

EFFETTI IN VITRO DEL GEL PIASTRINICO: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

Clara Cassinelli, Marco Bellanda, Maria Cristina Sacchi

RIASSUNTO Numerosi autori hanno presentato la loro esperienza clinico-chirurgica riguardo all'utilizzo delle piastrine attivate quale fonte di fattori di crescita (PDGF, TGF- β , IGF I/II, FGFb) per accelerare i processi di guarigione e di rigenerazione tissutale, dimostrando l'importanza di un impiego di questo bioprodotto sia nel trattamento di ulcere cutanee (diabetiche, vascolari, da decubito) sia nella pratica chirurgica. In particolare, in chirurgia orale, implantare e maxillofacciale il gel piastrinico viene considerato un utile e disponibile strumento per incrementare qualità e quantità di osso neoformato. Scopo di questa prima fase di lavoro è stata la valutazione in vitro dell'attività del gel piastrinico e del gel di fibrina, così da poterne verificare e comprendere gli effetti osservati in vivo. Vengono riportate le osservazioni preliminari sul comportamento di fibroblasti, sia in forma di linea cellulare continua sia come cellule primarie isolate da gengiva, coltivati sia in presenza di gel piastrinico sia di gel di fibrina.

SUMMARY *Preliminar Observations about in Vitro Effects of Platelet Gel* Several authors have presented their clinical-surgical experience in the use of activated platelets as a source of growth factors (PDGF, TGF- β , IGF I/II, FGFb) to accelerate wound healing and tissue regeneration, demonstrating the importance of using this bioproduct both in the treatment of skin ulcers (diabetic, vascular, pressure) and in surgery. In particular, platelet gel is considered as a useful and available means for enhancing the quality and quantity of newly formed bone in oral, implant and maxillo-facial surgery. The purpose of this first phase is the in vitro evaluation of platelet gel and fibrin gel activity, and to ascertain and understand their effects in vivo. Preliminary observations are offered on the behaviour of fibroblasts both as a continuous cellular line and as primary cells, isolated from the gingiva, cultured with and without platelet gel.

Implantologia Orale 2002;5:29-35

L'uso topico di emocomponenti autologhi rappresenta una delle strategie più innovative per modulare e amplificare i processi di guarigione e di rigenerazione tissutale. La biotecnologia del gel piastrinico autologo consente di preparare due emocomponenti, il concentrato piastrinico (CP) e il plasma povero di piastrine (PPP), da un semplice prelievo di sangue intero mediante due fasi di centrifugazione^{1,2}. L'attivazione del CP e del PPP mediante una miscela di batroxobina/calcio gluconato permette di ottenere rispettivamente il gel piastrinico e il gel di fibrina.

La differenza tra questi due bioprodotto consiste, fondamentalmente, nel fatto che mentre il gel piastrinico contiene un'elevata quantità sia di fattori di crescita sia di fibrinogeno, quello di fibrina è ricco soltanto di fibrinogeno nativo.

L'attivazione del CP e del PPP in masse gelatinose, malleabili e di semplice maneggevolezza nel-

la pratica chirurgica³⁻⁹, porta alla degranulazione delle piastrine con conseguente liberazione di tutti quei mediatori biologici (fattori di crescita, della coagulazione, proteine plasmatiche e citochine), fondamentali per i processi di cicatrizzazione, di guarigione e di rigenerazione dei tessuti molli e dell'osso.

Il CP, attivato in combinazione con osso autogeno e/o con materiali osteoinduttivi, permette di ottenere un innesto osseo che può essere utilizzato nei difetti ossei e nella rigenerazione tissutale. Il PPP, una volta attivato e trasformato nel gel di fibrina, può essere impiegato per differenti applicazioni cliniche: in chirurgia maxillo-facciale come emostatico in caso di ricostruzioni mandibolari; in chirurgia orale, implantare e parodontale sia come biomateriale riempitivo di cavità ossee dei mascellari sia come membrana riassorbibile in interventi di rigenerazione tissutale.

Le recenti scoperte nel campo della biologia delle ferite e dell'osso hanno permesso di dimostrare che l'applicazione delle piastrine direttamente all'interno della ferita, come fonte di fattori di crescita (*Platelet-derived growth factor*, PDGF; *Transforming growth factor*, TGF- β ; *Epidermal growth factor*, EGF; *Insulin-like growth factor*, IGF I/II; *Fibroblast growth factor*, FGfb), è in grado di determinare un incremento in situ della concentrazione di elementi biologici naturali che regolano eventi cellulari cruciali coinvolti nella riparazione dei tessuti, quali la sintesi di DNA, la chemiotassi, l'angiogenesi, la sintesi della matrice, la rigenerazione epiteliale e dell'epidermide¹⁰⁻¹⁴.

Sulla base di queste premesse biologiche, l'applicazione clinica del gel piastrinico e di fibrina è indicata sia nel trattamento delle lesioni cutanee (ulcere di tipo vascolare o neuropatiche in pazienti diabetici, piaghe da decubito, necrosi cutanee provocate da un trattamento radioterapico per la cura di neoplasie, ferite sternali) sia nella chirurgia plastica, ricostruttiva, orale, maxillo-facciale e ortopedica^{15,16}.

I primi studi biologici e clinici sull'utilizzo clinico del gel piastrinico, condotti da Marx nel campo della chirurgia ricostruttiva e maxillo-facciale, hanno dimostrato che le piastrine, una volta attivate, creano un complesso network di mediatori locali, risultato di meccanismi autocrini e paracrini, in grado di stimolare le cellule mesenchimali totipotenti a migrare, proliferare e differenziare in sede di innesto^{17,18}.

Il gel piastrinico autologo viene, pertanto, considerato da molti un valido e disponibile strumento per migliorare e incrementare sia la qualità sia la quantità di osso neoformato.

In effetti, è stata recentemente evidenziata la capacità dei fattori di crescita piastrinici da un lato di accelerare il rimodellamento e la rivascolarizzazione dell'osso, dall'altro di stimolare la chemiotassi di cellule mesenchimali, fibroblasti e osteoblasti³.

