

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[®]

Il L-PRF modula le fasi dell'infiammazione e di proliferazione nel processo di guarigione delle ferite; in tal modo, riducendo il rischio di formazione di cicatrici cheloidi e ipertrofiche. Lo studio presentato in questa sede ha avuto l'obiettivo di standardizzare la procedura di preparazione del L-PRF.

Alessandro Crisci*, E. Serra, F. Cardillo***, M. Crisci******

*Unità di dermochirurgia, trapianti cutanei e hard-to-heal wound "Villa Fiorita" Aversa (CE)

**Laboratorio di microbiologia, Istituto per lo studio e il trattamento del diabete, Casagiove (CE)

***Medico veterinario libero professionista Sulmona (AQ)

****Facoltà di medicina e chirurgia Vasile Goldis, Arad (Romania)

La Fibrina Ricca di Piastrine (PRF) di Choukroun [2] rappresenta un nuovo passo nel concetto terapeutico del gel piastrinico con una elaborazione semplificata e modificazioni biochimiche poco artificiali. A differenza di altri concentrati piastrinici, questa tecnica non richiede né anticoagulanti, né trombina bovina, né alcun altro agente gelificante, il che lo rende non più del sangue naturale centrifugato senza additivi [15].

Anche se le piastrine e le citochine leucocitarie svolgono un ruolo importante nella biologia di questo biomateriale, la matrice di fibrina di supporto costituisce certamente l'elemento determinante responsabile del reale potenziale terapeutico del PRF. Entro pochi minuti, l'assenza di anticoagulante consente l'attivazione della maggior parte delle piastrine contenute nel campione da innescare la cascata di coagulazione. Il fibrinogeno è inizialmente concentrato nella parte superiore della provetta, finché l'effetto della trombina autologa circolante lo trasforma in una rete di fibrina. Il risultato è un coagulo di fibrina contenente le piastrine situate nel centro della provetta, proprio tra lo strato inferiore di globuli rossi e il plasma acellulare in alto.

Il coagulo di PRF viene poi posto

sulla griglia nel PRF Box[®] e coperto con il coperchio compressore. Questo produce un'economica membrana di fibrina autologa approssimativamente in un minuto. Il PRF Box[®] è ideato per la produzione di membrane di spessore costante che rimangono idratate per diverse ore e permette di recuperare il siero essudato espresso dai coaguli di fibrina che è ricco di proteine quali vitronectina e fibronectina [15]. Il coagulo PRF è prodotto da un processo di polimerizzazione naturale durante la centrifugazione, e la sua architettura di fibrina naturale sembra essere responsabile di un lento rilascio di fattori di crescita e glicoproteine dalla matrice (≥7 gg).

Abbondanti sono sul reticolo di fibrina le proteine adesive: fibrinogeno (Fg), fibronectina (Fn), vitronectina (Vn), trombospondina-1 (TSP-1). Tra i fattori di crescita immagazzinati nelle piastrine ed essenziali per la riparazione delle ferite ci sono il PDGF, con la -AB e -C; sono presenti anche il VEGF-A, il TGF-1, il FGF-2; il EGF, il HGF e l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Il Fibrinogeno può migliorare la cicatrizzazione di una ferita, aumentando sia la proliferazione che la migrazione cellulare, esso si assembla con Fn in fibrille indipendentemente dalla

formazione di fibrina. La fibrina è un fattore importante nella guarigione delle ferite, infatti l'esito della guarigione di una ferita è influenzato dalla stessa struttura della fibrina (spessore delle fibre, numero di punti di ramificazione, porosità e permeabilità del coagulo al sito della ferita [6]. I coaguli di fibrina ricchi di piastrine costituiscono anche un serbatoio bioattivo. Dopo il primo rilascio massivo di fattori di crescita, le piastrine ne sintetizzano e secernono di nuovi per il resto della loro vita (7-10 gg).

I gel di fibrina sono desiderabili come *scaffolds* in ingegneria tissutale per diversi motivi. La ragione più importante è inerente la compatibilità con la vita cellulare della fibrina, che è diversa in base ai molti componenti e ai processi coinvolti nella fabbricazione di *scaffolds*. Anche se i fattori di crescita piastrinici svolgono un importante ruolo nella biologia del PRF, l'architettura della fibrina e il contenuto dei leucociti sono due parametri chiave. La distribuzione delle piastrine e dei leucociti all'interno del coagulo di fibrina è stata evidenziata attraverso la conta ematologica, la microscopia fotonica e la SEM.

Un valido metodo di preparazione di PRF® deve efficacemente separare le piastrine dagli eritrociti e concentrarle senza danneggiare o lisare le piastrine stesse. I fattori di crescita contenuti all'interno dei granuli α non sono attivi durante la secrezione, essi si fondono con la membrana piastrinica attivandosi. Di conseguenza se le piastrine vengono danneggiate durante la produzione di PRF, non secerneranno più i fattori di crescita bioattivi. Esse, infatti, sono particolarmente labili e sensibili a ogni tipo di evento stressante durante la fase di lavorazione e di applicazione; per tale ragione anche la concentrazione di fattori di crescita può venire influenzata dalla manipolazione durante la processazione del sangue. Quindi è determinante standardizzare la procedura di preparazione e quindi anche il tipo di centrifugazione che viene effettuato, essa deve avere determinate caratteristiche, quali sono: la *Start Low* iniziale, la fase centrale a giri alti e uno *Stop Low* finale [11] e deve svolgersi a una

determinata temperatura e per un determinato tempo.

