

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Scienze Farmacologiche e Tossicologiche, dello Sviluppo e  
del Movimento Umano**

Ciclo XXIX

**Settore Concorsuale di afferenza  
SC 06/F4 – MALATTIE DELL'APPARATO LOCOMOTORE**

**Settore Scientifico disciplinare  
SSD MED/33 – MALATTIE APPARATO LOCOMOTORE**

Platelet-rich Plasma: caratteristiche biologiche e applicazione clinica

**Presentata da: Dott.ssa Alice Roffi**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof.ssa Patrizia Hrelia**

**Relatore**

**Prof. Maurilio Marcacci**

**Correlatore**

**Dott. Giuseppe Filardo**

**Esame finale anno 2017**

**DOTT.SSA ROFFI ALICE**

Tutor Prof. Maurilio Marcacci, Co-relatore Dott. Giuseppe Filardo

**Titolo della tesi di Dottorato**

**“Platelet-rich plasma: Caratteristiche Biologiche e Applicazione Clinica”**

Presentazione

La Dott.ssa Alice Roffi si è laureata in Scienze Biomolecolari e cellulari presso l'Università degli Studi di Ferrara nel Luglio 2010, con la tesi dal titolo “La frazione mitocondriale di PTEN modula l'omeostasi intracellulare del calcio e la via intrinseca dell'apoptosi”. Ha conseguito l'abilitazione all'Esercizio Professionale nel novembre 2016. La Dott.ssa Roffi ha cominciato a svolgere attività di ricerca dall'ottobre 2010 nel Laboratorio di Biomeccanica ed Innovazione Tecnologica da me diretto presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli, focalizzandosi sullo studio dei trattamenti biologici per la rigenerazione dei tessuti muscolo-scheletrici. Svolgendo la propria attività lavorativa in un contesto di ricerca clinica, il ruolo della Dott.ssa Roffi, biologa, è quello di favorire la traslazione dei risultati pre-clinici in trattamenti clinici, in termini sia di sviluppo di nuovi protocolli terapeutici sia di miglioramento di quelli esistenti. Pertanto ha aiutato a coordinare le varie attività degli studi pre-clinici svolti in collaborazione con i Laboratori dell'Istituto Ortopedico Rizzoli e di quelli clinici svolti nel Laboratorio di Biomeccanica ed Innovazione Tecnologica/I Clinica Ortopedica e Traumatologica. Durante gli anni di Dottorato, la Dott.ssa Roffi ha lavorato con diligenza ed interesse indirizzando le sue ricerche nell'ambito dei concentrati piastrinici per il trattamento delle patologie degenerative articolari (Osteoartrosi), facendo convergere i risultati in vitro con quelli clinici.

L'osteartrosi comporta spesso una sintomatologia importante che può alterare notevolmente la qualità della vita dei pazienti affetti; inoltre la perdita delle proprietà funzionali dei tessuti promuove dei cambiamenti patologici instaurando una progressiva degenerazione articolare, arrivando in ultimo alla sostituzione totale dell'articolazione. Dato l'alto costo sociale di questa patologia appare chiaramente come la ricerca di soluzioni che consentano di risolvere tale problema sia una delle sfide dei nostri giorni. L'obiettivo quindi di questo lavoro di Dottorato è stato quello di approfondire la conoscenza dell'effetto dei concentrati piastrinici in vitro ed in vivo, integrando i risultati al fine di ottimizzare i protocolli terapeutici esistenti ed aumentare il potenziale di questo innovativo approccio terapeutico.

Il lavoro della Dott.ssa Roffi è stato quindi articolato in due parti: la prima parte “Dalla ricerca in vitro alla clinica” che mostra risultati in vitro inerenti gli effetti dei concentrati piastrinici su colture cellulari, con lo scopo di fornire nuove informazioni per l’ottimizzazione dei protocolli clinici; la seconda parte “Dalla ricerca clinica alla ricerca in vitro” mira ad indagare il razionale in vitro di alcune strategie già applicate in clinica.