Numerosi studi compiuti da chirurghi implantari e maxillo-facciali riportano un miglioramento, grazie all'impiego del gel piastrinico combinato con osso midollare autologo e/o di sintesi, sia della crescita e della maturazione precoce dell'osso sia della stabilizzazione dell'innesto¹⁷⁻²²; un'accelerazione dell'emostasi, soprattutto nella chirurgia ricostruttiva, è invece ottenibile con l'impiego del gel di fibrina.

Sulla base sia di queste premesse biologiche sia dell'ampia casistica riportata in letteratura si è iniziato a studiare il comportamento cellulare in vitro. In particolare, sono riportati i risultati preliminari di prove di crescita di fibroblasti di topo (L-929, linea cellulare continua, cioè immortalizzata) e di fibroblasti gengivali primari umani (HGF) in presenza o meno di gel piastrinico e gel di fibrina. Lo scopo del lavoro era innanzitutto la valutazione, a livello qualitativo, della proliferazione di entrambe le linee cellulari in presenza o meno del gel piastrinico e del gel di fibrina. Fasi di lavoro successive vedranno la caratterizzazione, a un livello più quantitativo e specifico, dell'interazione biologica tra gel piastrinico e di fibrina e sistemi cellulari in vitro.

MATERIALI E METODI

La preparazione del gel piastrinico prevede che il sangue venga prelevato rapidamente arrecando il minor trauma possibile ai tessuti per evitare che, durante la raccolta, si determini l'attivazione del sistema della coagulazione.

Per la preparazione del CP viene effettuato un prelievo di 54 ml di sangue venoso, raccolto in una siringa di 60 ml contenente 6 ml di sodio citrato, usato come anticoagulante.

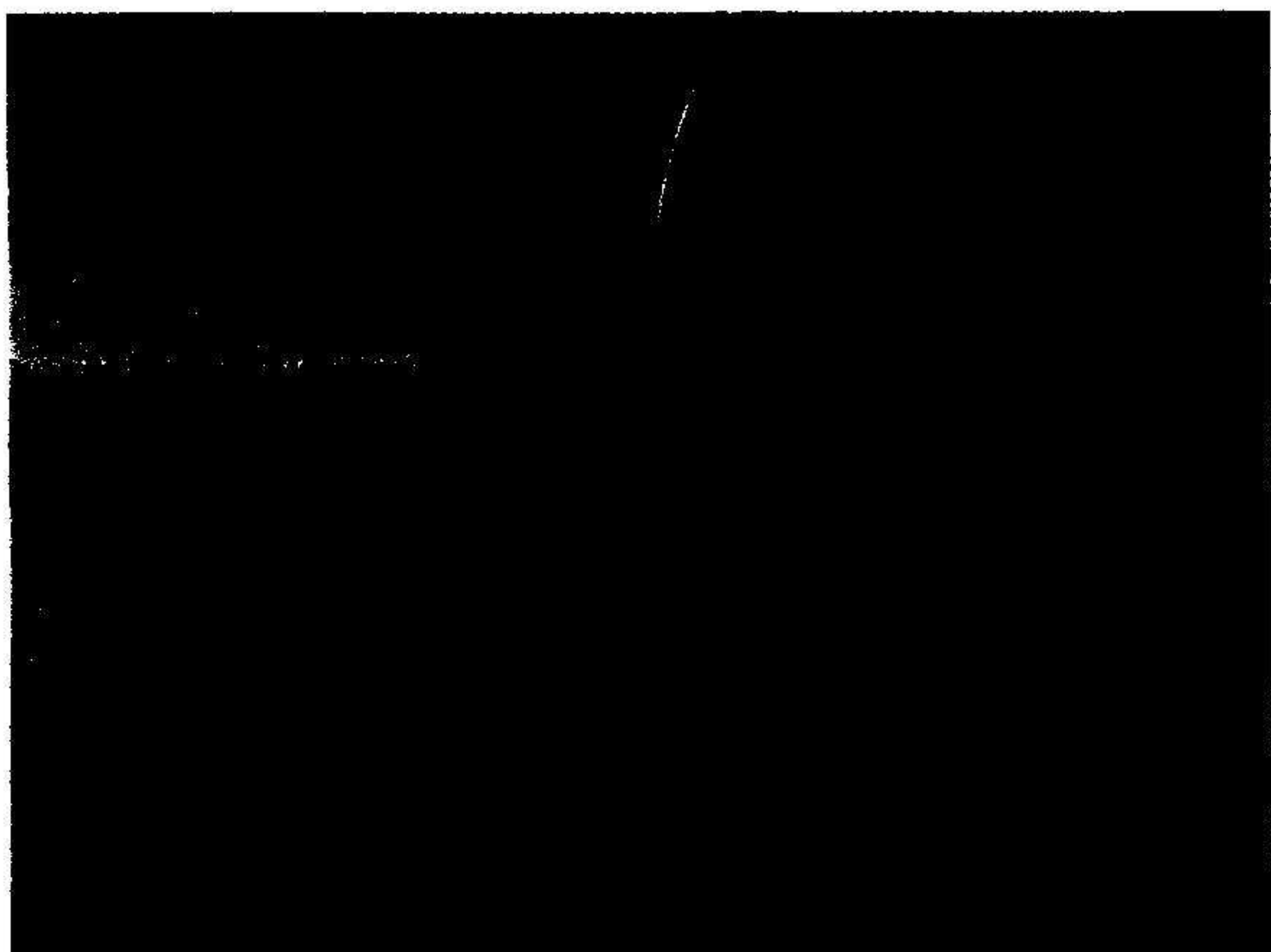
Il sangue viene mantenuto a temperatura ambiente prima di procedere alla separazione del PRP e del PPP e deve essere trattato entro 8 ore dalla raccolta.

Il sangue intero, raccolto in 4 provette sterili da 15 ml cadauna, viene centrifugato a 180 g (g = forza gravitazionale applicata) per 20 minuti.

Il PRP, corrispondente alla fase chiara superiore, viene quindi trasferito in una nuova provetta e ulteriormente concentrato, mediante centrifugazione a 580 g per 15 minuti.

