

## LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI CON FIBRINA RICCA DI PIASTRINE I NUOVI CONCENTRATI PIASTRINICI

La rigenerazione è il fine ultimo nel campo dell'ingegneria tissutale multidisciplinare, insieme al miglioramento o alla sostituzione, in modo prevedibile, di tessuti danneggiati o mancanti, un evento che si presenta in una moltitudine di condizioni, tra cui traumi, malattie e invecchiamento. Per garantire un'ampia disponibilità di diverse tecniche di ingegneria tissutale in campo clinico, queste devono essere modificate e adattate per renderle accessibili e relativamente facili da applicare nella routine clinica quotidiana. La Platelet Rich Fibrin (PRF) di Choukroun e i suoi derivati sono stati implementati in una vasta gamma di campi medici, come un concentrato soprannaturale di fattori di crescita autologhi, in grado di simulare la rigenerazione dei tessuti. Le piastrine sono state trovate all'interno dei coaguli di sangue, nella sua interezza, in tutti i suoi diversi gruppi, anche se all'interno del gruppo A-PRF, la conta delle piastrine è maggiore nella porzione distale, distale al Buffy Coat (BC), rispetto al L-PRF. I linfociti T e B, le cellule staminali e i monociti sono stati trovati vicino al BC. La diminuzione del numero di rotazioni e l'aumento della durata della centrifugazione nel gruppo A-PRF porta a una maggiore conta di neutrofili nella porzione distale dei coaguli. In conclusione, i risultati dello studio hanno evidenziato gli effetti positivi del PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) nella guarigione delle ferite, dopo la terapia rigenerativa.



### ALESSANDRO CRISCI

È nato il 30 giugno 1958 ad Airola (BN) dove attualmente risiede. Si è laureato in Medicina e Chirurgia presso la prima facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli con una tesi in Biologia generale e si è specializzato in Chirurgia generale. È stato stato coadiutore all'insegnamento e alle esercitazioni per i corsi di Biologia generale e Zoologia della stessa facoltà. Già responsabile del servizio di dermochirurgia e del Centro di cura delle ferite difficili e dei trapianti di pelle presso la Casa di cura "San Michele" di Maddaloni (CE), ricopre lo stesso

incarico presso la Casa di cura "Villa Fiorita" di Aversa (CE). Docente presso l'Università di Salerno, nel 2015 è autore del libro *Il Piede diabetico* (Aracne Roma). Nel 2021 è autore del libro *New Platelet Concentrates Useful in Tissue Repair. Platelet-rich Fibrin with Leukocytes (L-PRF), Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF) and Injectable Platelet-rich Fibrin (i-PRF)* (BP International London). È autore di cento pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali.



12,00 EURO



ALESSANDRO CRISCI LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI CON FIBRINA RICCA DI PIASTRINE

SAL  
14



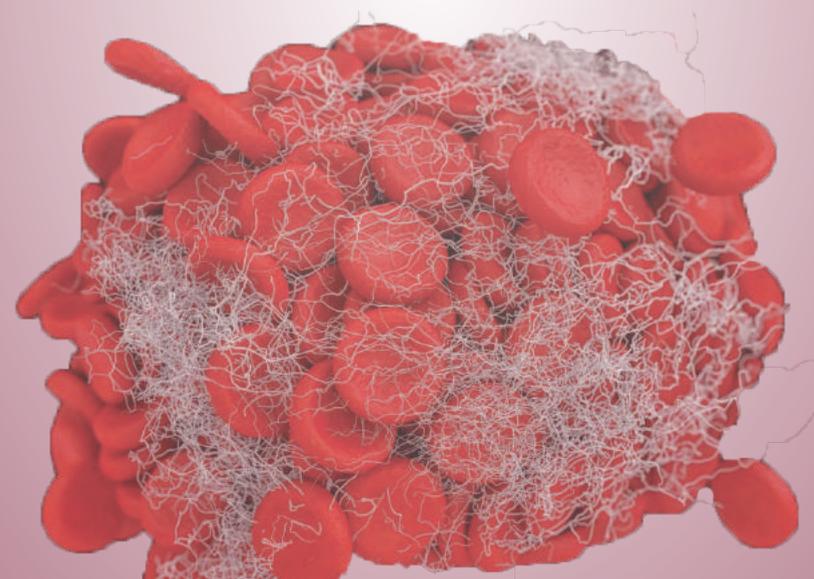
ALESSANDRO CRISCI

# LA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI CON FIBRINA RICCA DI PIASTRINE

I NUOVI CONCENTRATI PIASTRINICI

prefazione di

MARIO CAPUNZO



SALUS  
COLLANA DI SCIENZE DELLA SALUTE

I4

*Direttore*

**Rossana ALLONI**

Università Campus Bio–Medico di Roma

*Comitato scientifico*

**Paola BINETTI**

Università Campus Bio–Medico di Roma

**Laura DE GARA**

Università Campus Bio–Medico di Roma

**Caterina GALLETTI**

Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

**Simonetta FRISO**

Università degli Studi di Verona

**Alessandra LA MARCA**

Università degli Studi di Palermo

**Paolo PELLEGRINO**

Università Campus Bio–Medico di Roma

**Daniela TARTAGLINI**

Università Campus Bio–Medico di Roma

SALUS  
COLLANA DI SCIENZE DELLA SALUTE

Questa collana è dedicata a quanti coltivano le Scienze della salute, sia come docenti e studenti dei diversi corsi di laurea sia come operatori nell'ambito delle professioni mediche e sanitarie.

Caratteristiche comuni a tutti testi della collana sono la semplicità e la concretezza dell'esposizione e l'aggiornamento dei contenuti secondo le più recenti acquisizioni della ricerca scientifica, insieme ad una particolare attenzione agli aspetti umanistici e sociali. Per la natura stessa di questo ambito scientifico e professionale, coesistono nella collana testi dedicati alla didattica e alle relazioni interpersonali, al *management* e all'approfondimento di aspetti tecnici e tecnologici, in una prospettiva che vuole sottolineare la centralità della persona umana.



ALESSANDRO CRISCI

**LA RIGENERAZIONE  
DEI TESSUTI CON FIBRINA  
RICCA DI PIASTRINE  
I NUOVI CONCENTRATI PIASTRINICI**

*Prefazione di*

**MARIO CAPUNZO**



**aracne**



ISBN  
979-12-5994-XXX-X

PRIMA EDIZIONE  
ROMA 29 OTTOBRE 2021

*A mio padre,  
che non ha potuto godere dei miei progressi professionali*



## INDICE

- 11 *Prefazione*  
di MARIO CAPUNZO
- 13 Capitolo I  
Coinvolgimento della fibrina ricca di piastrine e leucociti (L-PRF).  
Come concentrati piastrinici di seconda generazione nella riparazione  
dei tessuti e nel recupero osseo
- 39 Capitolo II  
Determinazione della rigenerazione dei tessuti da concentrati ricchi di  
piastrine (L-PRF, PRP) coinvolgono nel controllo dell'apoptosi
- 53 Capitolo III  
Valutazione dei concentrati di seconda generazione di PRF nella  
chirurgia cutanea del piede
- 53 Capitolo IV  
Quantificazione delle piastrine e dei leucociti nei concentrati piastrinici  
solidi del sangue
- 77 Capitolo V  
La Fibrina ricca di piastrine ottimizzata con il concetto di bassa  
velocità di centrifugazione (LSCC). Rilascio dei fattori di crescita,  
biocompatibilità e risposta cellulare

- 93 Capitolo VI  
L'effetto antimicrobico in vitro del L-PRF (Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin) e dei suoi derivati. A-PRF (Advanced Platelet-Rich Fibrin), i-PRF (injectable Platelet-Rich Fibrin)
- 119 *Ringraziamenti*

## PREFAZIONE

È stato con grande piacere che ho accettato l'invito del Dr. Crisci a presentare questo testo sulla terapia rigenerativa delle lesioni, invitare qualcuno a presentare il proprio lavoro è sempre uno dei più grandi atti di affetto e stima e quindi prima di tutto il mio ringraziamento per questo onore.

È un testo che si caratterizza per la facilità di lettura, la completezza di presentazione delle tecniche di diagnosi e trattamento, l'ordine nelle diverse esposizioni. È chiaro dall'indice che questo è un testo scritto da un clinico per i clinici.

Non manca la valutazione delle ultime tecniche, delle basi di ricerca e dei nuovi concetti terapeutici, alcuni dei quali sono ancora in fase sperimentale tutti finalizzati all'applicazione pratica, con lo scopo di aiutare i pazienti.

Iniziative come questa sono tra le migliori risposte che, chi lavora nel campo, può dare.

Un vademecum a disposizione di medici, specialisti e non; vengono dati gli strumenti per operare a 360 gradi sulla problematica incentrata sulla cosiddetta terapia rigenerativa. La lettura è semplice ma ricca di contenuti, coniugando bene l'alta scienza con la pratica clinica, porta a semplificare il lavoro di chi si avvicina come nuovo operatore e offre spunti a chi ha familiarità con la pratica di questa arte.

Condividere il proprio sapere, la propria esperienza è, credo, una delle opere più meritorie tra le più meritorie che si possano fare. Auguro ai lettori una proficua lettura e agli Autori il giusto e meritato successo.

Ad Majora

MARIO CAPUNZO

Professore Ordinario di Igiene Università di Salerno



## CAPITOLO I

# **COINVOLGIMENTO DELLA FIBRINA RICCA DI PIASTRINE E LEUCOCITI (L-PRF) COME CONCENTRATI PIASTRINICI DI SECONDA GENERAZIONE NELLA RIPARAZIONE DEI TESSUTI E NEL RECUPERO OSSEO**

### **1.1. Introduzione**

La fibrina ricca di leucociti e piastrine (L-PRF) è un concentrato piastrinico di seconda generazione, che è una miscela 3-D autogena di Fibrina Ricca di Piastrine ottenuta dal sangue del paziente e utilizzata clinicamente per accelerare la guarigione dei tessuti e il recupero osseo. L-PRF ha preferenze su PRP e PRGF (Plasma ricco di piastrine e Fattori di crescita derivati da piastrine) in quanto ha la struttura solida della fibrina e non richiede alcuna alterazione biochimica attraverso l'aggiunta di trombina bovina o anticoagulanti. Come risultato delle sue proprietà naturali del sistema fibrinico, gli elementi di crescita possono mantenere la loro azione per un periodo generalmente più lungo e far avanzare i tessuti. Le piastrine possono assumere un altro ruolo nella fissazione dei tessuti e nel rimodellamento vascolare, oltre ad essere un ruolo dinamico nella risposta infiammatoria e immunitaria. Un numero significativo di queste sostanze viene accumulato e messo via in granuli piastrinici effettivamente evidenziati al microscopio elettronico a scansione (SEM) e con colorazione in immunofluorescenza. Le fibre sottili contenute nell'HPC (concentrato di piastrine umane) potrebbero essere identificate con l'elevata centralizzazione iniziale delle piastrine nell'HPC. Le proteine della colla fibrinica sono piuttosto abbondanti sul reticolo della fibrina: Fibrinogeno (Fg), fibronectina (Fn), vitronectina (Vn), trombospondina-1 (TSP-1).

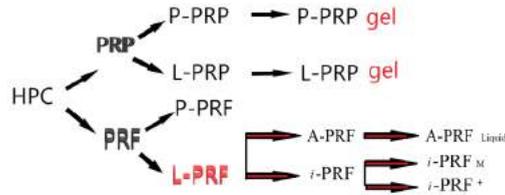
La fibronectina (Fn) accetta di guarire le ferite e favorisce la migrazione mitogenica del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF). Tra i fat-

tori di crescita (FG), fondamentali per la guarigione della ferita, contiamo il PDGF, in particolare PDGF-AB e PDGF-C (isoforme predominanti nelle piastrine); diversi elementi incorporano il fattore di crescita vaso-endoteliale (VEGF), fondamentalmente il VEGF-A, fattore di crescita trasformante 1 (TGF-1), fattore di crescita essenziale dei fibroblasti (bFGF), della famiglia FGF-2; fattore di crescita epidermica (EGF), fattore di crescita degli epatociti (HGF) e fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1). Gli individui della famiglia TGF si notano per quanto riguarda la cicatrizzazione delle ferite e la disposizione delle cicatrici. Tenendo un ruolo dominante nella guarigione, le piastrine sono una ricca fonte di citochine e chemochine. Un modello è RANTES, una chemochina immagazzinata sull'endotelio a causa di uno strumento subordinato alla P-selectin-platelet-subordinato. Le piastrine sono la sorgente degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP 1-4) che si trovano anche nei granuli e nelle vescicole dello strato citoplasmatico. Le Metalloproteinasi (MMP) sono presenti in un gruppo di enzimi la cui capacità fondamentale è lo svilimento delle proteine della rete extracellulare, ad esempio collagene, fibronectina, elastina e proteoglicani.

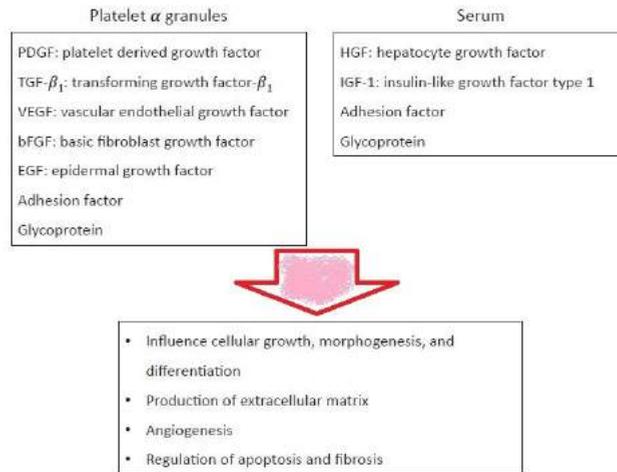
I coaguli di fibrina ricca di piastrine possono essere considerati come un deposito bioattivo. Un'elevato ematocrito o una bassa conta piastrinica potrebbe essere un componente limitante, e si prevede che un'ulteriore analisi consentirà di stabilire una media piastrinica ideale del materiale da utilizzare nella metodologia. La coagulazione PRF è ottenuta mediante un caratteristico processo di polimerizzazione, durante la centrifugazione, e il disegno della fibrina comune è a tutti gli effetti responsabile di un moderato rilascio di glicoproteine GF e di rete ( $\geq 7$  giorni). I coaguli di PRF sono utilizzati direttamente per riempire i pozzetti in plastica e nelle mediazioni di procedura medica generale. Sebbene le GF piastriniche diffondano un ruolo fondamentale nella scienza delle PRF, il design della fibrina, le sostanze contenenti leucociti e la vicinanza delle cellule staminali sono tre parametri fondamentali.

## 1.2. Materiali e tecniche

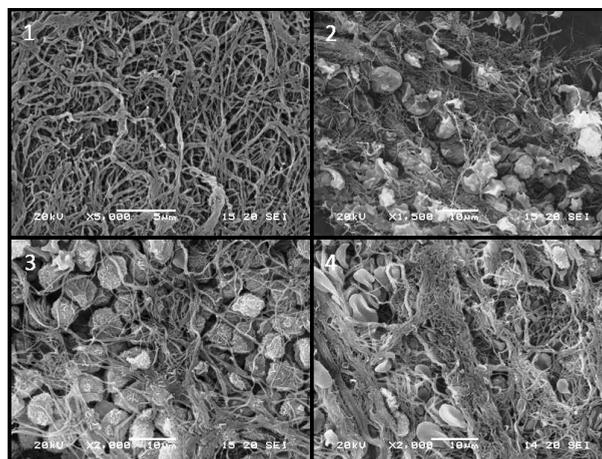
Preparazione di L-PRF: nella convenzione di produzione della PRF il sangue viene prontamente centrifugato entro 2 minuti dal prelievo, a seguito delle consecutive progressive centrifugazioni: 30" di velocità crescente, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm, e 36" di decelerazione e arresto. Il prodotto finale è costituito da tre strati: PPP (plasma povero di piastrine nella parte



**Figura 1.** Diversi tipi di concentrati piastrinici umani (HPC): PRP (plasma ricco di piastrine); PRF (fibrina ricca di piastrine); P-PRP (plasma ricco di piastrine pure); L-PRP (plasma ricco di leucociti e piastrine); P-PRF (fibrina ricca di piastrine pure); L-PRF (fibrina ricca di leucociti e piastrine); i-PRF (fibrina ricca di piastrine iniettabili); A-PRF (fibrina ricca di piastrine avanzata).



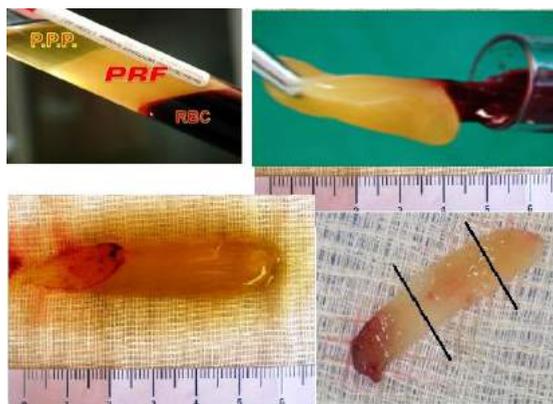
**Figura 2.** Funzioni delle piastrine nella medicina rigenerativa.



**Figura 3.** Visualizzazione dell'immagine SEM: 1 lo strato ricco di fibrina (5.000 x ingrandimento); 2 una zona di piastrine arricchite con vari gradi di attivazione (1.500 x ingrandimento); 3 buffy coat con numerosi leucociti e 4 la base dei globuli rossi (2.000 x ingrandimento).

superiore), PRF (coagulo centrale) e globuli rossi (RBC) alla base. I coaguli di PRF si accumulano e i coaguli rossi vengono eliminati con la guida delle forbici, senza danni macroscopici al valore della struttura di PRF. Il fibrinogeno è dapprima concentrato al centro e nella parte superiore della provetta, che si trova al centro dei globuli rossi (RBC) alla base e nel plasma povero di piastrine (PPP) nella parte superiore. La pressione del coagulo con metodi di pressione (L-PRF box) rinvigorisce essenzialmente la moltiplicazione cellulare e la neovascolarizzazione. Le parti centrali della PRF contengono piastrine, enormemente racchiuse all'interno della rete in fibrina. La realizzazione correttiva di questo tipo di strategia è del tutto dipendente dal tempo intermedio tra il prelievo di sangue e la sua centrifugazione, che dovrebbe essere portato avanti nel più breve tempo concepibile, così come sulla preparazione della temperatura e il tipo di provetta utilizzata.

Impatti della PRF nella progettazione dei tessuti: il confinamento delle piastrine all'interno del gel PRF è stato ispezionato mediante immunocolorazione e con la guida del microscopio elettronico a scansione. Inoltre, i fattori ottenuti dalle piastrine avviano e controllano l'espansione e la migrazione di diversi tipi di cellule, che sono associate alla fissazione dei tessuti, simili alle cellule muscolari lisce (SMC) e alle cellule mesenchimali immature (MSC). Piastrine attivate rilasciano un intero spettro di chemochine e fanno avanzare l'assimilazione, la presa e l'espansione delle microcellule di base adulte, comprese le cellule staminali positive CD-34, le CSM, i generatori di SMC e le cellule staminali endoteliali. Le piastrine gestiscono l'arruolamento di microcellule acerbe adulte verso le cellule danneggiate e potrebbero di conseguenza stabilire uno strumento di base per le forme cel-



**Figura 4.** Diverse fasi di preparazione della PRF.

**Tabella 1.** Numero di leucociti, RBC e piastrine nel sangue intero (gruppo di controllo) e coaguli rossi dopo la raccolta della membrana PRF (gruppo di test).

	Leukocytes/ $\mu\text{l}$		RBC/ $\mu\text{l}$		Platelets/ $\mu\text{l}$	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Controll	6.900	6.100-7.800	5.19 ( $10^6$ )	5.01-5.52 ( $10^6$ )	2.66 ( $10^5$ )	2.18-3.09 ( $10^5$ )
Group 1	3.500	3.000-3.800	5.89 ( $10^6$ )	5.75-6.08 ( $10^6$ )	6.000	4.000-8000
Group 2	3.600	3.300-4.000	5.84 ( $10^6$ )	5.78-5.91 ( $10^6$ )	7.000	6.000-9000

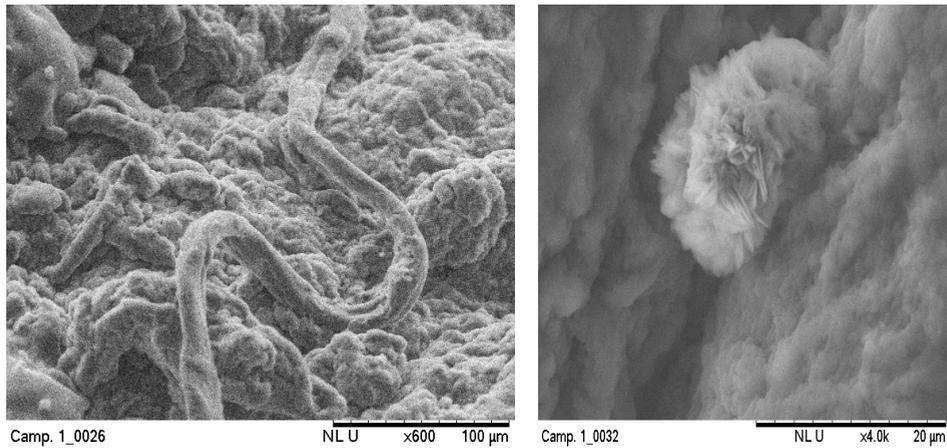
lulari rigenerative. Le piastrine messe in attivazione rilasciano HGF e sono state collegate all'ingresso delle CSM attraverso le cellule endoteliali, allineando le vie di approvvigionamento umano. L'espansione delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) corrisponde alla concentrazione di piastrine all'interno di concentrati di PRF.

In questo senso, la base di una convenzione standard per la preparazione delle PRF era di vitale importanza, soddisfacendo i criteri di requisito:

- i fattori di crescita contenenti piastrine dovrebbero essere protetti per animare le cellule ospiti;
- le piastrine dovrebbero essere riposte all'interno dell'opera in fibrina con un danno o un'implementazione trascurabile;
- il lavoro con fibrina tridimensionale deve essere utilizzato come struttura che comprende le cellule ospiti.

Il siero tenuto in PRF potrebbe contenere livelli elevati di GFs, rilasciati dalle piastrine, che sono abbastanza dinamiche durante le fasi di centrifugazione; non abbiamo cercato di schiacciare tutto il plasma con una pressione totale dei coaguli PRF. La propensione del C-PRF a contenere livelli di fattori di crescita più elevati (PRF compresso attraverso una pressione metallica), in contrasto con G (PRF compattato con un panno), potrebbe essere seguito di nuovo a GF contenenti piastrine (PDGF-AA, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB).

I risultati potrebbero essere dovuti alla fibrina, dal momento che il lavoro con la fibrina potrebbe legittimamente ingerire GFs o potrebbe impigliare l'albumina nel siero o l'eparina, di conseguenza per implicazione che tiene i GFs. È praticamente inimmaginabile per il conteggio e la gestione delle piastrine prevedere nella preparazione PRF prima dell'utilizzo clinico. Un tasso di trasferimento più elevato è stato osservato per L-PRF in contrasto con L-PRP il terzo, settimo e quattordicesimo giorno. Anche il trasferimento di



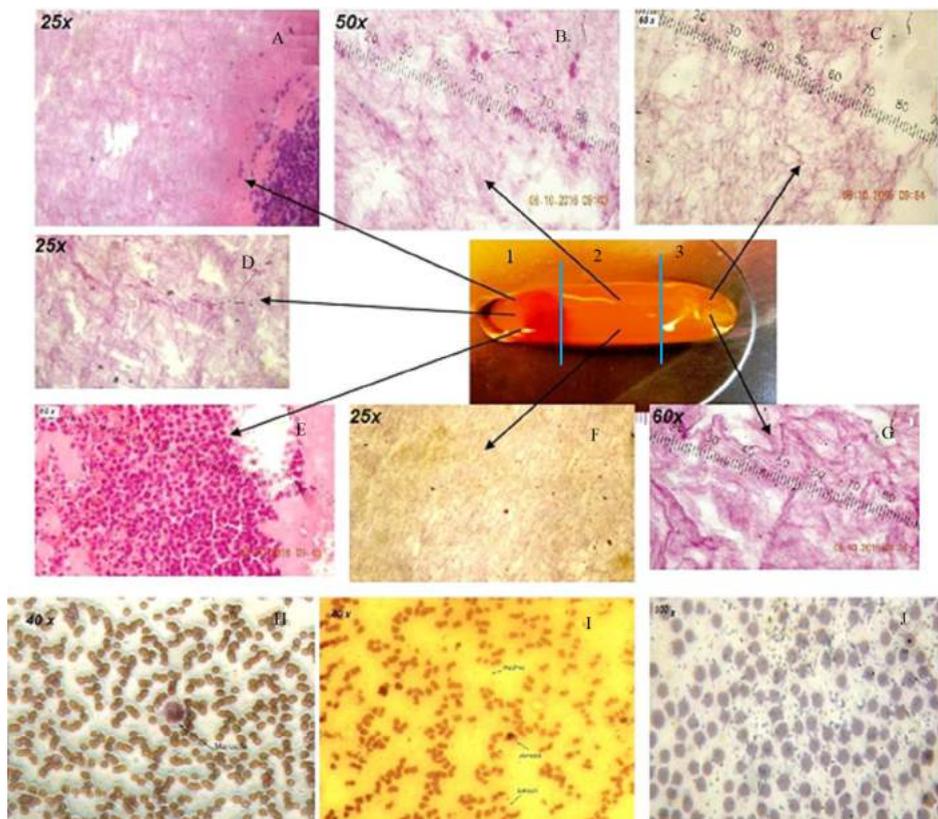
**Figura 5.** Immagine al microscopio S.E.M. Hitachi Tabletop Microscopio da tavolo TM3000 di L-PRF. A sinistra: Maglia di fibra (ingrandimento 600x); a destra: piastrina attivata (ingrandimento 4000x).

HUVECs è arrivato al suo apice il terzo, settimo e quattordicesimo giorno per la preparazione della PRF.

### 1.3. Studi preclinici

Per scopi di bioingegneria, la fibrina è un substrato prezioso ed è un noto idrogel nella costruzione di tessuti e farmaci rigenerativi. L-PRF è un preparato che contiene leucociti, e con un elevato spessore nel lavoro della fibrina. Questi prodotti esistono come gel nativi, e non possono essere infusi o utilizzati come abituale stick di fibrina. La fibrina crea una breve struttura presso il sito di adesione, tuttavia, le sue fibre non hanno effetto o pressione, e ha un basso controllo dei relativi fattori di crescita. PDGF e TGF- $\beta$ 1 sono i fattori di crescita più abbondanti, contenuti negli  $\alpha$ -granuli delle piastrine e vengono rilasciati all'interno dello spazio extracellulare, dopo l'attivazione delle piastrine.

L-PRF mostra un'incredibile maneggevolezza, i singoli coaguli L-PRF possono essere trasformati in film di vario spessore e misure, grazie alla nuova "L-PRF Wound Box" (figura 7); l'unione di almeno due strati è preziosa per realizzare un film bioattivo di misure maggiori, per coprire e incorniciare unioni maggiori.



**Figura 6.** Le tre regioni C-PRF e l'osservazione della distribuzione piastrinica O.M. sulla superficie della membrana. Il C-PRF è stato suddiviso in tre regioni: La regione 1 adiacente al coagulo rosso (RBC), la regione 2 è la parte centrale e la regione 3 è la parte distale del coagulo rosso. La distribuzione delle piastrine è stata osservata nelle regioni 1 (A-D-D-E), 2 (B-F) e 3 (C-G). Le piastrine sono a concentrazioni più elevate nella regione 1 e a concentrazioni più basse nella regione 3. (da Crisci A. *et al.* 2017) Membrana L-PRF Ø min dopo compressione (colorazione ematossilina eosina). (A) III prossimale 25x fibrina a forma di globuli bianchi; (B) media III 60x fibrina a forma di eritrociti; (C) III distale 60x fibrina a forma di eritrociti; (D) III prossimale 25x eritrociti-fibrina; (E) III prossimale 60x fibrina a destra, i linfociti centrali, eritrociti e neutrofili granulociti a sinistra; (F) media III 25x pattern di fibrina; (G) III distale 60x pattern fibrina; (H) striscio di coagulo rosso 40x presenza di monociti in un tappeto di globuli rossi; (I) striscio di coagulo rosso 40x presenza di globuli rossi, monociti e piastrine; (J) striscio di coagulo rosso 100x presenza di piastrine in un tappeto di globuli rossi (colorazione: May-Grünwald-Giemsa).

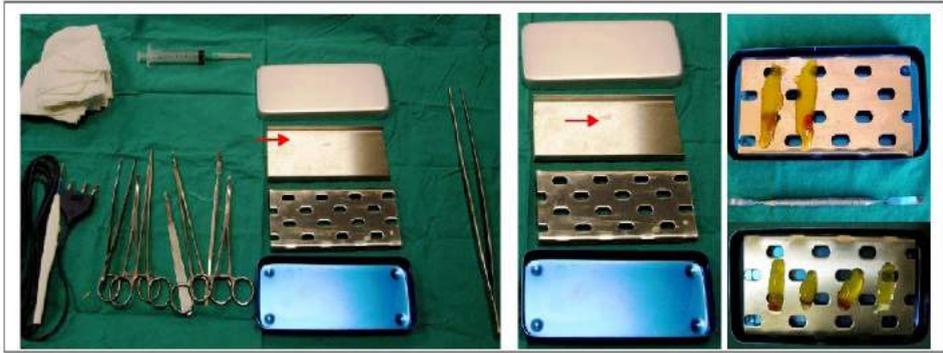


Figura 7. L-PRF Wound Box.

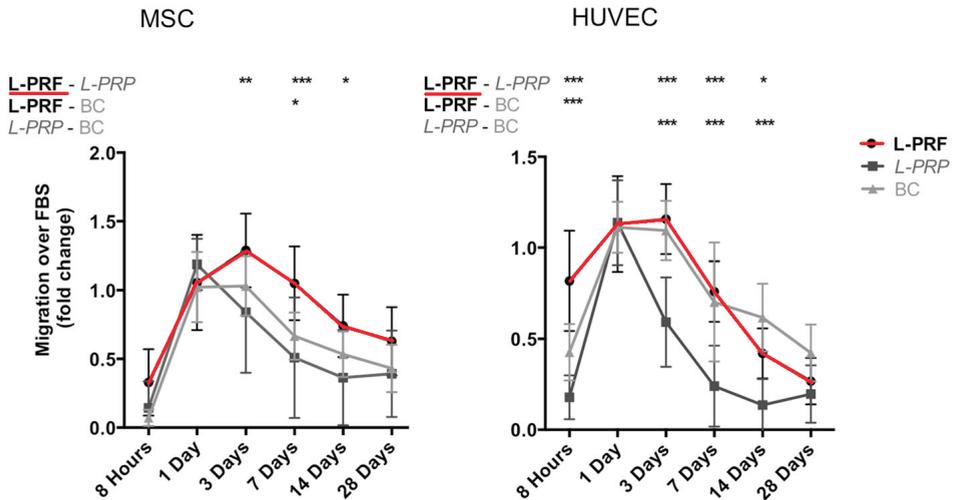


Figura 8. La migrazione di MSC e HUVEC è mostrata in risposta ai fattori rilasciati da L-PRF, L-PRP e coaguli di sangue (BC). La migrazione di MSC e HUVEC è stata valutata in camere di Boyden con mezzi raccolti dopo 8 ore e 1, 3, 7, 14 e 28 giorni di L-PRP, L-PRF e coaguli di sangue rispetto ai terreni contenenti FBS al 10 % e ha espresso come girare. I dati sono presentati come media  $\pm$  SD da un triplo di 11 campioni. La valutazione statistica è stata effettuata utilizzando l'ANOVA a due vie ripetute e il test post hoc Bonferroni. Sono indicate differenze significative per la migrazione di CSM e HUVEC tra i concentrati piastrinici in momenti diversi: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 1.4. L-PRF in vitro

L-PRF in vitro, L-PRF e P-PRP (Pure Platelet Rich Plasma) (PRFG-interest) sono state pensate le parti in gel, attraverso la valutazione degli elementi di crescita moderata e il rilascio di molecole della matrice. Queste due famiglie di gel sono state seminate su un terreno di crescita per 7 giorni, e la resa moderata di 3 fattori chiave di crescita (TGF- $\beta_1$ , PDGF-AB, VEGF) e 3 proteine di coagulazione e 3 proteine della matrice. I leucociti trovati in L-PRF non sono solo cellule infiammatorie, in quanto si mostrano ostili anche agli impatti dei nocicettori, attraverso l'arrivo di varie chemochine, citochine calmanti. Le vere PRF sono costantemente autologhe e non omologhe. Gli essudati PRF sottostanti (ricchi di variabili di crescita e proteine sieriche) sono raccolti nel contenitore e i PRF sono messi via in una condizione siero-umidificate. Questa è una tecnica convincente in una prospettiva naturale.

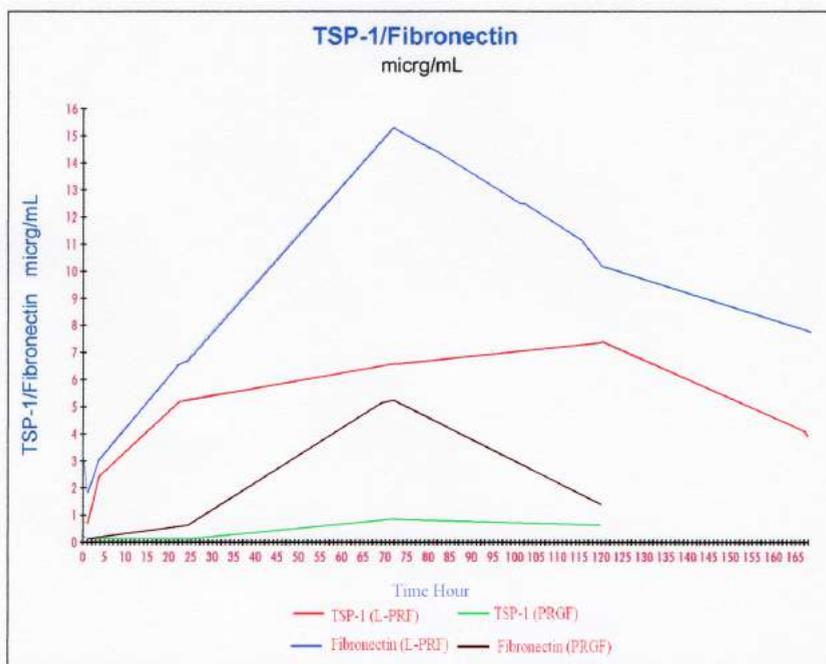
Un altro dispositivo che abbiamo provato in L-PRF coaguli e strati prontezza e strategia di istituzionalizzazione è L-PRF Wound Box in questo le coagulazioni PRF possono essere trasformate in film. Questo dispositivo garantisce la conservazione del coagulo in condizioni umide e sterili per 60 minuti, e permette il rilascio incompleto dei fattori di crescita. Utilizzando il PRF Box, la pressione di coagulazione nello strato viene aiutata attraverso una leggera pressione, lenta ed omogenea, e il film successivo rimane costantemente bagnato in modo omogeneo e inzuppato dal siero.

