



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

Dipartimento di medicina sperimentale (DIMES)

Dottorato di Ricerca in
IMMUNOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

Coordinatore del Corso: *Prof.^{ssa}* Simona SIVORI

XXXIV Ciclo

***Platelet Rich Plasma (PRP): nuovo dispositivo medico per la cura
delle ulcere in paziente diabetico***

Tesi presentata da

Salvatore RIGGIO, *MSc*

Tutor

Maddalena MASTROGIACOMO, *PhD*
DIMI

Anno accademico 2020/2021

Sommario

Medicina Rigenerativa	4
Ferite e guarigione.....	7
Ulcere Croniche.....	12
Diabete e ulcere diabetiche	15
PRP: natura, storia, preparazione	27
Biologia delle piastrine.....	28
Preparazione e classificazione.....	32
Applicazioni del PRP	39
Scopo dello studio	53
Materiali e metodi	58
1. Caratterizzazione in vitro della bio-membrana	58
Preparazione del PRP	58
Tracciabilità informatica delle preparazioni di PRP	59
Membrana a base di Acido Ialuronico come veicolo di rilascio del PRP	60
Valutazione della capacità assorbente della membrana di HA	60
Analisi del contenuto in proteine e fattori di crescita nel PRP.....	60
Rilascio di fattori di crescita dalla bio-membrana	61
Colture cellulari - Fibroblasti da cute.....	61
Proliferazione cellulare in presenza del rilasciato della membrana	62
2. Studio clinico.....	63
Reclutamento pazienti	63

Selezione dei pazienti.....	63
Consenso informato.....	64
Randomizzazione	65
Valutazione del paziente pre-trattamento.....	65
Valutazione della lesione	66
Valutazione dello stato di salute del paziente	66
Preparazione della bio-membrana.....	66
Applicazione della bio-membrana	66
Prelievo di sangue periferico e isolamento componenti ematiche	67
Analisi immunologiche	68
Follow-up dei pazienti.....	68
Risultati	69
Profilo emocromocitometrico delle preparazioni di PRP	69
Dosaggio dei fattori di crescita nel PRP.....	69
Verifica dell'attività biologica della bio-membrana in vitro.....	70
Cinetica di rilascio dei fattori di crescita.....	71
Discussione.....	73
Conclusioni.....	78
Bibliografia.....	79

Medicina Rigenerativa

La rigenerazione tessutale è un meccanismo naturale di fondamentale importanza per il mantenimento dei tessuti nell'organismo postnatale in quanto provvede ad un costante turnover cellulare e svolge un ruolo fondamentale in risposta a lesioni o patologie. L'uomo, come tutti i Mammiferi, possiede un potere rigenerativo limitato, che può risultare insufficiente in particolari situazioni.

Le soluzioni più tradizionali che la medicina utilizza nella sostituzione di tessuti o organi sono le protesi e il trapianto. Le protesi consistono nell'impianto di un sistema totalmente artificiale, che presenta dei limiti relativi alla compatibilità e al mantenimento delle prestazioni nel tempo. Il trapianto prevede il trasferimento di un componente totalmente biologico prelevato da un organismo di diversa specie, della stessa specie o dallo stesso organismo. La compatibilità tra donatore e ricevente, la ridotta disponibilità di organi da donatori sani ed il rischio di infezioni virali o batteriche limita fortemente questo approccio ^[1].

Possibili alternative ai metodi della medicina tradizionale sono state proposte dalla medicina rigenerativa che è la scienza che si occupa della sostituzione e rigenerazione di cellule, tessuti o organi degenerati patologicamente, al fine di ristabilirne la normale funzione. Secondo la definizione di Daar e Greenwood "La medicina rigenerativa è un campo interdisciplinare di ricerca e applicazioni cliniche incentrata sulla riparazione, la sostituzione o la rigenerazione di tessuti o organi per ripristinare la funzione alterata derivante da qualsiasi causa, inclusi difetti congeniti, malattie, traumi e invecchiamento".

La medicina rigenerativa utilizza una combinazione di svariati approcci tecnologici, sia d'uso consolidato che emergente, che la muovono al di là dei tradizionali trapianti e delle terapie di sostituzione. Gli approcci proposti spesso stimolano e sostengono la capacità autorigenerante dell'organismo. Questi approcci possono includere, ma non sono limitati ad essi, uso di molecole solubili, terapia genica, terapia con cellule staminali e progenitrici, ingegneria dei tessuti e riprogrammazione di tipi di cellule e tessuti. Quindi la sfida che la medicina

rigenerativa si propone è quella di rigenerare i tessuti o potenziando i meccanismi di riparazione propri dell'organismo o mediante la realizzazione di dispositivi ingegnerizzati idonei a ricostruire un tessuto e un organo [2].

L'approccio di rigenerazione tessutale prevede l'ingegnerizzazione di un dispositivo adeguato al tipo di lesione che possa essere impiantato nel paziente per favorire la ricostruzione del tessuto danneggiato.

Per riparare una lesione cutanea, ad esempio, è necessario combinare un biomateriale idoneo, con funzione di supporto (scaffold), a fattori di crescita e cellule progenitrici, che possono essere isolate dal paziente ed espanse in vitro. Le cellule rappresentano la componente biologica del dispositivo e, essendo progenitrici, sono in grado di differenziare in cellule del "lineage" del tessuto/organo danneggiato, supportando la ricolonizzazione nella sede della lesione. Le cellule secernono specifiche citochine e chemiochine che agiscono insieme ai fattori di crescita addizionati al costrutto, creando un microambiente rigenerativo nella zona dell'impianto. Lo scaffold rappresenta una struttura di supporto per la crescita cellulare che va gradualmente incontro a degradazione, lasciando al suo posto il tessuto neoformato.

La sfida dell'ingegneria tessutale è duplice: da un lato si propone di individuare uno scaffold biocompatibile e biodegradabile in cui le cellule possano formare strutture stratificate, dall'altro lato si propone di riprodurre le condizioni che consentano alle cellule di crescere, moltiplicarsi e differenziarsi.

Esempi di tessuti umani ricostruiti mediante un approccio biotecnologico sono l'epidermide ed altri tessuti epiteliali stratificati, interamente ricostruiti in vitro^[3]; il tessuto osseo ricostruito in pazienti con ampie lesioni, mediante l'impianto di costrutti osteogenici^[4] e il tessuto cartilagineo.

L'uso di cellule allogeniche rappresenta un'importante sfida per la medicina rigenerativa che sta facendo emergere nuove strategie per controllare la risposta immunitaria e favorire l'utilizzo delle cellule senza alcuna limitazione nella loro disponibilità. Un metodo proposto si è basato sull'uso di biomateriali come barriera fisica per proteggere le cellule del donatore dal sistema immune dell'ospite: ad esempio uno studio negli anni '80 ha proposto l'incapsulamento

delle isole di Langerhans da donatore in idrogel, che favoriva il passaggio di molecole di insulina ma impediva quello degli anticorpi e dei linfociti T che avrebbero indotto il rigetto^[5].

Anche la tecnologia delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) potrebbe rappresentare un metodo per produrre cellule o tessuti autologhi specializzati direttamente dalle cellule dei pazienti. Questo eliminerebbe il problema della risposta immune verso il non self; potrebbe però non essere la soluzione perfetta, infatti, alcuni studi hanno suggerito che le cellule derivate dalle iPSC possono essere immunogeniche anche quando donatore e ricevente sono geneticamente identici. Ciò può essere dovuto alla persistenza di antigeni legati alla fase dello sviluppo. Inoltre la fase di differenziazione cellulare che avviene in vitro può alterare l'espressione di molecole coinvolte nel riconoscimento immunitario in modo tale da innescare reazioni immunogene contro le cellule dopo il trapianto.

Il campo della medicina rigenerativa si sta espandendo rapidamente, guidato da una sempre crescente diversità e complessità di fonti cellulari, biomateriali e design. Il superamento delle barriere immunologiche rappresenta una delle questioni più urgenti in questo campo. I recenti progressi e le potenziali strade per la ricerca futura forniscono motivo di ottimismo nell'affrontare le sfide immunologiche presentate dalle terapie rigenerative emergenti.

Ferite e guarigione

Le ferite possono originarsi da cause differenti, quali, ad esempio, interventi chirurgici, traumi, ustioni, tagli, abrasioni, condizioni patologiche che portano ad ulcerazione dei tessuti, come il diabete e le patologie cardiovascolari.

Una ferita acuta è caratterizzata da un processo di riparazione accurato e ben organizzato che esita in una rigenerazione tessutale con ripristino dell'integrità funzionale e anatomica della parte lesa. Una ferita cronica, al contrario, è caratterizzata da una maggiore difficoltà nel ripristinare le normali condizioni del tessuto a causa della persistente fase flogistica sostenuta dalla continua produzione di citochine infiammatorie e conseguente rischio di infezioni^[6]. Le ferite croniche sono caratterizzate, inoltre, da difetti cellulari che esitano in una minore espressione di recettori per i fattori di crescita, in un ridotto potenziale mitogeno e in una difettosa capacità del tessuto di rispondere ai segnali di guarigione^[7]. Ulteriore caratteristica delle ferite croniche è la produzione di essudato nel sito della lesione che è in grado di contribuire alla distruzione della matrice extracellulare in quanto contiene metalloproteasi, le principali attrici nella distruzione dei tessuti^[8]. Entrambe le tipologie delle lesioni sono correlate allo stato generale del paziente e risentono dell'età, della presenza di patologie vascolari, della presenza di patologie autoimmuni o metaboliche, dell'uso di terapie farmacologiche che possono influenzare il fisiologico processo di guarigione^[9]. Lo studio delle ferite si basa sulla valutazione del perimetro di lesione e la sua estensione in lunghezza e larghezza, l'area della ferita e profondità e la vitalità dei tessuti. A queste caratteristiche si aggiungono: la valutazione dell'ossigenazione dei tessuti, l'irrorazione sanguigna, l'innervazione, la presenza di edema, infezioni e infiammazione. Tutte queste informazioni permettono di valutare l'origine e le condizioni della ferita e la sua fisiopatologia^[10].

La guarigione delle ferite è la risposta fisiologica del corpo al danno per rigenerare sia la struttura che la funzione di un tessuto o di un organo lesa. In tutti gli organismi pluricellulari, i meccanismi rigenerativi si verificano in seguito alla lesione; tali processi dipendono però molto dalla complessità biologica dell'organismo.

Nei mammiferi, la capacità rigenerativa è limitata e la rapida riparazione della lesione mediante deposizione di tessuto fibrotico spesso impedisce la rigenerazione dei tessuti, specialmente quando la lesione è estesa. Nell'uomo, gli esempi più rappresentativi della rigenerazione dopo la nascita sono la ricrescita delle punte delle dita amputate, quando si verifica nella prima decade di vita e la rigenerazione del fegato^[11]. Nell'uomo adulto, qualsiasi epitelio, ossa e sistema ematopoietico rappresentano i tessuti con la più alta capacità rigenerativa^[12].

In generale, tali differenze nel potenziale rigenerativo degli esseri umani durante la loro vita potrebbero essere spiegate riferendosi al contenuto di cellule indifferenziate all'interno dei tessuti, che sono più abbondanti nella vita fetale e neonatale che negli adulti^[13].

In ogni caso, la risposta rapida ad un danno grave con l'instaurarsi di tessuto fibrotico potrebbe rappresentare un vantaggio in termini di sopravvivenza perché previene le infezioni letali, arresta rapidamente il sanguinamento e inibisce la deformazione meccanica dei tessuti^[14]. Inoltre, la completa rigenerazione di parti estese di tessuti o parti del corpo sarebbe energeticamente insostenibile per un organismo complesso.

Il processo di guarigione delle ferite è estremamente complesso e dipende dall'interazione di svariati fattori finemente regolati che puntano al ripristino del tessuto. La sequenza di eventi che porta a guarigione avviene spontaneamente nelle ferite superficiali e in individui sani. Quando la guarigione delle ferite non avviene in modo normale si instaura una condizione cronica che rappresenta un problema per il paziente e una sfida per il clinico.

Dopo il verificarsi di una ferita si attivano diversi processi che tendono a ripulire il tessuto da materiali estranei, data la perdita di integrità, riportando la cute ad uno stato di normalità; nonostante tutto, il tessuto perderà circa il 30% della sua capacità elastica ma ritornerà alle sue funzioni principali^[15]. Le fasi principali della guarigione delle ferite sono quattro: emostasi, infiammazione, proliferazione e rimodellamento tessutale^[16] [Figura 1].

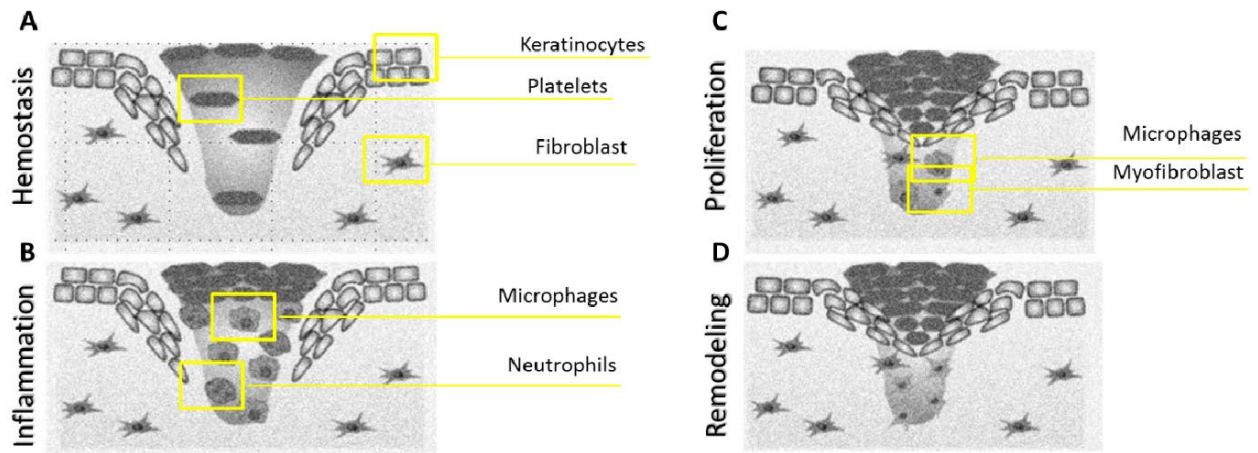


Figura 1. Rappresentazione schematica della rigenerazione dei tessuti. **Tottoli, E. M. et al. (2020).**

a) Emostasi e infiammazione

Il danno vascolare derivante da una ferita espone l'endotelio, il sub-endotelio e le proteine della matrice extra vascolare. Le piastrine circolanti si legano per mezzo dei loro recettori al collagene esposto, attivandosi e interagendo con la trombina avviano la cascata coagulativa^[17]. Le integrine sulla superficie piastrinica si legano al fibrinogeno e portano alla formazione di fibrina, che si accumula insieme al collagene interstiziale portando alla costituzione di un coagulo che imbriglia globuli rossi, neutrofili e altre componenti ematiche. Si viene così a creare una matrice extracellulare provvisoria costituita da monomeri di fibrina sotto forma di protofilamenti stabilizzati dalla presenza del fattore XIIIa. Tale rete viene modellata da alcune metalloproteasi rilasciate dai macrofagi e dai fibroblasti, formando una matrice che favorisce la migrazione di neutrofili e monociti^[18]. In questa fase le piastrine attivate rilasciano alcuni fattori di crescita (PDGF, TGF- β 1, FGF e VEGF) che, interagendo con varie cellule del sistema immunitario e dell'endotelio, aiutano nelle fasi della rilevazione e intrappolamento dei patogeni^[19].

La fase infiammatoria sopraggiunge subito dopo la fase emostatica. L'obiettivo principale di questa fase è quello di eliminare i patogeni e contenere il danno in una zona delimitata. Durante la fase infiammatoria, la permeabilità vascolare aumenta consentendo ai neutrofili e ai monociti di giungere nella sede dell'insulto. Le citochine rilasciate permettono di convertire i

monociti in macrofagi, principali attori nella regolazione dell'inflammazione ^[20]. I neutrofili sono le prime cellule che intervengono, oltre alle piastrine, nell'instaurare l'inflammazione. I fattori di crescita e le chemiochine rilasciati dalle piastrine nella sede di inflammatione richiamano i neutrofili. Grazie alle loro molecole di adesione migrano verso la sede di inflammatione dove facilitano la fagocitosi dei patogeni opsonizzati, eliminandoli ^[18,21]. I monociti presenti nella sede di inflammatione riconoscono le molecole DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) e PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) e rilasciano citochine che richiamano in sede altri monociti circolanti e neutrofili. I macrofagi svolgono la loro azione producendo citochine infiammatorie, al fine di controllare e uccidere i patogeni, rimuovere i detriti nel sito di infezione ^[18] portando alla fase di risoluzione dell'inflammazione.

b) Fase proliferativa

Alla fase infiammatoria segue quella proliferativa. Durante questa fase i fibroblasti iniziano a proliferare, a depositare la matrice extracellulare e si ha una contrazione dei tessuti della ferita; l'interazione tra fibroblasti e cheratinociti porta alla riepitelizzazione della ferita, si avrà la formazione di nuovi vasi e la rigenerazione delle terminazioni nervose. Tutti questi eventi vedono nei macrofagi le principali cellule che orchestrano il tutto ^[22].

A seguito della lesione il collagene esposto entra in contatto con le piastrine, il fibrinogeno e la fibronectina formano una matrice provvisoria con legami crociati tra la fibrina e la fibronectina stessa ^[13]. I fibroblasti attivati iniziano a produrre collagene, che viene depositato sulla matrice provvisoria trasformandola in matrice extracellulare ricca in collagene; inoltre i fibroblasti si differenziano in miofibroblasti, che a loro volta producono fibre di actina e miosina che si contraggono formando spazio che viene riempito da altro collagene. Tale processo si ripete fino alla formazione di un tessuto privo di vascolarizzazione e acellulare, costituito da collagene ^[18]. Dopo 16-24 ore dalla lesione, le molecole rilasciate nel sito e le varie componenti cellulari iniziano la fase di riepitelizzazione, in cui i cheratinociti sono spinti a proliferare ^[23]. Il microambiente della ferita è caratterizzato da una condizione di ipossia indotta dall'accelerato metabolismo cellulare e dalla vasocostrizione. La ridotta concentrazione di ossigeno stimola la produzione del fattore 1 inducibile dall'ipossia (HIF-1) da parte di macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali e cheratinociti. HIF-1 a sua volta promuove l'espressione di diversi geni, alcuni

dei quali inducono il rilascio di vari fattori di crescita, come VEGF, FGF, PDGF, TGF- β 1, coinvolti nel reclutamento delle cellule endoteliali che organizzeranno i nuovi vasi sanguigni [24].

c) Riepitelizzazione

Dopo la fase proliferativa entrano in azione i cheratinociti che provvedono alla fase di riepitelizzazione. Al fine di dare avvio al processo, i cheratinociti perdono le capacità adesive tra di loro e con la lamina basale. Tale processo avviene grazie alla proteina PKC α che indebolisce la forza di adesione dei desmosomi. I cheratinociti possono quindi iniziare a migrare nella zona della ferita. Tale migrazione avviene grazie ai fattori di crescita epidermici quali EGF, TGF- α e IGF-1 che stimolano direttamente i cheratinociti e la loro proliferazione [25].

c) Rimodellamento

Le ultime fasi del processo di guarigione delle ferite riguardano la deposizione del collagene e il rimodellamento dei tessuti. In risposta ai fattori di crescita e alle citochine rilasciate nella sede delle ferite si verifica la migrazione dei fibroblasti [26]. Inizia la sintesi di collagene, che forma una rete ben strutturata che durerà per circa 4- 5 settimane. Durante questa fase aumenta non soltanto il numero di fibroblasti ma anche la loro capacità di produrre collagene [27]. La sintesi del collagene e la sua deposizione sono scatenate dalla produzione da parte delle cellule di IGF-1 e TGF- β 1 [28]. Durante la fase di rimodellamento del tessuto si hanno dei cambiamenti inerenti il rapporto tra i vari tipi di collagene che portano a conferire al nuovo tessuto caratteristiche di resistenza e di elasticità, che aumentano con il trascorrere del tempo dalla guarigione [26,27]. Di fatto le metalloproteasi rilasciate dai fibroblasti e dai macrofagi degradano il collagene di tipo III a favore di collagene di tipo I, che si riorganizza in fibre parallele [29].

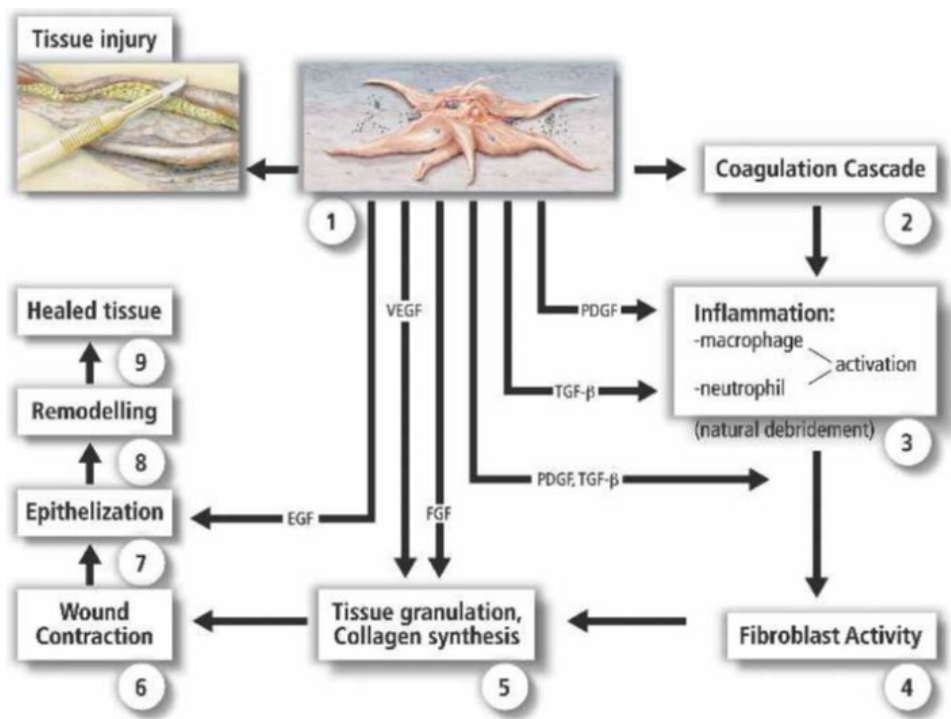


Figura 2. Illustrazione schematica del ruolo dei fattori di crescita rilasciati dalle piastrine durante i differenti stadi del processo di guarigione delle ferite. **Everts et al. (2006).**

Ulcere Croniche

Le ferite rappresentano la maggior causa di morbilità nel mondo. Si stima che per ogni milione di ferite, circa 10.000 persone muoiono a causa di complicanze di natura infettiva^[30]. Le ferite acute sono caratterizzate da una guarigione spontanea mentre le ferite croniche si instaurano, di fatto, quando si ha un processo di guarigione alterato. L'ipossia tissutale locale, il trauma ripetitivo e la pesante carica batterica, combinati con le risposte cellulari e sistemiche alterate dell'ospite allo stress, si traducono in una condizione che impedisce la fase proliferativa della guarigione. L'alto livello di attività mitogena osservato nelle ferite acute è assente nelle ferite croniche^[31]. Il microambiente ostile che si viene a definire disturba il delicato equilibrio tra citochine pro-infiammatorie, chemochine, proteasi e loro inibitori presenti nelle ferite acute. In quanto tale, la lesione non riesce a guarire entro un periodo di tempo fisiologicamente appropriato^[32].

La presenza di molti neutrofili nel sito di lesione conduce a una sovrapproduzione di ROS che a loro volta danneggiano la matrice extracellulare, determinando una precoce senescenza delle cellule. Il rilascio di proteasi, quali elastasi e collagenasi (MMP-8) da parte dei neutrofili, porta alla degradazione di importanti fattori di crescita come il PDGF e TGF- β . Quindi, sebbene la produzione di fattori di crescita sia spesso aumentata nelle ferite croniche, la loro biodisponibilità risulta essere ridotta^[33]. Alla risposta infiammatoria inappropriata si combina la diminuita risposta cellulare e sistemica dell'ospite allo stress, perpetuando il ciclo deleterio che deve essere interrotto attraverso lo sbrigliamento e la pulizia della ferita perché avvenga la guarigione.

