

EVOLUZIONE NELLA PREPARAZIONE DEL GEL PIASTRINICO (PRP-GEL) NELLA RIGENERAZIONE TISSUTALE

Maria Cristina Sacchi*, Laura Tartuferi*, Serenella Riva*, Marco Bellanda,
Narciso Mariani**, Alessandro Levis*

Azienda Ospedaliera «Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo», Alessandria;
*U.O.A. Ematologia, Primario dottor A. Levis; **U.O.A. Anatomia Patologica

RIASSUNTO: Il gel piastrinico, ricchissimo di fattori di crescita (GFs), si è rivelato particolarmente utile sia nel favorire i normali processi di guarigione dei tessuti sia nell'accelerare le fasi di rigenerazione ossea, offrendo ai clinici la possibilità di poter disporre di uno strumento per incrementare sia la qualità sia la quantità finale di osso neoformato. La possibilità di poter modellare il gel piastrinico consente, inoltre, una sua più ampia applicazione clinica. Studi recenti hanno permesso di riscontrare che, grazie al recupero e all'attivazione del plasma povero di piastrine (PPP), finora non utilizzato nei protocolli classici di preparazione del concentrato piastrinico (CP), è possibile ottenere, in combinazione con l'impiego del CP attivato, una maggiore quantità di questo materiale biologico. Conseguentemente, l'opportunità di poter utilizzare entrambi gli emocomponenti (CP e PPP) permette, da un lato, di effettuare un prelievo sempre più contenuto di sangue intero riducendo ancora di più la morbidità del paziente, dall'altro, di utilizzare tutte le piastrine presenti nel sangue processato e, verosimilmente, poter disporre di una maggiore quantità di GFs. Il presente lavoro descrive le modifiche apportate alla metodica, riuscendo infine a modellare il gel attivato a membrane e utilizzando anche quella frazione di plasma meno arricchita di piastrine, ma ugualmente utile nell'incrementare il processo di rigenerazione.

PAROLE CHIAVE: concentrato piastrinico, fattori di crescita, guarigione, plasma povero di piastrine, proteine morfogenetiche, rigenerazione ossea

SUMMARY: Improvement of Platelet Gel Methodology Platelet gel, when mixed with autologous bone, offers the opportunity to get a graft tissue with optimal surgical features for its easy stabilization and with a superior recovery level in terms of time and mineralization, if compared to the use of autologous bone alone. Hence this bioproduct can be considered a useful and available mean to increase both quality and final quantity of neoformed bone. The possibility to shape platelet gel as membranes allows an even wider clinical application. Recent studies, aimed to improve platelet gel methodology, have pointed out that, thanks to Platelet Poor Plasma (PPP) recovery and activation, it's now possible to obtain a greater quantity of this biological materials, obviously paired to the use of activated PC. Thus the opportunity to use both hemocomponents (PC and PPP) allows to take smaller amounts of whole blood sample reducing patients' morbidity, and to utilize most platelets contained in the processed blood. The aim of this study was to ameliorate our methodology, by shaping activated gel as membranes and by the utilization of the whole plasma fraction.

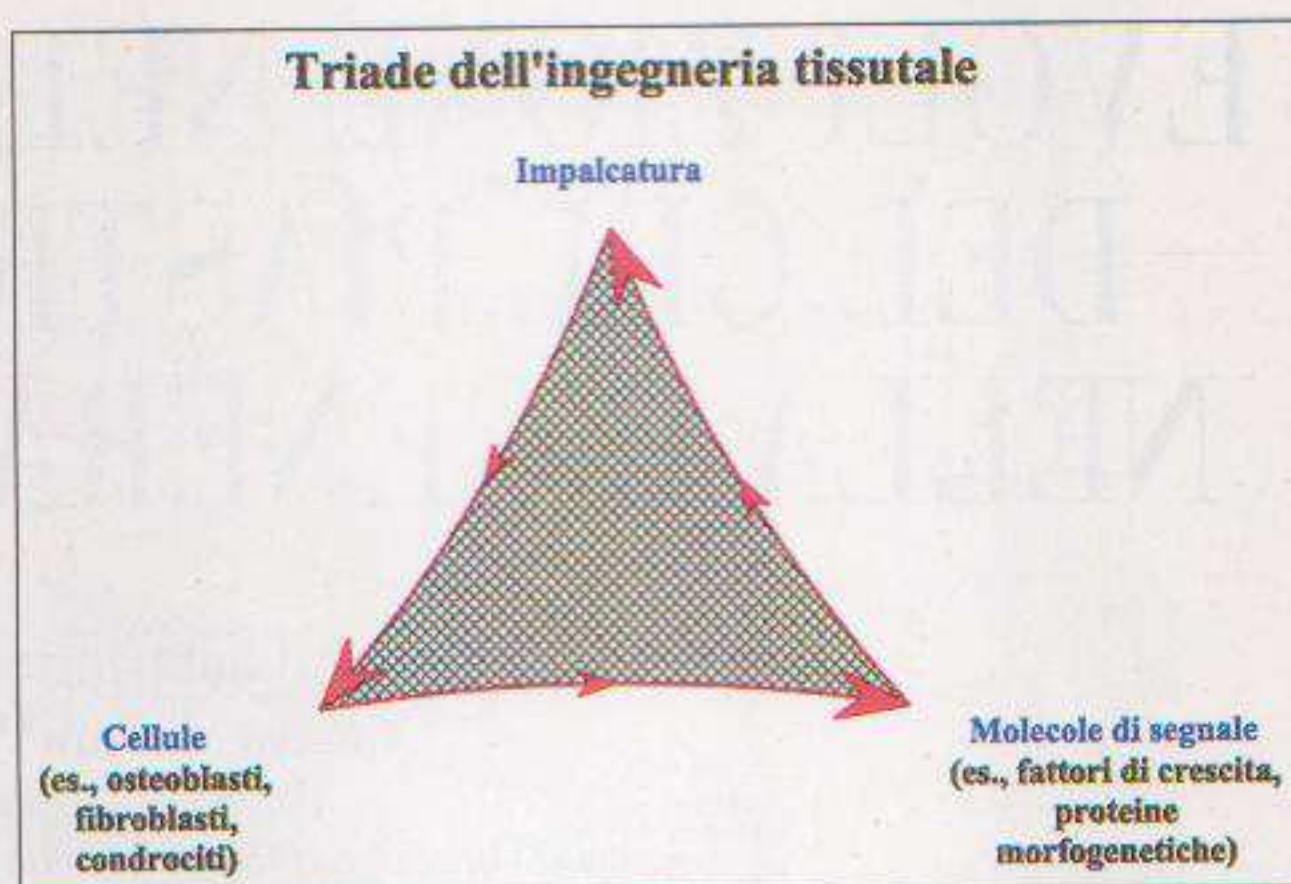
KEY WORDS: bone morphogenic proteins, bone regeneration, growth factors, platelet concentrate, wound healing

La messa a punto di una metodologia che permetta di ottenere un gel piastrinico molto malleabile e di facile applicazione in chirurgia orale, clinicamente efficace per varie applicazioni (siti estrattivi, rialzi di seno, difetti parodontali) nonché in interventi

di chirurgia maxillofacciale, è senza dubbio una delle innovazioni più affascinanti e interessanti di questi ultimi anni¹⁻⁴.