Un sistema di prelievo non istituzionalizzato, lento e carente, provoca una piccola massa di fibrina simile alla PRF, con polimerizzazione insicura della fibrina (con conseguenti scarse proprietà meccaniche) e un fattore di crescita oscuro e non riproducibile.

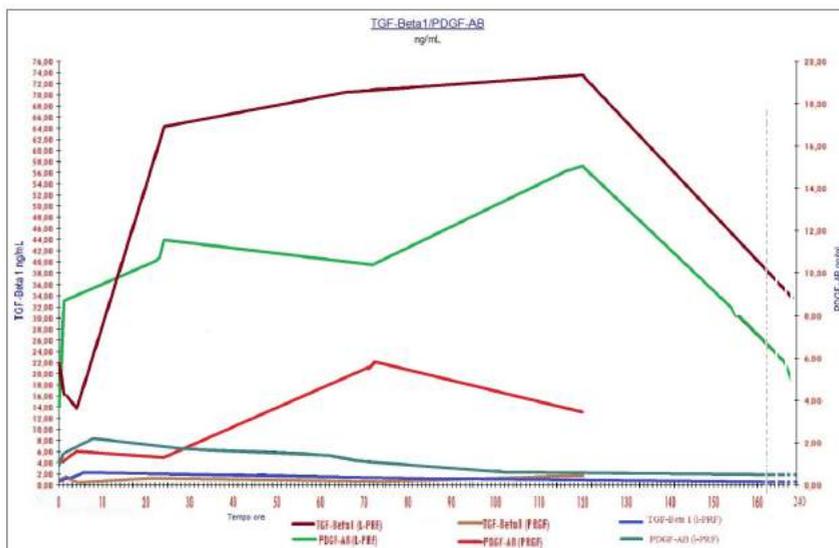
#### 1.5. Limitazioni della PRF

Piastrine, fibrina e leucociti agiscono normalmente in modo sinergico per favorire la guarigione delle lesioni e il recupero dei tessuti, e l'intensificazione di questo impatto di coagulazione/recupero su un sito attento o una ferita è il punto di lavoro del concentrato piastrinico disposto con precisione.

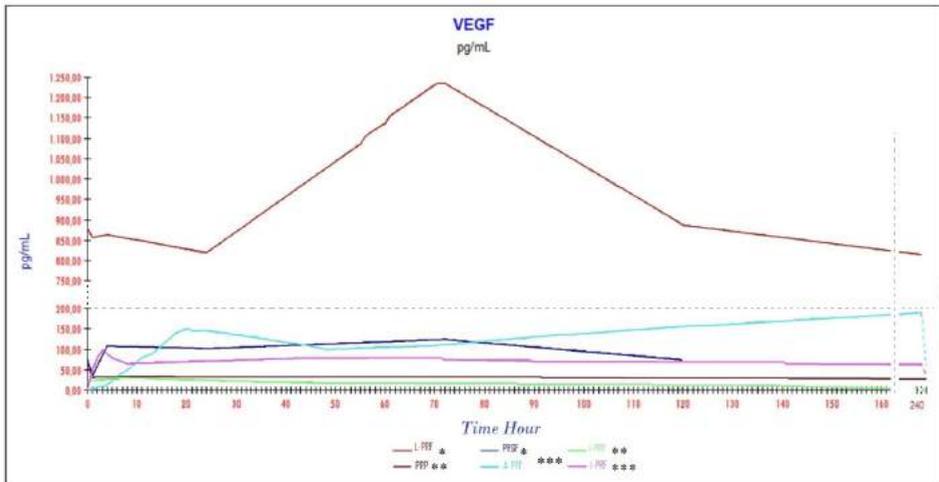
I limiti riscontrati nel contesto clinico e nell'utilizzo di questi prodotti includono:



**Figura 9.** Variazioni nel tempo della TSP-1 e della fibronectina. L-PRF a confronto con PRGF (Plasma ricco di fattori di crescita = P-PRF).



**Figura 10.** Variazioni nel tempo di TGF-1/PDGF-AB. L-PRF a confronto con PRGF e i-PRF.



Variazioni di VEGF nel tempo. Confronto tra L-PRF, PRGF, i-PRF, PRP, A-PRF.

\* da Dohan Ehrenfest et al. 2012 ; \*\* da Miron et al. 2017 ; \*\*\* da Al-Mawwi et al. 2018 ;

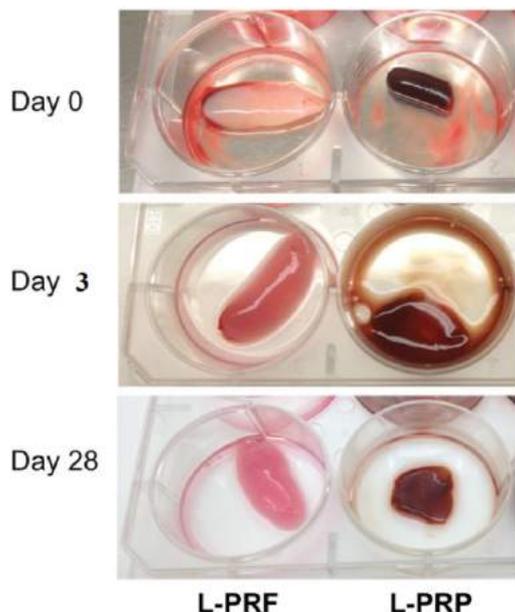
**Figura 11.** Variazioni nel tempo del VEGF. L-PRF a confronto con PRGF e i-PRF.

- poiché la PRF è un prodotto autologo, una necessità in espansione per l'accessibilità dei biomateriali è difficilmente realizzabile. Successivamente, il suo utilizzo in chirurgia deve essere fermamente controllato.
- la PRF contiene cellule immunitarie circolanti, proprio come le molecole antigeniche che ne impediscono l'utilizzo come materiale allogeneo; inoltre, si deve considerare un rischio minore per la trasmissione di malattie infettive.

I problemi legati alla fissazione piastrinica sono inesistenti, in quanto tutte le piastrine prelevate per l'esame del sangue vengono attivate e coordinate all'interno della matrice fibrinica della coagulazione. Il TGF- $\beta$ 1 viene espanso quantitativamente in PRF a rilascio moderato, in contrasto con il PRF a rilascio rapido. Non vi è alcuna distinzione apprezzabile nell'ingegneria PRF che utilizza vari tipi di provette.

## 1.6. Indagine su piastrine e leucociti

Quasi tutte le piastrine (>97%) mancavano all'interno dei contenitori di prova della raccolta esaminata dopo l'estrazione dello strato di PRF. La manca-



**Figura 12.** Aspetto di ciascun concentrato al momento della preparazione (giorno 0), dopo il terzo e il ventottesimo giorno.

**Tabella 2.**

Type	Membrane 0 min		Membrane 60 min		Between Membrane L-PRF 0-60 min 2 (%)			
	No./ml	%	No./ml	%	<i>t-test*</i>		<i>x<sup>2</sup></i>	
RBC	21,6012	0.0028%	193,966	0.0025%	P= 0.000	S	P= 0.266	NS
WBC	5,111.15	99.24%	5,036.86	97.80%	P= 0.007	NS	P= 0.993	NS
PLT	105,801	99.00%	97153	91.00%	P= 0.002	S	P= 1.000	NS

ta presenza di contrasti tra le due raccolte di prova ( $p > 0,05$ ) sembra dimostrare che la pressione di coagulazione non influisce sull'arrivo immaginabile di corpi cellulari catturati all'interno della struttura della fibrina. Nelle raccolte di test, la concentrazione dei linfociti è complessivamente più bassa, mentre la fissazione dei granulociti è maggiore ( $p < 0,01$ ), a differenza di una raccolta di controllo. In conclusione, il volume medio delle piastrine (MPV) è diminuito sensibilmente tra le raccolte di test e le raccolte di controllo ( $p < 0,01$ ); è sceso da  $9 \mu^3$  (range:  $8-11 \mu^3$ ) nel sangue intero a  $4,7 \mu^3$  (range:  $4,5-5,8 \mu^3$ ) nelle raccolte di test. Questa meraviglia potrebbe essere dovuta agli incrementi di osmolarità del plasma all'interno delle provette dopo l'attivazione nel corso della coagulazione.

**Tabella 3.** Formula leucocitaria stabilizzata nel sangue intero (gruppo di controllo) e coaguli rossi dopo la raccolta della membrana PRF (gruppo di prova).

Cell type	Whole blood (%)		Group 1(%)		Group 2 (%)	
	Mean	Range	Mean	Range	Mean	Range
Neutrophils	51.8	49.7-53.2	72.1	66.1-77.1	66.4	60.9-71.4
Eosinophils	2.9	2.3-3.1	6.1	3.4-8.8	5.1	3.9-6.1
Basophils	0.5	0.3-0.8	0.1	0.0-0.3	0.4	0.1-0.9
Lymphocytes	37.7	35.1-39.2	17.5	15.0-20.4	24.8	21.4-28.0
Monocytes	7.1	6.8-7.6	4.2	1.1-7.6	3.3	2.5-5.0
Total (Mean)/ $\mu$ l		6.900 (100%)		3.500 (100%)		3.600 (100%)

### 1.7. Indagine sulla distribuzione degli elementi del sangue:

L'esame istomorfometrico è stato eseguito utilizzando una lente di ingrandimento ottico con amplificazione 100x all out. Un oculare di 10 mm, con reticolo a 100 divisioni, è stato utilizzato per quantificare il livello di inclusione della lunghezza assoluta all'interno di ogni evento di uno strato cellulare, in ogni area. Con la colorazione tricromica di Masson (regolata da Godman), i totali piastrinici si trovano in blu scuro, ma gli RBC sono efficacemente riconosciuti, poiché sono ricolorati in rosso. In questa associazione, è difficile riconoscere gli elementi cellulari contenuti. I più importanti spessori di piastrine e leucociti sono stati trovati nel millimetro principale del coagulo giallo, al limite con il coagulo rosso. Questo risultato ha un effetto clinico gigantesco in quanto il numero di leucociti inseriti all'interno della pellicola è considerevole, e i piccoli linfociti sono particolarmente abili nella linea guida delle risposte infiammatorie. Su queste linee guida, il segmento più utile, sotto un'attenta prospettiva, è la parte centrale biancastra della membrana. Pertanto, è importante salvare un piccolo strato di RBC al limite del coagulo PRF, che contiene il peso delle piastrine e dei leucociti.

### 1.8. In conclusione:

Come indicato dall'esame, il lavoro della regione delle membrane PRF con il più importante miglioramento immaginabile delle piastrine è quello di realizzare un sistema standard per la preparazione delle PRF come materiale da innesto per la rigenerazione dei tessuti. È difficile controllare la qualità dei ma-

teriali di origine umana, in quanto la preparazione delle PRF, ed è essenziale per applicare i più importanti controlli di qualità immaginabili, tenere d'occhio la preparazione delle PRF prima della loro applicazione clinica. I biomateriali possono essere utilizzati come dispositivi a rilascio controllato, che terranno conto del trasporto supportato o addirittura su richiesta di queste sostanze miste con fattori di crescita. Ulteriori indagini cliniche, istologiche e statistiche sono necessarie per comprendere i vantaggi di questo nuovo metodo di concentrazione piastrinica. Nonostante ciò, non possiamo chiarire il modo in cui, quando acquisito da un esame del sangue autologo, la PRF prodotta è scarsa e può essere utilizzata solo in un volume limitato ed è una restrizione per l'utilizzo metodico della PRF nelle utilizzazioni di chirurgia generale. Poiché i modelli di migrazione stimolati dal surnatante della coltura di concentrato piastrinico non contrastano tra i due tipi di cellule, la migrazione di MSCs e HUVECs più fondata è stata vista come una risposta alla L-PRF. L'insieme di quanto sopra significa che L-PRF potrebbe essere utile come biomateriale di guarigione, e come caratteristica contro l'agente emorragico da utilizzare nei siti medici e chirurgici.

## Riferimenti bibliografici

- [1] Pretorius E., Briedenhann S., Marx J., Smit E., Van Der Merwe C., Pieters M., Franz C., *Ultrastructural comparison of the morphology of three different platelet and fibrin fiber preparations*, «The Anatomical Record», 290, 188-198, 2007.
- [2] Del Corso M., Choukroun J., Simonpieri A., Zampetti P., *Bucci Sabbatici V., Accelerazione dei processi di cicatrizzazione tissutale con un nuovo biomateriale: la fibrina ricca di piastrine (PRF)*, «Odontoiatria», 4, 361-366, 2007.
- [3] Nurden A.T., Nurden P., Sanchez M., Andua I., Anitua E., *Platelets and wound healing*, «Frontiers in Bioscience», 13, 3525-3548, 2008.
- [4] Crisci A., *Le membrane L-PRF utili in chirurgia*, «Journal of Plastic Dermatology», 2, 75-90, 2015.
- [5] Crisci A., Placido F., Crisci M., Bosco A., *A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin)*, «Update in Plastic Surgery», 3, 162-172, 2015.
- [6] Kobayashi M., Kawase T., Horimizu M., Okuda K., Wolff L.F., *Yoshie H., A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use*, «Biologicals», 40, 323-329, 2012.

- [7] Dohan Ehrenfest D.M. *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», 13, 1145-1152, 2012.
- [8] Choukroun J., *Advanced PRF e i-PRF: Platelet Concentrates or Blood Concentrates?*, «J Periodontal Med Clin Pract.», 1-3, 2014.
- [9] 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.», 110, 278-280, 2010.
- [10] Crisci A., Lombardi D., Serra E., Lombardi G., Cardillo F., Crisci M., *L-PRF: standardized protocol proposed for the use of fibrin rich in leukocyte platelet and the use of L-PRF Wound Box. Selection of an animal model*, «Update in Plastic Surgery», 3, 141-149, 2017.
- [11] Crisci A., Lombardi D., Serra E., Lombardi G., Cardillo F., Crisci M., *Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®*, «J. Unexplored Med. Data», 2, 77-87, 2017.
- [12] Crisci A., Serra E., Cardillo F., Crisci M., *Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box®*, «V.P.E.», 1, 41-50, 2017.
- [13] Schar M.O., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein M.A., Nesic D., *Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro*, «Clin. Orthop. Relat. Res. 473», 1635-1643, 2015.
- [14] 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.», 1, 48-57, 2014.
- [15] Desai C.B., Mahindra U.R., Kini Y.K., Bakshi M.K., *Use of platelet-rich fibrin over skin wounds: modified secondary intention healing*, «J. Cutan. Aesthet. Surg.», 6, 35-37, 2013.
- [16] Crisci A., Marotta G., Licito A., Serra E., Benincasa G., *Crisci M., Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (three clinical cases report)*, «Diseases», 6, 30, 2018.
- [17] Liu B., Tan X.Y., Liu Y.P., Xu X.F., Li L., Xu H.Y., An R., Chen F.M., *The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet-rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation*, «Tissue Eng. Part. C. Methods», 19, 1, 2013.

- [18] Dohan Ehrenfest D.M., Del Corso M., Diss A., Mouhyi J., Charrier J.B., *Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane*, «J. Periodontol», 81, 4, 546-555, 2010.

## CAPITOLO II

# DETERMINAZIONE DELLA RIGENERAZIONE DEI TESSUTI DA CONCENTRATI RICCHI DI PIASTRINE (L-PRF, PRP) COINVOLGONO NEL CONTROLLO DELL'APOPTOSI

### 2.1. Introduzione

Il corpo umano è più che attrezzato per il recupero e la guarigione stessa quando il danno è da una prospettiva minore. La Fibrina Ricca di Piastrine (PRF), a volte citata come Leucocyte-PRF e Pure-PRF, è il ciclo più recente e all'avanguardia di una strategia di riparazione profondamente radicata. La fibrina ha vita cellulare ed è uno dei più importanti e non proprio come i segmenti caratteristici che migliorano la disposizione del nuovo reticolo extracellulare. La fibrina ricca di piastrine deriva da una piccola quantità di sangue del paziente che viene centrifugato e preparato per isolare le piastrine da cellule rosse e leucociti e strutturano la premessa di una complessa membrana a matrice fibrinica. Nel momento in cui uno strato di matrice PRF viene applicato su una ferita, le piastrine vengono messe in attività rilasciando alcune proteine rigenerative con un potenziale veramente utile. Il trattamento con Fibrina Ricca di Piastrine (PRF) è triplo e i benefici includono, le proteine rigenerative e i fattori di crescita secreti dalle piastrine attivate accelerano il regolare processo di guarigione del corpo. Il coagulo PRF incornicia una potente rete di fibrina con un impressionante design tridimensionale. Valutando la presenza di fattori di crescita piastrinici della fibrina ricca di piastrine, gli enzimi attaccati agli immunosorbenti analizzano la polimerizzazione della fibrina durante l'elaborazione della PRF. Con l'aiuto di cellule progenitrici, le piastrine per circa il 97% e i leucociti vengono trasferiti nel coagulo indicando una particolare circolazione tridimensionale e nella riduzione dell'apoptosi cellulare e la sopravvivenza che sono sperimentalmente

significativi. Nella riparazione tissutale, i componenti piastrinici non sono sufficientemente compresi, e sono presenti in questa indagine. Il PRP confrontato con quello della produzione di PRF e i punti centrali sono confrontati e comprendono: nessun controllo dei componenti biochimici del sangue; produzione semplificata e meno costosa; nessuna informazione sull'uso di anticoagulanti e trombina bovina; guarigione accelerata a causa di una moderata polimerizzazione; riposizionamento e moltiplicazione cellulare più accentuata; la PRF influisce positivamente sulla struttura cellulare insensibile; la PRF aiuta l'emostasi. I fattori di crescita secreti dalle piastrine L-PRF, in particolare TGF- $\alpha$ , stimolano e controllano la moltiplicazione e il movimento di diversi tipi di cellule associate alla riparazione dei tessuti, ad esempio le cellule muscolari lisce (SMC) e le cellule staminali mesenchimali (MSC). La PRF è un caratteristico biomateriale a base di fibrina ricavato da sangue senza anticoagulante che si raccoglie senza contraffazioni biochimiche che permette di acquisire film di fibrina potenziati con piastrine e fattori di crescita. Le prove scientifiche raccomandano il ruolo potenziale della PRF nel recupero e nella progettazione dei tessuti. L'angiogenesi, allo stesso modo di altre procedure fisiologiche, si basa su un'armonia tra il segno stimolante e l'inibitorio. A causa dell'incitamento, ad esempio, nell'angiogenesi tumorale e, l'inutile sviluppo di malattie delle strutture vascolari induce la disposizione di cellule del sangue che sono immature, precarie e regolarmente presenti nelle cellule del sangue.

## **2.2. Riparazione del tessuto con piastrine**

Il danno tissutale provoca l'arrivo di particelle flagging che innescano l'arruolamento e l'attivazione delle cellule infiammatorie. Accompagnando la risposta immunitaria e potenziando la ricostruzione dei tessuti, l'organismo dall'attacco degli agenti patogeni gestisce l'evacuazione delle sezioni cellulari e dei tessuti danneggiati. La procedura infiammatoria attraverso una portata espansiva di recettori di strato e go-betweenes dissolvibili, che vengono scaricati sull'impatto di emanazione piastrinica. Gli impedimenti della rottura dei tessuti durante il danno, inoltre, potenziano l'intrusione di microrganismi e potrebbero incitare malattie tissutali. Di conseguenza, la guarigione dei tessuti è il passo più significativo per la regolazione e l'inizio della risposta immunitaria contro gli agenti patogeni che attaccano.

Trattamento di trombocitopenia, o occasioni drenanti e per ristabilire l'omeostasi con le piastrine di regola sono utilizzati. La guarigione della feri-

ta è indistintamente associata al disturbo e richiede una bella combinazione di coincidenza tra il controllo del movimento cellulare, l'affiliazione e la riprogettazione della struttura extracellulare, la neovascolarizzazione, la crescita cellulare, la divisione e l'angiogenesi. Le piastrine sono ad un livello di base impegnate con la riparazione e il recupero dei tessuti danneggiati e la protezione del lavoro d'organo dimostrato clinicamente e per via esplorativa. Durante le ferite tissutali, per esempio, ferite causate da traumi o ischemia dei tessuti umani, per esempio, nel tessuto morto del miocardio o nell'ictus cerebrale, la struttura del coagulo e le reazioni immunitarie vengono avviate precocemente, iniziando il processo di guarigione della ferita. Il plasma ricco di piastrine e PRP è cresciuto nell'utilizzo dinamicamente nella guarigione della ferita dove le piastrine secernono vari fattori di crescita come citochine, chemochine, fattore di crescita epatocitario (HGF) e il trattamento PRP è stato esteso all'espansione delicata dei tessuti unendo il PRP con l'unità di grasso sottocutaneo e sono stati presi in considerazione per alcuni risultati clinici positivi, preliminari che sostengono l'utilizzo del PRP unito con il grasso nel delicato aumento del tessuto, rimangono limitati. Da allora sono stati condotti solo un paio di studi essenziali e indagini precliniche sugli animali. In pazienti con disturbi epatici cronici, la trasfusione piastrinica ha migliorato particolari parametri di capacità epatica, anche se sono state osservate occasioni sfavorevoli identificate con la trasfusione piastrinica. Le piastrine secernono le variabili che controllano la moltiplicazione e il movimento di diversi tipi di cellule associate alla riparazione tissutale, ad esempio le CSM, i fattori di crescita ricombinanti che vengono secreti dalle piastrine autologhe aiutano la guarigione negli arti inferiori delle ulcere diabetiche croniche. Studi in vitro condotti con uno strato di Platelet Rich Plasma Puro sono stati esaminati attraverso la valutazione dell'arrivo moderato di componenti di crescita e molecole della matrice. I componenti chiave dei fattori di crescita (TGF- $\beta_1$ , VEGF, PDGF-AB) e 3 proteine del coagulo: trombospondina-1, (Fn) (Vitronectin) sono stati valutati in via sperimentale più volte.

Nel trattamento dell'osteomielite, dell'ulcera del piede diabetico si utilizzano la L-PRF e il gel piastrinico, permettendo la guarigione da questa grave infezione ed è un'altra progressione. Per migliorare la continuità del grasso trapiantato il PRP è prodotto come il nuovo reticolo. Per centrifugazione a due giri, il PRP derivato dal sangue intero che contiene diversi componenti della crescita e particelle di legame nei granuli di  $\alpha$ -granuli è progressivamente sicuro e i fattori di crescita ricombinanti o cellule staminali sono più pratici nel trattamento clinico rispetto ad altri farmaci che sono convincenti nel

recupero osseo, nella riparazione delle ferite e nel miglioramento delle lesioni muscoloscheletriche. Nel campo della fisiopatologia epatica, è stata fatta una chiara comprensione delle componenti piastriniche e dei controlli relativi alla fissazione dei tessuti. Trombocitopenia e ridotta attività piastrinica nei topi; trombopoietina stimola trombocitosi per causare un forte assortimento di piastrine nelle sinusoidi del fegato e il riconoscimento della duplicazione degli epatociti non molto tempo dopo l'epatectomia, dimostrano che le piastrine si aspettano un ruolo chiave nella scelta dell'equilibrio tissutale tra i danni della riparazione tissutale.

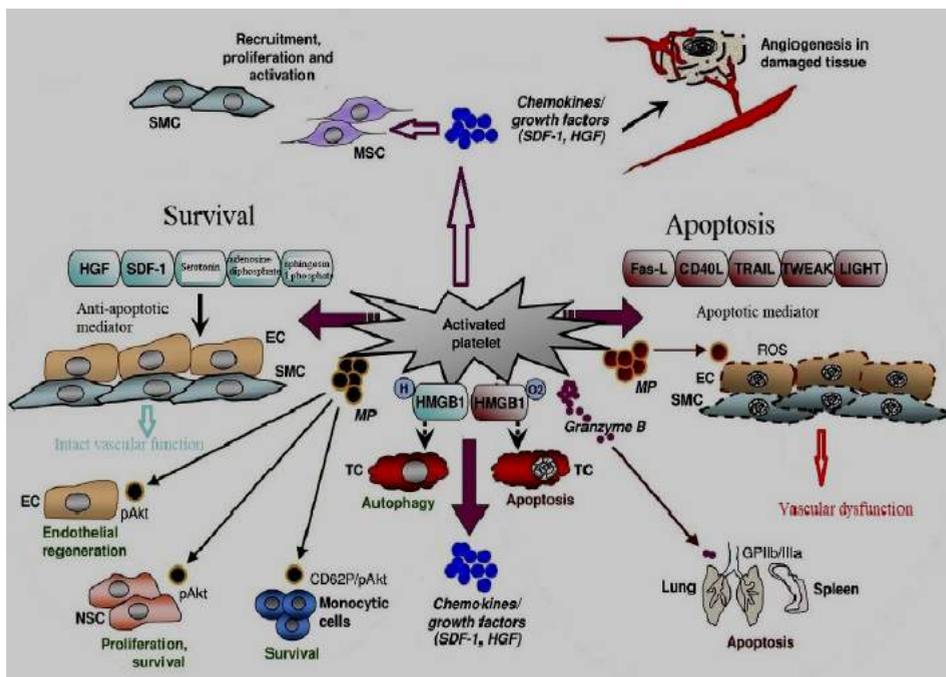


Figura 1. Meccanismi che regolano la riparazione tissutale mediata dalle piastrine.

### 2.3. Recupero delle cellule piastriniche e delle cellule progenitrici e la sua interazione

Le piastrine attivate secernono chemochine e favoriscono l'espansione delle cellule staminali adulte. Il trapianto intramuscolare, intracoronarico o intravenoso di CSM è stato fatto per infarto del miocardio, dove le cellule si muovono verso il cuore danneggiato e ristabiliscono essenzialmente la capacità

cardiovascolare. Oltre alla lesione del tessuto si produce nelle cellule staminali un solido segno chemio attraente, dando la premessa per la loro azione rigenerativa. Le Piastrine controllano l'arruolamento di cellule staminali adulte alle cellule danneggiate. Lungo queste linee, può essere una misura significativa nelle reazioni cellulari rigenerative. Il fattore di crescita noto come HGF, viene somministrato dopo l'infarto del miocardio e con le proprietà antiapoptotiche, ad azione immunosoppressiva e proangiogenetica, applica proprietà cardioprotettive. Dopo l'infarto miocardico di prova, l'organizzazione della SDF<sub>1</sub>-GPVI ha applicato enormi impatti cardioprotettivi, facendo avanzare il movimento positivo del CXCR<sub>4</sub> dei progenitori dal midollo osseo, rafforzando la separazione endoteliale della sopravvivenza cellulare di salvaguardia, e scoprendo gli impatti proangiogenici. Accanto all'HGF, un altro significativo intermediario impegnato nel trattamento con cellule staminali, dopo infarto del miocardio è l'arruolamento del midollo osseo progenitore in ossa dopo infusione endovenosa di cellule per via endovenosa in un modello murino dove viene gestito anche l'SDF-1. Negli studi di studi clinici, le cellule progenitrici di CD<sub>34</sub>-positive hanno risposto fundamentalmente per essere impegnate nella guarigione del miocardio e il recupero, giungendo alla conservazione della capacità cardiovascolare. Cellule CD-34 positive messe in attività da piastrine che secernono SDF-1 sostengono l'arruolamento di cellule progenitrici nel trombo dei vasi sanguigni e le cellule si isolano attraverso cellule progenitrici endoteliali invivo.

#### **2.4. La sopravvivenza cellulare e l'apoptosi dalle piastrine: sistemi di recupero dei tessuti**

L'apoptosi e la sopravvivenza cellulare sono bilanciate e controllate dalle piastrine, il che è significativo per il destino della lesione tissutale. La via significativa dell'apoptosi extracellulare include le sostanze del fattore di necrosi tumorale (TNF) che sono le cellule morte che controllano l'apoptosi. Nei topi, le piastrine con sepsi stimolata da apoptosi è stato sperimentato attraverso un sistema autonomo di componenti piastriniche da CD<sub>4</sub>-positivo. Nel sistema nervoso centrale (SNC), la fosforilazione di Akt causata da microparticelle piastriniche, legata all'espansione cellulare, alla sopravvivenza e all'isolamento delle neurocellule e all'intervento di Akt hanno migliorato il recupero endoteliale. Le cellule necrotiche secernono HMGB<sub>1</sub>, una proteina molecolare in ritardo durante la lesione dei tessuti o effettivamente emessa dalle cel-

lule immunitarie naturali, che si distingue come un segnale di avviso che innesca una reazione insensibile e dirige la morte della cellula e la sopravvivenza, come mostrato per le cellule malate, condizionata al redox HMGB1. L'HMGB1 endogeno presente nelle piastrine, che viene inviato all'area della superficie cellulare dopo l'emanazione, e fornisce all'HMGB1 un concorrente per la gestione del bilancio mortalità/sopravvivenza delle piastrine. Il tipo di circolazione locale e il potere di articolazione dei recettori di superficie e delle cellule bersaglio caratterizzano la conseguenza dell'apoptosi e contro gli elementi delle piastrine.

## 2.5. In conclusione

Come per gli studi, le piastrine controllano componenti complessi di riparazione tissutale. Come le cellule possono essere distrutte attraverso l'inizio di apoptosi e morte cellulare, a cui solo particolari cellule, per esempio, quelle del muscolo cardiaco e tessuto sensoriale. Dall'avanzamento embrionale, l'apoptosi è una morte cellulare programmata insieme alla necrosi e assume un ruolo chiave nella trasformazione e controlla tutta la presenza dell'organismo all'inizio. Meccanismi antiapoptotici possono essere eseguiti da meccanismi piastrinici, spostando l'equalizzazione alla sopravvivenza cellulare e la riparazione tissutale e secernono mediatori con azione antiapoptotica che sostengono il segno della sopravvivenza cellulare. Questo dirige l'arruolamento di cellule adulte non sviluppate in lesioni cellulari. Si tratta quindi di un sistema significativo nelle reazioni cellulari rigenerative. Le piastrine sono inoltre secrete dopo l'attuazione dell'HGF e sono state descritte per far avanzare l'assorbimento di CSM nelle cellule endoteliali condotte dell'uomo. I punti focali offerti da L-PRF rispetto a L-PRP contengono la secrezione di TGF- $\beta$ 1 generalmente in misure più elevate, un sostegno, l'arrivo a lungo termine dei fattori di crescita analizzati, e l'arruolamento più fondato di ricollocazione cellulare. Altri esami esplorativi e clinici devono essere diretti a dare una comprensione superiore del discorso opposto in mezzo alle piastrine che aiutano a controllare la guarigione del tessuto, descritto da procedure, per esempio, l'arruolamento di cellule rigenerative e la regolazione della morte cellulare o la sua sopravvivenza. L'utilizzo di materiali organici e trattamento del sangue è anche una questione legale per quanto riguarda i test logici, come l'utilizzo di elementi che non sono per il coordinamento delle trasfusioni di sangue, come pazienti, centri di ricerca, ospedali e industrie farmaceutiche. Nonostante il

fatto che da un punto di vista legale uno specialista che viene approvato per infusione i.v è approvato anche per la somministrazione di PRF. Inoltre, per linea guida comunitaria, a quel punto con la legge del legittimo le sostanze incluse non sono presenti in L-PRF, è tutt'altro che una trasfusione di sangue tuttavia rientra nel caso di reinfusione le cellule. Queste nuove conoscenze ci aiuteranno a scoprire alternative migliori e più utili che finiscono per incoraggiare il recupero e la riparazione dei danni ai tessuti e agli organi. Le piastrine secernono citochine, fattori di crescita e chemochine, per esempio, HGF e SDF-1 che controllano il reclutamento, la moltiplicazione e diverse cellule che sono principalmente impegnate nella guarigione delle ferite. Le piastrine sembrano essere un punto focale del sistema che neutralizza la degradazione tissutale e l'intrusione di patogeni e il loro ruolo nella ricostruzione tissutale nella guarigione dall'accettazione dell'apoptosi e l'arruolamento delle cellule progenitrici al supporto della verticalità vascolare. Una vasta gamma di ricerche di base, metodologie traslazionali ed esami clinici sono ancora necessari per migliorare la nostra comprensione dei sistemi di base su come le piastrine regolano l'evoluzione e il recupero dalle infezioni, in modo da utilizzare queste informazioni per un trattamento mirato. In stato redox il segnale di minaccia è HMGB1 che è stato inviato alla superficie cellulare dalle piastrine per l'iniziazione a dirigere la morte cellulare e il danno all'interno della cellula nelle cellule tumorali contingenti. Le piastrine gestiscono anche l'angiogenesi nei tessuti danneggiati.

## Riferimenti bibliografici

- [1] Crisci A., *Le membrane L-PRF utili in chirurgia*, «Journal of Plastic Dermatology», 2015;2:75-90.
- [2] Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T., *Wound repair and regeneration*, «Nature», 2008; 453 (7193): 314-321.
- [3] Stellos K., Kopf S., Paul A., Marquardt J.U., Gawaz M., Huard J. *et al.*, *Platelets in regeneration*, «Semin Thromb Hemost», 2010;36(2):175-184.
- [4] Lacci K.M., Dardik A., *Platelet-rich plasma: Support for its use in wound healing*, «Yale J Biol Med.», 2010; 83(1):1-9.
- [5] Massberg S., Konrad I., Schürzinger K. *et al.*, *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*, «J Exp Med.», 2006;203(5):1221-1233.