Il volume finale di CP è il risultato della risospensione del pellet piastrinico, ottenuto al termine della seconda centrifugata, in 6 ml di PPP. Dopo 15 min di riposo a temperatura ambiente, tempo necessario affinché le piastrine possano disaggregarsi completamente, il CP è pronto per essere attivato a gel (figure 1 e 2).

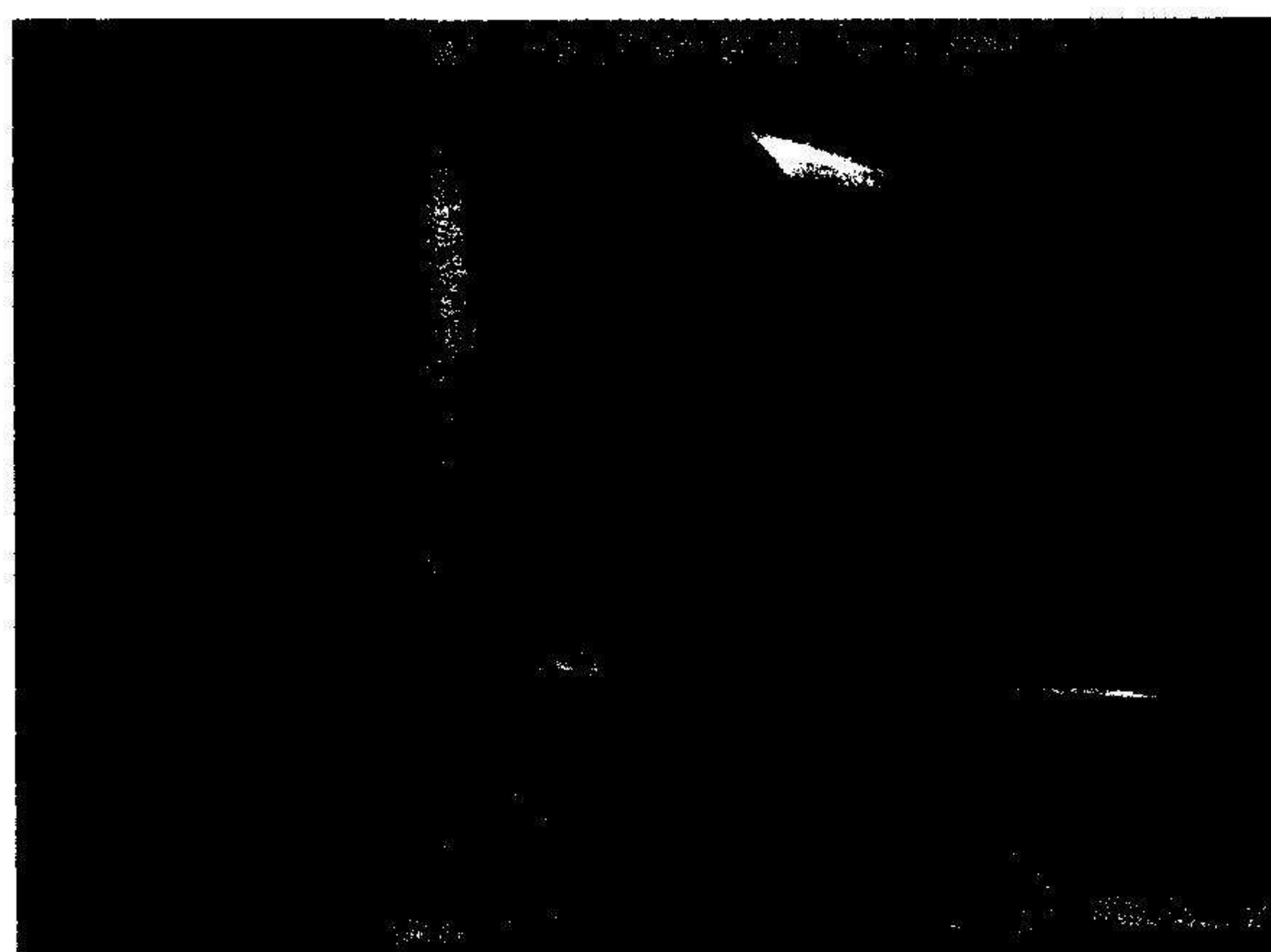
Il PPP, che rappresenta la parte liquida soprastante il pellet, viene raccolto in una provetta da 50 ml e attivato a gel in funzione delle necessità cliniche. Il protocollo per la formazione del gel piastrinico richiede concentrato piastrini-



