

Le membrane L-PRF® utili in chirurgia

Alessandro Crisci

SUMMARY

L-PRF membranes utility in surgery

The PRF is distinct in P-PRF (platelet rich Fibrin pure) and L-PRF (Fibrin rich in platelets with leukocytes). In vivo at the height of the formation of the fibrin clot, platelets bind to fibrin β -integrin and the clot shrinks. The PRF clot forms a strong fibrin matrix with a complex three-dimensional architecture. Quantifying PDGF-BB, TGF-1 β and IGF-1 in the PPP and the PRF, the analyzes revealed that the slow fibrin polymerization during the processing of PRF leads to the intrinsic constitution from platelets of cytokines and glycan chains in the meshes of fibrin. The central part of the PRF has massively platelets trapped in the mesh of fibrin. The localization of platelets in the PRF was examined by immunostaining and Scanning Electron Microscope (SEM). Compared to the membrane PRF tablet dry gauze (G-PRF), the conservation of the level of the plasma, of the fibrin 3D, and platelets is more intact in preparations of membrane PRF with compression system (PRF-C) metal. The distribution of platelets in the membranes C and G-PRF-PRF was analyzed by SEM and immunocytochemistry. The fibrin rich platelet pure (P-PRF) and the leukocyte-platelet rich fibrin (PRF-L) are biomaterials solid fibrin or not containing leukocytes. The problem of the concentration of platelets does not exist in the PRF, in that all the platelets of the blood sample taken are activated and integrated in the matrix of fibrin in the clot. Approximately 97% of platelets, and more than 50% of the leukocytes are concentrated in the PRF clot that showed a specific three-dimensional distribution.

Almost all platelets (> 97%) were absent from tubes of the groups tested after extraction of the membrane PRF. In the red part of the PRF clot, clots have GR in fibrin network.

KEY WORDS: Growth Factors, Fibrin Rich of Platelets, L-PRF Wound Box.

Alessandro Crisci



Introduzione

Recenti evidenze suggeriscono che le piastrine possono avere un nuovo ruolo nella riparazione dei tessuti e nel rimodellamento vascolare, oltre ad essere soggetti attivi nelle risposte infiammatorie ed immunitarie.

Liberano proteine biologicamente attive ed altre sostanze che sono in grado di influenzare una serie di processi che favoriscono l'assunzione, la crescita e la morfogenesi delle cellule.

Tali sostanze vengono liberate o presentate sulla superficie delle piastrine attivate. La capacità delle piastrine di rilasciare sostanze dall'interno di un coagulo rende quest'ultimo una fonte naturale autologa di fattori di crescita e citochine che possono essere utilizzate terapeuticamente per accelerare la guarigione naturale. Molte di queste sostanze sono accumulate negli α -granuli facilmente identificabili con il Microscopio Elettronico e con la colorazione all'immunofluorescenza (Figura 1).

Figura 1.

Microfotografia elettronica di piastrina di sangue umano.



L'aggiunta esogena di Plasma Ricco di Piastrine (PRP) nel sito di una ferita accelera il processo naturale di guarigione e fornisce un sostegno

Service of Dermosurgery and Skin Transplantation, Nursing Home "Villa del Sole" Caserta, Italy

supplementare per il legame non solo di piastrine, ma anche di altre cellule, endoteliali, muscolari lisce, fibroblasti, leucociti, cheratinociti e cellule staminali. Tra i vantaggi nell'uso del coagulo ricco di piastrine vi è la sicurezza fornita dall'influenza antibatterica delle piastrine. Le piastrine, infatti, non solo secernono proteine neutralizzanti i batteri, ma partecipano anche direttamente alla loro eliminazione durante la sepsi. Abbastanza sorprendente è anche la capacità che esse hanno, recentemente riconosciuta, di ridurre il dolore. La base molecolare di questo effetto è sconosciuta, una possibile spiegazione è il rilascio di proteasi indotta dalle piastrine (PAR-4) che ha proprietà antinocicettiva.

Le piastrine autologhe sono particolarmente utili per i tessuti molli in chirurgia ricostruttiva. Valbonesi *et al.* hanno usato colla di piastrine-fibrina autologa in 14 pazienti con perdita di pelle e di tessuti molli causata da traumi o patologia cronica. Già nel 1986, fattori cicatrizzanti derivanti da piastrine umane autologhe (PDWHF) sono stati proposti da Knighton *et al.* per facilitare la guarigione delle ulcere cutanee recalcitranti, promuovendo la formazione di tessuto di granulazione nella fase di guarigione precoce.

Non ci sono differenze morfologiche al SEM nelle fibre spesse di fibrina in tre tipi di PRP. Sono presenti fibre sottili di fibrina scarse nella LPRP e FPRP, mentre nella HPC (concentrato di piastrine) formano uno strato denso che copre le fibre spesse (Figura 2).

Le fibre sottili presenti nella HPC potrebbero essere correlate all'elevata concentrazione iniziale di piastrine nel HPC ($3-5 \times 10^{11}$ piastrine/l), in cui l'attività procoagulante locale può anche essere migliorata con l'avvio dell'amplificazione dello stimolo protrombotico, esso porta ad una produzione di trombina quasi esplosiva con conseguente aumento della fibrogenesi sulla superficie delle piastrine con conseguente formazione di fibrina e sua polimerizzazione. La HPC ha anche una concentrazione di fibrinogeno elevata (3,5 mg/ml) rispetto al FPRP e al LPRP e contribuisce alla formazione della rete secondaria sopra le fibre spesse (Pretorius *et al.* 2007).

Abbondanti sono 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 immagazzinati nelle piastrine ed

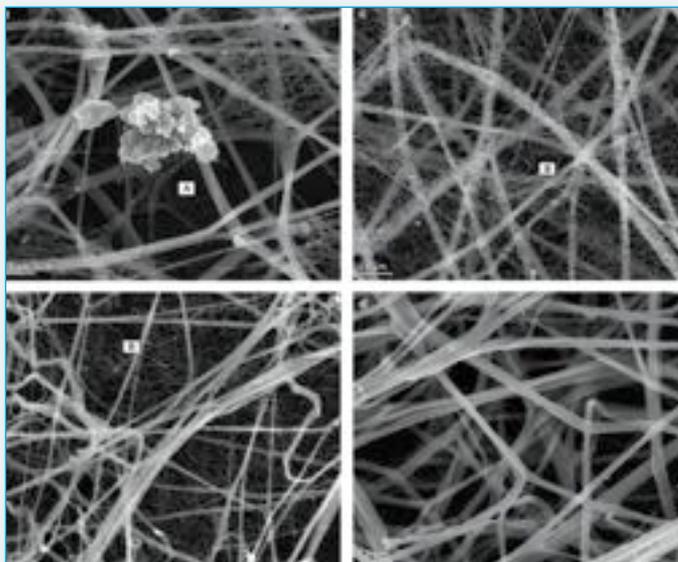


Figura 2.

Fotografia al SEM che mostra a) un aggregato piastrinico da coagulo di fibrina da concentrato di piastrine umane (HPC) (ingr.10.000 x), nonché fibre di fibrina. L'etichetta A dimostra pseudopodi. b) fibre di fibrina da HPC (ingr.5.000 x). L'etichetta B dimostra fibre minori con aspetto liscio formando una rete secondaria sulle fibre principali di fibrina. c) ingrandimento maggiore (10.000 x). L'etichetta B dimostra le fibre minori. d) ingrandimento maggiore (10.000 x) in cui sono presenti fibre di fibrina in cui è assente il reticolo di fibrina minore. Solo raramente sono presenti fibre spesse senza una copertura reticolare fine (modificata da Pretorius *et al.* 2007).

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 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). I membri della famiglia TGF- β sono importanti nella riparazione delle ferite e nella formazione delle cicatrici. La funzione di TGF- β 1 è regolata nella sua attivazione da una forma latente secreta e può influenzare negativamente l'angiogenesi sebbene favorisce la produzione di proteine della matrice. 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. Le piastrine sono anche una potenziale fonte di metalloproteasi della matrice (MMP) (MMP-2,

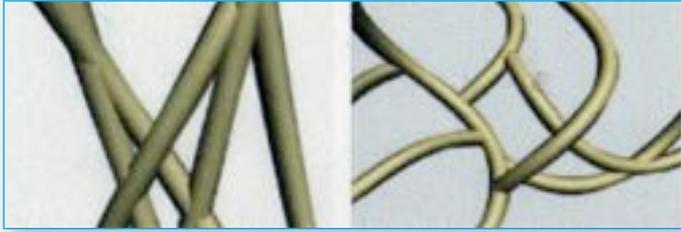


Figura 3.

Differenza tra l'architettura molecolare della fibrina prodotto con la tecnica del PRP (a) e del PRF (b). Si noti la differenza di elasticità tra le due strutture (modificata da Del Corso et al. 2007).

MMP-9, ADAM-10, ADAM-17, ADAMTS-13) così come di inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP 1-4). Le MMPs sono presenti negli α -granuli e anche nelle vescicole della membrana citoplasmatica.

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 partecipante importante nella guarigione delle ferite, infatti l'esito della guarigione di una ferita è influenzato dalla struttura della fibrina (spessore delle fibre, numero di punti di ramificazione, porosità e permeabilità del coagulo) (Figura 3) al sito della ferita (Del Corso et al. 2007).

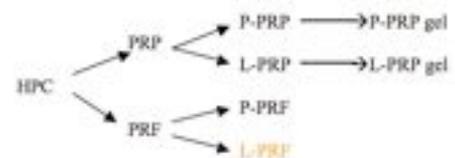
Se una ferita non guarisce in una sequenza ordinata e tempestiva, o se il processo di guarigione non risulta in un'integrità strutturale, la ferita viene considerata cronica. La guarigione della ferita cronica si verifica con gli stessi processi della guarigione della ferita acuta, ma si forma abbondante tessuto di granulazione, spesso con fibrosi eccessiva che porta alla contrazione cicatriziale e alla perdita di funzione.