- [6] Nakamura T., Teramoto H., Ichihara A., *Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures*, «Proc Natl Acad Sci USA», 1986; 83(17):6489-6493.
- [7] Langer H.F., Stellos K., Steingen C. *et al.*, *Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro*, «J Mol Cell Cardiol», 2009; 47(2):315-325.
- [8] Margolis D.J., Kantor J., Santanna J., Strom B.L., Berlin J.A., *Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers*, «Diabetes Care», 2001;24(3):483-488.
- [9] Crisci A., Placido F., Crisci M., Bosco A., *A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin)*, «Update in Plastic Surgery», 2015;3:162-172.
- [10] Carreon L.Y., Glassman S.D., Anekstein Y., Puno R.M., *Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions*, «Spine (Phila Pa 1976)», Discussion E247, 2005;30(9):E243-246.
- [11] Crisci A., Marotta G., Licito A., Serra E., Benincasa G., Crisci M., *Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (Three clinical cases report)*, «Diseases», 2018;6:30.
- [12] Liao H.T., Marra K.G, Rubin P., *Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: Basic science and literature review*, «Tissue Engineering», 2014;4.
- [13] Lesurtel M., Graf R., Aleil B., *et al.*, *Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration*, «Science», 2006; 312(5770):104-107.
- [14] Murata S., Ohkohchi N., Matsuo R., Ikeda O., Myronovych A., Hoshi R., *Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice*, «World J Surg.», 2007; 31(4):808-816.
- [15] Echtler K., Stark K., Lorenz M. *et al.*, *Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus*, «Nat Med.», 2010;16(1):75-82.
- [16] Von Hundelshausen P., Petersen F., Brandt E., *Platelet-derived chemokines in vascular biology*, «Thromb Haemost.», 2007;97(5):704-713.
- [17] Gneccchi M., Zhang Z., Ni A., Dzau VJ., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*, «Circ Res.», 2008; 103(11):1204-1219.
- [18] Gneccchi M., He H., Liang O.D. *et al.*, *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells*, «Nat Med.» 2005;11(4):367-368.
- [19] Okunishi K., Dohi M., Nakagome K. *et al.*, *A novel role of hepatocyte growth factor as an immune regulator through suppressing dendritic cell function*, «J. Immunol», 2005; 175(7):4745-4753.

- [20] Ziegler M., Elvers M., Baumer Y. *et al.*, *The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice*, «Circulation», 2012;125(5):685-696.
- [21] Stellos K., Bigalke B., Borst O. *et al.*, *Circulating platelet-progenitor cell coaggregate formation is increased in patients with acute coronary syndromes and augments recruitment of CD34+ cells in the ischaemic microcirculation*, «Eur Heart J.», 2013;34(32):2548-2556.
- [22] Vasina E.M., Cauwenberghs S., Staudt M., Feijge M.A., Weber C., Koenen R.R. *et al.*, *Aging and activation induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release*, «Am J Blood Res.», 2013;3(2):107-123.
- [23] Meyer T., Amaya M., Desai H., Robles-Carrillo L., Hatfield M., Francis J.L. *et al.*, *Human platelets contain and release TWEAK*, «Platelets», 2010;21(7):571-574.
- [24] Sharron M., Hoptay C.E., Wiles A.A. *et al.*, *Platelets induce apoptosis during sepsis in a contactdependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade*, «Plos One», 2012;7(7):e41549.
- [25] Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Varon D., Leker R.R., *Platelet microparticles promote neural stem cell proliferation, survival and differentiation*, «J Mol Neurosci», 2012;47(3):659-665.



## CAPITOLO III

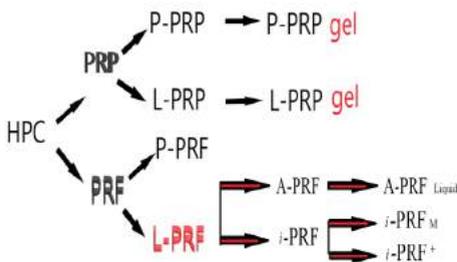
# VALUTAZIONE DEI CONCENTRATI DI SECONDA GENERAZIONE DI PRF NELLA CHIRURGIA CUTANEA DEL PIEDE

### 3.1. Introduzione

#### 3.1.1. Fibrina ricca di Piastrine (PRF)

Piastrine ricche di fibrina (PRF) è una concentrazione piastrinica di seconda generazione, che comporta un rapido meccanismo di guarigione della ferita attraverso l'influenza dell'angiogenesi, dell'immunità e dell'espansione epiteliale. Le citochine leucocitarie e le interazioni complesse della fibrina giocano un ruolo importante nella rigenerazione. La ferita potrebbe essere cronica se non guarisce in modo preciso e in buona forma, o se la procedura di guarigione non ha integrità strutturale. La guarigione della ferita cronica avviene attraverso procedure simili a una ferita acuta, ma per questa situazione, più tessuto di granulazione in genere si forma, con fibrosi esuberante che provoca la costrizione della cicatrice e la perdita di capacità. La guarigione della ferita include un percorso clinico impressionante di occasioni, richieste e complesse, tra cui numerosi tipi di cellule, che sono guidate dall'arrivo di sostanze in mezzi solubili e di sostanze pronte a colpire queste cellule che creano un circolo vizioso e le bloccano ai tessuti danneggiati. Le piastrine hanno dimostrato di essere cellule significative che dirigono le fasi dell'emostasi attraverso l'impedimento vascolare e incoraggiano la crescita del coagulo di fibrina. Ci si rende conto che sono inoltre responsabili della messa in atto e dell'arrivo di biomolecole significative, tra cui proteine piastriniche esplicite, fattori di crescita, compresi i fattori di crescita piastrino-simili (PDGF), fattori di coagulazione, chimici di legame, citochine e fattori angioge-

ni, pronti a rinvigorire la moltiplicazione e l'attivazione di cellule impegnate in forme di guarigione delle ferite, tra cui fibroblasti, neutrofilo, macrofagi e cellule staminali che sono comprese. Nonostante l'uso diffuso di concentrati piastrinici umani (HPC), come il plasma ricco di piastrine (PRP), uno dei lati negativi rivelati è l'utilizzo di fattori anticoagulanti che possono ritardare le normali fasi di guarigione della ferita. I macrofagi sono cellule aggiuntive ottenute da ascendenti mieloidi e sono considerati come uno dei tipi di cellule associate all'emissione del fattore di crescita durante la guarigione della ferita, incluso il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), PDGF e Vascular-Endothelial growth factor (VEGF). Queste cellule, insieme ai neutrofilo e alle piastrine, sono attori fondamentali nella guarigione delle ferite e, in relazione ai fattori di crescita emessi, possono favorire il recupero dei tessuti, la disposizione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e la prevenzione delle malattie (attività antimicrobica).



**Figura 1.** Piastrine concentrate (HPC). PRP, ricco di piastrine; PRF fibrina ricca di piastrine.



**Figura 2.** Centrifuga clinica PRF-DUO.

### 3.2. L-PRF e i suoi derivati nella guarigione delle ferite croniche del piede

#### 3.2.1. L-PRF

Nell'area longitudinale del coagulo L-PRF, creato osservando la convenzione standard di centrifugazione (30" di velocità crescente, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm e 36" di decelerazione e cattura) si trova uno spesso

	A-PRF+	1300 rpm, 8min
	I-PRF	700 rpm, 3min
	I-PRF M	700 rpm, 4min
	I-PRF+	700 rpm, 5min
	A-PRF Liquid	1300 rpm, 5min
	Custom	1300 rpm, 3min
	Manual	FREE SETTINGS

**Figura 3.** Tipi di concentrato piastrinico ottenibile con la Centrifuga Clinica PRF-DUO.

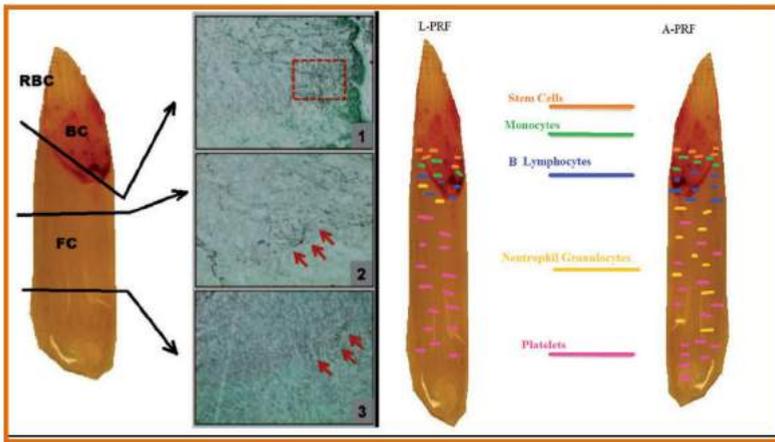
coagulo di fibrina con uno spazio inter-fibroso insignificante. Le cellule sono viste insieme all'intero coagulo, indipendentemente dal fatto che siano ridotte nelle parti distali del coagulo PRF.

### 3.2.2. Advanced-PRF

I coaguli PRF formati con la convenzione di centrifugazione Advanced-PRF (A-PRF), nei suoi segni di variazione A-PRF+ (1300 rpm, 8 minuti) e A-PRF Liquid (1300 rpm, 5 minuti), mostravano una struttura più libera, con un'espansione tra lo spazio filamentoso e un più alto numero di cellule all'interno del coagulo ricco di fibrina.

### 3.2.3. Piano PRF iniettabile (i-PRF)

La crescita di un dispositivo iniettabile PRF (chiamato i-PRF) [11,12] (centrifugato a 700 rpm [60g] per 3 minuti) e dei suoi derivati i-PRF M (700 rpm per 4 minuti) e i-PRF+ (700 rpm per 5 minuti) (figura 3) è, stata ricercata con l'aspettativa di fornire un concentrato piastrinico al medico che ha dimostrato semplicità d'uso in una forma fluida, da utilizzare da solo o efficacemente unito con diversi biomateriali. Sfruttando una velocità di centrifugazione sempre più lenta, è concepibile osservare un esteso conteggio di cellule rigenerative con un esteso raggruppamento di fattori di crescita, in contrasto con altri dettagli di PRF ottenuti a velocità di centrifugazione più elevate. Questo



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

tipo di concentrato può eventualmente migliorare l'angiogenesi comunicando la rete enzimatica metalloproteinasi-9. Quindi, l'incorporazione neutrofila nello strato di PRF, con l'utilizzo di A-PRF, può essere considerata se l'angiogenesi è uno dei punti da tenere in considerazione.

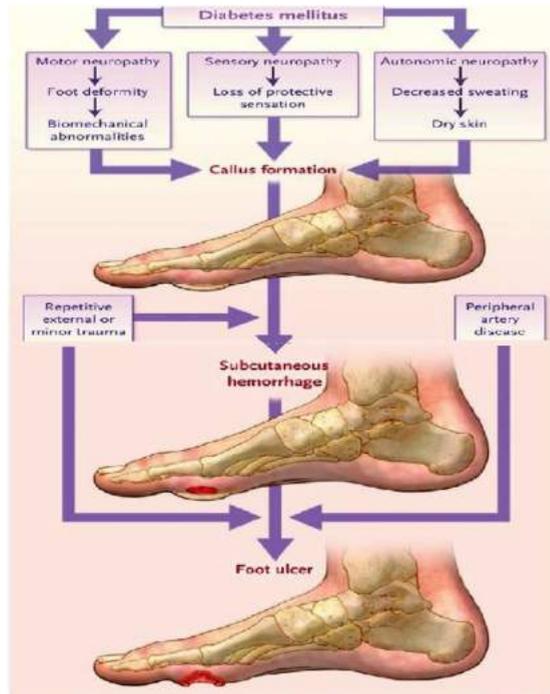
### 3.3. PRF di vari tipi ed effetti sul rilascio dei fattori di crescita

È stato per qualche tempo visto che PRF secerne una progressione dei fattori di crescita per il microambiente. Il TGF- $\beta$  ha un'ampia vitalità di oltre 30 componenti, noti come agenti fibrogeni, e il TGF- $\beta$ 1 è il più rappresentato nelle pubblicazioni. Si tratta di un trigger noto di diversi tipi di espansione cellulare, compresi gli osteoblasti, e comprende lo specifico della fibrogenesi più dominante tra tutte le citochine. Assume un ruolo cospicuo nella combinazione tra il reticolo, simile al collagene-1, e fibronectina, sia da osteoblasti e fibroblasti. Il VEGF è il fattore di crescita più dominante nell'angiogenesi tissutale. Essa influisce efficacemente sulla riprogettazione dei tessuti e il consolidamento del VEGF in diversi biomateriali ossei ha mostrato un'espansione nella nuova crescita ossea, richiamando in questo modo l'attenzione sugli ef-

fetti rapidi e sorprendenti del VEGF. I fattori di crescita insulino-simili (IGF) sono un controllore positivo di espansione e separazione per la maggior parte dei tipi di cellule mesenchimali, in quanto agenti di sicurezza cellulare. Come indicato da alcune indagini, le proprietà della PRF, che può aggiungere al suo effetto l'azione antimicrobica.

#### **3.4. Impatti della PRF sulla guarigione delle ferite cutanee del piede e sull'angiogenesi in vivo**

I fattori di crescita dei tessuti e in particolare la PRF e i suoi derivati sono stati presi in particolare considerazione per quanto riguarda la guarigione e l'angiogenesi delle ferite tissutali delicate in diversi modelli di animali. In numerose metodologie di ricostruzione, l'utilizzo della PRF è stato essenzialmente associato alla utilizzazione proficua nelle ulcere alle gambe, che di recente si sono dimostrate difficili da guarire, comprese le ulcere del piede diabetico, le ulcere venose e le ulcere da arteriopatie degli arti inferiori. In questo esame, lo scopo era quello di istituzionalizzare l'utilizzo di L-PRF in pazienti con osteomielite, per utilizzare questo concentrato piastrinico di seconda generazione, incoraggiando le forme di guarigione. Gli strati, insieme al fluido derivato dalla pressione del Wound L-PRF Box, sono stati inseriti nella piaga cutanea, in profondità, dopo un attento sbrigliamento. Tutti i pazienti hanno dimostrato positività al test Probe-to-Bone, e la Risonanza Magnetica Nucleare ha indicato un ispessimento cortico-periosteale e inoltre focolai di osteolisi del cortico-spugnoso, vicino all'ulcera. Le cellule microbiche gram-positivo sono state trovate nei nostri pazienti nel 52% dei casi.



**Figura 5.** Patogenesi delle ulcere cutanee del piede diabetico



**Figura 6.** Deiscenza post-chirurgica dopo la ricostruzione del tendine di Achille (A) trattato con L-PRF (B) dopo sette giorni dalla terapia (C) e una guarigione completa (D).

### 3.5. Discussione

Le proprietà rigenerative della L-PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) (figura 1) come coadiuvante attento ha ottenuto una considerazione eminente fin da quando il materiale è stato presentato nella prima parte del millennio. Ancora una volta, non c'è alcuna prova ragionevole per chiarire la capacità antimicrobica di questo biomateriale, che contrasta sia fundamentalmente che naturalmente con altre strutture HPC. A-PRF come griglia cellulare seminata su fibrina, che contiene diverse cellule, tra cui piastrine, linfociti (B e T), monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili, che possono secernere una progressione dei fattori di crescita. Ognuna di queste distinzioni può avere un risultato significativo sui singoli effetti calmanti e antimicrobici. Questi risultati sono stabili con quelli ottenuti da indagini passate, valutando le proprietà antimicrobiche di altri dispositivi HPC. Poiché l'A-PRF mostra proprietà antimicrobiche, è necessario stabilire se questo movimento è fundamentalmente maggiore di un intero coagulo di sangue. La ricerca futura dovrebbe indagare la gamma antimicrobica di A-PRF e di tutti i derivati di L-PRF e far emergere la probabilità che possa fungere da substrato per incoraggiare la crescita di microbi esplicita.



**Figura 7.** L-PRF coaguli, utilizzati su una ferita cutanea alla gamba.



**Figura 8.** Uso di Leukocyte Platelet (L-PRF) Rich Fibrin nell'ulcera del piede diabetico con osteomielite. (A, C, D, E) Diversi momenti di guarigione della ferita, stabili dopo due anni; (B) NMR del paziente con la lesione ossea. Stesso paziente dopo 6 anni dalla terapia con L-PRF. Il riscontro delle NRM dimostra una rigenerazione ossea della lesione (da Crisci *et al.* 2018) [16].

Nello specifico, per lo specialista, ricordiamo che lo *Staphylococcus Aureus* è uno dei principali driver delle contaminazioni nosocomiali procurate, malattie corrispondenti a gadget riparativi interni e malattie di lesioni aperte. Una ricerca significativa è oggi incentrata sui farmaci a contaminazione elettiva *S. Aureus*, per ridurre il pericolo di scegliere ceppi sicuri anti-infezione. La *Candida albicans* è la specie più abitualmente contagiosa confinata nel microbioma. L'impedenza di reazione invulnerabile può consentire a queste crescite abili di dare contaminazione. A-PRF ha una maggiore capacità di frenare continuamente la crescita di *C. Albicans*, in contrasto con un intero coagulo di sangue. Inoltre, *C. Albicans* è meno impotente alle parti antimicrobiche delle piastrine e ha visto come i peptidi antimicrobici delle piastrine umane fossero più dominanti contro le cellule microscopiche rispetto ai parassiti. A-PRF mostra il potenziale di reprimere più degno di nota *Streptococcus mutans* in contrasto con i comuni coaguli di sangue. Tuttavia, poiché nessun altro HPC è stato provato contro questa forma di vita, la componente di contenimento e del suo potenziale clinico richiede ulteriori esami.



**Figura 10.** Paziente con Ulcera Diabetica con osteomielite da 2 anni. Risultato dopo una sola applicazione di A-PRF come terapia.

Nonostante le conseguenze di esami diversi che l'A-PRF mostri un movimento antimicrobico, sono possibili alcuni impedimenti. Nel primo caso, la valutazione in vitro non emula una circostanza clinica in cui l'A-PRF verrebbe utilizzata in una situazione, circondata da tessuti che rispondono ad un'occasione attenta. In questa situazione, l'A-PRF può associarsi con poche cellule e citochine, impegnate in procedure di guarigione della ferita e può regolare la sottostante reazione insensibile e le fasi di guarigione. Il reticolo di fibrina incorniciato nella loro forma PRF in pazienti anziani è stato risolto in modo ancora più convenzionale, in contrasto con la struttura di fibrina modellata in pazienti più giovani. La grandezza di questa rivelazione dovrebbe ancora essere risolta. I tipi di cellule, il numero di cellule e la fissazione della parte plasmatica contrastano all'interno di ogni coagulo e tra i singoli coaguli; ogni cerchio di esempio non può essere indistinguibile da un altro. Uno dei problemi da valutare è che non esiste ancora un modo reale per decidere se il materiale provato sia battericida o batteriostatico. In questo contesto, il nostro gruppo di ricerca sta lavorando in questo periodo. I lati negativi messi in un punto sicuro, la tecnica di dispersione delle piastre ha dimostrato abbastanza per mostrare che l'A-PRF, similmente a tutti gli altri derivati dell'L-PRF, mostra un movimento antimicrobico.

### 3.6. In conclusione

Secondo l'indagine, la Fibrina ricca di piastrine (PRF) è una concentrazione piastrinica di seconda generazione, che comporta un meccanismo di guarigione rapida della ferita che influenza l'angiogenesi, l'immunità e la proliferazione epiteliale. Dal punto di vista della progettazione tissutale, è affascinante sottolineare che nessun esame si è concentrato sulla qualità della PRF, la natura inflessibile e la versatilità, nonostante il suo utilizzo clinico. L'utilizzo della PRF mostra un vantaggio rispetto ai farmaci tradizionali durante il periodo di recupero del tessuto malato, poiché secernono diversi fattori di sviluppo dei polipeptidi. Nonostante l'evidenza della posizione clinica favorevole di questi dispositivi, la prova del loro impatto positivo è ancora carente. Vi è quindi la necessità di ulteriori studi sul loro ampio utilizzo. Quindi, un'intrigante possibilità futura è quella di descrivere più facilmente le sue proprietà biomateriali, e la ricerca futura dovrebbe concentrarsi su quegli elementi che possono migliorare ulteriormente le sue qualità, per le sue diverse applicazioni biomediche. Il lavoro che guarda al futuro, concentrandosi sull'uso della PRF come coadiuvante nei trattamenti rigenerativi tissutali delicati, configurerebbe indagini adeguate, con i controlli necessari, per valutare ulteriormente la capacità rigenerativa della PRF nella guarigione di tessuti delicati, in particolare per quanto riguarda la guarigione delle ferite del piede. L'utilizzo dell'A-PRF nella pratica clinica ha dimostrato uno straordinario potenziale per migliorare la guarigione e per migliorare i risultati accurati, in quanto si riempie come una struttura autologa, pronta ad avere cellule e miscele bioattive. Comunque sia, la capacità antimicrobica di questo materiale è stata illustrata, e può essere una proprietà significativa, che si aggiunge alle occasioni di guarigione clinicamente apprese, velocizzate e non complicate. A seguito degli effetti di questo fenomeno si evince che l'A-PRF appare, in ogni caso, un movimento antimicrobico contro *S. Aureus*, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* e *C. Albicans*. Inoltre, la gamma e la potenza come agenti antimicrobici non sono esattamente quelli di un antimicrobico attento (antimicrobico esplicito). È fondamentale, in questo modo, per determinare l'intera gamma della sua azione antimicrobica in vitro, il suo interesse in vivo e l'impatto delle qualità del paziente sul suo movimento organico. Inoltre, il potenziale clinico come veicolo organizzativo per i farmaci specifici nelle destinazioni contaminate dovrebbe essere studiato. Gli esami futuri dovrebbero costruire la mutabilità silenziosa e le misura-

zioni di esempio per tutte le indagini basate sull'HPC. Ulteriori indagini cliniche, istologiche e misurabili sono necessarie per apprezzare i benefici di questa nuova procedura. In ogni caso, non sarebbe trascurabile che, una volta ottenuti da esami autologhi del sangue, l'L-PRF e i suoi derivati hanno un volume ridotto e possono essere utilizzati solo in quantità limitata. Questo limita l'utilizzo metodico della PRF nelle piaghe cutanee. Indipendentemente dal fatto che vi siano o meno abbondanti potenziali utilizzi della PRF, sono necessarie informazioni approfondite su questo biomateriale, così come informazioni sulla sua scienza, sulla sua vitalità e sui punti di taglio, per migliorare ulteriormente la sua utilizzazione nella pratica ordinaria.

### Riferimenti bibliografici

- [1] Crisci A., *Le membrane L-PRF utili in chirurgia*, «J Plast Dermatol», (2015) 2: 75-90.
- [2] Crisci A., Placido F., Crisci M., Bosco A., *A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin)*, «Update Plast Surg», (2015) 3: 162-172.
- [3] Crisci A., Serra E., Cardillo F., Crisci M., *Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box®*, «V.P.E», (2017), 1: 41-50.
- [4] Crisci A., Lombardi D., Serra E., Lombardi G., Cardillo F. *et al. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®*, «J Unexplored Med Data», (2017), 2: 77-87.
- [5] Marotta G., Licito A., Serra E., *Evaluation of genotyping methods and costs for IL1a polymorphisms in Platelet Rich Plasma (PRP); view point for therapy on the diabetic foot ulcers*, «Eur Rev Med Pharmac Sci», (2018), 22: 575-577.
- [6] Crisci A., Benincasa G., Crisci M., Crisci F., *Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new bio membrane useful in tissue repair: basic science and literature review*, «Bio interface Res Appl Chem», (2018), 8: 3635-3643.
- [7] Lundquist R., Dziegiel M.H., Agren M.S., *Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet rich fibrin*, «Wound Repair Regen», (2008), 16: 356-363.
- [8] Lundquist R., Holmstrøm K., Clausen C., Jørgensen B., Karlsmark T., *Characteristics of an autologous leukocyte and platelet rich fibrin patch in-*

- tended for the treatment of recalcitrant wounds, «Wound Repair Regen», (2013), 21: 66-76.
- [9] Clipet F., Tricot S., Alno N., Massot M., Solhi H. *et al.*, *In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology*, «Implant Dent», (2012), 21: 51-56.
- [10] Ghanaati S., Booms P., Orlowska A., Kubesch A., Lorenz J. *et al.*, *Advanced Platelet-Rich Fibrin: a new concept for cell based tissue engineering by means of inflammatory cells*, «J Oral Implantol», (2014), 40: 679-689.
- [11] Choukroun J., *Advanced-PRF and II. i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates?*, «J Periodont Med Clin Pract», (2014), 1: 1-3.
- [12] Miron R.J., Fujioka-Kobayashi M., Hernandez M., Kandalam U., Zhang Y. *et al.*, *Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?*, «Clin Oral Invest», (2017), 21: 2619-2627.
- [13] Crisci A., De Crescenzo U., Crisci M., *Platelet-Rich Concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: control of apoptosis and interactions with regenerative cells*, «J Clin Mol Med», (2018), 1: 5-12.
- [14] Bayer A., Lammel J., Rademacher F., Groß J., Siggelkow M. *et al.*, *Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes*, «Exper Dermatol», (2016), 25: 460-465.
- [15] Crisci A., Marotta G., Licito A., Serra E., Benincasa G. *et al.*, *Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (three clinical cases report)*, «Diseases», (2018), 6: 30.
- [16] Crisci A., Marotta G., Benincasa G., Crisci M., *L-PRF (fibrina ricca in leucociti e piastrine): uso in tre casi di ulcera diabetica con osteomielite cronica*, «JAMD», (2018), 21: 197-203.
- [17] Kobayashi E., Flückiger L., Fujioka-Kobayashi M., Schaller B., Miron R.J. *et al.*, *Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF*, «Clin Oral Invest», (2016), 20: 2353-2360.
- [18] Fujioka-Kobayashi M., Miron R.J., Hernandez M., Kandalam U., Zhang Y. *et al.*, *Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response*, «J Periodontol», (2016), 88: 112-121.
- [19] Del Fabbro M., Bortolin M., Taschieri S., Ceci C., Weinstein R.L., *Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence*, «Platelets», (2016), 27: 276-285.
- [20] Burnouf T., Chou M-L., Wu U-W., Su C.Y., Lee L.W., *Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and*

- solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria*, «Transfusion», (2013) 53: 138-146.
- [21] Cieslik-Bielecka A., Dohan E.D.M., Lubkowska A., Bielecki T., *Microbicidal properties of leukocyte-and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives*, «J Biol Regul Homeost Agents», (2012), 26: 43-52.
- [22] Crisci A., Rescigno C., Crisci M., *The L-PRF membrane and its derivatives useful in Wound Care*, «Italian Journal of Wound Care», (2019), 3: 19-26.
- [23] Dohan E.D.M., Rasmusson L., Albrektsson T., *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF)*, «Trends Biotechnol», (2009), 27: 1578-1567.
- [24] Bielecki T.M., Gazdzik T.S., Arendt J., Szczepanski T., Król W. *et al.*, *Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study*, «J Bone Joint Surg B», (2007), 89: 417-420.
- [25] Sause W.E., Buckley P.T., Strohl W.R., Lynch A.S., Torres V.J. *et al.*, *Antibody-Based biologics and their promise to combat staphylococcus aureus infections*, «Trends Pharmacol Sci», (2016), 37: 231-241.
- [26] Jabra-Rizk M.A., Kong E.F., Tsui C., Nguyen M.H., Clancy C.J. *et al.*, *Candida albicans pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework*, «Infect Immun», (2016), 84: 2724-2739.
- [27] Marsh P.D., Zaura E., *Dental biofilm: ecological interactions in health and disease*, «J Clin Periodontol», (2017), 44: S12-S22.
- [28] Tan Y-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E., *Antimicrobial Peptides from Human Platelets*, «Infect Immun», (2002), 70: 6524-6533.
- [29] Yajamanya S.R., Chatterjee A., Babu C.N., Karunanithi D., *Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study*, «J Indian Soc Periodontol» (2016), 20: 151-156.



## CAPITOLO IV

# QUANTIFICAZIONE DELLE PIASTRINE E DEI LEUCOCITI NEI CONCENTRATI PIASTRINICI SOLIDI DEL SANGUE

### 4.1. Introduzione

Il campo multidisciplinare dell'ingegneria tissutale mira a riparare, rigenerare o ripristinare in modo prevedibile i tessuti danneggiati.

Sviluppato da Choukroun (2001), il PRF (fibrina ricca di piastrine) ha una tecnica semplice, veloce, economica e "ad accesso libero" che si traduce nella formazione di un coagulo di fibrina ricca di piastrine e leucociti intrappolati in esso. Il L-PRF differisce da altre forme di Concentrati Piastrinici (HPC) poiché il suo protocollo di produzione sfrutta le proprietà della coagulazione inerenti al sangue intero senza la necessità di modifiche biochimiche. Quindi nega l'uso di additivi come anticoagulanti, trombina, cloruro di calcio o conservanti sintetici. Il protocollo originale PRF richiede che il sangue venoso venga prelevato dal paziente e depositato in provette di vetro asciutto da 10 ml. Il coagulo PRF è intrinsecamente carico con piastrine, leucociti e fattori di crescita. Questi fattori di crescita iniziano a liberarsi dalla matrice PRF entro 5-10 minuti dalla formazione del coagulo e continuano ad essere liberati per 60-100 ore (Dohan Ehrenfest DM, *et al.* 2012) [1]. Schär *et al.* (2015)[2] ha mostrato un rilascio costante di fattori di crescita e cellule staminali attive per un periodo di 28 giorni. Ciò indica che il coagulo PRF è un serbatoio di cellule inattive e attive in grado di interagire con le cellule e le molecole native del sito in cui è applicato. A-PRF™ (PRF avanzato) ha uno sviluppo relativamente recente (2013) basato su un'ipotesi che afferma che una riduzione della forza di centrifugazione relativa (forza G), riducendo la velocità di centrifuga-

zione, aumenterebbe il numero di leucociti (in particolare neutrofilo e macrofagi) all'interno della matrice PRF (LSCC Concetto di Centrifugazione a Bassa Velocità) (Ghanaati *et al.*, 2014 [3]; Kobayashi *et al.*, 2016) [4].

Choukroun (2014) [5] afferma che A-PRF™ è stato sviluppato principalmente nel tentativo di includere i monociti all'interno della rete di fibrina poiché queste cellule svolgono un ruolo essenziale nella crescita delle ossa, dei vasi sanguigni e nella produzione di due chemiochine, quella del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e quello della proteina morfogenica dell'osso (BMP-2). Ghanaati *et al.* (2014) [3] hanno studiato questo concetto e hanno scoperto che A-PRF™ contiene significativamente più granulociti neutrofilo e una loro distribuzione più ampia nel coagulo di fibrina rispetto a L-PRF. Il gruppo ha anche scoperto che, istologicamente, la distribuzione piastrinica è più omogenea in tutto il coagulo A-PRF™ rispetto al coagulo L-PRF. È stato dimostrato inoltre che A-PRF™ rilascia quantità totali significativamente maggiori di fattori di crescita rispetto a L-PRF preparato a 2700 rpm (325G) per 12 minuti (Kobayashi *et al.*, 2016) [4]. Il protocollo di elaborazione di A-PRF™ sembra, però, essersi evoluto all'interno della letteratura. Studi precedenti mostrano un protocollo di centrifugazione di 1500 rpm (252G) per 14 minuti (Ghanaati *et al.*, 2014 [3]; Kobayashi *et al.*, 2016) [4], mentre studi più recenti hanno utilizzato una velocità di centrifugazione di 1300 rpm (189G) per 14 minuti per la produzione di A-PRF™ e 1300 rpm (189G) per 8 minuti per produrre A-PRF+. L'attuale protocollo di elaborazione A-PRF™ prevede l'uso di una nuova centrifuga preprogrammata (PRF DUO, PROCESS® per PRF, Nizza, Francia), un kit per la raccolta del sangue standardizzato e una provetta a vuoto brevettata da 10 ml in vetro. La centrifuga DUO è in grado di produrre il classico L-PRF, A-PRF™ e per ultimo anche i-PRF™ (iniettabile PRF™).

Il numero delle piastrine è una quantità, ma è stato accettato come uno dei principali indici per garantire la qualità delle piastrine presenti (Marx, 2001) [6]. Tuttavia, fino agli studi attuali, c'è mancanza di un metodo per la determinazione accurata della conta piastrinica nei vari tipi di gel.

Tra la maggior parte dei clinici studiosi della terapia rigenerativa tissutale, è stato generalmente accettato che le piastrine sono altamente concentrate nel buffy coat e sono difficilmente presenti in altre frazioni vicine, in particolare nella frazione dei globuli rossi (RBC), dopo il frazionamento attraverso la centrifugazione.

Questo concetto non si applica alla valutazione dell'efficacia delle concentrazioni piastriniche in campioni liquidi, i quali possono essere quantificati con

un semplice emocromo, ma è specialmente esteso alla valutazione della conta piastrinica in concentrati piastrinici solidi auto-compresi [A-PRF, L-PRF, PRP e fattori di crescita concentrati (CSFG)]. Poiché le piastrine non hanno nuclei, il loro conteggio non può essere determinato attraverso il contenuto di DNA. Pertanto, per determinare il conteggio delle piastrine nei coaguli di fibrina, al momento viene applicato un calcolo attraverso il “metodo di sottrazione” (Dohan Ehrenfest, D.M. *et al.* 2010 [7]; Crisci A. *et al.* 2017 [8]) o “di simulazione” (Watanabe, T. *et al.* 2017) [9] (tabella 1).

Secondo il metodo di sottrazione, la conta piastrinica contenuta nei coaguli di fibrina viene effettuata sottraendo in numero di piastrine contenute nell'essudato del coagulo (*Surface post-compression*), nel siero supernatante (*PPP*) e nella frazione di globuli rossi (cioè il *trombo rosso*) da quelle presenti nel campione di sangue intero iniziale. Tuttavia, questo metodo non considera la possibilità della presenza di piastrine nella frazione RBC o la possibile perdita e il danneggiamento delle piastrine durante l'elaborazione per il conteggio delle cellule.

Nonostante l'uso clinico di PRF negli ultimi 15 anni nessuna ricerca fino ad oggi è riuscita a quantificare in modo diretto, semplice ed efficace il numero di piastrine e leucociti presenti in questo e negli altri concentrati piastrinici, in modo da metterlo in relazione al loro potenziale rigenerativo. La presenza di leucociti ha inoltre un grande impatto sulla biologia della guarigione delle ferite, non solo per il rilascio aggiuntivo di fattori di crescita e le loro implicazioni nella difesa immunitaria antibatterica, ma anche perché sono i regolatori chiave che controllano la guarigione delle ferite, attraverso la regolazione dei fattori di crescita locali.

La ricerca di base futura dovrebbe infatti concentrarsi specificamente sul contributo di queste cellule in specifici sistemi di knock-down/knock-in delle cellule per determinare i ruoli funzionali di ciascun tipo cellulare nel processo di guarigione della ferita quando viene utilizzato il PRF. Quindi, in teoria, il concetto di sviluppare nuovi protocolli modificati di PRF per aumentare ulteriormente il numero di globuli bianchi porterebbe, in linea di principio, ad aumentare la capacità di riparazione della ferita. Ciò nondimeno, una migliore comprensione dei singoli ruoli delle varie cellule trovate nel PRF potrebbe rivelarsi una scoperta importante per lo sviluppo di queste tecnologie, e porterebbe a cambiamenti moderni dei loro protocolli e ad aumentare ulteriormente il loro potenziale rigenerativo.

