

REVIEW

Utilità dei derivati del sangue di seconda generazione nella terapia rigenerativa delle ferite complesse delle estremità

Alessandro CRISCI ^{1, 2 *}, Tomoyuki KAWASE ³, Raffaele D'ADAMO ², Michela CRISCI ²

¹Department of Medicine, Surgery and Dentistry, Scuola Medica Salernitana, University of Salerno, Fisciano, Salerno, Italy; ²Unit of Skin Surgery, Skin Transplants and Difficult Wounds, "Villa Fiorita" Nursing Home, Aversa, Caserta, Italy; ³Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan

*Corresponding author: Alessandro Crisci, Department of Medicine, Surgery and Dentistry, Scuola Medica Salernitana, University of Salerno, Fisciano, Salerno, Italy. E-mail: alcrisci@unisa.it

RIASSUNTO

L'obiettivo crescente nel campo dell'ingegneria tissutale multidisciplinare è la rigenerazione, il miglioramento o la sostituzione, in modo prevedibile, di tessuti danneggiati o mancanti, a causa di una varietà di condizioni, causate da traumi, malattie e invecchiamento. Per garantire l'ampia disponibilità di metodi di ingegneria tissutale, in campo clinico, è necessario modificarli per renderli facilmente disponibili e relativamente facili da applicare nella routine clinica quotidiana. La fibrina piastrinica di Choukroun (PRF) e i suoi derivati sono stati impiegati in una vasta gamma di campi medici, come concentrato sopra-naturale di fattori di crescita autologhi, in grado di stimolare la rigenerazione dei tessuti. Piastrine sono state trovate all'interno del coagulo, in toto, in tutti i suoi gruppi, anche se all'interno del gruppo A-PRF la conta piastrinica è maggiore nella porzione distale, lontano dal *buffy coat* (BC) rispetto al L-PRF. Linfociti T e B, cellule staminali e monociti sono stati trovati vicino al BC. La diminuzione del numero di giri e l'aumento della durata della centrifugazione nel gruppo A-PRF ha dato un conteggio di neutrofili più elevato nella porzione distale dei coaguli. In conclusione, i risultati di questo studio sistematico ha evidenziato gli effetti positivi della PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) sulla guarigione delle ferite, dopo terapia rigenerativa in ferite cutanee del piede complicate.

ABSTRACT

USE OF SECOND-GENERATION BLOOD PRODUCTS IN REGENERATIVE THERAPY OF COMPLEX EXTREMITY WOUNDS

Regeneration is the ultimate aim in the field of multidisciplinary tissue engineering, as well as the amelioration or substitution, in a predictable manner, of damaged or missing tissues, as a result of a variety of reasons, including trauma, diseases and aging. To guarantee an ample availability of different tissue engineering techniques, in clinical fields, these need to be changed and adapted in order to render them accessible and relatively easy to apply in everyday clinical routines. Choukroun platelet fibrin (PRF) and its derivatives have been implemented in a vast array of medical fields, as a supra-natural concentrate of autologous growth factors, able to simulate tissue regeneration. Platelet have been found inside blood clots, in its entirety, in all its different groups, even if inside the A-PRF group, the platelet counts is higher in the distal portion, distal from the Buffy coat (BC), compared to L-PRF. T and B lymphocytes, stem cells, and monocytes have been found close to the BC. Lowering the number of spins and increasing the duration of centrifugation in the A-PRF group lead to a higher neutrophil count in the distal portion of the clots. In conclusion, the results of this systematic study have highlighted the positive effects of PRF and its derivatives (A-PRF, i-PRF) in wounds healing, after regenerative therapy of complicated cutaneous foot lesions.

(Cite this article as: Crisci A, Kawase T, D'Adamo R, Crisci M. Utilità dei derivati del sangue di seconda generazione nella terapia rigenerativa delle ferite complesse delle estremità. *Med Chir Caviglia Piede* 2020;44:3-13. DOI: 10.23736/S2284-2993.20.01811-7)

KEY WORDS: Stem cells; Platelet-rich fibrin; Wounds.

Se una ferita non guarisce in modo ordinato e tempestivo, o se il processo di guarigione non ha integrità strutturale, la ferita può essere considerata complessa. Le ferite complesse costituiscono un problema significativo, non solo nelle strutture specializzate, ma anche nella prati-

ca clinica quotidiana. La guarigione della ferita complessa avviene attraverso gli stessi meccanismi di una ferita acuta, ma in questo caso, di solito si forma un abbondante tessuto di granulazione, con una fibrosi eccessiva che porta alla contrazione della cicatrice e alla perdita di funzione.¹⁻⁵

La guarigione di una ferita comporta una complessa cascata di eventi, che coinvolgono molti tipi di cellule, che sono spinti dal rilascio di mediatori solubili e segnali in grado di influenzare queste cellule in circolazione e riportarle ai tessuti danneggiati. Le piastrine sono responsabili dell'attivazione e del rilascio di importanti biomolecole, tra cui proteine piastriniche specifiche e fattori di crescita, tra cui: fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF), fattori di coagulazione, molecole di adesione, citochine/chemochine e fattori angiogeni, in grado di stimolare la proliferazione e l'attivazione delle cellule coinvolte nei processi di guarigione delle ferite, quali fibroblasti, neutrofilo, macrofagi e cellule staminali. Nonostante l'uso diffuso di concentrati piastrinici umani (HPC) (Figura 1), come il plasma ricco di piastrine (PRP), uno degli svantaggi riportati è l'uso di fattori anticoagulanti in grado di ritardare le normali fasi di guarigione della ferita.^{4, 5} A causa di questi limiti, ulteriori ricerche sono state finalizzate allo sviluppo di concentrati piastrinici di seconda generazione che escludono l'uso di fattori anticoagulanti. Come tale, un concentrato piastrinico senza fattori di coagulazione, successivamente definito come fibrina ricca di piastrine (PRF), è stato sviluppato da Choukroun, con particolare riferimento alle sue capacità di accelerare la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti. Le proprietà biologiche e cliniche di questi concentrati li rendono estremamente attraenti per l'uso nella medicina rigenerativa. Questa impalcatura di fibrina, priva di qualsiasi proprietà citotossica, è ottenuta da 9 ml di sangue del paziente, dopo centrifugazione eseguita con una centrifuga PRF-DUO Quattro e l'uso di provette di vetro gel-free e non di PET contenenti silice sottovuoto;⁶ contiene una varietà di cellule del sangue — tra cui linfociti, piastrine, linfociti B e T, monociti, cellule staminali e granulociti neutrofilo — e diversi fattori di crescita. L-PRF (leucociti-PRF) e i suoi derivati (A-PRF, i-PRF e così via), quindi, contengono globuli bianchi, necessari durante i processi