Il protocollo PRF di Choukroun è una tecnica semplice sviluppata in Francia da Choukroun *et al.* [2] e può essere considerata come un concentrato piastrinico di seconda generazione perché il concentrato naturale viene prodotto senza alcun anti-coagulante o agenti gelificanti. Piastrine e leucociti vengono raccolti con alta efficienza con questo metodo e i leucociti sono conservati in toto. Tuttavia, le piastrine sono attivate durante tale processo il quale porta a un sostanziale incorporamento di piastrine, leucociti e fattori di crescita nella matrice di fibrina.

In questo studio il disegno sperimentale è quello di standardizzare la produzione di L-PRF nel cavallo finalizzandola alla produzione umana.

È necessario stabilire un protocollo standard per preparare la L-PRF in modo da soddisfare i seguenti criteri:

- i fattori di crescita presenti nelle piastrine devono essere conservati per stimolare le cellule circostanti ospiti;
- le piastrine devono essere conservate nel reticolo di fibrina con il minimo danno o attivazione;
- il reticolo di fibrina tridimensionale deve essere utilizzato come scaffold per le cellule ospiti circostanti.

Anche se non ci sono prove che stabiliscono i potenziali vantaggi per l'uso di PRF, l'esistenza di studi contraddittori dimostra la necessità di ulteriori indagini nell'applicazione di PRF in casi clinici. È stato dimostrato, ad esempio, che la fibrina ricca in piastrine non riesce ad aumentare il tasso di guarigione nei tendini canini acutamente tagliati, e può anche promuovere un'eccessiva fibroplasia. Una risposta fibroblastica eccessiva ha comportato infatti una zona trasversale del tendine da 2 a 5 volte quella dei tendini di controllo non trattati in quello studio [10]. È stato dimostrato in uno studio stimolare la guarigione di ferite croniche alle estremità inferiori nei cavalli, mentre un contraddittorio studio ha segnalato effetti minimi positivi sulla guarigione e un aumento indesiderato di tessuto di granulazione nelle ferite acutamente create nella stessa zona. Per quanto riguarda l'utilità clinica

essa è probabilmente dovuta all'influenza dei fattori di crescita rilasciati sui tessuti di guarigione. Molte delle notizie contraddittorie sull'uso appropriato delle terapie piastriniche appaiono riguardare i tempi di applicazione e la procedura di preparazione con esiti favorevoli più spesso noti quando questi prodotti biologici sono utilizzati in ferite croniche non guarite (MacLellan-Plevin, 2014).

MATERIALI E METODI

Procedura di preparazione

La coagulazione del sangue inizia istantaneamente quando viene a contatto con la superficie del vetro a causa della mancanza di anticoagulante. Se il tempo necessario per raccogliere sangue e l'inizio della centrifugazione è estremamente prolungato, la fibrina polimerizza in modo diffuso nella provetta e sarà ottenuta solo una piccola parte di coagulo di sangue senza consistenza (PRF-like). Di conseguenza, la raccolta del sangue deve essere seguita da una centrifugazione immediata ed è un prerequisito nel disciplinare di produzione del PRF. È formulato per produrre in maniera omogenea una membrana spessa idratata e un essudato ricco di piastrine, leucociti, vitronectina e fibronectina espressi dai coaguli di fibrina [8]. Nel complesso, il L-PRF è meccanicamente resistente, in grado di sostenere carichi, ha una capacità di allungarsi due volte sotto tensione e mantiene le suture chirurgiche abbastanza bene (si deforma in modo significativo prima della lacerazione) [7].

La tecnica di produzione di PRF è molto semplice e non richiede altro che un campione di sangue e una centrifuga da tavolo (foto 1). Il protocollo è il seguente: i campioni di sangue vengono prelevati in provette da 9 mL, senza anticoagulante, né gel separatore, e vengono immediatamente centrifugati seguendo la seguente programmazione: 30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3'a 3000 rpm e 36" di decelerazione e arresto. Dopo la cen-



Foto 1. Centrifuga con termometro, bilancia e calibro digitali.

trifugazione, tre parti sono localizzate nella provetta: i globuli rossi in basso, un coagulo di fibrina che rappresenta il PRF nel mezzo, e il plasma acellulare nella parte superiore. Estruendo la matrice dal tubo con una pinza ed eliminando il coagulo rosso può essere ottenuto il PRF. Il successo di questa tecnica dipende interamente dalla velocità di raccolta del sangue e dal trasferimento nella centrifuga [4, 5]. Il sangue equino è stato utilizzato da Textor *et al.* [14] per la produzione di concentrato piastrinico (PRF). La nostra ipotesi è che il L-PRF è facile da produrre nel cavallo, senza modifiche del protocollo umano, anzi permettendo una migliore standardizzazione del protocollo umano. Un consenso scritto dei proprietari è stato previsto per tutti i cavalli e la procedura di raccolta del sangue è stata eseguita conformemente alle linee guida AVMA attuali. È stato da noi effettuato uno studio prospettico su sangue equino. Sono state utilizzate provette di vetro rivestite di plastica senza anticoagulante, né gel separatore (provette BD Vacutainer per Siero 9.0 ml), per la produzione di coaguli L-PRF e membrane da n° 6 cavalli sani di varia età (media±SD, 10±4,1 anni, range da 4-17 anni), sesso e razza. Il sangue è stato raccolto rapidamente sia con siringhe sterili da 10 cc che col sistema ago e camicia per provette Vacutainer (22" valore medio, inferiore a 25" per provetta) e immediatamente (entro 1 minuto) centrifugate secondo la precedente descrizione a una temperatura ambientale maggiore di 21°C. Le temperature della superficie interna ed esterna della centrifuga sono state registrate prima e durante la centrifugazione con un Termometro digitale con sonda interna (foto 1).

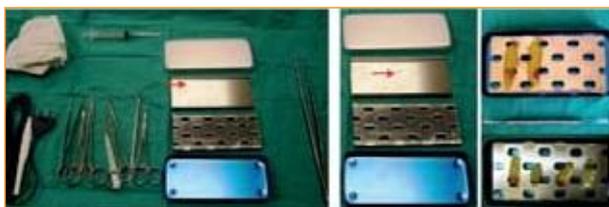


Foto 2. L-PRF Wound Box®.