| 1. Gel piastrinico modellato a membrana



| 2. Gel piastrinico combinato con matrice ossea di sintesi



| 3. Gel piastrinico usato come substrato per i fibroblasti



| 4. Gel di fibrina usato come substrato per i fibroblasti

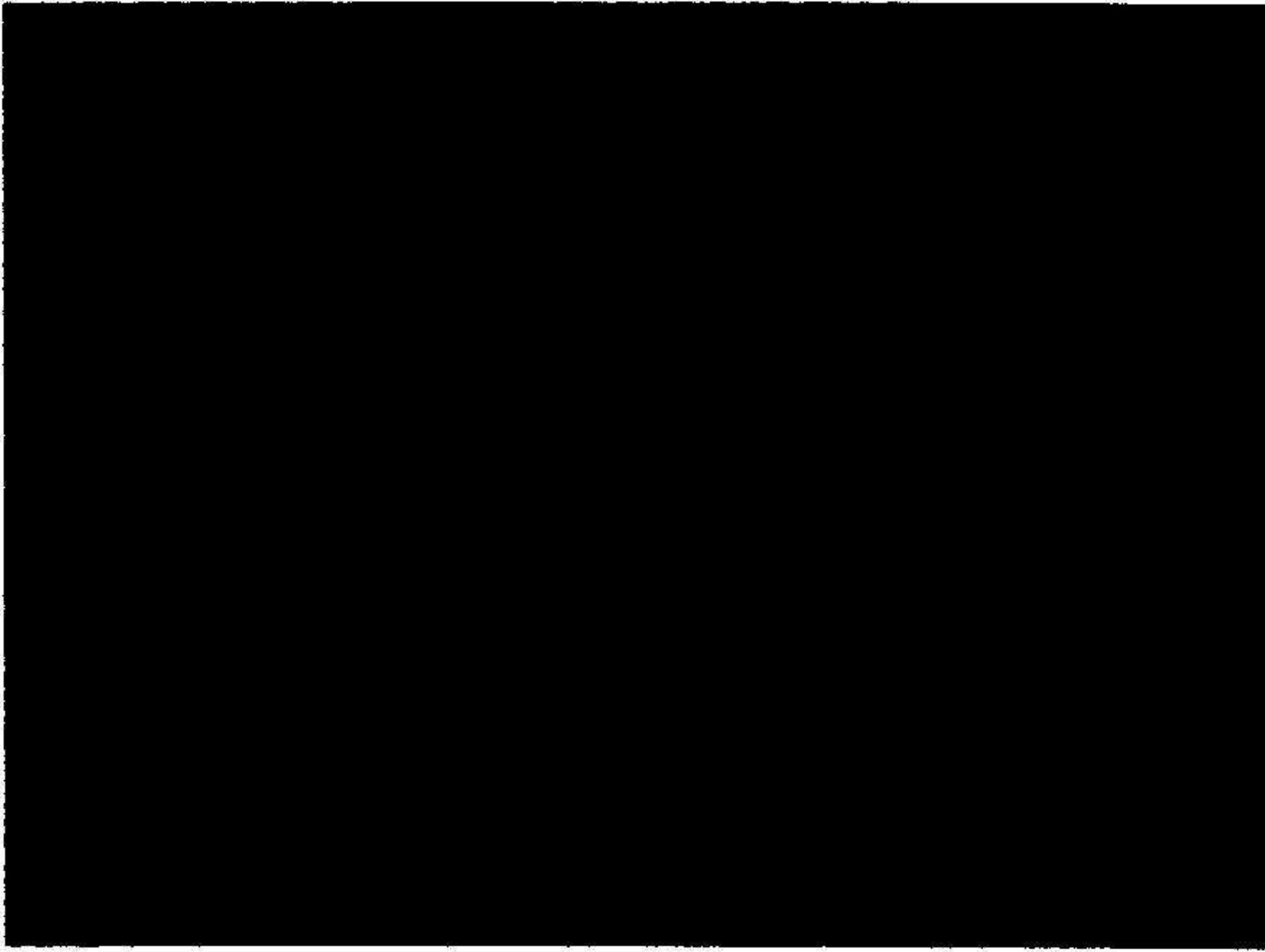
nico autologo, calcio gluconato e batroxobina; in questa sperimentazione si è utilizzata batroxobina moojeni (Pentapharm, Basilea).

La quantità di ogni componente necessaria per la formazione del gel dipende dal volume di coagulo piastrinico che si vuole usare nella pratica clinica. Il gel si sviluppa quando il CP prelevato con una pipetta sterile e il calcio gluconato miscelato con la batroxobina mediante una siringa da 2,5 ml vengono simultaneamente uniti in una capsula Petri. Nell'arco di 1-2 minuti il miscuglio di CP e la miscela di calcio gluconato/batroxobina assume una consistenza gelatinosa, dal momento che la batroxobina è responsabile della polimerizzazione della fibrina in una massa gelatinosa. Il PPP, raccolto nel-

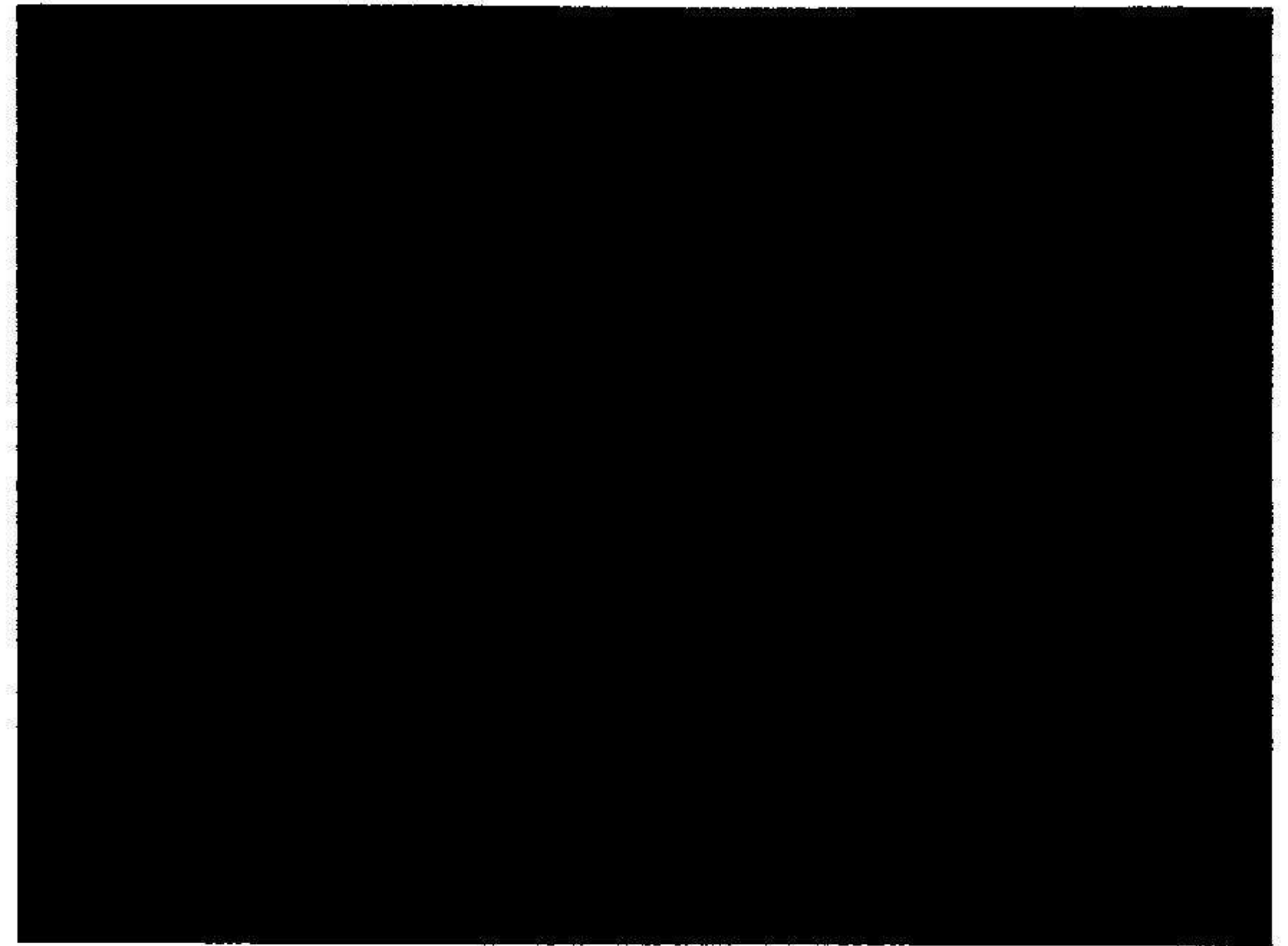
la provetta da 50 ml e conservato a temperatura ambiente, viene attivato in capsule Petri dopo la preparazione del gel piastrinico ottenuto dal CP, utilizzando come attivatore il trasudato dal gel piastrinico.