In effetti, la possibilità di poter utilizzare un concentrato piastrinico (PRP/CP) che, una volta attivato, appare particolarmente utile nel fa-

vorire i processi di guarigione e nell'accelerare le fasi di rigenerazione ossea, sta riscontrando sempre maggiori favori. Considerando le basi biologiche e cellulari, l'innesto osseo può essere suddiviso in tre componenti fondamentali⁵ (figura 1):
□ le cellule osteoprogenitrici (fi-



1 L'ingegneria tissutale utilizza tre elementi fondamentali: l'impalcatura (matrice osteoconduttiva), molecole di segnale (fattori di crescita) e cellule. Dalla combinazione di questi elementi si può spesso ottenere la rigenerazione tissutale (modificato da Marx¹)

broblasti, osteoblasti, condrociti) che sono in grado di produrre osso;

- una matrice osteoconduttiva che rappresenta l'impalcatura che deve sostenere l'innesto durante il processo di guarigione; svolge, quindi, questo ruolo di osteoconduzione, anche perché è la struttura attraverso la quale si formano i nuovi vasi;
- i fattori di crescita (GFs) osteoinduttivi (PDGF, TGF- β , IGF-I e II) e le proteine morfogenetiche (BMPs) che sembrano svolgere un ruolo critico nella guarigione dell'osso.

Dati di letteratura^{6,7} hanno dimostrato che le BMPs sono peptidi osteoinduttivi, appartenenti alla superfamiglia del TGF- β , e svolgono una funzione pleiomorfica che va dall'organogenesi extracellulare e scheletrica alla generazione dell'osso e alla rigenerazione. Nel caso specifico della chirurgia implantare, le BMPs sembrano in grado di stimolare la formazione di nuovo osso nel sito dell'impianto.

Di contro, i GFs polipeptidici sono mediatori biologici naturali che regolano gli eventi cellulari cruciali coinvolti nella riparazione dei tessuti, come la sintesi del DNA, la chemiotassi, la differenziazione e la sintesi della matrice.

Esempi di GFs individuati localmente nell'osso, nel cemento e nel tessuto di rigenerazione, includono il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita trasformante β (TGF- β), il fattore di crescita dei fibroblasti acido (aFGF) e basico (bFGF), i fattori di crescita tipo insulina (IGF-I e IGF-II) e il fattore di crescita derivato dal cemento (CGF).

L'espressione di vari GFs, citochine e chemochine come conseguenza di danno tissutale, è in grado di regolare il processo di guarigione e di rigenerazione ossea, che comporta una complessa interazione di molti fattori biologici locali e sistemici⁸⁻¹⁵.

FATTORI DI CRESCITA ELABORATI DALLE PIASTRINE

Acronimo	Denominazione	Attività
PDGF	Platelet derived growth factor	Mitogenesi Angiogenesi Up-regolazione di altri fattori di crescita e cellule (stimolazione di fibroblasti e osteoblasti, induzione della differenziazione cellulare, accelerazione degli effetti dei fattori di crescita su altre cellule così come i macrofagi)
TGF- β	Transforming growth factor- β	Stimolazione di fibroblasti e preosteoblasti Chemiotassi Inibizione di cellule epiteliali ed endoepiteliali Inibizione di osteoclasti e riassorbimento osseo
EGF	Epidermal growth factor	Stimolazione di cellule epiteliali e mesenchimali
IGF-I e II	Insulin-Like growth factor-I e II	Incremento del numero di osteoblasti Stimolazione della deposizione di osso Azione sui precursori degli osteoblasti

TABELLA 1

Questa complessa interazione di mediatori locali, risultato di meccanismi autocrini e paracrini, stimola le cellule mesenchimali indifferenziate a migrare, proliferare e differenziare in sede di innesto.

Lo studio delle complesse interazioni tra molteplici GFs sul metabolismo osseo si è dimostrato molto importante per diverse ragioni:

- numerosi GFs (IGF-I, TGF- β , bFGF e PDGF) vengono sequestrati nella matrice ossea ad alte concentrazioni;
 - le cellule dell'osso rilasciano numerosi GFs;
 - si verifica, durante la riparazione dell'osso (come nella guarigione delle fratture), un'espressione temporanea di geni che codificano sia per GFs multipli che per i loro corrispondenti prodotti genici multipli.
- Ai fini dei processi di guarigione e della rigenerazione ossea, l'attenzione deve essere rivolta ai granuli piastrinici α che contengono, oltre a

proteine plasmatiche e fattori della coagulazione, tutti quei GFs che si ritengono mediatori della guarigione e della rigenerazione.

È stato, infatti, dimostrato che la fase iniziale della rigenerazione sia caratterizzata dal rilascio, in sede di innesto, di PDGF, TGF- β e IGF-I e II, mediante degranulazione delle piastrine¹⁶.

Il PDGF, da un lato, stimola la proliferazione delle cellule staminali midollari presenti nell'innesto osseo, così da aumentare il loro numero di diversi ordini di grandezza, dall'altro, grazie alla sua azione angiogenetica, determina la formazione di nuovi capillari nell'innesto.

Nello stesso tempo, il TGF- β , che è mitogeno per i fibroblasti e per i preosteoblasti, aumenta specificamente il numero di queste cellule. Successivamente, il TGF- β promuove la differenziazione dei preosteoblasti verso forme più mature. La secrezione continua di TGF- β influen-

za, da un lato, gli osteoblasti a rilasciare matrice ossea, dall'altro, i fibroblasti a depositare matrice di collagene necessaria a sostenere la crescita dei capillari¹⁷.

L'IGF-I e II agiscono sugli osteoblasti dell'endostio, che possono così iniziare a colmare le trabecole dell'osso spugnoso innestato.