Un nuovo dispositivo, sperimentato dagli autori per la preparazione e la standardizzazione di L-PRF in coaguli e membrane, è il L-PRF Wound Box® (foto 2). Utilizzando il PRF Box, la procedura di compressione dei coaguli in membrana viene eseguita attraverso una leggera compressione, lenta e omogenea e la membrana finale rimane sempre omogeneamente bagnata e intrisa di siero. Questo metodo delicato evita l'estrazione e la perdita di una quantità significativa di fattori di crescita. I PRF Box esistenti in commercio sono di varia foggia ed esercitano attraverso la placca di compressione una pressione diversa in base al peso, originando una membrana di vario spessore, larghezza e lunghezza. Il L-PRF Wound Box® progettato dagli autori è costituito da un contenitore metallico di cm 17,5 x 7,6 x 2 contenente una piastra di acciaio forato di mm 150 x 68 x 1,5, è presente una seconda piastra di acciaio che funge da compressore di mm 150 x 68 x 1,5 e del peso di 148 gr. (foto 2). Questa seconda piastra esercita una pressione di 142,437 Pa/cm². In questo studio la compressione è stata esercitata sul coagulo per 2, 5, 10, 15 minuti per produrre membrane.

Analisi macroscopica

Dopo la centrifugazione, il coagulo di L-PRF è stato rimosso dalla provetta usando pinzette sterili e una spatola liscia per rilasciare delicatamente il coagulo rosso dal *buffy coat*. Ogni coagulo di fibrina L-PRF ottenuto è stato collocato in un vassoio per misurare peso e dimensione con una bilancia digitale da orafino (foto 1). La compressione del coagulo è stata effettuata con il L-PRF Wound Box® da noi progettato con una pressione di 142,437 Pa/cm² costante per due, cinque, dieci, quindici minuti.

Questo metodo ha permesso di ottenere da ciascun coagulo, membrane L-PRF, che sono state pesate e misurate singolarmente con un calibro digitale (foto 1). La superficie in cm² dei coaguli e delle membrane è stata rilevata con il software di misurazione di aree "Calcderm" progettato dagli autori [3].

Procedura di microscopia ottica

Le membrane sono state fissate in formalina 10% neutra tamponata per 24 h a temperatura ambiente per l'inclusione in paraffina. Sezioni successive di 4 µm sono state eseguite lungo il centro dell'asse longitudinale delle membrane e sono state colorate con ematossilina-eosina. Ogni sezione è stata divisa in tre aree di uguali dimensioni: Proximale (testa), Centro (corpo), Distale (coda). Ogni area di queste sezioni è stata osservata attraverso un microscopio ottico e analizzato contando i corpi cellulari visibili (contrassegnate in viola scuro, per lo più leucociti) al centro di ciascuna area osservata con un ingrandimento di 25x, 40x, 60x, 100x (a immersione). Il numero totale di corpi cellulari contati sono stati usati per correlare la loro distribuzione tra le tre aree della membrana (testa, corpo e coda). La maggior parte delle cellule sono risultate concentrate nella zona proximale (testa), più vicina al coagulo rosso.

Sono stati esaminati anche strisci di sangue allestiti dal sangue residuo nelle provette per una valutazione morfologica, dopo asportazione del coagulo di PRF, con una spatola (due per ogni provetta) differenziando i coaguli a 0' e a 60' dalla centrifugazione e fissandoli con alcool a 90° per una colorazione May-Grünwald-Giemsa in modo da individuare i vari elementi corpuscolari, in particolare piastrine e neutrofili per metterli in relazione all'esame emocromocitometrico.

Analisi ematochimiche

Da ogni cavallo è stato prelevato anche un campione di sangue per eseguire un esame emocromocitometri-

co di base utilizzando provette con EDTA K3E 5,4 mg (VacuMed).

Seguendo lo studio di Peck *et al.* [12] sono stati prelevati n° 3 campioni di sangue dalla vena giugulare sinistra di ogni cavallo attraverso un ago 14 gauge, 2 per la produzione di PRF e 1 per l'esame emocromocitometrico. Dopo la centrifugazione il coagulo è stato rimosso in un gruppo (A) immediatamente e in un gruppo (B) dopo 60'. Il surnatante derivato dalla compressione col Wound Box® della membrana è stato differenziato tra quello a 0' e a 60' ed è stato conservato in una provetta con EDTA K3E 5,4 mg per l'esame emocromocitometrico. Esso è stato confrontato con quello basale e con la conta degli elementi corpuscolari eseguita sugli strisci derivati dal coagulo rosso come misura indiretta della concentrazione piastrinica e leucocitaria del L-PRF. I due campioni prelevati con sistema Vacutainer senza gel sono stati assegnati in modo casuale ai due gruppi (A e B), utilizzando un lancio di moneta. Anche il surnatante derivato dalla spremitura del L-PRF a 0' e a 60' è stato analizzato con un esame emocromocitometrico standard a camera. Poiché una misura diretta della concentrazione piastrinica del PRF non è ancora possibile, abbiamo calcolato la concentrazione piastrinica residua.

Gli esami sono stati condotti con un Contaglobuli Cell Dyn 3500 R (Abbott).

Determinazione dei parametri delle membrane

Subito dopo la formazione, le membrane di L-PRF sono state conservate a 4 °C fino alla consegna in laboratorio in modo da evitare i danni da stoccaggio.

Le dimensioni delle membrane sono state misurate in altezza, lunghezza e larghezza in mm con calibro digitale e le aree in cm² con un software per calcolare aree irregolari (Calcderm) [3].