di guarigione delle ferite. Inoltre, poiché i globuli bianchi, compresi i neutrofilo e i macrofagi, sono tra i primi tipi di cellule presenti nei siti della ferita, il loro ruolo include anche la fagocitosi dei detriti cellulari, microbi e dei tessuti necrotici, prevenendo così le infezioni. I macrofagi sono anche cellule derivate dalla stirpe mieloide e sono considerati uno dei principali fattori di rischio di infezione.

Nel 2008, Lundquist *et al.*⁷ sono stati tra i primi a valutare gli effetti della PRF sui fibroblasti provenienti dal derma umano. Si è visto che l'effetto proliferativo della PRF sui fibroblasti dermici era significativamente superiore a quello della colla di fibrina e del PDGF-BB ricombinante. Inoltre, la PRF ha indotto un rapido rilascio di collagene I, e il rilascio prolungato e una protezione contro la degradazione proteolitica di fattori fibrogeni endogeni, che è importante per la guarigione.

In un secondo studio *in vitro* condotto da Lunquist *et al.* nel 2013,⁸ la PRF ha indotto l'effetto mitogeno e migratorio sui fibroblasti dermici umani in coltura e ha anche dimostrato che i fibrociti (cellule importanti nella guarigione delle ferite acute) potrebbero essere coltivati sui dischi di PRF, favorendo ancora di più la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti molli. Successivamente, Clipet *et al.*⁹ hanno scoperto che la PRF induce la sopravvivenza e la proliferazione di fibroblasti e cheratinociti. È stato scoperto che la PRF induce effetti mitogeni sulle cellule endoteliali attraverso la via di attivazione extracellulare della chinasi regolata dal segnale. È stato osservato un lento e costante rilascio di fattori di crescita dalla matrice della PRF, che ha rilasciato VEGF, un fattore di crescita noto, responsabile della risposta mitogena endoteliale.

L-PRF e suoi derivati nella guarigione delle ferite complesse del piede

L-PRF

Nella sezione longitudinale di un coagulo L-PRF, prodotto secondo il protocollo standard di centrifugazione (2700 rpm per 12 minuti) (325G) con Centrifuga DUO (PRF DUO, PROCESS® per PRF, Nizza, Francia) (Kobayashi *et al.*, 2016), si trova un denso coagulo di fibrina con uno spazio inter-fibroso minimo. Le cellule sono osservate lungo l'intero coagulo, anche se diminuiscono nelle porzioni distali del coagulo PRF.⁴

In vitro, la L-PRF ha mostrato una stimolazione notevole della proliferazione di tutte le linee cellulari sperimentate, in particolare dei fibroblasti e dei precheratinociti

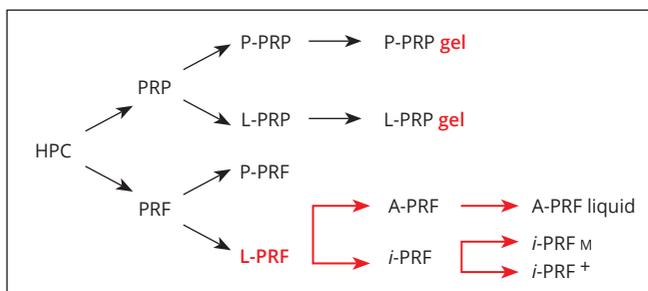


Figura 1.—Concentrati piastrinici umani (HPC). PRP: plasma ricco di piastrine; PRF: fibrina ricca di piastrine.

per più di 28 giorni. La L-PRF è apparso dunque, come un biomateriale molto interessante per la guarigione delle ferite recalcitranti.

Avanzato-PRF

I coaguli di PRF formati con il protocollo di centrifugazione Advanced-PRF (A-PRF), nelle sue varianti A-PRF+ (1300 rpm, 8 minuti) e A-PRF Liquid (1300 rpm, 5 minuti)¹⁰ a seguito delle indicazioni di Choukroun, hanno dimostrato una struttura più libera, con uno spazio inter-fibroso maggiore e un maggior numero di cellule all'interno del coagulo. Inoltre, le cellule sono distribuite in modo più uniforme all'interno di questo, rispetto alla L-PRF, e alcune cellule potrebbero essere trovate anche nella parte distale. Un'immagine rappresentativa della distribuzione cellulare all'interno di A-PRF è fornita in Figura 2 e Figura 3.

Formulazione PRF iniettabile (i-PRF)

Lo sviluppo di una soluzione iniettabile PRF (denominata i-PRF)^{11, 12} (centrifugata a 700 rpm [60g] per 3 minuti) e dei suoi derivati i-PRF M (700 rpm per 4 minuti) e i-PRF+ (700 rpm per 5 minuti) è stato perseguito con l'obiettivo di fornire al medico un concentrato piastrinico che si è dimostrato facile da usare in una formulazione liquida, da solo o in combinazione con vari biomateriali. Sfruttando una velocità di centrifugazione più lenta e più breve, è possibile osservare un maggior numero di cellule rigenerative con una maggiore concentrazione di fattori di crescita, rispetto ad altre formulazioni di PRF ottenute a velocità di centrifugazione più elevate. Dalla colorazione HE si può osservare che i-PRF, solidificata in gel dopo 20 minuti, presenta una rete di fibrina circondata da leucociti (principalmente linfociti) e alcuni eritrociti.¹³ Il nostro gruppo di lavoro ha usato provette in PET con silice (clot activator Vacuptaca cod.30023) per produrre i-PRF equino, ottenendo un Tempo di coagulazione di i-PRF (700 rpm [60g] per 3') = 3,30 minuti; con un Temperatura di lavorazione 26,3°C da 9 ml di sangue si ottiene 3 ml di i-PRF.