L'età avanzata rappresenta un'altra causa dell'insorgenza di ulcere croniche. La guarigione nella popolazione anziana risulta ritardata e rappresenta un importante problema sia clinico che economico^[34]. L'invecchiamento induce cambiamenti che coinvolgono anche la risposta infiammatoria e di riparazione dei tessuti; si presentano alterazioni nell'adesione cellulare, nella migrazione cellulare e nelle risposte funzionali. La risposta dei neutrofili risulta alterata e aumentata, con scarse capacità fagocitarie antimicrobiche e una chemiotassi ridotta^[35]. L'abbondanza di infiltrato neutrofilo produce un aumento delle proteasi, che è seguito da aumentata distruzione delle proteine strutturali e funzionali come proteoglicani, collagene e fibronectina^[36]. La presenza di patologie vascolari come l'ipertensione e l'aterosclerosi porta ad una riduzione del flusso sanguigno con conseguente stato di ipossia che caratterizza le ulcere croniche, interferendo con il normale processo di guarigione delle ferite. Il danno vascolare è caratterizzato, inoltre, da un aumentato reclutamento di neutrofili e macrofagi grazie all'iperespressione di molecole di adesione da parte del tessuto ipossico: ciò porta ad un incremento nella sintesi di citochine pro-infiammatorie^[37]. L'ipossia esercita effetti negativi anche su altri processi come la riepitelizzazione, così come sulla proliferazione dei fibroblasti e la sintesi di collagene^[34].

Un fattore patogeno che caratterizza le ulcere croniche è rappresentato dalla colonizzazione da parte dei batteri. Tale colonizzazione rallenta la guarigione dell'ulcera contribuendo alla cronicità. Tra i batteri più comunemente riscontrati troviamo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e streptococchi β emolitici^[38]. La presenza dei batteri danneggia il paziente, sia direttamente con la produzione di tossine ed enzimi, sia indirettamente: infatti, la presenza di cellule batteriche

richiama i leuciti, che a loro volta producono ulteriori citochine infiammatorie, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e proteasi [34]. A complicare il quadro si deve tenere conto della capacità di tali batteri di produrre biofilm, una sostanza che permette al batterio di resistere efficacemente sia alla risposta immunologica del paziente sia alla presenza di antibiotici [39]. Lo stato ipossico presente nella sede della ferita, inoltre, contribuisce alla colonizzazione batterica in quanto molti enzimi prodotti dalle cellule immunitarie dipendono dalla presenza dell'ossigeno [40].

Tipologie di ulcere

Le ulcere da stasi venosa rappresentano la maggioranza delle ferite croniche degli arti inferiori e colpiscono circa l'1-2% della popolazione adulta, con una maggiore prevalenza nelle donne e negli anziani; si tratta di ulcere che possono persistere anche per più di 5 anni [41]. La sede di lesione solitamente si estende dalla metà inferiore del polpaccio fino alla regione malleolare [42]. La causa di insorgenza è l'ipertensione venosa legata alla congestione dovuta a trombosi venosa o insufficienza valvolare. A causa della compressione si ha un aumento della permeabilità vascolare, che porta alla fuoriuscita di macromolecole e globuli rossi nello spazio perivascolare, dove possono agire come chemiotattici per l'infiltrazione leucocitaria [43]. Il conseguente edema e la fibrosi non permettono una corretta perfusione e diffusione dell'ossigeno, dei fattori di crescita e delle sostanze nutritive alla ferita [44]. La circolazione viene ripristinata con l'elevazione della gamba e i processi infiammatori associati alla riperfusione aggravano il danno [40]. Alla riperfusione, infatti, un gran numero di leucociti migra nel tessuto danneggiato rilasciando citochine infiammatorie e ROS: il continuo alternarsi di tali cicli porta a necrosi ed ulcerazioni [34].

Le ulcere arteriose sono meno comuni di quelle venose: rappresentano circa il 25% delle ulcere delle gambe [42]. Si verificano in conseguenza di un'insufficienza arteriosa causata solitamente da aterosclerosi, raramente da tromboembolia o danni da radiazioni [45]. Il restringimento del lume arterioso riduce la perfusione, portando a ischemia e ipossia. Importanti fattori di rischio sono rappresentati da fumo, diabete, ipertensione, ipercolesterolemia e una prevalenza che aumenta con l'età [46]. Il paziente con ulcera arteriosa riporta difficoltà nel camminare e dolore che peggiora con l'elevazione dell'arto [42]. Potrebbe essere richiesto il ripristino

chirurgico del flusso periferico con angioplastica o chirurgia ricostruttiva; inoltre, è utile modificare i fattori di rischio. La localizzazione delle ulcere arteriose è normalmente sopra le prominenze ossee e si presentano con un bordo rotondo e nettamente delimitato^[47].

Le ulcere da decubito sono comuni nei pazienti con mobilità e percezione sensoriale compromesse, nei pazienti paralizzati o incoscienti che non possono né percepire né rispondere alla necessità periodica di riposizionamento. Si presentano soprattutto in regioni con prominenza ossea come osso sacro, fianchi e malleoli e si presentano nell'1-5% dei pazienti ospedalizzati^[42]. La necrosi dei tessuti è derivante dall'ipossia tissutale e dal danno da ischemia-riperfusion^[48].

Diabete e ulcere diabetiche

Il paziente diabetico manifesta molto frequentemente ulcere di difficile trattamento. Secondo l'OMS il numero di diabetici è passato dai 108 milioni nel 1980 ai 422 milioni nel 2014. Tra il 2000 e il 2016 si è registrato un incremento del 5% delle morti premature a causa del diabete. Nel 2019 sono state stimate 1.5 milioni di morti direttamente correlate al diabete.

Per ogni mille abitanti ci sono 12 ricoveri ospedalieri diagnosticati con diabete, di cui 2 ammissioni hanno il diabete come principale causa di ospedalizzazione. Fino al 25% dei pazienti diabetici soffre di un'ulcera del piede durante la loro vita, essendo l'ulcerazione la principale causa di infezione e amputazione. Circa il 50% delle ulcere del piede diabetico si infetta e il 20% di queste richiede l'amputazione. In più nell'85% delle amputazioni degli arti inferiori l'ulcera è un aspetto critico della malattia nei pazienti diabetici. L'incidenza di amputazione correlata al diabete è più di due volte maggiore negli uomini che nelle donne, mentre è simile tra i gruppi razziali ed etnici [Figura 3].



Figura 3. L'impatto del diabete in Italia - Fonte ISTAT

Sebbene il trattamento convenzionale dell'ulcera nel paziente diabetico, inclusa la rivascularizzazione dell'arto, porti alla guarigione dell'ulcera nel 70% dei pazienti, entro il primo anno dopo l'intervento, il 30% di essi deve ancora essere sottoposto ad amputazione (dati ISTAT).

Il diabete è un onere gravoso per i bilanci economici dei sistemi sanitari nazionali. Il costo totale stimato del diabete diagnosticato nel 2010 è stato dell'11,6% della spesa totale a livello mondiale, del 10% nei Paesi europei e del 9% in Italia. In Europa si stima che circa l'1-3% della popolazione soffrirà di ulcere croniche durante la loro vita, e questa percentuale aumenterà a causa del graduale allungamento dell'aspettativa di vita. La prevalenza delle ulcere cutanee negli ospedali europei varia dal 5% al 28% dei pazienti ammessi. In Italia, il costo del trattamento delle lesioni croniche (ferite da decubito, ulcere diabetiche e lesioni chirurgiche) raggiunge 1 miliardo di euro all'anno, rappresentando un onere importante per il sistema sanitario. Per tale motivo, tutti i sistemi sanitari, sia pubblici che privati, prestano particolare attenzione alle nuove strategie terapeutiche per la gestione delle ulcere cutanee, al fine di migliorare la qualità della vita dei pazienti e ridurre i costi dei trattamenti terapeutici. Tuttavia, il trattamento clinico delle ulcere croniche rimane un problema, specialmente in termini di processo completo di guarigione delle ferite^[49].

Il diabete mellito è caratterizzato da iperglicemia e da difetti di vario grado nella produzione dell'insulina, prodotta dalle isole di Langerhans nel pancreas endocrino. È una patologia

metabolica complessa e multifattoriale con componente genetica. Ha un andamento cronico e a lungo termine conduce a complicanze che colpiscono svariati organi e tessuti.

La sintomatologia del diabete è caratterizzata da polidipsia, poliuria, perdita di peso, polifagia. In assenza di questi sintomi tipici, la diagnosi di diabete viene posta con il riscontro confermato in almeno due occasioni dei seguenti valori di laboratorio:

- $HbA_{1c} > 6,5\%$ in due circostanze e con dosaggio allineato allo standard DCCT;
- glicemia a digiuno (senza introito calorico da almeno 8 ore) misurata in laboratorio ≥ 126 mg/dl;
- glicemia dopo 2 ore durante OGTT $75g \geq 200$ mg/dl;
- glicemia riscontrata casualmente durante la giornata ≥ 200 mg/dl e presenza di sintomi tipici.

Esistono diversi tipi di diabete:

- Diabete mellito di tipo 1: è tipicamente autoimmune ed è il risultato dell'interazione di fattori genetici, ambientali e immunologici che portano alla distruzione delle cellule β del pancreas e al conseguente deficit di insulina. Insorge tipicamente durante l'infanzia e l'adolescenza, ma può svilupparsi a qualsiasi età. I soggetti colpiti diventano insulino-dipendenti ^[50].
- Diabete mellito di tipo 2: rappresenta un gruppo eterogeneo di disordini caratterizzati da insulino-resistenza, alterata secrezione insulinica, eccessiva produzione epatica di glucosio e alterato metabolismo dei grassi. Vi è una forte predisposizione genetica, diviene manifesto solo in presenza di eventi precipitanti ambientali, primo fra tutti l'obesità. Costituisce la forma insulino-indipendente, poiché le cellule β pancreatiche conservano parte della loro attività. È la forma di diabete che colpisce principalmente tra i 40 e i 59 anni ^[51].
- Diabete gestazionale: caratterizzato da un aumento dei livelli di glucosio nel sangue nella donna in gravidanza e destinato a scomparire dopo il parto. Può essere considerato un fattore di rischio per una futura insorgenza del tipo 2 ^[52].
- Altri tipi di diabete sono causati da malattie del pancreas esocrino, endocrinopatie

(malattie dovute a processi patologici o a disturbi nell'attività funzionale delle diverse ghiandole endocrine, ad es. tiroide ed ipofisi), diabete chimico o da farmaci, processi infettivi, forme non comuni di diabete immuno-mediato, sindromi associate a diabete mellito^[50].

Le ulcere del piede diabetico sono una complicanza comune e grave del diabete nei pazienti con scarso controllo glicemico, presenza di neuropatia, vasculopatia periferica e scarsa cura del piede, oltre a costituire una delle cause di osteomielite e amputazione del piede^[53]. L'evoluzione dell'ulcera ha inizio da una prima fase caratterizzata dallo svilupparsi di un callo che a sua volta è causato dalla neuropatia periferica. Infatti, a causa della neuropatia, il piede subisce delle deformità e la perdita di sensibilità facilita l'instaurarsi di traumi e lesioni. I continui traumi, infine, conducono, prima a emorragie sottocutanee e poi all'ulcerazione della cute. Inoltre, la compromissione vascolare è una ulteriore causa di peggioramento dell'ulcerazione, in quanto, non facendo ossigenare i tessuti, porta gli stessi a necrotizzare^[54]. Lo scarso controllo glicemico porta ad accumulare prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) che inducono stress ossidativo, alterano la funzione della cute e delle cellule infiammatorie e aumentano la rigidità della matrice extracellulare; inoltre, causano uno stato infiammatorio cronico di basso grado e persistente^[55]. I pazienti con ulcere del piede diabetico sono a maggior rischio di ulcerarsi nuovamente e di incorrere in amputazione dell'arto o di andare incontro alla morte; esiti così gravi hanno giustificato nell'ultimo decennio una maggiore attenzione alla guarigione delle ferite diabetiche e al salvataggio degli arti^[56].

Classificazione delle ulcere diabetiche

Data la variabilità dei fattori coinvolti nello sviluppo delle lesioni del piede diabetico, si rende necessario un sistema di classificazione che descriva le lesioni in modo condiviso dalla comunità scientifica. Allo stato attuale non esiste un singolo sistema di classificazione. In letteratura sono presenti diversi sistemi di classificazione; non tutti sono validati e a volte vengono utilizzati solo nelle strutture che li hanno messi a punto. Anche gli scopi per cui sono nati i vari sistemi di classificazione sono diversi, variando da scopi di ricerca a scopi clinici e di audit. La classificazione a scopo clinico ha la funzione di facilitare la comunicazione tra i clinici e

valutare eventuali prognosi. La classificazione nel campo della ricerca assume importanza quando bisogna decidere i criteri di arruolamento. Per gli audit, infine, la classificazione deve essere univoca, chiara e di semplice interpretazione in quanto serve a gestire dati spesso ottenuti da strutture diverse^[57].

Il primo dei sistemi di classificazione specifica per il diabete, il sistema Meggitt-Wagner, formulato nel 1976 e diffuso nel 1979, è un sistema lineare composto da soli sei gradi che vanno da 0 a 5, dove lo 0 indica una cute integra, fino ad arrivare al grado 5, che indica una estesa gangrena del piede. Si tratta di una classificazione di semplice utilizzo, ma presenta diverse criticità come l'assenza di neuropatia, mentre l'interessamento vascolare viene considerato solo negli stadi finali di gangrena. L'imprecisione di tale sistema non lo rende ottimale a scopo di ricerca.

Il sistema di classificazione dell'Università del Texas è stato sviluppato nel 1996 e validato nel 1998. Si tratta di una classificazione basata su una matrice bidimensionale. Un asse si basa sulla profondità della ferita e segue la numerazione da 0 a 3, mentre il secondo asse prende in considerazione l'assenza di ischemia o infezione (grado A), la presenza di infezione (grado B), la presenza di ischemia (grado C) o la presenza di entrambi i fattori (Grado D). Anche in questo caso si nota l'assenza del criterio inerente la neuropatia diabetica^[57,58]. Tale assenza è stata giustificata con il fatto che solitamente tale complicanza sia già presente nel momento in cui si presenta l'ulcerazione^[59].

Terapia delle ulcere

Al giorno d'oggi esiste in commercio una ampia gamma di prodotti che possono essere usati per le medicazioni delle ulcere croniche e che possono prevenire l'insorgenza di infezioni grazie all'aggiunta di agenti antibatterici.

Una tappa essenziale nell'ambito di un'efficace trattamento dell'ulcera è rappresentata dalla rimozione del tessuto necrotico detto debridement o "sbrigliamento" e dalla detersione del letto della lesione per preparare la zona della ferita ai successivi trattamenti. Il tessuto necrotico presente nelle ferite croniche può compromettere infatti la guarigione e impedire la migrazione

dei cheratinociti sul letto della ferita. Diversi sono i metodi utilizzati per ottenere lo sbrigliamento come quelli chirurgici, quelli basati sull'autolisi e quelli biologici^[60].

Il debridement chirurgico risulta essere un metodo rapido ed efficace, ma ha il rischio di danneggiare il tessuto vivo; tuttavia, questo è il modo più immediato per rimuovere detriti e tessuto necrotico: il bisturi riduce la carica batterica e rimuove le cellule vecchie e senescenti, convertendo una ferita cronica che non guarisce in una ferita acuta all'interno di una ferita cronica. È stato dimostrato che il debridement chirurgico che lascia una base sanguinante aumenta il tasso di guarigione delle ulcere diabetiche neurotrofiche del piede. Lo sbrigliamento chirurgico viene normalmente eseguito dove c'è una vasta area della ferita, un'infezione diffusa, dove l'osso e il tessuto infetto devono essere rimossi o dove il paziente è settico.

Il metodo autolitico risulta essere molto più selettivo ma con tempistiche dilatate. Tale tecnica si instaura in un ambiente mantenuto umido per facilitare l'azione di enzimi autolitici endogeni quali metalloproteasi. Si possono anche utilizzare delle preparazioni a base di collagenasi o altri enzimi come papaina: in questo caso parliamo di debridement enzimatico^[61]. I metodi biologici sfruttano l'uso di larve, allevate per tale scopo, che permettono, grazie agli enzimi della loro saliva, di eliminare il tessuto necrotico. Si tratta un metodo poco adoperato per via della reticenza legata all'uso delle larve^[62].

Spesso le ulcere sono caratterizzate dalla produzione di essudato che contiene sostanze dannose per la proliferazione cellulare e che causano un ritardo nella guarigione del tessuto. L'uso di medicazioni occlusive può essere utile al fine di prevenire la formazione di croste o per favorire la migrazione delle cellule della risposta infiammatoria, ma medicazioni che riescano a togliere parte dell'essudato sono più indicate nel processo di guarigione. Di fatto le medicazioni assorbenti facilitano l'azione dei fattori di crescita.

Le medicazioni tradizionali sono rappresentate da garze in vari materiali, dal cotone al nylon e hanno la funzione di isolare la lesione dall'ambiente esterno e assorbire l'essudato prodotto dalla ferita. Sulle garze vengono poi applicate delle bende di vari materiali^[63]. Le medicazioni tradizionali però presentano diversi svantaggi quali asportazione accidentale del tessuto di granulazione al momento del cambio, disidratazione e scarso drenaggio della ferita per cui sono poco utilizzate e vengono spesso sostituite da medicazioni avanzate che intervengono nel processo riparativo facilitandolo. Le caratteristiche principali di queste medicazioni sono

rappresentate dalla capacità di mantenere costante il microambiente della ferita (con riferimento alla temperatura e alla umidità), avere una buona capacità assorbente, consentire gli scambi gassosi di O₂, CO₂ e vapore acqueo con l'ambiente esterno, essere impermeabili all'ingresso di microrganismi, non aderire all'area cutanea della lesione e quindi non essere dolorose durante la rimozione. La scelta del tipo di medicazione da applicare dipenderà dalla localizzazione e dallo stato della lesione.

Le principali categorie di medicazioni avanzate sono rappresentate da: film semipermeabili, schiume in poliuretano, alginati, idrocolloidi e idrofibre.

Le medicazioni in film semipermeabili sono costituite da poliuretano poroso trasparente e adesivo che consente gli scambi gassosi, la rimozione di croste autolitiche oltre ad essere impermeabili ai batteri [64].

Le schiume in poliuretano si presentano in forma di schiuma pluristratificata o a base di poliuretano in forma gelificata e sono utilizzate nel trattamento delle ulcere degli arti inferiori e indicate per ustioni di I-II stadio e ulcere da pressione di I-IV stadio. I principali svantaggi delle medicazioni a base di schiuma di poliuretano sono la necessità di frequenti sostituzioni e l'inadeguatezza per ferite e cicatrici secche [65].

Gli alginati, derivati delle alghe brune, sono in grado di formare un gel capace di assorbire l'eccesso di essudato, riducono il dolore locale ed evitano di aderire alla ferita. Possono essere anche usati per veicolare farmaci, molecole segnale, o cellule staminali, al fine di migliorare la guarigione delle ferite [66].

Gli idrocolloidi sono medicazioni occlusive interattive costituite da due strati, quello interno, che è rappresentato da una sospensione di particelle colloidali idrofile, e quello esterno di poliuretano, impermeabile ai batteri. Pertanto, gli idrocolloidi sono una combinazione di agenti gelificanti con altri materiali quali elastomeri e rivestimenti adesivi [67]. Il principio d'azione degli idrocolloidi si basa sulla formazione di una fase gel a contatto con la superficie della ferita, che aiuta a idratare la ferita e proteggere il tessuto di granulazione grazie all'assorbimento dell'essudato da parte del materiale della medicazione.

Gli idrogel possono essere definiti come materiali polimerici altamente idratati la cui struttura è caratterizzata da legami crociati sia di natura fisica che chimica tra le catene polimeriche. Gli

idrogel vengono generalmente utilizzati per ferite non infette a basso contenuto di essudato. Sono spesso usati per trattare ustioni e ulcere e, inoltre, possono facilitare l'autolisi e la rimozione delle croste. Devono però essere sostituiti regolarmente ogni 2-3 giorni e necessitano di una medicazione secondaria che li fissi al letto della ferita^[68].

Le idrofibre sono composte da fibre idrocolloidalì non tessute e rappresentano una medicazione assorbente e resistente alla trazione. Si tratta di medicazioni che possono essere cambiate dopo una settimana^[7].

In generale, con l'uso delle medicazioni avanzate, si passa dal concetto di medicazione passiva a quello di medicazione attiva in grado di condizionare il microambiente della ferita^[6].

TIPO DI MEDICAZIONE	PRODOTTI COMMERCIALI	NOTE
Garze	Curity, Vaseline Gauze, Xeroform	Economiche, una volta asciutte possono causare ulteriori lesioni al cambio
Films	Bioclusive, Blisterfilm, Cutifilm, Flexi-grid, OpSite, Tegaderm	Occlusivi, mantengono l'umidità; indicati per ferite non essudative
Idrocolloidi	Aquacel, Comfeel, DuoDERM, Granuflex, Tegisorb	Lunghi tempi tra le sostituzioni, occlusivi e trattengono i liquidi, non adatti a ferite infette
Idrogel	Carrasyn, Curagel, Nu-Gel, Purilon, Restore, SAF-gel, XCell	Reidratanti per ferite asciutte, di facile sostituzione e rimozione, possono causare eccessiva idratazione
Schiume	3M Adhesive Foam, Allevyn, Lyofoam, Tielle	Moderatamente assorbenti e isolanti
Alginati	Algisite, Kaltostat, Sorbsan, Tegagen	Altamente assorbenti e emostatici
Idrofibre	Aquacel Hydrofiber	Altamente assorbenti
Sostituti ingegnerizzati della cute	Alloderm, Apligraf, Biobrane, Bioseed, Dermagraft, Epicel, EZ Derm, Hyalograft, Integra Omnigraft, Laserskin, Myskin, TransCyte	Sopperiscono all'insufficienza di fattori di crescita e citochine, costosi, rischio di infezione e di antigenicità.

Tabella 1. Prodotti attualmente disponibili per la medicazione delle ulcere. **Han, G. & Ceilley, R. (2017).**

Un altro tipo di medicazione degno di nota è quello sviluppato alla fine degli anni '90 che consiste in un dispositivo a pressione negativa in grado di mantenere l'ambiente umido, ottimizzare il flusso sanguigno e promuovere la chiusura della ferita grazie alla pressione esercitata, riducendo inoltre anche il rischio di infezioni^[69].

Alle moderne medicazioni possono spesso essere applicati degli adiuvanti come, ad esempio, fattori di crescita e cellule staminali che, interagendo con il microambiente della ferita, possono accelerare e facilitare il processo di guarigione.

In particolare, da molti anni la medicina rigenerativa si è avvalsa dell'uso di Plasma Ricco di Piastrine (PRP), quale sorgente di fattori biologicamente attivi da combinare a biomateriali/scaffold di diversa natura per ottimizzarne il rilascio nel sito della lesione. Il razionale della combinazione tra biomateriali e PRP è quello di concentrare i fattori di crescita in esso contenuti in una zona ben specifica e di rilasciarli progressivamente. Nella combinazione tra PRP e scaffold bisogna tenere conto di svariati fattori. Per quel che riguarda il PRP è importante valutarne la composizione e la concentrazione. Per quel che riguarda gli scaffold vanno valutate caratteristiche quali il gradiente di diffusione all'interno del biomateriale, l'erosione e la degradazione del materiale, i fattori che possono provocare fenomeni di osmosi, umidificazione o dissoluzione, i fattori che condizionano il tasso di rilascio dei fattori di crescita^[70].

Gli scaffold possono essere sia di origine naturale che sintetica; possono essere materiali stabili o che si biodegradano nel tempo nel corpo umano^[71]. Esistono diverse tecniche di costruzione degli scaffold, quali la preparazione di "fogli" cellulari che secernono matrice extracellulare, strutture porose composte da materiali biosintetici o naturali e biodegradabili, scaffold in matrice extracellulare decellularizzata, matrici di idrogel al cui interno sono intrappolate cellule^[72].

Gli scaffold devono essere caratterizzati da una porosità adeguata che permetta alle cellule, ai nutrienti e ai fattori di crescita di attraversarli; dovrebbero essere biodegradabili e quindi assorbibili, onde evitare di dover essere rimossi chirurgicamente; inoltre, il riassorbimento dovrebbe coincidere con i tempi di guarigione. Gli scaffold dovrebbero essere biocompatibili, non tossici ed avere adeguata resistenza fisica e meccanica^[73]. Oltre a ciò, devono essere dispositivi bio-funzionali e non devono interferire con la formazione di nuovo tessuto, cioè devono essere matrici biologiche che promuovano l'interazione cellulare, la migrazione e il differenziamento. Gli scaffold costituiti da biomateriali sintetici hanno il vantaggio di essere prodotti su larga scala a livello industriale con caratteristiche definite e parametri standard, come il peso e il tempo di degradazione; in più, possono essere facilmente cambiate alcune proprietà chimiche, quali le capacità adesive o le proprietà di biodegradabilità^[74].

Gli scaffold prodotti con materiali di origine naturale hanno la caratteristica di avere nella loro struttura delle sequenze di segnale che promuovono e mantengono l'adesione e la funzione

cellulare. Tra gli scaffold di origine naturale possiamo annoverare il collagene, la fibrina e l'acido ialuronico^[6].

Il collagene rappresenta la principale proteina strutturale dei tessuti animali; gioca un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità strutturale della matrice extracellulare e dà supporto fisico ai vari tessuti dell'organismo. Può essere estratto e purificato da diverse fonti biologiche, presenta bassa immunogenicità, possiede una struttura porosa, buona permeabilità e biocompatibilità oltre ad essere biodegradabile. Presenta, però, delle scarse proprietà meccaniche che ne limitano l'utilizzo. Questo ostacolo può essere superato utilizzando, insieme al collagene materiali biosintetici o modificando chimicamente la trama stessa del collagene^[75]. Gli scaffold a base di collagene possono essere adoperati come carrier per i fattori di crescita, che possono essere caricati nella matrice di collagene con vari metodi^[76].