Le ferite croniche e il loro trattamento sono un onere adeguato sul sistema sanitario e continuerà ad essere una sfida terapeutica. A causa dell'eterogeneità dei pazienti, di molteplici eziologie e della mancanza di modelli animali, la ricerca in questo campo è difficile e complessa. Nonostante questi problemi, vari fattori patogeni locali cellulari e molecolari possibili sono stati identificati. La terapia medica rimane lo standard di cura per il trattamento delle ulcere. Se fallisce, però, la gestione chirurgica può essere necessaria. L'innesto cutaneo a spessore parziale è fondamentale nel trattamento delle ulcere croniche ed è spesso utilizzato per coprire o chiudere grandi ulcere non-guarite. Prima

di un effettivo trapianto, l'ulcera è sbrigliata cioè la pelle lipodermatosclerotica, i tendini esposti e le calcificazioni sottocutanee vengono rimosse per realizzare una ferita vascolarizzata, idoneo letto per la pelle tagliata a maglie per rendere un intimo contatto con il letto dell'ulcera e favorire l'afflusso di sangue. Se questa trasformazione di una ulcera cronica crea problemi, si può creare una ferita acuta, in quanto la morbosità di base che in primo luogo ha causato l'ulcera è ancora presente.

I coaguli di fibrina ricchi di piastrine costituiscono un serbatoio bioattivo. Un ematocrito alto o un basso numero di piastrine possono essere un fattore limitante ed ulteriori ricerche sono necessarie per stabilire il numero ottimale di piastrine per la loro utilizzazione. Oltre a secernere proteine le piastrine rilasciano composti diffusibili a basso peso molecolare e grandi quantità di microparticelle che trasportano proteine come TF o IL-1 che sono sostanze protrombotiche. Pertanto può essere controindicata l'utilizzazione in pazienti con fattori di rischio trombotici ereditari o acquisiti (come ipertensione arteriosa, Fattore V di Leiden).

Usato contemporaneo di farmaci antiplastrine potrebbe teoricamente limitarne l'efficacia. L'aspirina riduce la secrezione piastrinica e dovrebbe quindi essere evitata nei giorni precedenti alla preparazione di PRP autologo, in quanto inibisce l'enzima ciclossigenasi (COX). Dopo il primo rilascio massivo di fattori di crescita, le piastrine ne sintetizzano e secernono di nuovi per il resto della loro vita ($\approx 7-10$ gg).



La PRF® (Fibrina ricca di piastrine) è una nuova generazione di concentrato piastrinico, ottenuto dalla centrifugazione di sangue periferico autologo, senza l'aggiunta di agenti biologici. Contiene il polimero matrice della fibrina, leucociti, citochine e cellule staminali. È distinto in P-PRF (Fibrina ricca di piastrine pura) e L-PRF (Fibrina ricca di piastrine con leucociti). Il PRP (Plasma ricco di piastrine) ha un effetto transitorio sulla guarigione delle ferite ed inoltre la trombina bovina aumenta il rischio di coagulopatia, cosa che non avviene con il PRF®. In esso si verifica un processo di coagulazione naturale

che permette una facile raccolta di leucociti e PRF® (L-PRF®) nel coagulo.

I gel di fibrina sono desiderabili come *scaffolds* per 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 ed ai processi coinvolti nella fabbricazione di *scaffolds*. La fibrina prodotta è una sostanza naturale completamente biodegradabile, che facilita la transizione verso una nuova matrice extracellulare. In vivo al culmine della formazione del coagulo di fibrina, le piastrine legano la fibrina alla β -integrina e il coagulo si contrae. Esso si contrae anche contro i margini del letto della ferita generando tensioni ed orientando la nuova matrice provvisoria. Il coagulo PRF è prodotto da un processo di polimerizzazione naturale durante la centrifugazione, e la sua architettura di fibrina naturale sembra responsabile di un lento rilascio di fattori di crescita e glicoproteine dalla matrice $>=7$ gg.

Tale rilascio lento è inimmaginabile nella maggior parte delle tecniche di produzione di PRP a causa dell'attivazione brutale delle piastrine.

In chirurgia plastica i coaguli di PRF possono essere direttamente utilizzati per riempire una cavità durante una lipostruttura. 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 ad 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 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 ed uno *Stop Low finale* (Nurden 2008) e deve svolgersi ad una determinata temperatura e per un determinato tempo.

Preparazione di L-PRF

Il protocollo di preparazione di PRF® è molto semplice: il sangue viene immediatamente centrifugato entro 2 minuti dal prelievo seguendo la seguente programmazione: 30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm, e 36" di decelerazione ed arresto. I coaguli di PRF risultanti sono raccolti e la parte dei globuli rossi vengono eliminati con le forbici senza nessun danno del PRF a livello macroscopico (*protocollo di processo, Nizza, Francia*). Il prodotto risultante è costituito da tre strati: PPP (Plasma privo di piastrine in alto), PRF (coagulo al centro), globuli rossi in basso (Figura 4). Il fibrinogeno è inizialmente concentrato nella parte centrale e superiore della provetta, proprio tra i globuli rossi in basso e il plasma acellulato in alto. Il coagulo PRF forma una forte matrice di fibrina con una complessa architettura tridimensionale (Figure 2, 3, 7), in cui la maggior parte delle piastrine e di leucociti sono concentrati dal sangue raccolto. La compressione del coagulo con garza asciutta (G-PRF) determina una riduzione di isoforme di PDGF rispetto ad una membrana di PRF preparata con un sistema di compressione (C-PRF) (PRF®Box)

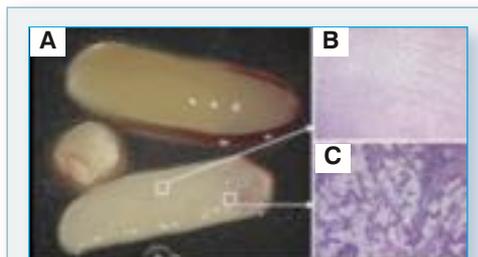


Figura 4.

Il PRF di Choukroun è un biomateriale (A) con una specifica architettura 3-dimensionale e distribuzione delle cellule. Il corpo principale del materiale è acellulare e costruito con filamenti di fibrina (B, hemalaun-eosina, ingr. 52 x), leucociti e aggregati piastrinici sono concentrati in alcune aree (C, hemalaun-eosina, ingr. 52 x). Il PRF può essere usato come un coagulo (A, alto), un cilindro condensato (A, centrale), o una membrana densa (A, in basso).

il quale stimola in modo più significativo la proliferazione cellulare e la neovascolarizzazione (Kobayashi et al. 2012).

Quantificando PDGF-BB, TGF- β 1 e IGF-1 nel PPP e nel PRF, le analisi hanno rivelato che la lenta polimerizzazione della fibrina durante la lavorazione di PRF porta alla costituzione intrinseca dalle piastrine di citochine e catene glicaniche nelle maglie di fibrina. Analizzando tre citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α), una citochina antinfiammatoria (IL-4) e il promotore dell'angiogenesi (VEGF), si è visto che il PRF potrebbe essere un nodo nella regolazione immunitaria con abilità nel controllo dell'infiammazione. Il PRF a differenza degli altri concentrati piastrinici, sarebbe in grado di rilasciare progressivamente citochine durante il rimodellamento della matrice di fibrina.

Diversi studi hanno dimostrato che la L-PRP ha effetti antimicrobici, ma senza azioni infiammatorie indesiderate. Il PRF permette al chirurgo di fornire direttamente una risposta di guarigione naturale e può stimolare la produzione di vasi sanguigni vitali, cellule di grasso, depositi di collagene che sembrano persistere nel tempo anche in assenza di una ferita (Zhao et al. 2013). Le citochine sono immediatamente utilizzate nella guarigione delle ferite.

Una colla di fibrina, arricchita con citochine (come il PRP) con grande effetto incontrollabile è di breve durata, è quindi più utile una matrice fisiologica di fibrina (come il PRF) (Naik et al. 2013).

I vantaggi del PRF rispetto al PRP sono:

- 1) nessuna manipolazione biochimica del sangue;
- 2) processo semplificato e conveniente;
- 3) l'uso di trombina bovina e anticoagulanti non sono richiesti;
- 4) guarigione favorevole a causa di una polimerizzazione lenta;
- 5) migrazione e proliferazione cellulare più efficiente;
- 6) un effetto favorevole sul sistema immunitario;
- 7) maggiore aiuto all'emostasi.

Il meccanismo coinvolto nella formazione di PRF è il fibrinogeno concentrato nella parte superiore della provetta il quale si combina con la trombina circolante, dovuta alla centrifugazione, per formare fibrina. La parte centrale del PRF presenta piastrine intrappolate massicciamente nelle maglie di fibrina. Il successo di

questa tecnica dipende interamente dall'intervallo di tempo trascorso tra la raccolta di sangue e la sua centrifugazione che deve essere fatta in meno tempo possibile, nonché dalla temperatura di lavorazione e dal tipo di provetta usato. I campioni di sangue infatti devono essere prelevati da pazienti senza storia di assunzione di aspirina o altri farmaci anticoagulanti nelle due settimane antecedenti.

Dohan et al. (1988) hanno rivelato un rilascio più lento di fattori di crescita nel PRF rispetto a PRP e osservato migliori proprietà curative con PRF. È stato dimostrato anche che le cellule sono in grado di migrare nel reticolo di fibrina. La modalità di polimerizzazione lenta conferisce alla membrana di PRF® un'architettura fisiologica particolarmente favorevole per supportare il processo di guarigione.