Per facilitare la realizzazione di ispezioni individuali di qualità, Kitamura Y. *et al.* (2018) [10] hanno sviluppato un metodo per determinare direttamen-

te la conta piastrinica e di leucociti in una matrice di PRF insolubile utilizzando la procedura di digestione con tessuto-Plasminogeno Attivatore (t-PA Alteplase) (GRTPA®; Mitsubishi Tanabe Pharma Corp., Osaka, Giappone) (figura 1). Tuttavia, con questo metodo è difficile valutare le singole matrici di PRF in modo tempestivo in ambito clinico. Al contrario, però, un'efficace standardizzazione della preparazione e dell'applicazione pratica pur non garantendo la qualità delle singole matrici di PRF, si prevede che possa minimizzare efficacemente la variabilità e massimizzi l'efficacia negli stessi campioni di sangue, coerentemente con altri tipi di protocolli di preparazione di concentrati piastrinici. I principali vantaggi del metodo proposto da Kitamura *et al.* sono: (1) alta precisione, (2) semplice procedura, (3) non abilità tecnica e (4) nessuna limitazione ai tipi di matrice di fibrina, mentre i principali svantaggi sono: (1) lunghi tempi di completamento, (2) costo del reagente (t-PA), (3) requisiti dell'incubatore e (4) le provette aggiuntive necessarie per l'analisi dei fattori di crescita.

Pertanto, in questo studio gli Autori partendo, dai risultati ottenuti nel lavoro di Kitamura hanno voluto elaborare un sistema più semplice e poco costoso per calcolare il numero preciso di piastrine e leucociti presenti nel PRF, rispetto a quello presente nel sangue intero, partendo sia dal “metodo di sottrazione” che da un semplice “esame emocromocitometrico”.

Leukocytes (WBC)	Dohan e al. (2010)		Crisci e al. (J. Unexplored Med. Data 2017)*		Watanabe e al. (MDPI 2017) A-PRF		Kitamura e al. (2018)	
		%		%		%		%
WHOLE BLOODSHED	69 x 10 <sup>2</sup> µl	100,00	51,5 x 10 <sup>2</sup> µl	100,00	45,0 x 10 <sup>2</sup> µl	100,00	36,22 x 10 <sup>2</sup> µl	100,00
RED CLOT	35 x 10 <sup>2</sup> µl	50,7	0,085 x 10 <sup>2</sup> µl	0,16	1,0 x 10 <sup>2</sup> µl	2,22	n.r.	n.r.
PRF	33,7 x 10 <sup>2</sup> µl	48,8	51,1 x 10 <sup>2</sup> µl	99,24	580,0 x 10 <sup>2</sup> µl	?	26,73 x 10 <sup>2</sup> µl	73,8
SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.	0,0002 x 10 <sup>2</sup> µl	0,00	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
SURFACE post compression	n.r.	n.r.	0,3 x 10 <sup>2</sup> µl	0,58	1,5 x 10 <sup>2</sup> µl	3,33	n.r.	n.r.
Red Blood Cells (RBC)								
WHOLE BLOODSHED	5,19 x 10 <sup>6</sup> µl	100,00	7,65 x 10 <sup>6</sup> µl	100,00				
RED CLOT	5,8 x 10 <sup>6</sup> µl	111,7	7,39 x 10 <sup>6</sup> µl	96,6				
PRF	0 x 10 <sup>6</sup> µl	0,0	0,216 x 10 <sup>6</sup> µl	0,0028				
SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.	0,002 x 10 <sup>6</sup> µl	0,00				
SURFACE post compression	n.r.	n.r.	0,013 x 10 <sup>6</sup> µl	0,16				
Platelets (PLT)								
WHOLE BLOODSHED	2,66 x 10 <sup>5</sup> µl (266.000)	100,00	1,06 x 10 <sup>5</sup> µl (106.780)	100,00	0,25 x 10 <sup>5</sup> µl (25.000)	100,00	1,524 x 10 <sup>5</sup> µl (152.400)	100,00
RED CLOT	0,06 x 10 <sup>5</sup> µl (6.000)	0,02	0,005 x 10 <sup>5</sup> µl (500)	0,47	0,00 x 10 <sup>5</sup> µl (000)	0,0	n.r.	n.r.
PRF	2,6 x 10 <sup>5</sup> µl (260.000)	97,7	1,05 x 10 <sup>5</sup> µl (105.801)	99,00	3,2 x 10 <sup>5</sup> µl (320.000)	?	1,27 x 10 <sup>5</sup> µl (127.000)	83,3
SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.	0,0002 x 10 <sup>5</sup> µl (2)	0,002	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
SURFACE post compression	n.r.	n.r.	0,0048 x 10 <sup>5</sup> µl (479)	0,45	0,00 x 10 <sup>5</sup> µl (000)	0,0	n.r.	n.r.
Methods Used	Subtraction methods				Simulation method		Method for t-PA counting	

n.r.= not reported; \* = values in the horse;

**Figura 1.** Confronto tra la conta di Piastrine, di Leucociti e di Eritrociti con i vari metodi.

## 4.2. Materiale e Metodi

Partendo dallo studio di Kitamura Y. *et al.* (2018) [10] (figura 1), gli A.A. hanno voluto:

1. Valutare lo scostamento percentuale tra la conta con t-PA e i valori di PLT e WBC ottenuti con il “metodo di sottrazione”, per cui aggiungendo o sottraendo la differenza percentuale calcolata, al valore ottenuto con il metodo di sottrazione, si ipotizza di ottenere il valore derivato con metodo t-PA.

Il procedimento per la conta con “metodo di sottrazione” è eseguito come descritto da Watanabe *et al.* (2017) [9] secondo l'equazione:

$$PLT/WBC \text{ in A-PRF e L-PRF} = PLT/WBC$$

*nel sangue intero - [(PLT/WBC nel coagulo rosso) - (PLT/WBC nel siero sopra il coagulo di PRF) - (PLT/WBC nel soprannatante dopo compressione del coagulo PRF)]*

2. Valutare lo scostamento percentuale tra la conta con t-PA e i valori di PLT e WBC ottenuti con un emocromo (W.B.), per cui aggiungendo o sottraendo la differenza percentuale calcolata, al valore ottenuto con un esame emocromocitometrico, si può avere il valore ottenuto con metodo per conta con t-PA.

L'esame emocromocitometrico di base è eseguito utilizzando provette con EDTA K<sub>3</sub>E 5,4 mg (VacuMed) e condotto con un Contaglobuli Cell Dyn 3500 R (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA).

La validità e la precisione delle misurazioni è stata valutata attraverso il Coefficiente di Variazione, considerando validi i valori se esso è <2% su almeno tre misurazioni.

L'ipotesi zero ( $H_0$ ) formulata è che non vi è differenza statisticamente significativa tra i valori misurati con “metodo t-PA” e i valori col “metodo di sottrazione”  $\pm X\%$  e tra i valori misurati con il “metodo t-PA” e i valori misurati con il “metodo per emocromo” (W.B.)  $\pm X\%$ , sia per PLT che WBC.

Formalmente:

$$H_0: t-PA = Met.Sottr.(PLT) (WBC) \pm X\%; t-PA=W.B. (PLT) (WBC) \pm X\%$$

La relazione tra le variabili è stata valutata effettuato il calcolo del Coefficiente di Correlazione di Pearson-Bravis tra t-PA e Met.Sottr.  $\pm X\%$  e tra t-PA e W.B.  $\pm X\%$ , sia per PLT che WBC, nel PRF solido.

Il grado di concordanza osservato nel Coefficiente di Correlazione è stato generalmente classificato come: moderato se il coefficiente  $r$  è compreso tra 0,65 e 0,8, buono se il valore è compreso tra 0,8 e 0,9 e ottimo se è  $>0,9$ . Come intervallo di Significatività Statistica viene utilizzato un Intervallo di Confidenza al 95%.

Per verificare l'ipotesi zero ( $H_0$ ) viene utilizzato il test della Varianza ad un criterio (ANOVA) tra t-PA e Met.Sottr.  $\pm X\%$  e tra t-PA e W.B.  $\pm X\%$  per PLT e WBC nel L-PRF e in altri tipi di Concentrato Piastrinico (PC) solidi autocomprimibili, successivamente sono stati utilizzati altri due test di significatività: il test-t parametrico di Student e il Chi-quadro ( $\chi^2$ ).

I dati grezzi rilevati con metodo di conta con t-PA, sono stati forniti dal gruppo di lavoro dell'Università di Niigata, Giappone. Da questi si è proceduto all'Analisi Statistica e ai Confronti col "metodo per sottrazione" e con il "metodo per emocromo" [4].

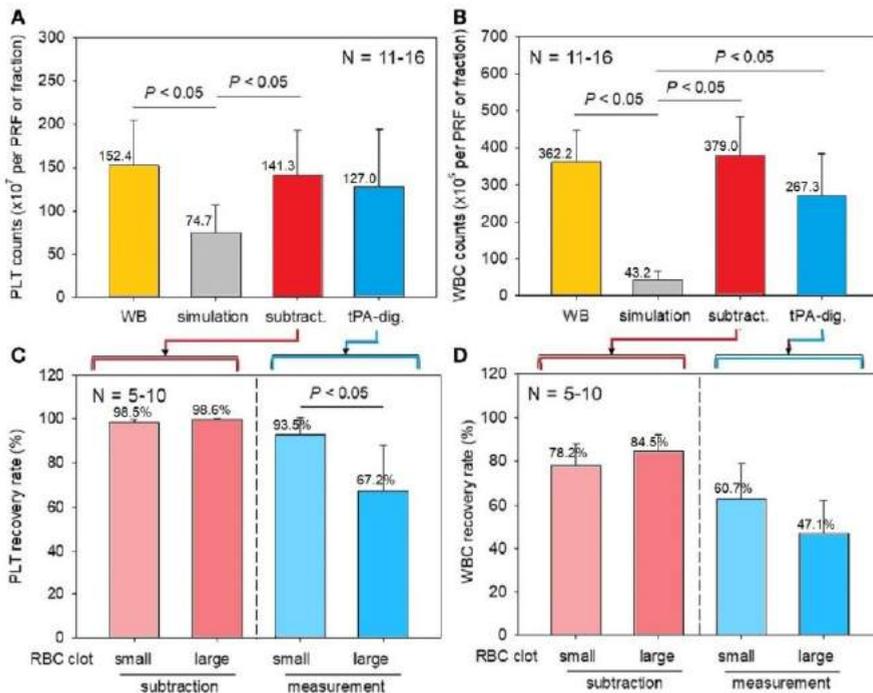
Questo calcolo permetterà di giustificare statisticamente l'uso di Met.Sottr.  $\pm X\%$  e W.B.  $\pm X\%$  al posto di t-PA nella valutazione della conta di piastrine e di leucociti nel L-PRF e nei vari tipi di HPC solidi, però con differenze che sono statisticamente significative tra loro ( $p \leq 0,000$ ).

### 4.3. Analisi statistiche

I risultati sono stati calcolati come Media  $\pm$  Deviazione Standard (SD) e valutati per differenze significative in ogni momento con l'analisi di Varianza a senso unico (ANOVA), il test parametrico di Student e il  $\chi^2$ , utilizzando il software di Statistica per Discipline Biomediche di Santon A.Glatz Ed. 2007 Versione 6.0.

Le differenze sono state considerate con valori di  $p$  inferiori a 0,05 (\*) come significative e valori di  $p$  inferiori a 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*) e ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*) come altamente significative.

Si è proceduto a calcolare anche la significatività con i test di Wilcoxon e Friedman quando si sono avuti risultati con una Bassa Correlazione al test di Pearson-Bravis.



**Figura 2.** Confronto tra i metodi di conteggio delle piastrine e dei globuli bianchi (simulazione vs. sottrazione vs. digestione). (A, B) Conta piastrine e WBC in fibrina ricca di piastrine (coaguli PRF e le corrispondenti frazioni preparate da campioni di sangue intero (N=11-16). (C, D) La relazione tra e WBC conta nei coaguli di PRF e le dimensioni dei trombi rossi (piccolo vs. grande) (N=5-10). (da Kitamura Y. *et al.*, 2018 modificato).

#### 4.4. Risultati

I dati forniti dalla Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Japan, sono riportati nelle Tabelle 2, 3, 4 e sono stati analizzati statisticamente. È stata calcolata la deviazione percentuale tra i valori ottenuti dall'emocromo (W.B.) e quelli dello stesso paziente ottenuti con digestione con t-PA. Il valore ottenuto per PLT è una deviazione percentuale media pari a  $-10.85 \pm 26.01\%$ . Poiché i risultati dei valori di t-PA per alcuni sono risultati superiori al valore di W.B., questi valori (in rosso) sono stati esclusi da un secondo calcolo per la deviazione percentuale, ottenendo una deviazione media di  $-27,30 \pm 15,82\%$ .

**Tabella 1.** Metodo per conta con digestione t-PA. Prima della coagulazione, i conteggi di PLT e WBC sono stati rilevati direttamente (con emocromo). Dopo la coagulazione, i conteggi di PLT e WBC sono stati determinati con la digestione di t-PA. Il secondo calcolo derivato dall'emocromo (W.B.) è stato eseguito eliminando i valori in rosso che sono valori positivi rispetto al W.B. (Dati derivati dallo studio di Kitamura Y et al, 2018).

PLT conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	% di deviazione	W.B. ematico	W.B. WBC conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	% di deviazione	W.B. ematico	W.B. WBC conta			
157.48	108.60	31.04	140.39	114.48					355.60	136.50	61.61	274.73	217.45
89.27	107.10	16.65	79.58						331.80	242.60	26.88	256.35	202.89
100.80	91.10	9.62	89.86	73.28					400.00	314.00	21.50	309.04	244.60
116.80	90.20	22.77	104.12	84.91					376.00	310.00	17.55	290.49	229.92
261.63	132.80	49.24	233.24	190.20					583.20	312.00	46.50	450.58	356.62
152.60	81.70	46.46	136.04	110.94	x10 <sup>6</sup> /CGF				287.00	184.00	35.89	221.73	175.50
141.75	126.20	10.97	126.37	103.05					249.80	112.20	55.08	192.99	152.75
190.76	217.80	12.42	170.06						342.00	431.80	20.80	264.22	
197.34	251.10	21.41	175.92						343.20	451.50	23.99	265.15	
96.60	76.30	21.01	86.11	70.23					378.00	205.00	45.77	292.04	231.14
171.00	217.10	21.23	152.45						337.50	401.30	15.90	260.75	
media	152.37	136.36	-10.85	135.83	106.73	media	362.19	281.90	279.82				
t-test Student	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	t-test Student	p>0.05							
I.C.95%	da -35 a -67.01	da -49.3 a -48.3	da -43.9 a -32.4	da -43.9 a -32.4	I.C.95%	da -2.9 a -163.6	da -81.8 a -85.9	da -76.0 a -77.4	da -81.8 a -85.9	da -76.0 a -77.4	da -81.8 a -85.9	da -76.0 a -77.4	da -81.8 a -85.9
$\chi^2$	p=0.52	p=0.98	p=0.75	p=0.75	$\chi^2$	p=0.057	p=0.96	p=0.985	p=0.96	p=0.985	p=0.96	p=0.985	p=0.985
	p=0.000	p=1.000	p=0.005	p=0.005		p=0.000							
	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA		ANOVA							
	4.128	4.128	115.4	115.4		23.69	23.69	1.84	23.69	23.69	1.84	1.84	1.84
	P=0.97	P=0.97	P=0.75	P=0.75		P=0.96	P=0.96	P=0.98	P=0.96	P=0.98	P=0.96	P=0.98	P=0.98

Il valore ottenuto per WBC è una deviazione percentuale media di  $-22,74 \pm 30,73\%$ . Poiché, anche in questo caso, sono risultati per alcuni valori di t-PA superiori al valore di W.B., questi valori (in rosso) sono stati esclusi dal calcolo della deviazione percentuale ottenendo una deviazione media di  $-38,82 \pm 16,03\%$ .

Abbiamo effettuato il confronto tra t-PA e W.B.-10,85% e W.B.-27,3% per PLT e tra t-PA e W.B.-27,74% e W.B.-38,82% per WBC, effettuando i Coefficienti di Correlazione di Pearson-Bravis (Tabelle 7 e 8).

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il 10,85% ai valori di W.B. abbiamo: test t-Student=0,98 (Differenza Statisticamente Non Significativa) (NS);  $\chi^2=1,000$ ; ANOVA: 4,128  $p=0,97$  (NS); Coefficiente di Correlazione:  $r=0,573$ ;  $p=0,065$ ; che significa Bassa Concordanza tra i valori con *Differenza St.N.S.\**.

Sottraendo, invece, il 27,3% ai valori di W.B.: t-Student=0,75 (NS);  $\chi^2=0,005$  (Differenza Statisticamente Significativa) (S); ANOVA: 115,4  $p=0,75$  (NS).

Coefficiente di Correlazione:  $r=0,745$ ;  $p=0,054$ ; che significa Moderata Concordanza tra i valori (NS)\*.

Se assumiamo, però, una significatività di  $0,001^{***}$ , i valori di differenza tra t-PA e W.B.-27,3% risultano tutti Statisticamente *Non Significativi*. Perciò si può utilizzare il valore di W.B. di PLT -27,3% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente appropriatezza statistica.

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per WBC, abbiamo ottenuto che sottraendo il 22,74% ai valori di WB: t-Student=0,96 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 23,69  $p=0,96$  (NS); Coefficiente di Correlazione:  $r=0,269$ ;  $p=0,423$ ; che significa Bassa Concordanza tra i valori (NS)\*.

Sottraendo, invece, il 38,82% ai valori di WB abbiamo: t-Student=0,98 (NS);  $\chi^2=0,000$  (NS); ANOVA: 1,84  $p=0,98$  (NS);

Coefficiente di Correlazione:  $r=0,695$ ;  $p=0,055$ ; che significa Moderata Concordanza tra i valori (NS)\*.

Se assumiamo una significatività di  $0,05^*$ , i valori di differenza tra t-PA e W.B.-38,82% risultano *Non Significativi* con una Concordanza Moderata. Perciò si può utilizzare il valore di W.B. di WBC -38,82% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente appropriatezza statistica.

L'esame a coppie di Wilcoxon tra t-PA e W.B.-38,82% è  $W=-2,0$   $p>0,054$  (NS); Test di Friedman  $p=1,000$  (NS);

Sono stati successivamente eseguiti sugli stessi pazienti (Kitamura *et al.* 2018) [10] altri test per la conta con t-PA, W.B. e col Metodo di Sottrazione, i quali vengono riportati in Tabelle 3 e 4.

**Tabella 3.** Conteggio di Piastrine con “Metodo per conta con digestione t-PA” e “con Metodo per Sottrazione”. Prima della coagulazione, i conteggi di PLT (A sono stati rilevati direttamente (con emocromo). Dopo la coagulazione, i conteggi di PLT sono stati determinati dalla digi-  
 stione di t-PA e col Metodo di Sottrazione secondo Watanabe *et al.* (2017) e Crisci e al (2017). Il secondo calcolo è stato eseguito eliminando i valo-  
 ri in grigio che sono valori risultati positivi rispetto al W.B. (Dati derivati dallo studio di Kitamura Y et al, 2018).

PLT conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	Metodo Sottraz	% deviazione tra WB e Sottr.	W.B. -20,43±21,44%	W.B. -25,09±20,42%	% deviazione tra t-PA e Sottr.	Met. Sottr. -19,69±21,88%	Met. Sottr. -24,31±21,02%
x10 <sup>6</sup> /ICGF	155.00	126,20	154.50	18.58	123.33	116.11	18.32	124.07	116.90
	132.50	108.60	130.90	18.04	105.40	99.25	17.04	105.10	99.07
	117.80	107.10	112.40	9.08	93.73	88.24	4.72	90.26	85.07
	228.40	217.10	227.90	4.95	173.30	171.09	4.74	183.03	172.49
	245.60	217.80	245.60	11.32	195.42	183.97	11.32	196.72	185.89
	248.50	251.10	247.60	1.04	197.73		1.39	198.32	
	126.70	132.80	125.50	4.59	100.81		5.50	100.52	
	104.60	91.10	103.00	12.91	83.23	78.35	11.55	82.50	77.96
	100.70	81.70	100.00	18.87	80.12	75.44	18.30	80.10	75.69
	108.20	34.10	108.20	68.48	86.09	81.05	68.48	86.66	81.89
	136.60	76.30	136.60	44.14	108.69	102.33	44.14	109.41	103.39
	144.90	80.40	144.90	44.51	115.29	108.54	44.51	116.06	109.67
media	154.13	127.03	153.09	-20.43	121.93	110.44	-19.69	122.73	110.80
t-test Student		p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
I.C.95%		da -24.7 a -78.9	da -45.6 a -47.7	da -78.0 a -25.9	da -42.4 a -42.6	da -43.4 a -50.6	da -42.4 a -52.4	da -43.7 a -52.4	da -44.1 a -50.5
		p=0.29	p=0.96	p=0.31	p=0.826	p=0.874	p=0.85	p=0.85	p=0.88
$\chi^2$		54.14 p=0.000	0.118 p=1.000	55.29 p=0.000	51.345 p=0.000	38.731 p=0.000	50.972 p=0.000	50.972 p=0.000	40.024 p=0.000
		ANOVA		155.9 P=0.83	64.91 P=0.87	110.7 P=0.85	52.4 P=0.89		

**Tabella 4.** Conteggio di Leucociti con “Metodo per conta con digestione t-PA” e “con Metodo per Sottrazione”. Prima della coagulazione, i conteggi di PLT (A) e WBC (B) sono stati rilevati direttamente (con emocromo). Dopo la coagulazione, i conteggi di PLT e WBC sono stati determinati dalla digestione di t-PA e col Metodo di Sottrazione secondo Watanabe *et al.* (2017) e Crisci e al (2017). Il secondo calcolo è stato eseguito eliminando i valori in rosso che sono valori risultati positivi rispetto al W.B. (Dati derivati dallo studio di Kitamura Y et al, 2018).

WBC conta	W.B. ematico	t-PA-digerito	Metodo Sottraz.	% deviazione tra W.B. e Sottr.	W.B.	% deviazione tra t-PA e Sottr.	Met. Sottr.
x10 <sup>5</sup> /CGF							
	350.0	112.20	251.20	67.94	189.35	55.33	164.91
	426.3	136.50	272.30	67.98	230.60	49.87	178.76
	380.0	242.60	271.00	36.16	205.58	10.48	177.91
	667.3	401.30	575.50	39.86	361.00	30.27	377.81
	616.0	431.80	559.70	29.90	333.25	22.85	367.44
	592.8	451.50	489.60	23.84	320.70	7.78	321.42
	563.2	312.00	458.80	44.60	304.69	32.00	301.20
	410.8	314.00	389.60	23.56	222.24	19.40	255.77
	420.8	184.00	319.30	56.27	227.65	42.37	209.62
	385.4	126.50	334.30	67.18	208.50	62.16	219.46
	469.2	205.00	404.40	56.31	253.84	49.31	265.48
	462.0	290.40	417.20	37.14	157.11	30.39	273.89
media	478.65	267.32	395.24	-45.90	251.21	-34.35	259.47
t-test Student		p>0.05	p>0.05		p>0.05	p>0.05	p>0.05
I.C.95%		da -306.3 a -116.4	da -174.5 a -7.659		da -64.8 a -97.0	da 30.73 a -225.1	da -75.6 a -91.3
		p=0.00	p=0.071		p=0.68	p=0.012	p=0.84
$\chi^2$		165.82	28.343		163.44	110.824	93.09
		p=0.000	p=0.003		p=0.000	p=0.000	p=0.000
		ANOVA			3344.0		1413.0
					P=0.59		P=0.73

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il  $20,43 \pm 21,44\%$  ai valori di WB si riscontra:  $t\text{-Student} = 0,83$  (*NS*);  $\chi^2 = 0,000$  (*S*); ANOVA:  $155,9$   $p = 0,83$  (*NS*);

Coefficiente di Correlazione:  $r = 0,92$ ;  $p = 0,000$ ; il che significa Ottima Concordanza (*S*)\*\*\*\*(tabella 2A).

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il  $20,43 \pm 21,44\%$  ai valori di WB si riscontra:  $t\text{-Student} = 0,83$  (*NS*);  $\chi^2 = 0,000$  (*S*); ANOVA:  $155,9$   $p = 0,83$  (*NS*);

Coefficiente di Correlazione:  $r = 0,92$ ;  $p = 0,000$ ; il che significa Ottima Concordanza (*S*)\*\*\*\*(tabella 3).

Confrontando, invece, il metodo t-PA e il Metodo di Sottrazione -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che riducendo del  $19,69 \pm 21,88\%$  i valori ottenuti con Met.di Sottrazione si ha:  $t\text{-Student} = 0,85$  (*NS*);  $\chi^2 = 0,000$  (*S*); ANOVA:  $110,7$   $p = 0,85$  (*NS*); Coefficiente di Correlazione:  $r = 0,92$ ;  $p = 0,000$ ; il che significa un'Ottima Concordanza (*S*)\*\*\*\*(tabella 3) (figura 2). Per il calcolo di PLT le differenze tra t-PA e W.B.- $20,43\%$  e t-PA e Met.Sottr.- $19,69\%$  si equivalgono. In tutti i casi il t-test e ANOVA dimostrano differenze statisticamente *Non* Significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative insieme al Coefficiente di Correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di  $0,0001$ \*\*\*\* i valori di differenza risultano *Non* Significativi con una Concordanza Ottima.

Poiché sono risultati valori di t-PA per alcuni superiori al valore di W.B., questi valori (in rosso) sono stati esclusi dal calcolo della deviazione percentuale ottenendo una deviazione media di  $-25,09 \pm 20,42\%$ .

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che sottraendo il  $25,09 \pm 20,42\%$  ai valori di WB:  $t\text{-Student} = 0,874$  (*NS*);  $\chi^2 = 0,000$  (*S*); ANOVA:  $64,91$   $p = 0,87$  (*NS*); Coefficiente di Correlazione:  $r = 0,94$ ;  $p = 0,000$ ; che significa Ottima Concordanza (*S*)\*\*\*\*(tabella 3).

Confrontando, invece, il metodo t-PA e il Metodo di Sottrazione -% di scostamento per PLT, abbiamo ottenuto che riducendo del  $24,31 \pm 21,02\%$  ai valori del Met.di Sottrazione:  $t\text{-Student} = 0,88$  (*NS*);  $\chi^2 = 0,000$  (*S*); ANOVA:  $52,4$   $p = 0,89$  (*NS*); Coefficiente di Correlazione:  $r = 0,91$ ;  $p = 0,000$ ; che significa Ottima Concordanza (*S*)\*\*\*\*(tabella 3). Per il calcolo di PLT le differenze tra t-PA e W.B.- $25,09\%$  e t-PA e Met.Sottr.- $24,31\%$  si equivalgono. In tutti i casi il t-test e ANOVA dimostrano differenze statisticamente *Non* Significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative insieme al Coefficiente di Correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di

0,0001 \*\*\*\* i valori di differenza risultano *Non Significativi* con una Concor-  
danza Ottima.

Confrontando, inoltre, il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per WBC, abbiamo ottenuto che sottraendo il 45,9±16,67% ai valori di WB: t-Student=0,68 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 3344,0  $p=0,59$  (NS); Coefficiente di Correlazione:  $r=0,73$ ;  $p=0,007$ ; che significa Moderata Concor-  
danza (S)\*\*\* (tabella 4).

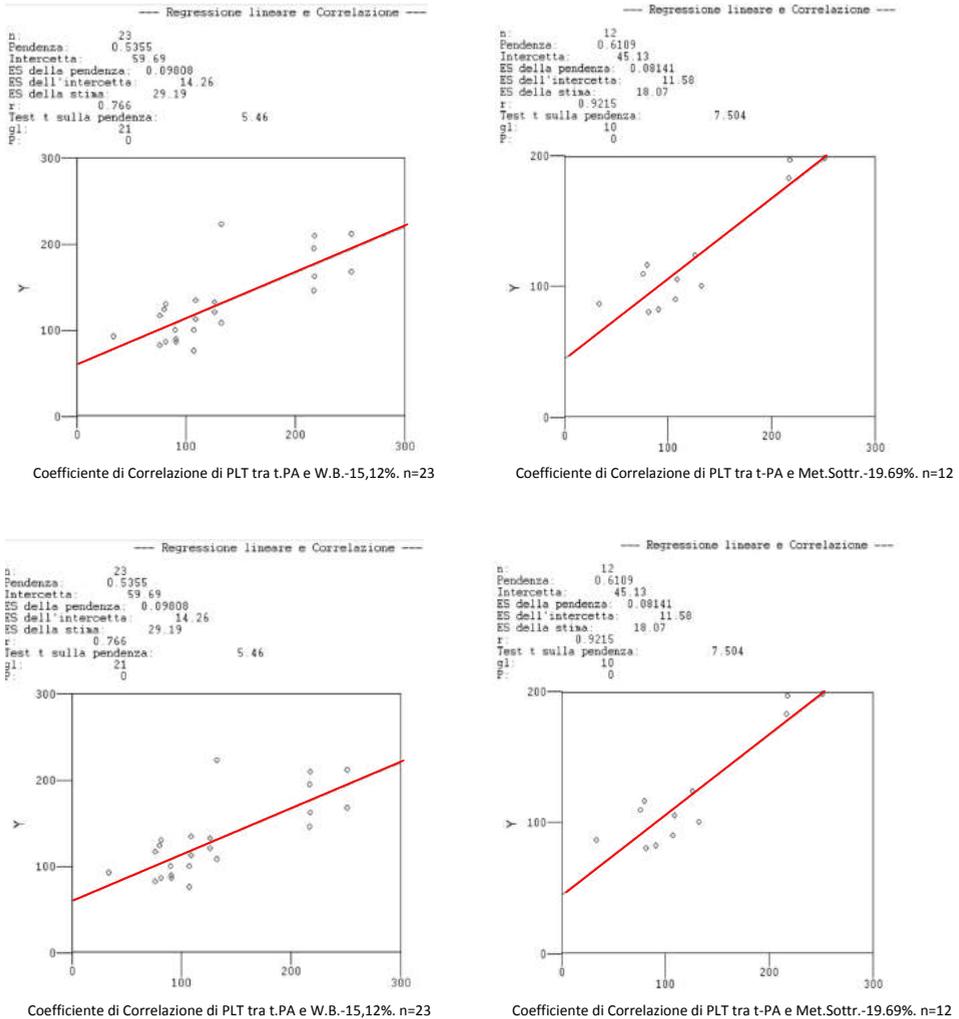
Confrontando il metodo t-PA e il Metodo di Sottrazione -% di scosta-  
mento per WBC, abbiamo ottenuto che riducendo del 34,35±16,67% ai valori del Met.di Sottrazione: t-Student=0,84 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 1413,0  $p=0,73$ (NS); Coefficiente di Correlazione:  $r=0,88$ ;  $p=0,000$ ; che significa Bu-  
ona Concoranza (S)\*\*\*\*(tabella 4) (figura 2). Per il calcolo di WBC le dif-  
ferenze tra t-PA e W.B.-45,9% e t-PA e Met.Sottr.-34,3% si equivalgono. In  
tutti i casi il t-test e ANOVA dimostrano differenze statisticamente *Non Si-  
gnificative*, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative insie-  
me al Coefficiente di Correlazione. Se assumiamo, però, una significatività di  
0,001 \*\*\* i valori di differenza tra t-PA e WB-45,9% per WBC risultano *Non  
Significativi* con una Concoranza Moderata. Se, invece, assumiamo una si-  
gnificatività di 0,0001 \*\*\*\* i valori di differenza tra t-PA e sottrazione-34,35%  
per WBC risultano *Non Significativi* con una Concoranza Buona.

Per questo confronto l'esame a coppie di Wilcoxon tra t-PA e W.B.-45,9%  
è risultato  $W=16,0$   $p>0,052$  (NS); Test di Friedman  $p=0,564$  (NS).

Successivamente abbiamo sommato i valori ottenuti nelle Tabelle 2, 3 e 4  
esclusivamente per i valori di confronto tra t-PA e W.B. e i risultati ottenuti  
semberebbero i più validi Statisticamente (t-PA e WB-15,12±24,87% per PLT  
e tra t-PA e WB-34,12±28,2% per WBC) (tabella 9).

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per PLT  
(tabella 9), abbiamo ottenuto che sottraendo il 15,12% ai valori di WB: t-Stu-  
dent=0,93 (NS);  $\chi^2=0,000$  (S); ANOVA: 10,45  $p=0,953$  (NS)\*; Coefficiente  
di Correlazione:  $r=0,766$ ;  $p=0,000$ , con Buona Concoranza tra i valori (S).  
Il t-test e ANOVA dimostrano differenze statisticamente *Non Significative*,  
mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative insieme al Coef-  
ficiente di Correlazione. Se assumiamo una significatività di 0,0001 \*\*\*\* i va-  
lori di differenza tra t-PA e W.B.-15,12% risultano tutti *Non Significativi* (fi-  
gura 2) (tabelle 5, 7 e 10). Ciò significa che si può utilizzare il valore di WB di  
PLT - il 15,12% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente accura-  
tezza statistica.