La fibrina è un ottimo esempio di matrice temporanea, che viene sostituita dalla matrice extracellulare, risulta essere altamente immuno-compatibile in quanto la si può ottenere dai pazienti stessi a partire dal fibrinogeno; viene usata come veicolo di rilascio di fattori di crescita, citochine e altre molecole bioattive che controllano l'adesione e la proliferazione cellulare, la migrazione cellulare e la produzione di matrice extracellulare.^[36]

L'acido ialuronico rappresenta un materiale di grande interesse nella medicina rigenerativa ed è stato oggetto di studio per più di un secolo. Soprattutto nella seconda metà del XX secolo si è sviluppato sempre un più crescente interesse verso tale materiale per prodotti medici e applicazioni cliniche^[77]. L'acido ialuronico è un polimero formato da glicosamminoglicani, abbondante nei tessuti epiteliali, connettivi e nervosi dei vertebrati. È molto presente in natura e lo ritroviamo nell'uomo, negli animali e in alcuni batteri^[78]. In base al peso molecolare è in grado di esercitare funzioni diverse, come è stato descritto ad esempio relativamente alle proprietà anti infiammatorie della forma ad alto peso molecolare rispetto alla forma a basso peso molecolare che manifesta proprietà pro-infiammatorie^[79].

L'acido ialuronico ha guadagnato un enorme interesse da parte delle industrie farmaceutiche, cosmetiche, mediche e alimentari. Le proprietà rigenerative, immunosoppressive, oltre alle caratteristiche di non immunogenicità, adesività, igroscopicità, elasticità e lubrificazione, biocompatibilità e biodegradabilità, fanno dell'acido ialuronico un prodotto molto versatile di grande interesse produttivo, ottimizzato al fine di ottenere dei prodotti standardizzati e di grande

qualità^[80]. L'acido ialuronico viene, oggi, prodotto tramite fermentazione microbica su larga scala e il prodotto ottenuto è biocompatibile con l'uomo grazie al fatto che la struttura dell'acido ialuronico è molto conservata nelle differenti specie^[78].

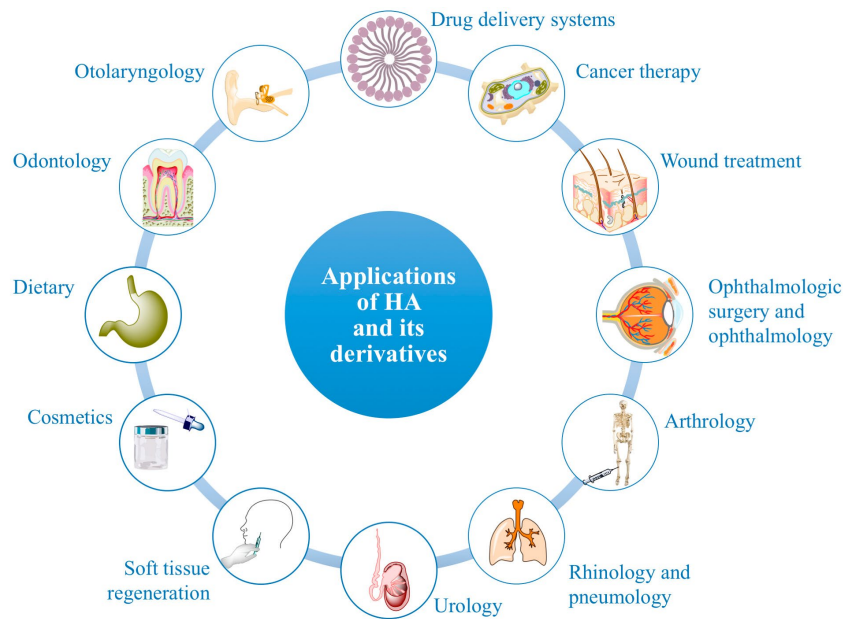


Figura 4. Applicazioni dell'Acido Ialuronico in diversi campi. **Fallacara, A. et al. (2008).**

Nella guarigione delle ferite l'acido ialuronico rappresenta un possibile trattamento per le sue capacità di stimolazione dei processi rigenerativi quali la promozione della proliferazione, migrazione e adesione dei fibroblasti nella sede della ferita. L'acido ialuronico e i suoi derivati infatti vengono utilizzati come tali nel trattamento di lesioni cutanee oppure possono essere arricchiti di sostanze terapeutiche, agendo da carrier per il rilascio di farmaci^[81].

PRP: natura, storia, preparazione

Il Plasma Ricco di Piastrine viene comunemente utilizzato in differenti campi medici quali chirurgia plastica, chirurgia pediatrica, cardiocirurgia, chirurgia maxillofacciale, oftalmologia, ortopedia, dermatologia, ginecologia e urologia^[82] per la capacità di favorire la rigenerazione tissutale.

Storia del Plasma Ricco di Piastrine (PRP)

La nozione e la descrizione del PRP trova le sue origini nel campo dell'ematologia^[26]. Il termine venne coniato negli anni '70 al fine di descrivere il plasma con un contenuto piastrinico superiore a quello presente nel sangue periferico, il cui utilizzo era destinato al trattamento dei pazienti con trombocitopenia^[83]. In medicina trasfusionale i concentrati piastrinici vedono il loro esordio principalmente per il trattamento emostatico in campo emorragico. L'uso dei derivati del sangue per aiutare a controllare le emorragie e sigillare le ferite è una tecnologia nota da più di 50 anni e vede nelle colle di fibrina i primi dispositivi utilizzati^[84]. Di conseguenza, l'uso di concentrati piastrinici per migliorare la guarigione e sostituire le colle di fibrina è stato esplorato considerevolmente negli ultimi decenni^[85].

Nell'ultimo ventennio le terapie basate sull'uso del PRP hanno generato sempre un maggiore interesse per il loro potenziale in medicina rigenerativa come terapia in un ampio range di patologie croniche e acute. L'uso del PRP autologo ha trovato largo impiego grazie alla sua facile manipolazione e ampia caratterizzazione. Inoltre, regolando la tecnica di processazione del campione ematico e i parametri della centrifugazione e dell'attivazione delle piastrine, è possibile dosare le quantità di fattori di crescita e di proteine liberate durante la fase di degranulazione delle piastrine^[86].

Il PRP per molto tempo utilizzato in forma autologa, può essere prodotto anche in forma allogenica utilizzando il sangue raccolto dai centri trasfusionali, favorendo una maggiore

riproducibilità del prodotto; inoltre l'uso della forma allogenica potrebbe sopperire più facilmente alla costante domanda clinica del prodotto per la riparazione dei tessuti [26].

Le terapie con PRP rivestono importanza nella riparazione tissutale grazie al loro aiuto nel generare un ambiente interno che contribuisce al ripristino dell'omeostasi tissutale, fornendo molecole quali citochine e fattori di crescita che migliorano i meccanismi regolanti il processo infiammatorio, l'angiogenesi e la sintesi e il rimodellamento di nuovi tessuti [87].

Dati clinici suggeriscono che il PRP si può sfruttare tramite meccanismi rigenerativi diversi in condizioni patologiche differenti; per esempio, durante interventi chirurgici l'uso del PRP porta alla generazione di trombina e fibrina, prevenendo sanguinamenti e riducendo la necessità di ricorrere a trasfusioni [88]. Attraverso la secrezione di citochine, chemiochine e fattori di crescita il PRP svolge un ruolo chemiotattico paracrino che modula l'infiammazione e permette una risposta analgesica [89].

Il PRP rappresenta un trattamento alternativo alle ferite recalcitranti: queste sono caratterizzate da un ambiente pro-infiammatorio e ricco di attività proteasica, che inevitabilmente altera le concentrazioni fisiologiche dei fattori di crescita in sede, ma che vengono reintegrate dalle elevate concentrazioni presenti nel PRP [90]. Sulla base di evidenze istologiche il PRP iniettato nel derma e nell'ipoderma induce l'attivazione dei fibroblasti, la deposizione di nuovo collagene, la formazione di nuovi vasi sanguigni e la formazione di tessuto adiposo [91,92].

Biologia delle piastrine

Tutte le cellule del sangue derivano da una comune cellula staminale pluripotente, che si differenzia in diverse linee cellulari. Ognuna di queste serie di cellule contiene precursori che possono dividersi e maturare.

Le piastrine furono scoperte nel 1882 da Giulio Bizzozzero, medico e ricercatore di livello internazionale, il quale le definì come terzo componente morfologico del sangue, captando anche la loro importanza nel processo della trombosi. Esse sono il più piccolo degli elementi figurati del sangue: posseggono un diametro di 2-4 micron. Costituite da frammenti cellulari arrotondati di megacariociti, sono prive di nucleo e ribosomi. Una volta prodotte dal midollo

osseo, partono da esso, ma circa 1/3 di esse viene intrappolato e distrutto dalla milza, organo linfoide situato nella cavità addominale sinistra, con funzione di filtraggio e controllo delle infezioni. I restanti 2/3 di piastrine prodotte rimangono nel sangue dai 7 ai 10 giorni e vengono utilizzate in caso di evenienza. Il conteggio fisiologico delle piastrine circolanti nel flusso sanguigno varia da 150.000 a 400.000 piastrine per μl .

Le piastrine rappresentano lo step finale della serie piastrinopoietica, la quale inizia con il megacarioblasto, che attraverso varie fasi, passa allo stadio di megacariocito con un nucleo poliploide e un citoplasma suddiviso da strati di membrane. I megacariociti rappresentano lo 0.1-0.5% delle cellule midollari nucleate e sono localizzate vicino ai seni capillari midollari. La proliferazione, la differenziazione e la maturazione dei megacariociti è stimolata da diverse citochine, dalle interleuchine IL-3, IL-6 e IL-11, e dalla trombopoietina^[93]. La membrana cellulare delle piastrine è caratterizzata da una serie di invaginazioni che danno origine al sistema canalicolare aperto il quale aumenta la superficie di scambio con l'esterno. A questo si associa un sistema di canalicoli chiusi, isolati dall'esterno, che prende il nome di sistema tubulare denso, sede di alcuni processi biochimici^[94]. Sulla membrana cellulare piastrinica sono presenti molecole recettoriali di adesione. La loro forma è controllata dal citoscheletro grazie ad un fascio di microtubuli e da microfilamenti contrattili ancorati alle membrane cellulari. Lo strato più esterno della membrana plasmatica delle piastrine è costituito da una superficie ricoperta da glicoproteine che giocano un ruolo importante nelle varie funzioni piastriniche quali l'adesione e l'aggregazione, contribuendo così all'emostasi. Ci sono molti recettori sullo strato più esterno della membrana plasmatica delle piastrine, che si legano a vari agenti di adesione, di aggregazione, di inibizione e fattori pro-coagulanti. Questi comprendono le selectine (come GMP 140 o P-selectina), le integrine (come GP I, GP II, GP III, GP IV, GP V), le immunoglobuline e altri recettori, come quelli per l'adenosina difosfato (ADP), il collagene, l'adrenalina, la trombina etc. che partecipano all'adesione delle piastrine, all'aggregazione e alla coagulazione^[95]. All'interno del citoplasma le piastrine contengono gli α - granuli che rappresentano la fonte più abbondante di proteine secrete dalle piastrine^[96].

I granuli densi contengono al loro interno molecole di ADP / ATP, polifosfato inorganico, pirofosfato, serotonina e Ca^{2+} . L'ADP e l'ATP agiscono come cofattori di aggregazione piastrinica. L'ATP nello specifico interagisce con il collagene^[97]. Il calcio svolge un ruolo centrale

nel processo di guarigione delle ferite: è in grado di modulare la proliferazione e la differenziazione dei cheratinociti, permette la formazione di fibrina e l'aggregazione piastrinica.

Negli α -granuli ritroviamo proteine adesive, fattori di crescita e citochine, e sono presenti anche dei recettori di membrana. Le proteine con attività adesiva più espresse sono rappresentate dal fibrinogeno, dalla vitronectina e dalla trombospondina-1: sono proteine che intervengono durante le fasi dell'emostasi, partecipando alla genesi del trombo^[98]. Tra i fattori mitogeni che si accumulano negli α -granuli ritroviamo il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita basale dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita TGF- β , il fattore di crescita epidermica derivato dalle piastrine (PDEGF) e il fattore di crescita simile all'insulina-1 (IGF-1). Tutti questi fattori sono indispensabili per la rigenerazione tissutale, oltre al loro essenziale coinvolgimento nella stimolazione della chemiotassi, della proliferazione cellulare e della maturazione^[99].

Tra le citochine rilasciate, la più abbondante è rappresentata dal fattore piastrinico 4 (PF4), una proteina caricata positivamente che si lega ai glicosamminoglicani. La PF4, oltre a giocare un ruolo nell'emostasi, è una proteina chemiotattica per i monociti e i neutrofili, possiede un'attività immunoregolatoria ed è coinvolta in una varietà di stati patologici, tra cui lo shock settico^[100]; possiede inoltre un ruolo inibitorio sulla proliferazione delle cellule endoteliali^[101]. La proteina basica strutturalmente correlata (PBP) funge da precursore di prodotti attivi come β -tromboglobulina e NAP-2 (proteina attivante i neutrofili-2), una citochina chemiotattica nei confronti dei neutrofili^[102]. La membrana degli α -granuli contiene dei recettori che hanno un ruolo nella formazione dei trombi e nelle interazioni delle piastrine con le altre cellule^[103]. Sulle piastrine attivate è presente la P-selectina che ha la funzione di mediare i rapporti tra le piastrine e le cellule endoteliali e immunitarie. Infatti, tali recettori intervengono nella fase iniziale di diapedesi dei leucociti^[104]. Questi fenomeni iniziali spingono i leucociti a produrre una vasta gamma di citochine e chemiochine^[105].

Le piastrine rappresentano le protagoniste nelle prime fasi nell'emostasi primaria in caso di lesione. Le glicoproteine presenti sulla superficie piastrinica permettono l'adesione delle piastrine alle pareti danneggiate dei vasi che espongono matrice extracellulare e collagene; inoltre il danno vascolare riduce la produzione di alcune molecole che inibiscono l'adesione piastrinica^[106].

Una volta avvenuto il legame tra sito della lesione e piastrine si assiste alla produzione di trombossano A2 da parte di queste ultime e al reclutamento di ulteriori piastrine circolanti. I granuli densi rilasciano ADP. Si avvia la formazione dei trombi e la formazione del tappo emostatico primario, anche grazie all'azione della trombina circolante. All'emostasi primaria segue la secondaria con stabilizzazione del tappo trombinico grazie alla deposizione di fibre di fibrina^[107].

I fattori di crescita coinvolti nella funzione rigenerativa del PRP sono elencati nella tabella sottostante.

GF e Citochine	Fonte cellulare	Funzioni ed effetti
PDGF (AA-BB-AB)	Piastrine, cellule endoteliali, macrofagi, muscolatura liscia	Effetto mitogeno per cellule mesenchimali e osteoblasti; stimola la chemiotassi e la mitogenesi di fibroblasti, cellule gliali e cellule della muscolatura liscia; regola la secrezione di collagenasi e la sintesi di collagene; stimola la chemiotassi di macrofagi e neutrofili
VEGF	Piastrine, macrofagi, cheratinociti, cellule endoteliali	Incrementa l'angiogenesi e la permeabilità vasale; stimola la mitogenesi per le cellule endoteliali
EGF	Piastrine, macrofagi, monociti	Proliferazione dei cheratinociti, fibroblasti; stimola la mitogenesi delle cellule endoteliali
(a-b)-FGF	Piastrine, macrofagi, cellule mesenchimali, condrociti, osteoblasti	Promuovono la crescita e la differenziazione dei condrociti e degli osteoblasti; stimolano la mitogenesi di cellule mesenchimali, condrociti e osteoblasti
CTGF	Piastrine, fibroblasti	Promuove l'angiogenesi, la rigenerazione della cartilagine, l'adesione piastrinica
IGF-1	Piastrine, plasma, cellule epiteliali, cellule endoteliali, fibroblasti, osteoblasti, matrice ossea	Attività chemiotattica per fibroblasti, stimolazione della sintesi proteica. Migliora la formazione dell'osso attraverso la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti

GF e Citochine	Fonte cellulare	Funzioni ed effetti
HGF	Piastrine, cellule mesenchimali	Regola la crescita cellulare e la motilità delle cellule epiteliali e endoteliali; supporta la riparazione e la neo-vascularizzazione dell'epitelio durante la guarigione delle ferite
Ang-1	Piastrine, neutrofilo	Induce l'angiogenesi stimolando la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali. Supporta e stabilizza lo sviluppo dei vasi sanguigni
PF4	Piastrine	Richiama i leucociti e regola la loro attivazione. Attività microbica
SDF-1 α	Piastrine, cellule endoteliali, fibroblasti	Richiama le cellule CD34+, induce la proliferazione e la differenziazione in progenitori endoteliali stimolando l'angiogenesi. Richiama le cellule staminali e i leucociti

Tabella 2. Parziale lista dei fattori di crescita e delle citochine contenuti nelle piastrine. Tabella modificata da Everts et al. 2020.

Preparazione e classificazione

L'impiego del PRP come dispositivo medico è caratterizzato dall'eterogeneità delle sue formulazioni a causa di una scarsa procedura di standardizzazione. In letteratura è riportata una ampia variabilità riguardo al contenuto assoluto delle piastrine, alla purezza e alle proprietà biologiche del PRP e dei prodotti ad esso correlati: tutto questo influisce sull'efficacia biologica e sui risultati ottenuti dagli studi clinici. La variabile principale nella metodologia di preparazione del PRP è rappresentata dalla centrifugazione del prodotto di partenza (sangue intero o buffy coat): differenze nella velocità e nel tempo di centrifugazione determinano cambiamenti significativi nella resa, concentrazione, purezza, vitalità e stato di attivazione delle piastrine isolate^[108].

Gli effetti rigenerativi e terapeutici del PRP derivano dal rilascio dei vari fattori di crescita. È corretto presumere che dosaggi piastrinici più elevati porteranno ad una maggiore

concentrazione locale di fattori di crescita rilasciati. Tuttavia, la concentrazione delle piastrine e dei fattori di crescita rilasciati potrebbero non essere facilmente controllati perché vi sono marcate differenze biologiche interindividuali, variabilità nella conta piastrinica di base^[109], differenze tra i metodi di preparazione del PRP^[110]. Inoltre ritroviamo alcuni fattori di crescita anche nella frazione plasmatica del PRP; di conseguenza una concentrazione elevata di piastrine non influisce molto sulle proprietà rigenerative di questi fattori^[99]. In alcuni studi è stato inoltre dimostrato che concentrazioni troppo elevate di fattori di crescita possono avere effetti controproducenti ai fini rigenerativi^[111].

Il PRP utilizzato in clinica attualmente è caratterizzato da una concentrazione piastrinica circa cinque volte superiore a quella fisiologica nel sangue^[112], corrispondente a circa $1-1,5 \times 10^6$ piastrine per μL . L'uso della concentrazione piastrinica "terapeutica" di circa 1×10^6 piastrine/ μl è stata mostrata da Marx relativamente all'uso del PRP nell'accelerazione del processo di guarigione dell'osso e dei tessuti molli^[113]. Questi risultati sono stati confermati in uno studio sulla fusione lombare che ha dimostrato una fusione significativamente maggiore quando la dose piastrinica era maggiore di $1,3 \times 10^6$ piastrine/ μl ^[114]. È stato poi dimostrato che per avere meccanismi di riparazione tissutali che inducano angiogenesi è necessaria una concentrazione di piastrine pari a $1,5 \times 10^9/\text{ml}$, dimostrando che concentrazioni più alte riducono il potenziale angiogenico delle piastrine^[115].

Le piastrine presenti nel PRP dovrebbero stimolare la proliferazione cellulare, la sintesi di fattori mesenchimali e neurotrofici, contribuire alla migrazione cellulare e stimolare le attività immunomodulanti^[116].

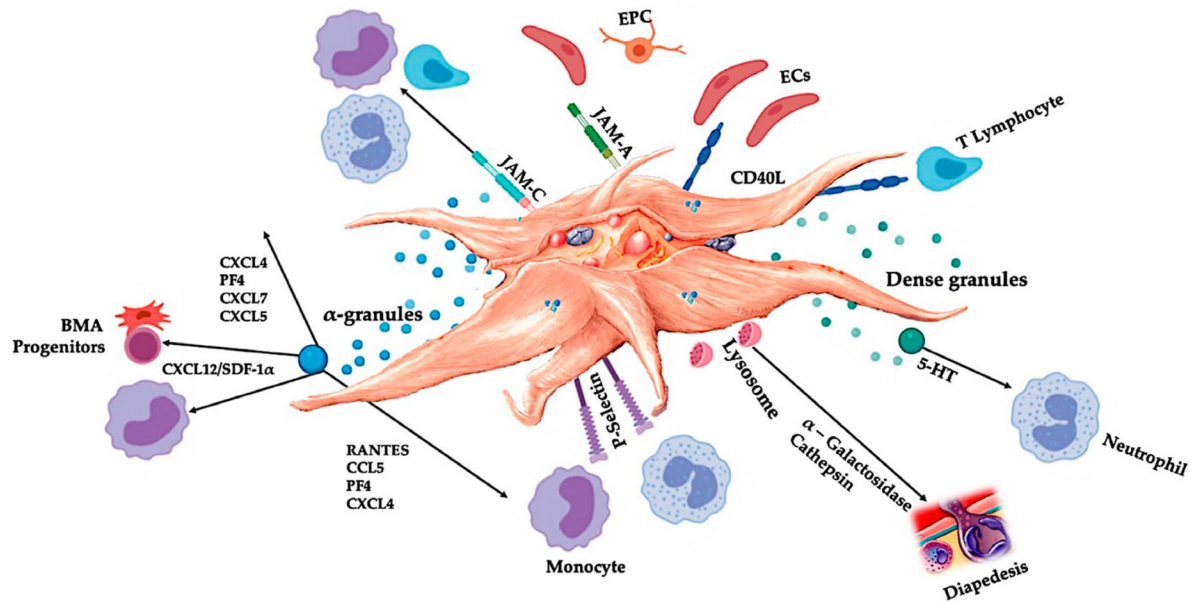


Figura 5. Piastrine attivate con rilascio dei fattori di crescita e molecole di adesione e loro interazioni cellulari.
Everts P. et al. (2020).

In letteratura è presente un'ampia varietà di protocolli usati per la preparazione del PRP che si ottiene tramite la tecnica della centrifugazione con la conseguente separazione dei componenti del sangue in base alla loro densità e morfologia, giocando di volta in volta su tempi e forze di centrifugazione. Molti protocolli prevedono l'utilizzo di semplice materiale di laboratorio, altri invece l'utilizzo di kit commerciali più o meno complessi. Data la varietà di metodiche usate per la produzione del PRP nasce la necessità di definire, scientificamente, dei criteri riconosciuti al fine di classificare le diverse preparazioni^[117].

La classificazione che ha riscontrato successo nella comunità scientifica è quella proposta da Dohan Ehrenfest che si basa su tre principali parametri^[85]: la metodica utilizzata o i kit, la concentrazione piastrinica, le caratteristiche fisiche e chimiche del reticolo di fibrina.

Tenendo conto di questi parametri si possono definire 4 tipologie di concentrato piastrinico e in ciascuna di queste categorie il concentrato può essere preparato sia mediante kit automatizzato che manualmente.^[85]

Plasma puro ricco di piastrine (P-PRP)	Povero di leucociti, bassa densità della rete fibrinica
Plasma ricco di piastrine con leuciti (L-PRP)	Contiene leucociti, bassa densità della rete fibrinica
Plasma puro ricco di fibrina (P-PRF)	Senza leucociti e alta densità della rete fibrinica
Plasma ricco di fibrina e leucociti (L-PRF)	Contiene leucociti, alta densità della rete fibrinica

Tabella 3. Classificazione di Ehrenfest. **Ehrenfest D. et al. (2009)**.

- a) Plasma puro ricco di piastrine (P-PRP): questo preparato è povero di leucociti e presenta una rete di fibrina a bassa densità dopo l'attivazione. Può essere utilizzato come soluzione liquida o in forma di gel attivato.
- b) PRP ricco di leucociti (L-PRP): è un preparato in cui il numero di leucociti è significativo o anche superiore a quello del sangue di partenza e con una rete di fibrina a bassa densità dopo l'attivazione. Può essere utilizzato come soluzione liquida o in forma di gel attivato.
- c) Plasma puro ricco di fibrina (P-PRF): questo preparato presenta una rete di fibrina ad alta densità. Si presenta solo in una forma di gel attivato e non può essere iniettato o utilizzato come le colle di fibrina tradizionali. Tuttavia, grazie alla densa matrice di fibrina, può essere maneggiato come un vero materiale solido per altre applicazioni.
- d) Plasma ricco di fibrina e leucociti (L-PRF): è un preparato ricco in leucociti e con una rete di fibrina ad alta densità. Esiste solo in una forma di gel attivato e non può essere iniettato o utilizzato come le colle di fibrina tradizionali^[118].