Nel corso dei tre anni di Dottorato, la Dott.ssa Roffi ha acquisito competenze nell’ambito del coordinamento di attività di ricerca, competenze di progettazione e conduzione di studi clinici, nonché di stesura di articoli scientifici e presentazione dei risultati ottenuti a Congressi Nazionali ed Internazionali. Il progetto è stato condotto dalla Dott.ssa Roffi in piena sinergia con i propri supervisori, acquisendo nel tempo sempre maggiore autonomia nella conduzione delle proprie ricerche.

La Dott.ssa Roffi ha inoltre acquisito capacità di Project Management nell’ambito di Bandi Nazionali ed Internazionali (attestate da frequentazione di corsi e partecipazione attiva all’interno di progetti del Laboratorio), apprendendo le modalità di scrittura di un Progetto, la supervisione delle attività nei progetti in corso, i sistemi di reporting economico e scientifico. In tale ambito ha dimostrato notevoli capacità di tipo organizzativo e relazionale, nei confronti del proprio lavoro e nella buona capacità di lavoro in gruppo.

Considerando l’impegno e l’autonomia dimostrati nel condurre le proprie ricerche si ritiene la Dott.ssa Alice Roffi pienamente meritevole di conseguire il titolo di Dottore di Ricerca.

### **Pubblicazioni relative ai risultati del lavoro di tesi**

1. Roffi A, Di Matteo B, Krishnakumar GS, Kon E, Filardo G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *Int Orthop*. 2016 Nov 26.
2. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6591717. Epub 2016 Sep 8.
3. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, Marcacci M, Facchini A, Pulsatelli L. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015 Sep;23(9):2690-703.

4. Fiorentino S, Roffi A, Filardo G, Marcacci M, Kon E. European definitions, current use, and EMA stance of platelet-rich plasma in sports medicine. *J Knee Surg.* 2015 Feb;28(1):51-4.
5. Roffi A, Filardo G, Assirelli E, Cavallo C, Cenacchi A, Facchini A, Grigolo B, Kon E, Mariani E, Pratelli L, Pulsatelli L, Marcacci M. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int.* 2014;2014:692913.

#### **Articoli pubblicati nel triennio del Dottorato nell'ambito della medicina rigenerativa nel tessuto muscolo-scheletrico**

1. Filardo G, Merli G, Roffi A, Marcacci T, Berti Ceroni F, Raboni D, Bortolotti B, Kon E, Marcacci M. Kinesiophobia and depression affect total knee arthroplasty outcome in a multivariate analysis of psychological and physical factors on 200 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016 Jun 21.
2. Filardo G, Perdisa F, Roffi A, Marcacci M, Kon E. Stem cells in articular cartilage regeneration. *J Orthop Surg Res.* 2016 Apr 12;11(1):42.
3. Filardo G, Roffi A, Merli G, Marcacci T, Ceroni FB, Raboni D, Bortolotti B, De Pasqual L, Marcacci M. Patient kinesiophobia affects both recovery time and final outcome after total knee arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Dec 19
4. Perdisa F, Gostyńska N, Roffi A, Filardo G, Marcacci M, Kon E Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Articular Cartilage: A Systematic Review on Preclinical and Clinical Evidence. *Stem Cells Int.* 2015;2015:597652.
5. Kon E, Roffi A, Filardo G, Tesei G, Marcacci M. Scaffold-based cartilage treatments: with or without cells? A systematic review of preclinical and clinical evidence. *Arthroscopy.* 2015 Apr;31(4):767-75

### **Presentazioni orali a congressi nazionali ed internazionali dei risultati del lavoro di tesi**

1. TERMIS CONGRESS EU 2014 in Genova, in qualità di relatore “Does platelet-rich plasma with or without leukocytes produce different effects on human synoviocytes? In vitro comparative analysis”
2. Congresso Nazionale del Club Italiano Osteosintesi (Sesto di Val Pusteria) in qualità di relatore: “Fattori di crescita: Cosa rimane dopo le BMP?”