Il risultato finale è illustrato nelle figure 3 e 4 che mostrano, rispettivamente, il gel piastrinico e quello di fibrina utilizzati in questo lavoro. Il CP e il PPP, attivati come descritto, mostrano un'elevata plasmabilità che consente di modellarli a seconda della forma del recipiente in cui viene effettuata l'attivazione.

Attivando il CP in una capsula Petri, è possibile dare al gel la forma di una membrana (figura 1), la cui consistenza è proporzionale alla quantità del materiale attivato e alla dimensione del-



5. Fibroblasti L-929 di controllo coltivati senza gel piastrinico (40x)



6. Fibroblasti L-929 coltivati in presenza della lega Cu-Ni-Al (controllo positivo)

la capsula stessa. Il tempo di trattamento richiesto per la separazione del sangue autologo nei suoi emocomponenti, secondo la metodica proposta, è di soli 45 minuti.

Per quanto riguarda le prove di crescita cellulare, le cellule utilizzate sono state:

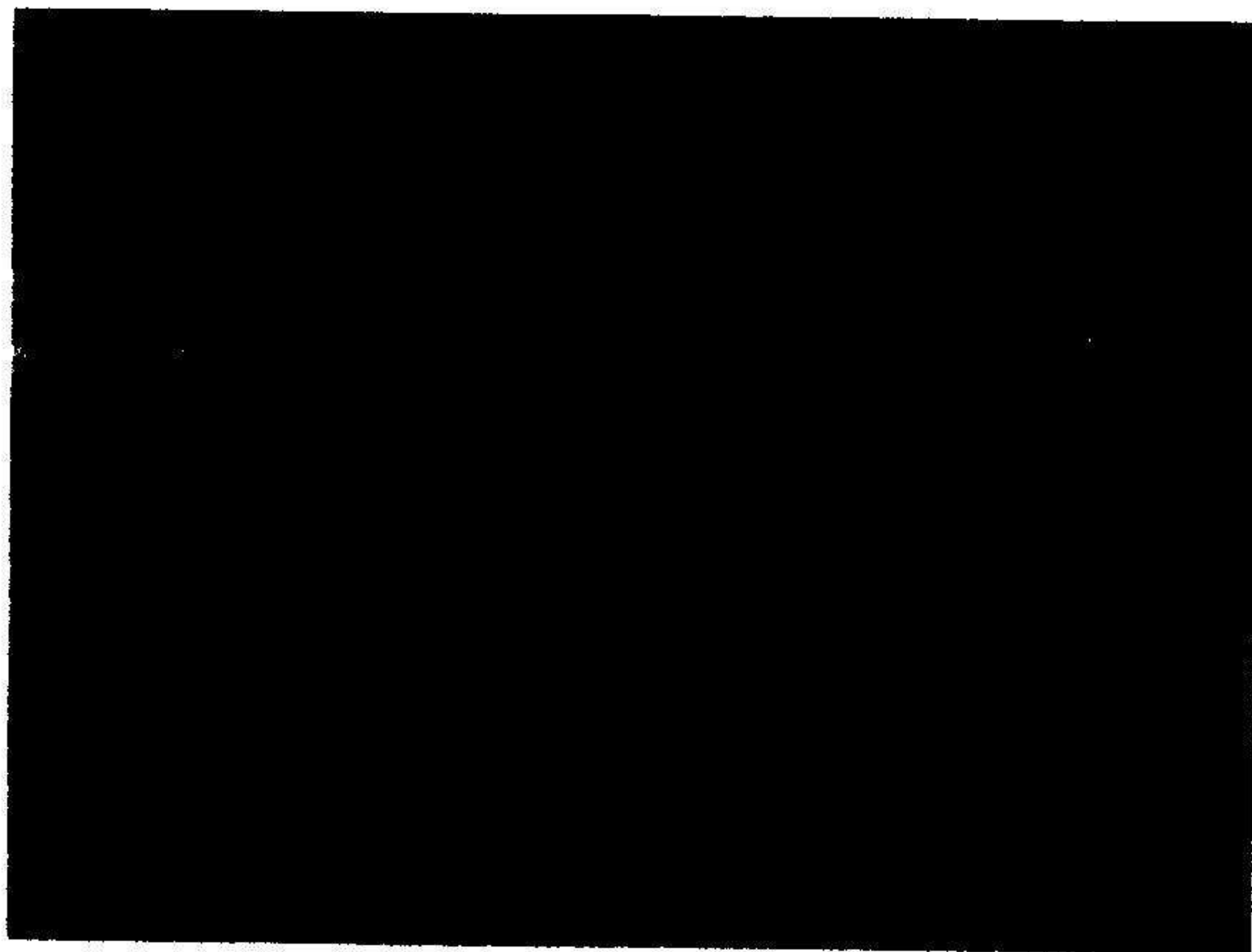
- fibroblasti di tessuto connettivo di topo L-929, una delle linee cellulari consigliate dalla norma ISO 10993-5: 1999, *Biological Evaluation of Medical Devices tests for in vitro cytotoxicity*²³ e dalla bibliografia internazionale; si tratta di una linea cellulare continua;
- fibroblasti gengivali umani, isolati secondo le procedure riportate in letteratura²⁴ e utilizzati al quarto passaggio.