Il contenuto di eritrociti, piastrine, globuli bianchi (neutrofili, linfociti, monociti, basofili) presente nelle membrane è derivato confrontando l'esame emocromocitometrico di

base con quello ottenuto sul surnatante e la conta eseguita sugli strisci di sangue del coagulo rosso.

Analisi statistiche

La significatività statistica per le differenze tra due gruppi è stata calcolata con il test-T di Student e ANOVA per misure ripetute per variabili parametriche e con il χ^2 per quelle non parametriche.

Ogni valore di $p < 0,005$ è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono stati analizzati utilizzando la versione 6.0 del pacchetto di Statistica per Discipline Biomediche di Santon-Glantz 2007.

Risultati

La procedura è stata ben tollerata in tutti gli animali. Non sono state rilevate differenze significative nel confronto ematologico di base che aveva una concentrazione media di WBC di $5,1 \times 10^3/\text{mL}$ ($\pm 0,37$ I.C. 95%) ($p=0,24$) e una conta piastrinica media di $106,8 \times 10^3/\text{mL}$ ($\pm 15,3$ I.C. 95%) ($p=0,15$). Non è stato possibile quantificare in modo diretto la concentrazione piastrinica e di WBC intrappolate all'interno del coagulo di L-PRF ed è stato derivato in modo indiretto effettuando un confronto tra i valori medi del sangue intero, valori medi sul surnatante ottenuto dopo compressione del coagulo a 2' e valori medi ottenuti con la conta su strisci di coagulo rosso dopo la asportazione del coagulo di L-PRF. La tabella 1 confronta le caratteristiche dei coaguli e delle membrane di L-PRF ottenute nell'uomo (centrifuga Intraspín) riportate da Pinto *et al.* [13] e quelle da osservate dagli autori nel cavallo. In questo confronto è stato verificato che vi sono differenze significative nelle caratteristiche del coagulo, ma queste differenze si annullano quando si esaminano le membrane derivate dalla compressione. Questa osservazione secondo il parere degli autori sarebbe da attribuire a un diverso contenuto di essudato (peso dell'essudato $1,47 \pm 0,13$ g nell'uomo, $3,05 \pm 0,11$ g nel cavallo, $p=0,000$). In questo studio le dimen-

TABELLA 1. Confronto tra membrane ottenute da sangue umano (Pinto et al. 2014) e da sangue equino

Variabile	Uomo (n=8)	Cavallo (n=6)	T Student	Significatività
	Media (±SD)			
T° finale della provetta (°C)	27,5 (±0,66)			
Peso Coagulo (g) *	2,09 (±0,19)	4,23 (±0,55)	P=0,000< 0,005	S
Peso Membrana (g)	0,62 (±0,15)	0,78 (±0,08)	P=0,036> 0,005	NS
Peso Essudato (g)	1,47 (±0,13)	3,05 (±0,11)	P=0,000< 0,005	S
Lunghezza Coag (mm)	35,69 (±3,43)	44,38 (±3,83)	P=0,000< 0,005	S
Larghezza Coag (mm)	12,81 (±0,75)	14,74 (±1,23)	P=0,003< 0,005	S
Altezza Coag (mm)		7,02 (±1,09)		
Superficie Coag (mm ²)		4,10 (±0,86)		
Lunghezza Memb (mm)	34,81 (±2,95)	36,81 (±3,18) •	P=0,248> 0,005	NS
Larghezza Memb (mm)	12,25 (±0,71)	13,02 (±1,01) •	P=0,119> 0,005	NS
Altezza Memb (mm)		3,02 (±0,51) •		
Superficie Memb (cm ²)		3,08 (±0,5) •		
Rapporto peso Coag/ campione sangue () 10 ml	20,94 (±2,4)	32,53 (±0,54)	P=0,000< 0,005	S

*La differenza del Peso Coagulo è dovuta a una differenza del contenuto di essudato
 • Valori medi (±D, S,) dopo 2' di compressione a 30°C,
 N, B,: i valori non sono in relazione al contenuto di Hb ed eritrociti nel sangue intero,

sioni delle membrane non sono risultate essere in relazione al contenuto di emoglobina o al contenuto di eritrociti riscontrati nell'emocromo basale. In microscopia ottica (foto 3),

la maggior parte dei corpi cellulari (colorati in viola scuro per i nuclei) sono stati concentrati nella parte prossimale (testa) di ogni membrana, l'ultimo 1/4 è stato osservato al centro; la parte distale aveva solo tracce residue di corpi cellulari. La microscopia ottica non ha permesso però di osservare più in dettaglio l'esatto stato di questi corpi cellulari.

La figura 1A dimostra le caratteristiche medie di una membrana L-PRF ottenuta col Wound Box a vari minuti di compressione (2, 5, 10, 15 minuti). Le variazioni minime tra M05', M10', M15' rispetto a M02' ci fanno protendere verso l'utilizzazione della membrana dopo due minuti dall'inizio della compressione (tabella 2). La temperatura di lavorazione deve essere >di 21°C poiché se inferiore il coagulo non si produce. La figura 1D evidenzia le temperature rilevate durante la centrifugazione all'interno e all'esterno della centrifuga a bassa temperatura (23°C) e ad alta temperatura (30 °C) nei vari momenti. Si noti che aumentando la velocità di giri aumenta la temperatura interna.