Il PRP generalmente viene preparato partendo da un campione ematico prelevato dal paziente stesso prima del trattamento. La raccolta del campione viene effettuata in provette contenenti un anticoagulante al fine di prevenire l'attivazione delle piastrine e la formazione del coagulo. Tra i differenti anticoagulanti disponibili, i sali di citrato rappresentano quello di

elezione in quanto non interferiscono con la biologia piastrinica e permettono al PRP di gelificare aggiungendo degli ioni di Ca^{2+} ^[117].

I principali metodi di produzione del PRP sono i seguenti:

- a) utilizzo di sangue fresco da venipuntura che viene sottoposto a una prima centrifugazione a bassa velocità al fine di far precipitare i globuli rossi, formare un anello sopra i globuli rossi contenente i globuli bianchi e infine il plasma che conterrà le piastrine in sospensione; dopo questa prima separazione si provvede a prelevare il solo plasma per avere un prodotto povero di leucociti (P-PRP) oppure il plasma con l'anello di globuli bianchi nel caso si voglia ottenere un PRP ricco in leucociti (L-PRP). Il plasma surnatante viene poi sottoposto a una seconda centrifugazione ad alta velocità, al fine di ottenere un concentrato piastrinico^[85,119] [Figura 6];
- b) uso di *buffy coat* derivante da sangue intero e conservato a temperatura di laboratorio (20-24°C); questo poi va fatto centrifugare ad alta velocità al fine di ottenere tre strati: globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, plasma povero di piastrine (PPP); viene poi eliminato il PPP e raccolto lo strato intermedio; questo potrà essere o meno privato dei globuli bianchi^[117];
- c) il sistema aferetico permette di ottenere un PRP più standardizzato ma ancora oggi di poco utilizzo^[120].

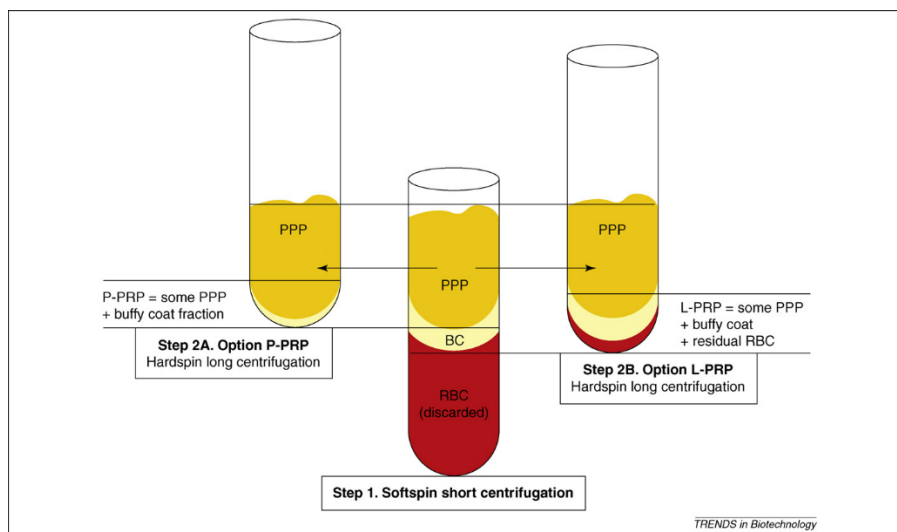


Figura 6. Metodi di preparazione del PRP puro privo di leucociti (P-PRP) e del PRP ricco di leucociti (L-PRP).

Dohan Ehrenfest et al. 2009

La presenza di leucociti nelle preparazioni di PRP dipende quindi dal metodo scelto per la preparazione e può variare notevolmente.

In letteratura è stato mostrato che preparazioni di PRP ricche in leucociti e preparazioni povere in leucociti avevano profili di sicurezza simili^[121] e che le reazioni avverse del PRP potrebbero non essere direttamente correlate alla concentrazione dei leucociti. In un altro studio il PRP ricco in leucociti non ha portato a modificazioni nei livelli sistemici o locali delle interleuchine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17)^[122]. I risultati ottenuti suggeriscono che il ruolo bioattivo dei leucociti nel PRP possa derivare dalla comunicazione di questi con le piastrine e che tale interazione promuova la sintesi di fattori che intervengono nel processo infiammatorio^[123]. Un altro dato interessante sulla presenza o meno dei leucociti nella preparazione del PRP interessa le colture di staminali mesenchimali. Risultati sperimentali suggeriscono che la presenza di leucociti apporti un aumento nella proliferazione delle cellule staminali mesenchimali in modo maggiore rispetto al PRP povero di leucociti^[124]. Meno chiaro è il ruolo della contaminazione da parte dei globuli rossi nel PRP. Gli eritrociti potrebbero andare incontro a rottura della membrana cellulare con conseguente rilascio di emoglobina e prodotti della sua degradazione, come gruppi eme e ferro. Tali prodotti sono causa di effetti deleteri sui tessuti in quanto causano stress ossidativo, perdita di ossido nitrico, attivazione dei processi

infiammatori e immunosoppressori, con fenomeni di vasocostrizione locale e quindi conseguente danno tessutale. Il rilascio di una molecola citochinica chiamata Fattore Inibitorio della Migrazione dei Macrofagi inibisce la migrazione di monociti e macrofagi, esercita un'attività pro-infiammatoria sui tessuti circostanti, con conseguente inibizione della migrazione delle cellule staminali e la proliferazione dei fibroblasti, provocando una significativa disfunzione cellulare locale. Pertanto, è importante limitare la contaminazione da globuli rossi nelle preparazioni di PRP^[99].

La resa piastrinica del PRP è condizionata da vari fattori:

- a) velocità di centrifugazione, che è importante per ottenere un buono strato di piastrine;
- b) fattori legati al paziente stesso, come alimentazione, orario del prelievo^[125];
- c) modalità di prelievo del campione, in cui sono da preferire aghi con un diametro superiore ai 22G^[117];
- d) aspetti tecnici, quali la scelta dell'anticoagulante (ACD-A è quello di elezione) e il pH che ne deriva^[126].

I PRP che prevedono la presenza di leucociti possono contribuire in modo significativo alla modulazione immunitaria e alla rigenerazione dei tessuti in virtù dell'impatto sui meccanismi immunitari che i leucociti giocano sulle lesioni croniche; specificamente, i linfociti producono fattori di crescita simili all'insulina e supportano il rimodellamento dei tessuti. La presenza dei leucociti nelle preparazioni sembra rendere questi prodotti preferibili ai PRP privi di tale componente cellulare^[127].

Quando il prodotto deve essere applicato, le piastrine devono essere attivate in quanto l'attivazione porta ad un incremento della degranulazione e quindi dei fattori di crescita^[17].

Esistono molti metodi di attivazione delle piastrine. Alcuni attivatori esogeni sono rappresentati da calcio, trombina e collagene di tipo 1 e possono essere usati in singolo o in combinazione tra loro in base ai protocolli usati^[128]. Anche la dose di attivatori è importante, si è osservato che se calcio e trombina sono usati ad alte dosi si ha un rilascio elevato di fattori di crescita, mentre a dosi basse il rilascio dei fattori procede in modo più graduale e lento^[17]. Il cloruro di calcio utilizzato da solo porta ad un rilascio che aumenta nelle 24 ore, mentre utilizzato in

associazione alla trombina porta ad un rilascio dei fattori più immediato. L'utilizzo della trombina da sola porta ad una coagulazione più rapida rispetto all'uso del solo cloruro di calcio^[129].

Applicazioni del PRP

L'idea di utilizzo del PRP in medicina è quella di creare un microambiente ottimale per la guarigione dei tessuti sfruttando le diverse proprietà del contenuto piastrinico.

Nella guarigione delle lesioni è necessario andare ad intervenire nella proliferazione e migrazione cellulare, nella sintesi di matrice extracellulare e nella regolazione dell'infiammazione e dell'angiogenesi. Il PRP riesce ad agire su tutti questi meccanismi grazie ai diversi componenti in esso presenti^[26].

In base alle necessità mediche si possono modificare alcune caratteristiche del PRP, come la composizione cellulare, la concentrazione delle molecole presenti e il modo in cui il PRP viene attivato; ad esempio, modificando il numero dei leucociti contenuti si possono avere differenti proprietà immunomodulatorie e la produzione di alcune molecole che possono controllare l'infiammazione^[130].

Le capacità rigenerative del PRP, la facilità di preparazione, la sicurezza del prodotto hanno reso questa tecnologia di ampio uso in diversi ambiti medici che richiedono la rigenerazione dei tessuti. Si è quindi rapidamente affermato come un prodotto di interesse in diversi campi. Il PRP può agire in sinergia con le terapie fisiche, farmacologiche e chirurgiche che vengono normalmente utilizzate, andando a migliorare la risposta fisiologica di guarigione^[131].

In ortopedia i fattori di crescita piastrinica sono da tempo utilizzati nelle malattie degenerative delle articolazioni del ginocchio, dell'anca e della caviglia e nel trattamento delle tendinopatie, dimostrando un migliore effetto terapeutico rispetto a quello dell'acido ialuronico o delle infiltrazioni di cortisone^[132].

Allo stesso modo, negli atleti, dove le strutture tendinee sono sempre sottoposte a forti sollecitazioni e vanno incontro a microtraumi, l'utilizzo del PRP si è dimostrato efficace nei processi di recupero.

In medicina estetica il PRP è usato, da solo o in associazione, per contrastare l'invecchiamento cutaneo, in quanto alcuni fattori di crescita stimolano la produzione di collagene e acido ialuronico (efficaci, non di meno, per la riduzione dei segni di acne); più recenti, in tricologia, sono i protocolli chirurgici per il trattamento dell'alopecia aerata e per l'alopecia androgenetica: i fattori di crescita rilasciati dalle piastrine agiscono direttamente sull'area di Bulge (serbatoio di cellule staminali, "sacca" da cui migrano per differenziarsi nella papilla follicolare), stimolando le cellule staminali in essa contenute, la formazione di nuovi follicoli e la neo-vascolarizzazione^[133].

In dermatologia, l'applicazione del PRP nei siti di lesioni croniche, come le ulcere venose o diabetiche, rigenerando il tessuto degenerato e rimodellando la parte lesa, consente una guarigione delle ferite più rapida rispetto alle medicazioni classiche. Il PRP è usato anche nei trattamenti della psoriasi, dell'acne e delle cicatrici^[134].

In oculistica il PRP trova particolare applicazione nelle patologie del film lacrimale (secchezza oculare, cheratopatie, alterata densità lacrimale, scorretto uso di lenti a contatto) che generano disturbi corneali e della visione: tramite il PRP è possibile preparare un collirio personalizzato (in monodosi) i cui fattori di crescita piastrinici aiutano a ristabilire la normalità del film lacrimale, situazione sempre più difficoltosa utilizzando colliri, sostituti lacrimali o altre sostanze farmacologiche medicate^[135]. La durata delle applicazioni e il metodo di somministrazione varia in base ai gruppi sperimentali presi in esame. Dai dati raccolti nei vari studi si evidenzia che il prodotto ad uso oftalmico risulta essere un prodotto sicuro, che apporta miglioramenti alla qualità di vita del paziente.^[136]

PRP e ulcere

Con l'aumento dell'età media della popolazione le ferite croniche, difficili da curare, rappresentano una sfida non indifferente per il sistema sanitario che si fa carico delle spese sanitarie e che grava sulla popolazione intera. Nei paesi industrializzati si stima che 1-2% della popolazione avrà a che fare nella sua vita con una ulcera cronica. Le ferite croniche derivano spesso da patologie metaboliche come il diabete. Si stima che circa il 25% dei pazienti diabetici

svilupperà una ulcera diabetica e che di queste circa il 12% richiederanno un intervento di amputazione^[137].

Le ulcere croniche rappresentano una sfida importante in quanto sono complesse da trattare, spesso sono accompagnate da infezioni che si sovrappongono e presentato un alterato afflusso sanguigno. Anche la glicazione, propria dei pazienti diabetici, comporta una compromissione nel normale processo di guarigione delle ferite^[138].

L'uso del PRP è rientrato nella pratica comune nella gestione e cura delle ulcere, soprattutto di quelle diabetiche. Nei pazienti diabetici sono presenti diversi difetti della rigenerazione come una produzione limitata di fattori di crescita, una risposta angiogenica difettosa, alterazioni della risposta dei macrofagi^[139].

Le piastrine rappresentano la fonte principale di PDGF che ha la funzione di attrarre i monociti che vengono convertiti in macrofagi e che a loro volta producono altro PDGF. Il PDGF, inoltre, stimola la produzione di fibronectina e acido ialuronico, che sono i principali componenti della matrice extracellulare. Migliorando la proliferazione dei fibroblasti aumenta anche la produzione di collagene^[140]. I TGF- α e β hanno funzione mitogena per i fibroblasti e per i cheratinociti, stimolando la sintesi di collagene, di tessuto di granulazione e riepitelizzazione^[141]. L'EGF incrementa il numero dei fibroblasti nella ferita che produrranno collagene; inoltre stimola la crescita delle cellule epiteliali aumentando l'epitelizzazione delle ferite e migliorando i tempi di rigenerazione delle ferite nelle ulcere diabetiche^[142]. Anche FGF e IGF giocano un ruolo fondamentale nella proliferazione cellulare e nell'angiogenesi, supportando la formazione del tessuto di granulazione e la conseguente riepitelizzazione del tessuto leso^[143].

Influenze del PRP sulla rigenerazione tessutale nelle ferite

Gli insegnamenti della medicina hanno tradizionalmente trattato l'emostasi come un processo con il solo scopo di arginare la perdita di sangue, indipendentemente dalla riparazione tessutale. In questo quadro, i vari tipi di PRP sono stati sviluppati alla fine degli anni '80 come alternative autologhe ai sigillanti di fibrina, che all'epoca erano ampiamente utilizzati in molteplici campi della chirurgia in Europa. I PRP sono emersi come emostatici alternativi, sfruttando fibrinogeno/fibrina autologhi insieme all'aggregazione e all'adesione delle piastrine. La

GPIIb/IIIa è il principale mediatore dell'aggregazione piastrinica grazie alla sua capacità di legare le proteine plasmatiche – tra cui fibrinogeno/fibrina e fattore di Von Willebrand – alle piastrine attivate. Inoltre, è stato dimostrato che un certo numero di componenti della matrice extracellulare, in particolare, collagene, condroitine e ialuronati, interagiscono o si legano al coagulo PRP in via di sviluppo^[26].

Il PRP influenza l'infiammazione e la risposta immunitaria innata grazie al rilascio di numerose chemiochine. Le principali chemiochine che giocano un ruolo nella fase infiammatoria sono rappresentate da CXCL7, PF4 e CCL5^[144]. La CXCL7 richiama e attiva i neutrofilii; la CCL5 provvede ad attivare i linfociti T, gli eosinofili, i basofili le cellule NK e le cellule dendritiche; il PF4 richiama i monociti. Inoltre, il PF4 è in grado di modificare il fenotipo dei monociti macrofagi spingendo verso un pathway con attività anti-infiammatoria^[145].

I mediatori rilasciati dalle piastrine presenti nel PRP giocano quindi un duplice ruolo pro-infiammatorio e anti-infiammatorio. Tali caratteristiche hanno favorito l'uso del PRP in varie patologie associate al dolore cronico: in particolare HGF e TNF- α agiscono interferendo con la via di attivazione di NF- κ B e inibendo quindi la produzione di citochine pro-infiammatorie^[146].

Il PRP contiene sia molecole pro-angiogeniche che anti-angiogeniche contenute negli α -granuli e nei granuli densi delle piastrine che giocano un ruolo nei processi di controllo dell'angiogenesi agendo sui loro specifici recettori^[147][Tabella 4]

Pro-angiogenici	Anti-angiogenici
VEGF	TGF-β1
PDGF	PAI
TGF-β1	TSP
EGF	Angiostatina
Serotonina	Endostatina
SDF-1	PF4
Angiopietina 1 e 2	CXCL4L
MMP 1 e 2	TIMPS
IL-8	

Tabella 4. Fattori di crescita derivati dalle piastrine e loro attività pro/anti-angiogenica. **Walsh, T. G. et al. (2015).**

Nonostante l'attività anti-angiogenica delle molecole presenti nelle piastrine è importante sottolineare come l'attività principale delle piastrine sull'angiogenesi sia quella pro-angiogenica^[148]. L'uso di PRP induce l'angiogenesi, la vasculogenesi e l'arteriogenesi grazie al legame di SDF-1 (Fattore 1 derivato dalle cellule stromali) che si lega alla CXCR4 presente sulle cellule progenitrici endoteliali^[99]. In letteratura è anche stato dimostrato che i fattori angiogenici PDGF-BB e VEGF hanno una attività maggiore se lavorano in sinergia – rispetto alle attività dei singoli fattori – nella formazione di una rete di nuovi vasi^[149].

Nella promozione del ruolo angiogenico del PRP va tenuta in considerazione la concentrazione delle piastrine. Tale concentrazione ottimale è di $1,5 \times 10^6$ piastrine/ μ l. Come già riportato in precedenza, concentrazioni piastriniche troppo elevate potrebbero avere un effetto inibitorio sulla genesi dei nuovi vasi^[115].

Attività antimicrobica del PRP

Il PRP rilascia numerosi fattori con attività antimicrobica quali il peptide attivante del tessuto connettivo III, PF4, RANTES, fibrinopeptide A e B. Queste proteine interagiscono con le cellule tramite meccanismi diversi. Alcune di queste interagiscono interferendo con le membrane cellulari batteriche e quindi causando una maggiore permeabilità, impedendo la sintesi proteica,

interferendo con la sintesi del DNA o inibendo le attività enzimatiche^[150]. Esperimenti in vitro, dimostrano come il PRP interferisca anche con le capacità di adesione di alcuni batteri della cavità orale, fase iniziale della colonizzazione e quindi di infezione, senza però avere attività biocida^[151]. L'attività antibatterica in vitro viene esercitata dopo attivazione del PRP ed ha azione su un ampio range di batteri come *C. albicans*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *N. gonorrhoeae*. *S. aureus* è uno dei principali batteri che sono in grado di colonizzare le ferite aperte e rappresenta una sfida importante per i clinici in quanto ne esistono ceppi che hanno sviluppato delle resistenze importanti anche alla meticillina (ceppi MRSA). Uno studio ha dimostrato come in vitro il PRP sia in grado di inibire la crescita di tali ceppi^[152].

Batteri	Tempo di incubazione	PRP CFU/coltura = 50% v/v*	PRP al 10% CFU/coltura = 50% v/v*
MRSA	1st hour	1.8 ± 6.7	95 ± 100
	2nd hour	6.4 ± 9.3	225 ± 175.8
	3th hour	19.6 ± 24.1	660.9 ± 311
	10th hour	217.9 ± 299.4	1000 ± 0
<i>Staphylococcus pneumoniae</i>	1st hour	66.1 ± 78.9	97.2 ± 72.7
	2nd hour	27.9 ± 21.3	307.6 ± 136.1
	3th hour	75.3 ± 77.7	763.6 ± 367.4
	10th hour	662.8 ± 397.6	923.1 ± 249.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1st hour	18.3 ± 12.9	43.1 ± 23.9
	2nd hour	6.7 ± 6.8	46 ± 26.4
	3th hour	19 ± 16.3	63.7 ± 42.1
	10th hour	29 ± 26.1	395.3 ± 473.7

Tabella 5. Tabella modificata che mostra incubazione in terreno agar sangue con 5% di sangue di pecora. Valutazione della crescita delle colonie batteriche ai vari tempi con aggiunta di 160 µl di PRP nel gruppo di studio e 160 µl di PBS nel gruppo di controllo. **Aytac Cetinkaya et al. 2019.**

Uno studio su modello murino dimostra come il PRP associato a vancomicina abbia delle attività sinergiche con l'antibiotico contro i ceppi MRSA di *S. aureus*^[153]. L'azione antimicrobica è favorita dalla presenza nel PRP dei leucociti^[154]. I risultati ottenuti in diversi studi, sia in vitro che in vivo, permettono di affermare che il PRP abbia una attività antimicrobica e che questa lavori in sinergia con gli antibiotici e possa essere considerato un trattamento adiuvante nelle infezioni batteriche, anche in quelle che dimostrano antibiotico-resistenza^[150].

Effetti antalgici del PRP

I mediatori chimici rilasciati dalle piastrine attivate svolgono un ruolo importante nel dolore. Queste caratteristiche del PRP hanno portato all'implementare il ventaglio delle applicazioni di tale prodotto anche alle condizioni di dolore cronico, come si verifica nelle lesioni sportive, patologie ortopediche, disturbi spinali^[99].

I primi risultati sull'attività analgesica del PRP sono stati riscontrati in uno studio randomizzato e controllato effettuato su interventi chirurgici alla spalla. In tale studio si è riscontrata una riduzione nell'assunzione di farmaci antidolorifici oppiacei e un migliore outcome della riabilitazione post-chirurgica^[155]. L'attività analgesica sembra essere imputata alla 5-HT che viene rilasciata abbondantemente dai granuli densi delle piastrine. Nel caso del PRP, data la concentrazione delle piastrine presente in tali preparati, il rilascio di 5-HT è abbondante^[156].

Diversi studi hanno identificato che la 5-HT agisce sulla trasmissione nervosa del dolore in modo diverso, legandosi a diverse forme di recettori^[99]; inoltre vi è una maggiore presenza di tali recettori in zone periferiche rispetto al SNC e la 5-HT viene rilasciata in risposta a traumi e lesioni dei tessuti^[157].

In letteratura sono presenti alcuni studi clinici dove si evidenzia un buon effetto antalgico sul dolore cronico neuropatico. In uno studio del 2015 è stato indagato l'effetto analgesico del PRP in pazienti con dolore neuropatico cronico di varia entità dovuto a lesione di un nervo non rigenerato. Nei pazienti trattati con il PRP il dolore è scomparso per un minimo di 6 anni post trattamento e il sollievo iniziava già dopo 3 settimane dalla terapia. Altri studi clinici hanno indicato poco o nessun sollievo dal dolore nei pazienti trattati per patologie tendinose o lesioni della cuffia dei rotatori^[99,158-160]. Tale discrepanza dei dati può essere associata alla

concentrazione piastrinica del PRP e ai metodi di somministrazione dello stesso, alle tecniche di attivazione e alla concentrazione dei fattori di crescita, oltre al tipo di lesione e sede di applicazione del PRP^[99].

Effetti analgesici sono stati osservati anche in ferite chirurgiche della cute. In questo caso l'effetto analgesico sembrerebbe ricondotto alla neo-angiogenesi e al ripristino dell'ossigenazione e delle condizioni di nutrimento del tessuto leso^[161]. Non si conosce al momento la concentrazione piastrinica ottimale per ottenere l'effetto analgesico del PRP, sebbene in uno studio condotto su un modello animale a cui vengono iniettati 25µl in unica somministrazione di PRP alla concentrazione di 1×10^6 piastrine/µl si otteneva effetto analgesico. Tale analgesia diminuiva significativamente con l'uso di un PRP con concentrazione piastrinica dimezzata^[162].

Tendinopatie

Le tendinopatie sono caratterizzate da dolore e dalla ridotta funzionalità dei tendini che comporta difficoltà dei movimenti. La sintomatologia è generalmente di lunga durata, andando a limitare la vita dei pazienti.

Nelle tendinopatie croniche il dolore è solitamente causato da un insieme di fattori meccanici e biochimici e non da uno stato infiammatorio. Di fatto la rottura delle fibre di collagene presenti nei legamenti, l'intervento di alcune sostanze biochimiche irritanti e la presenza di neurotrasmettitori possono causare dolore^[163]. Alcuni studi su un numero elevato di pazienti hanno dimostrato come l'uso del PRP nel trattamento delle tendinopatie abbia portato a sollievo dal dolore^[164].

Uno dei principali fattori che interferisce con la guarigione delle tendinopatie è la scarsa vascolarizzazione nel tessuto tendineo. I fattori di crescita contenuti nel PRP incrementano la vascolarizzazione e la permeabilità vasale, promuovendo il reclutamento di cellule (tenociti e fibroblasti) deputate alla rigenerazione e alla deposizione di collagene^[165].

Osteoartrite

La cartilagine articolare rappresenta una struttura fondamentale per la locomozione, riducendo la frizione e per supportare il carico di peso. L'avanzare dell'età, i traumi, i cambiamenti metabolici conducono ad una degenerazione del tessuto cartilagineo, portando all'osteoartrite^[166]. Al fine di condurre alla risoluzione dei sintomi è necessario intervenire medicalmente, essendo il tessuto cartilagineo privo di vascolarizzazione, caratteristica che limita la capacità rigenerativa e di guarigione del tessuto stesso^[167]. Le terapie in uso si basano su fisioterapia, uso di anti-infiammatori, modificazioni dello stile di vita, iniezione intra-articolare di corticosteroidi e acido ialuronico, iniezione di PRP e infine soluzioni chirurgiche^[168]. La comparazione tra l'uso delle iniezioni di PRP e le iniezioni di corticosteroidi ha dimostrato che il primo apporta maggiori benefici in termini di dolore e sintomatologia generale, migliorando la funzionalità e di conseguenza la qualità della vita del paziente^[169]. Dalla letteratura si evince, inoltre, come l'uso del PRP presenti maggiori benefici, in termini di dolore e funzionalità, rispetto all'uso dell'acido ialuronico e che la combinazione dei due prodotti apporti un incremento ancora maggiore rispetto ai trattamenti singoli^[132]. L'efficacia biologica esplicita dal PRP può essere spiegata dalla presenza di HGF che è in grado di ridurre il signalling infiammatorio attraverso il pathway di NF- κ B, che è il principale responsabile dell'infiammazione nell'osteoartrite^[170].