Un Tempo di coagulazione di i-PRF a bassa forza centrifuga relativa (RCF) (600 rpm [40g] per 8') = 6,30 minuti;

con una Temperatura di lavorazione di 25,4 °C da 9 ml di sangue si ottiene 3,2 ml di i-PRF.

Un Tempo di coagulazione di i-PRF a bassa RCF di 500 rpm [28g] per 10' = 3,10 minuti; con una Temperatura di lavorazione di 22,4°C da 9 ml di sangue si ottiene 3,5 ml di i-PRF.

Individualmente le cellule presentano caratteristiche normali quali: integrità della membrana e normocromatismo, dimostrazione dell'assenza di atipia e conservazione degli aspetti morfologici. La fibrina è sistemata in filamenti sottili, tortuosi ed eosinofili che a volte formano ammassi compatibili con aggregati di piastrine e fibrina. All'immunocolorazione per il fattore TGF-β al terzo giorno è stata rilevata la presenza di colorazione brunastra moderatamente intensa nel nucleo e nel citoplasma dei leucociti, dimostrando un'immunoreattività cellulare del i-PRF. Si ipotizza che i-PRF manterrebbe le sue proprietà anche dopo 10 giorni, poiché il coagulo si scioglie sostanzialmente dopo 10 giorni.

Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno riferito che velocità e tempo non influenzano le concentrazioni di monociti e cellule staminali, ma sono in grado di influenzare le concentrazioni di piastrine e neutrofili. Di conseguenza, l'A-PRF contiene un numero maggiore di piastrine, che si trova principalmente nella porzione di membrana distale, e include più neutrofili rispetto all'L-PRF. Questo tipo di concentrato

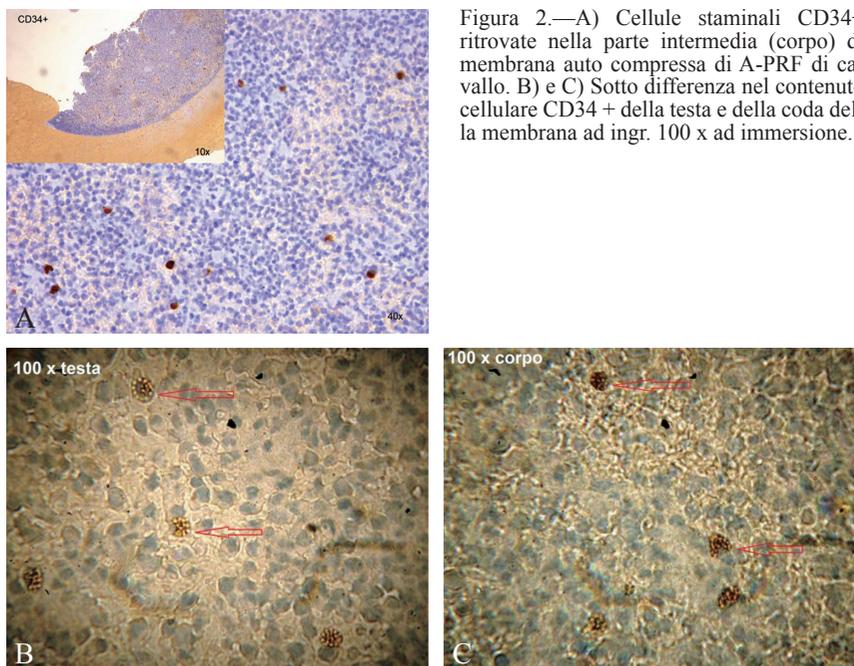


Figura 2.—A) Cellule staminali CD34+ ritrovate nella parte intermedia (corpo) di membrana auto compressa di A-PRF di cavallo. B) e C) Sotto differenza nel contenuto cellulare CD34+ della testa e della coda della membrana ad ingr. 100 x ad immersione.

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The production of derivative works from the Article is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.