Considerazioni generali

La localizzazione delle piastrine nel PRF è stata esaminata mediante immunocolazione e al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM). In studi precedenti, la compressione del coagulo per formare una membrana PRF è stata effettuata convenzionalmente con una garza umida o secca e non si ci è preoccupati se questa compressione può danneggiare le piastrine e fa trasudare quantità significative di fattori di crescita. Su e Burnouf hanno dimostrato che notevoli quantità di fattori di crescita sono rimossi con la spremitura. Pertanto il processo della spremitura potrebbe influenzare l'efficacia e la qualità clinica dei preparati PRF come materiale da innesto.

I livelli dei fattori di crescita dopo vari tipi di compressione sono stati valutati con dosaggi biologici e tecniche citochina-anticorpo.

La conservazione del livello di plasma, del reticolo di fibrina 3D, e di piastrine è più intatta nei preparati di membrana PRF con sistema di compressione (C-PRF) metallica, rispetto alla membrana PRF compressa con garza asciutta (G-PRF). Il peso umido della membrana PRF da 2,18 gr è passato a 0,35 gr nella compressione metallica e a 0,04 gr in quella con garza (diminuzione del 84% vs il 98%).

Tra i fattori di crescita testati, il PDGF contenuto nel C-PRF è maggiore e stimola, in modo significativo la proliferazione cellulare e la neovascolarizzazione. Il C-PRF può essere utile per l'innesto, riducendo al minimo la perdita di fat-

tori bioattivi. Una caratteristica importante del PRF è che il gel di fibrina risultante è più rigido di quello preparato con l'aggiunta di trombina (PRP). La densità delle fibre e la densità dei punti di ramificazione della rete di fibrina regolano principalmente la rigidità del gel di fibrina e questi parametri sono in rapporto alla ricchezza di trombina in modo dose-dipendente (Figura 3).

È stato necessario quindi stabilire un protocollo standardizzato per preparare il PRF soddisfacendo i seguenti criteri:

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

I campioni di membrana PRF sono stati esaminati al S.E.M. e col metodo immunocitochimico da Kobayashi *et al.* 2012.

Il C-PRF è stato diviso in 3 regioni di uguale lunghezza e la presenza di piastrine in ogni regione è stata osservata al S.E.M. (Figura 5).

La regione 1 è quella più vicina al coagulo rosso e presenta numerose piastrine aggregate e vi sono alcuni linfociti e globuli bianchi. Il numero di piastrine diminuisce con l'aumentare della distanza dal coagulo rosso. Nella regione 2 (centrale) sono presenti fibre di fibrina e qualche piastrina. Nella regione 3 il reticolo di fibrina è molto evidente, mentre le piastrine sono scarse. La distribuzione delle piastrine nelle membrane C-PRF e G-PRF della regione 1 è stata analizzata al SEM e all'immunocitochimica. Nel C-PRF il reticolo di fibrina è stato ricoperto da molti aggregati piastrinici e linfociti (Figura 6), mentre nel G-PRF il reticolo di fibrina è completamente premuto in una forma di film e possono essere osservate poche piastrine. Questi risultati sono stati verificati dal rilevamento di cellule positive all'anticorpo anti-CD41 all'immunocitochimica, infatti nel C-PRF su un lato della membrana si trovano accumulate numerose piastrine CD41-positive ed alcune piastrine si trovano all'interno della membrana. Al lato opposto di questa vi sono scarse piastrine.

Nel G-PRF al contrario non sono stati trovati aggregati piastrinici su entrambi i lati della

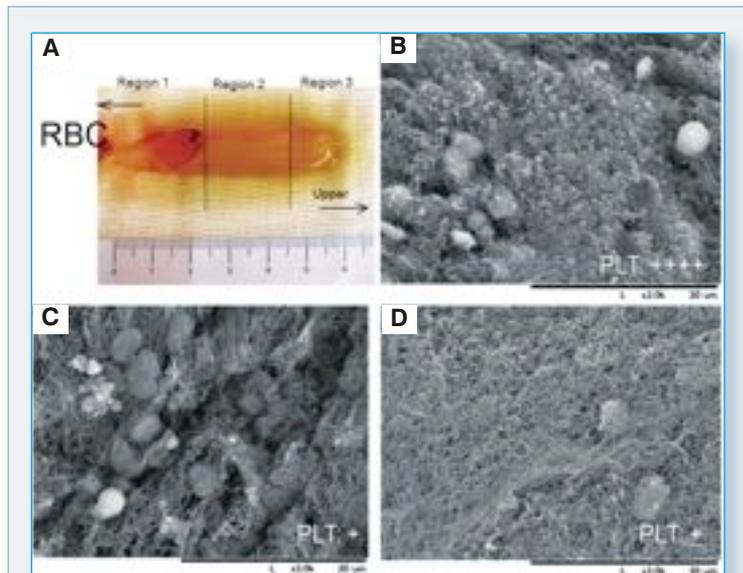


Figura 5.

Le tre regioni del C-PRF e osservazioni SEM delle piastrine sulla superficie della membrana. (A) C-PRF è stato diviso in tre regioni: Regione 1 adiacente al coagulo rosso (RBC), Regione 2 è la parte centrale e la Regione 3 è la parte distale del trombo rosso. La localizzazione delle piastrine è stata osservata nella regione 1 (A), nella regione 2 (B) e nella regione 3 (C). Le piastrine sono più concentrate nella regione 1 e meno nella regione 3 (modificata da Kobayashi *et al.* 2012).

membrana di PRF ma solo all'interno di essa con una densità superiore a quella del C-PRF.

Nel confrontare i fattori di crescita contenuti in C-PRF e G-PRF il primo contiene una maggiore concentrazione di TGF- β , PDGF-AB, PDGF-BB, EGF, FGF-4, IGF-II, e VEGF-D.

La scoperta dello studio di Kobayashi *et al.* 2012 è che le piastrine non sono equamente distribuite all'interno e sulla superficie del coagulo PRF, anche se esso è stato ritenuto essere un gel con un uniforme concentrato di piastrine. Pertanto in una condizione clinica in cui i fattori di crescita forniti dalle piastrine sono attesi e desiderati, deve essere usata una regione adiacente al trombo rosso in quanto è più ricca di piastrine.

Basato sul concetto che il siero trattenuto nel coagulo PRF potrebbe contenere elevati livelli di fattori di crescita rilasciati dalle piastrine che sono più o meno attive durante la centrifugazione, non è stato tentato di spremere tutto il plasma con la compressione completa dei coaguli di PRF. La tendenza ad un maggiore livello di fattori di crescita nel C-PRF rispetto al G-PRF può essere attribuito alla presenza di FG deriva-

ti dalle piastrine (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB). Questo effetto può essere dovuto alla fibrina perché il reticolo di fibrina può assorbire direttamente i FG o potrebbe intrappolare la sieralbumina o l'eparina e quindi, indirettamente mantenere i FG.

È quasi impossibile da contare e regolare il numero di piastrine nelle preparazioni di PRF prima dell'utilizzo clinico. Pertanto il modo clinicamente più efficace per controllare la qualità dei risultati è quello di utilizzare la regione di PRF più vicina al coagulo di G.R.

L-PRF in Chirurgia

La fibrina è un utile substrato per scopi di bioingegneria ed è uno degli idrogel più popolari nel campo dell'ingegneria tissutale

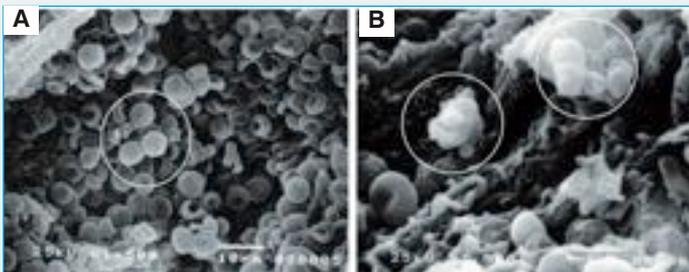


Figura 6.

A) Al confine tra la zona rossa e coagulo giallo al SEM. Il gruppo di globuli rossi e di leucociti appare come strutture sferiche con una superficie irregolare (cerchi bianchi). La maggior parte di loro sembrava piuttosto piccola (tra 6 e 8 μm di diametro) e, quindi, potrebbero essere principalmente linfociti. B) Le piastrine erano spesso mischiate nella rete di fibrina, ma a volte, appaiono come aggregati (cerchi bianchi) che sono stati facilmente identificati (Ingr. A 1500 x, B 3500 x) (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2010).

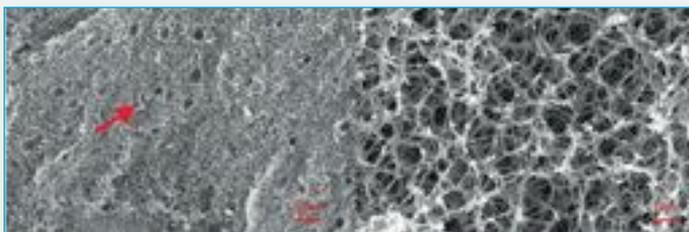


Figura 7.

a e b. Coagulo di PRF visto al microscopio elettronico. La freccia indica i trombociti
a barra = 10 μm b barra = 1 μm

e della medicina rigenerativa. Le cellule trapiantate richiedono segnali specifici dalla matrice extracellulare per sopravvivere. *Anoikis* è un termine usato per descrivere la morte prematura delle cellule che non ricevono questi segnali meccanici e chimici dalla matrice, e questo fenomeno è considerato una delle cause principali di fallimento del trapianto cellulare.