Oftalmologia

Diverse patologie possono interessare la superficie dell'occhio: dalle lesioni chimiche e fisiche, a patologie autoimmuni come la sindrome di Sjögren o quella di Stevens-Johnson. Queste patologie pongono una sfida per l'oftalmologia: in alcuni casi le cellule staminali dell'occhio sono distrutte e questo potrebbe rendere difficoltoso il rigenerarsi del tessuto. Se il tessuto corneale non viene riparato in fretta questo può portare a cecità, formazioni di cicatrici, infezioni e perforazione corneale. Il PRP in campo oftalmologico viene, principalmente adoperato sotto due forme. Per l'applicazione sulla superficie corneale si adoperano sotto forma di collirio topico. Negli interventi chirurgici ricostruttivi viene adoperato un PRP solido, sotto forma di coagulo^[135].

Odontoiatria

In uno studio è stato evidenziato come il PRP sia in grado di ridurre il processo infiammatorio nelle tasche parodontali: si è visto come si siano ridotti i linfociti e i parametri clinici patognomici dell'infiammazione e della distruzione del tessuto gengivale^[171]. È stato anche dimostrato un effetto antibatterico contro *S. aureus* e *E. coli*, soprattutto con l'utilizzo di PRP ricco in leucociti. Tale crescita però era solo limitata nel tempo alle sole prime ore di applicazione^[172].

Una forma iniettabile di concentrato piastrinico con presenza di fibrina (PRF) ha portato alla formazione di piccoli coaguli che si comportano come un gel che rilascia fattori di crescita, esplicando inoltre un'azione inibente la crescita batterica nella placca^[173].

Il PRP può aumentare l'espressione del collagene di tipo I da parte delle cellule del legamento parodontale (PDL). Studi recenti hanno dimostrato che il PRP può stimolare la proliferazione delle cellule PDL^[174].

In odontoiatria l'approccio rigenerativo si basa sul concetto di ingegneria tissutale e mira a creare condizioni favorevoli per la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali.

La ricerca condotta negli ultimi anni ha mostrato il potenziale dei concentrati piastrinici come scaffold nel processo di rigenerazione dei tessuti. Numerosi scienziati hanno confrontato l'efficacia del PRF, del PRP e della tecnica del sanguinamento indotto arrivando alla conclusione che il PRF e il PRP si sono dimostrati efficaci come trattamenti nella rigenerazione endodontica con maggiori benefici rispetto ad altre tecniche^[175].

L'uso dei concentrati piastrini in odontoiatria non ha utilità solo in campo rigenerativo. È risultato utile anche nel trattamento di condizioni mediche legate alla mucosa del cavo orale o nella prevenzione e nel trattamento dell'osteonecrosi. Vi sono alcuni dati che suggeriscono una utilità nel trattamento nel lichen planus orale, mentre nel caso dell'osteonecrosi i dati sono ancora controversi e vanno ulteriormente chiariti^[176].

PRP e Sistema Immunitario

Nel PRP la concentrazione dei leucociti è variabile e dipende dai metodi di preparazione adoperati. Nei preparati da buffy coat i leucociti risultano essere concentrati. La presenza di specifici leucociti nelle preparazioni di PRP causa vari effetti a livello cellulare e tissutale. Infatti, grazie a diversi protocolli è possibile avere concentrazioni diverse dei vari leucociti presenti nelle preparazioni^[177].

I neutrofili giocano un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo dai patogeni esterni: sono in grado di aumentare lo stato infiammatorio necessario alla rigenerazione dei tessuti nelle ferite croniche o nella crescita ossea e svolgono un ruolo nel processo di angiogenesi^[178]. In alcune preparazioni possono però rappresentare una lama a doppio taglio in quanto possono causare un aumento di deposito di collagene III, andando a ridurre la resistenza dei tendini^[179].

La componente cellulare dei monociti può essere o abbondantemente presente o nulla, in base alla preparazione di PRP di nostro interesse. I monociti sotto l'effetto delle citochine prodotte durante un danno tissutale vengono convertiti in macrofagi^[22]. I macrofagi di tipo 1 svolgono funzioni pro-infiammatorie e producono VEGF e FGF con conseguenti attività su fibroblasti e angiogenesi^[99]. L'IL-4 prodotta dai linfociti T polarizza la differenziazione dei macrofagi nel tipo 2, i quali dimostrano avere attività anti-infiammatoria con produzione di IL-10, componenti della matrice extracellulare e fattori di crescita^[180].

Le piastrine interagiscono con diverse cellule del sistema immunitario sia nella risposta innata sia in quella acquisita. L'interazione tra piastrine e leucociti è in grado di regolare il processo infiammatorio, la riparazione tissutale e la guarigione delle ferite. Il ruolo importante viene giocato nella risposta immune. Infatti il legame delle piastrine con i neutrofili, grazie al TLR-4, è in grado di regolare il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e mieloperossidasi che danno origine al burst ossidativo dei neutrofili^[181].

Grazie all'attivazione delle piastrine, i monociti migrano nei siti di insulto dove aderiscono e rilasciano molecole infiammatorie e chemiotattiche; inoltre attivano la via NF-kb con conseguente mediazione nella risposta infiammatoria e attivazione e differenziazione delle cellule del sistema immunitario^[182].

L'interazione delle piastrine con i leucociti facilita l'attivazione della risposta immunitaria adattativa^[183].

Come abbiamo visto, le piastrine attivano la risposta immunitaria adattativa con la conseguente produzione di cellule NK e DC deputate alla presentazione degli antigeni che risultano in una specifica attivazione di una risposta adattativa da parte dei Linfociti T e B^[99]. Le piastrine, infatti, esprimono CD40L, una molecola fondamentale nella modulazione della risposta immunitaria adattativa^[184]. Il recettore del CD40L è il CD40 ed è espresso da diverse cellule, ad esempio le cellule endoteliali dove il legame CD40L-CD40 porta alla produzione di citochine, chemochine e molecole di adesione^[185]. L'interazione CD40L-CD40, inoltre, conduce alla stimolazione di macrofagi e neutrofili^[186]. Nelle piastrine il CD40L non gioca un ruolo solo nella presentazione dell'antigene ma anche nell'influenzare le risposte da parte dei linfociti T. La stimolazione dei linfociti T CD4 porta a intense risposte pro- e anti-infiammatorie^[187].

Il legame di CD40L dei linfociti T CD4 con il CD40 dei linfociti B avvia la trasduzione del segnale che conduce all'attivazione di questi ultimi, portandoli a proliferare e a differenziarsi^[188]. Le piastrine aumentano le risposte dei linfociti B mediate dai linfociti T mediante il legame CD40L-CD40. Le piastrine attivate rilasciano un abbondante numero di sostanze pro-infiammatorie e molecole bioattive che sono in grado di influenzare sia la risposta innata sia quella adattativa da parte del sistema immunitario. Il CD154 espresso sulle piastrine, interagendo con il CD40 delle cellule endoteliali, porta alla iper-espressione di molecole di adesione (ICAM 1, VCAM, CCL 2) che conducono al reclutamento dei vari leucociti^[189].

Le piastrine giocano un ruolo fondamentale nella differenziazione dei monociti in APC (Antigen-Presenting Cell), come ad esempio le cellule dendritiche, andando, di conseguenza, ad influenzare la risposta adattativa e innata^[96]. I monociti possono differenziarsi in cellule dendritiche immature che esprimono CD1a in presenza di Fattore Stimolante le colonie di Granulociti-Monociti (GM-CSF) e di IL-4^[190]. Le cellule dendritiche possono influenzare, inducendo espansione selettiva sotto induzione alloantigenica, sia i linfociti T CD8+ che i linfociti T regolatori CD4+^[191]. Le caratteristiche fenotipiche principali dei linfociti T regolatori CD4+ sono rappresentate dall'espressione del CD25 (catena α del recettore per IL-2) e dal fattore di trascrizione FoxP3. La presenza di queste cellule durante la guarigione può indicare una regolazione negativa della risposta infiammatoria immunitaria^[192]. Il PRP allogenico può inibire il

differenziamento in cellule dendritiche dei monociti CD1a nel sangue periferico, generando delle cellule simili ai fibroblasti con caratteristiche analoghe ai monociti di tipo 2 anti-infiammatori. Queste cellule sono caratterizzate da una elevata espressione di marker di fagocitosi come il CD163 (scavenger) o il CD206 (recettore per il mannosio) e dal rilascio di IL-10, citochina anti-infiammatoria. Questi eventi suggeriscono che il PRP sia in grado di creare un ambiente anti-infiammatorio grazie all'attivazione dei monociti e alla loro differenziazione verso un tipo 2, con conseguente stimolazione dei linfociti T reg, portando ad accelerare la cascata degli eventi che conduce a guarigione le ferite^[193].

Anche la serotonina presente nelle piastrine gioca un ruolo nell'immunomodulazione sia sulla risposta innata che acquisita, agendo attraverso i vari recettori per la serotonina^[194]. La 5-HT è in grado di stimolare la proliferazione di Treg e regolare la funzione delle cellule B, delle cellule natural killer e dei neutrofili, attraverso il reclutamento di cellule dendritiche e dei monociti nei siti infiammatori^[195]. Pertanto, l'uso di PRP, con concentrazioni piastrine superiori a 1×10^6 piastrine/ μ l, potrebbe contribuire significativamente all'apporto di 5-HT nelle zone di applicazione e, in un microambiente caratterizzato da componenti infiammatorie, il PRP potrebbe interagire con diverse cellule immunitarie che svolgono ruoli chiave in queste patologie, influenzando potenzialmente gli esiti clinici^[99].

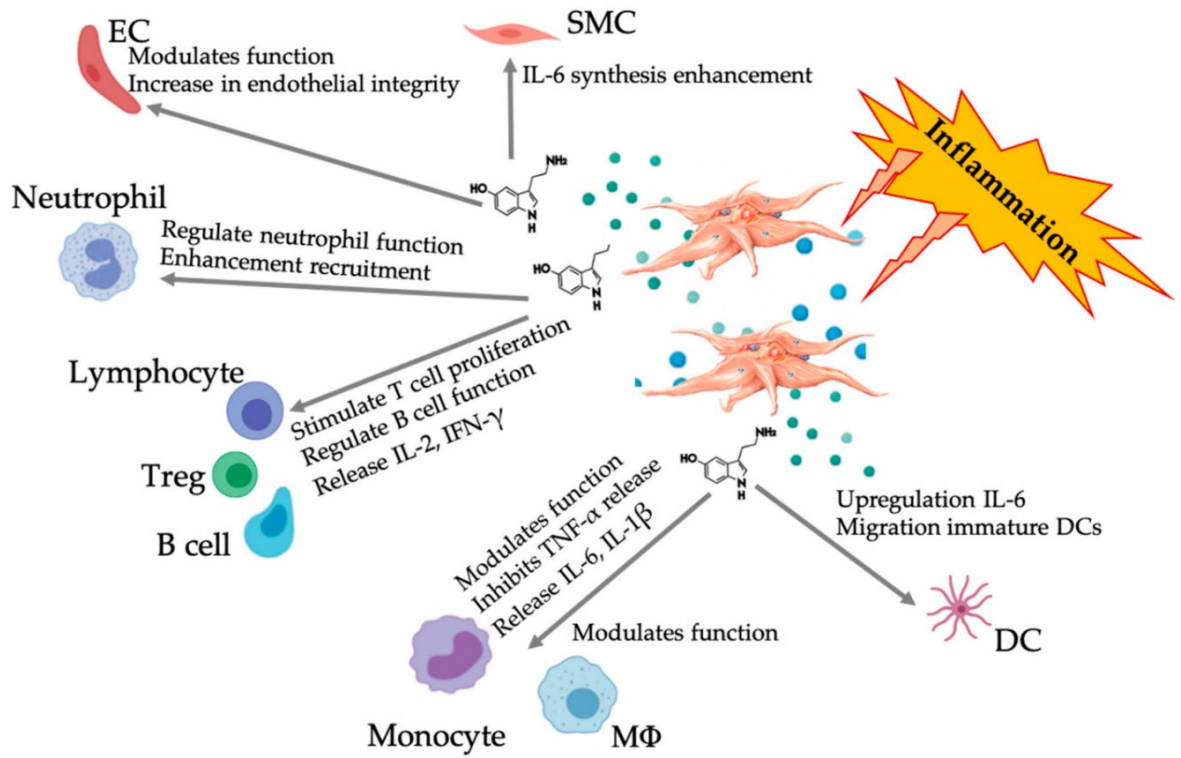


Figura 7. Rilascio dei granuli piastrinici e della 5-HT e interazioni con le cellule del sistema immunitario. Everts et al. (2020).

Scopo dello studio

La cronicità delle ulcere rappresenta, come già detto, una spesa sanitaria molto importante per il Sistema Sanitario Nazionale; il tutto è reso maggiormente pesante dalla presenza di una popolazione che invecchia sempre più e dalla maggiore presenza di patologie croniche come il diabete^[196]. La maggior parte dei trattamenti ad oggi esistenti è di natura per lo più palliativa. Le ulcere croniche si presentano di difficile trattamento: molte di queste rimangono aperte per diversi anni, causando problemi invalidanti al paziente. Nonostante i trattamenti oggi esistenti, i dati inerenti alle amputazioni non sono migliorati. Circa il 30% dei pazienti diabetici che subiscono rivascolarizzazione dell'arto ulcerato vanno incontro ad amputazione.

Il PRP autologo ha guadagnato successo come dispositivo innovativo nel trattamento delle ulcere. Di fatto, il PRP non solo aumenta il reclutamento delle cellule endoteliali e migliora la vascolarizzazione, ma favorisce anche il reclutamento di macrofagi che, a loro volta, attraverso la loro attività paracrina, reclutano e stimolano la proliferazione delle cellule staminali/progenitrici mesenchimali ed epiteliali, portando alla rigenerazione cutanea^[26]. Tuttavia non sempre è possibile il prelievo del quantitativo di sangue necessario alla preparazione di PRP in pazienti in stato di salute compromesso. Di fatto, nel caso del paziente diabetico l'uso del PRP autologo presenta degli ostacoli dovuti ad una produzione ridotta e inadeguata dei fattori di crescita, della risposta angiogenica, delle funzioni alterate dei macrofagi, di una scarsa formazione di tessuto di granulazione e di anormali risposte cellulari nella rigenerazione^[197]. Bisogna anche tenere conto che ci sono problemi legati alla variabilità di produzione del PRP relativi alla concentrazione delle piastrine e dei fattori di crescita presenti nel prodotto finale autologo e della variabilità interindividuale^[198]. Queste difficoltà sarebbero superabili se si adoperasse un PRP allogenico, prodotto da un pool di donatori.

Dati raccolti *in vitro* ed *in vivo* precedentemente nel nostro laboratorio hanno mostrato la necessità di lavorare con preparazioni standardizzate di PRP con una riproducibile concentrazione piastrinica e un controllato rilascio dei principali fattori di crescita. Alcuni dati preliminari ottenuti su un numero limitato di pazienti arruolati in una sperimentazione clinica precedente,

che prevedeva l'impiego di PRP allogenico applicato direttamente come gel piastrinico sul sito di lesione cutanea, avevano fornito risultati iniziali promettenti [Figura 8]; il prodotto allogenico era ben tollerato e nessun evento avverso era stato osservato.

Lo studio aveva previsto due gruppi di pazienti trattati con gel piastrino allogenico a concentrazione piastrinica standardizzata; il confronto si è basato sul trattamento con gel completo verso quello deprivato dei leucociti. I pazienti sono stati monitorati per un anno dopo il trattamento; lo studio non ha evidenziato una risposta immunitaria significativa nei due gruppi, sebbene una buona risoluzione della ferita abbia interessato un discreto numero dei pazienti reclutati. Purtroppo, i risultati non sono stati confermati dall'analisi statistica dato il numero limitato di pazienti reclutati.



Figura 8. Paziente con ulcera del piede. Nelle foto si apprezzano i miglioramenti dell'ulcera dall'inizio fino a 11 settimane dopo l'inizio del trattamento con gel di PRP.

Da qui è nata la necessità di traslare lo studio clinico a livello più esteso, coinvolgendo un numero elevato di pazienti, proponendo non solo uno studio sull'efficacia riparativa del PRP ma soprattutto sulla valutazione della potenziale immunogenicità dell'applicazione di PRP allogenico nel trattamento delle ulcere diabetiche.

Lo studio clinico è stato preceduto da una fase di sperimentazione in vitro per la messa a punto e validazione di una bio-membrana derivata dalla combinazione di acido ialuronico e plasma ricco di piastrine (o soluzione fisiologica come controllo), quale dispositivo per il rilascio graduale di fattori bioattivi. La bio-membrana è stata caratterizzata nel contenuto in fattori di crescita e nella cinetica di rilascio di molecole biologicamente attive ed importanti nel processo di guarigione tissutale. La sua attività biologica è stata testata in esperimenti di

proliferazione cellulare su fibroblasti dermici che rappresentano insieme ai cheratinociti le popolazioni cellulari più rappresentate nella cute.

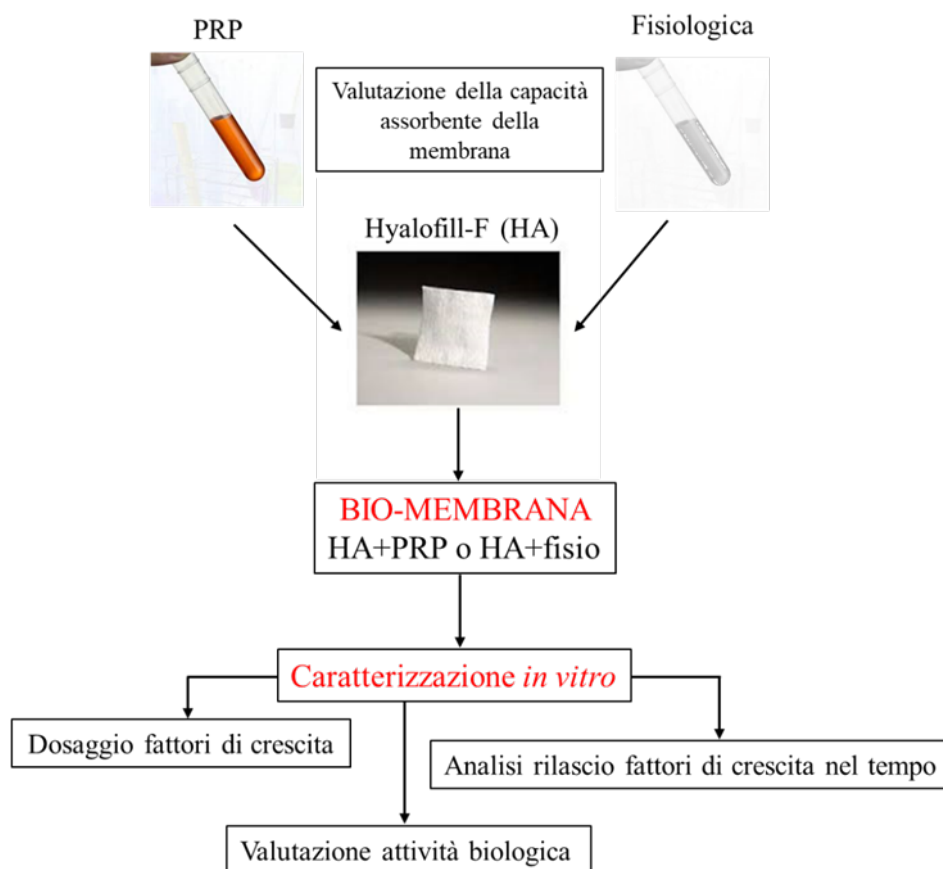


Figura 9. Schema della preparazione e caratterizzazione della bio-membrana.

La bio-membrana caratterizzata *in vitro* è anche il dispositivo utilizzato nello studio clinico, che si basa sull'efficienza del PRP nella rigenerazione dei tessuti ed in particolare di quello cutaneo. Lo studio clinico riportato in questa tesi è stato oggetto di un progetto di ricerca che è stato vincitore di un bando di Ricerca Finalizzata nel 2018. Prima dell'avvio di qualsiasi attività è stato presentato al Comitato Etico Regionale (CER) Liguria come studio clinico di fase II in doppio cieco, randomizzato, multicentrico. Dopo approvazione da parte del CER Liguria, lo studio purtroppo ha subito un notevole rallentamento a causa della pandemia per Sars-Cov-2 e ha visto l'avvio soltanto nei primi mesi del 2021.

In questo progetto viene proposto l'uso di un PRP allogenico, standardizzato nella concentrazione piastrinica e sottoposto a rigidi controlli di qualità che mira a ridurre i costi della Sanità del nostro Paese e dell'Europa per il trattamento di una patologia diffusa e debilitante quale l'ulcera del piede diabetico.

Il principale obiettivo dello studio, infatti, è quello di valutare le potenzialità di guarigione esercitate dal PRP allogenico sulle ulcere diabetiche. Sono comparati due gruppi di pazienti con ulcera diabetica suddivisi dopo randomizzazione 1:1 in due gruppi di trattamento:

1. Un gruppo sperimentale in cui i pazienti saranno trattati con la bio-membrana PRP+HA
2. Un gruppo di controllo in cui i pazienti saranno trattati solo con la bio-membrana fisiologica+HA

Obiettivo secondario dello studio è rappresentato dallo studio della sicurezza del PRP allogenico e lo studio dell'eventuale risposta immunitaria dopo il trattamento con lo stesso.

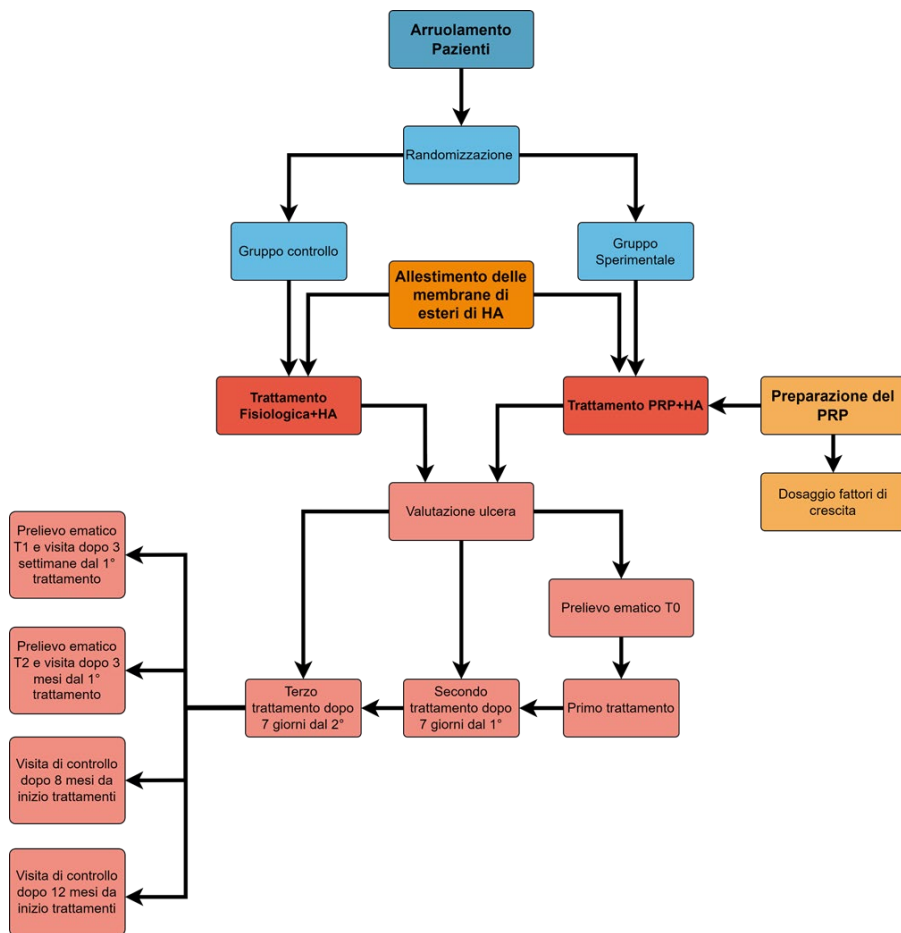


Figura 10. Schema riassuntivo dello studio clinico.