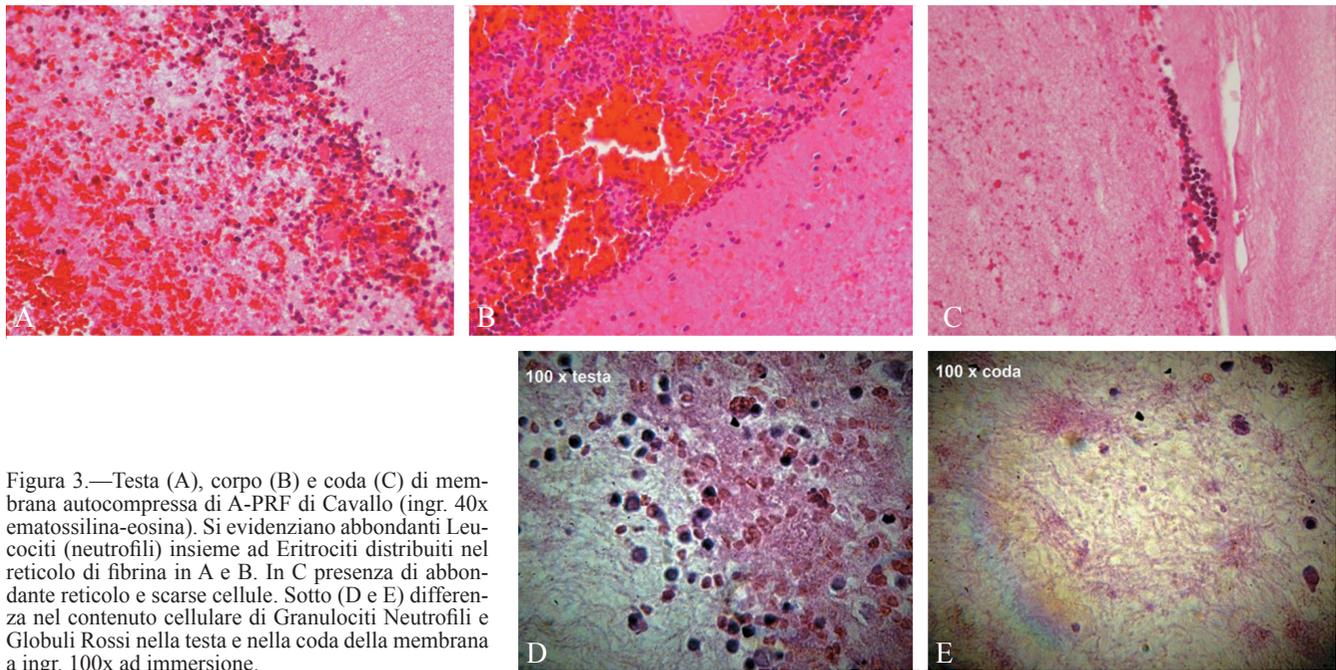


Figura 3.—Testa (A), corpo (B) e coda (C) di membrana autocompressa di A-PRF di Cavallo (ingr. 40x ematossilina-eosina). Si evidenziano abbondanti Leucociti (neutrofili) insieme ad Eritrociti distribuiti nel reticolo di fibrina in A e B. In C presenza di abbondante reticolo e scarse cellule. Sotto (D e E) differenza nel contenuto cellulare di Granulociti Neutrofili e Globuli Rossi nella testa e nella coda della membrana a ingr. 100x ad immersione.

ha il potenziale per migliorare l'angiogenesi esprimendo la metalloproteinasi-9 della matrice enzimatica. Pertanto, l'inclusione neutrofila nella membrana PRF, con l'uso di A-PRF, potrebbe essere presa in considerazione se l'angiogenesi è uno degli obiettivi.

Le analisi dello studio del Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno anche rivelato che le piastrine erano le uniche cellule presenti in ogni area del coagulo fino all'87±13% nel gruppo L-PRF, e fino all'84±16% nel gruppo A-PRF. 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%), le cellule staminali CD34+ (Figura 2) (L-PRF: 17±6%, A-PRF: 21±11%) e i monociti (L-PRF: 19±9%, A-PRF: 22±8%) non sono stati trovati oltre un certo punto ad un massimo del 30% della lunghezza totale del coagulo, poiché sono distribuiti vicino al BC creato dal processo di centrifugazione. Il nostro gruppo di lavoro le ha trovate nei 2/3 prossimali di una membrana compressa di A-PRF equina (Figura 2).

PRF: vari tipi di effetti sul rilascio dei fattori di crescita

È stato a lungo osservato che le PRF rilasciano una serie di fattori di crescita per il microambiente. Il TGF-β (fattore di crescita trasformante) ha un'ampia efficacia di oltre

30 fattori, noti come agenti fibrogenetici, e il TGF-β1 è il più descritto in letteratura. È uno stimolatore noto di vari tipi di proliferazione cellulare, compresi gli osteoblasti, e costituisce l'agente fibrogenetico più potente tra tutte le citochine. Svolge un ruolo di primo piano nella sintesi delle molecole della matrice, come il collagene-1, e la fibronectina, sia da osteoblasti che da fibroblasti. Anche se i suoi meccanismi regolatori sono particolarmente complessi, il TGF-β1 svolge un ruolo attivo nella guarigione delle ferite cutanee, in tutti i diversi distretti.

Il VEGF (fattore di crescita vascolo endoteliale) è il fattore di crescita più potente nell'angiogenesi tissutale. Ha potenti effetti sul rimodellamento dei tessuti e l'incorporazione del VEGF in diversi biomateriali ossei ha dimostrato un aumento della nuova formazione ossea, evidenziando così gli effetti rapidi e potenti del VEGF.

I fattori di crescita insulino-simili (IGF) sono un regolatore positivo della proliferazione e differenziazione per la maggior parte dei tipi di cellule mesenchimali, che agiscono come agenti di protezione cellulare. Queste citochine, pur essendo mediatori della proliferazione cellulare, costituiscono anche l'asse principale della morte cellulare pianificata (apoptosi),¹⁴ inducendo segnali di sopravvivenza in grado di proteggere le cellule da molti stimoli apoptotici.

Bayer *et al.*¹⁵ hanno esplorato per la prima volta le proprietà della PRF, che potrebbero contribuire alle sue

attività antinfiammatorie/antimicrobiche. È stato riscontrato che nei cheratinociti umani, la PRF è stata in grado di indurre l'hBD-2 (β -defensina 2). I fattori di crescita rilasciati dalle piastrine inducono il peptide antimicrobico beta-defensina-2 umano nei cheratinociti primari, Bayer *et al.* hanno mirato ad analizzare l'influenza del PRGF sull'espressione di hBD-3, perché hBD-3 appartiene all'innato sistema di difesa epiteliale e sembra svolgere un ruolo importante nel processo di guarigione della ferita. Oltre alle sue proprietà antimicrobiche e di cicatrizzazione delle ferite, l'hBD-3 attiva diverse cellule immunitarie e infiammatorie e stimola la migrazione e la proliferazione dei cheratinociti epidermici e la produzione di citochine proinfiammatorie e chemochine. Pertanto, hBD-3 si mostra come un mediatore chiave nell'immunità cutanea e nella guarigione delle ferite.

Effetti del PRF sulla guarigione cutanea della ferita del piede e sull'angiogenesi *in vivo*

L'effetto dei fattori di crescita dei tessuti, e in particolare la PRF e i suoi derivati, sono stati particolarmente studiati per quanto riguarda la guarigione e l'angiogenesi delle ferite dei tessuti molli in vari modelli animali e nell'uomo. In molte procedure mediche, gli usi della PRF sono stati

combinati principalmente per ottenere una gestione efficace delle ulcere delle gambe, che in precedenza si sono rivelate difficili da guarire, comprese le ulcere del piede diabetico, le ulcere venose e le ulcere arteriopatiche. Inoltre, la PRF è stata studiata dagli Autori nella gestione delle ulcere della mano diabetica e nei difetti cicatriziali dei tessuti del piede (Figura 4, 5, 6, 7, 8).¹⁶⁻¹⁸