La fibrina ricca di piastrine pura (P-PRF) e la leucociti-fibrina ricca di piastrine (L-PRF) sono biomateriali solidi di fibrina contenenti o no leucociti. In queste tecniche l'attivazione piastrinica è parte del processo di produzione e può essere naturale (L-PRF) o artificiale (P-PRF), ma si verifica sempre durante la centrifugazione e porta ad una forte architettura finale di fibrina.

Il L-PRF è un preparato contenente leucociti e con un'alta densità della rete di fibrina. Questi prodotti esistono sotto forma di gel attivato e non possono essere iniettati o utilizzati come la colla di fibrina tradizionale. Tuttavia, a causa della loro forte matrice di fibrina possono essere trattati come materiale solido per le applicazioni che sono state proposte, con interessanti risultati in chirurgia ricostruttiva, ma queste applicazioni rimangono ancora in fase sperimentale in quanto richiedono di trovare un modo per utilizzare i coaguli in ogni specifica procedura chirurgica.

La fibrina crea una matrice provvisoria nel letto del trapianto, ma le sue fibre non hanno direzionalità e tensione, essa ha infatti pochi fattori di crescita associati contenuti. I gel di fibrina invece presentano una disposizione regolare e reticolare dei pori con fibre corte e sottili e non del tutto acellulari e al SEM sono state osservate piastrine e leucociti (Figura 7).

In studi eseguiti nel cavallo i gel di fibrina contenenti piastrine (PRFG) presentano grandi fibre dense e disposte in modo casuale (con diametro medio di $117,7 \pm 10,53$ nm). Le fibre di gel di fibrina sono più piccole ($56,8 \pm 5,11$ nm). L'incorporazione delle piastrine nel gel di fibrina quindi risulta in alterazioni strutturali e in un aumento della concentrazione dei fattori di crescita e può, in definitiva migliorare le prestazioni delle cellule innestate nello *scaffold* dopo il trapianto.

Il PDGF e TGF- β 1 sono i più abbondanti fattori di crescita contenuti all'interno degli α -granuli delle piastrine e vengono rilasciati nello spazio extracellulare dopo l'attivazione piastrinica. Questi fattori cellulari dirigono la proliferazione,

la differenziazione cellulare, la produzione della matrice, l'angiogenesi e la contrazione della ferita, la supplementazione di fattori di crescita infatti, migliora la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule trapiantate in un numero di materiali e tessuti trattati (Figure 8, 9).

L'aggiunta di piastrine al gel di fibrina (PRFG) comporta un aumento del diametro delle fibre e la diminuzione delle aree porose aumentando la rigidità del gel di fibrina. Il diametro misurato delle fibre è stato associato alla concentrazione più bassa di piastrine (100×10^3 piastrine/ μ l) che si approssima alla concentrazione di piastrine sistemica in cavalli normali. La spiegazione può essere che meno tensione viene applicata alle fibre dal minor numero di piastrine.

Le aree porose e la percentuale di porosità sono importanti indici strutturali di qualsiasi *scaffold* biologico. I pori più grandi favoriscono la crescita interna e la proliferazione cellulare mentre i pori più piccoli favoriscono l'adesione cellulare a causa di una maggiore superficie. La concentrazione di leucociti presente nel PRP e nel PRFG è controversa.

Però l'effetto specifico della concentrazione di leucociti sulla formazione del coagulo, sulla formazione di gel di fibrina o sulla rigidità del coagulo è ancora da studiare. Il PRP utilizzato per la produzione di PRFG ha una concentrazione di WBC intermedia (media: $9,34 \times 10^3$ leucociti/ml) (range: $3,2 \times 10^3$ - $16,0 \times 10^3$ di leucociti/ml) (Textor et al. 2014).

Da un punto di vista clinico, L-PRF presenta eccellenti proprietà di manipolazione: i singoli coaguli di L-PRF vengono trasformati in membrane di opportune dimensioni e spessore grazie al nuovo "L-PRF Wound Box®"; più membrane unite tra loro serviranno a creare una membrana bioattiva di maggiori dimensioni per ricoprire e costituire ampi innesti. La membrana di L-PRF può essere tagliata su misura. Essendo abbastanza flessibile si adatta bene a differenti aree anatomiche.

Da un punto di vista legale un medico essendo autorizzato alle punture endovena è autorizzato anche al prelievo. Inoltre, da regolamento comunitario, quindi con legge valida in tutta Europa il L-PRF non avendo aggiunta di sostanze non è un emoderivato ma rientra nel caso del reinnesto di cellule autologhe.

Poiché la guarigione che si verifica con questa tecnica non è né per prima, né per seconda intenzione, essa viene definita "guarigione per seconda intenzione modificata" (Desai et al. 2013).

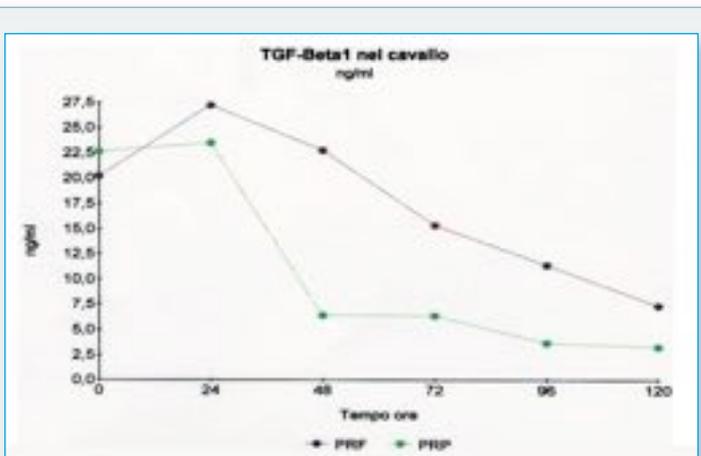


Figura 8.

Livelli TGF- β 1 nel cavallo (modificata da McLellan, Plevin, 2014).

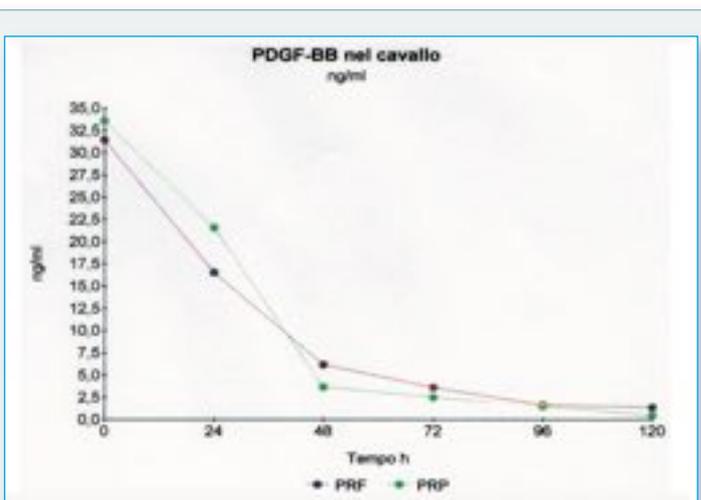


Figura 9.

Livelli PDGF-BB nel cavallo (modificata da McLellan, Plevin, 2014).

La famiglia L-PRF si adatta alle esigenze degli interventi chirurgici. Come coaguli e membrane la L-PRF presenta una forma e un volume facile da combinare con la maggior parte delle tecniche chirurgiche, come riempimento ed interposizione di biomateriali di guarigione o come membrane di protezione per la guarigione delle ferite.

Queste membrane sono anche forti ed offrono un lento rilascio di molti fattori di crescita (Tabella 1) per periodi lunghi. Infine, è facile da preparare in gran quantità e poco costoso, ciò lo rende particolarmente adatto per la quotidiana pratica clinica. È utilizzabile in particolare nel trattamento delle ulcere cutanee.

L-PRF in vitro

In vitro i comportamenti di una membrana di L-PRF e gel P-PRP (PRFG-endorest) sono stati confrontati attraverso la valutazione del lento rilascio di fattori di crescita e di molecole della matrice.

Queste due famiglie di gel sono state poste in un terreno di coltura per 7 giorni, e le versioni lente di 3 fattori di crescita chiave (TGF- β 1, PDGF-AB, VEGF) e 3 proteine della coagulazione e della matrice (TSP-1 [Trombospondina 1])

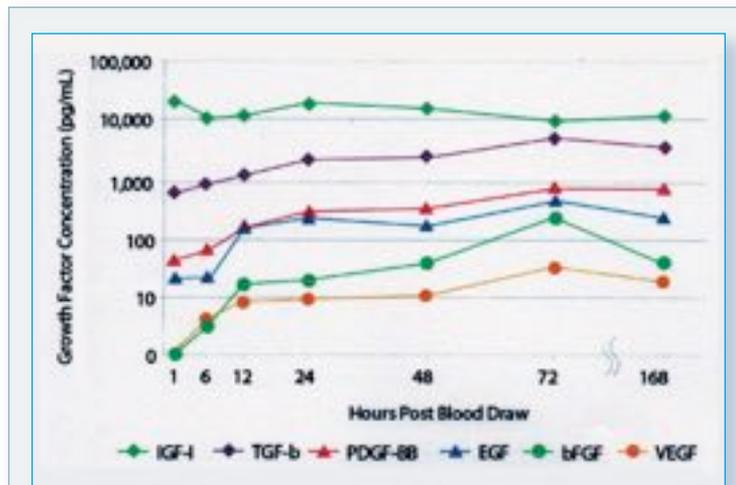


Figura 10.
Livelli dei fattori di crescita nel tempo.