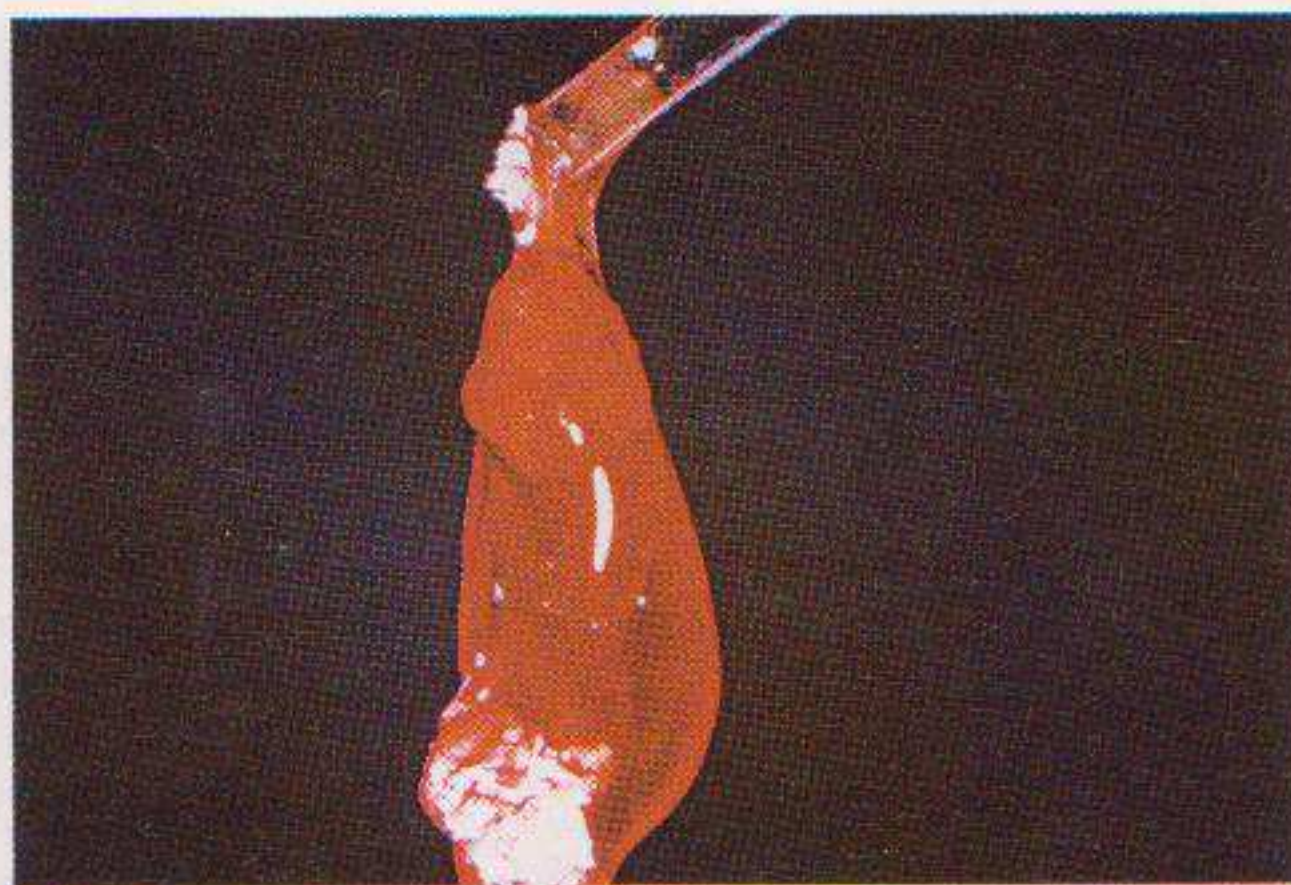
In tabella 1 vengono riassunte le funzioni principali dei fattori di crescita che si ritengono coinvolti nei processi di guarigione e di rigenerazione ossea.

Al momento, questa nuova metodologia del gel piastrinico, che permette di combinare il gel piastrinico sia con osso autogeno spugnoso e corticale (figura 2) sia con matrice ossea esogena (figura 3), offre la possibilità di usufruire dell'impiego dei GFs e delle BMPs.

La necessità di rigenerare è talvolta richiesta per trattare perdite ossee dovute a traumi, tumori, osteonecrosi o condizioni congenite.



2 Osso autologo combinato con gel piastrinico



3 Particelle di matrice ossea esogena vengono incluse nel gel piastrinico così da formare una massa gelatinosa, facilmente manipolabile

Gli innesti ossei autogeni sono considerati i «gold standard» per il materiale di innesto ma, talvolta, ci si trova ad affrontare il problema di poter disporre soltanto di una quantità limitata di osso disponibile per la raccolta dal paziente e, conseguentemente, nascono problemi legati alla morbidità del sito donatore.

Queste limitazioni hanno suscitato un interesse crescente nell'impiego di innesti ossei alternativi, come gli alloplastici.

Dal momento che è stato dimostrato che GFs e BMPs, il cui potenziale osteoinduttivo è stato valutato in svariati modelli sia in vivo sia in vitro¹⁸ e sono essenziali per la fisiologia del processo di riparazione dell'osso, è naturale considerarli come potenziali agenti osteoinduttivi.

Il gruppo di Marx, pioniere in questo campo, ha elaborato una procedura che prevede la raccolta di plasma autologo ricco di piastrine, indispensabile per formare il gel.

Le piastrine vengono isolate e con-

centrate a partire dal sangue del paziente (prelievo di 450-500 ml) permettendo, quando si degranulano per l'aggiunta di trombina bovina e calcio cloruro, di ottenere GFs, citochine, fibrina e molecole di adesione. L'importanza dell'utilizzo del gel piastrinico nella pratica chirurgica, e in altre discipline della medicina (trattamento di ulcere croniche, da decubito, ustioni), ha indotto il nostro gruppo di studio a mettere a punto una metodologia efficace, affidabile, semplice, economica e che permette di ottenere rapidamente in laboratorio un gel piastrinico autologo^{4,5} così da poter essere utilizzato di routine nella chirurgia orale, implantare, parodontale e maxillofacciale.

Al momento, questo protocollo permette di preparare, in modo riproducibile e standardizzabile, un concentrato piastrinico a partire da un prelievo di 60 ml di sangue venoso che viene attivato mediante una miscela di calcio gluconato e

botropase, per ottenere un gel di piastrine, la cui applicazione verosimilmente determina localmente un incremento della concentrazione dei GFs tissutali tale da accelerare la guarigione e la rigenerazione dei tessuti circostanti.

Si ritiene che le innovazioni fondamentali di questa tecnica, rispetto a quella di Marx et al., consistano:

- nella possibilità di poter prelevare poco sangue, rispetto al prelievo di 500 ml di sangue venoso necessario per realizzare la procedura di Marx et al., che rappresenta senza dubbio un vantaggio in termini pratici e comporta una scarsa morbidità per il paziente;

- nella rapidità, facilità di esecuzione e costo veramente minimo che consentono di rendere routinaria la procedura di preparazione del gel piastrinico;

- nella sostituzione della trombina bovina con il botropase, aspetto di fondamentale importanza poiché si rende possibile la fattibilità e l'appli-

cazione di questo protocollo in Italia, dal momento che finora l'attivazione del concentrato piastrinico poteva essere effettuata solo ed esclusivamente mediante la trombina di natura bovina, non commerciabile nel nostro Paese; inoltre, l'uso del botropase è sicuramente da preferirsi alla trombina bovina dal momento che può offrire una maggiore sicurezza biologica¹⁹.

In questi ultimi mesi, sono state effettuate alcune modificazioni al protocollo di attivazione del concentrato piastrinico (CP).

Innanzitutto, il calcio cloruro è stato sostituito con il calcio gluconato dal momento che quest'ultimo sembra accelerare ulteriormente i tempi di gelificazione del CP. Inoltre, l'esperienza maturata in questi mesi ha dimostrato che è sufficiente una quantità sempre più ridotta di botropase (200-300 ml) per attivare circa 6-7 ml di CP.

Infine, studi recenti, volti a perfezionare la metodica di preparazione e di attivazione del CP, hanno permesso di giungere a evidenze molto interessanti.

Innanzitutto, è stato osservato che il gel piastrinico è un biomateriale modellabile: può prendere, infatti, la forma del recipiente in cui viene attivato; inoltre, l'impiego di botropase, in grado di provocare un'attivazione delle piastrine più lenta (5-10 minuti) rispetto alla trombina bovina (qualche secondo) permette di modulare la consistenza e le dimensioni del gel.