Usando siringhe da 9 ml al posto del sistema di prelievo Vacutainer le membrane che si producono sono di dimensioni inferiori (Fig. 4B) sia in termini di peso, che di lunghezza, larghezza e superficie utile. Dopo la compressione di 2', la riduzione del peso della membrana rispetto al coa-

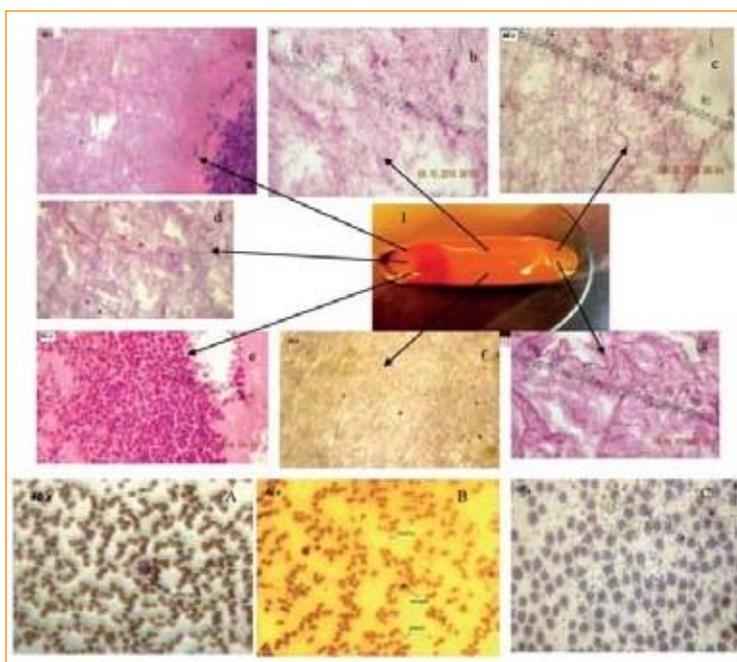


Foto 3. Membrana L-PRF di cavallo a 0 minuti dalla compressione (Colorazione Eosina-Ematossilina). a) III prossimale ingr. 25x Globuli Bianchi-Reticolo di Fibrina; b) III medio ingr. 60x Eritrociti-Reticolo di Fibrina; c) III distale ingr. 60x Reticolo di Fibrina; d) III prossimale ingr. 25x Eritrociti-Fibrina; e) III prossimale ingr. 60x Fibrina a dx, Linfociti al centro, Eritrociti e Granulociti neutrofili a sx; f) III medio ingr. 25x Reticolo di fibrina; g) III distale ingr. 60x Reticolo di Fibrina; A) Striscio di coagulo rosso ingr. 40x presenza di Monocita in un tappeto di Eritrociti; B) striscio coagulo rosso ingr. 40x presenza di eritrociti, monociti e piastrine; C) striscio coagulo rosso ingr. 100x presenza di piastrine in un tappeto di Eritrociti (Colorazione May-Grünwald-Giemsa).

TABELLA 1. Test di significatività sulle variazioni dei parametri di una membrana L-PRF a compressioni con L-PRF Wound Box per ft, 5, 10, 15 minuti

Variabile Parametro	Tra Basale e M02'		Tra Basale e M05'		Tra Basale e M10'		Tra Basale e M15'	
	t-Student	ANOVA	t-Student	ANOVA	t-Student	ANOVA	t-Student	ANOVA
Peso (g)	p=0,006•	p=0,006•	p=0,002*	p=0,005*	p=0,002*	p=0,005*	p=0,001*	p=0,006•
Riduzione Peso (g)	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*	p=0,000*
Lunghezza Memb (mm)	p=0,031•	p=0,004•	p=0,039•	p=0,002*	p=0,019•	p=0,002*	p=0,021•	p=0,000*
Larghezza Memb (mm)	p=0,015•	p=0,021•	p=0,001*	p=0,005*	p=0,001*	p=0,006•	p=0,001*	p=0,008•
Altezza Memb (mm)	p=0,018•	p=0,054•	p=0,005*	p=0,020•	p=0,002*	p=0,014•	p=0,002*	p=0,008•
Superficie Memb (cm ²)	p=0,506•	p=0,137•	p=0,083•	p=0,079•	p=0,058•	p=0,078•	p=0,038•	p=0,066•
	Tra M02' e	M05'-M10'- χ^2	M15'					
Peso (g)		p=1,000•						
Riduzione Peso (g)		p=0,852•						
Lunghezza Memb (mm)		p=1,000•						
Larghezza Memb (mm)		p=1,000•						
Altezza Memb (mm)		p=1,000•						
Superficie Memb (cm ²)		p=1,000•						

•p>0,005=Differenza Non Significativa; *p<0,005=Differenza Significativa

gulo è dell'85% se si preleva il sangue con una siringa, del 70% se si preleva con il sistema Vacutainer (figura 1C) probabilmente perché con la siringa viene danneggiata la parte corpuscolata del sangue e il fibrinogeno.

I risultati degli esami emocromocitometrici su sangue intero, su surnatante ottenuto da compressione del coagulo a 0' e a 60' confrontati con la conta di eritrociti, piastrine e WBC su striscio di coagulo rosso a 0' e a 60' sono riportati con i corrispondenti esami statistici in tabella 3, mentre le immagini microscopiche a 60' sono riportate nella foto 4. La tabella 3 dimostra una differenza statisticamente significativa tra il contenuto di RBC, WBC e Piastrine tra il surnatante derivato dalla compressione del coagulo a 0 e a 60 minuti. Dimostra, inoltre, una differenza statisticamente significativa tra il contenuto di RBC, WBC e PLT negli strisci ottenuti da coaguli rossi a 0' e a 60' riportati anche nelle foto 3 e 4 A, B, C a vari ingrandimenti. La tabella 3 dimostra inoltre il contenuto di RBC, WBC e PLT ipotetico nelle membrane di L-PRF derivato dalla differenza di questi elementi corpuscolari tra il sangue intero, il surnatante a 0' e a 60' e lo striscio di coagulo rosso a 0' e a 60'. Il t-test dimostra differenze significative tra RBC a 0' e a 60' e tra PLT a 0' e a 60' in membrane di L-PRF. Il contenuto di RBC nelle membrane è dello 0,0028% rispetto al sangue

intero, quello di WBC è del 99,24%, quello di PLT è del 99,0% rispetto al contenuto nel sangue intero. Le membrane dopo 60 minuti di compressio-