Confrontando il metodo t-PA e l'emocromo -% di scostamento per WBC (tabella 9), abbiamo ottenuto che sottraendo il 34,12% ai valori di WB: t-Student=0,88 (NS);  $\chi^2=0,000$ ; (S); ANOVA: 217,6  $p=0,88$  (NS)\*; Coefficiente di Correlazione:  $r=0,47$ ;  $p=0,022$ ; che significa Scarsa Concordanza tra i valori (S). Il t-test e ANOVA e il Coefficiente di Correlazione dimostrano differenze statisticamente *Non* Significative, mentre il  $\chi^2$  dimostra differenze statisticamente Significative. Se assumiamo una significatività di 0,0001\*\*\*\* i valori



**Figura 3.** Coefficiente di Correlazione di PLT e WBC tra la conta con t-PA, W.B. e Metodo per Sottrazione.

**Tabella 5.** Test di Significatività. Confidence Interval:95% per PLT.

Differenze Statisticamente Significative				*Seconda misurazione			
	t-test	$\chi^2$	Intervallo di Confidenza a 95%		ANOVA		D.S.
per W.B. e t-PA	p>0.05	85.54	p=0.000	da -35 a-67.01	p=0.52		
per t-PA e W.B.-10,85%	p>0.05	81.25	p=1.000	da -49.35 a-48.28	p=0.98	4.128	p=0.97 ±26.01%
per t-PA e W.B.-27,30%	p>0.05	18.44	p=0.005	da -43.91 a -32.42	p=0.005	115.4	p=0.75 ±15.82%
per W.B. e t-PA*	p>0.05	54.14	p=0.000	da -24.71 a-78.91	p=0.29		
per t-PA e W.B.-20,43%	p>0.05	51.34	p=0.000	da -42.42 a-52.61	p=0.83	155.9	p=0.83 ±21.44%
per t-PA e W.B.-25,09%	p>0.05	38.73	p=0.000	da -43.4 a-50.61	p=0.87	64.91	p=0.87 ±20.42%
per t-PA e Sottr.-19,66%	p>0.05	50.97	p=0.000	da -43.76 a-52.36	p=0.85	110.7	p=0.85 ±21.88%
per t-PA e Sottr.-24,31%	p>0.05	40.02	p=0.000	da -44.06 a-50.54	p=0.85	52.4	p=0.89 ±21.02%
per W.B. e Sottr.	p>0.05	0.118	p=1.000	da -45.63 a-47.69	p=0.85		
per t-PA e Sottr.	p>0.05	40.02	p=0.000	da -78.05 a-25.91	p=0.31		
per t-PA e W.B.-15,12%	p>0.05	133.01	p=0.000	da -31.14 a -33.92	p=0.93	10.45	p=0.953 ±24.87%

**Tabella 6.** Test di Significatività. Confidence Interval:95% per WBC.

Differenze Statisticamente Significative				*Seconda misurazione			
	t-test	$\chi^2$	Intervallo di Confidenza a 95%		ANOVA		D.S.
per W.B. e t-PA	p>0.05	261.08	p=0.000	da -2.99 a 163.6	p=0.057		
per t-PA e W.B.-22,74%	p>0.05	231.40	p=0.000	da -81.79 a-85.94	p=0.98	23.69	p=0.96 ±30.73%
per t-PA e W.B.-38,82%	p>0.05	53.49	p=0.000	da -76.01 a -77.37	p=0.005	1.84	p=0.98 ±16.03%
per W.B. e t-PA*	p>0.05	165.82	p=0.000	da -306.3 a-116.4	p=0.29		
per t-PA e W.B.-45,90%	p>0.05	163.44	p=0.000	da -64.81 a-97.03	p=0.00	3344.0	p=0.59 ±16.67%
per t-PA e Sott.-34,35%	p>0.05	93.09	p=0.000	da -75.61 a-91.3	p=0.87	1413.0	p=0.73 ±16.67%
per W.B. e Sottr.	p>0.05	28.343	p=0.003	da -174.5 a-7.659	p=0.071		
per t-PA e Sottr.	p>0.05	110.82	p=0.000	da -30.73 a-225.1	p=0.012		
per t-PA e W.B.-34,12%	p>0.05	439.73	p=0.000	da -61.69 a-52.99	p=0.88	217.6	p=0.88 ±28.20%

**Tabella 7.** Coefficiente di Correlazione per PLT.

Differenze Statisticamente Significative				*Seconda misurazione	
	r	t		Correlazione	
tra t-PA e % deviance	r=0.687	2.835	p=0.019	Correlazione Moderata	
tra t-PA e W.B.	r=0.573	2.097	p=0.065	Correlazione Scarsa	
tra W.B. e t-PA	r=0.927	7.824	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e W.B.-10.85%	r=0.573	2.096	p=0.065	Correlazione Scarsa	
tra t-PA e W.B.-20.43%	r=0.92	7.655	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra W.B. e W.B.-20.43%	r=0.998	61.22	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra W.B. e W.B.-25.09%	r=1.00	999	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e M.Sottr-19.66%	r=0.92	7.504	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e M.Sottr-24.31%	r=0.91	6.288	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e W.B.-25.09%	r=0.94	8.679	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e % dev. tra WB e Sott.	r=-0.71	-3.19	p=0.009	Correlazione Moderata Negativa	
tra WB e % dev. tra WB e Sott.	r=0.40	-1.403	p=0.19	Correlazione Scarsa Negativa	
tra M.Sottr e % dev. tra t-PA e Sott.	r=-0.68	1.233	p=0.24	Correlazione Scarsa	
tra M.Sottr e % dev. tra WB e Sott.	r=-0.39	-1.347	p=0.20	Correlazione Scarsa Negativa	
tra WB e % dev. tra t-PA e Sott.	r=-0.38	1.291	p=0.22	Correlazione Scarsa	
tra W.B. e Sottr.	r=0.999	121.6	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e Sottr.	r=0.927	7.488	p=0.000	Correlazione Ottima	
tra t-PA e % dev. tra t-PA e Sott.	r=0.689	3.005	p=0.013	Correlazione Moderata	
per t-PA e W.B.-15,12%	r=0.77	5.46	p=0.000	Correlazione Buona	

**Tabella 8.** Coefficiente di Correlazione per WBC.

Differenze Statisticamente Significative				*Seconda misurazione
	r	t		Conclusione
tra W.B. e M.Sott.	r=0.94	9.042	p=0.000	Correlazione Ottima
tra t-PA e M.Sott.	r=0.88	5.921	p=0.000	Correlazione Buona
tra W.B. e t-PA	r=0.85	5.142	p=0.000	Correlazione Buona
tra t-PA e W.B.-45.9%	r=0.73	3.378	p=0.007	Correlazione Moderata
tra t-PA e W.B.-34.12%	r=0.47	2.477	p=0.022	Correlazione Scarsa
tra t-PA e M.Sott-34.35%	r=0.88	5.922	p=0.000	Correlazione Buona
tra t-PA e % dev. tra WB e Sott.	r=0.88	-5.922	p=0.000	Correlazione Ottima Negativa
tra t-PA e % dev. tra t-PA e Sott.	r=0.79	-4.201	p=0.001	Correlazione Buona Negativa

**Tabella 9.** Confronto tra Metodo per conta con digestione t-PA ed Emocromo per WBC e PLT.

WBC conta x10 <sup>5</sup> /CGF					PLT conta x10 <sup>7</sup> /CGF			
t-PA-digerito	W.B. ematico	W.B.-t-PA	W.B. -34,12±28.2%		t-PA-digerito	W.B. ematico	W.B.-t-PA	W.B. -15,12±24.87%
136.50	355.60	61.61	234.27		108.60	157.48	31.04	133.67
242.60	331.80	26.88	218.59		107.10	89.27	-19.97	75.77
314.00	400.00	21.50	263.52		91.10	100.80	9.62	85.56
310.00	376.00	17.55	247.71		90.20	116.80	22.77	99.14
312.00	583.20	46.50	384.21		132.80	261.63	49.24	222.07
184.00	287.00	35.89	189.08		81.70	152.60	46.46	129.53
112.20	249.80	55.08	164.57		126.20	141.75	10.97	120.32
431.80	342.00	-26.26	225.31		217.80	190.76	-14.17	161.92
451.50	343.20	-31.56	226.10		251.10	197.34	-27.24	167.50
205.00	378.00	45.77	249.03		76.30	96.60	21.01	81.99
401.30	337.50	-18.90	222.35		217.10	171.00	-26.96	145.14
112.20	350.00	67.94	230.58		126.20	155.00	18.58	131.56
136.50	426.30	67.98	280.85		108.60	132.50	18.04	112.47
242.60	380.00	36.16	250.34		107.10	117.80	9.08	99.99
401.30	667.30	39.86	439.62		217.10	228.40	4.95	193.87
431.80	616.00	29.90	405.82		217.80	245.60	11.32	208.47
451.50	592.80	23.84	390.54		251.10	248.50	-1.05	210.93
312.00	563.20	44.60	371.04		132.80	126.70	-4.81	107.54
314.00	410.80	23.56	270.64		91.10	104.60	12.91	88.78
184.00	420.80	56.27	277.22		81.70	100.70	18.87	85.47
126.50	385.40	67.18	253.90		34.10	108.20	68.48	91.84
205.00	469.20	56.31	309.11		76.30	136.60	44.14	115.95
290.40	462.00	37.14	304.37		80.40	144.90	44.51	122.99
274.29	422.95	34.12	278.64	Mean	131.49	153.28	15.12	130.11
115.31	110.75	28.20	72.96	±D.S	63.45	52.26	24.87	44.36

di differenza tra t-PA e W.B.-34,12% risultano tutti *Non* Significativi. Poiché il confronto tra il metodo t-PA e W.B.-34,12% per WBC ha una Bassa Correlazione al Coefficiente di Correlazione ( $r=0,47$ ;  $p=0,022$ ) con Differenza Statisticamente Significativa (figura 2) (tabelle 6, 8 e 10), si è proceduto a calcolare la significatività con i test di Wilcoxon e Friedman tra i valori di t-PA e W.B.-34,12%, W.B.-45,9% e W.B.-38,82%.

Sulla base del confronto con i test di Wilcoxon e Friedman si considera valido Statisticamente il calcolo di W.B.-34,12% per WBC.

Da ciò si può dedurre che si può utilizzare il valore di WB di WBC - il 34,12% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente accuratezza statistica.

#### 4.5. Discussione

I concentrati piastrinici sono mezzi sicuri, affidabili e convenienti per accelerare la guarigione dei tessuti e migliorare l'efficienza della riparazione dei tessuti dopo una lesione.

Le piastrine, la fibrina e i leucociti contenuti in essi agiscono, naturalmente, in sinergia per promuovere la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti. Il concetto di concentrato piastrinico per uso chirurgico è di moltiplicare questo effetto di coagulazione/rigenerazione su un sito chirurgico o una ferita.

I concentrati piastrinici, compresi L-PRF e A-PRF, sono stati utilizzati, infatti, per procedure rigenerative in vari campi della medicina, tra cui l'odontoiatria, la chirurgia plastica ricostruttiva e la dermochirurgia, per fornire concentrazioni soprafisologiche di fattori di crescita autologhi direttamente ai tessuti ospiti. Questi fattori di crescita hanno dimostrato di essere chemiotattici per vari tipi di cellule, compresi monociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule staminali Mesenchimali (MSC) e fibroblasti, creando microambienti tissutali e influenzando direttamente la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici (Cellule staminali CD34<sup>+</sup>).

L'effetto benefico delle membrane PRF nella guarigione delle ferite complesse può essere spiegato con l'alta concentrazione di piastrine e leucociti insieme al rilascio a lungo termine di fattori di crescita specifici.

È chiaro che i coaguli di fibrina ricchi di piastrine costituiscono un serbatoio bioattivo. Pertanto, un ematocrito alto o un basso numero di piastrine, possono essere un fattore limitante ed è per questo che ulteriori ricerche sono necessarie per stabilire il numero ottimale di piastrine per la loro utilizzazio-

ne clinica. Le citochine prodotte dalle piastrine e dai leucociti sono, quindi, una parte importante nel ruolo di questo biomateriale, ma sia la matrice di fibrina, che gli elementi contenuti in essa, sono responsabili del reale potenziamento terapeutico del PRF.

Fino ad oggi era quasi impossibile da contare e regolare il numero di piastrine nelle preparazioni di PRF prima del loro utilizzo clinico, in modo da metterlo in relazione al risultato per ogni paziente. Pertanto, il modo clinicamente più efficace per controllare la qualità dei risultati, era quello di utilizzare la regione di PRF più vicina al coagulo di RBC [3].

**Tabella 10.** Risultati ottenuti tra i metodi di conta con t-PA, Sottrazione e Simulazione.

Leukocytes (WBC)		t-PA			Subtraction			Simulation			Difference between PRF with count for simulating and count from t-PA
		N°	%	Diff %	N°	%	Diff %	N°	%	Diff %	
WHOLE BLOODSHED	WHOLE BLOODSHED	36,22 x 10 <sup>3</sup> /µl (3.622/mm <sup>3</sup> )	100,00	-34,12% t-Test=0,88* χ <sup>2</sup> =0,000 ANOVA=0,44* Coeff Cor.	47,86 x 10 <sup>3</sup> /µl (4.786/mm <sup>3</sup> )	100,00	-34,35% t-Test=0,88* χ <sup>2</sup> =0,000 ANOVA=0,71* Coeff Cor.	36,22 x 10 <sup>3</sup> /µl (3.622/mm <sup>3</sup> )	100,00		-83,83%
	RED CLOT	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	n.r.	n.r.			
	PRF	26,73 x 10 <sup>3</sup> /µl (2.673/mm <sup>3</sup> )	-26,2%		37,90 x 10 <sup>3</sup> /µl (3.790/mm <sup>3</sup> )	-20,8%		4,32 x 10 <sup>3</sup> /µl (432/mm <sup>3</sup> )	-88,1%		
	SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.	t=0,47 p=0,622	n.r.	n.r.	t=0,88 p=0,400	n.r.	n.r.		
	SURFACE post compression	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
Red Blood Cells (RBC)	WHOLE BLOODSHED	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.	+29,47%	n.r.	n.r.		
	RED CLOT	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
	PRF	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
	SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
	SURFACE post compression	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
Platelets (PLT)	WHOLE BLOODSHED	1,524 x 10 <sup>5</sup> /µl (152.400/mm <sup>3</sup> )	100,00	-15,11% t-Test=0,93* χ <sup>2</sup> =0,000 ANOVA=0,91* Coeff Cor.	1,541 x 10 <sup>5</sup> /µl (154.100/mm <sup>3</sup> )	100,00	-19,69% t-Test=0,85* χ <sup>2</sup> =0,000 ANOVA=0,43* Coeff Cor.	1,524 x 10 <sup>5</sup> /µl (152.400/mm <sup>3</sup> )	100,00		-50,9%
	RED CLOT	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
	PRF	1,27 x 10 <sup>5</sup> /µl (127.000/mm <sup>3</sup> )	-16,7%		1,413 x 10 <sup>5</sup> /µl (141.300/mm <sup>3</sup> )	-8,3%		0,747 x 10 <sup>5</sup> /µl (74.700/mm <sup>3</sup> )	-50,9%		
	SERUM OVER (PPP) CLOT	n.r.	n.r.	t=0,27 p=0,786	n.r.	n.r.	t=0,82 p=0,400	n.r.	n.r.		
	SURFACE post compression	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		n.r.	n.r.		
Methods Used	Method for t-PA counting			Subtraction methods			+10,12%	Simulation method			-41,2%

A value of P less than 0.05 was considered a Statistically Significant Difference; \*p>0.05 Statistically Not Significant Difference; n.r.= not reported.

Le piastrine attivate rilasciano un'intera gamma di chemiochine e promuovono l'assunzione, l'adesione e la proliferazione di cellule staminali adulte, incluse le cellule progenitrici CD34-positive, le MSC, le progenitrici di SMC, e le progenitrici endoteliali. I leucociti presenti nella 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 peptidi oppioidi (β-endorfine, dimorfina-A ecc.) e quindi possono promuovere una inibizione clinicamente rilevante anche del dolore patologico. Le quantità rilasciate di VEGF e TGF-β1 sono prodotte dai leucociti massicciamente. 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).

Wend *et al.* (2017) [11] ha mostrato che una diminuzione della velocità di centrifugazione del PRF porta a un numero maggiore di leucociti, linfociti, neutrofilo, monociti e piastrine in esso, rispetto al PRF generato a RCF (Forza centrifuga applicata) più alta. Pertanto, la quantità di fattore di crescita e il rilascio di citochine dalle matrici PRF aumenta con la diminuzione delle forze RCF. Anche l'effetto pro-angiogenico di PRF è significativamente maggiore quando viene utilizzato un PRF a basso-RCF rispetto al PRF con RCF alto e può essere correlato alla presenza di un gran numero di neutrofilo e neutrofilo extracellulari (NET) intrappolati che vengono rilasciati, è stato quindi introdotto il concetto di bassa velocità di centrifugazione (LSCC).

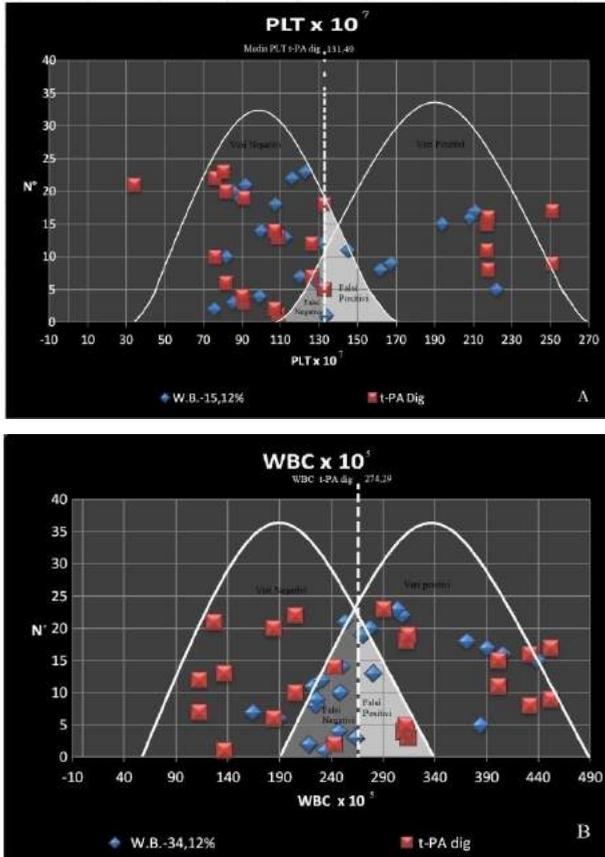
Le limitazioni, però, riscontrate nell'uso clinico di questi concentrati piastrinici solidi sono quindi:

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 controllato;
2. il PRF possiede cellule immunitarie circolanti e molecole antigeniche che impediscono il suo uso come materiale allogenico, pertanto, vi è un aumentato rischio di trasmissione di agenti infettivi;
3. il numero di cellule (piastrine, leucociti e cellule staminali) contenute può essere molto variabile.

A questo punto della nostra conoscenza, tra i parametri importanti da tenere in considerazione abbiamo quindi: la concentrazione di piastrine, la concentrazione dei leucociti e la proporzione tra i vari tipi di leucociti. Per quanto riguarda la concentrazione di piastrine, dei leucociti e la loro formula, la loro influenza sull'effetto clinico dei concentrati piastrinici di seconda generazione, deve ancora essere studiata con attenzione, in quanto la loro presenza più o meno abbondante può spiegare i risultati contraddittori che si sono osservati nei lavori pubblicati.

In una fase suggestiva della sperimentazione abbiamo, confrontato il metodo di conta Piastrinica e Leucocitaria con digestione t-PA proposto da Kawase [10] con quello Statistico da noi proposto nel 2019 [12] i cui valori sono riportati in tabella I abbiamo costruito sui valori ottenuti con i due metodi poi la Curva ROC (*Relative Operating Characteristic*) per PTL e WBC per valori ottenuti con t-PA dig e con W.B.-15,12% per PLT e -34,12% per WBC.

Il cut-off considerato è rappresentato dalla media t-PA per PLT (131,49) e per WBC (274,29) (figura 4 A-B).



**Figura 4.** Curva ROC per PTL (A) e WBC (B) per valori ottenuti con t-PA dig e con W.B.-15,12% per PLT e -34,12% per WBC. Il cut-off è rappresentato dalla media t-PA per PLT (131,49) e per WBC (274,29).

Su questi valori sono stati calcolati, nell'ipotesi più semplice in cui si assume che il “test aureo” fornisca risultati perfettamente corrispondenti alla verità, la Sensibilità ( $Se$ ), la Specificità ( $Sp$ ), il Valore Predittivo positivo ( $VP+$ ), il Valore Predittivo negativo ( $VP-$ ), la Proporzione di Falsi Negativi e la Proporzione dei Falsi positivi (tabella II). Abbiamo assunto quindi come “test aureo” quello risultato dalla conta con t-PA dig.

**Tabella 11.** Tabella di contingenza per PLT. Il “Gold Standard” è stato considerato il test t-PA dig.

Test Aureo PLT (t-PA dig)						
	M.	N.M.	Tot.	Fuori Scala		
Pos	4	2	6	0	$Se=0.80$	$VP+=0.66$
Neg	1	13	14	0	$Sp=0.86$	$VP-=0.92$
Tot	5	15	23	3	Prop.Falsi Neg=0.2	Prop.Falsi Pos=0.13
Test PLT (WB-15.12%)						
	M.	N.M.	Tot.	Fuori Scala		
Pos	6	2	8	0	$Se=0.75$	$VP+=0.75$
Neg	2	13	15	0	$Sp=0.86$	$VP-=0.86$
Tot	8	15	23	0	Prop.Falsi Neg=0.25	Prop.Falsi Pos=0.13

I risultati ottenuti hanno dimostrato per PLT una Sensibilità di 0.75 (Gold Standard=0.80), Specificità di 0.86 (Gold Standard=0.86), per WBC una Sensibilità di 0.47 (Gold Standard=0.80), Specificità di 0.66 (Gold Standard=0.75). Inoltre un  $VP+$  di 0.75 (Gold Standard=0.66),  $VP-$  di 0.86 (Gold Standard=0.92) per PLT. Un  $VP+$  di 0.80 (Gold Standard=0.75),  $VP-$  di 0.30 (Gold Standard=0.81) per WBC. La Proporzione dei Falsi Negativi è di 0.25 per PLT (Gold Standard=0.2) e di 0.53 per WBC (Gold Standard=0.2). La Proporzione dei Falsi Positivi è di 0.13 per PLT (Gold Standard=0.13) e di 0.33 per WBC (Gold Standard=0.25).

#### 4.6. Conclusioni

In questo studio si potrà dedurre che, riducendo del 34,35% il valore della conta delle Piastrine col metodo di sottrazione e del 15,12% al valore dall’Emocromo, e del 19,69% il valore della conta del Leucociti con Metodo per sottrazione e del 34,12% il valore dell’emocromo, si otterrà il valore ottenuto col metodo della digestione con t-PA con un sistema molto più semplice. Da questo studio si potrà quindi validare un sistema semplice e poco costoso per calcolare il numero preciso di piastrine e leucociti presenti nei concentrati piastrinici solidi auto compressi. Il presente studio ha dimostrato che è possibile infatti, quantificare il numero di cellule nei biomateriali, un sistema cellulare complesso per la presenza di piastrine, leucociti, cellule staminali ecc., utilizzando un metodo clinico applicabile in modo rapido (max 15 minuti) e sicuro (Metodo Statistico) [12, 16].

Con ciò si potrà valutare quindi, il livello minimo/massimo di piastrine e leucociti utile per avere un risultato clinico nell'utilizzo dei Concentrati Piastrinici di Seconda Generazione.

Altri studi sperimentali e clinici devono essere però condotti per fornire una migliore comprensione della diafonia tra il numero di piastrine, di leucociti e i meccanismi che controllano la riparazione dei tessuti, caratterizzati da processi come il reclutamento di cellule con potenziale rigenerativo e la regolazione dell'apoptosi/sopravvivenza cellulare.

Questa sperimentazione indica anche che si può utilizzare il valore di WB di PLT - il 15,12% per ottenere i valori di conta per t-PA con sufficiente accuratezza statistica con una Sensibilità di 0.75 *vs* 0.80 ed una Specificità di 0.86 *vs* 0.80, quindi molto simili al "Test Aureo". Utilizzare invece il valore di WB di WBC - il 34,12% ha una Sensibilità ed una Specificità di molto inferiore al "Gold Standard" (Sensibilità di 0.47 *vs* 0.80, Specificità di 0.66 *vs* 0.75).

## Riferimenti bibliografici

- [1] Dohan Ehrenfest D.M. *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.
- [2] Schär M.O., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein M.A., Nesic D., *Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro*, «Clin. Orthop. Relat. Res.» 2015, 473:1635-1643.
- [3] Ghanaati S., Booms, P., Orłowska A. *et al*, *Advanced Platelet-Rich Fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells*, «J. Oral. Implantol», 2014; 40:679-89.
- [4] Kobayashi E., Flückiger L., Fujioka-Kobayashi M. *et al.*, *Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF*, «Clin. Oral. Invest», 2016;20:2353-60.
- [5] Choukroun J., *Advanced-PRF and i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates?*, «J. Periodont. Med. Clin. Pract.», 2014;1:1-3
- [6] Marx R., *Platelet-Rich Plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP?*, «Implant Dentistry», 2001, 10(4):225-228.

- [7] Dohan Ehrenfest D.M., Del Corso M., Diss A., Mouhyi J., Charrier J.B., *Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane*, «J. Periodontol», 2010, 81, 546-555.
- [8] Crisci A., Lombardi D., Serra E., Lombardi G., Cardillo F., Crisci M., *Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. J. Unexplor*, «Med. Data», 2017, 2, 77-87.
- [9] Watanabe T., Isobe K., Suzuki T., Kawabata H., Nakamura M., Tsukioka T., Okudera T., Okudera H., Uematsu K., Okuda K., Nakata K., Kawase T., *Method Used for Determining Platelet Counts in Advanced Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factor Preparations*, «Dent. J.» 2017, 5, 7.
- [10] Kitamura Y., Watanabe T., Nakamura M., Isobe K., Kawabata H., Uematsu K., Okuda K., Nakata K., Tanaka T., Kawase T., *Platelet Counts in Insoluble Platelet-Rich Fibrin Clots: A direct Method for Accurate determination*, «Front. Bioeng. Biotechnol.», 2018, 6, 4.
- [11] S. Wend, A. Kubesch, A. Orłowska, S. Al-Maawi, N. Zender, A. Dias, R.J. Miron, R. Sader, P. Booms, C.J. Kirkpatrick, J. Choukroun, S. Ghanaati, *Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices*, «J. Mater. Sci. Mater. Med.», 2017, 28.
- [12] Crisci A., Kawase T., D'Adamo R., Crisci M., *Experimental research on a technique for quantification of platelets and leukocytes in second-generation platelet concentrates*, «International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research», 2019, 05(12), 4792-4799.
- [13] Crisci A., Barillaro M.C., Lepore G., Cardillo F., *L-PRF Membrane (Fibrin Rich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, i-PRF) are Helpful as a Basis of Stem Cells in Regenerative Injury Treatment: Trial Work on the Horse*, «International Blood Research & Reviews», 2020; 10(2), 1-14.
- [14] Crisci A., Kawase T., D'Adamo R., Crisci M., *Utilità dei derivati del sangue di seconda generazione nella terapia rigenerativa delle ferite complesse delle estremità*, «Med Chir Caviglia Piede», 2020; 44:3-13.
- [15] Sato A., Kawabata H., Aizawa H., Tsujino T., Isobe K., Watanabe, Kitamura Y., Miron J.R., Kawase T., *Distribution and quantification of activated platelets in platelet-rich fibrin matrices*, «Platelets», 2020.
- [16] Crisci A., Kawase T., D'Adamo R., Crisci M., *Quantificazione delle piastrine e dei leucociti nei concentrati piastrinici solidi del sangue per uso chirurgico: studio di una tecnica sperimentale*, «Chirurgia», 2021; 34:000-000.



## CAPITOLO V

# **LA FIBRINA RICCA DI PIASTRINE OTTIMIZZATA CON IL CONCETTO DI BASSA VELOCITÀ DI CENTRIFUGAZIONE (LSCC) RILASCIO DEI FATTORI DI CRESCITA, BIOCOMPATIBILITÀ E RISPOSTA CELLULARE**

### **5.1. Introduzione**

La centrifugazione è una tecnica ampiamente utilizzata per separare una miscela biologica all'interno di una fase liquida. I principi di questa tecnica si basano sull'uso della forza centrifuga, che è una forza molto più intensa della gravità. Durante la centrifugazione, forze diverse interagiscono e influenzano le particelle in movimento all'interno del liquido, inclusa la forza centrifuga, la forza di gravità e la forza di trascinamento delle cellule. Questo processo si traduce in una migrazione delle particelle che dipende dalla loro dimensione, densità e massa. Perché la centrifugazione dipende dal peso e dalla densità delle cellule, una maggiore RCF (Forza di Centrifugazione Relativa) può essere il motivo per una sedimentazione della maggioranza delle piastrine nella porzione inferiore del coagulo secondo la formula della loro densità e dimensione, come osservato nel L-PRF. La diminuzione del RCF permette alle piastrine di separarsi dai globuli rossi e diventare equamente distribuite all'interno della rete di fibrina. L'efficacia dei coaguli di PRF con basso numero di piastrine e loro distribuzione non uniforme può avere una minore influenza sugli esiti clinici rispetto ai coaguli con un numero di piastrine uniformemente distribuito e potenziato perché il coagulo applicato potrebbe avere un'attività biologica non uniforme e quindi un ridotto rilascio dei fattori di crescita.

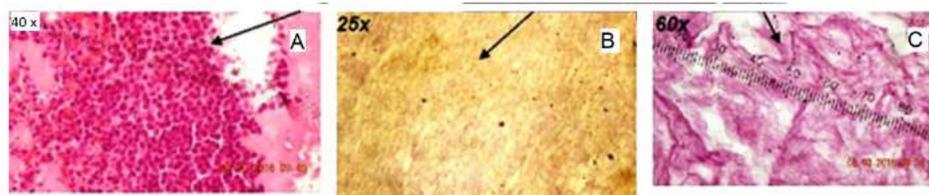
Le Matrici a base di PRF includono varie matrici di cellule infiammatorie, come piastrine e leucociti, in combinazione tra loro con varie proteine plasmatiche incorporate in una rete di fibrina (figura 1) [1]. I componenti delle matrici

a base di PRF sono noti per svolgere un ruolo importante durante il processo di guarigione delle ferite. Le piastrine sono le prime cellule che si riscontrano nella sede di un infortunio. Oltre al loro ruolo all'interno dell'emostasi, le piastrine hanno un potenziale infiammatorio, compreso il reclutamento di ulteriori cellule infiammatorie, come neutrofilo e macrofagi, e la promozione dell'angiogenesi e la riparazione dei tessuti [2, 3]. In questo contesto, le piastrine sono in grado di esprimere una serie di molecole di segnalazione biologicamente attive e fattori di crescita, come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ). Questi fattori di crescita sono essenziali per la vascolarizzazione e la formazione di nuovi tessuti [2, 4]. Inoltre, le piastrine contengono granuli con citochine, chemochine e altri mediatori infiammatori che sono rilasciati dopo l'aggregazione piastrinica per migliorare l'emostasi e attivare e reclutare cellule nel luogo dell'infiammazione [5].

Uno studio sistematico condotto da Choukroun e Ghanaati (2017) ha dimostrato l'influenza della riduzione della forza di centrifugazione relativa (RCF), sul numero di leucociti e di piastrine, nonché il loro ruolo nel rilascio dei fattori di crescita nelle matrici fluide a base di PRF (i-PRF) seguendo il concetto di bassa velocità di centrifugazione (LSCC), ciò indica che la riduzione del valore di RCF aumenta il numero di cellule e il rilascio dei fattori di crescita all'interno di matrici basate sulla PRF [6, 7]. La distribuzione delle piastrine nelle matrici basate su PRF, identificate con Colorazione immunoistochimica con anticorpi CD-61, è stata condotta da El Bagdadi e al. (2017) [8] (figura 2) per determinare la distribuzione piastrinica in sezioni trasversali di tre matrici basate sulla PRF. La distribuzione piastrinica è stata valutata in relazione alla posizione nel coagulo. Le piastrine formano accumuli all'interno di tutti e tre i coaguli. Il L-PRF, che è stato preparato con un alto RCF (2400 rpm, 708 g, per 12 min) ha mostrato un diverso schema di distribuzione in base alla localizzazione. Le porzioni superiori (C) e centrale (B) del coagulo hanno mostrato solo poche piastrine, mentre la maggior parte delle piastrine sono state distribuite nella parte inferiore (A) della L-PRF (figura 1).

Al contrario, A-PRF+, che viene preparato con un ridotto RCF (1300 rpm, 208 g, per 8 min), presenta un diverso schema di distribuzione. Le piastrine sono disperse all'interno di tutto il coagulo. A-PRF+ con un ridotto RCF e ridotto tempo di centrifugazione ha visualizzato un modello di distribuzione piastrinica uniforme all'interno del coagulo (figure 2, 3).

I risultati del lavoro di El Bagdadi *et al.* hanno rivelato un continuo rilascio dei fattori di crescita VEGF, TGF- $\beta$ 1 e EGF nel corso del tempo di stu-



**Figura 1.** Membrane L-PRF o min after compression (hematoxylin-eosin staining). (A) III proximal 60x fibrin on the right, the center lymphocytes, erythrocytes, and granulocytes neutrophils on the left; (B) average III 25x pattern of fibrin; (C) III distal 60x pattern fibrin (Crisci A. *et al.* 2017).

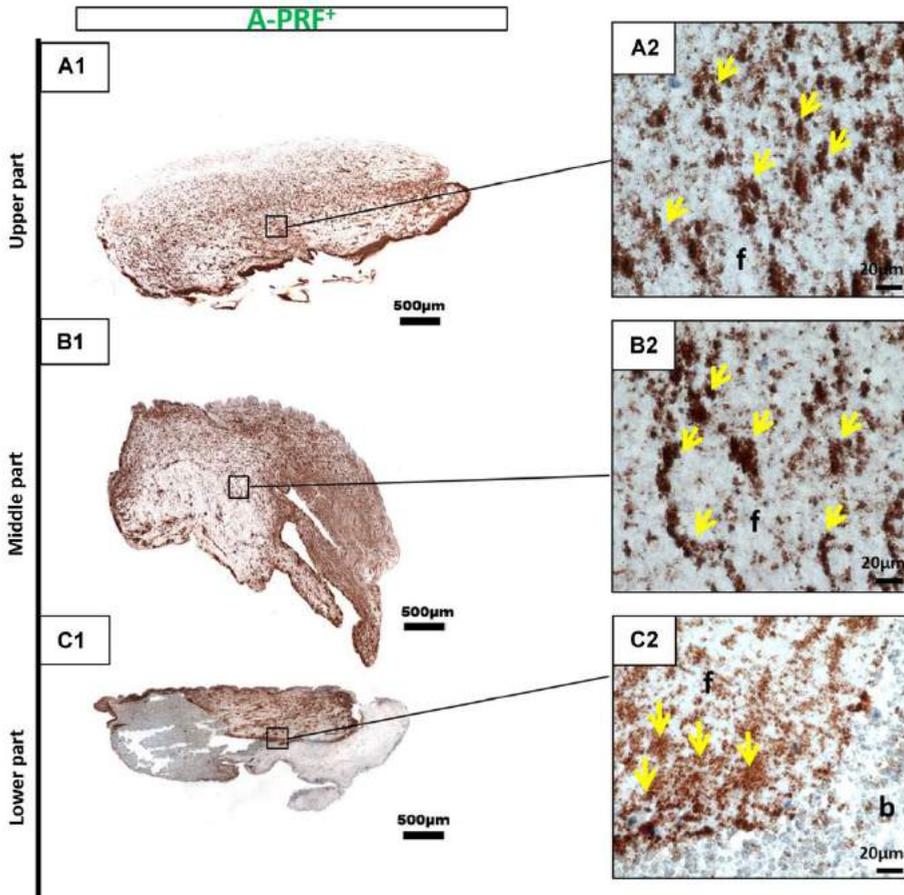
dio (figura 4) e sono state dimostrate differenze statisticamente significative tra i protocolli di preparazione di L-PRF e A-PRF+.