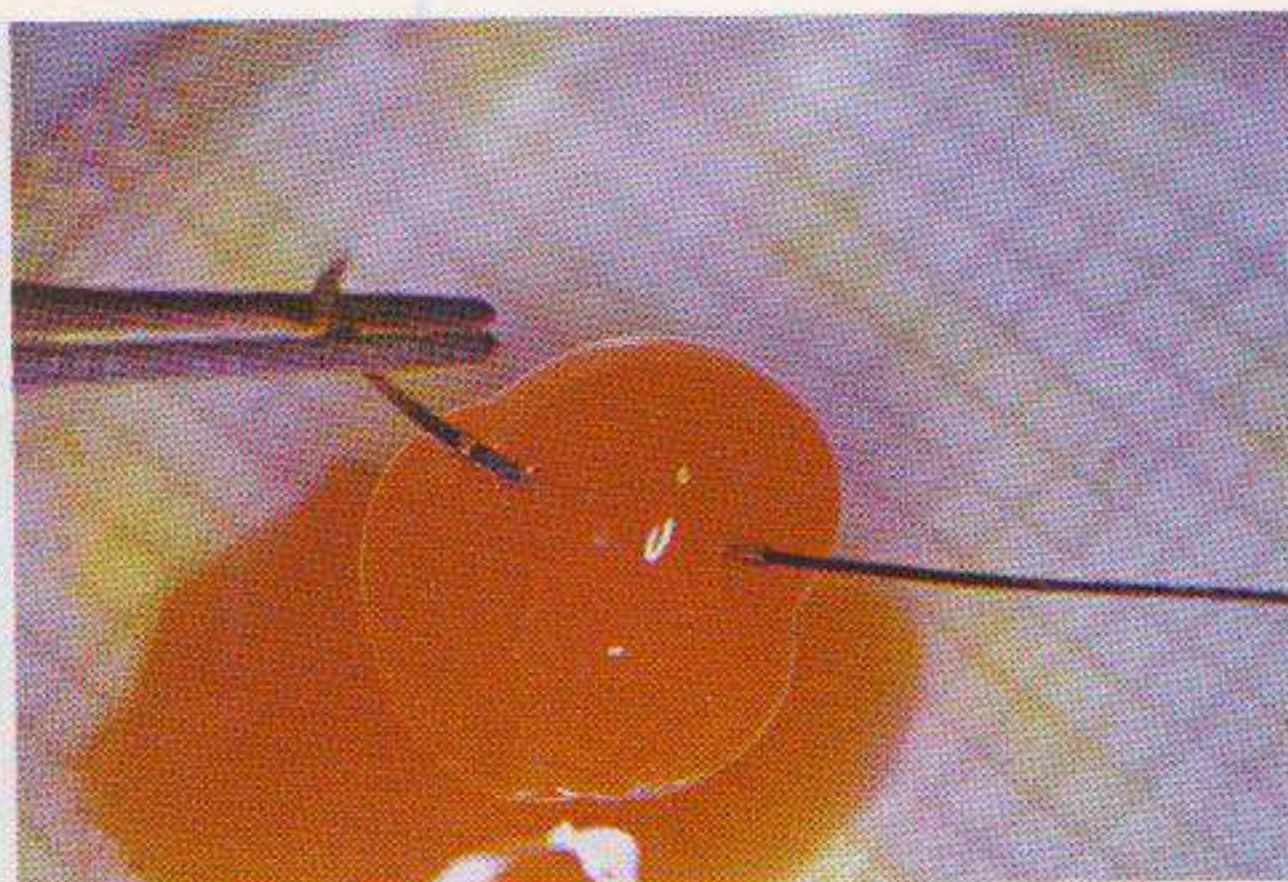
Ovviamente, forma e consistenza sono in funzione della quantità di CP che si deve attivare e della forma del recipiente impiegato.

La possibilità di poter plasmare il gel

piastrinico e l'utilizzo di capsule Petri quale recipiente in cui eseguire l'attivazione del CP hanno consentito di ottenere un gel a forma di membrana, del tutto simile a quelle usate in campo odontoiatrico.

L'opportunità di disporre di una membrana di piastrine, quale tappeto ricco di GFs autologhi, che si può agevolmente maneggiare e che per la sua consistenza si può addirittura suturare (figura 4), consente una più ampia applicazione clinica del gel piastrinico, offrendo anche prospettive inedite nella terapia rigenerativa che, attualmente, trova grande riscontro in chirurgia implantare e parodontale. Inoltre, è stato dimostrato che, grazie al recupero e all'attivazione del plasma povero di piastrine (PPP), finora non utilizzato nei protocolli classici di preparazione del CP, in quanto considerato un prodotto di scarto per la sua povertà in piastrine, è di contro possibile ottenere ugualmente la formazione del gel.

Una possibile spiegazione di questo risultato consiste nell'osservazione che, con la metodica di preparazione del CP messa a punto nel nostro laboratorio, sono ancora presenti nel PPP piastrine in una concentrazione tale da portare alla formazione del gel. Conseguentemente, l'opportunità di poter utilizzare sia il CP sia il PPP per ottenere il gel permette, da un lato, di effettuare un prelievo ancora più contenuto di sangue intero, riducendo, pertanto, sempre di più la morbidità del paziente, dall'altro, di utilizzare, verosimilmente, tutte le piastrine presenti nel sangue processato e, quindi, poter disporre di una maggiore quantità di GFs.



4 La consistenza del gel permette di sopportare discreti stimoli meccanici, al punto da renderlo suturabile quasi come un «tessuto sostitutivo»

MATERIALI E METODI

Vengono prelevati 60 ml di sangue venoso in 12 ml di acido citrico-destrorioso (ACD, Byk Gulden Italia spa, Corman, Milano) e processati secondo le procedure di routine⁴. Dopo la preparazione, CP e PPP vengono tenuti a temperatura ambiente per almeno 15 minuti prima di dare inizio alle fasi necessarie per ottenere il gel piastrinico. Il numero di piastrine viene determinato mediante un contaglobuli automatico (Advia 120, Bayer, Milano, Italia). Sono stati allestiti citocentrifugati di CP, PRP e PPP, colorati con May Grunwald/Giemsa per l'analisi morfologica.

TECNICA PER LA PREPARAZIONE DI CP E DI PPP

Il sangue intero, raccolto in provette sterili (Falcon, Sacco, Milano) da 15 ml cadauna ($n = 4$), viene centrifugato a 180 giri al minuto per 20 minuti.