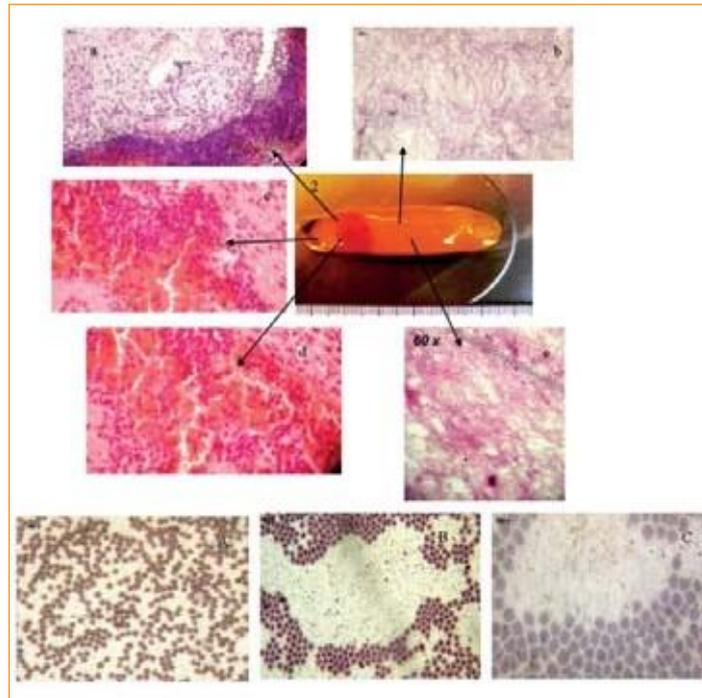


Foto 4. Membrana L-PRF di cavallo a 60 minuti dalla compressione (Colorazione Eosina-Ematossilina). a) III prossimale ingr. 25x Globuli Bianchi-Eritrociti-Reticolo di Fibrina; b) III medio ingr. 25x Reticolo di Fibrina; c) III prossimale ingr. 60x Reticolo di Fibrina a dx, Linfociti al centro, Eritrociti e Granulociti Neutrofili a sx; d) III prossimale ingr. 60x Fibrina a dx, Linfociti al centro, Eritrociti e Granulociti neutrofili a sx; e) III medio ingr. 60x Reticolo di fibrina con Linfocita; A) Striscio di coagulo rosso ingr. 40x presenza di Piastrine in un tappeto di Eritrociti; B) striscio coagulo rosso ingr. 40x presenza di eritrociti e molte piastrine; C) striscio coagulo rosso ingr. 100x presenza di molte piastrine in un tappeto di Eritrociti (Colorazione May-Grunwald-Giemsa).

TABELLA 3. Risultati degli esami emocromocitometrici su sangue intero, su surnatante ottenuto da compressione del coagulo a 0' e a 60' confrontati con la conta di Eritrociti, Piastrine e WBC su striscio di coagulo rosso a 0' e a 60' con test di significatività

Tipo	Emocromo Sangue	Striscio C. R. 0'	Striscio C. R. 60'	Tra striscio Coagulo Rosso 0-60'			
	Media±D. S.	Media ±D. S.	Media ±D. S.	t-test*	χ ²		
RBC	7.648.000±1.130.981	7.399.440 ±27.039,76	7.322.960±81.119,29	P=0.333>0.05	NS	p=0.000<0.005	S
WBC	5.150±369	8,5±2,12	0,5±0,71	P=0.037<0.05	S	p=0.908>0.005	NS
PLT	106.780±15.351	500±707,11	6.000±1.414,21	P=0.039<0.05	S	p=0.000<0.005	S
Neutrofili	3.046±857						
Basofili	4,2±1,3						
Linfociti	1.606±668						
Monoliti	490,2±138,06						
Eosinofili	5,4±5,37						

Tipo	Emocromo surn. a 0'	Emocro. surn. a 60'	Tra Emocromo Surnatante 0'-60'			
	Media±D. S.	Media±D. S.	t-test*	χ ²		
RBC	13.428±21.345	73.714±186.233	p=0.411>0.05	NS	p=0.000<0.005	S
WBC	30±27,99	109,14±172,95	p=0.255>0.05	NS	p=0.000<0.005	S
PLT	479±77,614	3.627±3.401	p=0.031<0.05	S	p=0.000<0.005	S
Neutrofili	0,29±0,76	1,29±2,21	p=0.280>0.05	NS	p=0.991>0.005	NS
Basofili	2,29±2,14	2±1,73	p=0.785>0.05	NS	p=0.611>0.005	NS
Linfociti	19±23,15	98,43±167,69	p=0.238>0.05	NS	p=0.000<0.005	S
Monoliti	4,57±7,68	2,86±5,01	p=0.631>0.05	NS	p=0.928>0.005	NS
Eosinofili	4±9,71	4,57±7,96	p=0.906>0.05	NS	p=0.316>0.005	NS

Tipo	Membrana 0'		Membrana 60'		tra Membrane L-PRF 0-60'			
	n°/μl	%	n°/μl	%	t-test*	χ ²		
RBC	216.012	0,0028	193.966	0,0025	p=0.000<0.005	S	p=0.266>0.005	NS
WBC	5.111,15	99,2400	5.036,86	97,8000	p=0.007>0.005	NS	p=0.993>0.005	NS
PLT	105.801	99,0000	97.153	91,0000	p=0.002<0.005	S	p=1.000>0.005	NS

χ² elaborazione eseguita su due confronti. Contenuto ipotetico di RBC, WBC, PLT in membrane di L-PRF a 0' e a 60' con test di significatività: p>0,05=+0,5 differenza non significativa; p<0,01=-1 differenza significativa.

ne presentano un contenuto di RBC, WBC e PLT inferiore rispetto a quelle a 0 minuti.