Uno dei più potenti stimolanti l'angiogenesi è il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF).

A-PRF+ rilascia molto più VEGF che L-PRF il giorno 7 (figura 4). Questi risultati sono probabilmente legati alla struttura specifica della fibrina e al modello di distribuzione cellulare di A-PRF+.

Il VEGF svolge un ruolo fondamentale nella guarigione delle ferite e nella rigenerazione dei tessuti promuovendo la vascolarizzazione e nuova formazione di vasi sanguigni [9, 10]. L'emissione potenziata di VEGF da parte di A-PRF+ potrebbe portare a maggiori benefici nella rigenerazione e nella vascolarizzazione e fornire così un apporto di sostanze nutritive per sostenere la guarigione della ferita e migliorare il modello di rigenerazione guidata da biomateriali. Il rilascio di TGF- $\beta$ 1 nel A-PRF+ indica i valori massimi di rilascio nel giorno 7, e sono significativamente più elevati se si confrontano A-PRF+ e L-PRF.

TGF- $\beta$ 1 è essenziale per la guarigione delle ferite [11]. Sono state, infatti, osservate ferite croniche avere una minore espressione dei recettori TGF- $\beta$  [12]. Così, le matrici PRF con un maggiore rilascio di TGF- $\beta$ 1, come è il caso di A-PRF+, potrebbero avere una maggiore influenza sulla guarigione delle lesioni come catalizzatore delle fasi della riparazione della ferita. Inoltre, questo fattore di crescita è noto per stimolare la migrazione dei fibroblasti, migliorare la sintesi di collagene e promuovere l'angiogenesi [12]. Tutte queste caratteristiche sono essenziali nel processo di rigenerazione basata su biomateriali. Di conseguenza, le matrici basate su PRF come ulteriore aggiunta autologa di cellule infiammatorie e fattori di crescita, potrebbe essere promettente nel campo della rigenerazione guidata dei tessuti e dell'osso (GTR e GBR), in cui i biomateriali dovrebbero fornire un ponteggio e sostenere la rigenerazione nell'area del difetto.



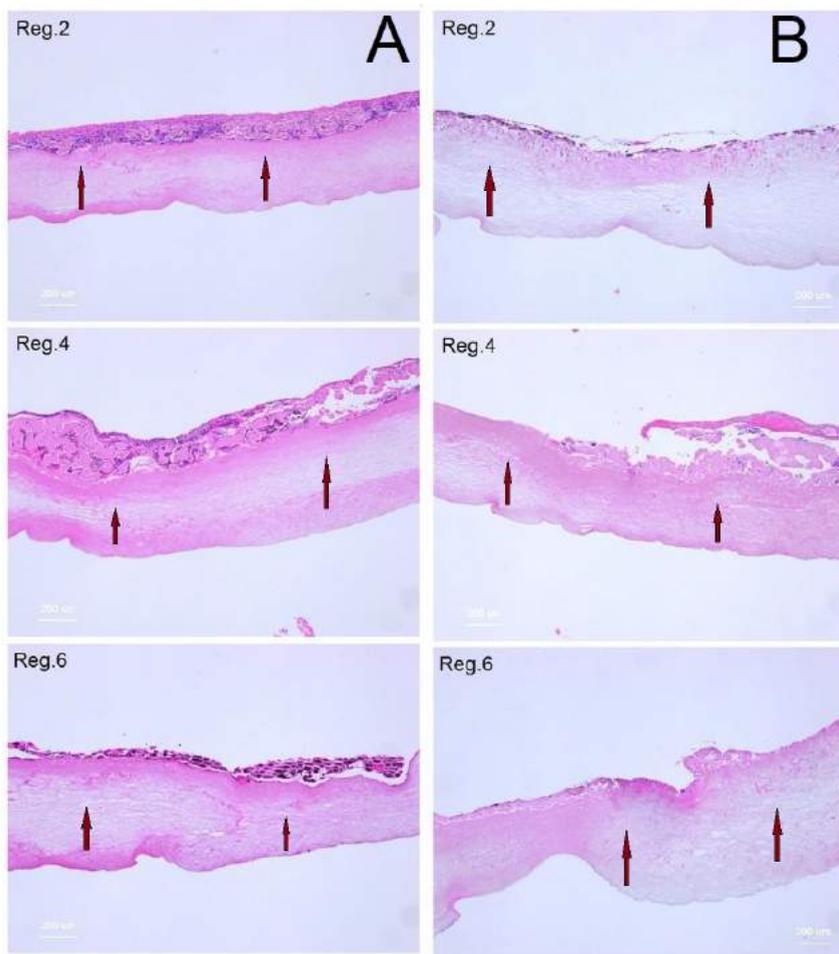
**Figura 2.** CD-61 immunohistochemical analysis of A-PRF+ according to the different regions. a1, a2 upper portion; b1, b2 middle portion; c1, c2 lower portion (a1, b1, c1 total scan sections;  $\times 100$  magnification, scale bar 500  $\mu\text{m}$ ). a2, b2, c2 Show the distribution pattern of platelets (yellow arrows) in higher magnification (f fibrin; b buffy coat;  $\times 400$  magnification; scale bar 20  $\mu\text{m}$ ) (El Bagdadi *et al.* 2017).

Il rilascio di EGF risulta generalmente più elevato nel gruppo A-PRF+ rispetto al L-PRF. Statisticamente differenze molto significative sono state rilevate quando si confronta A-PRF+ con L-PRF dopo 24 ore.

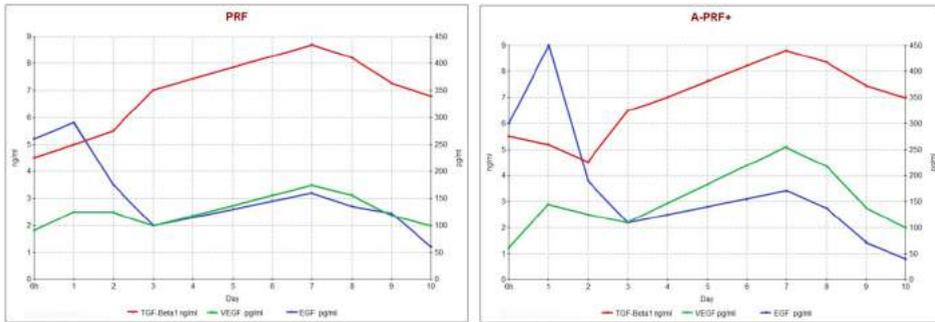
EGF è stato descritto come promotore della crescita cellulare [13], aumentando la migrazione dei cheratinociti, inibendo l'apoptosi in condizioni di ipossia [14], e stimolando il supporto alla riepitelizzazione e alla guarigione della pelle [15]. Inoltre, EGF supporta il processo di guarigione delle ferite croniche [15], la non guarigione delle ferite croniche e delle ulcere, che sono, per esempio, os-

servate in pazienti diabetici, sono dovute alla mancanza dei necessari fattori di crescita capaci di mantenere il processo di guarigione [15].

Vengono mostrate sezioni delle regioni (Reg.) 2, 4 e 6, colorate con HE. Le frecce indicano la direzione della forza centrifuga. I margini superiori della membrana PRF, a cui sono attaccate le cellule del sangue e le proteine del siero, rappresentano la regione rivolta verso la parete interna della provetta (Tsujino T. *et al.* 2019).



**Figura 3.** Distribuzione piastrinica in matrice PRF preparata usando provette di vetro per A-PRF+ mediante centrifugazione a bassa (A: 700 rpm per 14 minuti) e alta velocità (B: 30 s, accelerazione; 2 min, 692 x g; 4 min, 547 x g; 4 min, 592 x g; 3 min, 855 x g; 36 s, decelerazione).



**Figura 4.** Statistical analysis of the growth factor releases by time points as the mean  $\pm$  standard deviation for PRF and A-PRF+. VEGF, TGF- $\beta$ 1 release, EGF release, ( $*p < 0.05$ ), ( $***p < 0.0005$ ), ( $****p < 0.0001$ ).

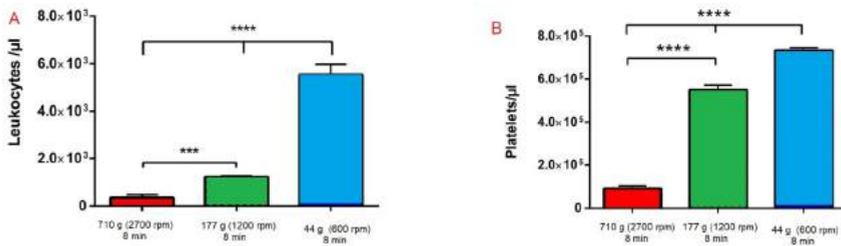
## 5.2. Discussione

Questi gruppi di pazienti possono trarre beneficio dall'applicazione di matrici di PRF come sistema di somministrazione autologa di farmaci. Inoltre, la valutazione immunoistochimica indica uno schema di distribuzione uniforme delle piastrine in tutte le regioni del coagulo nel caso di A-PRF+ (figura 2), mentre nel caso di L-PRF, la maggior parte delle piastrine sono situate nella parte inferiore del coagulo (figura 1). Questi risultati sono, secondo El Bagdadi *et al.*, correlati all'LSCC (basso livello di velocità di centrifugazione), indicando che nella riduzione della velocità di centrifugazione, l'RCF applicata aumenta il numero di cellule infiammatorie e di piastrine, nonché il rilascio dei fattori di crescita rispetto alle matrici di L-PRF [1]. Queste osservazioni evidenziano l'influenza della riduzione di RCF, cioè da L-PRF (708 g) a A-PRF+ (208 g) sulla distribuzione piastrinica, correlando così come precedentemente dimostrato il conteggio automatizzato delle cellule che indica un numero significativamente maggiore di piastrine nelle matrici PRF preparate con un RCF basso rispetto ad un'applicazione con alto RCF. Un precedente studio immunoistochimico *ex vivo* di Ghaanati *et al.* (2014) ha dimostrato il modello di distribuzione nel PRF e A-PRF, che ha incluso, in aggiunta alle piastrine, una vasta gamma di cellule infiammatorie che fisiologicamente esistono all'interno del sangue periferico, come ad esempio i leucociti, compresi i neutrofili, i monociti e i linfociti [1]. Queste cellule, in particolare le piastrine e i granulociti neutrofili, contribuiscono alla neoangiogenesi e alla liberazione di VEGF [16]. Inoltre, le piastrine sono le cellule primarie secernenti

ti EGF e TGF- $\beta$ 1 [17]; quindi, la presenza numerosa all'interno delle matrici basate sulle PRF è una possibile spiegazione per il rilascio dei fattori di crescita osservati. Queste cellule sono essenziali per la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti [18]. Nello studio di El Bagdadi *et al.* (2017), la cinetica di rilascio ha mostrato un maggiore rilascio del fattore di crescita nel corso del tempo di studio e al massimo al giorno 7 per VEGF e TGF- $\beta$ 1, così come un aumento del rilascio del fattore di crescita a 24 ore nel caso di EGF (figura 4). Sulla base del rilascio dei fattori di crescita e della cinetica dimostrata qui, si può supporre che il modello di rilascio dei fattori di crescita all'interno delle varie matrici basate su PRF è un rilascio attivo da cellule viventi all'interno dei diversi coaguli di PRF, che molto probabilmente hanno sperimentato l'apoptosi durante il periodo di studio, se i 10 giorni riflettono la riduzione del rilascio del fattore di crescita rispetto al giorno 7 in tutti i gruppi e per tutti i fattori di crescita. Inoltre, i leucociti e l'interazione piastrinica tramite cross-talk cellulare sono stati descritti nella rigenerazione ossea. In questo contesto, l'elevato potenziale di rigenerazione di matrici avanzate a base di PRF potrebbe essere utile in vari tipi di applicazioni cliniche, come il miglioramento della rigenerazione in modelli di biomateriali in termini di GTR e GBR. Inoltre, biomateriali autologhi di biologizzazione che utilizzano matrici PRF-based possono migliorare il modello di rigenerazione in difetti di grandi dimensioni, dei tessuti molli e ossei per catalizzare la guarigione della ferita e la rigenerazione. Lo studio eseguito da El Bagdadi *et al.* dimostra che l'applicazione dell'LSCC, diminuendo l'RCF si traduce in un significativo maggiore rilascio di VEGF, TGF- $\beta$ 1 e EGF. In particolare, il rilascio accumulato nell'arco di 10 giorni di TGF- $\beta$ 1 e EGF, il rapporto tra la riduzione di RCF e il rilascio dei fattori di crescita (figura 4). Quindi, le membrane di A-PRF+, hanno visualizzato comparabili risultati che sono stati significativamente più elevati rispetto alle membrane di L-PRF, che è stato preparato con un RCF più di tre volte superiore. Queste osservazioni sottolineano il fatto che l'applicazione del metodo LSCC è utile per modificare e ottimizzare le PRF solide. I vari profili di rilascio delle PRF valutate sulla base di matrici di PRF possono anche essere una conseguenza del diverso tipo di fattore di crescita che lega affinità con la fibrina. È stato dimostrato che i fattori di crescita, come il VEGF, hanno una alta affinità a legarsi al fibrinogeno e alla fibrina in modo che questi fattori sono rilasciati in modo sostenuto. Queste informazioni sono riflesse nei risultati attuali, mostrando il rilascio del VEGF notevolmente aumentato il giorno 7 nel caso di A-PRF+. Per contro, il EGF è rilasciato in alta concentrazione ad un punto di tempo molto precoce (24 ore). Una spiegazione di questa

osservazione può essere la bassa vincolante affinità del EGF alla fibrina e al fibrinogeno [19]. Un'altra spiegazione può essere la struttura delle matrici basate sulle PRF. A-PRF+, infatti, mostra una struttura più porosa della L-PRF [1]. È possibile che una struttura più porosa, come in A-PRF+, è uno dei motivi per cui si verifica un maggiore rilascio del fattore di crescita [1]. Così, rimane discusso se il rilascio dei fattori di crescita sia correlato alle proprietà fisiche specifiche della rete fibrinica o alle cellule infiammatorie e alle piastrine incluse, o una combinazione di entrambi.

I coaguli di PRF, nello studio di El Bagdadi, non sono stati compressi o manipolati, ma comunque hanno prodotto la grande quantità di fattori di crescita.



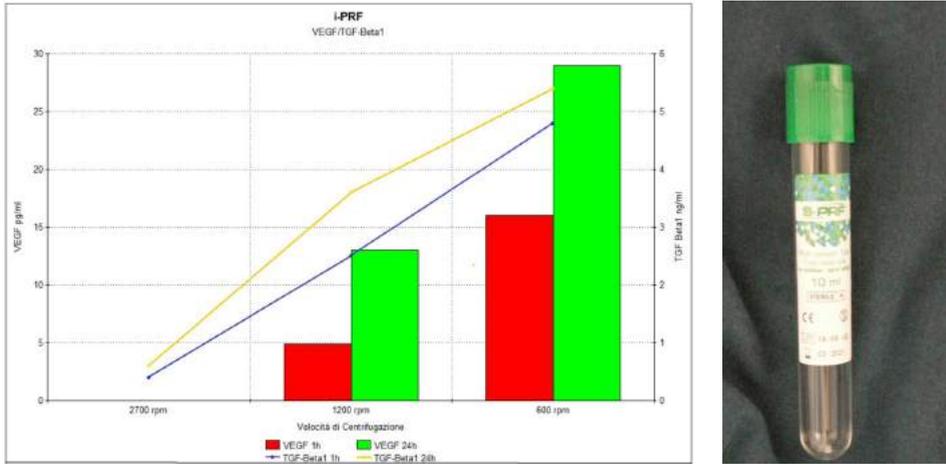
**Figura 5.** **A** Number of leukocytes within the different experimental PRF-based matrices (i-PRF). **B** Number of platelets within the different experimental PRF-based matrices (i-PRF) (Choukroun and Ghanaati, 2017).

Utilizzando specifici protocolli sperimentali di centrifugazione, che erano modifiche sistematiche del descritto primo PRF, Choukroun e Ghanaati (2017) hanno generato matrici a base di PRF fluida (i-PRF) con diverse porzioni di piastrine e leucociti. Inoltre è stata dimostrata, anche in questo caso, una relazione tra la riduzione del RCF e il rilascio dei fattori di crescita. I dati attuali forniscono nuove informazioni sul potenziale del processo di centrifugazione nel generare diversi quantità totali di cellule e diversi livelli di rilascio di fattori di crescita all'interno dello stesso volume di sangue, solo in relazione all'ammontare dell'esposizione a specifici RCF. Tre protocolli sperimentali sono stati stabiliti con un tempo di centrifugazione costante (8 min) per concentrarsi sull'impatto della RCF su varie gamme, tra cui alta, media o bassa nell'ambito della produzione di un i-PRF (PRF iniettabile) (figure 5,6). L'adattamento dello spettro di RCF (710-44 g) in base al primo protocollo PRF descritto [7], Choukroun e Ghanaati hanno eseguito una riduzio-

ne sistematica dell'RCF con una riduzione di quattro volte dell'RCF per ogni protocollo (I-III) come conseguenza del dimezzamento graduale dei giri/min. La conta cellulare automatizzata mediante citometria a flusso è stata eseguita nello studio di Choukroun e Ghanaati, per determinare il numero totale di leucociti e di piastrine. I risultati hanno mostrato che la RCF in diminuzione fino al 16 volte meno rispetto al primo PRF descritto, ha portato ad un significativo aumento del numero di leucociti e piastrine all'interno del numero di giri utilizzato per generare Matrici PRF. Il primo protocollo-I (710 g, 2400 rpm) ha mostrato il più basso numero rilevabile di leucociti e piastrine nei campioni testati (figura 4). È interessante notare che la riduzione della RCF nel protocollo-II (177 g, 1200 rpm) ha portato ad un risultato significativamente più alto del numero di leucociti e piastrine rispetto al protocollo con 710 g. Inoltre, la seconda fase di riduzione del RCF verso il protocollo-III (44 g, 600 rpm) ha rivelato un ulteriore significativo aumento del numero totale dei leucociti e delle piastrine, con il più alto valore rispetto a tutti gli altri gruppi. Questi dati sottolineano che le riduzioni della RCF contribuiscono ad un chiaro e significativo aumento del numero di leucociti e delle piastrine nelle gamme di RCF inferiori (177-44 g) (figura 5).

I risultati di Choukroun e Ghanaati sulla i-PRF suggeriscono che la massa, la dimensione e la gamma di densità dei leucociti e di piastrine richiedono un basso RCF, che è sufficiente per separarli dal resto dei componenti del sangue, pur non causando aggregazione sul fondo della provetta utilizzata (figura 6).

I leucociti sono anche noti per essere coinvolti nella comunicazione tra i precursori di cellule mesenchimali per quanto riguarda la formazione delle ossa [13-20]. Di conseguenza, senza leucociti, una sofisticata comunicazione cellula-cellula per la rigenerazione dei tessuti non è possibile. Inoltre, le piastrine sono note per ospitare potenti fattori di crescita tra i quali i fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF) per la rigenerazione di tessuti come il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il fattore di crescita trasformante-beta (TGF- $\beta$ ) [21, 24], che può essere rilasciato solo dopo un'aggregazione piastrinica. Inoltre, le piastrine non sono gli unici attori nella rigenerazione tissutale, ma richiedono la presenza di leucociti per una migliore performance nelle loro capacità verso la rigenerazione tissutale. La riduzione della RCF applicata si traduce, quindi, in una chiara maggiore tendenza alla concentrazione dei fattori di crescita (figura 6). Così, i fattori di crescita determinati quali VEGF e TGF- $\beta$ 1 sono stati più bassi nel protocollo a 710 g, che è stato preparato all'interno dell'alta gamma di RCF. Tuttavia, la riduzione di RCF verso la gamma media di RCF ha portato ad un significativo aumen-



**Figura 6.** VEGF and TGF- $\beta$ 1 concentration within the different experimental PRF-based matrices (i-PRF) 1 h after clotting and concentration within the different experimental PRF-based matrices 24 h after clotting (Choukroun and Ghanaati, 2017). A destra Provetta per la produzione di i-PRF.

to delle concentrazioni di VEGF e TGF- $\beta$ 1 nel protocollo a 177 g. Un'ulteriore riduzione di RCF ha mostrato al più alto livello di VEGF e TGF- $\beta$ 1 nel protocollo a 44 g all'interno dello spettro inferiore di RCF. Questa osservazione è stata evidenziata sia a 1 che a 24 ore (figura 6). Questi risultati sono in correlazione con i risultati ottenuti aumentando il numero di piastrine e leucociti. In questo contesto, l'aumento della concentrazione del fattore di crescita all'interno degli intervalli di RCF medio e basso è probabilmente legato all'aumento del numero di piastrine e leucociti, in quanto queste cellule sono importanti fonti di fattori di crescita. Inoltre, potrebbe essere che applicando un RCF elevato non si ottiene solo un numero inferiore di piastrine e leucociti, ma si influenza anche la capacità di queste cellule di rilasciare i fattori di crescita. Di conseguenza, il miglioramento delle concentrazioni dei fattori di crescita all'interno delle matrici fluide a base di PRF riflette il miglioramento della capacità rigenerativa delle matrici a base di PRF liquido come serbatoio di fattori di crescita autologhi. Il VEGF è una delle molecole di segnalazione più importanti per la neoangiogenesi, che è altamente richiesta durante la guarigione delle ferite [25]. Inoltre, TGF- $\beta$ 1 contribuisce alla rigenerazione dei tessuti, al reclutamento di cheratinociti, soprattutto nelle prime fasi della guarigione della ferita.

### 5.3. Conclusioni

Ad oggi non ci sono dati che indichino quanti leucociti o piastrine all'interno delle matrici basate su PRF sono sufficienti per avere la migliore condizione fisiologica possibile secondo cui può essere generata una condizione ottimale per la guarigione della ferita o una base per il successo della rigenerazione dei tessuti molli e delle ossa. I risultati degli studi di El Bagdadi *et al.* e di Choukroun e Ghaanati, evidenziano tuttavia, che la riduzione della RCF potrebbe essere un'applicazione clinica per adattare la quantità di leucociti all'interno dei concentrati ematici derivati dalla PRF in base all'indicazione del fabbisogno. Sulla base dei dati attuali, alla base della riduzione di RCF in matrici PRF arricchite di leucociti e piastrine e il rilascio di fattori di crescita potenziati, è stato ipotizzato il cosiddetto LSCC, che può essere utilizzato per generare anche matrici fluide di PRF, arricchite con cellule e plasma-proteine del sangue periferico come fonte autologa per una rigenerazione tissutale intelligente nell'ingegneria dei tessuti complessi. In un ambiente clinico, c'è la necessità di aumentare la rigenerazione potenziale di materiali sostitutivi dell'osso o di biomembrane. Questo potrebbe essere ottenuto con l'aggiunta di tessuto autologo ai sistemi liquidi per l'ingegneria. Di conseguenza, la plastica presente nelle provette (i-PRF tubes) e la riduzione di RCF è consentita per la generazione di una matrice a base di PRF liquido iniettabile (i-PRF) senza l'uso di anticoagulanti. Questo i-PRF, preparato secondo la LSCC, è altamente arricchito con piastrine, leucociti e fattori di crescita, e potrebbero fornire un beneficio significativo nel processo di rigenerazione. Recentemente, è stato dimostrato che, l'aggiunta di soli monociti isolati dal sangue periferico, contribuisce ad aumentare la vascolarizzazione in vivo dell'osso sintetico in materiali sostitutivi [26]. Di conseguenza, guardando al PRF come un complesso sistema "fisiologico", che può essere generato con una centrifugazione a un tempo, si presume che questo sistema può essere arricchito di monociti e di tutte le altre sostanze e di cellule. Questo sistema potrebbe quindi essere in grado di contribuire ad una migliore condizione di guarigione della ferita con una maggiore vascolarizzazione, pur rimanendo all'interno della nicchia specifica per la cellula. Questi dati sottolineano che le matrici basate su PRF fluide, ottenute con RCF ridotto, possono essere utilizzate per rendere funzionali i biomateriali mediante una fonte autologa, cioè i concentrati di sangue periferico per promuovere la rigenerazione dei tessuti. I lavori ex vivo di El Bagdadi (2017) hanno dimostrato che controllare l'RCF all'interno di matrici solide basate su PRF (A-PRF+) fa aumentare la distribuzione cellulare e aumenta il numero di granulociti neutrofili, come sottogruppo di leucociti all'in-

terno del coagulo di PRF avanzata [11]. Tuttavia, sono necessari studi ulteriori per mostrare il ruolo della riduzione della RCF sul numero di cellule e sul rilascio dei fattori di crescita in matrici PRF solide. La composizione del sangue è specifica e individuale secondo un particolare donatore. Tuttavia, i valori legati al donatore all'interno delle diverse matrici basate su PRF sono approssimativamente simili in tutti i gruppi per quanto riguarda la distribuzione di piastrine e leucociti. Questi risultati indicano che prima di tutto le matrici basate su PRF sono sistemi riproducibili e applicabili individualmente indipendentemente dalle caratteristiche del donatore. In secondo luogo, i risultati stabiliscono anche la riproducibilità dell'LSCC in vari tipi di campioni di sangue quando si confrontano i diversi donatori. I dati dimostrano che è possibile applicare il LSCC per l'arricchimento dei concentrati di sangue con piastrine, leucociti e fattori di crescita. La combinazione di leucociti e piastrine gioca un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti. Così, la capacità di controllare il contenuto di cellule all'interno del fluido derivato dal sangue a base di matrici PRF, cambiando solo le impostazioni di centrifugazione, come ad esempio il numero di giri, vale a dire, cambiando l'esposizione ad una specifica RCF, potrebbe servire come un passo prezioso per avere una medicina diffusa e clinicamente applicabile a livello cellulare di ingegneria dei tessuti. In questo modo, utilizzando l'RCF come strumento per controllare il numero di cellule incluse, potrebbe essere utilizzato per adattare il protocollo di preparazione alle esigenze specifiche di singoli pazienti secondo le indicazioni cliniche.

Sulla base delle ricerche attuali, il LSCC aiuta a mostrare che il numero di diversi componenti del sangue responsabile della rigenerazione dei tessuti, cioè delle piastrine, dei leucociti e dei fattori di crescita, possono essere selettivamente arricchiti dall'applicazione di un sistema clinicamente applicabile attraverso un singolo parametro all'interno del processo di centrifugazione.

Considerando, infatti, la complessità dell'isolamento delle cellule e della loro coltivazione nei laboratori in condizioni sterili, il sistema PRF incarna uno strumento relativamente semplice per influenzare il numero di queste cellule. In questo contesto, ulteriori studi clinici sistematici in vivo che valutano i benefici di questo sistema, cioè, migliorando la capacità di rigenerazione autologa, sono necessari per valutare la correlazione tra l'arricchimento cellulare e il miglioramento del potenziale di rigenerazione dei tessuti e la guarigione delle ferite.

Studi clinici controllati sono essenziali per valutare il potenziale di rigenerazione di A-PRF+ e di i-PRF e a stabilire la misura in cui una distribuzione omogenea di piastrine e un maggiore rilascio dei fattori di crescita in aggiun-

ta alla struttura porosa contribuirà a migliorare la guarigione della ferita. Inoltre, la rigenerazione potenziale delle matrici basate sulle PRF può anche essere correlata all'età del donatore. Pertanto, può essere che, poiché l'età dei donatori aumenta, viene rilasciato meno fattore di crescita e viceversa. Inoltre sono necessari studi che dimostrino in che misura i livelli più elevati o intervalli di RCF inferiori rispetto allo spettro attualmente indagato, può avere su eventuali ulteriori benefici per quanto riguarda le cellule e l'accumulo dei fattori di crescita all'interno delle matrici fluide di PRF. Così, la riduzione del RCF può essere utilizzata come "strumento" per generare matrici fluide a base di PRF arricchite con leucociti e piastrine.

Questo fenomeno è di alto livello scientifico e rilevanza clinica, in quanto i leucociti sono uno dei principali motori della rigenerazione dei tessuti molli e dell'osso contribuendo al rilascio dei fattori angiogenici e linfogenici responsabili per il cross-talk cellulare nel processo di rigenerazione dei tessuti [27].

## Riferimenti bibliografici

- [1] Ghanaati S., Booms P., Orlowska A., Kubesch A., Lorenz J., Rutkowski J., Landes C., Sader R., Kirkpatrick C., Choukroun J., *Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells*, «J Oral Implantol.», 2014;40:679-89.
- [2] Nurden AT., *Platelets, inflammation and tissue regeneration*, «Thromb Haemost», 2011;S13-33.
- [3] Rivera F.J., Kazanis I., Ghevaert C., Aigner L., *Beyond clotting: a role of platelets in CNS repair? Front Cell Neurosci*, 2015;9:511.
- [4] Schär M.O., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein M., Nesic D., *Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro*, «Clin Orthop Relat Res.», 2015;473:1635-43.
- [5] Jenne C.N., Urrutia R., Kubes P., *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*, «Int J Lab Hematol», 2013;35:254-61.
- [6] Choukroun J., Ghanaati S., *Reduction of relative centrifugation force within injectable PRF-(Platelet-Rich-Fibrin) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: First introduction of the low speed centrifugation concept (LSCC)*, «Eur J Trauma Emerg Surg», 2017.
- [7] Crisci, A., Lombardi D., Serra E., Lombardi G., Cardillo F., Crisci M., *Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®*, «J. Unexplor. Med.», 2017, 2, 77-87.

- [8] El Bagdadi K., Kubesch A., Yu X., Al-Maawi S., Orłowska A., Dias A. *et al.*, *Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept)*, «Eur J Trauma Emerg Surg.», 2017 Mar.
- [9] Tsujita T., Masuki H., Nakamura M., Isobe K., Kawabata H., Aizawa H., Watanabe T., Kitamura Y., Okudera H., Okuda K., Nakata K., Kawase T., *Striking Differences in Platelet Distribution between Advanced-Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factors: Effects of Silica-Containing Plastic Tubes*, «J. Funct. Biomater.», 2019, 10, 43.
- [10] Ozaki H., Hayashi H., Vinos S.A., Moromizato Y., Campochiaro P.A., Oshima K., *Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates*, «Exp Eye Res.» 1997;64:505-17.
- [11] Lichtman M.K., Otero-Vinas M., Falanga V., *Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isoforms in wound healing and fibrosis*, «Wound Repair Regen.», 2016;24:215-22.
- [12] Alexander P.B., Yuan L., Yang P., Sun T., Chen R., Xiang H., Chen J., Wu H., Radloff D.R., Wang X.F., *EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence*, «Cell Res.», 2015;25:135-8.
- [13] Arda-Pirincci P., Bolkent S., *The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats*, «Acta Histochem.», 2014;116:167-75.
- [14] Johnson N.R., Wang Y., *Coacervate delivery of HB-EGF accelerates healing of type 2 diabetic wounds*, «Wound Repair Regen.» 2015;23:591-600.
- [15] Heuch L., Streak Gomersall J., *Effectiveness of offloading methods in preventing primary diabetic foot ulcers in adults with diabetes: a systematic review*, «JBI Database Syst Rev Implement Reports», 2016;14:236-65.
- [16] Walsh T.G., Metharom P., Berndt M.C., *The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis*, «Platelets», 2015;26:199-211.
- [17] Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M., *Perspective article. Growth factors and cytokines in wound healing*, «Wound Repair Regen.», 2008;16:585-601.
- [18] Gurtner G., Werner S., Barrandon Y., Longaker M., *Wound repair and regeneration*, «Nature», 2008;453:314-21.
- [19] Martino M.M., Briquez P.S., Ranga A., Lutolf M.P., Hubbell J.A., *Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix*, «Proc Natl Acad Sci USA», 2013;110:4563-8.

- [20] Seeger M.A., Paller A.S., *The roles of growth factors in keratinocyte migration*, «Adv Wound Care», 2015;4:213-24.
- [21] Pence B.D., Woods J.A., *Exercise, obesity, and cutaneous wound healing: evidence from rodent and human studies*, «Adv Wound Care», 2014;3:71-9.
- [22] Johnson N.R., Wang Y., *Coacervate delivery of HB-EGF accelerates healing of type 2 diabetic wounds*, «Wound Repair Regen.», 2015;23:591-600.
- [23] Walsh T.G., Metharom P., Berndt M.C., *The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis*, «Platelets.» 2015;26:199-211.
- [24] Kolaczowska E., Kubes P., *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*, «Nat Rev Immunol.» 2013;13:159-75.
- [25] Zumstein M.A., Rumian A., Lesbats V., Schaer M., Boileau P., *Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF): a prospective randomized controlled pilot trial*, «J Shoulder Elb Surg.», 2014;23:3-12.
- [26] Kobayashi E., Flückiger L., Fujioka-Kobayashi M., Sawada K., *Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF*, «Clin Oral Investig.» 2016;20(9):2353-60.
- [27] Fujioka-Kobayashi M., Miron R.J., Hernandez M., Kandalam U., Zhang Y., Choukroun J., *Optimized platelet rich fibrin with the low speed concept: growth factor release, biocompatibility and cellular response*, «J Periodontol.», 2017;88(1):112-21.



## CAPITOLO VI

# L'EFFETTO ANTIMICROBICO IN VITRO DEL L-PRF (LEUKOCYTE AND PLATELET-RICH FIBRIN) E DEI SUOI DERIVATI A-PRF (ADVANCED PLATELET-RICH FIBRIN), I-PRF (INJECTABLE PLATELET-RICH FIBRIN)

### 6.1. Introduzione

A differenza delle cellule isolate, la PRF è un sistema complesso che include piastrine umane, leucociti e proteine plasmatiche all'interno di una matrice di fibrina. Questi componenti di cui sopra sono elementi chiave nella guarigione delle ferite e nella rigenerazione dei tessuti.

Le piastrine sono state storicamente sottostimate per il loro contributo antimicrobico a difesa dell'ospite. Quando sono stimolate da microrganismi o agonisti generati nella sede dell'infezione, le piastrine rilasciano una serie di peptidi antimicrobici potenti. Sulla base di queste osservazioni, le piastrine sono attualmente ritenute contribuire significativamente alla difesa antimicrobica dell'ospite.

Studi di Blair e Flaumenhaft (2009) [1] non più recenti hanno indicato che le piastrine sono prodotte *in vivo* tramite la formazione di pro-piastrine e che gli  $\alpha$ -granuli vengono trasportati da megacariociti su fasci di microtubuli. Gli organuli si muovono ad una velocità di 0,1-2  $\mu$ /min in quella che sembra essere una direzione casuale.