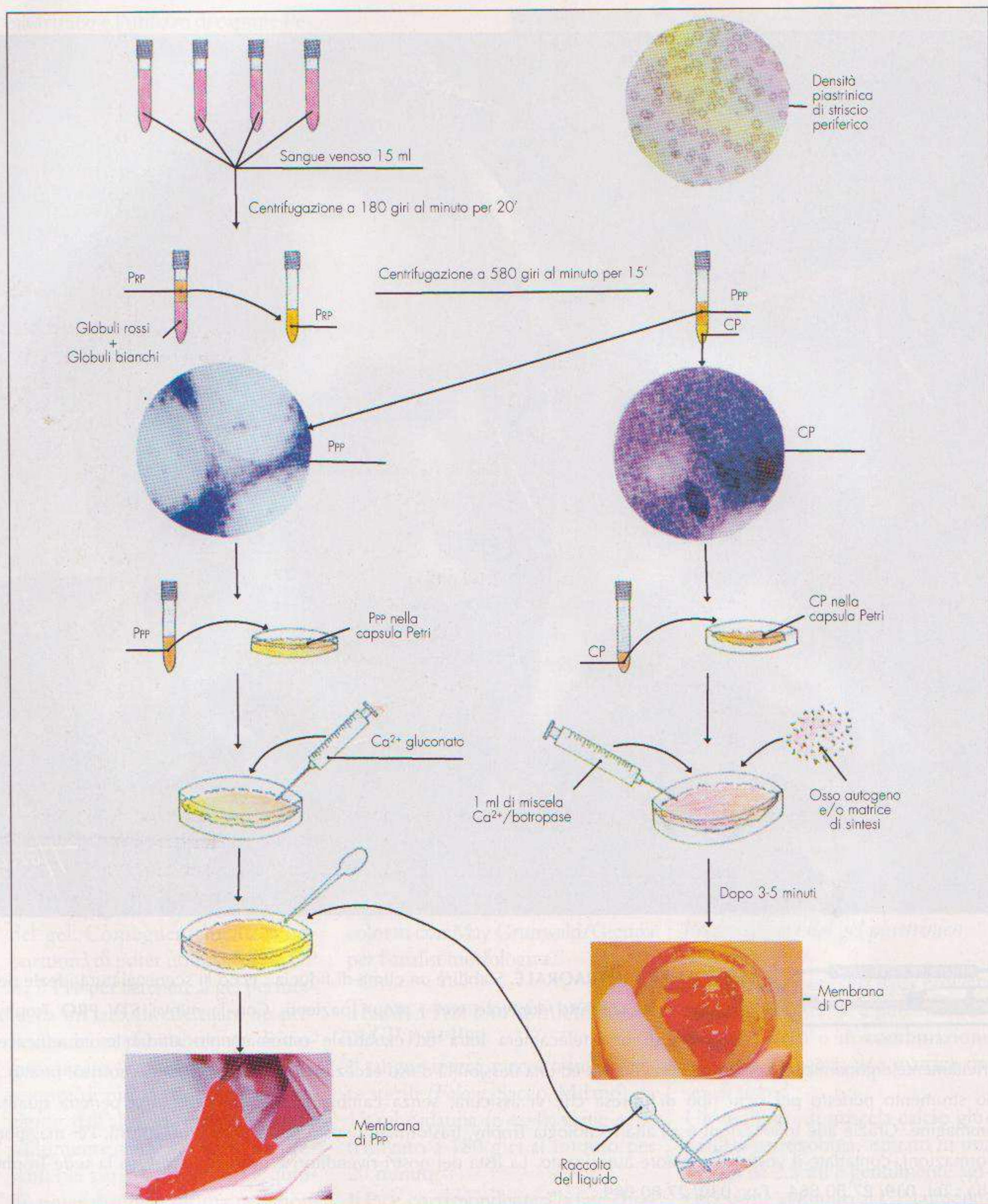
Il PRP, corrispondente alla fase chiara superiore, viene quindi trasferito

in una nuova provetta e ulteriormente concentrato, mediante centrifugazione (580 giri al minuto per 15 minuti). Il volume finale di 7 ml di CP è il risultato della risospensione del pellet piastrinico, ottenuto al termine della seconda centrifugata, in 5 ml di PPP (figura 5). Il PPP rappresenta la parte liquida soprastante il pellet che, invece di essere eliminato come previsto nei protocolli standard di preparazione del CP, viene raccolto in una provetta da 50 ml, pronto per essere attivato.

PROTOCOLLO DI ATTIVAZIONE Preparazione del gel piastrinico da CP

Il CP viene trasferito dalla provetta in un dappen sterile e può essere attivato da solo o in combinazione con osso autogeno e/o matrice ossea di sintesi.

Un millilitro di miscela calcio gluconato/batroxobina, aspirato in una siringa da 2,5 ml e gentilmente agitato, viene aggiunto al CP contenuto nel dappen.



5 Fasi di preparazione e attivazione del gel piastrinico ottenuto da CP e PPP

Nell'arco di 3-5 minuti, il miscuglio di CP e miscela calcio gluconato/batroxobina assume una consistenza gelatinosa, dal momento che la batroxobina, principio attivo del botropase ed equivalente all'attività coagulante di $1 \pm 0,2$ unità trombiniche internazionali, è responsabile della polimerizzazione della fibrina in un gel insolubile, inducendo la degranulazione delle piastrine con conseguente rilascio di fattori di crescita e citochine.

Il tempo di processamento richiesto per la separazione del sangue autologo nei suoi componenti (CP e PPP), secondo questa metodica, è di soli 45 minuti.

Preparazione del gel piastrinico da PPP

Il PPP, conservato nella provetta da 50 ml a temperatura ambiente, viene attivato dopo la preparazione del gel piastrinico ottenuto dal CP.

Le fasi principali consistono in:

- raccolta, in provetta sterile, del liquido in eccesso, trasudato dal gel piastrinico e formatosi nel dappen al termine dell'attivazione;
- aggiunta al PPP di calcio gluconato (10% del volume totale di PPP), quale antagonista dell'anticoagulante utilizzato per il prelievo;
- travaso del suddetto liquido nella provetta contenente il PPP, con sua rapida trasformazione (da 30 secondi a 2 minuti) in una massa gelatinosa.

Allestimento di membrane a partire da CP attivato

Il CP, attivato come descritto, mostra un'elevata plasmabilità che consente all'operatore di modellarlo a seconda delle esigenze cliniche, co-

sì che assuma la forma del recipiente in cui viene effettuata la sua attivazione.

Attivando il CP in una capsula Petri (diametro di 35 o 60 mm a seconda delle dimensioni del gel piastrinico necessario per la rigenerazione ossea e/o la guarigione tissutale), è possibile dare al gel la forma di una membrana, la cui consistenza è proporzionale alla quantità del materiale attivato e alla dimensione della capsula stessa.

Allestimento di membrane a partire da PPP attivato

Anche il PPP, il cui volume finale non è mai inferiore a 25 ml partendo da un prelievo venoso di 60 ml, può essere attivato e modellato a membrana, quando viene trasferito in una capsula Petri di dimensioni maggiori (diametro di 100 mm), dal momento che dimensioni inferiori della capsula non sarebbero in grado di contenere tutto il PPP a disposizione.

CONTE PIASTRINICHE RELATIVE AI PAZIENTI TRATTATI

N. pazienti	Conta basale (k/ μ l)	Conta CP (k/ μ l)	Conta PPP (k/ μ l)
1	240	1111	227
2	275	1373	200
3	230	1162	184
4	183	817	100
5	192	527	144
6	265	1437	187
7	173	273	65
8	108	550	33
9	95	237	40
10	94	465	137
11	192	440	129
12	206	744	133
13	258	1702	160
14	186	726	122
15	185	283	57