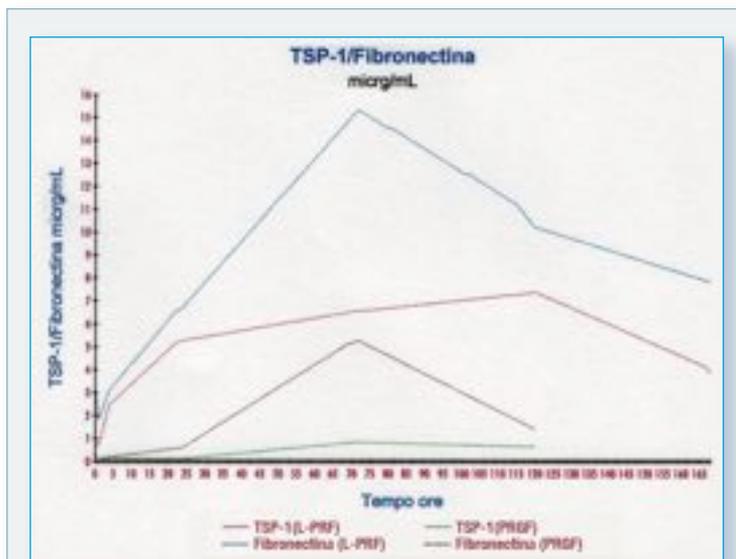


Figura 11.
Variazioni di TSP-1 e fibronectina nel tempo. Confronto tra L-PRF e PRGF (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2012).

(Fn) (Vitronectina) sono state quantificate sperimentalmente sette volte (a 20', 1h, 4h, 24h, 72h, 120h, 168h) (Figure 10-14) (Dohan Ehrenfest et al. 2014)

Questi studi hanno rivelato che i prodotti presentano due profili molto differenti: la membrana L-PRF è rimasta solida e intatta dopo 7 gg e rilascia continuamente una grande quantità di fattori di crescita e una parte significativa di essi è prodotta dalle cellule all'interno della membrana. Al contrario il gel P-PRP chiarificato rilascia la maggior parte dei fattori di crescita nelle prime ore ed è completamente sciolta dopo 3 giorni (Figure 11-14).

I leucociti presenti nella L-PRF non sono solo cellule infiammatorie, in quanto essi presentano anche effetti anti-nocicettivi attraverso diverse chemiochine, citochine antinfiammatorie (IL-4, IL-10, IL-13) e peptici oppioidi (β -endorfine, dimorfina-A ecc.) e quindi possono promuovere una inibizione clinicamente rilevante del dolore patologico (il processo di centrifugazione può attivare dolcemente, stimolare patologicamente lo stato infiammatorio o distruggere i leucociti). Molti tipi di cellule sono presenti in queste preparazioni. La formula leucocitaria è un parametro importante: le popolazioni di linfociti sono molto diverse e non hanno affatto lo stesso impatto dei monociti e dei granulociti. Inoltre, molte altre cellule circolanti, come le staminali possono essere trovate in un concentrato piastrinico e non essere trascurate.

È stata osservata una certa quantità di GF nel siero rilasciato da PRF (PRFR) e nel siero supernatante (SS) subito dopo la formazione del PRF. È stato trovato un rilascio aggiuntivo dalla PRF di GF fino a 300' (5h). Il contenuto di GF nel SS è \approx 7 ng/ml (PDGF-AB), 9,5 ng/ml (TGF- β 1), 0,1 ng/ml (VEGF) e costituisce una buona indicazione del livello basale dei GF nel PRFR intrappolata nel coagulo. La concentrazione di GF rilasciati dal PRF è significativamente inferiore rispetto a quella presente nei lisati piastrinici ed è la concentrazione inferiore presente nel sangue intero utilizzato per produrre PRF. Il PRF ed il SS contengono grandi quantità di GF e non devono essere scartate in quanto possono essere utili nel trattamento del paziente (Su, 2010).

L'essudato iniziale del PRF (ricco di fattori di crescita e proteine del siero) viene raccolto nel contenitore e le membrane PRF vengono conservate in un ambiente umido di siero. Questo è un metodo efficace da un punto di vista biologico.

Il coagulo L-PRF contiene quasi tutte le piastrine e più del 50% dei globuli bianchi del sangue inizialmente raccolto, presenta inoltre una forte architettura di fibrina e una speciale distribuzione tridimensionale delle piastrine e dei leucociti. Una soluzione è mantenere i coaguli in un contenitore di metallo sterile e premerli in membrane con una placca sterile in metallo quando è necessario.

Questo dispositivo permette la conservazione del coagulo in un ambiente umido e sterile per 1 h e permette un aumento del rilascio dei fattori di crescita totale. Il L-PRF Wound Box® è uno strumento polivalente in cui coaguli PRF (A) possono essere trasformati in membrane. Le quantità medie prodotte di PDGF-AB sono significativamente più alte in ogni momento sperimentale (Figura 12, Tabella 1) e la TGF-β1 (Figura 12, Tabella 1) e VEGF (Figura 13, Tabella 1) sono significativamente più alte durante le prime 4h (Figura 14). La spiegazione di questo risultato è abbastanza semplice: utilizzando il PRF Box, la procedura di compressione dei coaguli in membrana viene eseguita attraverso una leggera compressione, lenta ed omogenea e la membrana finale rimane sempre omogeneamente bagnata ed intrisa di siero. Questo metodo delicato evita l'estrazione e la perdita di una quantità significativa di fattori di crescita, ed è particolarmente evidente con PDGF-AB, perché questo fattore di crescita viene rilasciato solo dalle piastrine. Questo metodo, non influenza altri fattori di crescita intrinseci che vengono rilasciati lentamente in quantità elevate per diversi giorni. Le quantità rilasciate di VEGF e TGF-β1 sono prodotte dai leucociti massicciamente.

Un procedimento di raccolta di sangue ed una preparazione non standardizzata, lenta ed inadeguata, porta ad una piccola massa di fibrina PRF-like, con polimerizzazione di fibrina instabile (con conseguente deboli proprietà meccaniche) e fattori di crescita sconosciuti e irriproducibili. Inoltre è molto difficile separare queste piccole masse di fibrina alla base dei G.R. risultante in un pesante carico di globuli rossi nel prodotto (Dohan Ehrenfest et al. 2012).

Limitazioni del PRF

Secondo la classificazione POSEIDO tutti i prodotti di questa categoria sono raggruppati sotto il termine generale di concentrati piastrinici (HPC), qualunque sia la loro forma

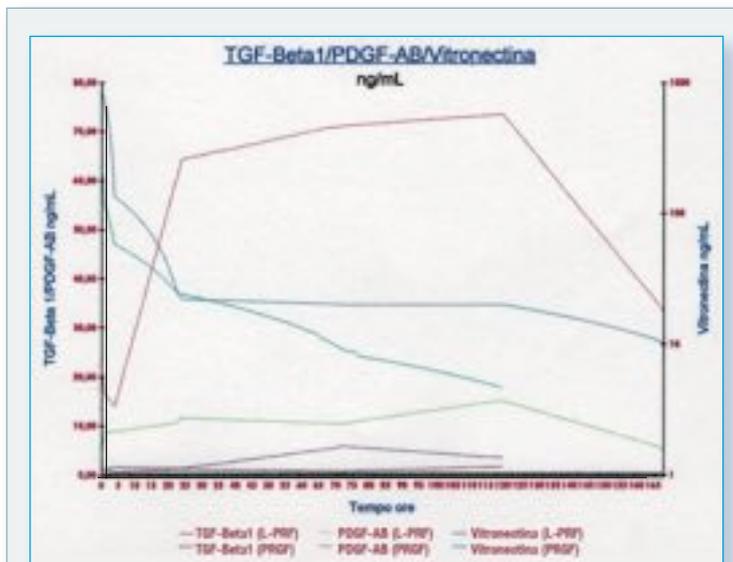


Figura 12.

Variazioni di TGF-β1/PDGF-AB e Vitronectina nel tempo. Confronto tra L-PRF e PRGF (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2012).

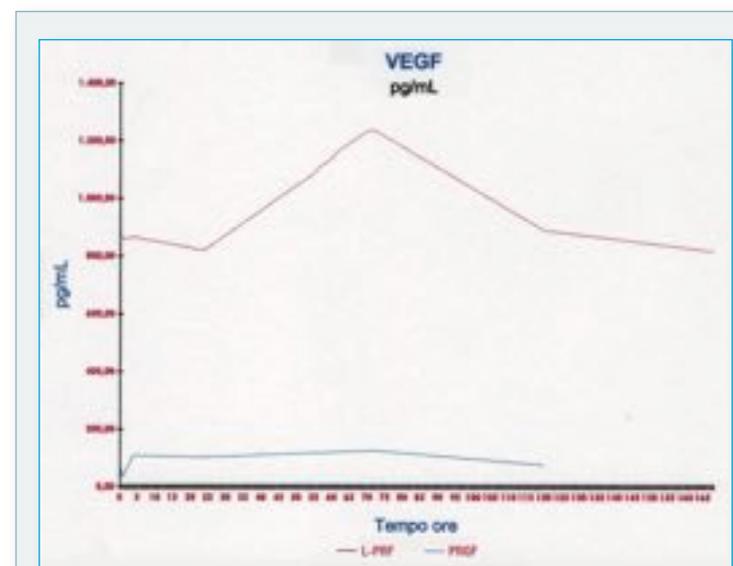


Figura 13.

Variazioni di VEGF nel tempo. Confronto tra L-PRF e PRGF (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2012).

o il contenuto cellulare. Inoltre è importante evidenziare l'influenza chiave dei leucociti e l'architettura della fibrina nei potenziali effetti clinici o sperimentali di questi prodotti e che ciascun prodotto si riferisce ad un'impronta biologica specifica.

Le piastrine, la fibrina e i leucociti agiscono naturalmente in sinergia per promuovere la

Tabella 1.

Variazioni di vari fattori di crescita nel tempo. Confronto tra L-PRF, PRGF e PPGF (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2012).