### **Poster presentati a congressi nazionali ed internazionali dei risultati del lavoro di tesi**

1. Platelet-Rich Plasma activators affect the release of bioactive molecules. Presented at EORS 2016. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Krishnakumar GS, Filardo G.
2. Effect of freezing/thawing on PRP Growth Factor Release and Their Effects on Chondrocytes and Synoviocytes G. Merli, G. Filardo, A. Roffi, E. Mariani, C. Cavallo, E. Assirelli, B. Grigolo, L. Pulsatelli, E. Kon, M. Marcacci. Presented at ICRS 2015 Congress Chicago (USA)
3. Platelet-rich Plasma: does the choice of activation method affect the release kinetics of bioactive molecules? Carola Cavallo, Brunella Grigolo, Erminia Mariani, Alice Roffi, Giulia Merli, Elizaveta Kon, Maurilio Marcacci, Giuseppe Filardo. Presented at ICRS 2015 Congress Chicago (USA)
4. PRP with or without leukocytes: any difference on chondrocytes and synoviocytes culture? E.Kon, G.Filardo, E.Mariani, A.Roffi, B. Di Matteo, B.Grigolo, L.Pulsatelli, A.Facchini, M.Marcacci. Presented at ESSKA Congress 2014.

In fede

Prof. Maurilio Marcacci

# SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	2
I PARTE.....	12
DALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO” ALL’APPLICAZIONE CLINICA.....	12
II PARTE .....	37
DALLA CLINICA ALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO” .....	37

# **INTRODUZIONE**

# L'Osteoartrosi del ginocchio

Un'articolazione sana è caratterizzata da un equilibrio tra danno tissutale, rigenerazione e rimodellamento, sia a livello delle singole cellule sia considerando l'intera struttura articolare, e ciò avviene grazie all'interazione sinergica di cartilagine, sinovia, osso sub-condrale, menischi, legamenti [1]. Differenti fattori possono alterare questo equilibrio portando ad una perdita delle proprietà funzionali dei tessuti articolari che progressivamente portano all'insorgenza dell'osteartrosi (OA) [2,3].

L'OA del ginocchio è una delle patologie degenerative articolari più diffuse [4] che colpisce un numero crescente di persone a livello mondiale e per la quale non esiste tuttora una cura definitiva. Si stima che negli Stati Uniti ed in Europa le persone affette siano rispettivamente 20 e 50 milioni, rappresentando quindi un problema in termini sociali (peggioramento della qualità della vita, riduzione della forza lavoro) ed economici (elevati costi per il Sistema Sanitario) [4].

È classificata come una malattia sistemica, cronica caratterizzata dalla progressiva degenerazione della cartilagine, accompagnata da cambiamenti patologici nell'osso sub-condrale, tessuto sinoviale, menischi, tendini/legamenti [4]. Tale condizione rappresenta un fattore limitante importante in quanto il dolore è il sintomo maggiore che influisce sulla qualità della vita dei pazienti, accompagnato inoltre da limitazioni funzionali [5]. L'OA è una patologia multifattoriale causata da fattori genetici (come l'alterazione dell'espressione genica della cartilagine e dell'osso sub-condrale) e caratteristici del paziente (età, genere, sesso, obesità, stress meccanici, vita sedentaria, traumi, occupazione lavorativa) [6]. Da un punto di vista patofisiologico distinguiamo l'osteartrosi in precoce e tardiva. La prima è caratterizzata da dolore associato a lesioni cartilaginee e/o dell'osso sub-condrale che possono essere identificati da artroscopia, radiografia o risonanza magnetica [7,8]. L'osteartrosi tardiva è caratterizzata da una diminuzione del rimodellamento e del turnover osseo, incrementandone la deposizione, e causando aumento dello spessore dell'osso corticale e spongioso sub-condrale [9].

Differenti strategie terapeutiche sistemiche e locali sono applicate nella pratica clinica, dai trattamenti farmacologici e non, procedure infiltrative con varie sostanze (l'acido ialuronico, HA o corticosteroidi) con lo scopo di ristabilire l'omeostasi e portare ad un miglioramento del quadro funzionale [10]. Sfortunatamente quando queste strategie terapeutiche falliscono, l'unica opzione per evitare o rimandare la sostituzione totale dell'articolazione è rappresentata da tentativi chirurgici invasivi [11,12], con tempi di riabilitazione molto lunghi e spesso imprevedibili, incompleti e limitati nel tempo [13,14,15,16,17].

Al fine quindi di proporre una soluzione mini-invasiva per migliorare lo stato della superficie articolare e permettere un veloce ritorno alle attività quotidiane, sono stati sviluppati approcci terapeutici di origine biologica, tra questi i concentrati piastrinici.