TABELLA 2

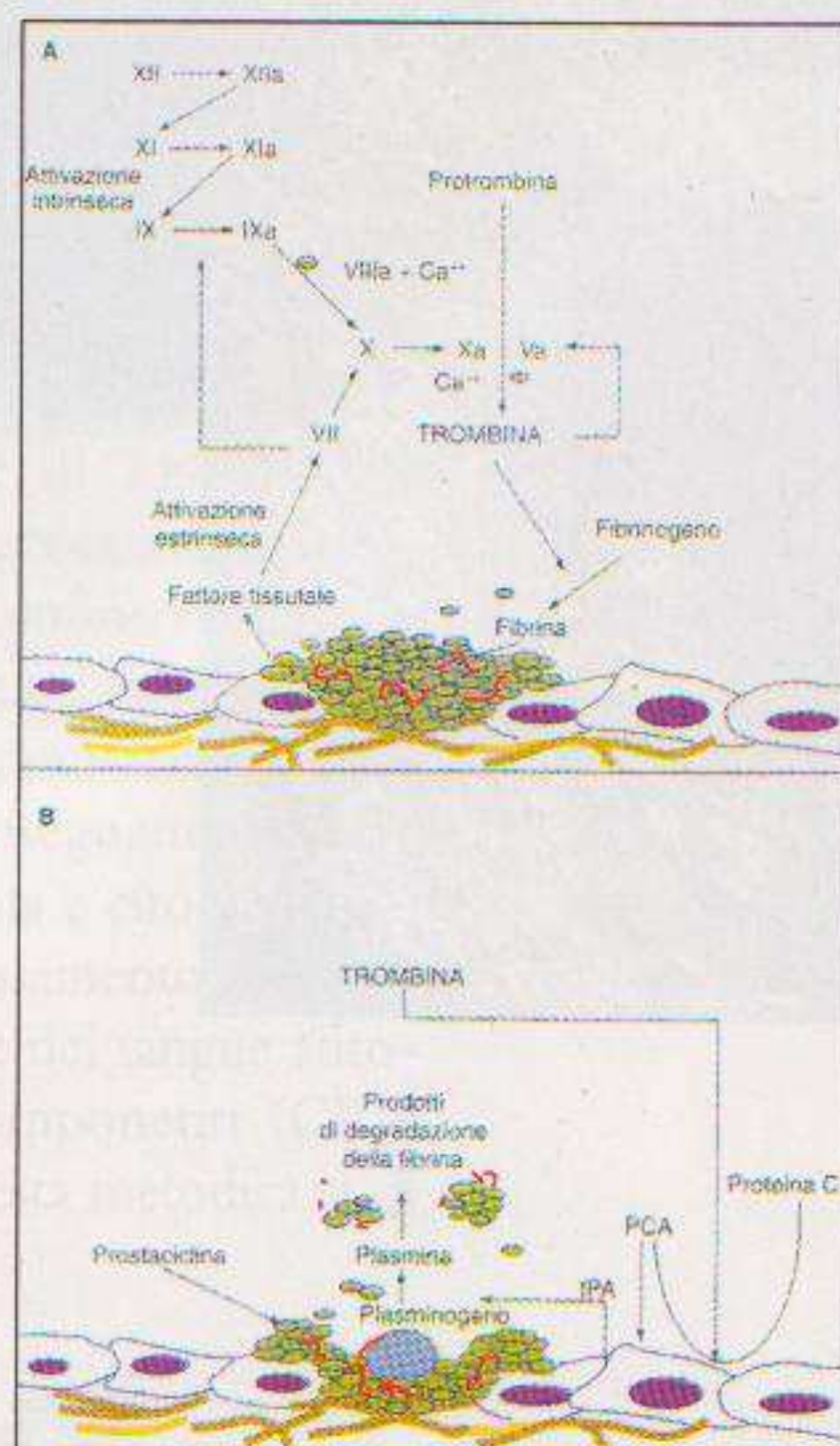
Analisi istopatologica

Le biopsie ossee sono state fissate in formalina tamponata al 10%, demineralizzate in acido formico al 5% per 48 ore, decalcificate in acido nitrico e incluse in cera di paraffina. Da ogni biopsia sono state ricavate sezioni spesse 5 μ m, colorate con ematossilina-eosina, osservate e fotografate al microscopio ottico (Nikon).

Sono stati allestiti vetrini, esaminati con un analizzatore di immagine, per effettuare una valutazione istomorfometrica.

RISULTATI

Dalle conte piastriniche basali del CP e del PPP, eseguite su 15 pazienti (tabella 2) mediante sistema ematologico automatico, si evince che il gel ottenuto da CP presenta una concentrazione piastrinica incrementata in media di 4 volte rispet-



6 Rappresentazione schematica della fase vascolare della coagulazione (tratta da Madon et al.²³)



7 Osso lamellare maturo. Si notino i sistemi haversiani completi; colorazione ematossilina-eosina, 160x

to al sangue intero (CP/basale = 400%), mentre quello derivante dall'impiego di PPP risulta essere depauperato soltanto del 30% delle piastrine totali (PPP/basale = 70%). In figura 5 vengono riportate le densità piastriniche che sono state riscontrate all'osservazione al microscopio ottico dopo colorazione May Grunwald/Giemsa, relative a strisci di sangue periferico intero e citocentrifugati allestiti a partire da CP e PPP dello stesso paziente.

Nel PPP si può osservare, come comprovato dalle conte sopra citate, un modesto incremento della concentrazione piastrinica rispetto a quanto osservato nello striscio di sangue periferico intero; sufficiente, tuttavia, per la preparazione di

un gel da modellare a seconda delle necessità cliniche. Il calcio gluconato e il botropase, quando aggiunti al CP, attivano le piastrine in esso contenute e iniziano il processo di coagulazione, caratterizzato dalla conversione del fibrinogeno in fibrina (figura 6) che risulta nella formazione di un gel clinicamente utile per migliorare la manipolazione e l'efficacia di particolari innesti di osso autologo o di sostituti.

L'analisi istologica delle biopsie ossee, effettuate a distanza di 5 mesi dalla chirurgia (figura 7), e gli studi istomorfometrici eseguiti sui vetrini allestiti a partire dalle suddette biopsie (figure 8-10), sembrano evidenziare che, quando viene impiegata una miscela di in-