Il nostro gruppo di lavoro ha proposto l'uso della fibrina ricca di piastrine e leucociti (L-PRF) anche nell'osteomielite nel piede diabetico ulcerato, ipotizzando il recupero da questa grave patologia. In questo studio, l'obiettivo era quello di standardizzare l'uso di L-PRF nei pazienti con osteomielite, per utilizzare questo concentrato piastrinico di seconda generazione, facilitando i processi di guarigione.^{16, 18}

Gli autori hanno prodotto e utilizzato membrane L-PRF create da sangue periferico, in pazienti con osteomielite, con lesioni cutanee in arti inferiori da almeno 6 mesi. Le membrane, insieme al liquido derivato dalla compressione con Wound L-PRF Box, sono state inserite nella lesione cutanea, fino all'osso, dopo lo sbrigliamento chirurgico e idonea terapia antibiotica mirata dopo identificazione del germe ed antibiogramma. Gli antibiotici più comunemente usati sono stati la gentamicina, tobramicina e vancomicina, sia per via generale che locale. Il solfato di gentamicina

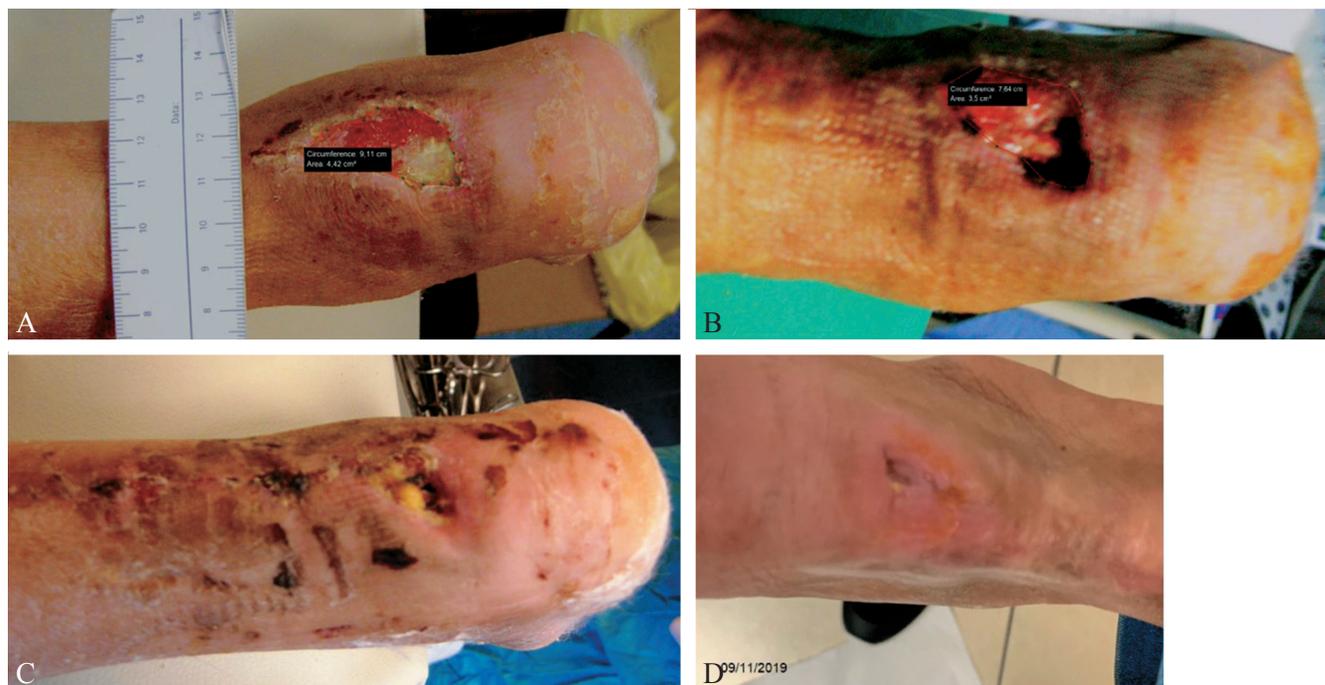


Figura 4.—Deiscenza postchirurgica dopo la ricostruzione del tendine di Achille (A) trattata con L-PRF (B) dopo sette giorni dalla terapia (C) e a guarigione completa (D).



Figura 5.—Uso di fibrina ricca di piastrine e leucociti (L-PRF) nell'ulcera del piede diabetico con osteomielite. A, C, D, E) Diversi momenti di guarigione della ferita, stabili dopo due anni; B) NMR del paziente con la lesione ossea (Crisci *et al.* 2018).¹⁶



Figura 6.—Stesso paziente dopo 4 anni dalla terapia con L-PRF. Il riscontro delle NRM dimostra una rigenerazione ossea della lesione (Crisci *et al.* 2018).¹⁶

è un eccellente additivo al polimetilacrilato grazie al suo ampio spettro di azione, alle sue proprietà battericide, al basso tasso di agenti patogeni resistenti e alla buona termo stabilità. La vancomicina e la tobramicina sono entrambe solubili in acqua e disponibili in forma di polvere.¹⁹ È stata eseguita una fasciatura elastica in due strati dalle dita delle estremità fino alla parte prossimale, per ottenere un

gradiente pressorio disto-prossimale. L'evoluzione delle lesioni è stata successivamente analizzata nel tempo (Figura 5, 6, 7) fino a 4 anni.¹⁶

Tutti i pazienti hanno mostrato positività al test Probe-to-Bone, e la risonanza magnetica nucleare ha mostrato un ispessimento cortico-periosteale e/o focolai di osteolisi del cortico-spugnoso, adiacente all'ulcera. I batteri Gram-po-

This document is protected by international copyright laws. No additional reproduction is authorized. It is permitted for personal use to download and save only one file and print only one copy of this Article. It is not permitted to make additional copies (either sporadically or systematically, either printed or electronic) of the Article for any purpose. It is not permitted to distribute the electronic copy of the article through online internet and/or intranet file sharing systems, electronic mailing or any other means which may allow access to the Article. The use of all or any part of the Article for any Commercial Use is not permitted. The production of derivative works from the Article is not permitted. It is not permitted to remove, cover, overlay, obscure, block, or change any copyright notices or terms of use which the Publisher may post on the Article. It is not permitted to frame or use framing techniques to enclose any trademark, logo, or other proprietary information of the Publisher.