Materiali e metodi

1. Caratterizzazione in vitro della bio-membrana

Preparazione del PRP

Il PRP è prodotto a partire da campioni di Buffy Coat (BC) isolati da donatori sani, omogruppo, ottenuti presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova secondo il protocollo adottato dal centro trasfusionale, in linea con i protocolli esistenti in letteratura, applicando opportune modifiche mirate ad ottenere la concentrazione piastrinica desiderata. I campioni di BC sono derivati da sangue intero, entro 6 ore dal prelievo e sono mantenuti in costante agitazione alla temperatura di 22°C fino al loro utilizzo che deve avvenire entro 72 ore dal prelievo del campione. Le sacche di BC vengono unite saldando sterilmente 6 sacche, con connessione testa-coda. Per gravità tutto il contenuto delle 6 sacche, è raccolto in una sacca da 600 ml anch'essa collegata sterilmente. La sacca di raccolta, contenente il pool di BC, è saldata ad una seconda sacca da 600 ml. Le due sacche sono sottoposte ad una centrifugazione a 388 rcf per 10' a 22°C. Questa centrifugazione permetterà di separare il Plasma Ricco di Piastrine (PRP) dai globuli rossi.

La sacca contenente le fasi separate, è sottoposta ad un delicato schiacciamento meccanico, al fine di far defluire tutto il PRP nella sacca vuota evitando il passaggio dei globuli rossi, che verranno eliminati.

Successivamente alla raccolta del PRP, si esegue, su una piccola aliquota di questo, un emocromo al fine di valutare la concentrazione piastrinica (plt/ μ l) del campione per ottenere un pool di PRP alla concentrazione di 2×10^6 plt/ μ l. Qualora questa concentrazione risultasse maggiore si procede a collegare una sacca di COMPOSOL, soluzione di conservazione delle piastrine, e eseguiti i calcoli di diluizione, si procede a far defluire la giusta quantità di COMPOSOL nella sacca contenente il PRP a maggiore concentrazione di piastrine. Si procede ad ulteriore emocromo. Nel caso in cui la concentrazione risultasse adesso troppo diluita si procede

come segue: la sacca contenente il pool di PRP, viene nuovamente collegata, tramite termosaldatura, ad una sacca da 600 ml. Le due sacche sono sottoposte ad una nuova centrifugazione a 2169 rcf per 20' a 22°C.

Questa centrifuga permetterà l'ottenimento di una fase superiore contenente Plasma Povero di Piastrine (PPP) e un pellet costituito dalle piastrine.

Utilizzando, anche in questo caso, un delicato schiacciamento meccanico, si fa defluire il PPP nella sacca vuota al fine di ottenere la concentrazione di piastrine desiderata (2×10^6 plt/ μ l). La concentrazione verrà nuovamente confermata con un nuovo emocromo.

La decisione di usare una concentrazione piastrinica di 2×10^6 plt/ μ l deriva dai risultati di un precedente studio effettuato presso il nostro laboratorio in cui si dimostra che tale concentrazione accelerava la guarigione di lesioni cutanee in un modello murino diabetico^[137].

Il pellet di piastrine è omogenizzato con il PPP tramite agitazione manuale.

Il PRP viene poi suddiviso in aliquote da 3 ml, conservate a -30°C fino al loro utilizzo.

Tracciabilità informatica delle preparazioni di PRP

La tracciabilità informatica delle preparazioni di PRP è garantita dal software di gestione degli emocomponenti EMONET, presente presso il centro trasfusionale del Policlinico San Martino di Genova. I buffy coat vengono assemblati informaticamente in un unico emocomponente con codice identificativo. L'emocomponente assemblato viene frazionato in aliquote con il comando "Frazionamento" che permette di stampare una etichetta con numerazione progressiva per ogni provetta prodotta dal frazionamento. Ogni trattamento prodotto è poi scaricato informaticamente sul centro di costo del progetto di ricerca finalizzata per i trattamenti destinati a Genova. Per i trattamenti destinati all'Istituto Dermatopatico Immacolata IDI di Roma, i campioni vengono scaricati informaticamente su un centro di costo appositamente creato con il comando "scarico multiplo verso centri esterni".

Membrana a base di Acido Ialuronico come veicolo di rilascio del PRP

Il PRP o la soluzione fisiologica (0,9% NaCl) sono combinati ad una matrice fibrosa (membrana) assorbente a base di Hyaff, estere dell'acido ialuronico. La matrice ha il nome commerciale di HyaloFill®-F (ANIKA Therapeutics Srl, Padova) ed il suo utilizzo clinico è autorizzato dagli Enti Regolatori Europei. La membrana, confezionata singolarmente, ha una superficie di 10cm × 10cm. Dal momento che ogni lesione viene trattata con una membrana di dimensioni 5cm × 5cm, la membrana viene ritagliata sterilmente con un bisturi in 4 membrane di dimensione 5cm × 5cm e le 4 membrane così ottenute vengono poste ciascuna all'interno di un tubo sterile da 15 ml e conservate a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.

Valutazione della capacità assorbente della membrana di HA

La membrana di HA è stata inizialmente utilizzata per valutare la capacità massima di assorbimento di PRP o soluzione fisiologica tale da evitare la perdita di liquido dalla membrana e da poter garantire ancora l'integrità e la manipolazione della membrana stessa, senza causare cioè rotture della membrana durante il suo trasferimento sulla lesione del paziente.

È stato calcolato un volume di assorbimento massimo di circa 80 µl PRP o soluzione fisiologica / cm² di membrana. Dal momento che la membrana per il trattamento della lesione ha una superficie di 25 cm², vengono caricati 2 ml di PRP o soluzione fisiologica per ogni membrana.

Analisi del contenuto in proteine e fattori di crescita nel PRP

Le preparazioni di PRP sono state testate per valutare il contenuto proteico totale mediante il saggio BCA (BCA Protein Assay Kit) e per il contenuto dei fattori di crescita PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-BB) e VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) tramite saggio ELISA (kit ELISA human PDGF-BB, RayBiotech Inc; kit ELISA human VEGF, Invitrogen rispettivamente) seguendo i rispettivi protocolli forniti dai produttori. La scelta di questi due fattori, nell'ampia gamma di fattori di crescita rilasciati dalle piastrine, si è basata sul fatto

che entrambi sono rappresentativi di fattori contenuti ad elevata concentrazione (come il PDGF-BB) o a bassa concentrazione (come il VEGF).

Rilascio di fattori di crescita dalla bio-membrana

È stato valutato il grado di rilascio di fattori di crescita dalla bio-membrana. Quadrati di 1 cm × 1 cm di membrana di HA sono stati imbibiti con 80 µl di una preparazione di PRP alla concentrazione di circa $2,0 \times 10^6$ plt/µl.

Tre preparazioni con gruppo sanguigno A, B, O rispettivamente sono state utilizzate. Ogni membrana è stata caricata con una delle preparazioni in triplicato e disposta poi all'interno di un transwell da 24 pozzetti per valutare il rilascio di fattori di crescita. 1 ml di soluzione salina è stato messo alla base del transwell. Il saggio è stato eseguito con incubazione delle piastre transwell a 37°C, 5% CO₂. La soluzione contenente il rilasciato proteico è stata raccolta al tempo 0, 2 ore, 4 ore, 6 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 7 giorni. Il liquido recuperato ad ogni time point è stato rimpiazzato con un volume equivalente di soluzione salina. Il rilasciato è stato poi aliquotato e conservato a -20°C per le analisi successive.

Sul rilasciato è stato eseguito il dosaggio del fattore di crescita PDGF-BB secondo quanto già descritto precedentemente. Tramite questa analisi è stato definito il tempo e la percentuale di fattore rilasciato rispetto alla quantità totale di fattore caricato inizialmente su ogni membrana.

Colture cellulari - Fibroblasti da cute

Il test di efficacia biologica del rilasciato dalla bio-membrana è stato eseguito su colture di fibroblasti dermici, ottenuti da campioni di scarto di cute di soggetti sottoposti a chirurgia ricostruttiva mastoplastica. Il derma è stato separato dal tessuto sottocutaneo sottostante e disinfettato tramite un passaggio in etanolo 70°C seguito da due lavaggi in soluzione salina sterile. Il derma è stato poi tagliato con un bisturi sterile in piccoli frammenti quadrati di circa 1 mm che sono stati poi disposti in piastre Petri da 100 mm diametro. I frammenti sono stati coperti con un vetrino sterile, per consentire l'isolamento delle cellule dal tessuto. La coltura è stata ottenuta

in presenza di terreno di coltura α MEM (Invitrogen) addizionato con 100 UI/ml penicillina, 100 μ g/ml streptomina (EuroClone S.p.A, Milano, Italy). I fibroblasti iniziano a fuoriuscire dal frammento di cute dopo circa 7 giorni. Raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate con 0,05% di tripsina, 0,01% di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (EuroClone S.p.A, Milano, Italy), contaminate e congelate in azoto liquido fino al momento dell'uso oppure ripiastrate alla densità di 250.000 cellule per piastra Petri da 100 mm diametro per espansione cellulare.

Proliferazione cellulare in presenza del rilasciato della membrana

L'effetto biologico del rilasciato della membrana è stato valutato in un saggio di proliferazione cellulare tramite colorazione con Thiazolyl blue (MTT Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) su fibroblasti dermici umani. Le cellule al passaggio 1, sono state piastrate in terreno α MEM contenente 10% FBS alla densità di 5000 cellule/ pozzetto in piastra transwell da 24 pozzetti (Millicell Culture Plates Inserts, 0.4 μ m). Dopo 24 ore dalla piastratura, le cellule sono state lavate con soluzione salina (phosphate buffered saline, PBS) per rimuovere i residui di siero bovino e trasferite in 0,5 ml di terreno serum-free α MEM per 3h. È stata poi aggiunta al terreno sodio eparina (Veracer) alla concentrazione finale di 5UI/ml, per evitare gelificazione del terreno a causa della presenza di fibrinogeno nel PRP. Successivamente nel transwell è stata disposta una membrana di HA (1cm \times 1cm) imbibita con 80 μ l di PRP alla concentrazione di circa $2,0 \times 10^6$ plt/ μ l o con 80 μ l di soluzione fisiologica. Sono state utilizzate 3 diverse preparazioni di PRP di gruppo sanguigno O, A, B rispettivamente. In transwells di controllo, senza membrana, sono stati caricati direttamente 80 μ l di PRP. La proliferazione cellulare è stata valutata al tempo 0, 72, 120 ore dal trattamento. Ad ogni time point, le cellule sono state incubate con MTT per 3h, poi la soluzione di MTT è stata rimossa e il colorante solubilizzato con l'aggiunta di 1 ml di etanolo assoluto. La riduzione dell'MTT a formazano è stata quantificata tramite lettura dell'assorbanza a 570 nm e 670 nm.

2. Studio clinico

Reclutamento pazienti

Il disegno sperimentale prevede il reclutamento di 110 pazienti distribuiti tra 2 Centri, l'Ospedale Policlinico San Martino di Genova e l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI-IRCCS) di Roma e i pazienti saranno distribuiti nei due centri nel numero di 40 e 70 rispettivamente.

I pazienti saranno così suddivisi nei seguenti gruppi sperimentali:

- 55 pazienti trattati con la medicazione a base di acido ialuronico caricato con PRP allogenico
- 55 pazienti trattati con la medicazione a base di acido ialuronico

Selezione dei pazienti

I pazienti vengono selezionati nella popolazione diabetica con ulcera diabetica agli arti inferiori e secondo criteri ben definiti.

I criteri di inclusione sono:

- Pazienti maschi e femmine
- Età compresa tra i 40 e i 90 anni
- Diagnosi di diabete: valore di glicemia random >126 mg/dl in più valutazioni oppure con valore di glicemia >200 mg/dl al test di tolleranza al glucosio o valore di emoglobina glicosilata >6.5 mmol/l
- Area della sezione trasversale dell'ulcera tra 25 e 2000 mm²
- Classificazione secondo la scala TEXAS di grado I e II e di livello A e B
- Indice pressorio caviglia-braccio >0.5

- Disponibilità del paziente a collaborare con il medico curante per garantire l'aderenza al protocollo di follow-up
- Nessun trattamento precedente con derivati piastrinici
- Nelle donne non in menopausa test di gravidanza negativo entro i 7 giorni dall'inizio dello studio
- Le donne in età fertile devono usare un efficace metodo di contraccezione fino a 6 mesi dopo il trattamento
- Firma del modulo del consenso informato

Oltre ai pazienti che non risultano possedere i criteri di inclusione verranno esclusi tutti i pazienti che presentano:

- Insufficienza renale cronica allo stadio finale di malattia renale, insufficienza cardiaca severa che richiede trapianto.
- Allattamento
- Presenza di malattia neoplastica maligna negli ultimi 5 anni
- Presenza di patologia neuropsichiatrica che possa interferire con la collaborazione del paziente allo studio
- Presenza di condizioni che possano mettere in pericolo il paziente, a giudizio del medico.

Consenso informato

Ai pazienti arruolati viene consegnato il modulo del consenso informato dopo approvazione dello stesso dal Comitato Etico Regionale. I pazienti, o i tutori legali degli stessi, sono informati riguardo la natura dello studio e il suo scopo, gli obiettivi dello studio e i possibili rischi ad esso associati. I soggetti sono informati anche della possibilità di abbandonare lo studio in qualsiasi momento essi lo desiderino e per qualsiasi ragione senza che incorrano in una riduzione della qualità delle cure ricevute. Tutte queste informazioni sono contenute in un modulo

specificamente sviluppato ai fini di questo studio. I pazienti vengono anche informati che tutti i dati saranno raccolti e conservati in un database e mantenuti confidenziali secondo la legislazione nazionale di protezione dei dati. Il paziente, prima di iniziare il trattamento, deve firmare il consenso informato scritto. Una copia viene consegnata al paziente mentre l'originale viene archiviato.

Randomizzazione

La randomizzazione dei pazienti ai due gruppi di studio viene effettuata utilizzando un software remoto messo a disposizione dall'Unità di Epidemiologia Clinica dell'IRCCS Policlinico San Martino di Genova. Ai pazienti arruolati viene assegnato un numero ID in ordine sequenziale di iscrizione allo studio e il trattamento viene assegnato in base all'elenco dei numeri di trattamento generato in modo casuale.

Valutazione del paziente pre-trattamento

Prima del primo trattamento il paziente viene sottoposto ad una visita medica con lo scopo di valutare i seguenti parametri:

- Valutazione della lesione
- Classificazione della lesione secondo classificazione Texas
- Valutazione della neuropatia periferica tramite test di screening MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument), strumento utilizzato per valutare la neuropatia periferica simmetrica distale nel diabete. Comprende due valutazioni separate: un questionario autosomministrato di 15 elementi e un esame degli arti inferiori che include l'ispezione e la valutazione della sensazione vibratoria e dei riflessi della caviglia
- Test di sensibilità cutanea mediante test del monofilamento di Semmes-Weinstein
- Valutazione vascolare dell'aorta iliaca in asse femoro-popliteo-tibiale con Eco color doppler e TcPO₂ (ossimetria transcutanea)

Valutazione della lesione

Viene effettuata una valutazione periodica della lesione, dal reclutamento fino a 12 mesi, secondo la classificazione del Texas. La lesione viene monitorata utilizzando una scheda dedicata per la raccolta dei seguenti parametri: localizzazione, stadiazione, presenza, quantità e tipo di essudato e caratterizzazione della cute perilesionale. L'estensione della lesione viene valutata utilizzando una fotografia scattata in presenza di una scala metrica posta in prossimità della ferita.

Valutazione dello stato di salute del paziente

Lo stato di salute del paziente viene valutato con i questionari Skindex 17 e SF36 Versione Italiana. L'SF-36 Health Survey è il questionario più utilizzato al mondo, essendo stato applicato in molte malattie. Il questionario comprende 36 domande che si combinano per formare 8 scale: funzionalità fisica, limitazioni di ruolo dovute a problemi fisici, dolore fisico, salute in generale, vitalità, limitazioni di ruolo dovute a problemi emotivi, attività sociali, salute mentale. Lo Skindex è un questionario composto da 17 domande che valutano i sintomi e lo stato psico-sociale in presenza di patologie dermatologiche.

Preparazione della bio-membrana

Il giorno del trattamento, la membrana di dimensione 5cm × 5cm viene preparata all'interno di una piastra Petri da 100 mm diametro, distesa delicatamente con l'aiuto di una pinzetta e imbibita con 2 ml di PRP o di soluzione fisiologica, depositati goccia a goccia sulla membrana, in base al braccio di trattamento (PRP o controllo). Una volta idratata, la membrana acquisisce una consistenza gelatinosa che la rende idonea ad adattarsi agevolmente alla forma della lesione.

Applicazione della bio-membrana

In ambulatorio la bio-membrana viene posizionata sul letto della ferita dopo pulizia della stessa con disinfettanti neutri. Si prosegue quindi al bendaggio della ferita medicata con la bio-membrana. La medicazione non va cambiata per una settimana e va evitato di bagnarla. La

medicazione viene poi sostituita con una nuova medicazione dopo una settimana e dopo due settimane dalla prima applicazione. Prima di ogni applicazione il medico esegue sempre una valutazione del letto dell'ulcera.

Prelievo di sangue periferico e isolamento componenti ematiche

Ai tempi stabiliti dal protocollo di studio e cioè al T0, T1 (3 settimane dalla prima applicazione) e T2 (3 mesi dalla prima applicazione) il paziente viene sottoposto ad un prelievo di sangue periferico raccolto in parte in litio eparina (10 provette da 3,5 ml) per l'isolamento di PBMC e in parte in una provetta contenente un attivatore della coagulazione (CAT Serum Sep Clot Activator) per l'ottenimento del siero.

Il sangue raccolto in litio eparina viene sottoposto a separazione su gradiente di densità (Lympholyte, Cedarlane) in rapporto 1:1 tramite centrifugazione a 805 rcf per 40' a temperatura ambiente.

Dopo la centrifugazione, si recupera la fase superiore rappresentata dal plasma e l'anello di cellule mononucleate (PBMC). Il plasma viene poi centrifugato a 453 rcf per 10' a temperatura ambiente per eliminare eventuali contaminazioni cellulari e il sovrnatante viene suddiviso in aliquote da 1 ml che sono poi successivamente congelate a -80°C .

L'anello di PBMC viene lavato con PBS, centrifugandolo a 453 rcf per 10' a temperatura ambiente, si elimina il sovrnatante e il pellet viene risospeso in 10 ml di PBS e centrifugato a 201 rcf senza freno per 10' a temperatura ambiente per eliminare la contaminazione piastrinica.

Il pellet viene poi risospeso in 20 ml di PBS e sottoposto a conta cellulare. Le cellule mononucleate vengono congelate alla densità di $10,0 \times 10^6$ cellule / vial in 90% FBS e 10% DMSO, congelate o.n. a -80°C e poi mantenute in azoto liquido.

Il sangue raccolto con l'attivatore della coagulazione viene centrifugato a 1811 rcf per 10' per ottenere la separazione del siero dal coagulo. Il siero viene poi suddiviso in aliquote che vengono congelate a -80°C .

Analisi immunologiche

Nel siero dei pazienti verrà valutata la presenza di anticorpi contro gli antigeni di istocompatibilità di classe I (HLA-1) e di classe II (HLA-2). Per analizzare l'effetto del PRP allogenico sull'immunità cellulare sarà analizzata l'attività del PRP sui linfociti T mediante analisi di immuno-fenotipizzazione tenendo in considerazione antigeni di attivazione come il CD25, il CD69 e HLA-DR, la presenza di cellule T CD4+ regolatorie e l'espressione delle loro citochine pro-infiammatorie (TNF α e INF γ) o regolatorie (IL-10 e TGF β). Verranno effettuati saggi di proliferazione dei linfociti T in presenza di PRP da solo o in associazione ad anticorpo anti-CD3 come agente stimolatore.

Follow-up dei pazienti

Terminati i trattamenti con la bio-membrana, i pazienti vengono sottoposti a visita medica al tempo T1 (1 mese dal trattamento), T2 (3 mesi dopo l'ultimo trattamento), al tempo T3 (8 mesi dopo l'ultimo trattamento), e al tempo T4 (12 mesi dopo l'ultimo trattamento). Durante la visita si esegue una valutazione della lesione e si sottopone il paziente ai test di cui sopra.

Risultati

Profilo emocromocitometrico delle preparazioni di PRP

Le preparazioni di PRP sono state caratterizzate mediante esame emocromocitometrico, per la determinazione del contenuto piastrinico e di altri eventuali componenti cellulari quali leucociti e globuli rossi [Tabella 6]. I dati mostrano la presenza di una modesta contaminazione leucocitaria, $0,47 \times 10^3 \pm 0,14/\mu\text{l}$ e di globuli rossi, $0,34 \times 10^6 \pm 0,01/\mu\text{l}$ (media \pm sem rispettivamente).

Preparazioni	Gruppo sanguigno	Globuli rossi $\times 10^6/\mu\text{l}$	Emoglobina g/l	Globuli bianchi $\times 10^3/\mu\text{l}$	Piastrine $\times 10^3/\mu\text{l}$
21-001	O POS	0,3	0	0,17	2092
21-003	A POS	0,35	0	0,37	1930
21-004	AB POS	0,4	0	0,75	2097
21-005	B POS	0,32	0	1,05	2090
21-006	O NEG	0,35	0	0,17	2027
21-007	B POS	0,32	0	0,35	2405

Tabella 6. Caratterizzazione emocromocitometrica delle preparazioni di PRP.

Dosaggio dei fattori di crescita nel PRP

La quantificazione delle proteine totali e dei fattori di crescita VEGF e PDGF-BB è stata eseguita su 6 preparazioni [Tabella 7]. Le concentrazioni medie di proteine totali, di PDGF-BB e di VEGF sono $54,03 \pm 2,95$ mg/ml, $115,65 \pm 9,23$ ng/ml e $0,87 \pm 0,13$ ng/ml rispettivamente (media \pm sem).

Preparazioni	Proteine Totali mg/ml	VEGF ng/ml	PDGF-BB ng/ml
21-001	53,208	0,33	92,35
21-003	46,458	0,76	86,69
21-004	64,556	1,19	135,53
21-005	60,278	1,11	128,21
21-006	52,833	0,74	140,11
21-007	46,833	1,12	111,01

Tabella 7. Quantificazione proteine totali (saggio BCA) e fattori di crescita (VEGF e PDGF-BB) (test ELISA) nelle pre-parazioni di PRP.

Verifica dell'attività biologica della bio-membrana in vitro

L'attività biologica della bio-membrana è stata verificata in coltura primaria umana di fibroblasti da cute coltivati in terreno serum-free contenente il rilasciato della bio-membrana HA+PRP o HA+fisiologica (controllo) posta all'interno di un transwell, utilizzando la stessa coltura con tre preparazioni a diverso gruppo sanguigno.

La proliferazione cellulare è stata monitorata mediante saggio MTT per un arco temporale di 5 giorni. Dal grafico si osserva che il rilasciato della membrana HA+PRP (derivato dalla media delle tre preparazioni) stimola la proliferazione cellulare di circa 6 volte rispetto alla membrana di controllo che non ha alcun effetto sulle cellule (n=3 preparazioni di PRP, A, B e O (pool da 6 buffy coat per ogni gruppo analizzato); ogni preparazione di PRP a sua volta è stata testata in triplicato sulla coltura; la condizione HA+fisio è stata testata in duplicato). I valori ottenuti sono stati espressi come media \pm sem, la differenza osservata confrontando i diversi punti delle colture risulta statisticamente significativa (T-test, ** p<0,01; *** p<0,001). Il PRP delle stesse preparazioni, utilizzato direttamente nel transwell senza associazione alla membrana di HA (controllo), induce una proliferazione cellulare superiore rispetto al corrispettivo caricato sulla membrana di HA.

