

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





ISBN
979-12-5994-529-7

PRIMA EDIZIONE
ROMA 20 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 (≥ 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

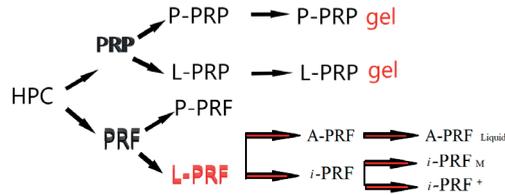


Figura 1. Diversi tipi di concentrati piastrinici umani (HPC): PRP (plasma ricco di piastrine); PRF (fibrina ricca di piastrine); P-PRP (plasma ricco di piastrine pure); L-PRP (plasma ricco di leucociti e piastrine); P-PRF (fibrina ricca di piastrine pure); L-PRF (fibrina ricca di leucociti e piastrine);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

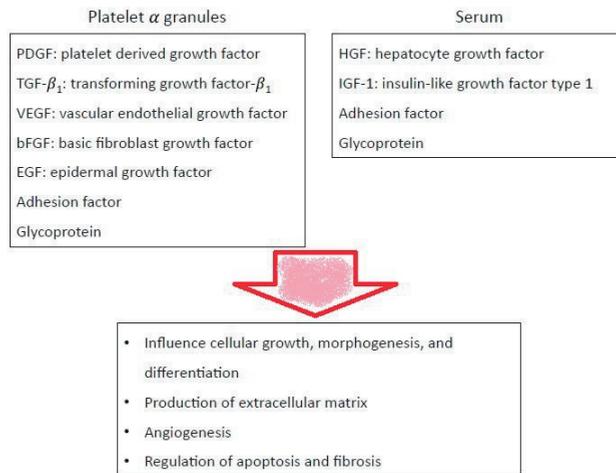


Figura 2. Funzioni delle piastrine nella medicina rigenerativa.

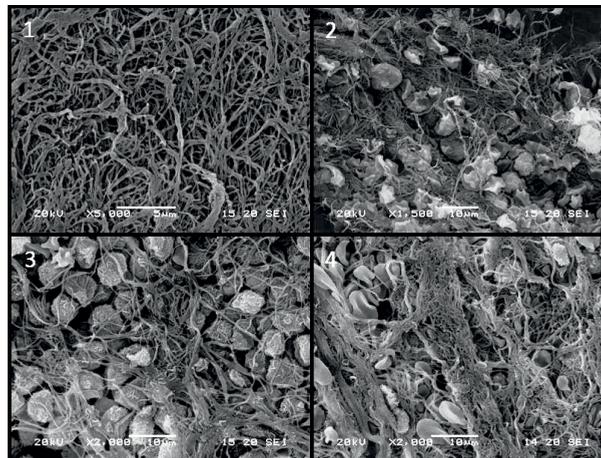


Figura 3. Visualizzazione dell'immagine SEM: 1 lo strato ricco di fibrina (5.000 x ingrandimento); 2 una zona di piastrine arricchite con vari gradi di attivazione (1.500 x ingrandimento); 3 buffy coat con numerosi leucociti e 4 la base dei globuli rossi (2.000 x ingrandimento).

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-

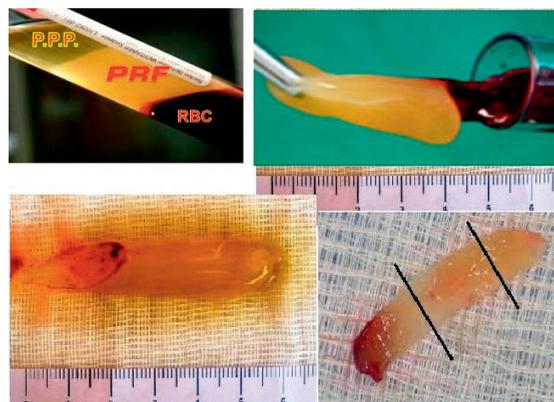


Figura 4. Diverse fasi di preparazione della PRF.