Figura 7.—Paziente con ulcera diabetica con osteomielite da 2 anni. Risultato dopo una sola applicazione di A-PRF come terapia.

sitivi sono stati trovati nei nostri pazienti nel 52% dei casi. Tra gli agenti trovati sono stati trovati 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. Al follow-up oggi, le lesioni osteomielitiche cutanee risultano

guarite in tutti i pazienti trattati, senza segni di infezione né ricadute. In uno dei pazienti trattati agli ultimi controlli clinici abbiamo riscontrato un'inizio della rigenerazione ossea alla NMR (Figura 6).

L'uso di L-PRF nel trattamento delle lesioni cutanee del piede da parte degli AA ha presentato i risultati riportati, con uno sforzo minimo 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 ogni paziente è stato sottoposto è basso (i nostri pazienti sono stati tutti trattati in anestesia loco-regionale).

Discussione

Le proprietà rigenerative di L-PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) come coadiuvante chirurgico hanno ricevuto una notevole attenzione sin dall'introduzione del materiale nei primi anni del millennio.

Il successo dei concentrati piastrinici dipende dalla concentrazione piastrinica, dal numero/tipo di leucociti intrappolati nella membrana di fibrina e anche dal rilascio di molecole bioattive nei siti di lesione che attiveranno il processo rigenerativo.

In questi concentrati piastrinici, sono abbondanti sul reticolo di fibrina le proteine adesive: Fibrinogeno (Fg), Fibronectina (Fn), Vitronectina (Vn), Trombospondina-1 (TSP-1). La Fn partecipa alla riparazione delle ferite e promuove l'attività mitogena del Fattore di Crescita derivato dalle Piastrine (PDGF). Tra i fattori di crescita (FG) im-



Figura 8.—Lesioni diabetiche della mano trattate con PRF (Crisci 2018).¹⁷

magazzinati nelle piastrine ed essenziali per la riparazione delle ferite ci sono il PDGF, con la -AB e -C (isoforme predominanti nelle piastrine); sono presenti anche il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) essenzialmente VEGF-A, il fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), il fattore di crescita basale dei fibroblasti (bFGF) specie FGF-2; il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF) e l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Figura 9, 10). I membri della famiglia TGF- β sono importanti nella riparazione delle ferite e nella formazione delle cicatrici. Con un importante ruolo nella guarigione, le piastrine sono una ricca fonte di citochine e chemiochine. Un esempio è RANTES, una chemiochina depositata sull'endotelio infiammato da un meccanismo P-selectina-piastrine-dipendente, ma vi sono anche interleu-

china-6 (IL-6), interleuchina-4 (IL-4) e interleuchina-10 (IL-10) e molecole chemio tattiche come chemiochine ligand-5 (CCL5) ed eotaxina.

Oltre alle piastrine, l'inclusione di altri componenti come i leucociti migliorano il processo di guarigione. I leucociti, infatti rilasciano VEGF e TGF che, ancora una volta, migliorano la chemiotassi e l'angiogenesi.

In generale, questi fattori reclutano e attivano le cellule staminali e ne inducono la mitogenesi e la differenziazione. Pertanto, i concentrati piastrinici come A-PRF hanno tutte le caratteristiche biologiche per indurre una guarigione ottimale.^{20, 21}

D'altra parte, non ci sono prove chiare per spiegare il potenziale antimicrobico di questo biomateriale, che si differenzia strutturalmente e biologicamente da altre forme

Figura 9.—Variazioni TGF- $\beta 1$ /PDGF-AB nel tempo. Confronto L-PRF con PRGF e i-PRF.

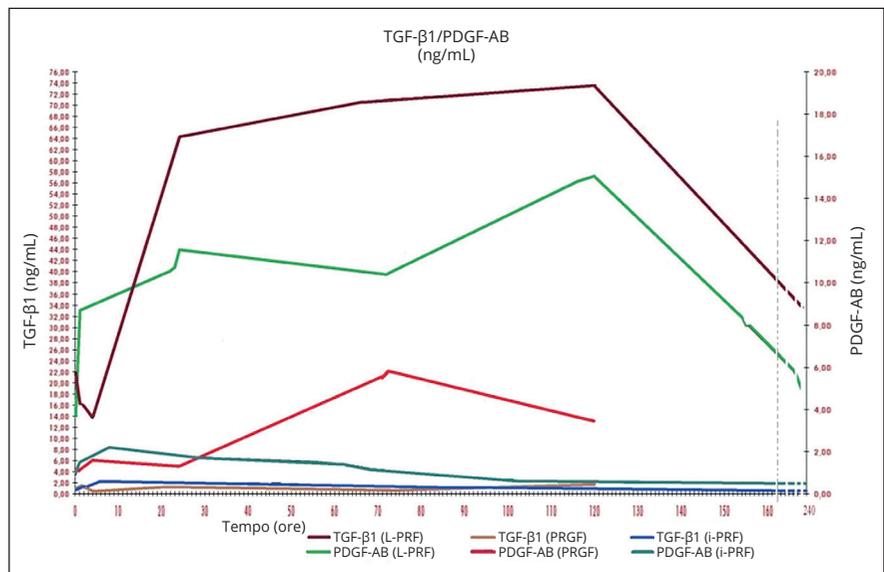
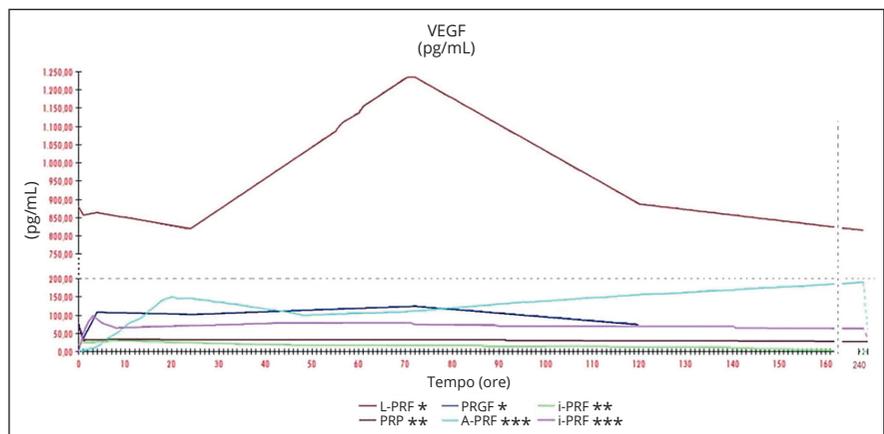