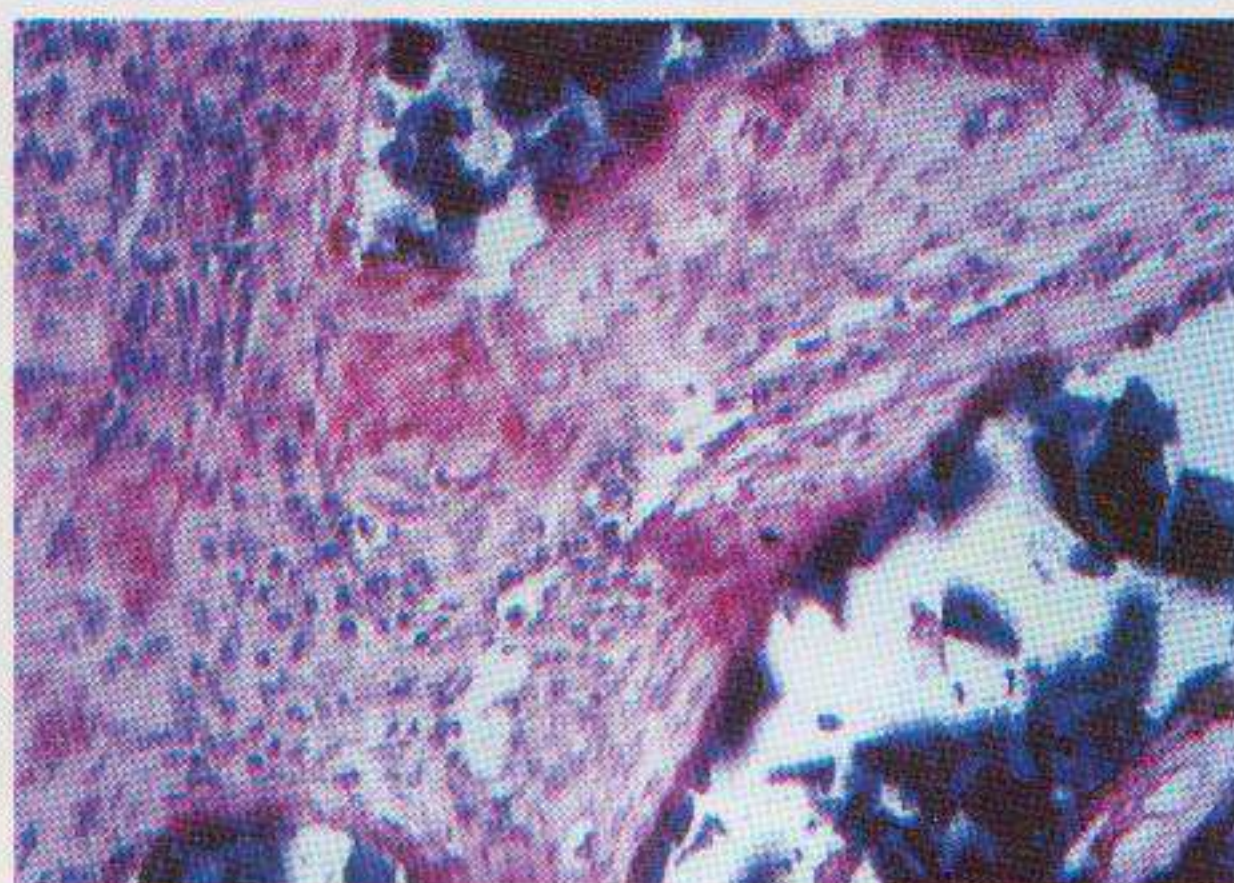
nesto osso autologo-gel piastrinico (figura 2) e/o matrice ossea di sintesi-gel piastrinico (figura 3), si osserva, da un lato, un aumento del tasso di velocità di formazione dell'osso e, dall'altro, un incremento della densità ossea.

Quando l'attivazione del gel piastrinico viene effettuata in capsule Petri, è possibile plasmarlo a membrana (figura 11).

A gelificazione avvenuta, la membrana può essere scollata dalle pareti della capsula (figura 12), in modo da poter recuperare il liquido in eccesso da essa trasudato (figura 13), che viene immediatamente utilizzato per l'attivazione del PPP, raccolto in un'altra capsula Petri di dimensioni maggiori (figura 14).

STUDIO ISTOMORFOMETRICO

Percentuale di tessuto osseo neoformato/tessuto fibroso	54,5/45,5
Area media delle spicole ossee neoformate (mm ²)	73
Perimetro medio delle spicole ossee neoformate (mm)	1,4
Diametro massimo medio delle spicole ossee neoformate (mm)	0,47



8 Paziente 1. Studio istomorfometrico eseguito sul vetrino e tessuto osseo neoformato, osservabile a distanza di 5 mesi dall'applicazione; colorazione ematossilina-eosina, 160x

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I meccanismi e il potenziale di formazione e riparazione ossea sono stati delucidati rapidamente durante gli ultimi dieci anni.

Nonostante rimangano aperte ancora molte problematiche, è per ora chiaro che numerose citochine e GFs polipeptidici giocano un ruolo essenziale in questi processi così complessi.

È ormai universalmente riconosciuto che GFs e BMPs, fattori trascrizionali che regolano la proliferazione e la differenziazione delle cellule

mesenchimali, svolgono un ruolo di primaria importanza nel rimodellamento, nella rigenerazione e nelle fasi di guarigione sia dei tessuti molli sia di quelli duri^{17,18-20}.

Il gel piastrinico, rivelandosi un bioprodotto ricchissimo di GFs, favorisce, accelerandoli, i normali processi sia di guarigione sia di rigenerazione tissutali.

I recenti risultati ottenuti da diverse sperimentazioni cliniche hanno indotto a credere che l'impiego di un solo GF non sia sufficiente per risolvere tutti i problemi connessi ai processi di riparazione ma, al contrario, si ritiene che una rete com-

STUDIO ISTOMORFOMETRICO

Percentuale di tessuto osseo neoformato/tessuto fibroso	60/40
Area media delle spicole ossee neoformate (mm ²)	46,5
Perimetro medio delle spicole ossee neoformate (mm)	1,4
Diametro massimo medio delle spicole ossee neoformate (mm)	0,41



9 Paziente 2. Studio istomorfometrico eseguito sul vetrino e tessuto osseo neoformato, osservabile a distanza di 5 mesi dall'applicazione; colorazione ematossilina-eosina, 160x

STUDIO ISTOMORFOMETRICO

Percentuale di tessuto osseo neoformato/tessuto fibroso	65/35
Area media delle spicole ossee neoformate (mm ²)	80
Perimetro medio delle spicole ossee neoformate (mm)	1,56
Diametro massimo medio delle spicole ossee neoformate (mm)	0,47



10 Paziente 3. Studio istomorfometrico eseguito sul vetrino e tessuto osseo neoformato, osservabile a distanza di 5 mesi dall'applicazione; colorazione ematossilina-eosina, 160x

plexa di GFs, citochine e altri mediatori biologici debbano essere usati più specificamente per ottenere una guarigione completa delle ferite e una rigenerazione rapida ed efficace²¹.

In questo articolo vengono riportati i correnti progressi nella preparazione del gel piastrinico.

Come riportato in letteratura²², questo biomateriale, usato in svariate applicazioni con apparente successo clinico, è una modificazione autologa della colla di fibrina.

Da circa un anno, nel nostro laboratorio, è stato messo a punto un protocollo riproducibile e standar-

dizzato, che permette di preparare rapidamente e con un costo contenuto il gel piastrinico che, al momento, viene usato in combinazione con procedure chirurgiche ablative della regione maxillofacciale, per ricostruzioni mandibolari e in aggiunta a procedure finalizzate al posizionamento di impianti osteointegrati.

Recentemente, abbiamo adottato una procedura che prevede la preparazione di membrane di piastrine, ottenute modellando il gel formatosi, attivandolo con una miscela calcio gluconato/botropase sia CP sia PPP.

Ovviamente, la possibilità di poter plasmare il gel piastrinico, consentendo una sua più ampia applicazione clinica, è da considerarsi assolutamente positiva.