Per entrambe le linee cellulari, una sospensione di 1×10^5 cellule in 2 ml di terreno *Minimum essential eagle's medium* (MEM, Sigma, Milano), senza siero di feto bovino, L-glutamina, penicillina e streptomina veniva introdotta in contenitori sterili in polistirene per colture cellulari a 6 scomparti (*6 wells plate*, Falcon) contemporaneamente ai gel precedentemente formati secondo la metodica che prevede l'utilizzo di batroxobina moojeni⁸. I contenitori venivano successivamente posti in incubatore a 37 °C, 5% di CO₂ e umidità relativa del 98% per 72 ore. Al termine delle 72 ore di crescita, le cellule a contatto con i due tipi di gel venivano innanzitutto osservate al microscopio ottico invertito. In particolare, inizialmente, si è valutata la presenza di cellule morte, di cellule giganti multinucleate, di anomalie generali

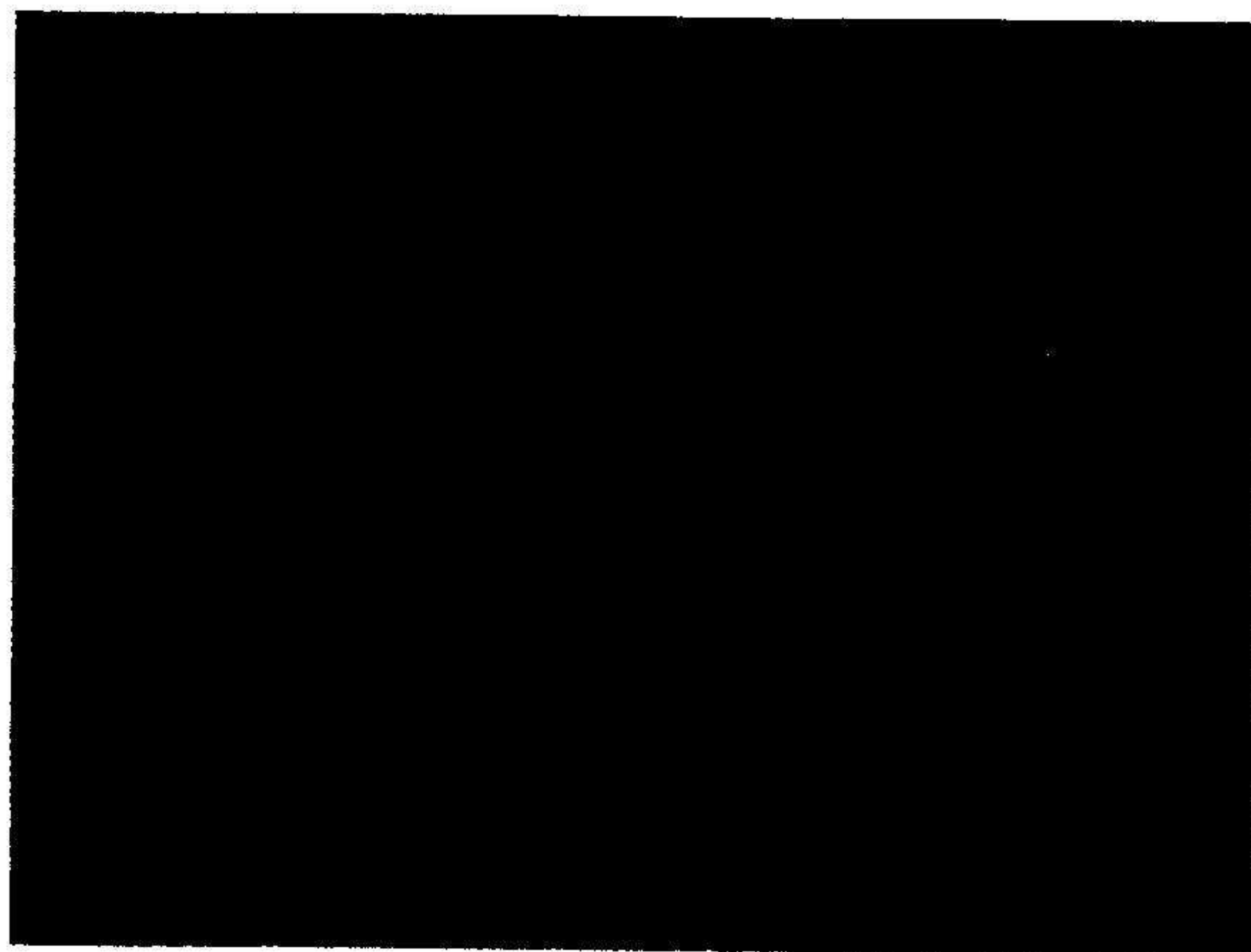


7. Fibroblasti L-929 coltivati in presenza di gel piastrinico (40x)

della morfologia cellulare, il tutto in confronto con quanto osservato a livello degli strati cellulari a contatto con il controllo negativo, cioè i fibroblasti L-929 e fibroblasti primari cresciuti in terreno MEM completo, cioè addizionato del 10% di siero di feto bovino e il controllo positivo (un cilindro di lega Cu-Ni-Al). Dopo la prima osservazione microscopica, le cellule contenute nei pozzetti in polistirene venivano invece sottoposte a fissazione con soluzione di glutaraldeide 4% in *Phosphate buffered saline*, colorate con blu di toluidina e fotografate con macchina fotografica Cool Pix 995 (Nikon).



| 8. HFG di controllo coltivati senza gel piastrinico (40x)



| 9. HFG coltivati senza gel piastrinico (100x)

RISULTATI

La figura 5 illustra, a 40x, lo strato di fibroblasti continui L-929 al termine delle 72 ore di crescita nel terreno completo in assenza di gel piastrinico o fibrinico: le cellule crescono in modo omogeneo sulla superficie a loro disposizione senza evidenziare alterazioni della morfologia, come auspicabile per il controllo negativo. La figura 6 mostra, invece, il severo effetto citotossico indotto dal controllo positivo, sempre a 40x: i «corpi» rotondeggianti scuri visibili nella figura sono quello che resta dei fibroblasti dopo il loro distacco dal substrato.