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/ μ l		RBC/ μ l		Platelets/ μ 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

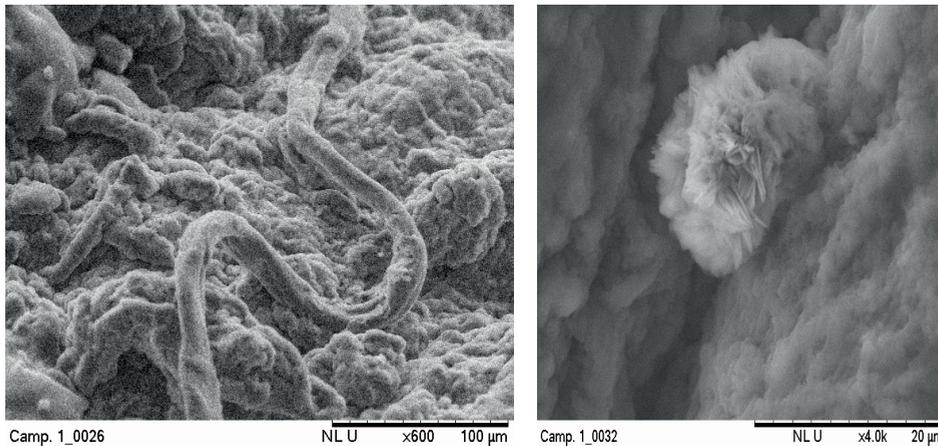


Figura 5. Immagine al microscopio S.E.M. Hitachi Tabletop Microscopio da tavolo TM3000 di L-PRF. A sinistra: Maglia di fibra (ingrandimento 600x); a destra: piastrina attivata (ingrandimento 4000x).

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- β 1 sono i fattori di crescita più abbondanti, contenuti negli α -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.