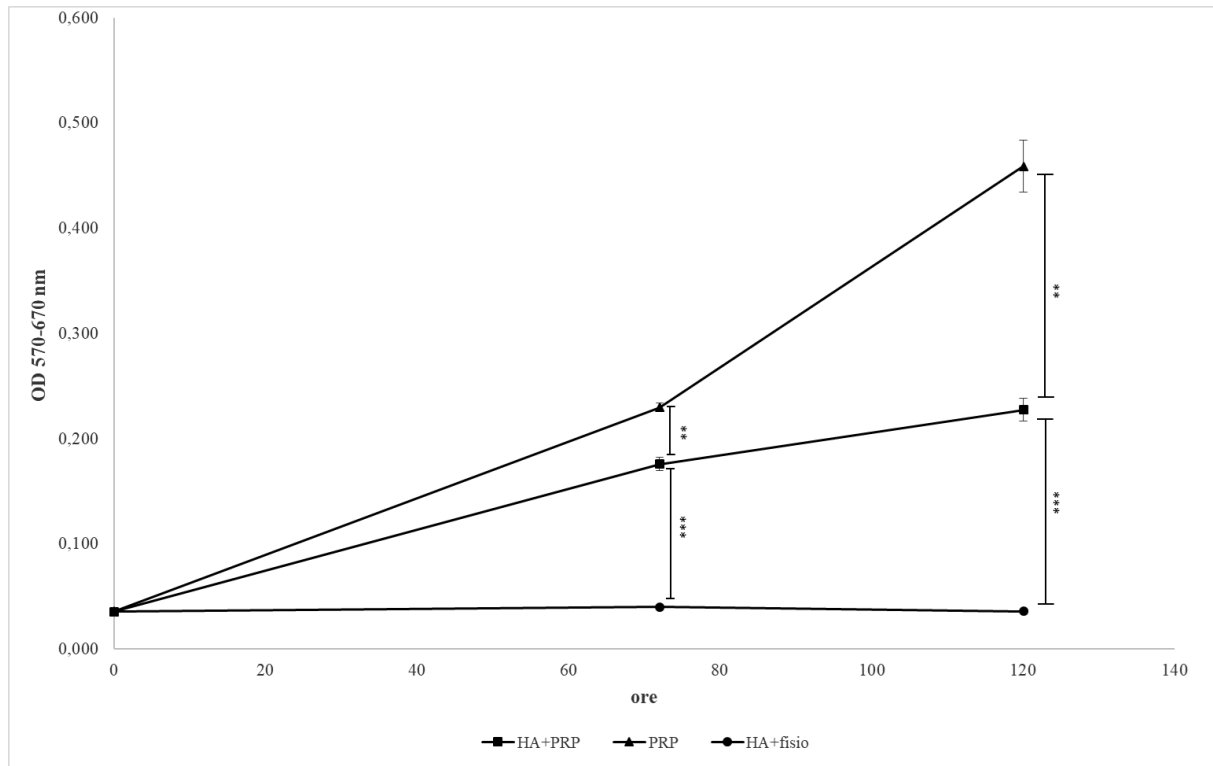


Figura 11. Valutazione della proliferazione cellulare di fibroblasti umani dermici in presenza del rilasciato dalla biomembrana HA+PRP, HA+fisio o in presenza diretta di PRP mediante saggio colorimetrico MTT. Le differenze osservate tra i vari punti della curva nelle diverse condizioni di coltura risultano statisticamente molto significative (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Cinetica di rilascio dei fattori di crescita

La bio-membrana di HA+PRP o di HA+fisio è stata monitorata nel tempo per il rilascio del fattore di crescita PDGF-BB. È stato definito il rilascio cumulativo del fattore nel tempo e la percentuale stimata di fattore rilasciato sulla base del quantitativo di PRP che era stato caricato inizialmente sulla bio-membrana.

I dati mostrano che la membrana di HA+PRP rilascia lentamente il PDGF-BB e dopo 7 giorni il rilasciato corrisponde a circa il 5% della quantità totale di PDGF-BB che si è stimato di aver caricato sulla membrana di HA (cioè alla quantità di PDGF-BB contenuta teoricamente nel volume di 80 μ l caricato inizialmente sulla membrana di HA 1 cm \times 1cm) (Figura 12).

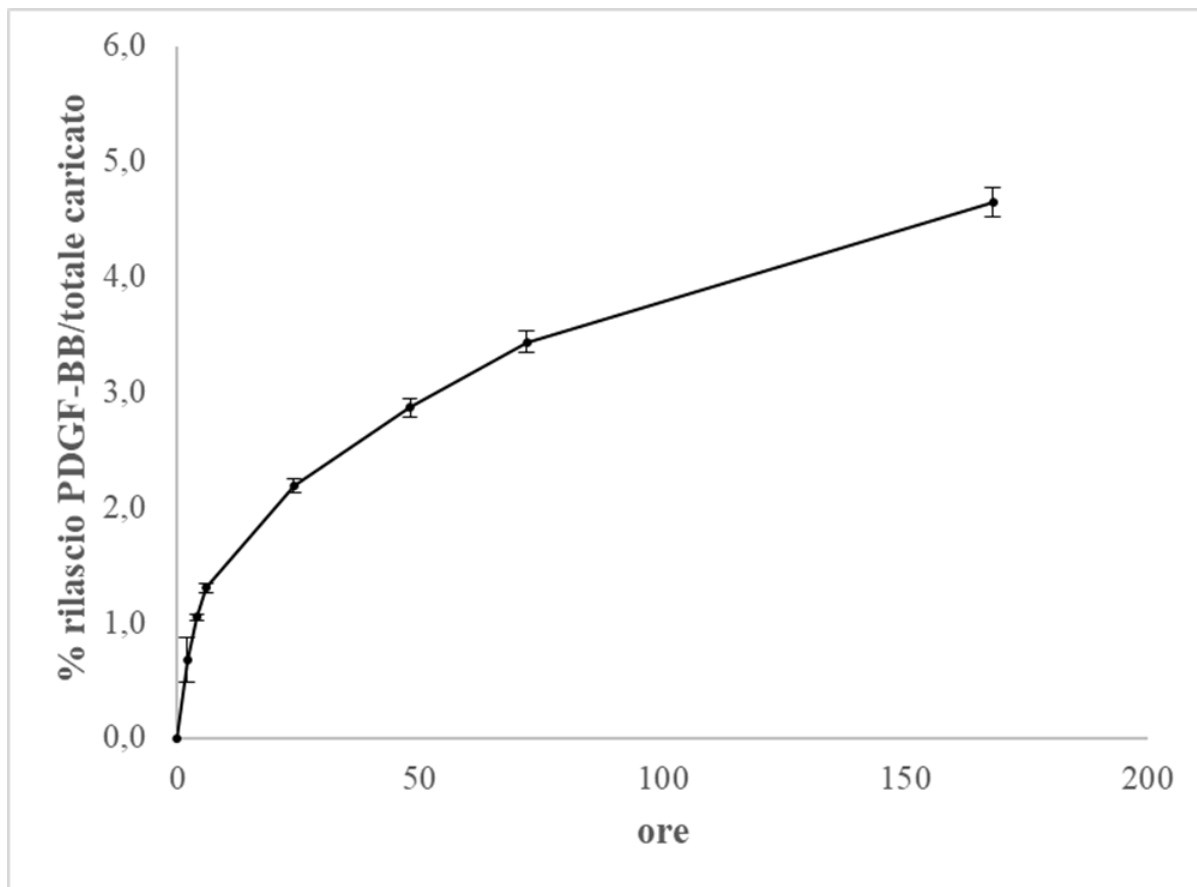


Figura 12. Analisi del rilascio del fattore di crescita PDGF-BB. Il rilascio è stato valutato dopo incubazione della bio-membrana in PBS a 37°C e 5% CO₂. La quantità di fattore è stata misurata a diversi time-points mediante saggio Elisa. La curva rappresenta la percentuale di PDGF-BB rilasciato sul totale di fattore inizialmente caricato sulla bio-membrana. I valori ottenuti derivano dalla media di 3 preparazioni di PRP, ciascuna valutata in duplicato.

Discussione

Il trattamento delle ulcere croniche rappresenta un importante problema sanitario che affligge milioni di persone nel mondo. Questo tipo di lesioni sono spesso una conseguenza di malattie metaboliche, come ad esempio il diabete mellito. Infatti, una delle principali complicanze della patologia diabetica è rappresentata dal possibile instaurarsi di ulcere di difficile guarigione, spesso localizzate nel piede e talvolta associate a neuropatia e/o deterioramento della funzione vascolare degli arti inferiori. Come conseguenza a tali alterazioni, il paziente tende ad ignorare la presenza di eventuali lesioni della cute che, per la loro difficoltà a guarire possono complicarsi con infezioni più o meno gravi sino ad arrivare all'instaurarsi di un'ulcera cronica che nei casi più gravi può comportare l'amputazione dell'arto. L'ulcera è una fonte di grande sofferenza per il paziente, comporta spesso lunghi periodi di cure ambulatoriali, prolungati e ripetuti ricoveri ospedalieri, in generale un peggioramento nella qualità della vita, oltre a gravare in modo pesante sul sistema sanitario.

I trattamenti standard utilizzati ad oggi per le ulcere diabetiche spesso non risultano essere risolutivi: i tassi di guarigione sono variabili e le recidive molto frequenti.

Nel processo fisiologico di guarigione delle ferite un ruolo chiave è giocato dalle piastrine che intervengono grazie al rilascio di molecole biologicamente attive, tra cui i fattori di crescita che giocano un ruolo nella migrazione di cellule mesenchimali, epiteliali ed endoteliali, nella sintesi e deposizione di collagene, glicosaminoglicani e altre molecole della matrice extracellulare che oltre a reclutare/attivare cellule del sistema immunitario nel letto della ferita sono elementi fondamentali nella regolazione della risoluzione del danno tissutale. I fattori rilasciati dalle piastrine sono regolatori fisiologici della riparazione tissutale, agiscono in modo sinergico e sono regolati nell'asse spazio-temporale secondo un ordine ben definito. In condizioni patologiche, come ad esempio nel diabete, il microambiente dell'ulcera presenta delle alterazioni importanti, tra cui una diminuita o alterata produzione di fattori di crescita^[139], che causano un ritardo o addirittura una mancata cicatrizzazione. Questo rappresenta il razionale dell'uso

ampiamente descritto in letteratura di un concentrato piastrinico, il PRP, per accelerare la riparazione tissutale sfruttando proprio il contenuto in fattori che attivano i meccanismi di riparo.

A tal fine, lo scopo di questa tesi è stato quello di proporre l'utilizzo di un dispositivo costituito da PRP allogeneico associato ad uno scaffold per il trattamento di ulcere di difficile guarigione. In particolare, lo studio è stato suddiviso in un progetto di ricerca di base che ha sviluppato una bio-membrana che vede associato il PRP a un biomateriale a base di HA e in una ricerca clinica che propone in un trial clinico lo studio dell'efficienza della biomembrana nella rigenerazione cutanea valutando anche la risposta del sistema immunitario all'applicazione di un prodotto di derivazione allogeneica. L'obiettivo dello studio è di identificare una cura migliore per le ulcere difficili mirando a ridurre i costi della sanità pubblica. Sebbene diversi gruppi abbiano dimostrato l'efficienza del PRP nell'accelerare i processi di guarigione, altri mettono ancora in discussione il suo ruolo nel riparare delle lesioni tissutali. La discrepanza dei risultati ottenuti è dovuta a diversi fattori che vanno dai protocolli di produzione del PRP alle modalità e sedi di applicazione. Uno dei limiti dell'approccio terapeutico è legato al fatto che in molti casi il PRP è stato ottenuto da una singola donazione di sangue ed è noto che il sangue presenta una variabilità significativa nella concentrazione piastrinica tra un individuo e l'altro. Un'altra causa di variabilità nell'efficacia del PRP è legata al tipo di protocollo usato per la sua produzione che comporta differenze nella concentrazione piastrinica ottenuta e quindi nel contenuto in fattori di crescita. Anche lo stato di salute del donatore influisce sulla composizione del PRP e quindi sulla sua efficacia biologica. Nel tentativo quindi di eliminare tali variabilità del PRP, abbiamo messo a punto un protocollo standardizzato che prevede di utilizzare un pool omogruppo derivante dai buffy coat di 6 donatori ^[137]. Il PRP è prodotto in un sistema chiuso e rigidamente controllato presso il Centro Trasfusionale del Policlinico San Martino a partire dai buffy coat isolati dal sangue intero e la concentrazione delle piastrine è pari a $2.0 \times 10^6/\mu\text{l}$. La scelta di utilizzare questa concentrazione piastrinica è legata all'esperienza raccolta nei dati del laboratorio (modello topo diabetico) e quanto riportato in letteratura, secondo la quale la concentrazione "terapeutica" del PRP dovrebbe essere almeno 5 volte più alta di quella del sangue ^[137,199].

Per ridurre al minimo la variabilità, le preparazioni di PRP sono state caratterizzate per il profilo emocromocitometrico e sulla concentrazione proteica totale e di alcuni fattori di

crescita. Tutte le preparazioni hanno un basso contenuto di leucociti, al di sotto del livello basale del sangue. La presenza di leucociti nel PRP può essere variabile a seconda del protocollo di preparazione utilizzato e la loro utilità nel PRP è ancora dibattuta. Alcuni studi infatti attribuiscono alla presenza dei leucociti un effetto negativo sul PRP, legato al rilascio di enzimi proteolitici e specie reattive all'ossigeno, altri studi invece considerano i leucociti come una sorgente di citochine oltre ad essere importanti per la prevenzione delle infezioni^[127].

La bio-membrana contenente PRP è stata caratterizzata per le sue proprietà di rilascio di uno dei fattori di crescita piastrinici più rappresentativi e presente ad elevata concentrazione, il PDGF-BB. I dati ottenuti dall'analisi del rilascio a 7 giorni dimostrano un modesto rilascio del PDGF-BB dalla bio-membrana. Nonostante ciò, la bio-membrana contenente PRP è in grado di indurre proliferazione in fibroblasti dermici umani in modo statisticamente significativo rispetto alla membrana di controllo costituita da HA caricata con soluzione salina. Questo dimostra che il PRP combinato all'acido ialuronico mantiene la propria attività e che l'acido ialuronico, in questa formulazione, agisce come veicolo di rilascio del contenuto piastrinico.

Diversi studi, eseguiti con preparazioni di gel piastrinico, hanno mostrato che il rilascio della maggior parte dei fattori bioattivi si verifica durante le prime ore dopo l'attivazione piastrinica e che fino al 90% dei fattori è stato rilasciato durante le prime 24 ore dalla preparazione del gel. Nel nostro studio l'uso di una membrana di HA permette di maneggiare il PRP allo stato liquido con facilità e consente un rilascio dei fattori di crescita graduale nel tempo ed evitare il burst di rilascio come è stato osservato da Spanò et al. utilizzando il PRP puro sotto forma di gel^[137]. L'uso della membrana di HA in associazione al PRP infatti ha mostrato un rilascio del fattore di crescita PDGF-BB più controllato e prolungato nei 7 giorni presi in esame, probabilmente in accordo con un sequestro del fattore di crescita da parte della membrana stessa. Un rilascio prolungato di fattori può accelerare e aumentare la qualità della rigenerazione dei tessuti.^[137] Quindi l'associazione del PRP alla membrana di HA permette il rilascio di fattori di crescita per la durata di ogni singolo trattamento.

Lo studio eseguito in vitro sulla caratterizzazione della bio-membrana è stato preliminare all'avvio dello studio clinico su pazienti diabetici con ulcere cutanee. Lo studio clinico è stato finanziato dal Ministero della Salute e ha previsto l'utilizzo della bio-membrana su 110 pazienti suddivisi in due gruppi di trattamento: 55 trattati con la bio-membrana contenente PRP e 55 per

il trattamento con la bio-membrana con soluzione salina (controllo). Lo studio è stato proposto come studio randomizzato in doppio cieco e prevede l'utilizzo di PRP allogeneico derivato da un pool di 6 donatori.

Obiettivi dello studio, al momento in corso, saranno la valutazione dell'efficacia rigenerativa del PRP e la verifica dell'eventuale immunogenicità del prodotto allogeneico. La letteratura a supporto del ruolo immunogenico del PRP allogeneico è limitata a pochi articoli. In particolare uno studio condotto in coniglio il PRP è stato iniettato per via intramuscolare e il sangue degli animali trattati è stato analizzato per il numero di cellule T CD⁴⁺ e CD⁸⁺ prima del trattamento e fino a 12 settimane post trattamento. I dati hanno dimostrato solo un lieve e non significativo aumento delle cellule T CD⁴⁺ dopo una settimana dal trattamento; il valore è ritornato a livelli normali dopo l'ottava settimana^[200]. Studi sull'uomo hanno portato allo stesso tipo di risultato, riguardo alle reazioni immunitarie verso antigeni non self. In pazienti con ulcere diabetiche trattati con PRP allogeneico sono stati dosati marker infiammatori e presenza di anticorpi anti-piastrine. I risultati hanno mostrato che non vi erano differenze rispetto al gruppo di controllo^[201]. La letteratura a supporto della possibilità di sviluppare reazioni avverse al trattamento con PRP allogeneico non è ampia, né esaustiva, e per questi motivi l'obiettivo secondario del nostro studio clinico è proprio la valutazione di questo aspetto che prevede di monitorare la presenza di anticorpi anti HLA I e II nel sangue dei pazienti pre e post trattamento. Il vantaggio di utilizzare un prodotto allogeneico sta nel garantire un'ampia disponibilità di concentrati piastrinici sfruttando buffy coat non più utilizzabili per scopi trasfusionali, conservati nelle bio-banche dei centri trasfusionali, e rappresenterebbe un'opzione terapeutica comoda anche per i pazienti che non possono andare incontro all'autodonazione del proprio sangue (bambini, pazienti con malattie ematologiche, soggetti anziani affetti da co-morbidità) o pazienti che devono essere trattati in condizioni di emergenza (ad esempio per traumi) dato che sarebbe limitato il tempo per andare incontro alla preparazione del PRP autologo. Questo studio si è avvalso anche di una precedente esperienza del laboratorio di utilizzo di PRP allogeneico, sotto forma di gel piastrinico, nel trattamento di ulcere in piede diabetico su un numero limitato di pazienti. I risultati ottenuti sono stati soddisfacenti e non sono stati segnalati effetti avversi al trattamento.

D'altronde in ambito trasfusionale, più recentemente, i concentrati piastrinici trasfusi sono tutti di natura allogeneica. Le indicazioni alla loro trasfusione prevedono il rispetto per il gruppo

sanguigno AB0, in quanto sulla superficie piastrinica sono presenti antigeni AB0 specifici. Inoltre la presenza di plasma, seppure non clinicamente rilevante, può causare delle positività ad alcuni test pretrasfusionali aumentando di conseguenza i test necessari e i costi di gestione del paziente da trasfondere. Per quel che riguarda il fattore Rh va sottolineato che le piastrine non contengono tali antigeni ma che la possibile contaminazione di globuli rossi possa portare ad una allo-immunizzazione da anticorpi anti-D. Nella prassi clinica è indicato trasfondere piastrine di gruppi negativi a pazienti negativi per l'antigene Rh facendo particolare attenzione alle bambine e alle donne in età fertile. Vi è comunque la possibilità di sviluppare anticorpi contro l'HLA I portando a condizioni di refrattarietà piastrinica. Spesso, quando si presentano queste condizioni di refrattarietà sono presenti anche altre concause di natura non immunologica. Alcuni studi hanno evidenziato come l'irradiazione delle piastrine riduca la possibilità di produrre tali anticorpi dal 45% al 7-10%. È importante sottolineare che nel caso delle trasfusioni di plasma di infusione diretta dell'emocomponente nel torrente ematico^[202].

Conclusioni

L'efficacia biologica dei fattori piastrinici nella induzione e regolazione della rigenerazione tissutale è alla base dell'utilizzo del PRP per accelerare la guarigione delle ferite. Il dispositivo caratterizzato dalla combinazione di PRP, come agente biologicamente attivo e acido ialuronico come scaffold, proposto nello studio per il trattamento di ulcere di difficile guarigione, ha mostrato in vitro la capacità di rilasciare i fattori piastrinici in modo graduale e di sostenere la proliferazione di fibroblasti dermici che sono una delle componenti cellulari di fondamentale importanza nella cute. Nella parte clinica dello studio, trial di fase II randomizzato e in doppio cieco, viene proposto l'utilizzo topico del dispositivo utilizzando su ulcere di soggetti diabetici un PRP allogenico pronto all'uso, prodotto secondo una procedura standardizzata e rigorosamente controllata. Un prodotto allogenico presenterebbe diversi vantaggi su quello autologo, soprattutto per quella fascia di popolazione impossibilitata a donare il proprio sangue ma pone la questione importante dell'eventuale immunogenicità del prodotto che sarà investigata sui pazienti post-trattamento.

Bibliografia

1. Oreffo, R. O. C. & Triffitt, J. T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* **25**, 5–9 (1999).
2. Abdallah S Daar, H. L. G. A proposed definition of regenerative medicine. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE* 179–184 (2007) doi:10.1002/term.
3. de Luca, M. & Cancedda, R. Culture of human epithelium. *Burns* **18**, 5–10 (1992).
4. Cancedda, R. *et al.* Bone Marrow Stromal Cells and Their Use in Regenerating Bone. *Novartis Found Symp.* **249**, 133-137,170-174,239-241 (2003).
5. Zakrzewski, J. L., van den Brink, M. R. M. & Hubbell, J. A. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nature Biotechnology* **32**, 786–794 (2014).
6. Tottoli, E. M. *et al.* Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics* **12**, 1–30 (2020).
7. Gregory S Schultz, R Gary Sibbald, Vincent Falanga, Elizabeth A Ayello, Caroline Dowsett, Keith Harding, Marco Romanelli, Michael C Stacey, Luc Teot, W. V. Wound bed preparation: a systematic approach to chronic wounds. *British journal of community nursing* **8**, (2003).
8. Mofazzal Jahromi, M. A. *et al.* Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* **123**, 33–64 (2018).
9. Lazarus, G. S. *et al.* Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration* **2**, 165–170 (1994).
10. Guo, S. & DiPietro, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research* **89**, 219–229 (2010).
11. Cancedda, R., Bollini, S., Descalzi, F., Mastrogiacomo, M. & Tasso, R. Learning from Mother Nature: Innovative Tools to Boost Endogenous Repair of Critical or Difficult-

- to-Heal Large Tissue Defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **5**, 1–13 (2017).
12. Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine* **6**, (2014).
 13. Barker, T. H. & Engler, A. J. The provisional matrix: setting the stage for tissue repair outcomes. *Matrix Biology* **60–61**, 1–4 (2017).
 14. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
 15. Stadelmann, W. K., Digenis, A. G. & Tobin, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American Journal of Surgery* **176**, 26S-38S (1998).
 16. Broughton, G., Janis, J. E. & Attinger, C. E. Wound healing: An overview. *Plastic and Reconstructive Surgery* **117**, 1–32 (2006).
 17. Yun, S.-H. H., Sim, E.-H. H., Goh, R.-Y. Y., Park, J.-I. I. & Han, J.-Y. Y. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *BioMed Research International* **2016**, 10–14 (2016).
 18. Cañedo-Dorantes, L. & Cañedo-Ayala, M. Skin acute wound healing: A comprehensive review. *International Journal of Inflammation* **2019**, (2019).
 19. Tamagawa-Mineoka, R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. *Journal of Dermatological Science* **77**, 93–101 (2015).
 20. Thomas A Wynn 1, L. B. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 21. Ridiandries, A., Tan, J. T. M. & Bursill, C. A. The Role of Chemokines in Wound Healing. doi:10.3390/ijms19103217.
 22. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
 23. Werner, S., Krieg, T. & Smola, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 998–1008 (2007).
 24. Guy Eelen, Pauline de Zeeuw, Michael Simons, P. C. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. (2015) doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.302855.
 25. Pastar, I. *et al.* Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care* **3**, 445–464 (2014).

26. Andia, I. & Abate, M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regenerative Medicine* **8**, 645–658 (2013).
27. Broughton: II, Janis, JE, and Attinger, CE (2006).... - Google Scholar. [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Wound healing%3A An overview&author=G. Broughton&publication_year=2006](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Wound+healing%3A+An+overview&author=G.+Broughton&publication_year=2006).
28. Hayes, A. J. & Ralphs, J. R. The response of foetal annulus Wbrosus cells to growth factors: modulation of matrix synthesis by TGF-1 and IGF-1. *Histochem Cell Biol* **136**, 163–175 (2011).
29. Maquart, F. X. & Monboisse, J. C. Extracellular matrix and wound healing. *Pathologie Biologie* **62**, 91–95 (2014).
30. Rahim, K. *et al.* Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microbial Ecology* **73**, 710–721 (2017).
31. Stojadinovic, A., Carlson, J. W., Schultz, G. S., Davis, T. A. & Elster, E. A. Topical advances in wound care. *Gynecologic Oncology* **111**, S70–S80 (2008).
32. Schultz, G. S. & Mast, B. A. Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: Cytokines, proteases, and growth factors. *Wounds* **10**, (1998).
33. Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R. & Herman, I. M. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: Normal and chronic wounds: Biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin and Wound Care* **25**, 304–314 (2012).
34. Schreml, S. *et al.* Oxygen in acute and chronic wound healing. *British Journal of Dermatology* **163**, 257–268 (2010).
35. Ashcroft, G. S., Mills, S. J. & Ashworth, J. J. Ageing and wound healing. *Biogerontology* **3**, 337–345 (2002).
36. Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C. & Xue, M. Inflammation in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1–14 (2016).
37. Peschen, M. *et al.* Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the skin is modulated in progressing stages of chronic venous insufficiency. *Acta Dermato-Venereologica* **79**, 27–32 (1999).
38. Mudge, E. J. Recent accomplishments in wound healing. *International Wound Journal* **12**, 4–9 (2015).