Figura 10.—VEGF variazioni nel tempo. Confronto tra L-PRF, PRGF, i-PRF, PRP e A-PRF. *da Dohan Ehrenfest *et al.*, 2012; **da Miron *et al.*, 2017; ***da Al-Maawi *et al.*, 2018.



di HPC. Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno istologicamente descritto A-PRF™ come una matrice cellulare seminata su fibrina, che contiene varie cellule del sangue, tra cui: piastrine, linfociti (B e T), monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili, che sono in grado di rilasciare una serie di fattori di crescita. Teoricamente, i componenti biologici e i meccanismi fisiologici per esercitare l'attività antimicrobica sono simili tra tutti i vari tipi di HPC e simili al sangue coagulato.

Tuttavia, tutti questi biomateriali autologhi si differenziano tra loro per: I) la miscela variabile dei tipi cellulari; II) la vitalità delle cellule contenute; III) il loro metodo di attivazione, naturale o chimico; IV) la densità della rete fibrinica; V) le interazioni tra componenti cellulari ed extracellulari; VI) il rilascio di una varietà di proteine.

Tutte queste differenze potrebbero avere un risultato significativo sulle rispettive attività antinfiammatorie e antimicrobiche. Inoltre, i meccanismi e la dinamica delle singole componenti antimicrobiche presenti in questi biomateriali sono difficilmente comprensibili.

A-PRF™ mostra l'attività antimicrobica contro tutti i singoli organismi testati in questo studio su un arco di tempo di 24 ore. Questi risultati sono coerenti con quelli ottenuti da studi precedenti, valutando le proprietà antimicrobiche di altri preparati HPC. Poiché A-PRF™ mostra proprietà antimicrobiche, è necessario stabilire se questa attività è significativamente superiore a quella di un coagulo di sangue intero. La ricerca futura è necessaria per esplorare lo spettro antimicrobico di A-PRF™ e di tutti i derivati di L-PRF, e per esplorare la possibilità che possa agire come substrato per facilitare la crescita di organismi specifici. In particolare, per il chirurgo, è importante ricordare che lo *Staphylococcus Aureus* è una delle principali cause di infezioni nosocomiali acquisite, infezioni correlate a dispositivi medici interni e infezioni delle ferite chirurgiche. Una ricerca significativa è oggi focalizzata sui trattamenti alternativi per l'infezione da *S. Aureus*, per ridurre il rischio di selezionare ceppi resistenti agli antibiotici.²²⁻²⁸ Questo è il motivo per cui *S. Aureus* è ancora l'organismo più frequentemente testato in letteratura, esaminando l'attività antimicrobica degli HPC.²² Diversi preparati HPC hanno dimostrato attività antimicrobica, sia per ceppi di *S. Aureus* resistenti alla meticillina che sensibili. La *Candida albicans* è la specie fungina più frequentemente isolata nel microbioma. La compromissione della risposta immunitaria potrebbe consentire a questi funghi opportunistici di dare infezione.^{29, 30} A-PRF™ ha una maggiore capacità di inibire costantemente la crescita di *C. Albicans*, rispetto ad un coagulo di sangue intero. Inoltre, *C. albicans* è

meno sensibile ai componenti antimicrobici delle piastrine e conferma le scoperte fatte nel 2002 da Tan *et al.*³¹ che hanno notato come i peptidi antimicrobici delle piastrine umane fossero più potenti contro i batteri rispetto ai funghi. A-PRF™ mostra un maggiore potenziale di inibizione dello *Streptococcus mutans* rispetto al coagulo di sangue naturale. Tuttavia, poiché nessun altro HPC è stato testato contro questo organismo, il meccanismo di inibizione e il suo potenziale clinico richiedono ulteriori studi.

Anche se i risultati di vari studi suggeriscono che l'A-PRF™ mostra un'attività antimicrobica, sono presenti diverse limitazioni. In primo luogo, l'esame in vitro non imita una situazione clinica in cui l'A-PRF™ sarebbe impiegato in un ambiente, circondato da tessuti che reagiscono a un evento chirurgico. In questo scenario, l'A-PRF™ è in grado di interagire con diverse cellule e citochine coinvolte nei processi di guarigione delle ferite e può modificare la risposta immunitaria iniziale e le fasi di guarigione. I fattori di crescita delle piastrine attivate rilasciano all'interno del reticolo di fibrina che può modificare l'espressione di peptidi antimicrobici dai tessuti circostanti. È possibile che numerosi fattori correlati al paziente possano influenzare la qualità di A-PRF™. Yajamanya *et al.*³² hanno dimostrato che la matrice di fibrina formatasi nella versione PRF in pazienti anziani era organizzata in modo più generico rispetto alla matrice fibrina formatasi in pazienti più giovani. L'entità di questa scoperta deve ancora essere determinata. I tipi di cellule, il numero di cellule e la concentrazione dei componenti plasmatici differiscono all'interno di ogni coagulo e tra i singoli coaguli, ogni disco campione non può essere identico ad un altro.