La PRF può essere più appropriatamente utilizzata, quindi, nella cronica, lenta guarigione delle ferite, in grandi difetti che non possono altrimenti essere riempiti, o in tessuti che dimostrano una costruttivamente scarsa risposta alla guarigione. Essa può anche fornire enormi vantaggi per l'emostasi, aiutando fisicamente la formazione di coaguli e a fornire un aumento delle concentrazioni di specifici fattori essenziali per la cascata della coagulazione. Questo presenta molteplici opportunità terapeutiche come ad esempio la riparazione di un tendine, difetti di ossificazione, la riparazione della cartilagine e la riparazione di ferite cutanee, ma tali applicazioni richiederebbero ulteriori indagini nel cavallo (MacLellan-Plevin, 2014).

Discussione

Lo studio eseguito da McLellan *et al.* [10] ha dimostrato che il PRF equino similmente a quello umano fornisce una fonte immediata e costante di fattori di crescita tissutale. Lo studio presentato in questa sede ha cercato di standardizzare la procedura di preparazione del L-PRF, la quale pur rimanendo una tecnica di facile esecuzione e a basso costo, non richiede attrezzature specializzate, ma ha una certa costanza nella produzione di una membrana L-PRF in termini di caratteristiche macroscopiche e microscopiche. La L-PRF si formerà costantemente quando le fasi sopra descritte vengono rigorosamente rispettate. Una delle considerazioni importanti nel generare una buona membrana L-PRF è il ritardo nel tempo tra prelievo di sangue e centrifugazione, e la temperatura di lavorazione. Il successo della

tecnica L-PRF dipende interamente dalla velocità di raccolta di sangue e l'immediato trasferimento in centrifuga, di solito entro un minuto e da una temperatura di centrifugazione e di compressione superiore a 21°C. Non è possibile generare un coagulo di L-PRF ben strutturato (con il suo specifico contenuto cellulare, architettura della matrice e profilo del rilascio dei fattori di crescita), se la raccolta del sangue è prolungata e non omogenea oppure se la temperatura di centrifugazione è inferiore a 21°C; si forma invece una piccola incoerente, friabile massa di fibrina con contenuto sconosciuto. Le funzioni di L-PRF come matrice extracellulare provvisoria, la quale viene trasformata in tessuto funzionale durante la guarigione, il poter essere sottoposto a forze meccaniche ed esiti di guarigione con successo, dipendono dall'integrità strutturale del L-PRF e quindi è importante chiarire le sue proprietà fisiche. Il L-PRF assomiglia al tessuto connettivo denso con caratteristiche di maneggevolezza superiori. Attraverso un modulo elastico di 0.470 MPa (SD=0.107) si è visto che la membrana di L-PRF allunga di due volte la sua lunghezza iniziale prima della rottura (sforzo del 215%). Questi dati confermano la letteratura pubblicata [7] che ha riportato una bassa rigidità (1-10 MPa) e una alta tensione (fino al 150%) prima di rompersi.

Sulla base di questi risultati, è chiaro che la L-PRF è un nuovo biomateriale con caratteristiche uniche: la preparazione prevedibile dal sangue autologo, la semplicità del protocollo, l'architettura definita, le impressionanti proprietà meccaniche e l'abbondanza di fattori di crescita derivati da piastrine attivate. Le nostre sperimentazioni sul sangue equino saranno senza dubbio capaci di migliorare la comprensione della guarigione così come contribuiscono a far progredire il campo della medicina personalizzata.

CONCLUSIONI

Il L-PRF può anche modulare le fasi dell'infiammazione e di proliferazione nel processo di guarigione delle ferite;

in tal modo, riducendo il rischio di formazione di cicatrici cheloidi e ipertrofiche. Questa caratteristica è molto importante nei cavalli, nei quali ferite croniche *nonhealing* o un tessuto di granulazione esuberante spesso si sviluppano, soprattutto quando le ferite sono situate sulla parte distale del corpo (arti). Queste condizioni si verificano più frequentemente nei vecchi cavalli in cattive condizioni di salute o se la ferita si trova in un punto soggetto al movimento, e può limitare la carriera di un equino o ritardo del recupero atletico.

Ci sono molti metodi per il campionamento e la preparazione di gel di fibrina contenenti piastrine come segue: provette, sacche di sangue, aferesi quadruple, la preparazione manuale in sistemi aperti o chiusi, e dispositivi di preparazione automatica. La maggior parte di questi metodi, utilizzato anche in applicazioni cliniche umane, sono automatizzati o semi-automatizzati, e richiedono costosi e sofisticati equipaggiamenti tecnici [9]. La preparazione manuale ha il vantaggio di non richiedere costose attrezzature, è semplice e veloce, e può anche contenere una soddisfacente concentrazione di piastrine equine. È sicuro, veloce, economico e semplice da produrre, e può essere utilizzato per curare le ferite acute e subacute in aree soggette a movimenti degli arti di equini, così come nei casi di ritardata guarigione delle ferite. Può essere utilizzato sul campo ed è molto meno oneroso di altri trattamenti.

Le problematiche legate alla conservazione di queste membrane ne limitano molto l'utilizzo. La crioconservazione a 4 °C potrebbe rappresentare una soluzione a questo problema, ma al momento i dati riportati in letteratura non sono incoraggianti a causa della ridotta emivita delle piastrine criopreservate (<2 gg) rispetto a quelle fresche (3,5-3,8 gg) [1].

I dati riguardanti il tempo massimo di stoccaggio e la temperatura ideale di conservazione del PRF sono in gran parte carenti.