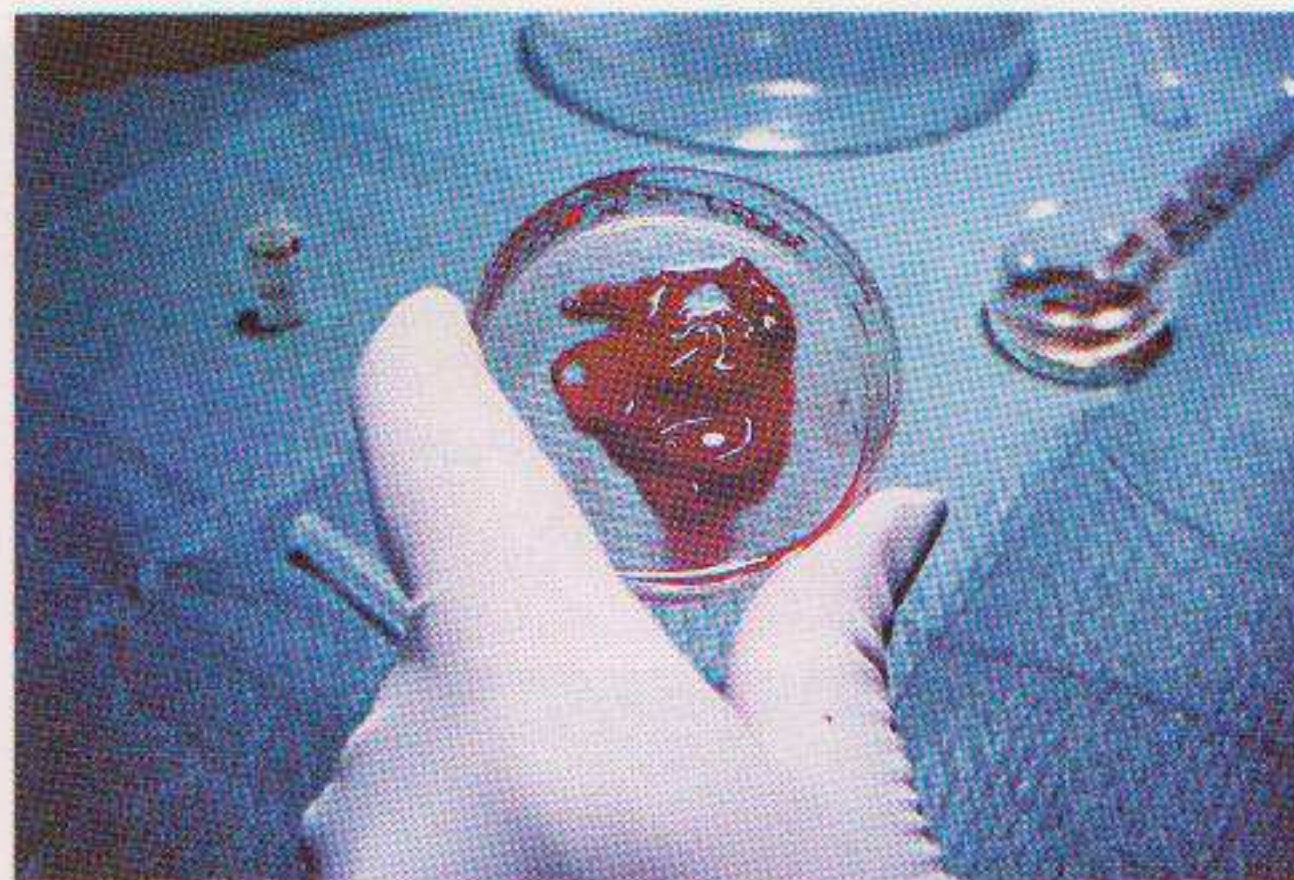
È, tuttavia, importante tenere presente che la somiglianza delle membrane di piastrine con quelle del commercio si ferma però solo alla forma, dal momento che le classiche membrane tanto in uso in chirurgia orale producono il famosissimo «effetto barriera», mentre le membrane di piastrine non sono altro che un tappeto di GFs autologhi.

Ora, l'opportunità di disporre di un

Suono e preciso



11 Gel piastrinico modellato a membrana



12 Membrana i cui bordi sono stati scollati dalle pareti



13 Recupero dell'essudato prodotto dalla membrana



14 PPP durante la fase di attivazione

tessuto ricco di tali fattori, che si può agevolmente maneggiare e per la sua consistenza addirittura suturare, apre prospettive inedite nella terapia rigenerativa, che attualmente trova grande riscontro in odontoiatria.

Inoltre, l'opportunità di poter utilizzare sia CP sia PPP permette, da un lato, di effettuare un prelievo sempre più contenuto di sangue intero, riducendo ancora di più la morbidità del paziente, dall'altro, di utilizzare tutte le piastrine presenti nel san-

gue processato e, verosimilmente, poter disporre di una maggiore quantità di GFs.

Pertanto, questi studi sono stati finalizzati ad apportare delle evoluzioni alla tecnologia di preparazione del gel piastrinico, riuscendo a modella-

re a membrane questo gel attivato e a utilizzare anche quella frazione di plasma meno arricchita di piastrine, ma ugualmente utile nell'incrementare il processo di rigenerazione.

Inoltre, si rende noto che risultati sperimentali alquanto promettenti, ottenuti anche nel trattamento delle ulcere diabetiche e vascolari, mediante l'impiego del gel piastrinico modellato a membrane con la tecnica da noi messa a punto, non possono che incoraggiarci ad approfondire questo studio.

È, pertanto, possibile che le evoluzioni della tecnica del gel piastrinico possano essere applicate con successo anche ad altre discipline della medicina.

Considerando i risultati incoraggianti raggiunti finora, nasce inevitabilmente l'esigenza di comprendere il meccanismo fisiologico alla base del potenziale di guarigione e di rigenerazione, proprio del gel di piastrine.

*Corrispondenza a: dottoressa Maria C. Sacchi
Laboratorio di Ematologia,
Dipartimento di Ematologia e Medicina Trasfusionale,
Azienda Ospedaliera «S. Antonio e Biagio e C. Arrigo»
Via Venezia 16, 15100 Alessandria*

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. Sacchi MC, Bellanda M, Vercellotti T. Il concentrato piastrinico in chirurgia orale e implantare. *Dent Mod* 2000;1:69-78.
4. Sacchi MC, Vercellotti T. A new routine technique to make PRP derived gel which can be used in oral and implant surgery. Submitted to *J Oral Maxillofac* 2000.
5. Lynch SE. Introduction. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999: 179-98.
6. Bostrom MPG. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* 1998;355:116-23.
7. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic proteins. *J Dent Res* 1971;50:1392.
8. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81:277-81.
9. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9843-7.
10. Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990;21:199-209.
11. Joyce ME, Jingushi S, Scully SP, Bolander ME. Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 1991;365:391-416.
12. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994;9:651-9.
13. Simmons DJ. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 1985;200:100-13.
14. Triffitt JT. Initiation and enhancement of bone formation. A review [published erratum appears in *Acta Orthop Scand* 1988;59: 625]. *Acta Orthop Scand* 1987;58: 673-84.
15. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetics protein and bone morphogenetic gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998;346:26-37.
16. 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.
17. Bostrom MPG, Asnis P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop* 1999;355:124-31.
18. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. *Acta Orthop Scand* 1998;69 (suppl. n. 283).
19. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:297-300.
20. Lane JM, Tomin E, Bostrom MPG. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop* 1999; 367:107-17.
21. Robson MC, Mustoe TA, Hunt TK. The future of recombinant growth factors in wound healing. *Am J Surg* 1998;176(suppl 2A):80S-82S.
22. Hood AG, Hill AG, Reeder GD. Perioperative autologous sequestration III: a new physiologic glue with wound healing properties. *Proceedings of the American Academy of Cardiovascular Perfusion* 1993;14:126.
23. Madon E, Gabrutti V, Miniero R. *Ematologia e oncoematologia pediatrica*. Milano: McGraw-Hill, 1998.

In redazione da luglio 2000

DM