La figura 7 evidenzia lo stesso tipo di cellule L-929 cresciute in terreno privo di siero, ma in presenza del gel piastrinico: osservando la popolazione cellulare, si possono sviluppare molte riflessioni: innanzitutto, si vede la totale assenza di effetti tossici. Questo risultato, in apparenza scontato o banale, è fondamentale in quanto esperimenti inizialmente condotti con altre formulazioni commerciali di batroxobina (dati non pubblicati) evidenziarono in vitro effetti gravemente citotossici.

In questa serie di prove, invece, con la tipologia e le concentrazioni di batroxobina utilizzate⁸, non solo non sono mai state osservate cellule morte ma neppure cellule giganti multinucleate o con morfologia anormale. Al contrario, si è sempre riscontrata una densità notevolmente superiore a quella del controllo negativo e, probabilmente proprio a causa dell'elevata densità,

la morfologia risulta più allungata rispetto al controllo. Lo stesso tipo di comportamento, non documentato fotograficamente in questo lavoro, è stato evidenziato per le cellule L-929 cresciute in presenza del gel di fibrina.

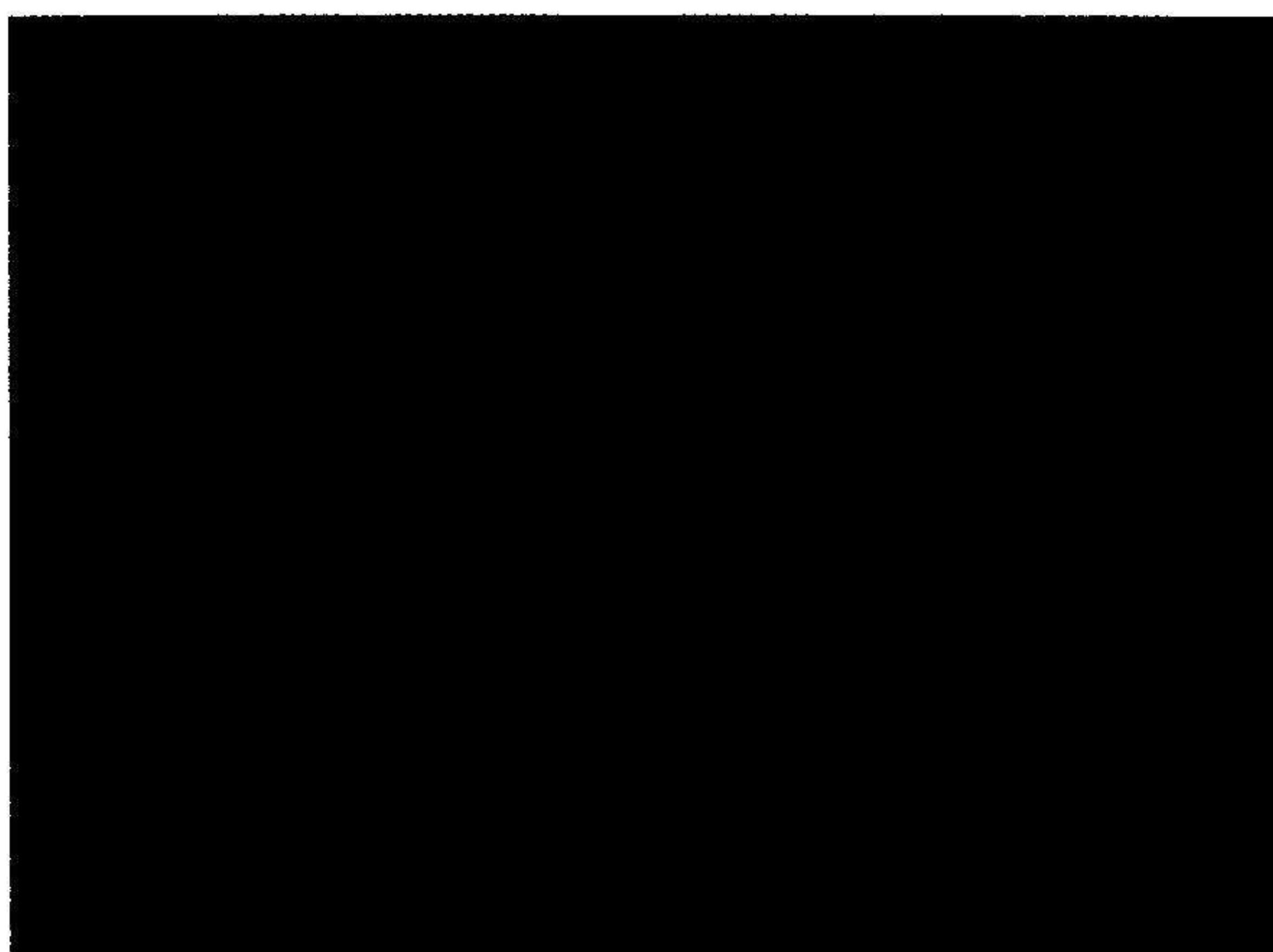
Le prove eseguite con le cellule isolate da tessuto gengivale umano hanno fornito risultati analoghi. Anche in questo caso, cioè, non solo non sono stati riscontrati effetti tossici, ma si è, anzi, registrato un significativo aumento della densità cellulare, a parità di tempo di coltura, rispetto alle cellule cresciute in assenza di gel (figure 8 e 9, a 40x e 100x, rispettivamente).

In particolare, i risultati della conta cellulare effettuata con un programma di analisi di immagine (*Image Tool for Window* versione 3.0) hanno dimostrato un numero di cellule praticamente doppio. Le figure 10 e 11 documentano a 40 e 100x ingrandimenti questa aumentata proliferazione. Anche per questo tipo cellulare il contatto con il controllo positivo ha sortito gli effetti attesi (figura 12).