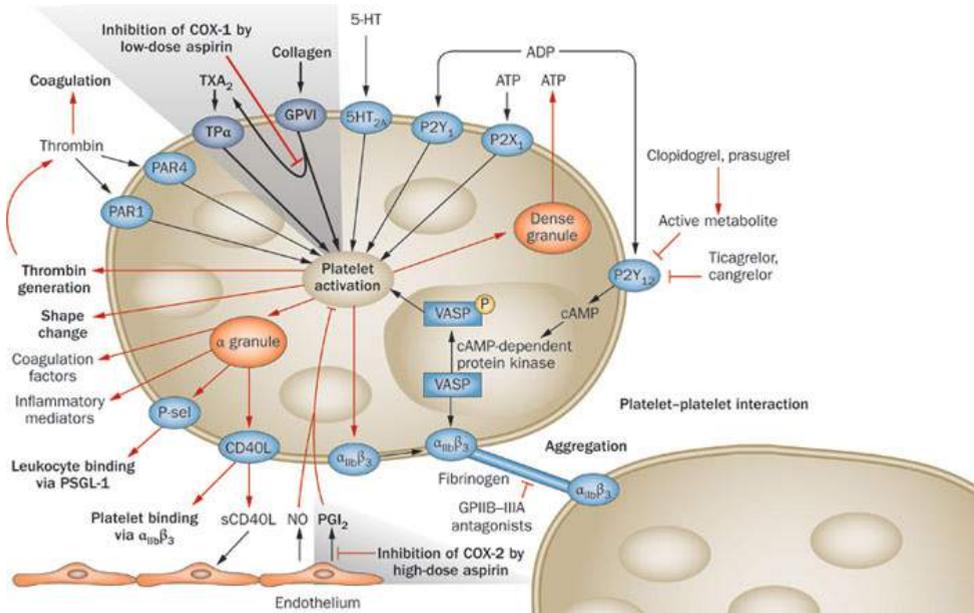
Gli  $\alpha$ -granuli contengono anche un arsenale di proteine microbicide trovate nelle piastrine di mammifero. Anche se le piastrine hanno indiscutibili proprietà antimicrobiche [2], a causa di agenti patogeni virulenti come lo *Staphylococcus aureus*, generalmente si verifica: (1) l'adesione dei patogeni ematogeni alle superfici endoteliali normali; (2) espressione di agonisti e/o ligandi che promuovono la deposizione di piastrine e la formazione della ma-

trice piastrine-fibrina; e (3) l'ulteriore deposizione di piastrine circolanti in risposta ad agonisti (ad esempio,  $\text{TXA}_2$ , ADP e PAF [platelet activating factor]), o ligandi (ad esempio, GPIIb-IIIa) associata con l'attivazione piastrinica (figura 1).

Come fagociti professionali, il citoplasma delle piastrine è prevalentemente composto da granuli che contengono molecole bioattive. Le Piastrine e i fagociti effettori del sistema immunitario, come i neutrofili e i monociti condividono anche antigeni di superficie comuni. Questi includono P-selectina (GMP-140), il recettore Fc $\gamma$ RII 40 kD, il recettore per le IgE, la Fc $\epsilon$ , la proteina C-reattiva, e il recettore per la trombospondina CD36 (piastrinico GP-IV). Le piastrine sono anche note per esprimere il recettore CR3 del complemento e rispondere a citochine quali TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 in modo simile ai leucociti. Questi rapporti suggeriscono che le piastrine possiedono caratteristiche strutturali e funzionali che facilitano il loro ruolo nella difesa antimicrobica dell'ospite. Possono interiorizzare i microrganismi in vacuoli simili ai fagosomi e sono in grado di generare molecole ossidanti e radicali liberi come anione superossido, perossido di idrogeno, radicali idrossilici, ossigeno singoletto e lipoperossidi producendo quindi metaboliti dell'ossigeno citotossici.

Le piastrine interagiscono con i batteri direttamente e attraverso una varietà di mediatori ligandi. Il fatto che le piastrine di mammifero interagiscono direttamente o indirettamente con i batteri patogeni è stato ben definito sia in vitro che in vivo. La sequenza di eventi nell'interazione piastrine-batteri procede attraverso quattro fasi distinte: il contatto, il cambiamento di forma, l'aggregazione precoce e l'aggregazione irreversibile. Nel corso di questo processo, le piastrine che interagiscono fisicamente con cellule batteriche che cambiano da cellule discoidali lisce in cellule ameboidi con presenza di pseudopodi pleiomorfici (figura 2). Questo cambiamento di forma generalmente corrisponde con l'inizio dell'aggregazione piastrinica. La stimolazione batterica comporta anche cambiamenti all'interno delle piastrine. Ad esempio, in coincidenza con il cambiamento della forma, microtubuli legati a batteri si organizzano e migrano verso l'interno dal perimetro delle piastrine. Questa migrazione comporta la centralizzazione e la conseguente secrezione di granuli piastrinici. La differenza principale tra i batteri e la loro interazione con le piastrine risiede nella grandezza globale della stimolazione e nel tempo dal contatto attraverso le fasi di aggregazione irreversibili. Per esempio, *S. Aureus* e *S. Pyogenes* hanno dimostrato di essere quasi equivalenti nella loro induzione rapida e completa dell'aggregazione piastrinica, mentre *E. Coli* ed *E. Faecalis* causano aggregati piastrinici molto meno rapidamente e vigorosamente.

Diverse specie e ceppi batterici hanno differenti meccanismi con cui interagiscono con le piastrine. Insieme con la loro capacità di legarsi direttamente alle piastrine, Stafilococchi e Streptococchi sembrano affidarsi a cofattori plasmatici per facilitare la loro interazione con esse.



**Figura 1.** Effetti svolti dalle piastrine attivate.

Le ferite sono normalmente contaminate da una grande varietà di microrganismi, ma solo quando compaiono i segni clinici evidenti che suggeriscono la presenza di un'infezione vengono effettuate ulteriori indagini, con il fine di poter scegliere la terapia più adeguata per evitare serie complicazioni.

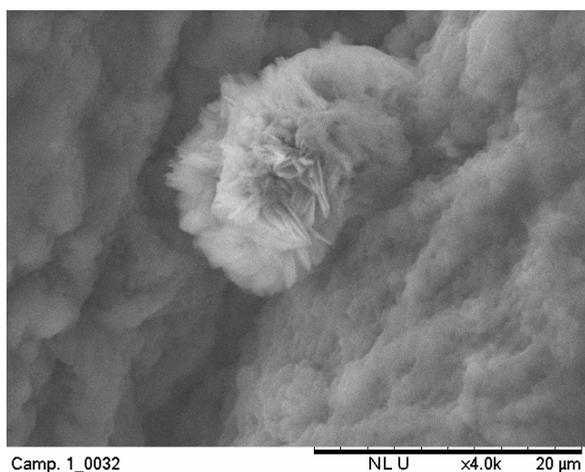
Mentre la contaminazione e la colonizzazione sono stati "normali", non associati a problemi di salute, la colonizzazione critica e le infezioni, al contrario, sono entrambi stati "anormali", che possono risultare in un ampio spettro di malattie con segni clinici e sintomi particolari. Si può quindi affermare che la "colonizzazione critica" è la condizione in cui nella lesione vi è deposizione e moltiplicazione di organismi nei tessuti con "host reaction" associata, ma limitata alla lesione. La colonizzazione critica si riferisce a livelli batterici tali che in associazione con la produzione di tossine (endotossine), citochine e proteasi, sono in grado di interferire con la guarigione dell'ulcera. I primi sintomi che possono farci pensare alla colonizzazione critica sono: presenza di

edema o infiammazione; arresto del processo di guarigione della lesione; comparsa di biofilm [3].

La L-PRF risulta efficace sia per il trattamento che per la prevenzione, nei confronti delle infezioni da MRSA (*Stafilococco Aureo* meticillino-resistente)[4].

Nella letteratura esistente, solo pochi rapporti hanno discusso gli effetti antibatterici della PRF, soprattutto se rispetto al numero di studi che indagano il suo potenziale rigenerativo [5]. Perciò, le proprietà antibatteriche del PRF sono relativamente sconosciute.

Gli effetti antibatterici dei concentrati piastrinici sono stati evidenziati quindi in pochi studi in vitro. Una forte attività paragonabile a gentamicina e oxacillina per L-PRP contro *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili (MSSA) è stata già dimostrata, la L-PRP ha anche inibito la crescita di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) ed *Escherichia coli* [6].



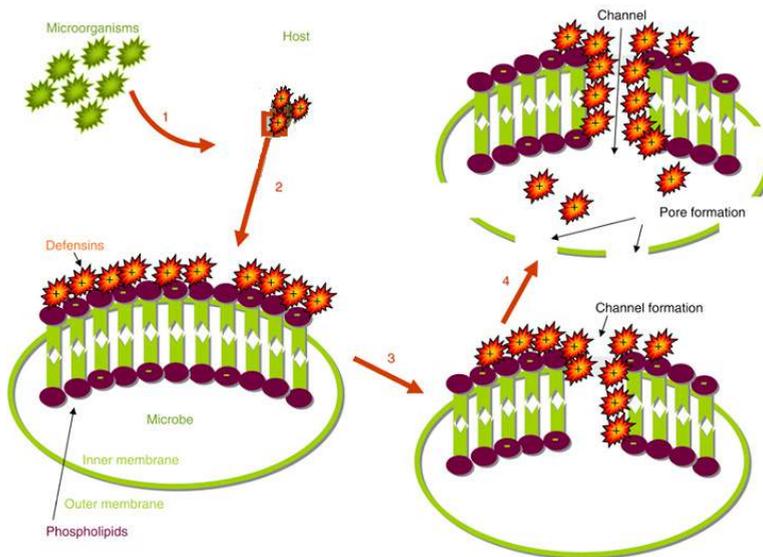
**Figura 2.** Microfoto al S.E.M. Hitachi Tabletop Microscope TM3000 di L-PRF: piastrina attivata (ingr. 4000x).

A differenza degli antibiotici, che sono specificatamente connessi agli elementi particolari delle cellule batteriche, i peptidi antibatterici agiscono in modo distruttivo contro le membrane cellulari dei batteri, dove entrano direttamente, e riducono il rischio di sviluppo della resistenza batterica (Modello Shia-Matsuzaki-Huang, figura 3).

Conosciamo 7 proteine umane antimicrobiche delle piastrine (HPAPs): fibrinopeptide A e B, timosina  $\beta_4$ , proteina basica piastrinica, proteine attivatrici il tessuto connettivo 3, RANTES (regolamentato su Attivazione Normale T cellulare espressa e secreta) e fattore piastrinico 4, che hanno proprietà antibatteriche agendo contro *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili (MSSA) e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA), *Escherichia coli*. Essi costituiscono la prima linea di difesa antibatterica.

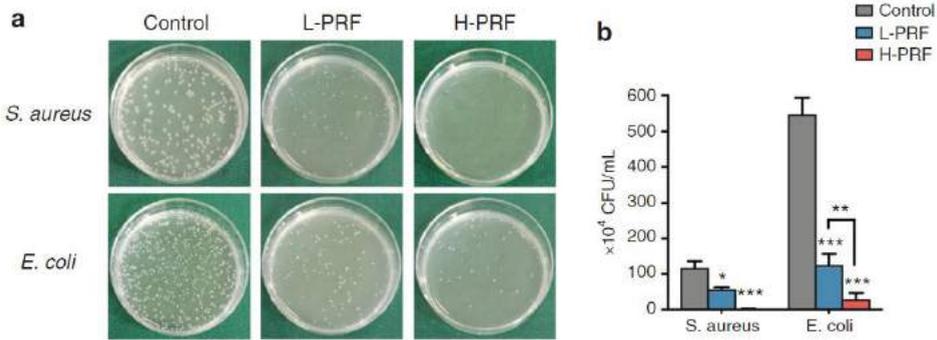
La centrifugazione orizzontale con la produzione di H-PRF porta secondo Feng *et al.* [6] ad un quadruplo aumento del numero di cellule immunitarie (leucociti) rispetto a quelle raggiunte con una centrifugazione ad angolo fisso.

Le misurazioni delle unità formanti colonie (CFU) hanno indicato che entrambi i coaguli PRF (L-PRF e H-PRF) hanno effetti antibatterici contro *S. aureus* e *E. Coli* (figura 4a, b). Rispetto a L-PRF, H-PRF ha mostrato un significativo e pronunciato aumento dell'attività sia contro *S. Aureus* che *E. Coli*.

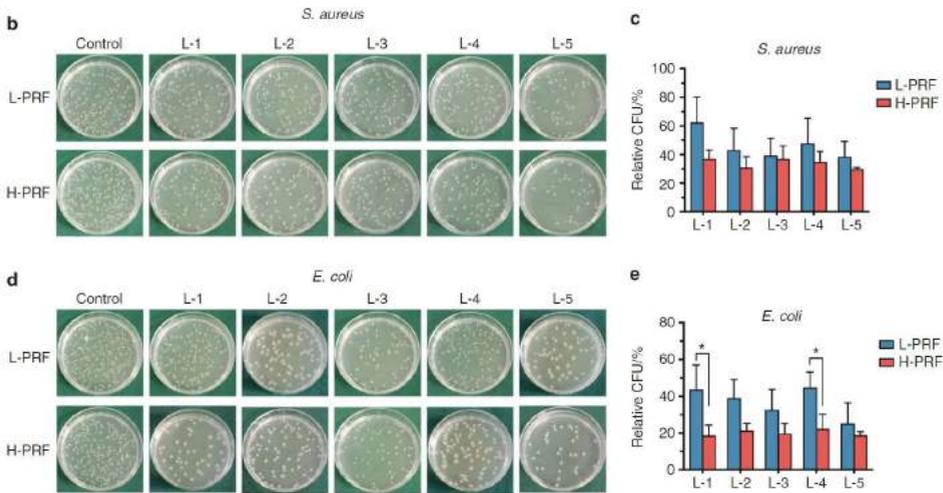


**Figura 3.** Modello Shia-Matsuzaki-Huang. Il modello mostra il consenso generale per la modalità d'azione antimicrobica delle HDP (sono state pubblicate anche altre possibili teorie per la distruzione della membrana da parte delle AMP). 1: L'ospite è inizialmente esposto ai microorganismi. 2: La risposta immunitaria innata comporta il reclutamento di HDP cationiche, che sono immediatamente attratte verso la membrana microbica anionica. 3: Le HDP formano una struttura a tappeto sulla membrana microbica, istituendo dei canali. 4: I canali portano alla destabilizzazione della membrana con formazione di pori e alla morte del microbo. HDP, peptidi di difesa dell'ospite.

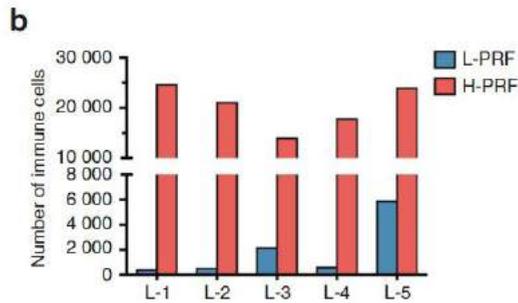
Feng *et al.* hanno diviso, inoltre, il PRF in forma liquida (*i*-PRF) in cinque porzioni uguali dopo la centrifugazione per verificare se le proprietà antibatteriche erano diverse in ogni strato (figura 5a). Ogni strato di PRF mostra una certa attività antibatterica contro *S. Aureus* e *E. Coli* e gli effetti antimicrobici dei cinque strati di ogni PRF variano significativamente. I risultati CFU hanno mostrato che la conta batterica dello strato cinque in L-PRF era la più bassa tra tutti quelli analizzati (figura 5b-e), dimostrando la maggiore attività antimicrobica.



**Figura 4.** Proprietà antibatteriche della fibrina ricca di leucociti e piastrine (L-PRF) e H-PRF. a, b Foto e analisi quantitativa di *S. aureus* e colonie batteriche di *E. Coli* incubate con coaguli L-PRF o H-PRF per 4 ore. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, e \*\*\*P < 0,001.



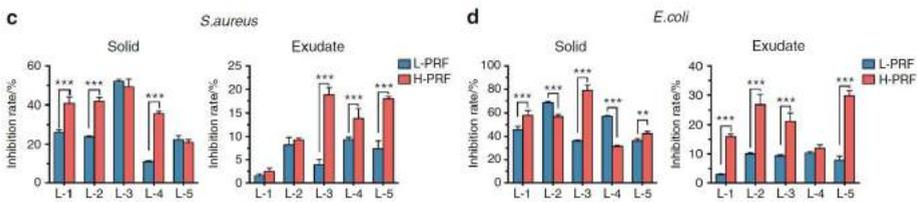
**Figura 5. b, c** Foto e analisi quantitativa della colonia batterica di *S. aureus* incubata con ogni strato L-PRF o H-PRF per 4 ore. **d, e** Foto e analisi quantitativa di colonia batterica di *E. Coli* incubata con ogni strato L-PRF o H-PRF per 4 ore. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, e \*\*\*P < 0,001.



**Figura 6.** Analisi quantitativa del numero totale di cellule immunitarie in ogni strato L-PRF e H-PRF.

In generale, il numero totale di cellule immunitarie in H-PRF risulta dieci volte superiore a quello in L-PRF (102,076 vs 9778), in particolare negli strati superiori (figura 6). Per L-PRF, la maggior parte delle cellule immunitarie si trova solo all'interno del quinto strato più vicino al buffy coat, mentre nel gruppo H-PRF, il numero di cellule immunitarie è aumentato in tutti gli strati ma anche distribuito più uniformemente negli strati superiori (figura 6).

La componente solida e l'essudato di L-PRF e H-PRF hanno diverse proprietà antibatteriche (figura 7 c-d). Gli effetti antibatterici dei componenti solidi e componenti dell'essudato contro *E. Coli* sono migliori di quelli contro *S. aureus*. Inoltre, i tassi di inibizione relativi di H-PRF sono significativamente migliori di quelli di L-PRF, in particolare per *E. Coli* (figura 7 c, d).



**Figura 7. c-d** Analisi quantitativa delle zone di inibizione di ogni strato L-PRF e H-PRF contro *S. aureus* e *E. Coli* dopo l'incubazione per 24 ore. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, e \*\*\*P < 0,001

Feng *et al.* [6] hanno usato il classico ring-test di inibizione e il plate-counting per verificare l'effetto antibatterico. I risultati hanno indicato che L-PRF e H-PRF hanno esercitato alcuni effetti antibatterici contro *S. aureus* ed *E. Coli*. Tuttavia, rispetto a L-PRF, H-PRF ha mostrato una capacità significativamente migliore di proteggere contro *E. Coli*.

I ricercatori hanno riferito che le proprietà antibatteriche di PRF possono essere divise in due parti: (1) il rilascio di peptidi antimicrobici intrappolati inizialmente nella matrice di fibrina insieme al PRF degradato e (2) i fattori antimicrobici prodotti costantemente dalle cellule all'interno della matrice di fibrina [7].

Anche se il numero di cellule immunitarie in L-1 e L-5 da H-PRF erano quasi lo stesso, l'effetto antibatterico di L-5 era aumentato, in particolare nell'essudato (figura 7).

Il quinto strato di H-PRF conteneva più cellule T rispetto al primo strato. I linfociti T sono direttamente coinvolti nell'eliminazione di patogeni microbici rilasciando granuli citotossici e molecole batteriostatiche o molecole litiche. Inoltre, le cellule T possono regolare altre cellule immunitarie, tra cui cellule dendritiche, macrofagi, cellule B e altri sottotipi di cellule T. È stato attribuito il miglioramento della capacità antibatterica di L-5 ai buoni effetti di regolazione delle cellule T su altre cellule immunitarie presenti nello strato più vicino al buffy coat in H-PRF. Inoltre, sia il componente solido della membrana che l'essudato della H-PRF sono antibatterici, il che indica che non solo i componenti cellulari della H-PRF ma anche le secrezioni di citochine e/o proteine del complemento avevano forti proprietà antimicrobiche. Anche se Feng *et al.* [6] hanno scoperto che l'effetto antibatterico di PRF è legato al numero di cellule immunitarie, i meccanismi esatti non sono stati chiariti, e ulteriori esperimenti devono essere condotti in futuro.

## 6.2. Presupposti clinici

Le ferite sono normalmente contaminate da una grande varietà di microrganismi, ma solo quando compaiono dei segni clinici evidenti che suggeriscono la presenza di un'infezione vengono effettuate ulteriori indagini, con il fine di poter scegliere la terapia più adeguata per evitare serie complicazioni. Attualmente, il trattamento antimicrobico di supporto alla medicazione nella cura delle lesioni cutanee croniche risulta essere un problema molto importante.

Mentre la contaminazione e la colonizzazione sono stati "normali", non associati a problemi di salute, la colonizzazione critica e le infezioni, al contrario, sono entrambi stati "anormali", che possono risultare in un ampio spettro di malattie con segni clinici e sintomi particolari. Si può quindi affermare che la "colonizzazione critica" è la condizione in cui nella lesione vi è deposizione e moltiplicazione di organismi nei tessuti con "host reaction" associata, ma li-

mitata alla lesione. La colonizzazione critica si riferisce a livelli batterici tali che in associazione con la produzione di tossine (endotossine), citochine e proteasi, sono in grado di interferire con la guarigione dell'ulcera. I primi sintomi che possono farci pensare alla colonizzazione critica sono: presenza di edema o infiammazione; arresto del processo di guarigione della lesione; comparsa di biofilm. In ognuno di questi stati "anormali" il trattamento di elezione è rappresentato (oltre al debridement) dall'impiego di prodotti antibatterici ad ampio spettro associati a medicazioni per il corretto controllo della carica microbica. La L-PRF risulta efficace sia per il trattamento che per la prevenzione, nei confronti delle infezioni da MRSA (*Stafilococco Aureo* meticillino-resistente)[3].

L'ulcera, quando cronicizza, costituisce per il medico una sfida aperta alla guarigione, spesso attesa anche da decenni; il tessuto perilesionale diventa distrofico e l'irrorazione insufficiente; il letto della ferita è pieno di materiale fibrinoso tenacemente adeso che funge da pabulum per i batteri i quali diventano sempre più resistenti. Qualsiasi genere di ferita rappresenta una perdita della normale barriera cutanea e quindi potenzialmente suscettibile a colonizzazione ed infezione da parte di tutta una moltitudine di microrganismi con cui la superficie corporea normalmente convive. È anche una via di facile accesso per eventuali organismi patogeni. Inoltre la presenza di materiale necrotico, rappresentato da tessuti (epidermide, derma, sottocute) devitalizzati, che funge da pabulum per la replicazione batterica, e l'alterata irrorazione della lesione, sono ulteriori fattori che favoriscono l'instaurarsi di infezioni perciò ogni ferita può essere considerata a priori potenzialmente infetta [8](tabella 1 A).

**Tabella 1.** A. Batteri più frequentemente isolati dalle ulcere cutanee; B. Antibiotici utili nelle lesioni (testati); C. Effetti dell'antibioticoterapia topica.

A) Batteri più frequentemente da noi isolati dalle ulcere cutanee:		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Proteus Mirabilis</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Candida Albicans</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
B) Antibiotici utili nelle lesioni (testati: mg)		
Augmentin 30	Tobramicina 10	Rifampicina 30
Imipenem 10	Azitromicina 15	Ceftriaxone
Cloramfenicolo 30	Aztreonam 15	Cotrimossazolo 30
Imipenem 10	Pefloxacina	Mupirocina 5
Metronidazolo 5	Dexiciclina	Teicoplanina
Amikacina	Gentamicina 10	Ofloxacina 5

Ciprofloxacina 5	Doxicillina 30	Tigecillina 15
C) Effetti dell'antibioticoterapia topica:		
Istolesività	Allergizzazione	Intossicazione
Dispersione nel tessuto di granulazione		Induzione all'antibiotico-resistenza

L'infezione della ferita è stato dimostrato alterare la contrazione della ferita sia nelle ferite acute che croniche. Il meccanismo per cui ciò avviene è ritenuto essere il rilascio di enzimi batterici e di metallo-proteinasi che possono degradare la fibrina e i fattori di crescita della ferita. La matrice di fibrina, soprattutto fibronectina, è necessaria per la migrazione dei fibroblasti, ed è anche necessaria per mantenere l'attività fagocitica dei macrofagi. Questo delicato equilibrio è facilmente sconvolto dalla presenza di batteri e l'infezione della ferita.

La salute non è uno stato privo di germi. Di conseguenza, le ferite croniche non sono quasi mai sterili, e raggiungere la sterilità della ferita è spesso un obiettivo non realistico e non essenziale della cura delle ferite. Più importante della presenza fisica di batteri è il numero degli organismi presenti per grammo di tessuto in una ferita e il tipo di microrganismo identificato. Il numero critico di batteri in grado di causare un'infezione della ferita è stato dimostrato essere di  $10^5$  batteri per grammo di tessuto per la maggior parte di essi. Se sono presenti  $>10^5$  batteri per grammo di tessuto, le possibilità di successo della chiusura della ferita sono basse (dell'ordine del 19%). Se, d'altro canto, sono presenti  $<10^5$  organismi per grammo di tessuto, allora la probabilità di chiusura della ferita è circa del 94%. La pulizia meccanica, sia chirurgica che con medicazioni, dovrebbe essere combinata con la coltura e con la sensibilità diretta di agenti antimicrobici topici (tabella 1 C).

L'analisi della coltura batterica quantitativa deve essere utilizzata per valutare l'efficacia del trattamento in corso. Le ferite croniche contengono abbondante tessuto necrotico, che è dannoso per la guarigione delle ferite in diversi modi. In primo luogo, il tessuto morto fornisce un terreno di coltura per i batteri, aumentando così la probabilità di infezione. I batteri in questo ambiente stimolano ulteriormente l'elevazione prolungata di mediatori pro-infiammatori e citochine. In secondo luogo, il tessuto necrotico in una ferita rilascia endotossine che possono inibire la migrazione dei cheratinociti e dei fibroblasti nella ferita. I detriti non vitali promuovono anche una reazione infiammatoria sostenuta, con la produzione di mediatori pro-infiammatori e proteinasi, che possono distruggere i fattori di crescita endogeni nonché degradare la matrice glicosaminoglicanica necessaria per la guarigione delle ferite. A meno che è presente un

componente invasivo dell'infezione della ferita (come cellulite e crepitio, leucocitosi, febbre, ed elevato senso di pulsazione), gli antibiotici sistemici sono di scarso aiuto nel trattamento di queste ferite (tabella 1 B). Nonostante l'abbondante offerta presente nel sangue del tessuto di granulazione, la somministrazione sistemica di antibiotici non produce livelli notevoli di antibiotico nel tessuto di granulazione della ferita. Ferite ischemiche con poco tessuto di granulazione hanno scarsa penetrazione di antibiotici sistemici. Gli antimicrobici topici a base d'acqua (idrosolubili), invece, forniscono efficacemente alte concentrazioni di farmaco direttamente dove sono più efficaci [8, 9].

### 6.3. Materiali e metodi

L'immunità innata è un parametro centrale da considerare nelle strategie terapeutiche, e questa immunità è strettamente legata alla costante crescente resistenza dei batteri a veri farmaci, in particolare agli antibiotici. Molte indagini recenti mirano a superare la resistenza dei microbi agli antibiotici con l'uso di proteine naturali dell'organismo umano [4]. Il loro vantaggio è innegabile, una citotossicità minore e assenza di resistenza alla loro attività.

L'uso di piastrine, attraverso i concentrati piastrinici di seconda generazione, concentra le tecnologie per la raccolta e l'uso degli agenti antimicrobici naturali dell'organismo.

I materiali utilizzati per la valutazione microbiologica dell'infezione sono stati il raschiamento della base dell'ulcera dopo lo sbrigliamento, l'aspirazione del materiale ascessuale e inviati all'unità di Clinical Patology and Microbiology, Institute for the Study and Treatment of Diabetes "L'Abetaia" Casagiove (CE) Italy, in un mezzo di trasporto speciale "Stewart". Tutti i campioni sono stati esaminati come strisci colorati per Gram e sottoposti a coltura aerobica su agar sangue e piastre di agar McConkey e anaerobicamente su agar sangue e incubate per 24 ore.

Il L-PRF prelevato da Cavalli secondo le tecniche precedentemente descritte [10], è stato preparato in 4 diverse provette in PET senza gel (vacuptaca cd.30023) e 4 con gel (vacuptaca cd.44718), e distinto come segue:

1. L-PRF senza alcuna aggiunta;
2. L-PRF con aggiunta di Ciprofloxacina 2 mg/ml (1ml);
3. L-PRF con aggiunta di Azitromicina 100mg/ml (1ml);
4. L-PRF con aggiunta di Metronidazolo 5mg/ml (1ml);

Il A-PRF prelevato da Cavalli secondo la tecnica descritta in 4 provette di vetro per A-PRF (Advanced PRF) senza anticoagulante né un gel separatore (provette per A-PRF Vacutainer per siero 9,0 ml) (PROCESS<sup>®</sup>, Nice, Francia), [11], e distinto come segue:

1. A-PRF senza alcuna aggiunta;
2. A-PRF con aggiunta di Ciprofloxacina 2 mg/ml (1ml);
3. A-PRF con aggiunta di Azitromicina 100mg/ml (1ml);
4. A-PRF con aggiunta di Metronidazolo 5mg/ml (1ml);

Infine è stato testato il liquido di spremitura di queste membrane A-PRF dopo compressione per 2 minuti con “Wound L-PRF Box”.

I quattro distinti PRF così preparati sono stati testati contro 6 ceppi batterici, i più comunemente responsabili di infezione nelle ulcerazioni. Questi ceppi, infatti, come precedentemente descritto, sono stati isolati da piaghe infette, e precisamente si tratta di:

- Streptococco viridans
- Klebsiella ozenae
- Escherichia coli
- Pseudomonas aeruginosa
- Stafilococco aureo
- Streptococco piogene (tabella 1 A)

Ogni ceppo (precedentemente isolato ed identificato) è stato conservato in frigorifero a +4°C in tamponi con terreno di trasporto Stuart.

Operando sempre sotto Cappa a Flusso Laminare, ogni ceppo batterico, è stato seminato su una piastra di terreno di Muller-Hinton (Liofilchem s.r.l., Italia), che comunemente si usa per eseguire un Antibiogramma, ed i 4 tipi di PRF, dopo essere stati sezionati in frammenti mediante l’uso di bisturi sterili, sono stati adagiati sulla coltura.

Il tutto è stato identificato mediante numeri, come sopra attribuiti, e descritti con permanent marker sul fondo della piastra.

Le piastre così preparate vengono messe in armadio termostatico (Intercontinental) alla Temperatura di 37°C, controllata mediante l’uso di Data Logger, oltre al display lcd.

Dopo 24 ore, si procede a “leggere” le piastre. Il diametro delle zone di inibizione è stato misurato in tre punti, utilizzando una pinza digitale calibrata

in millimetri (mm) e visualizzata su uno sfondo illuminato. Tutte le misurazioni sono state eseguite dal principale investigatore sotto la supervisione del microbiologo. Un valore zero ( $\emptyset$ ) è stato assegnato a dischi che non visualizzavano alcuna zona di inibizione anche in ingrandimento ( $5\times$ ).

Il pH del PRF nel cavallo è stato misurato mediante strisce reattive lette con apparecchiatura U 120 Intermedical Diagnostics Na (Italy).

Sono stati effettuati per ogni membrana L-PRF saggi antimicrobici differenziando il tipo di membrana a 0 e a 60 minuti dalla centrifugazione [10], controllando con foto visibili (figura 9) l'alone di inibizione e confrontando con quello prodotto dagli antibiotici specifici attraverso l'antibiogramma.

Per distinguere il tipo di attività rilevata, se batteriostatica o battericida, come già precedentemente descritto, abbiamo proceduto con la semina del materiale prelevato nell'alone, mediante ansa di platino arroventata a fiamma del Becco di Bunsen, su terreno di Muller Hinton, e posto in termostato per 24 ore.

Trascorse le quali si procede a valutare se c'è stata crescita batterica o meno.

Per poter distinguere tra l'una e l'altra azione si procede come segue: si preleva materiale dal terreno, in zona alone di inibizione, mediante ansa di platino sterilizzata alla fiamma del becco di Bunsen, e si semina su altro terreno di Muller-Hinton. Si pone in armadio termostatico a  $37^{\circ}\text{C}$  per altre 24 ore, e si osserva poi se c'è stata crescita batterica. Ove ci fosse tale crescita, si tratterebbe di azione batteriostatica, che quando rimosso l'effetto, permetterebbe la crescita batterica; invece se non si verificasse crescita, si parlerebbe di effetto battericida, in quanto le cellule batteriche sono state uccise.

Ulteriori saggi di A-PRF con e senza aggiunta di Antibiotico, ed una rilevazione del raggio di inibizione misurato, sono riportati nella figura sottostante (figura 10).

In questo caso si è utilizzato sia A-PRF da solo, oppure addizionato con antibiotico, ma anche il liquido di spremitura post-compressione da esso ricavato. In quest'ultimo caso, l'inoculo sul terreno di coltura seminato con il germe, è stato effettuato mediante pipetta automatica MLA da 5 microlitri e relativo puntale.

#### **6.4. Risultati**

I microrganismi isolati sono stati identificati e la suscettibilità antimicrobica in vitro dei batteri isolati è stata determinata dalla diffusione del disco. Inizialmen-

te sono stati utilizzati antibiotici generici ad ampio spettro genitoriali contro organismi gram-positivi, gram-negativi e anaerobi (tabella 1). La modifica ad un antibiotico più specifico quando i risultati iniziali di coltura e sensibilità sono diventati disponibili era obbligatoria. L'infezione è stata considerata adeguatamente controllata quando la cellulite, la linfangite e l'edema si erano risolti e le ferite erano libere da purulenza. Microbiologicamente, le infezioni del piede diabetico sono generalmente polimicrobiche e tra i più frequentemente isolati microrganismi dalle lesioni in questo studio sono stati *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. L'incidenza di *Stafilococco Aureus* nei nostri casi è inferiore a quello riportato da altri [12]. Questa differenza può essere spiegata dalla differenza di gravità delle infezioni tra gli studi, poiché la maggior parte delle infezioni lievi sono causate da cocchi aerobici gram-positivi come *Staph. aureus* e *Streptococchi* mentre le infezioni più profonde, minacciose per gli arti sono polimicrobiche e causate da cocchi gram-positivi, bacilli gram-negativi (es. specie *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Proteus*) e anaerobi (ad es. specie *Bacteroides*) come si trova nel nostro studio (tabella 1).