Molecole	Prodotto	Amounts of Released Molecules (Mean and Standard Deviation) From						
		0 to 20min	20min to 1h	1h to 4h	4h to 24h	24 to 72h	72 to 120h	120 to 168h
TGF-β1 (nmol)	L-PRF	22.4 (±13.3)	16.5 (±12.3)	13.9 (±14.8)	64.3 (±5.7)	71.1 (±6.4)	73.5 (±7.1)	33.4 (±9.3)
	PRGF	0.91 (±0.42)	1.33 (±0.49)	0.63 (±0.35)	1.19 (±0.49)	0.7 (±0.42)	1.46 (±0.7)	
	PPGF	0.54 (±0.28)	1.19 (±0.54)	0.9 (±0.26)	0.7 (±0.35)	1.12 (±0.49)	1.26 (±0.63)	
VEGF (pmol)	L-PRF	881 (±183)	857 (±165)	865 (±173)	821 (±169)	1235 (±254)	888 (±199)	815 (±153)
	PRGF	79 (±30)	36 (±24)	108 (±13)	183 (±29)	125 (±41)	75 (±30)	
	PPGF	72 (±39)	74 (±37)	105 (±17)	84 (±33)	96 (±32)	72 (±37)	
PDGF-AB (nmol)	L-PRF	3.46 (±0.5)	8.7 (±1.6)	8.9 (±2.1)	11.8 (±3.1)	19.4 (±2.6)	15.1 (±3.7)	4.9 (±1.2)
	PRGF	1.2 (±0.33)	1.13 (±0.3)	1.6 (±0.4)	1.3 (±0.4)	5.6 (±2.05)	3.5 (±1.6)	
	PPGF	1.15 (±0.45)	1.2 (±0.6)	1.36 (±0.55)	1.25 (±0.45)	0.9 (±0.35)	7.4 (±2.15)	
TSP-1 (micromol)	L-PRF	0.8 (±0.12)	0.69 (±0.1)	2.46 (±0.27)	5.36 (±0.54)	6.56 (±0.62)	7.18 (±0.48)	3.85 (±0.42)
	PRGF	0.25 (±0.11)	0.12 (±0.05)	0.13 (±0.06)	0.12 (±0.06)	0.82 (±0.24)	0.62 (±0.16)	
	PPGF	0.15 (±0.07)	0.125 (±0.06)	0.23 (±0.1)	0.16 (±0.05)	0.14 (±0.04)	0.58 (±0.2)	
Fibrinogen (micromol)	L-PRF	3.5 (±1.1)	1.6 (±0.7)	3.1 (±1.2)	6.7 (±1.9)	13.3 (±2.7)	10.2 (±3.1)	7.8 (±2.1)
	PRGF	0.25 (±0.1)	0.12 (±0.06)	0.19 (±0.09)	0.6 (±0.23)	5.24 (±0.66)	1.37 (±0.44)	
	PPGF	0.6 (±0.29)	0.27 (±0.11)	0.65 (±0.38)	1.04 (±0.67)	4.13 (±1.95)	2.89 (±1.23)	
Vitronectin (nmol)	L-PRF	925 (±107)	719 (±174)	134 (±26)	22 (±8)	20 (±8)	20 (±6)	10 (±4)
	PRGF	245 (±76)	114 (±33)	26 (±21)	24 (±5)	9 (±4)	5 (±3)	
	PPGF	426 (±156)	171 (±61)	132 (±55)	29 (±7)	8 (±2)	4 (±2)	

Tabella 2.

Numero di leucociti, G.R. e piastrine nel sangue intero (gruppo di controllo) e nel residuo coagulo rosso dopo la raccolta della membrana PRF (gruppi testati) (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2010).

	Leucociti/μl		RBC/μl		Piastrine/μl	
	Media	Range	Media	Range	Media	Range
Controllo	6.900	6.100-7.800	5.19 (10 ⁶)	5.01-5.52 (10 ⁶)	2.66 (10 ⁶)	2.18-3.09 (10 ⁶)
Serie 1	3.500	3.000-3.800	5.89 (10 ⁶)	5.75-6.08 (10 ⁶)	6.000	4.000-8000
Serie 2	3.600	3.300-4.000	5.84 (10 ⁶)	5.78-5.91 (10 ⁶)	7.000	6.000-9000

Tabella 3.

Formula leucocitaria stabilizzata nel sangue intero (gruppo di controllo) e nel residuo coagulo rosso dopo la raccolta della membrana PRF (gruppi testati) modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2010).

Tipo di cellula	Sangue Intero(%)		Serie 1(%)		Serie 2(%)	
	Media	Range	Media	Range	Media	Range
Leucociti Neutrofili	51.8	49.7-53.2	72.1	66.1-77.1	66.4	60.9-71.4
Leucociti Eosinofili	2.9	2.3-3.1	6.1	3.4-8.8	5.1	3.9-6.1
Leucociti Basofili	0.5	0.3-0.8	0.1	0.0-0.3	0.4	0.1-0.9
Linfociti	37.7	35.1-39.2	17.5	15.0-20.4	24.8	21.4-28.0
Monociti	71.1	6.8-7.6	4.2	1.1-7.6	3.3	2.5-5.0
Totale (Media) per μl	6.900(100%)		3.500(100%)		3.600(100%)	

guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti e il concetto di concentrati piastrinici per uso chirurgico è di moltiplicare questo effetto di coagulazione/rigenerazione su un sito chirurgico o una ferita.

Le limitazioni nell'uso di PRF sono:
 1) A causa del fatto che la PRF è un prodotto autologo, la disponibilità di questo biomateriale in quantità maggiore è difficoltoso. Quindi, il suo utilizzo in procedure chirurgiche deve essere ben programmato.

2) Il PRF possiede cellule immunitarie circolanti e molecole antigeniche che impediscono il suo uso come materiale alloigenico e vi è inoltre un aumentato rischio di trasmissione di agenti infettivi.

A questo punto della nostra conoscenza, tra i parametri tenuti al di fuori dalle nostre considerazioni abbiamo: la concentrazione di piastrine, la concentrazione dei leucociti e la proporzione tra i vari tipi di leucociti. Il problema della concentrazione delle piastrine non esiste nel PRF, in quanto tutte le piastrine del campione di sangue prelevato sono attivate e integrate nella matrice di fibrina nel coagulo. Per quanto riguarda la concentrazione dei leucociti e la loro formula, la loro influenza deve ancora essere studiata con attenzione, in quanto la loro presenza o meno può spiegare i risultati contraddittori che si sono osservati (Tabelle 2, 3).

Nel L-PRF non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le concentrazioni basali di WBC (7,4 x 10³/ml) e di piastrine (166 x 10³/ml). Non ci sono correlazioni tra valori ematici basali e concentrazione di FG. È stata rilevata una correlazione significativa tra numero di piastrine e rilascio di TGF-β1 (p = 0,005) e di PDGF-BB (P = 0,04). Il TGF-β1 è quantitativamente maggiore nel gruppo PRF a lento rilascio rispetto a quello a pronto rilascio (Figura 8).

È stato riportato che WBC intrappolati nella matrice PRF rappresentano la fonte principale di questo rilascio supplementare di TGF-β1, e che WBC continuano a secernere questo FG

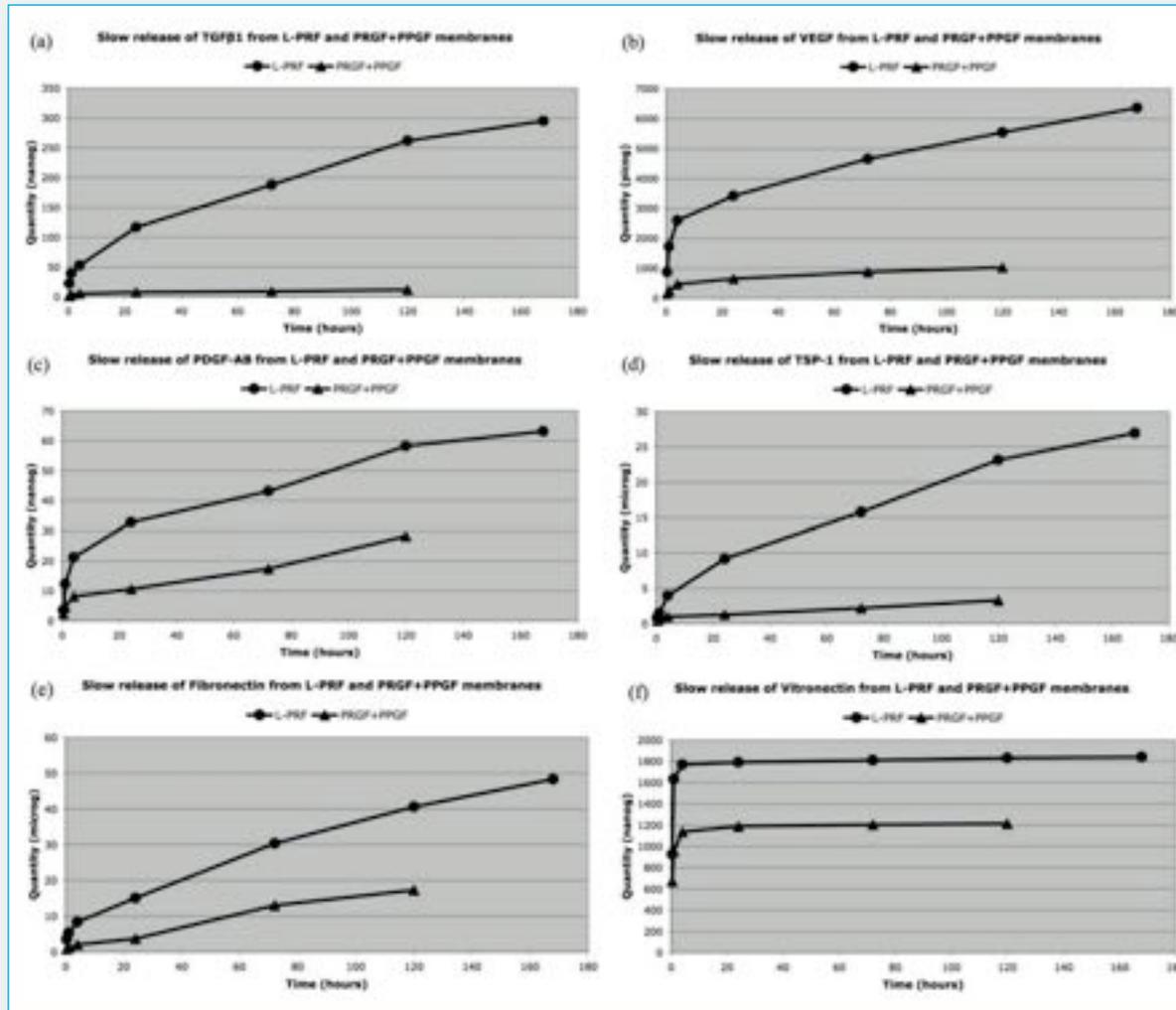


Figura 14.