In futuri studi vorremmo perciò verificare l'ipotesi di Peck et al. [12] confrontando i parametri riscontrati a 0' e a 60' dalla centrifugazione usando provette Vacutainer asciutte vs pro-

vette Vacutainer con gel di separazione analizzando i preparati anche al Microscopio Elettronico a Scansione. Vorremmo inoltre valutare per quanto tempo il PRF (coagulo o membrana) rimane stabile dopo la sua costituzione e se l'essudato raccolto nella scatola del L-PRF Wound Box può essere utilizzato efficacemente per fissare gli innesti autologhi (membrana L-PRF o derma bioconduttivo o bioinduttivo).

BIBLIOGRAFIA

- 1-Agnoli C. (2015) Terapie trasfusionali nel cane parte I. Il sangue intero e i suoi componenti-raccolta, produzione e stoccaggio. *Veterinaria*, 5: 7-15.
- 2-Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C., Vervelle, A. (2001) Une opportunité en paro-implantologie: le PRF, *Implantodontie*, 62: 42-55.
- 3-Crisci A., Crisci M., Boccalone E. (2014) Final results of an experimental research

about a technique of measurement of skin lesions. *Esperienze Dermatologiche*, 16: 147-152.

- 4-Crisci A. (2015) Le membrane L-PRF utili in chirurgia. *Jour Plastic Derm*, 2: 75-90.
- 5-Crisci A., Placido F., Crisci M., Bosco A. (2015) A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). *Jour Plastic Derm*, 3: 162-172.
- 6-Del Corso M, Choukroun J, Simonpieri A, Zampetti P, Buccì Sabbatici V (2007) Accelerazione dei processi di cicatrizzazione tissutale con un nuovo biomateriale: la fibrina ricca di piastrine (PRF). *Odontoiatria*, 4: 361-66.
- 7- Hasan F. K. (2015) Characterization of leukocyte-platelet rich Fibrin, a novel biomaterial. <http://scholarscompass.vcu.edu/etd>
- 8-Hotwani K., Sharma K. (2014) Platelet rich fibrin- a novel acumen into regenerative endodontic therapy. *R D E*, [http://dx. doi. org/10.5395/rde.2014.39.1.1](http://dx.doi.org/10.5395/rde.2014.39.1.1);
- 9-Iacopetti I., Perazzi A., Ferrari V., Busetto R., (2011) Application of platelet-rich gel to enhance wound healing in the horse: a case report. *Journal of Equine Veterinary Science*, XXX: 1-6.
- 10-McLellan J., Plevin S. (2014) Temporal release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich Plasma (PRP) in the horse: a comparative in vitro analysis. *Intern J Appl Res Vet Med*, 1: 48-57.
- 11-Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andua I, Anitua E (2008) Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience*, 13: 3525-3548.
- 12-Peck M. T., Hiss D., Stephen L., Satti A., Majeed A. (2015) Platelet-rich fibrin (PRF) - The effect of storage time on platelet concentration. *SADJ*, 10: 448-451.
- 13-Pinto N. R., Pereda A., Jimenez P., Del Corso M., Kang B-S., Wang H-L., Quirynen M., Dohan Ehrenfest D. (2014) The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electron Microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes. *POSEIDO Journal*, 2: 141-154.
- 14- Textor J. A., Murphy K. C., Leach K., Ta-blín F. (2014) Ultrastructure and growth factors content of equine platelet-rich fibrin gels. *A J V R*, 4: 392-401.
- 15-Toffler M., Toscano N., Holtzclaw D., Del Corso M., Dohan Ehrenfest D. (2009) Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to reconstructive surgery milieu. *JIA C D*, 6: 21-32.

RIASSUNTO

La Fibrina Ricca di Piastrine (PRF) di Choukroun rappresenta un nuovo passo nel concetto terapeutico del gel piastrinico con una elaborazione semplificata e modificazioni biochimiche poco artificiali. Un valido metodo di preparazione di PRF deve efficacemente separare le piastrine dagli eritrociti e concentrarle senza danneggiare o lisare le piastrine stesse. In questo studio il disegno sperimentale è quello di standardizzare la produzione di L-PRF nel cavallo finalizzandola alla produzione umana. La nostra ipotesi è che il L-PRF è facile da produrre nel cavallo, senza modifiche del protocollo umano, anzi permettendo una migliore standardizzazione del protocollo umano. Un nuovo dispositivo per la preparazione e la standardizzazione di L-PRF in coaguli e membrane è il L-PRF Wound Box®. Auspichiamo che le sperimentazioni degli autori sul cavallo saranno in grado di migliorare la comprensione della guarigione delle ferite e contribuiranno a far progredire il campo della medicina personalizzata sia veterinaria che umana, in particolar modo nella terapia delle lesioni cutanee croniche.

PAROLE CHIAVE: autologo, buffy coat, livello di fattori di crescita, fibrina ricca di piastrine, trombociti concentrati.

SUMMARY

The Platelet Rich Fibrin of Choukroun (PRF) represents a new step in the therapeutic concept of platelet gel with a simplified processing and little artificial biochemical changes. A valid method of PRF preparation must effectively separate the platelets from red blood cells and concentrate them without damaging or lyse the platelets themselves. In this study, the experimental design is to standardize the production of L-PRF in the horse directing it towards human production. Our hypothesis is that the L-PRF is easy to produce in the horse, without modification of the human protocol, even allowing better standardization of the human protocol. A new device by us for the preparation and standardization of L-PRF in clots and membranes is the L-PRF Wound Box®. Our experiments on horse will be able to improve our understanding on wound healing, as contribute to advancing the field of personalized medicine both veterinary and human, particularly in chronic skin lesions therapy.

KEY WORDS: autologous, buffy coat, growth factor level, platelet-rich fibrin, thrombocyte concentrate.