39. Zhao, G. *et al.* Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds. *Advances in Wound Care* **2**, 389–399 (2013).
40. Mustoe, T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *American Journal of Surgery* **187**, S65–S70 (2004).
41. Fonder, M. A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**, 185–206 (2008).
42. Morton, L. M. & Phillips, T. J. Wound healing and treating wounds Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology* **74**, 589–605 (2016).
43. Word, R. Medical and Surgical Therapy for Advanced Chronic Venous Insufficiency. *Surgical Clinics of North America* **90**, 1195–1214 (2010).
44. Trent, J. T., Falabella, A., Eaglstein, W. H. & Kirsner, R. S. Venous ulcers: pathophysiology and treatment options. *Ostomy/wound management* **51**, 36–38 (2005).
45. Bonham, P. A. Assessment and management of patients with venous, arterial, and diabetic/neuropathic lower extremity wounds. *AACN clinical issues* **14**, 442–456 (2003).
46. Fowkes, F. G. R. *et al.* Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: A systematic review and analysis. *The Lancet* **382**, 1329–1340 (2013).
47. Grey, J. E., Enoch, S. & Harding, K. G. Venous and arterial leg ulcers. *British Medical Journal* **332**, 347–350 (2006).
48. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Advances in skin & wound care* **17**, 24–35 (2004).
49. Wang, Z. *et al.* Evaluation of emulsion electrospun polycaprolactone/hyaluronan/epidermal growth factor nanofibrous scaffolds for wound healing. *Journal of Biomaterials Applications* **30**, 686–698 (2016).
50. Devendra, D., Liu, E. & Eisenbarth, G. S. Type 1 diabetes: Recent developments. *British Medical Journal* **328**, 750–754 (2004).
51. Kharroubi, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes* **6**, 850 (2015).

52. Lodhi, T. I. Diabetes Mellitus in Older Women. *Clinics in Geriatric Medicine* (2021) doi:10.1016/j.cger.2021.06.003.
53. Baltzis, D., Eleftheriadou, I. & Veves, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy* **31**, 817–836 (2014).
54. R. Gary Sibbald, K. Y. W. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **32**, 13–23 (2014).
55. Blakytyn, R. & Jude, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine* **23**, 594–608 (2006).
56. Garwood, C. S., Steinberg, J. S. & Kim, P. J. Bioengineered Alternative Tissues in Diabetic Wound Healing. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery* **32**, 121–133 (2015).
57. F., G. Classification of diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 186–194 (2016) doi:10.1002/dmrr.
58. Monteiro-Soares, M. *et al.* Diabetic foot ulcer classifications: A critical review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **36**, 1–16 (2020).
59. Armstrong, D. G., Lavery, L. A. & Harkless, L. B. Validation of a Diabetic Wound Classification System. *Diabetes care* **21**, 855–859 (1998).
60. Powers, J. G., Higham, C., Broussard, K. & Phillips, T. J. Wound healing and treating wounds Chronic wound care and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* **74**, 607–625 (2016).
61. König, M., Vanscheidt, W., Augustin, M. & Kapp, H. Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. *Journal of wound care* **14**, 320–323 (2005).
62. Courtenay, M. The use of larval therapy in wound management in the UK. *Journal of wound care* **8**, 177–179 (1999).
63. Barillo, D. J., Barillo, A. R., Korn, S., Lam, K. & Attar, P. S. The antimicrobial spectrum of Xeroform®. *Burns* **43**, 1189–1194 (2017).
64. Savina, I. N., Zoughaib, M. & Yergeshov, A. A. Design and assessment of biodegradable macroporous cryogels as advanced tissue engineering and drug carrying materials. *Gels* **7**, (2021).

65. Vivcharenko, V., Wojcik, M., Palka, K. & Przekora, A. Highly porous and superabsorbent biomaterial made of marine-derived polysaccharides and ascorbic acid as an optimal dressing for exuding wound management. *Materials* **14**, 1–21 (2021).
66. Barbu, A. *et al.* Current trends in advanced alginate-based wound dressings for chronic wounds. *Journal of Personalized Medicine* **11**, (2021).
67. Silva, J. M. *et al.* Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. *ACS Applied Bio Materials* **2**, 4346–4355 (2019).
68. Brumberg, V., Astrelina, T., Malivanova, T. & Samoilov, A. Modern wound dressings: Hydrogel dressings. *Biomedicines* **9**, (2021).
69. Streubel, P. N., Stinner, D. J. & Obremskey, W. T. Use of negative-pressure wound therapy in orthopaedic trauma. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **20**, 564–574 (2012).
70. Anitua, E., Tejero, R., Alkhraisat, M. H. & Orive, G. Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. *BioDrugs* **27**, 97–111 (2013).
71. Chen, L. J. & Wang, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. *Biomaterials* **23**, 2631–2639 (2002).
72. Chaudhari, A. A. *et al.* Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, (2016).
73. Gathani, K. M. & Raghavendra, S. S. Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dental Research Journal* **13**, 379–386 (2016).
74. Eltom, A., Zhong, G. & Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering* **2019**, (2019).
75. Chanjuan Dong, and Y. L. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers* **8**, 1–20 (2016).
76. Luc A J Roelofs 1, Egbert Oosterwijk 1, Barbara B M Kortmann 1, Willeke F Daamen 2, Dorien M Tiemessen 1, Katrien M Brouwer 2, Alex J Eggink 3, A Jane Crevels 1, Rene M H Wijnen 4, Toin H van Kuppevelt 2, Paul J Geutjes 1, W. F. J. F. 1. Bladder Regeneration using a Smart Acellular Collagen Scaffold. *Tissue Engineering Part A* 1–39 (2015).

77. K., M. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. **27**, (1947).
78. de Oliveira, J. D. *et al.* Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories* **15**, 1–19 (2016).
79. Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S. & Vertuani, S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers* **10**, (2018).
80. Shiedlin, A. *et al.* Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidemicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* **5**, 2122–2127 (2004).
81. Berce, C. *et al.* Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **163**, 155–166 (2018).
82. Andia, I., Rubio-Azpeitia, E., Martin, J. I. & Abate, M. Current Concepts and Translational Uses of Platelet Rich Plasma Biotechnology. *Biotechnology* 1–32 (2015) doi:10.5772/59954.
83. Andia, I. Platelet-rich plasma biology. in *Clinical Indications and Treatment Protocols with Platelet-Rich Plasma in Dermatology* (eds. Alves, R. & Grimalt, R.) 3–15 (Ediciones Mayo, 2016).
84. Win, M. *et al.* A Systematic Review of Fibrin Glue as an Ideal Treatment for the Pilonidal Disease. *Cureus* **13**, (2021).
85. Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L. & Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology* **27**, 158–167 (2009).
86. Leitner, G. C. *et al.* Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: A comparison of four different systems. *Vox Sanguinis* **91**, 135–139 (2006).
87. Andia, I., Sanchez, M. & Maffulli, N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy* **10**, 1415–1426 (2010).
88. Everts, P. A. M. *et al.* Platelet gel and fibrin sealant reduce allogeneic blood transfusions in total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **50**, 593–599 (2006).
89. Zhou, S.-F. *et al.* Analysis of Autologous Platelet-Rich Plasma During Ascending and Transverse Aortic Arch Surgery. *The Annals of Thoracic Surgery* **95**, 1525–1530 (2013).

90. Conde Montero, E. PRP in wound healing. in *Clinical Indications and Treatment Protocols with Platelet-Rich Plasma in Dermatology* (eds. Alves, R. & Grimalt, R.) 59–72 (Ediciones Mayo, 2016).
91. Bou Camps, L. PRP in cosmetic dermatology. in *Clinical Indications and Treatment Protocols with Platelet-Rich Plasma in Dermatology* (eds. Alves, R. & Grimalt, R.) 45–57 (Ediciones Mayo, 2016).
92. Sclafani, A. P. & McCormick, S. A. Induction of dermal collagenesis, angiogenesis, and adipogenesis in human skin by injection of platelet-rich fibrin matrix. *Archives of Facial Plastic Surgery* **14**, 132–136 (2012).
93. Kaushansky, K. Thrombopoiesis. *Seminars in Hematology* **52**, 4–11 (2015).
94. Castoldi, L. MALATTIE DEL SANGUE E DEGLI ORGANI EMATOPOIETICI.
95. Katharina Neubauer, B. Z. Endothelial cells and coagulation.
96. Nurden, A. T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* **105**, 13–33 (2011).
97. Kahner, B. N., Shankar, H., Murugappan, S., Prasad, G. L. & Kunapuli, S. P. Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **4**, 2317–2326 (2006).
98. Warwick S Nesbitt, Erik Westein, Francisco Javier Tovar-Lopez, Elham Tolouei, Arnan Mitchell, Jia Fu, Josie Carberry, Andreas Fouras, S. P. J. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation.
99. Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J. F. & Mautner, K. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1–36 (2020).
100. Kowalska, M. A., Rauova, L. & Poncz, M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research* **125**, 292–296 (2010).
101. Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P. & Nurden, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis* **91**, 4–15 (2004).
102. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews* **23**, 177–189 (2009).

103. Wagner, D. D. & Frenette, P. S. The vessel wall and its interactions. *Blood* **111**, 5271–5281 (2008).
104. von Hundelshausen, P., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* **16**, 84–96 (2009).
105. Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I. & Anitua, E. Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **13**, 3532–3548 (2008).
106. Ghoshal, K. & Bhattacharyya, M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal* **2014**, (2014).
107. Milka Koupenova, Lauren Clancy, Heather A. Corkrey, and J. E. F. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Physiology & behavior* **176**, 139–148 (2017).
108. Fadadu, P. P., Mazzola, A. J., Hunter, C. W. & Davis, T. T. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: A call for PRP standardization. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* **44**, 652–659 (2019).
109. Amable, P. R. *et al.* Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research and Therapy* **4**, 1–13 (2013).
110. Gentile, P. *et al.* Impact of the different preparation methods to obtain autologous non-activated platelet-rich plasma (A-PRP) and activated platelet-rich plasma (AA-PRP) in plastic surgery: Wound healing and hair regrowth evaluation. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, (2020).
111. Nguyen, P. A. & Pham, T. A. V. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. *Journal of applied oral science : revista FOB* **26**, e20180077 (2018).
112. Haunschild, E. D. *et al.* Platelet-Rich Plasma Augmentation in Meniscal Repair Surgery: A Systematic Review of Comparative Studies. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery* **36**, 1765–1774 (2020).
113. Marx, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* **10**, 225–228 (2001).
114. Hee, H. T., Majd, M. E., Holt, R. T. & Myers, L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *European Spine Journal* **12**, 400–407 (2003).

115. Giusti, I. *et al.* Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion* **49**, 771–778 (2009).
116. Zheng, C. *et al.* Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells in vitro. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **10**, 428–436 (2016).
117. Dhurat, R. & Sukesh, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* **7**, 189 (2014).
118. Dohan Ehrenfest, D. M. *et al.* Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: Current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* **4**, 3–9 (2014).
119. Mariani, E. *et al.* Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro Clinical microbiology and vaccines. *BMC Microbiology* **15**, 1–13 (2015).
120. Krüger, J. P. *et al.* Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **40**, 432–440 (2013).
121. Mariani, E. *et al.* Leukocyte-rich Platelet-rich Plasma injections do not up-modulate intra-articular pro-inflammatory cytokines in the osteoarthritic knee. *PLoS ONE* **11**, (2016).
122. Parrish, W. R. Physiology of Blood Components in Wound Healing: an Appreciation of Cellular Co-Operativity in Platelet Rich Plasma Action. *Journal of Exercise, Sports & Orthopedics* **4**, 1–14 (2017).
123. Seta, N. & Kuwana, M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio Journal of Medicine* **56**, 41–47 (2007).
124. Perut, F. *et al.* Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* **15**, 830–839 (2013).
125. Lansdown, D. A. & Fortier, L. A. Platelet-Rich Plasma: Formulations, Preparations, Constituents, and Their Effects. *Operative Techniques in Sports Medicine* **25**, 7–12 (2017).

126. Arora, S. & Agnihotri, N. Platelet Derived Biomaterials for Therapeutic Use: Review of Technical Aspects. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* **33**, 159–167 (2017).
127. Eymard, F. *et al.* Intra-articular injections of platelet-rich plasma in symptomatic knee osteoarthritis: a consensus statement from French-speaking experts. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* (2020) doi:10.1007/S00167-020-06102-5.
128. Cavallo, C. *et al.* Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *BioMed Research International* **2016**, (2016).
129. Akbarzadeh, S., McKenzie, M. B., Rahman, M. M. & Cleland, H. Allogeneic Platelet-Rich Plasma: Is It Safe and Effective for Wound Repair? *European Surgical Research* **62**, 1–9 (2021).
130. Sundman, E. A., Cole, B. J. & Fortier, L. A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *American Journal of Sports Medicine* **39**, 2135–2140 (2011).
131. Tambella, A. M., Martin, S., Cantalamessa, A., Serri, E. & Attili, A. R. Platelet-rich Plasma and Other Hemocomponents in Veterinary Regenerative Medicine. *Wounds* **30**, 329–336 (2018).
132. Duarte Lana, J. F. S. Randomized controlled trial comparing hyaluronic acid, platelet-rich plasma and the combination of both in the treatment of mild and moderate osteoarthritis of the knee- letter to the editor & author response(2). *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine* **13**, P81–P83 (2017).
133. Almohanna, H. M., Ahmed, A. A., Griggs, J. W. & Tosti, A. Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Alopecia Areata: A Review. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **20**, S45–S49 (2020).
134. Hesseler, M. J. & Shyam, N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology* **81**, 834–846 (2019).
135. L. Alio, J., Arnalich-Montiel, F. & E. Rodriguez, A. The Role of “Eye Platelet Rich Plasma” (E-Prp) for Wound Healing in Ophthalmology. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**, 1257–1265 (2012).

136. You, J., Hodge, C., Hoque, M., Petsoglou, C. & Sutton, G. Human platelets and derived products in treating ocular surface diseases – a systematic review. *Clinical Ophthalmology* **14**, 3195–3210 (2020).
137. Spanò, R. *et al.* Platelet-rich plasma-based bioactive membrane as a new advanced wound care tool. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **12**, e82–e96 (2018).
138. Han, G. & Ceilley, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy* **34**, 599–610 (2017).
139. Brem, H. & Tomic-Canic, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *Journal of Clinical Investigation* vol. 117 1219–1222 (2007).
140. Stephan Barrientos, MD, Harold Brem, MD, Olivera Stojadinovic, MD, and Marjana Tomic-Canic, P. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Physiology & behavior* **176**, 139–148 (2016).
141. Knighton, D. R. *et al.* *Classification and Treatment of Chronic Nonhealing Wounds Successful Treatment with Autologous Platelet-derived Wound Healing Factors (PD WHF)*.
142. Joon, P. H., Heun, D. J. & Yun, W. K. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Annals of Plastic Surgery* **56**, 394–398 (2006).
143. Blakytyn, R., Jude, E. B., Martin Gibson, J., Boulton, A. J. M. & Ferguson, M. W. J. Lack of insulin-like growth factor I (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. *Journal of Pathology* **190**, 589–594 (2000).
144. Flad, H.-D. & Brandt, E. Platelet-derived chemokines: pathophysiology and therapeutic aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 2363–2386 (2010).
145. Gleissner, C. A., Shaked, I., Little, K. M. & Ley, K. CXC Chemokine Ligand 4 Induces a Unique Transcriptome in Monocyte-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology* **184**, 4810–4818 (2010).
146. dos Santos, R. G. *et al.* The regenerative mechanisms of platelet-rich plasma: A review. *Cytokine* **144**, 155560 (2021).
147. Walsh, T. G., Metharom, P. & Berndt, M. C. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets* **26**, 199–211 (2015).

148. Brill, A., Elinav, H. & Varon, D. Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. doi:10.1016/j.cardiores.2004.04.012.
149. Richardson, T. P., Peters, M. C., Ennett, A. B. & Mooney, D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotech* **19**, 1029–1034 (2001).
150. Zhang, W. *et al.* Platelet-rich plasma for the treatment of tissue infection: Preparation and clinical evaluation. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **25**, 225–236 (2019).
151. Badade, P. S., Mahale, S. A., Panjwani, A. A., Vaidya, P. D. & Warang, A. D. Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin. *Indian Journal of Dental Research* **27**, 300–304 (2016).
152. Aytaç Çetinkaya, R. *et al.* Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria: in vitro antibacterial activity study. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery* **45**, 555–565 (2019).
153. Cetinkaya, R. A. *et al.* The efficacy of platelet-rich plasma gel in MRSA-related surgical wound infection treatment: an experimental study in an animal model. *Eur J Trauma Emerg Surg* **44**, 859–867 (2018).
154. D’asta, F. *et al.* The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: A systematic review. *Platelets* **29**, 9–20 (2018).
155. Everts, P. A. *et al.* Exogenous Application of Platelet-Leukocyte Gel during Open Subacromial Decompression Contributes to Improved Patient Outcome. *European Surgical Research* **40**, 203–210 (2008).
156. Everts, P. A. M. *et al.* Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *Journal of Extracorporeal Technology* **38**, 174–187 (2006).
157. Sommer, C. Serotonin in pain and analgesia: Actions in the periphery. *Molecular Neurobiology* **30**, 117–125 (2004).
158. Lin, M. T., Wei, K. C. & Wu, C. H. Effectiveness of platelet-rich plasma injection in rotator cuff tendinopathy: A systematic review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Diagnostics* **10**, 1–13 (2020).
159. Urits, I. *et al.* Injection Techniques for Common Chronic Pain Conditions of the Foot: A Comprehensive Review. *Pain and Therapy* **9**, 145–160 (2020).
160. Kuffler, D. P. Platelet-Rich Plasma Promotes Axon Regeneration, Wound Healing, and Pain Reduction: Fact or Fiction. *Molecular Neurobiology* **52**, 990–1014 (2015).

161. Mohammadi, S. *et al.* Evaluation of platelet-rich plasma gel potential in acceleration of wound healing duration in patients underwent pilonidal sinus surgery: A randomized controlled parallel clinical trial. *Transfusion and Apheresis Science* **56**, 226–232 (2017).
162. Yoshida, M., Funasaki, H. & Marumo, K. Efficacy of autologous leukocyte-reduced platelet-rich plasma therapy for patellar tendinopathy in a rat treadmill model. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* **6**, 205–215 (2016).
163. Liu, X. *et al.* Effects of leukocyte- and platelet-rich plasma on tendon disorders based on in vitro and in vivo studies (Review) . *Experimental and Therapeutic Medicine* **21**, 1–7 (2021).
164. Lim, W. *et al.* Relationship of cytokine levels and clinical effect on platelet-rich plasma-treated lateral epicondylitis; Relationship of cytokine levels and clinical effect on platelet-rich plasma-treated lateral epicondylitis. (2017) doi:10.1002/jor.23714.
165. Xie, X. *et al.* Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials* **33**, 7008–7018 (2012).
166. Musumeci, G. *et al.* Osteoarthritis in the XXIst century: Risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 6093–6112 (2015).
167. Drengk, A., Zapf, A., Stürmer, E. K., Stürmer, K. M. & Frosch, K. H. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* **189**, 317–326 (2009).
168. Southworth, T. M., Naveen, N. B., Tauro, T. M., Leong, N. L. & Cole, B. J. The Use of Platelet-Rich Plasma in Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Journal of Knee Surgery* **32**, 37–45 (2019).
169. Bijan Forogh, Elaheh Mianehsaz, Shervan Shoaee, Tannaz Ahadi, Gholam R Raissi, S. S. Effect of single injection of platelet-rich plasma in comparison with corticosteroid on knee osteoarthritis: a double-blind randomized clinical trial. (2018) doi:10.23736/S0022-4707.18.08413-X.
170. Bendinelli, P. *et al.* Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: Mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *Journal of Cellular Physiology* **225**, 757–766 (2010).

171. Lubaba A. Abdul Ameer, Zainab J. Raheem, Saif Saadedeen Abdulrazaq, Basima Gh. Ali, Maysaa Mahdi Nasser, and A. W. A. K. The anti-inflammatory effect of the platelet-rich plasma in the periodontal pocket. *European Journal Of Dentistry* **12**, 528–531 (2018).
172. Yang, L.-C. *et al.* Antimicrobial Activity of Platelet-Rich Plasma and Other Plasma Preparations Against Periodontal Pathogens. *Journal of Periodontology* **86**, 310–318 (2015).
173. Pietruszka, P., Chruścicka, I., Duś-Ilnicka, I. & Paradowska-Stolarz, A. Prp and prf—subgroups and divisions when used in dentistry. *Journal of Personalized Medicine* **11**, (2021).
174. Qiao, J., Duan, J., Zhang, Y., Chu, Y. & Sun, C. The effect of concentrated growth factors in the treatment of periodontal intrabony defects. *Future Science OA* **2**, (2016).
175. Shivashankar, V. Y. *et al.* Comparison of the effect of PRP, PRF and induced bleeding in the revascularization of teeth with necrotic pulp and open apex: A triple blind randomized clinical trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **11**, ZC34–ZC39 (2017).
176. Bennardo, F. *et al.* Efficacy of platelet-rich fibrin compared with triamcinolone acetate as injective therapy in the treatment of symptomatic oral lichen planus: a pilot study. *Clinical Oral Investigations* **25**, 3747–3755 (2021).
177. de Melo, B. A. G., Luzo, Â. C. M., Lana, J. F. S. D. & Santana, M. H. A. Centrifugation conditions in the L-PrP preparation affect soluble factors release and mesenchymal stem cell proliferation in fibrin nanofibers. *Molecules* **24**, (2019).
178. Phillipson, M. & Kubes, P. The Healing Power of Neutrophils. *Trends in Immunology* **40**, 635–647 (2019).
179. Zhou, Y. & Wang, J. H. C. PRP Treatment Efficacy for Tendinopathy: A Review of Basic Science Studies. *BioMed Research International* **2016**, (2016).
180. Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in Wound Care* **1**, 10–16 (2012).
181. Ang, A. *et al.* Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood* **126**, 1017–1026 (2015).

182. Dale, D. C., Boxer, L. & Conrad Liles, W. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood* **112**, 935–945 (2008).
183. Ho-Tin-Noé, B. *et al.* Platelet Inflammatory Response to Stress. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org **1**, 1478 (2019).
184. Henn, V. *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591–594 (1998).
185. Karmann, K., Hughes, C. C. W., Schechner, J., Fanslow, W. C. & Pober, J. S. *CD40 on human endothelial cells: Inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression* Expression of CD40 increases within 8 h of cytokine treatment and continues to increase through 72 h. A trimeric form of recombinant murine CD40 ligand acts on human EC to increase expression of leukocyte adhesion molecules, including E-selectin, vascular cell adhesion molecule 1, and intercellular adhesion molecule 1. *CD40. Immunology* vol. 92 (1995).
186. Cheynier, R. *et al.* Interactions of HIV and Antiretroviral Therapy With Neutrophils and Platelets. *Frontiers in Immunology* | www.frontiersin.org **1**, 634386 (2021).
187. YATING YU, XINBO MA, RUFEI GONG, JIANMENG ZHU, L. W. and J. Y. Recent advances in CD8+ regulatory T cell research (Review). doi:10.3892/ol.2018.8378.
188. Renshaw, B. R. *et al.* Humoral Immune Responses in CD40 Ligand-deficient Mice. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 1889–1900 (1994).
189. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* **11**, 264–274 (2011).
190. Poggi, A. *et al.* NK Cell Activation by Dendritic Cells Is Dependent on LFA-1-Mediated Induction of Calcium-Calmodulin Kinase II: Inhibition by HIV-1 Tat C-Terminal Domain 1. *The Journal of Immunology* **168**, 95–101 (2002).
191. Lipscomb, M. F. & Masten, B. J. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. (2002) doi:10.1152/physrev.00023.2001.-Dendritic.
192. Weirather, J. *et al.* Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circulation Research* **115**, 55–67 (2014).
193. Papait, A., Cancedda, R., Mastrogiacomo, M. & Poggi, A. *Allogeneic platelet-rich plasma affects monocyte differentiation to dendritic cells causing an anti-inflammatory*

- microenvironment, putatively fostering wound healing. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* vol. 12 (2018).
194. Wan, M., Ding, L., Wang, D., Han, J. & Gao, P. Serotonin: A Potent Immune Cell Modulator in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* **11**, 1–12 (2020).
 195. Duerschmied, D. *et al.* Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* **121**, 1008–1015 (2013).
 196. Chandan K Sen, Gayle M Gordillo, Sashwati Roy, Robert Kirsner, Lynn Lambert, Thomas K Hunt, Finn Gottrup, Geoffrey C Gurtner, M. T. L. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair regen.* **17**, 763–771 (2009).
 197. Blakytyn, R. & Jude, E. B. Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *International Journal of Lower Extremity Wounds* **8**, 95–104 (2009).
 198. Borzini, P. & Mazzucco, L. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: Clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* **45**, 1759–1767 (2005).
 199. Marx, R. E. *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **85**, 638–646 (1998).
 200. Zhang, Z. Y. *et al.* The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: Immunogenicity and defect healing efficacy. *Cell Transplantation* **22**, 175–187 (2013).
 201. Greppi, N. *et al.* Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals* **39**, 73–80 (2011).
 202. Martha Rae Combs, MT(ASCP)SBB; Gregory Denomme, PhD, FCSMLS(D); Brenda J. Grossman, M., MPH; N. Rebecca Haley, MD, MT(ASCP)SBB; Teresa Harris, MT(ASCP)SBB, CQIA(ASQ); Betsy W. Jett, M., CQA(ASQ)CQMgr; Regina M. Leger, MSQA, MT(ASCP)SBB, CQMgr(ASQ); Jeanne V. Linden, MD, M. J. G. M. & MD; James T. Perkins, MD; Susan D. Roseff, MD; Joseph Sweeney, MD; Darrell J. Triulzi, M. *Technical Manual 15th edition.* (2005).