Variazioni di vari fattori di crescita nel tempo. Confronto tra L-PRF e PRGF+PPGF.

I valori sono riportati come somme dei dosaggi consecutivi (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2012).

all'interno del coagulo PRF per parecchi giorni. Il PDGF-BB è quasi completamente contenuto negli α -granuli delle piastrine e viene rilasciato al momento dell'attivazione, questo spiega perché la sua produzione è massima nel PRP e PRF attivati e si riduce nelle forme lente (Figura 9). È possibile che i valori ematologici rilevati nel sangue prelevato non possono essere utilizzati per prevedere il rilascio immediato o lento dei fattori di crescita nel PRF (McLellan et al. 2014). Nello studio di Dohan Ehrenfest et al. 2010, si è voluto determinare la composizione cellulare e l'organizzazione tridimensionale di questo biomateriale autologo e l'utilità di provette diverse (vetro asciutto, vetro rivestito, plastica) ma tutte

senza gel. Circa il 97% delle piastrine e più del 50% dei leucociti sono concentrati nel coagulo di PRF che ha mostrato una specifica distribuzione tridimensionale. Le piastrine e la fibrina sono presenti in grosse quantità nei primi millimetri della membrana oltre il limite dei globuli rossi. Non vi è differenza nell'architettura di PRF usando vari tipi di provette.

Analisi delle piastrine e dei leucociti

Quasi tutte le piastrine (> 97%) erano assenti dalle provette dei gruppi testati dopo l'e-

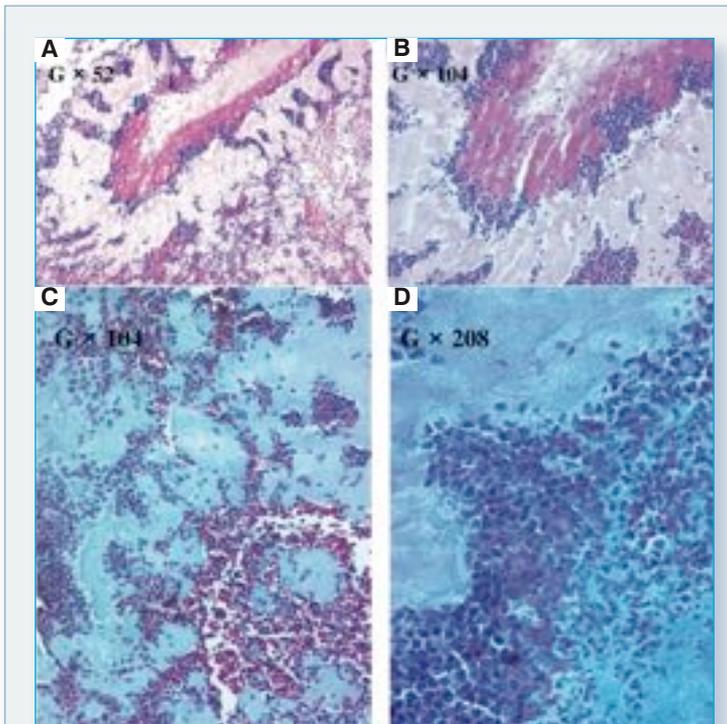


Figura 15.

Analisi al microscopio ottico di coaguli di PRF.

A e B) La colorazione hemalaun-eosina non è sufficiente per distinguere i vari tipi di cellule intrappolate nella matrice di fibrina. C e D) Usando la colorazione tricromica di Masson è possibile facilmente distinguere gli aggregati piastrinici separatamente dai leucociti (blu scuro) dai Globuli rossi (rosso). Ingrandimenti (G) (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2010).

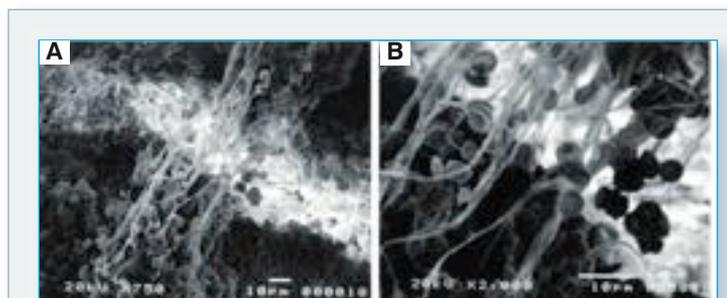


Figura 16.

A e B) La zona rossa del coagulo PRF (SEM) contiene molti G.R. intrappolati all'interno di un'immatura e molto sciolta matrice di fibrina (Ingr. A x 750, B x 2000) (modificata da Dohan Ehrenfest et al. 2010).

strazione della membrana PRF. Nei gruppi testati il livello di leucociti è sceso significativamente rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,01$) e più della metà dei leucociti sembrava essere

scomparso (Tabella 2). Le piastrine e i leucociti mancanti rimangono intrappolati nella matrice di PRF quando si usa il metodo di raccolta con le forbici. L'assenza di una differenza tra i due gruppi testati ($p > 0,05$) sembra indicare che la brutale compressione del coagulo non influenza il possibile rilascio di corpi cellulari intrappolati all'interno della matrice di fibrina.

Nei gruppi testati la concentrazione di linfociti è significativamente inferiore, mentre quella dei granulociti neutrofili è significativamente superiore ($p < 0,01$) al gruppo di controllo (Tabella 3). Questo indicherebbe che i linfociti sono stati più degli altri leucociti intrappolati nella matrice di PRF. Infine il volume medio delle piastrine (MPV) è notevolmente ridotto nei gruppi testati rispetto ai gruppi di controllo ($p < 0,01$) ed è sceso da $9 \mu\text{m}^3$ (range: $8-11 \mu\text{m}^3$) nel sangue intero a $4,7 \mu\text{m}^3$ (range: $4,5-5,8 \mu\text{m}^3$) nei gruppi testati.

Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'aumento dell'osmolarità plasmatica nelle provette dopo l'attivazione della cascata coagulativa.

Studio alla microscopia ottica

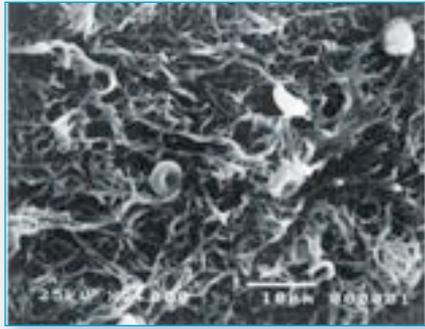
L'analisi istomorfometrica è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico con un ingrandimento totale di 100 x. Un oculare da 10 mm con un reticolo con 100 divisioni è stato utilizzato per misurare la percentuale di copertura della lunghezza totale con almeno uno strato di cellule in ogni sezione.

Con la colorazione hemalaun-eosina la matrice di fibrina appare omogenea in colore rosa, mentre gli aggregati piastrinici sono blu scuro/viola (Figura 15A-B).

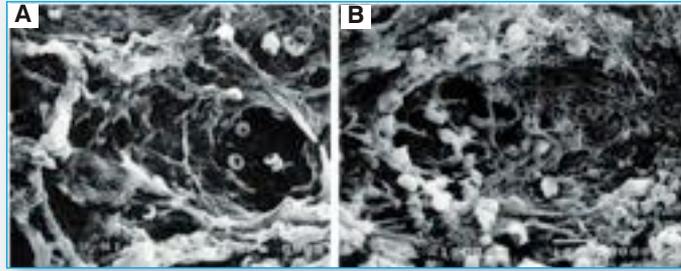
I GR e il citoplasma dei leucociti sono rosa scuro e non facilmente individuabili. Il nucleo dei leucociti sono colorati in blu con la hemalaun e non sono facilmente distinguibili dagli aggregati piastrinici.

Con la tricromia di Masson (modificata da Godman) gli aggregati piastrinici sono ancora blu scuro, ma i GR sono facilmente identificabili perché colorati in rosso. I leucociti sono ancora difficili da evidenziare dentro gli aggregati piastrinici, tuttavia la linea di demarcazione tra GR e aggregati piastrinici/leucociti è molto chiara (Figura 15C-D).

La linea di distinzione tra GR, leucociti e aggregati piastrinici non è evidente.

**Figura 17.**

Esame al SEM del coagulo giallo di fibrina ha rivelato una fitta matrice di fibrina matura con una bassissima quantità di corpi identificabili (RBC, leucociti, aggregati piastrinici) intrappolati. (Ingr. 2000) (modificata da Dohan Ehnrenfest et al. 2010).