## **L'utilizzo dei concentrati piastrinici in ambito Ortopedico: Revisione Sistemática della Letteratura**

I fattori di crescita sono un gruppo eterogeneo di polipeptidi biologicamente attivi tipici di tutti gli organismi pluricellulari, che svolgono un ruolo essenziale nel regolare i processi di proliferazione e differenziazione cellulare, oltre ad essere critici nel processo di riparazione dei danni tissutali, promuovendo la chemiotassi, la neoangiogenesi, la deposizione di matrice extracellulare [18,19]. È ormai noto in letteratura che le piastrine siano una importante riserva di fattori di crescita e di altre molecole bio-attive, contenute all'interno degli  $\alpha$ -granuli che, in seguito ad attivazione, rilasciano il proprio contenuto, stimolando la migrazione cellulare, la crescita, morfogenesi e modulando l'infiammazione. In questo scenario, il Platelet Rich Plasma (PRP) rappresenta un'opzione semplice, economica e minimamente invasiva per ottenere un concentrato di fattori di crescita e altre molecole di origine autologa.

Per questo, il PRP è stato largamente utilizzato in differenti campi della medicina: dalla oftalmologia, alla chirurgia maxillo-facciale, fino all'ortopedia, come terapia infiltrativa minimamente invasiva per lesioni cartilaginee focali e degenerative (in ambito clinico e preclinico) [20]. Tuttavia, nonostante l'iniziale entusiasmo tra i medici e la comunità scientifica per questa innovativa strategia terapeutica i risultati riportati sono spesso contraddittori senza nessuna indicazione di trattamento [20]. Il principale ostacolo nella comprensione dell'efficacia del PRP è la mancanza di un protocollo standardizzato per la produzione e l'applicazione dei concentrati piastrinici, che porta inevitabilmente ad avere differenti PRP in termini di concentrazione piastrinica, presenza/assenza di leucociti, metodo di attivazione e protocollo di applicazione.

L'obiettivo di questa revisione è di analizzare in maniera sistematica le evidenze disponibili in letteratura sull'utilizzo del PRP come trattamento infiltrativo per le lesioni cartilaginee e la degenerazione articolare in ambito pre-clinico e clinico. I risultati forniti da questa ricerca faranno luce sugli aspetti prioritari da chiarire per ottenere indicazioni sulle fasi di questo lavoro di dottorato.

### **Materiali e Metodi**

La ricerca sistematica è stata condotta seguendo le linee guida per le revisioni sistematiche e meta analisi del PRISMA (Figura 1). Nel database PubMed ho effettuato la ricerca con la seguente stringa di ricerca: “(Platelet rich Plasma OR PRP OR Platelet Concentrate OR Platelet Lysate OR Platelet supernatant) AND (Cartilage OR chondrocytes OR synoviocytes OR menisci OR mesenchymal stem cells)”. Sono stati presi in considerazione tutti gli studi in vitro, in vivo e clinici in lingua inglese, inerenti l’effetto del PRP su cartilagine, menischi e tessuto sinoviale; inoltre, dal momento che il PRP può essere utilizzato come procedura concomitante dopo la stimolazione del midollo osseo o trapianti di cellule, l’analisi è stata estesa anche all’effetto sulle cellule staminali mesenchimali (MSCs) di varia origine. Per poter trovare ulteriori studi sono state analizzate anche le liste bibliografiche degli articoli selezionati. Gli articoli sono stati analizzati e i dati collezionati in 3 tabelle, separando gli studi in vitro, in vivo e clinici.