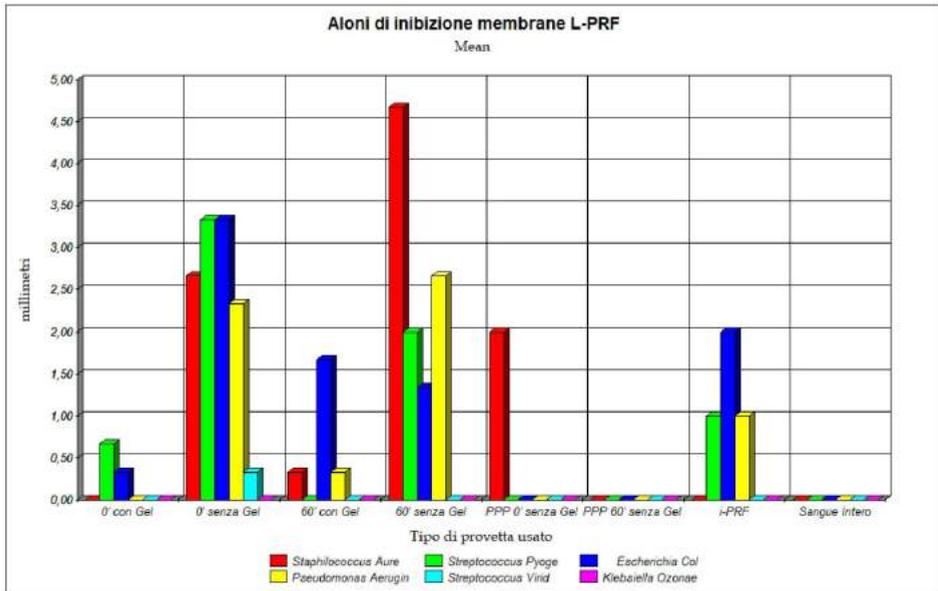
Nelle membrane L-PRF di cavallo abbiamo rilevato un pH di 8.

L'azione antimicrobica del L-PRF si evidenzia in vitro solo al  $\frac{1}{3}$  di membrana più vicino al coagulo rosso (non vi è azione antimicrobica nel surnatante prelevato dopo centrifugazione [PPP] e neanche per la membrana di L-PRF dopo congelamento) e ciò è in relazione alla presenza sia di piastrine che di leucociti (neutrofili?). Feng *et al.* nello studio riportato [6] affermano di avere riscontrato attività antimicrobica anche nell'essudato post-centrifugazione.

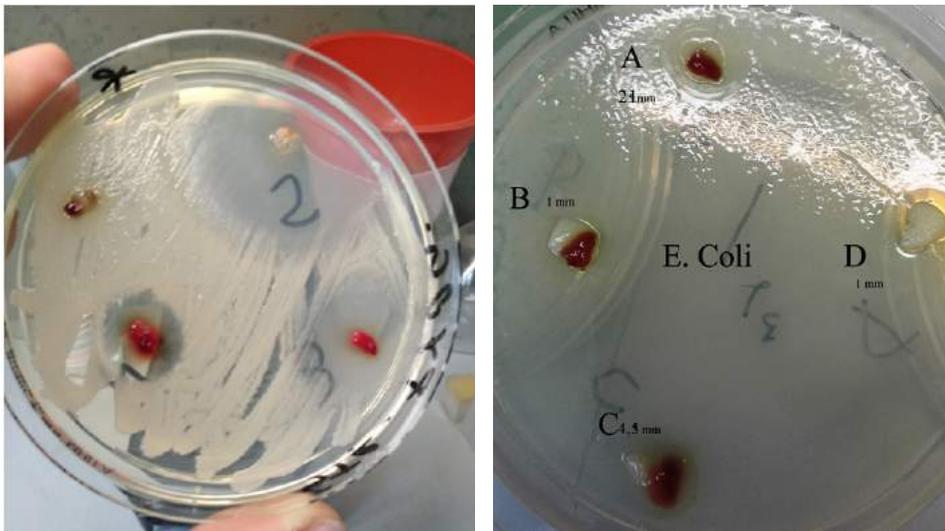
I dati rilevati dalle misurazioni degli aloni di inibizione sono riportati nelle seguenti figure.

La figura 8 dimostra che il L-PRF, ottenuto da provette con gel sia a 0' che a 60' dalla centrifugazione, non dimostra che uno scarso o nullo effetto antibatterico, così come il sangue intero e il Plasma Povero di Piastrine. Il L-PRF, ottenuto, invece, con provette senza gel a 0' e a 60', dimostra invece un notevole effetto antimicrobico specie verso lo *Stafilococco Aureus*, lo *Streptococco Pyogenes*, *Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa* (figura 9A-B, tabella 4).

La figura 9 dimostra l'attività antibatterica sviluppata nei confronti di *Streptococcus Pyogenes* ed *Escherichia Coli* esaminando le zone chiare degli anelli di inibizione intorno alle membrane di A-PRF.



**Figura 8.** Aloni di inibizione delle membrane L-PRF con e senza gel a 0' e a 60' dalla centrifugazione, del Plasma Povero di Piastrine, dell'i-PRF e del Sangue Intero.



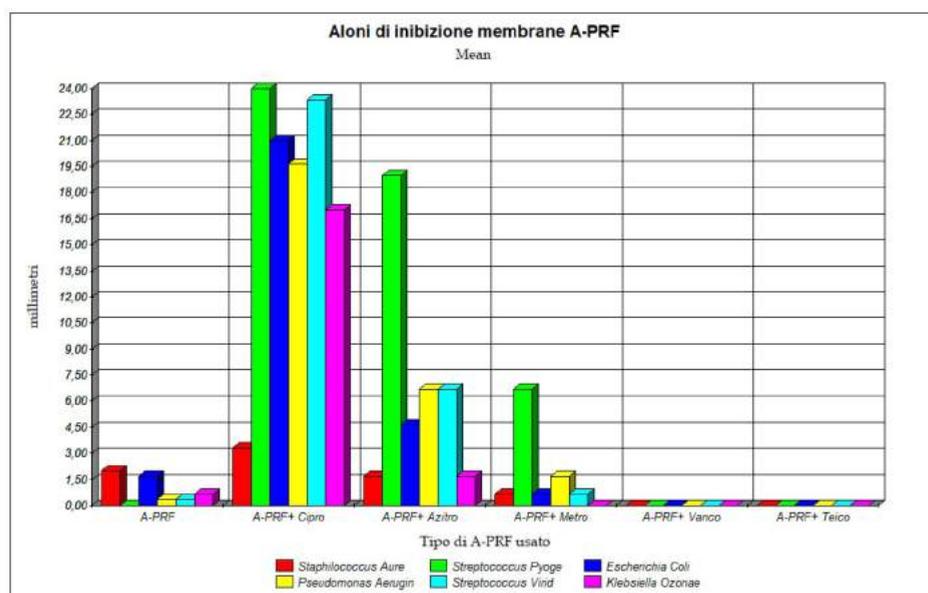
A)

B)

**Figura 9.** A) A-PRF su *Streptococcus pyogenes* e B) su *Escherichia coli* A) 1=A-PRF; 2=A-PRF+Ciprofloxacina; 3=A-PRF+Azitromicina; 4=A-PRF+Metronidazolo; B) A= A-PRF+Ciprofloxacina; B= A-PRF; C=A-PRF+Azitromicina; D=A-PRF+Metronidazolo.

**Tabella 4.** Valori dell'alone di inibizione nei vari batteri utilizzando provette con gel e senza gel a 0' e a 60' dalla centrifugazione con test statistici.

	con gel 0'	senza gel 0'	con gel 60'	senza gel 60'
Stafilococco	0	2,67	0,33	4,67
Streptococco	0,67	3,33	0	2
Escherichia	0,33	3,33	1,67	1,33
Pseudomonas	0	2,33	0,33	2,67
Media	0,25	2,92	0,58	2,67
Mediana	0,25	2,92	0,33	2,67
Deviazione Standard	0,28	0,43	0,64	1,25
Varianza	0,077	0,187	0,412	1,561



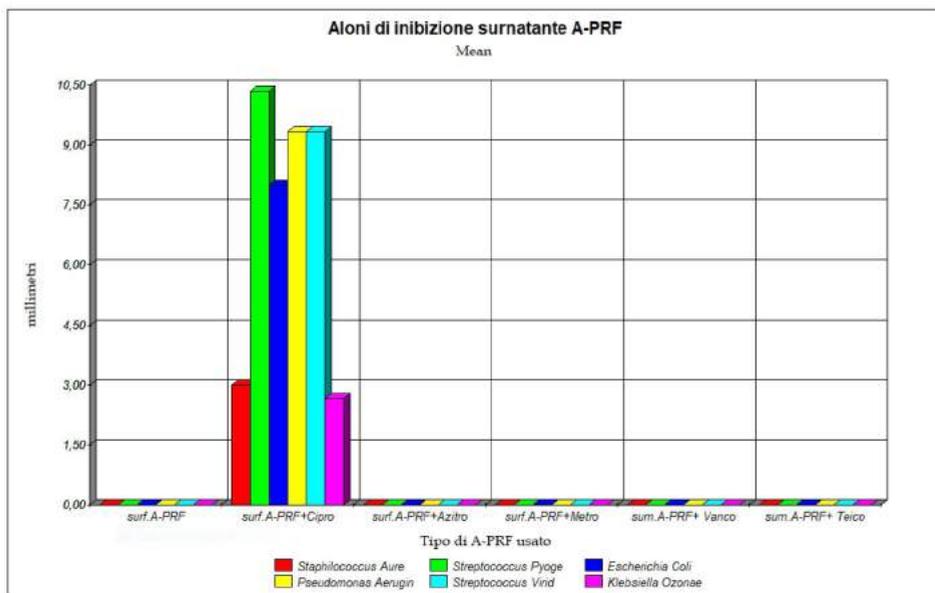
**Figura 10.** Aloni di inibizione delle membrane A-PRF con e senza aggiunta di antibiotici Ciprofloxacina (A-PRF+Cipro), Azitromicina (A-PRF+Azitro) e Metronidazolo (A-PRF+Metro).

La figura 10 dimostra che il A-PRF ottenuto da provette specifiche [12] di vetro per A-PRF (Advanced PRF) senza anticoagulante ne un gel separatore (provette per A-PRF Vacutainer per siero 9,0 ml), dimostra, da solo, senza antibiotici, uno scarso effetto antibatterico su tutti i 6 germi testati, dimostra un notevole effetto antimicrobico nella A-PRF addizionata con Ciprofloxacina.

na, specie verso lo *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, lo *Streptococcus Viridans* e *Klebsiella Ozoneae*, mentre è ridotto nello *Staphilococco Aureo*.

La A-PRF addizionata con Azitromicina dimostra la maggiore attività nei confronti dello *Streptococcus pyogenes*.

La A-PRF addizionata con Metronidazolo dimostra invece una maggiore attività nei confronti dello *Streptococcus pyogenes*, ma decisamente scarsa nei confronti degli altri germi testati.



**Figura II.** Aloni di inibizione del liquido di spremitura di A-PRF senza e con aggiunta di antibiotici Ciprofloxacina, Azitromicina e Metronidazolo.

La figura II dimostra che il liquido di spremitura post-compressione di A-PRF dimostra, da solo, senza antibiotici, nessun effetto antibatterico su tutti i 6 germi testati, dimostra invece un notevole effetto antimicrobico specie verso lo *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, lo *Streptococcus Viridans*, mentre è ridotto nello *Staphilococco Aureo* e *Klebsiella Ozoneae*, solo se addizionata con Ciprofloxacina. Per quanto concerne la mancanza di effetto in vitro di A-PRF addizionato con Vancomicina e Teicoplanina, si tratta in entrambi i casi di Glicopeptidi, che probabilmente presentano, una attività inibente nei confronti della formazione della rete di fibrina.

Dalla semina in replica del materiale prelevato negli aloni di inibizione di *Escherichia coli*, si è potuto rilevare che la membrana addizionata con Ciprofloxacina ha attività battericida, mentre il liquido di spremitura della membrana in oggetto ha avuto effetto batteriostatico.

La membrana più Azitromicina ha attività battericida.

Nel caso del test eseguito su *Pseudomonas aeruginosa*, si è avuto effetto battericida sia nel caso della membrana con Azitromicina, che per quanto concerne la membrana con Ciprofloxacina, che il suo relativo liquido di spremitura.

## 6.5. Discussione

La sepsi può essere causata da una varietà di agenti patogeni. Degli organismi gram-positivi, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* sono tra quelli più riscontrati. Tra gli organismi gram-negativi, *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa* si trovano in gran numero [12].

Oltre a questi effetti antibatterici diretti, le piastrine sembrano anche aumentare le attività antibatteriche di neutrofili, monociti e macrofagi (vedi l'interazione delle piastrine con leucociti).

Weksler e Nachman [13] hanno isolato due proteine cationiche piastriniche con masse molecolari di 10 kD e 40 kD che erano battericide in vitro contro *B.subtilis* e ceppi di *S.aureus*. Proteine Piastriniche Microbicide (PMP) possono essere rilasciate in modo differenziato dalle piastrine in risposta al trauma dei tessuti, a mediatori solubili dell'infiammazione o a microrganismi.

Il Lipopolisaccaride (LPS) e le citochine pro infiammatorie IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  promuovono la produzione di HDP (peptidi di Difesa dell'Ospite) (Crisci *et al.*, J.P.D., 2015)[14]. Le proprietà funzionali antimicrobiche e citotossiche delle defensine mature (e altri HDP) generalmente si pensa che siano associate con le loro attività che formano pori come multimeri delle membrane biologiche e che portano alla autocaptazione, un meccanismo che è stato descritto dal modello di Shii-Matsuzaki-Huang (figura 3). Le HDP sono il bersaglio e il "tallone d'Achille" della membrana microbica (cioè l'assenza di colesterolo e di fosfolipidi caricano negativamente il foglietto esterno della membrana citoplasmatica). La carica positiva facilita il legame di un numero sempre maggiore (1-10 miliardi di molecole) di HDP ai fosfolipidi sulla superficie batterica fino che la membrana batterica collassa completamente. La resistenza agli HDP è rara, in quanto è estremamente difficile per qualsi-

asi microrganismo modificare la sua organizzazione strutturale dei fosfolipidi di superficie. Concentrazioni di 40 ng/mL di  $\alpha$ -defensine sono state misurate nel plasma in soggetti umani normali, un aumento nella concentrazione a 41 mg/ml si è verificato durante le infezioni, concentrazioni plasmatiche di 170 mg/ml sono state misurate nella sepsi. Gli studi nei cavalli si sono concentrati sulle defensine e catelicidine.

La resistenza antimicrobica è associata ad alti tassi di mortalità e costi medici elevati e ha un impatto significativo sull'efficacia degli agenti antimicrobici. Il problema della resistenza può essere visto in modo semplicistico come un'equazione con due componenti principali: il farmaco antibiotico o antimicrobico, che inibisce gli organismi sensibili e seleziona quelli resistenti; e la resistenza genetica determinata in microrganismi selezionati dal farmaco antimicrobico. Attualmente la resistenza antimicrobica tra batteri, virus, parassiti e altri fattori di organismi patogeni rappresentano una seria minaccia per la gestione delle malattie infettive a livello globale. È noto che qualsiasi uso di antimicrobici anche se appropriato e giustificato, contribuisce allo sviluppo della resistenza, ma l'uso diffuso non necessario ed eccessivo peggiora la situazione [15]. Gli agenti antimicrobici possono essere classificati in base al loro componente o al sistema cellulare che influenzano, oltre a se inducono morte cellulare (agenti battericidi) o semplicemente inibiscono la crescita cellulare (agenti batteriostatici) (Kohanski *et al.*, 2010)[16]. I meccanismi di azione ben noti degli agenti antimicrobici includono; interferenza con la sintesi della parete cellulare, inibizione della sintesi proteica, interferenza con la sintesi dell'acido nucleico, l'inibizione delle vie metaboliche intermedie e la distruzione della membrana citoplasmatica (Tenover, 2006)[17].

Il problema della resistenza può essere visto in modo semplicistico come un'equazione con due componenti principali: il farmaco antibiotico o antimicrobico, che inibisce gli organismi sensibili e seleziona quelli resistenti; e il determinante della resistenza genetica nei microrganismi selezionati dal farmaco antimicrobico. La resistenza ai farmaci emerge solo quando i due componenti si uniscono in un ambiente o ospite, e può portare a un problema clinico. Vengono utilizzati milioni di chilogrammi di antimicrobici ogni anno nella profilassi e nel trattamento di persone, animali e nell'agricoltura a livello globale, guidando il problema della resistenza uccidendo ceppi suscettibili e selezionando quelli che sono resistenti. È ben noto comunque che l'uso di antimicrobici, anche se appropriato e giustificato, contribuisce allo sviluppo della resistenza, ma quello non necessario diffuso e l'uso eccessivo peggiora la situazione. Alcune caratteristiche microbiche possono apparentemente in-

fluenzare la frequenza della resistenza antimicrobica migliorando la capacità del microorganismo di emergere, persistere o essere trasmesso. Tali caratteristiche incluse la propensione a scambiare facilmente materiale genetico, possedere resistenza intrinseca, sopravvivere in condizioni ambientali variabili, occupando alcune nicchie ecologiche, colonizzando facilmente e infettando. La resistenza antimicrobica è associata ad alti tassi di mortalità e costi medici elevati e ha un impatto significativo sull'efficacia degli agenti antimicrobici. La resistenza antimicrobica provoca ostacolo nel controllo della malattia intensificando la possibilità di diffusione di agenti patogeni resistenti, risultando in un tempo prolungato di infezione nel paziente. Il tasso di successo delle attuali applicazioni mediche come il trapianto d'organo e la chemioterapia del cancro ha contribuito immensamente allo sviluppo della farmaco-resistenza. La resistenza antimicrobica può essere classificata come intrinseca, resistenza circostanziata e acquisita.

È necessaria una strategia globale per affrontare le sfide che accompagnano la crescente minaccia di AMR (Resistenza Batterica agli Antibiotici). In primo luogo, l'uso terapeutico di antimicrobici deve essere condotto appropriatamente in contesti medici e veterinari. In secondo luogo, le infezioni resistenti ai farmaci devono essere controllate e prevenute. In terzo luogo, le strategie sono necessarie per preservare gli antimicrobici esistenti e migliorare lo sviluppo di nuovi agenti antimicrobici, terapie alternative e dispositivi diagnostici. Il controllo della resistenza microbica agli agenti antimicrobici richiede un approccio multiplo. I componenti essenziali dell'approccio devono comprendere la riduzione non solo di prescrizioni inappropriate per gli esseri umani ma anche per gli animali, riducendo la trasmissione di organismi resistenti attraverso l'aumentato controllo delle infezioni e l'igiene ambientale e l'identificazione delle tendenze nella resistenza attraverso la sorveglianza. L'uso eccessivo di antibiotici sono considerati il principale fattore nell'emergenza e nella disseminazione di resistenza agli antimicrobici. La prevenzione e il controllo di queste infezioni richiederanno nuovi agenti antimicrobici, un uso prudente degli agenti esistenti, nuovi vaccini e maggiori sforzi per la salute pubblica a ridurre la trasmissione.

Di norma, l'uso razionale dell'antimicrobico ad ogni livello è la chiave per limitare la diffusione della resistenza. Pertanto, in base alle informazioni di cui sopra, vengono inoltrate le seguenti raccomandazioni:

- i governi dovrebbero sviluppare e attuare politiche e strategie di medicina che prendano in considerazione la minaccia della resistenza ai far-

- maci antimicrobici in modo da limitare l'evoluzione e la possibile diffusione di microbi resistenti;
- l'operatore sanitario dovrebbe prestare attenzione alla resistenza antimicrobica durante il trattamento della malattia infettiva con agente antimicrobico.

Nel nostro caso, dopo semina in replica del materiale prelevato dagli aloni di almeno 10 mm di raggio, non si è avuta crescita. Pertanto si ritiene che l'attività del A-PRF addizionato con antibiotico, e da ritenersi di natura battericida. Per quanto concerne il surnatante, non ha mostrato in nessun caso produrre aloni di inibizione. Dopo una riduzione iniziale dell'inoculo, infatti, un recupero della crescita batterica è stato sempre osservato, indicando che i concentrati piastrinici mostravano un'attività inibitoria (batteriostatica) piuttosto che microbicida. Per quanto riguarda le singole specie batteriche, *S. Aureus* è stato il microrganismo più testato e ha sempre mostrato sensibilità ai concentrati piastrinici, mentre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae* sono stati meno frequentemente testati e hanno prodotto risultati contraddittori: in alcuni studi è stata osservata attività antimicrobica, ma in altri non si è ottenuto alcun effetto inibitorio contro queste specie. Il nostro gruppo in questo lavoro ha voluto approfondire l'effetto in rapporto a questi batteri e al tipo di concentrato piastrinico utilizzato, con l'obiettivo di focalizzare l'utilità di PRF nella prevenzione della resistenza batterica.

Di seguito sono riportati i possibili meccanismi ipotizzati per l'azione antibatterica delle piastrine.

- Le piastrine agiscono come senzialità del sistema vascolare, esprimono una vasta gamma di potenziali recettori batterici, possono avere la capacità di internalizzare i batteri e sono in grado di rilasciare un'ampia varietà di molecole che forniscono una serie di funzioni di difesa dell'ospite.
- Studi in vitro hanno dimostrato che le piastrine, dopo la stimolazione con trombina, sono in grado di rilasciare proteine con attività antimicrobica contro batteri e funghi.
- Oltre al rilascio di peptidi antimicrobici, le piastrine sono anche in grado di generare specie reattive dell'ossigeno, di legare e internalizzare i microrganismi e partecipare alla citotossicità cellulare anticorpo-dipendente.

- Recenti studi hanno sottolineato il ruolo diretto delle piastrine nel riconoscere, sequestrare e neutralizzare gli agenti patogeni invasori, così come il loro contributo indiretto al reclutamento dei leucociti nei siti di infezione e di infiammazione, e nel modulare il loro comportamento, migliorando la loro capacità di fagocitosi e uccidere i microrganismi, innescando diversi tipi di percorsi di segnalazione.

Lo scopo di questa ricerca era determinare se A-PRF, L-PRF, i-PRF possiedono attività antimicrobica contro i microrganismi delle ulcere cutanee.

Dai risultati di questa indagine, possiamo concludere che A-PRF, L-PRF, i-PRF mostrano da soli un'attività antimicrobica contro tutti i singoli microrganismi testati all'interno di questo studio in un periodo di tempo di 24 ore, che viene potenziata se vengono utilizzati come vettori aggiungendo antibiotici specifici.

## 6.6. Conclusioni

Se si considera specie batteriche specifiche, i risultati ottenuti dall'utilizzo di concentrati piastrinici (PC) sono stati talvolta contraddittori. Tali discrepanze potrebbero essere dovute a diversi motivi, come ad esempio il fatto che caratteristiche intrinseche dei ceppi batterici utilizzati, possono presentare una diversa suscettibilità ai concentrati piastrinici di per sé o a differenti sensibilità del test utilizzato per valutare l'attività antibatterica. Altri motivi importanti per spiegare la variabilità osservata nei risultati, potrebbero essere attribuiti ai tipi di concentrato piastrinico utilizzati che possono differire nella forma (gel o liquido), nonché nella concentrazione di piastrine, nel contenuto di leucociti, nella densità della rete fibrina, nella modalità di attivazione che può verificarsi naturalmente per contatto con i tessuti o può essere indotta dalla trombina o dal cloruro di calcio. Questi dati sembrano suggerire che alcuni componenti plasmatici (come il complemento) sono i principali responsabili dell'azione antimicrobica come attività dei concentrati piastrinici, e che è necessaria una cooperazione tra piastrine ed elementi plastici. Esaminando i risultati ottenuti negli studi di vari gruppi di lavoro, i preparati ricchi di leucociti hanno sicuramente un'attività antibatterica, ma solo pochi studi hanno confrontato concentrati piastrinici poveri e ricchi di leucociti ed entrambi sembrano suggerire che non ci sono differenze sostanziali tra l'attività antimicrobica delle due formulazioni. Così potrebbe essere dimostrato

che i globuli bianchi possiedono un'attività fagocitica e costituiscono una ricca fonte di molecole antimicrobiche (ad es. difensine, catelicidine, lisozima, mieloperossidasi).

Generalmente gli antibiotici sotto forma di sistemi di somministrazione sistemici o locali sono utilizzati come coadiuvante nel trattamento di queste infezioni, ma hanno lo svantaggio di sviluppare resistenza. Così questi agenti (PC) possono superare questo svantaggio e fornire un mezzo alternativo ai vari antibiotici usati nel nostro campo.

La principale limitazione del nostro studio è il sistema artificiale *in vitro* utilizzato per coltivare i concentrati. *In vivo*, un ambiente fisiologico del tessuto influenzerebbe il comportamento del concentrato piastrinico in termini di struttura, diafonia cellulare, esposizione agli enzimi di degradazione e di rilascio di fattori di crescita. Tuttavia, la caratterizzazione di L-PRF *in vitro* e dei suoi derivati rimane un passo importante verso la comprensione degli effetti *in vivo*. Ad esempio, la conoscenza dell'effetto antimicrobico di L-PRF e dei derivati (i-PRF) potrebbe fornire importanti linee guida per la scelta dei tessuti e/o lesioni da utilizzare in futuri studi preclinici e, in definitiva, clinici.

Anche con lievi variazioni di tempistica per le diverse tensioni e per diversi preparati, gli studi, incluso il nostro, sembrano concordare sul fatto che 4 ore è il tempo ottimale di incubazione, quando si ottiene la massima diminuzione del numero di batteri. Tutti gli studi concordano sul fatto che i preparati sono batteriostatici, con conseguente ricrescita, ma bisogna riconoscere che i preparati L-PRF sono un utile aggiunta più probabile che venga utilizzata in un contesto clinico per la profilassi piuttosto che terapeuticamente per il trattamento di stabili infezioni. Gli autori suggeriscono di utilizzare formulazioni contenenti leucociti e piastrine in combinazione dopo l'intervento chirurgico di debridement per ridurre sia la carica batterica (uccidendo i batteri e inibendo la formazione del biofilm [14]), sia per stimolare la guarigione.

Sono necessarie ricerche e studi clinici sufficienti per valutare i potenziali benefici della PRF in termini di attività antimicrobica. È evidente con i dati disponibili che la PRF ha attività antimicrobica contro i patogeni microbici. Sulla base di revisioni [18], si può concludere che dei vari PC, in particolare il PRF ha la potenziale attività antimicrobica rispetto ad altri PC. Questa attività può essere potenziata da protocolli di preparazione come l'abbassamento della velocità centrifuga e l'abbassamento del tempo, incorporando antibiotici nella matrice di fibrina che può agire come un sistema di rilascio del farmaco a lento rilascio. Considerando il suo effetto antimicrobico sui patogeni, la PRF dovrebbe essere considerata come un potenziale sistema di sommini-

strazione locale di farmaci e anche materiale rigenerativo naturale che dovrebbe rendere questo materiale biologico unico dal resto dei biomateriali utilizzati ora. La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sul ruolo esatto della proprietà antimicrobica di ciascun fattore di crescita e delle molecole presenti nella PRF insieme ai parametri del paziente come età, sesso, parametri del sangue e interazioni farmacologiche. L'utilizzo del proprio sangue per la rigenerazione assorbirà più valore nella mente del paziente e anche del chirurgo curante, il che sarà un vantaggio per l'umanità.

Si può concludere che anche i-PRF può essere facilmente preparato durante l'intervento chirurgico e possiede attività battericida e antibiofilm. Questo potrebbe agire come un peptide antimicrobico e un potenziale agente bioattivo per prevenire le infezioni postoperatorie nei siti chirurgici. Sono necessarie ulteriori ricerche per valutare in profondità le proprietà antimicrobiche ad ampio spettro di i-PRF utilizzando un modello *in vivo*.

Gli Autori sperano anche che questo lavoro sia una delle basi per studi futuri per esplorare ulteriormente il contributo di leucociti nella preparazione PRF per ottenere una preparazione ottimale sia per combattere le infezioni che per promuovere efficacemente la guarigione delle ferite.

## Riferimenti bibliografici

- [1] Blair P., Flaumenhaft R., *Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates*, «Blood Rev.», 2009, 23(4), 177-189.
- [2] Yeaman M.R., *The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense*, «Clin. Infect. Dis.», 1997, 25, 951-968.
- [3] Giraldo E., Zorzi L., *Razionale di impiego dell'argento sulfadiazina nelle lesioni cutanee croniche infette*, «Acta Vulnol.», 2013, 11, 83-89.
- [4] Cieslik-Bielecka A., *Dohahn Ehrenfest D.M., Lubkowka A., Bielecki T., Microbicidal properties of leukocyte-and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives*, «J. of biological regulators & homeostatic agents», 2012, 2(S), 43-52.
- [5] Pavlovic V., Ciric M., Jovanovic V., Trandafilovic M., Stojanovic P., *Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications*, «Open Medicine», 16, 1, 2021, 446-454.
- [6] Feng M., Wang Y., Zhang P., Zhao Q., Yu S., Shen K., Miron R.J., Zhang Y. *Antibacterial effects of platelet-rich fibrin produced by horizontal centrifugation*, «Int J Oral Sci.», 2020 Nov 26;12(1):32.

- [7] Castro A. *et al.*, *Antimicrobial capacity of leucocyte-and platelet rich fibrin against periodontal pathogens*, «Sci. Rep.», 2019, 9, 8188.
- [8] Marazzi M. *et al.*, *Le ferite difficili linee guida di trattamento*, in Monti M., *L'ulcera Cutanea*, 2000, 351-376.
- [9] Stadelman KW., Digenis A.G., Tobin G.R., *Impediments to Wound Healing*, «The Am. Jour. of Surg.», 1998, 176, 398-478.
- [10] Crisci A., Serra E., Cardillo F., Crisci M., *Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box\**, «V.P.E.», 2017, 1, 41-50.
- [11] Giuliano G., Crisci M., D'Adamo R., Crisci A., *I concentrati piastrinici di seconda generazione nella terapia dell'osteomielite cronica: una chirurgia rigenerativa moderna*, «Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia», 2020;46:1-12.
- [12] Pirozzi N., Rejali N., Brennan M., Vohra A., McGinley T., Krishna M.G., *Sepsis: Epidemiology, Patho-physiology, Classification, Biomarkers and Management*, «J. Emerg. Med. Trauma Surg. Care», 2016, 3.
- [13] Nachman R.L., Weksler B., *The Platelet as an Inflammatory Cell*, «Annals of the New York Academy of Sciences», 1972, 10: 131-137.
- [14] Crisci A., *Le membrane L-PRF utili in chirurgia*, «J.P.D.», 2015, 2, 75-90.
- [15] Gudata D., Begna F., *Antimicrobial Resistance: Review*, «International Journal of Research-Granthaalayah», 2018, 6(11), 77-93.
- [16] Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*, «Nature Reviews Microbiology», 2010, 8(6): 423.
- [17] Tenover F.C., *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria*, «American journal of infection control», 2006 34(5):3-10.
- [18] Balaji V.R., Thiagarajan R.K., Niazi T.M., Ulaganathan G., Manikandan D., *Antimicrobial effects of platelet rich fibrin: A systematic review on current evidence of research*, «J Interdiscip Dentistry», 2021;11:2-10.



## RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare mia figlia Michela per la sua collaborazione, e anche le infermiere di Sala Operatoria Mena Messina e Pina Colombiano per la loro disponibilità.

Desidero ringraziare inoltre la Dott. Edda Serra Microbiologa, Responsabile del laboratorio microbiologico del Centro per la Prevenzione e Cura del Diabete “L’Abetaia” di Casagiove (CE), per il contributo dato alla sperimentazione relativa all’effetto antibatterico dei concentrati piastrinici.



SALUS  
COLLANA DI SCIENZE DELLA SALUTE

1. Rossana Alloni  
*Il tutor clinico nel corso di laurea in Medicina e Chirurgia. Spunti per la riflessione e per la formazione dei tutor*  
ISBN 978-88-548-5865-7, formato 17 × 24 cm, 160 pagine, 12 euro
  
2. Pietro Genova, Nello Grassi, Mario Adelfio Latteri  
*L'impiego del linfonodo sentinella nel carcinoma del colon-retto. Considerazioni e proposta di tecnica*  
ISBN 978-88-548-4760-6, formato 17 × 24 cm, 92 pagine, 8 euro
  
3. Giuseppe Modica, Carmelo Sciumè, Massimo Cajozzo, Girolamo Geraci, Antonio Sciuto, Chiara Lo Nigro  
*Il drenaggio pleurico*  
ISBN 978-88-548-6220-3, formato 17 × 24 cm, 84 pagine, 8 euro
  
4. Rossana Alloni, Daniela Tartaglino (a cura di)  
*Aggiornamenti di chirurgia generale e specialistica 2013. Evidence based nursing ed evidence based surgery*  
ISBN 978-88-548-6484-9, formato 17 × 24 cm, 108 pagine, 8 euro
  
5. Nicola Picardi  
*Chirurgia sperimentale e dei trapianti di organo. Storia, metodologie e conquiste tecnologiche*  
ISBN 978-88-548-6033-9, formato 17 × 24 cm, 588 pagine, 38 euro
  
6. Ornella Piazza, Walter Santaniello, Geremia Zito Marinosci  
*Diagnosi e terapia dell'addome critico*  
ISBN 978-88-548-7327-8, formato 17 × 24 cm, 352 pagine, 19 euro
  
7. Paola Berni, Massimo Olina, Gabriele Olina  
*Il defibrillatore nelle società sportive*  
ISBN 978-88-548-7684-2, formato 17 × 24 cm, 72 pagine, 8 euro
  
8. Rossana Alloni  
*Qualità e sicurezza nel lavoro clinico*  
ISBN 978-88-548-8096-2, formato 17 × 24 cm, 192 pagine, 12 euro

9. Alessandro Crisci  
*Il piede diabetico*  
ISBN 978-88-548-8137-2, formato 17 × 24 cm, 161 pagine, 13 euro
10. Paolo Lantieri, Giulia Cavatassi  
*L'infermiere di famiglia*  
ISBN 978-88-548-9121-0, formato 17 × 24 cm, 144 pagine, 12 euro
11. Rossana Alloni, Modesto D'Aprile (a cura di)  
*Guida pratica per lo sperimentatore clinico*  
ISBN 978-88-548-9825-7, formato 17 × 24 cm, 152 pagine, 15 euro
12. Daniela Francesca Nestola, Massimo Olina  
*Principi di fisiopatologia dell'orecchio*  
ISBN 978-88-548-9484-6, formato 17 × 24 cm, 188 pagine, 16 euro
13. Mariolina Rossi  
*Musicoterapia in ematologia e TMO adulti. Metodologia di lavoro e valutazione dei risultati*  
ISBN 978-88-255-1817-7, formato 17 × 24 cm, 124 pagine, 12 euro
14. Alessandro Crisci  
*La rigenerazione dei tessuti con fibrina ricca di piastrine. I nuovi concentrati piastrinici*  
ISBN 979-12-5994-xxx-x, formato 17 × 24 cm, 124 pagine, 12 euro



Finito di stampare nel mese di ottobre del 2021  
dalla tipografia «System Graphic S.r.l.»  
via di Torre Sant'Anastasia, 61 – 00134 Roma