**Figura 18.**

A e B) SEM Nelle vene biancastre all'interno del coagulo giallo, gli aggregati piastrinici erano strettamente uniti in una matrice di fibrina densa e matura. (Ingr. A x 1000; B x 1500) (modificata da Dohan Ehnrenfest et al. 2010).

spesse e dense. In essa è impossibile distinguere gli elementi cellulari contenuti.

Valutazione al SEM

L'osservazione del coagulo PRF al SEM a piccolo ingrandimento (15x) ha dimostrato che il coagulo presenta una concavità centrale che è un artefatto da fissazione. Nella parte rossa del coagulo PRF, i coaguli presentano GR nella rete di fibrina (Figura 16).

I GR sono normali ma la rete di fibrina appare immatura. Al limite tra la parte rossa e quella gialla del coagulo (area buffy coat), l'esame al SEM ha mostrato leucociti che appaiono come strutture sferiche con superficie irregolare (Figura 16A).

La maggioranza di questi è piccola (6-8 µm di diametro) e quindi potrebbe trattarsi principalmente di linfociti. Aggregati piastrinici appaiono lungo i filamenti di fibrina (Figura 6B).

Al di là dell'area buffy coat si distinguono due diverse aree: la prima costituita da filamenti di fibrina spessi e pochi GR sparsi, probabilmente da contaminazione; la fibrina sembra essere matura (Figura 17); la seconda costituita da quella vena di piastrine addensata osservata al microscopio ottico, caratterizzata da piastrine e fibrina in ammassi densi e grandi dovuti ad ampia aggregazione e coagulazione (Figura 18).

Questo aggregato è costituito da una rete spessa e solida e le piastrine sembrano altamente attivate durante il protocollo di preparazione di PRF.

A un maggiore ingrandimento la fibrina è chiaramente organizzata in fibre parallele molto

Analisi della distribuzione degli elementi corpuscolati

La più alta densità di piastrine e leucociti è stata trovata nel primo millimetro del coagulo giallo a limite con quello rosso.

La distribuzione di piastrine e leucociti diventa più bassa man mano che ci si sposta alla fine del coagulo e non sono state trovate più piastrine e leucociti oltre la prima metà del coagulo giallo. Nei primi 2 mm al di là del limite tra il coagulo rosso e quello giallo la distribuzione delle piastrine e di leucociti è abbastanza omogenea su tutta la lunghezza del coagulo. Oltre questo limite, quanto più ci si sposta dal bordo giallo/rosso, più piastrine (e leucociti) sono raggruppate in vene di concentrazioni piastriniche centrali o centrifughe. Queste vene presentano un'alta densità di piastrine/leucociti all'interno di una matrice priva di cellule.

Questa architettura è simile in tutti i coaguli, indipendentemente dai pazienti, dal tipo di provette e dal metodo di compressione. La conta piastrinica ha mostrato chiaramente che non ci sono quasi piastrine lasciate nello strato di GR, nel PPP e nell'essudato dopo la compressione del coagulo PRF.

Così la maggior parte delle piastrine provenienti dal campione di sangue intero sono raccolte nella membrana PRF. La conta leucocitaria ha confermato che oltre la metà dei leucociti è

intrappolata nella membrana PRF (Tabelle 2, 3) e i piccoli linfociti sembrano attratti in modo selezionato come confermato al SEM. Questi leucociti non sembrano essere danneggiati durante la preparazione di PRF. Questo risultato ha un forte impatto clinico poiché la quantità di leucociti impiantati all'interno della membrana è considerevole e i piccoli linfociti sono particolarmente efficienti nella regolazione delle reazioni infiammatorie. Inoltre, la composizione cellulare dell'L-PRF implica che questo biomateriale deve essere maneggiato con attenzione per fare in modo che il contenuto cellulare si mantenga vivo e stabile. Il microscopio fotonico ha dimostrato che la distribuzione piastrinica e dei leucociti all'interno del coagulo non è uniforme. Le piastrine e i leucociti sono concentrati nello strato che si trova tra il coagulo rosso e il coagulo di fibrina e si dispongono formando un rivestimento macroscopico sulla superficie del coagulo di PRF. Pertanto la parte più utile da un punto di vista chirurgico è lo strato biancastro intermedio. Quindi è necessario preservare un piccolo strato di GR all'estremità del coagulo di PRF che contiene la maggior parte di leucociti e piastrine. La procedura deve essere eseguita con le forbici ed è operatore-dipendente e ciò richiede una conoscenza accurata dell'architettura del PRF. La compressione leggera della matrice di fibrina determina che i filamenti di fibrina sono condensati e attaccati a vicenda. Quando le membrane PRF sono utilizzate in chirurgia il loro riassorbimento è lento e facilita il rimodellamento della matrice di fibrina in un tessuto cicatriziale. Per la standardizzazione della preparazione PRF come materiale di innesto per la rigenerazione tissutale, proponiamo l'utilizzo della regione delle membrane di PRF con il massimo arricchimento piastrinico e, inoltre, non spremere tutto il plasma contenuto nel coagulo di PRF. Quindi è consigliabile comprimere il coagulo con un dispositivo di compressione (L-PRF Wound Box). È difficile quindi controllare accuratamente la

qualità dei materiali di derivazione umana, come i preparati PRF, ma è molto importante effettuare il massimo livello di controllo di qualità sul PRF preparato prima della loro applicazione clinica. Ulteriori studi clinici, istologici e statistici sono richiesti per comprendere i vantaggi di questa nuova concentrazione piastrinica. Tuttavia, non si può ignorare che, quando ottenuto da un campione di sangue autologo, il PRF prodotto è scarso e solo un volume limitato può essere utilizzato. Questo fatto limita l'utilizzazione sistematica di PRF in Chirurgia Generale. Anche se le potenziali applicazioni di PRF sono ampie, è necessaria un'accurata conoscenza del funzionamento del biomateriale, la sua biologia, l'efficienza e i limiti, per ottimizzare il suo utilizzo nella pratica clinica quotidiana (Chatterjee et al. 2014).

Abbreviazioni

C-PRF	Compressione di PRF con sistema di compressione
EGF	Fattore di crescita epidermico
FGF	Fattore di crescita dei fibroblasti
FPRP	Preparato fresco di plasma ricco di piastrine
G-PRF	Compressione di PRF con garza
HGF	Fattore di crescita degli epatociti
HPC	Concentrato di piastrine umano
IGF	Insulin-like growth factor
L-PRF	Fibrina ricca di piastrine con leucociti
LPRP	Plasma ricco di piastrine liofilizzato
MMP	Matrice delle petaloproteasi
PDGF	Fattore di crescita derivato dalle piastrine
PDWHF	Fattori cicatrizzanti derivati da piastrine umane autologhe
PRF	Fibrina ricca di piastrine
PPP	Plasma privo di piastrine
PPGF	Plasma povero di fattori di crescita
P-PRF	Fibrina ricca di piastrine pura
P-PRP	Plasma ricco di piastrine puro
PRGF	Plasma ricco di fattori di crescita = P PRP
TGF	Fattore di crescita trasformante

N.B. L'Autore è responsabile di figure, tabelle e grafici presenti in questo articolo.

Bibliografia

- Chatterjee A, Agarwal P, Subbaiah SK. Platelet rich fibrin: an autologous bioactive membrane, *APOLLO Medicine*. 2014; 11:24-26.
- Crisci A, et al., Preliminary results of experimental research on a technique for measuring skin ulcer lesions, *Acta Vuln* 2011; 9(2):53-63.
- Crisci A, et al. Il computer al servizio della citologia: l'analisi delle immagini, *Quad Med Chir* 1986; 3:285-94.
- Crisci A, et al, Presentazione di un software per la misurazione delle lesioni cutanee ulcerative, *Atti X Congresso AIUC* 2011; 87.
- Crisci A, Crisci M, Boccalone E. Final results of an experimental research about a technique of measurement of skin lesions, *Esperienze Dermatologiche*, 2014; 16:147-152.
- Del Corso M, et al. Accelerazione dei processi di cicatrizzazione tissutale con un nuovo biomateriale: la fibrina ricca di piastrine (PRF), *Odontoiatria* 2007; 4:361-366.
- Desai CB, Mahindra UR, Kini YK, Bakshi MK. Use of platelet-rich fibrin over skin wounds: modified secondary intention healing. *J Cutan Aesthet Surg*. 2013; 6:35-37.
- Dohan Ehrenfest DM, et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-rich plasma- PRP, Platelet-rich fibrin - PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives, *M.L.T.J.* 2014; 1:3-9.
- Dohan Ehrenfest DM, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2012; 13:1145-1152.
- Dohan Ehrenfest DM, et al. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol*. 2010; 81(4):546-555.
- Knighton DR; et al. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds, successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg*. 1986; 204:322-329.
- Kobayashi M, et al. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. 2012; 40:323-329.
- McLellan J, Plevin S. 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*. 2014; 1:48-57.
- Naik B, et al. Role of platelet rich fibrin in wound healing: a critical review. *J Conserv Dent*. 2013; 16:284-293.
- Nurden AT, et al. Platelets and wound healing, *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13:3525-3548.
- Pagano M, Gauvreau K. *Biostatistica*, ed Idelson-Gnocchi, 2003.
- Pretorius E, et al. Ultrastructural comparison of the morphology of three different platelet and fibrin fiber preparations, *The Anatomical Record*. 2007; 290:188-198.
- Su C-Y, How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRP, Choukroun technique) clots and membranes: introducing the PRF box. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path, Oral Rad End*. 2010; 110:278-280.
- Textor JA, et al. Ultrastructure and growth factors content of equine platelet-rich fibrin gels, *A.J.V.R.*, 2014; vol.75, n4, 392-401.
- Zhao QM, Ding YJ, Si T. Platelet-rich fibrin in plastic surgery, *OA Evidence-based Medicine*. 2013; 1(1):3.