DISCUSSIONE

Numerosi lavori clinici hanno valutato la capacità osteoformativa del gel piastrinico nei rialzi di seno mascellare, nei siti estrattivi e nei difetti parodontali e ossei^{3,13,17}.

Sulla base degli eccellenti risultati riportati in letteratura sull'impiego del gel piastrinico quale utile strumento nella modulazione e nell'incre-



10. HFG coltivati in presenza di gel piastrinico (40x)



11. HFG coltivati in presenza di gel piastrinico (100x)

mento dell'attività di guarigione e di rigenerazione ossea⁴, sono state allestite colture cellulari in vitro, inizialmente solo con fibroblasti, per studiarne il comportamento in presenza e non del gel piastrinico e di fibrina.

Le osservazioni preliminari, a livello qualitativo, delle prove di crescita in vitro sembrano dimostrare la capacità sia del gel di piastrine sia di fibrina, prodotti secondo la procedura che prevede l'attivazione con batroxobina moojeni e calcio gluconato alle concentrazioni definite nei brevetti relativi, di stimolare i fenomeni di proliferazione cellulare. Questi risultati, se pur preliminari, renderebbero ragione di quanto osservato nella clinica, dove è evidente una più rapida guarigione delle ferite chirurgiche quando vengono impiegati il gel di piastrine e quello di fibrina.

È importante sottolineare la totale assenza di manifestazioni citotossiche a livello di linea cellulare continua o primaria, anche se occorre specificare che le condizioni dei test in vitro sono molto differenti dalla realtà pratica di utilizzo di un materiale. Infatti, la situazione statica, priva del benché minimo flusso o dilavamento che caratterizza intrinsecamente il test di citotossicità in vitro, non trova riscontro nella realtà dinamica che, invece, contraddistingue i tessuti in vivo. Eventuali effetti citotossici dei materiali, infatti, che nell'organismo non riescono a esplicarsi proprio grazie alla costante, continua diluizione da parte del flusso ematico o dei fluidi biologici in generale, nei test in vitro si esplicano totalmente. Ciò spiega il motivo per cui materiali ampiamente accettati e utilizzati nella quotidiana



12. HFG coltivati in presenza della lega Cu-Ni-Al (controllo positivo, 100x)

clínica senza apparenti problemi si rivelino, nei test in vitro, biologicamente piuttosto scadenti.

Una successiva fase di lavoro prevede una più approfondita caratterizzazione dell'interazione tra gel piastrinico (e/o di fibrina) e sistemi cellulari: valutando, per esempio, sempre mediante test in vitro, la sintesi di DNA, proteine totali e marker specifici, indicatori di ben precise attività metaboliche. Un'ulteriore fase di lavoro vedrà l'estensione dello studio a tipi cellulari diversi come, per esempio, cellule di tipo osteoblastico, con la valutazione quantitativa, anche in questo caso, di marker specifici quali, per citarne uno, la fosfatasi alcalina.

Corrispondenza Clara Cassinelli

Nobil Bio Ricerche

Strada S. Rocco, 36

14018 Villafranca d'Asti (Asti)

e-mail: cclara@tin.it

BIBLIOGRAFIA

1. Seghatchien MJ, Brozovic B. An overview of current trends in platelet preparation, storage and transfusion. *Blood coagulation and fibrinolysis* 1992;3:617-20.
2. Rebulli P. In vitro and in vivo properties of various types of platelets. *Vox Sanguinis* 1998;74(suppl):217-22.
3. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofacial Surg* 2002;60:630-5.
4. Sacchi MC, Bellanda M, Vercellotti T. Il concentrato piastrinico in chirurgia orale e implantare. *Dent Mod* 2000;1:69-78.
5. Sacchi MC, Tartuferi L, Riva S, Bellanda M, Mariani N, Levis A. Evoluzione nella preparazione del gel piastrinico (PRP-gel) nella rigenerazione tissutale. *Dent Mod* 2000;9:59-76.
6. Brevetto Internazionale n. PCT/EP00/12661. A process for preparing an autologous platelet gel and membranes thereof, and a kit for carrying out this process. 13 dicembre 2000.
7. Sacchi MC. Il gel piastrinico in chirurgia orale e implantare: il Manuale. Vicenza: Grafica Winner, 2001.
8. Brevetto Italiano. Attivatore per la formazione di gel piastrinico, gel di plasma povero di piastrine o gel di plasma ricco di piastrine. 10 settembre 2002.
9. Cappè R, Ridi M, Bozzi L. Considerazioni medico-legali relative alla metodica PRP. *Dent Mod* 2001;1:47-50.
10. Preuss S, Breuing K, Eriksson E. Cutaneous wound repair and gene transfer. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:179-98.
11. Donati L, Colona M, Garbin S, Gavoni E, Marazzi M. Le ferite e la riparazione tissutale. Verona: Bi & Gi Editori, 1993.
12. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop* 1999;355S:S124-S131.
13. Lynch SE. Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:XI-XVIII.
14. Hughs FJ, Aubin JE, Heersche JN. Differential chemotactic responses of differential populations of fetal rat calvarian cells to platelet derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner* 1992;19:63-74.
15. Sacchi MC, Maresca P, Tartuferi L, et al. Platelet gel is a new routine method to improve wounds' healing and tissue regeneration. *Transfusion Med* 2000;10:235.
16. Perrero L, Bellora A, Laguzzi E, Sacchi MC. Utilizzo del gel piastrinico (PRP-gel) per migliorare i processi di guarigione e di rigenerazione tissutale nell'anziano affetto da ulcere da pressione. *Giornale della Società Italiana di Geriatria* 2002 (in press).
17. Marx RE. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:179-98.
18. Burwell R. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone graft. *J Bone Joint Surg* 1985;46B:110-40.
19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich-plasma growth factor enhancement for bone graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998;85:638-46.
20. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *J Oral Maxillofacial Impl* 1999;14:529-35.
21. Whitman DH, Berrv RL, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9.
22. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297-300.
23. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices tests for in vitro cytotoxicity, 1999.
24. Pini Prato GP. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: a case report. *Int J Period Rest Dent* 2000;20:553-9.