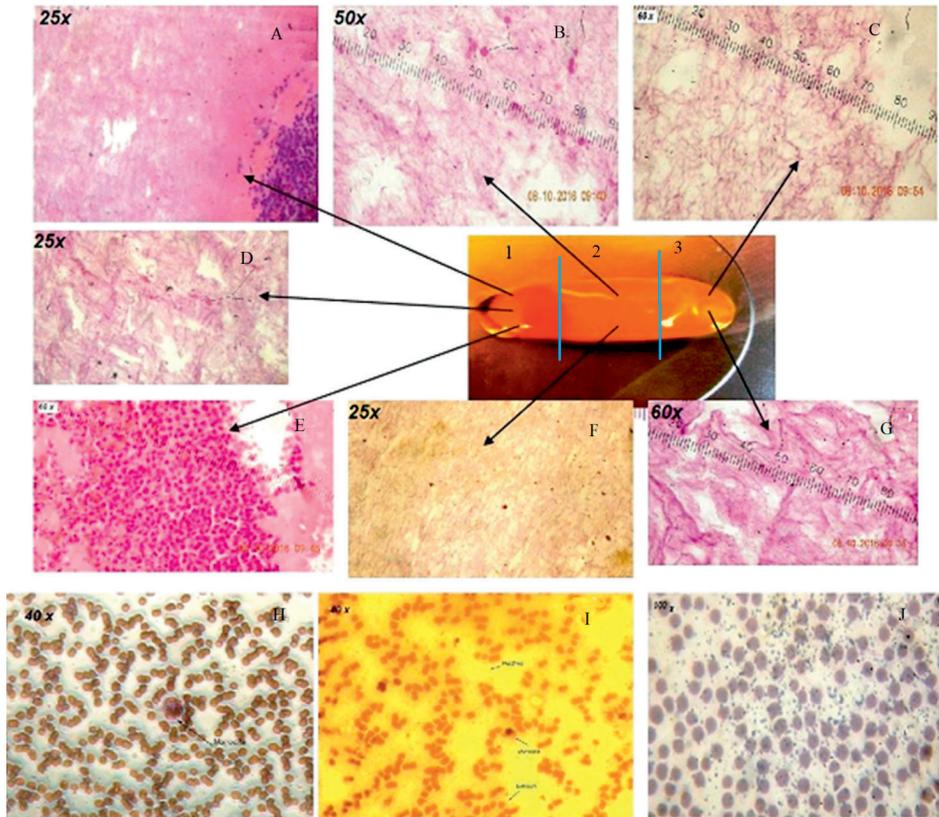


Figura 6. Le tre regioni C-PRF e l'osservazione della distribuzione piastrinica O.M. sulla superficie della membrana. Il C-PRF è stato suddiviso in tre regioni: La regione 1 adiacente al coagulo rosso (RBC), la regione 2 è la parte centrale e la regione 3 è la parte distale del coagulo rosso. La distribuzione 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 neutrofilo 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).

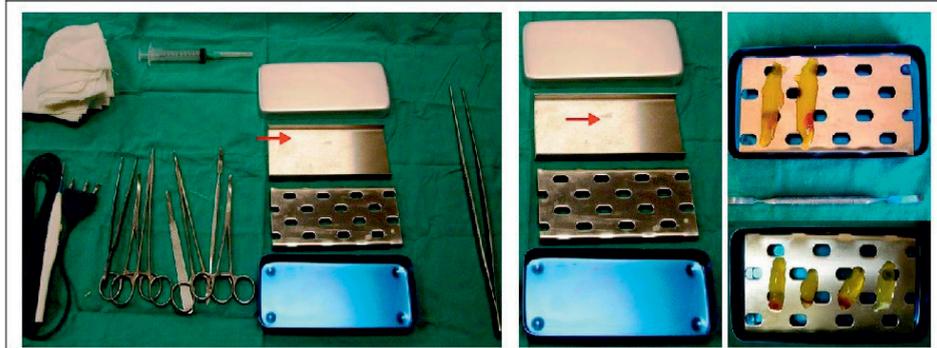


Figura 7. L-PRF Wound Box.

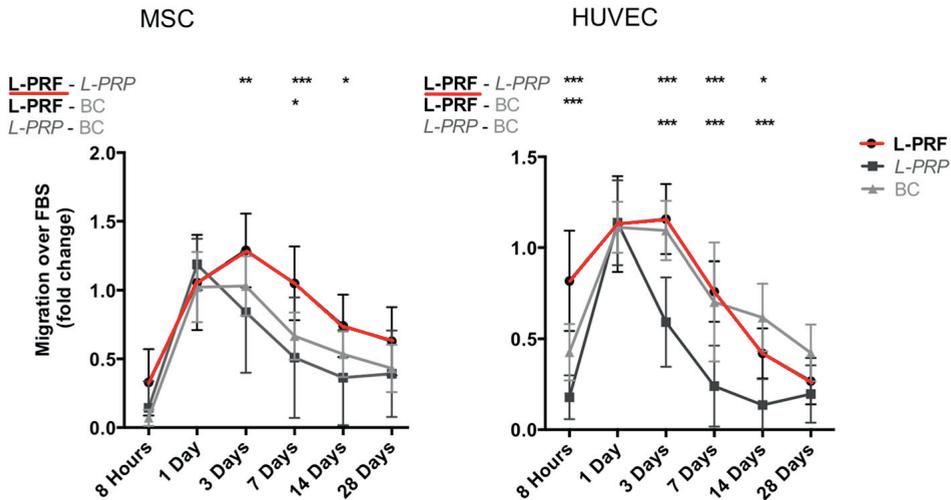


Figura 8. La migrazione di MSC e HUVEC è mostrata in risposta ai fattori rilasciati da L-PRF, L-PRP e coaguli di sangue (BC). La migrazione di MSC e HUVEC è stata valutata in camere di Boyden con mezzi raccolti dopo 8 ore e 1, 3, 7, 14 e 28 giorni di L-PRP, L-PRF e coaguli di sangue rispetto ai terreni 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: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.