Uno dei problemi da valutare è che non c'è ancora modo di determinare se il materiale testato sia battericida o batteriostatica. Su questo argomento, il nostro gruppo di studio sta lavorando proprio in questo momento. A parte gli svantaggi, il metodo di diffusione del disco si è dimostrato sufficiente a dimostrare che l'A-PRF™, come tutti gli altri derivati dell'L-PRF, mostra attività antimicrobica.^{17, 31-35}

Conclusioni

Ancora troppo poco si sa delle proprietà antimicrobiche della PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) e una scarsa quantità di studi ha fatto luce, fino ad oggi, su questo fenomeno. Dal punto di vista dell'ingegneria tissutale, è interessante sottolineare che nessun progetto di ricerca si è concentrato sulla forza, la rigidità e la resilienza delle PRF, nonostante il suo utilizzo clinico negli ultimi 15 anni. Quindi, un'interessante prospettiva futura è quella

di caratterizzare meglio le proprietà di questi biomateriali, e la ricerca futura dovrebbe concentrarsi su quei fattori che potrebbero migliorare ulteriormente le sue caratteristiche, per le sue varie applicazioni biomediche. È di fondamentale importanza che le ricerche future, concentrandosi sull'uso della PRF come coadiuvante nelle terapie rigenerative dei tessuti molli, progettino studi appropriati, con i controlli necessari, per stimare ulteriormente il potenziale rigenerativo della PRF nella guarigione delle ferite dei tessuti molli, in particolare per quanto riguarda la guarigione delle ferite ai piedi. L'uso di A-PRFTM nella pratica clinica ha mostrato un grande potenziale per migliorare la guarigione e migliorare gli esiti chirurgici, poiché funziona come impalcatura autologa, in grado di ospitare cellule e composti bioattivi. Tuttavia, il potenziale antimicrobico di questo materiale è stato dimostrato, e può essere una proprietà importante, che contribuisce ulteriormente ad eventi di guarigione accelerati e non complicati, clinicamente accertati. I risultati di questo studio indicano che A-PRFTM mostra, tuttavia, un'attività antimicrobica contro *S. Aureus*, *S. Mutans*, *Enterococcus faecalis* e *C. Albicans*. Inoltre, lo spettro e la potenza come agente antimicrobico sono molto inferiori a quelli di un antimicrobico chirurgico (antibiotico specifico). Il nostro gruppo di lavoro sta svolgendo ricerche, effettuando indagini che coinvolgano l'A-PRFTM e i suoi derivati per accertare 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, stiamo esplorando il potenziale clinico di PRF come veicolo di somministrazione di farmaci locali nei siti infetti. Gli studi futuri dovrebbero aumentare la variabilità del paziente e le dimensioni del campione per tutti gli studi basati sull'HPC.

Conclusioni

Ulteriori studi clinici, istologici e statistici sono necessari per comprendere i vantaggi di questa nuova tecnica. Tuttavia, non è possibile ignorare che, una volta ottenuti da campioni di sangue autologo, l'L-PRF e i suoi derivati hanno un volume ridotto e possono essere utilizzati solo in quantità limitata. Questo limita l'uso sistematico della PRF nelle lesioni cutanee maggiori. Anche se ci sono ampie possibilità di applicazione della PRF, è necessaria una profonda conoscenza del funzionamento di questo biomateriale, così come la conoscenza della sua biologia, efficacia e limiti, per ottimizzarne al meglio l'uso nella pratica clinica quotidiana.

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®. *Veterinaria Pratica Equina* 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, Benincasa G, Crisci A. Evaluation of genotyping methods and costs for IL1 α polymorphisms in Platelet Rich-Plasma (PRP); viewpoint for therapy on the diabetic foot ulcers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:575–7.
6. Tsujino T, Masuki H, Nakamura M, Isobe K, Kawabata H, Aizawa H, *et al.* Striking differences in platelet distribution between advanced-platelet-rich fibrin and concentrated growth factors: effects of silica-containing plastic tubes. *J Funct Biomater* 2019;10:43.
7. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008;16:356–63.
8. Lundquist R, Holmström K, Clausen C, Jørgensen B, Karlsmark T. 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, Massot M, Solhi H, Cathelineau G, *et al.* In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant Dent* 2012;21:51–6.
10. Ghanaati S, Booms P, Orłowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, *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, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, *et al.* Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig* 2017;21:2619–27.
13. de Almeida VH, *et al.* Histological preparation technique of blood derivative injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) for microscopic analyzer. *J Cytol Histol* 2018;9:3.
14. 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.
15. Bayer A, Lammel J, Tohidnezhad M, Lippross S, Behrendt P, Klüter T, *et al.* The Antimicrobial Peptide Human Beta-Defensin-3 Is Induced by Platelet-Released Growth Factors in Primary Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017;2017:6157491.
16. Crisci A, Marotta G, Licito A, Serra E, Benincasa G, Crisci M. Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (three clinical cases report). *Diseases* 2018;6:30.
17. Crisci A. The diabetic hand: a very neglected pathology. A Case Study & Review of Literatur. *J Surg (Northborough)* 2018;1134.
18. 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. *JAMD* 2018;21:197–203.
19. Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, Jamali AA. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg* 2009;23:100–7.
20. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean

A, Schaller B, *et al.* Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig* 2016;20:2353–60.

21. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol* 2017;88:112–21.

22. Fabbro MD, Bortolin M, Taschieri S, Ceci C, Weinstein RL. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets* 2016;27:276–85.

23. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW. 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.

24. 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(Suppl 1):43S–52S.

25. Crisci A, Rescigno C, Crisci M. The L-PRF membrane and its derivatives useful in Wound Care. *Italian Journal of Wound Care* 2019;3:19–26.

26. 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;27:158–67.

27. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Król W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with

growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:417–20.

28. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, Lynch AS, Torres VJ. Antibody-Based biologics and their promise to combat staphylococcus aureus infections. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:231–41.

29. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL Jr, *et al.* *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016;84:2724–39.

30. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017;44(Suppl 18):S12–22.

31. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002;70:6524–33.

32. 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.

33. Caruana A, Savina D, Macedo JP, Soares SC. From Platelet-rich plasma to advanced platelet-rich fibrin: biological achievements and clinical advances in modern surgery. *Eur J Dent* 2019;13:280–6.

34. Ozer K, Colak O. Leucocyte- and platelet-rich fibrin as a rescue therapy for small-to-medium-sized complex wounds of the lower extremities. *Burns Trauma* 2019;7:11.

35. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets* 2018;29:468–75.

Conflicts of interest.—The authors certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript. Manuscript accepted: January 17, 2020. - Manuscript received: December 6, 2019.