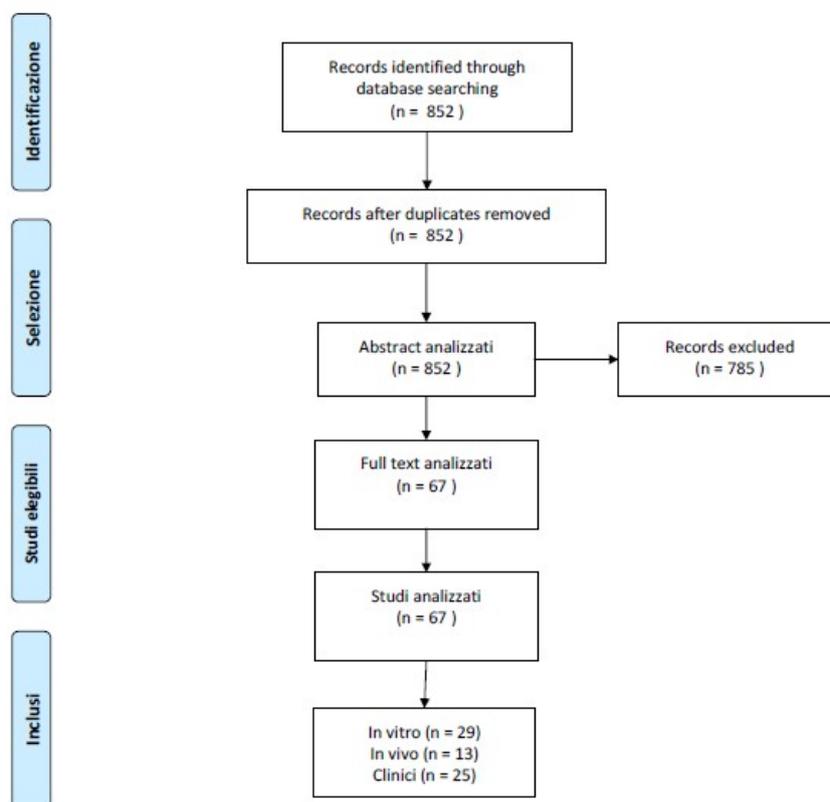


Figura 1: Diagramma PRISMA della selezione degli articoli

## Risultati

Sono stati identificati 852 articoli, di cui 64 con i criteri di inclusione precedentemente descritti: 31 in vitro (Tabella 1), 11 in vivo (Tabella 2), e 22 studi clinici. L’analisi delle pubblicazioni per anno

ha evidenziato un aumento dell'interesse in questa strategia terapeutica, con un numero crescente di pubblicazioni nel tempo.

**Tabella 1: Studi in vitro**

	<b>Publicazioni</b>	<b>Caratteristiche del PRP</b>	<b>Effetti</b>
<b>Condrociti</b>	Yin 2013	Concentrazione Piastrine: 2604±602x10 <sup>3</sup> /ml Attivazione: - No Leucociti	Aumento della proliferazione e della deposizione di componenti della ECM
	Muraglia 2013	Concentrazione Piastrine: 10x10 <sup>6</sup> /μl No Attivazione Leucociti: -	Aumento della proliferazione maggiore che con l'utilizzo di siero, anche in condrociti da pazienti anziani
	Hildner 2013	Nessuna informazione	Aumento della proliferazione
	Park 2012	Concentrazione Piastrine: 6–10x10 <sup>6</sup> /μl No Attivazione Leucociti: -	Aumento dose dipendente (5, 10, 20% PRP) della proliferazione con mantenimento del fenotipo condrogenico Aumento tempo dipendente di fattori pro angiogenici e anti-angiogenici
	Lee 2012	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: - No Leucociti	Aumento della proliferazione e dell'espressione di CB1 e CB2
	Pereira 2012	Concentrazione Piastrine: 1x10 <sup>7</sup> /ml Attivazione: congelamento/scongelo Leucociti: -	Aumento della proliferazione e mantenimento del fenotipo condrogenico Azione pro/anti infiammatoria
	van Buul 2011	Concentrazione Piastrine: 845.3x10 <sup>6</sup> /ml Attivazione: CaCl <sub>2</sub> Leucociti: presenti	Normalizzazione dei livelli di collagene II, aggrecano, ADAMTS4, MMP13 and PTGS2 alterati da IL-1β No influenza sul contenuto di GAG Down-regulation dell'IL-1β indotta da NF-kb
	Wu 2011	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: Thrombin Leucociti: -	Aumento della proliferazione dei condrociti e normalizzazione dei livelli di collagene II, PG, integrine e CD44 inibite da ambiente infiammatorio
	Bendinelli 2010	Concentrazione Piastrine: 1850±320x10 <sup>6</sup> /ml Attivazione: Thrombin+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: present	Azione anti infiammatoria Inibizione della chemotassi di cellule simil monociti
	Spreafico 2009	Concentrazione Piastrine: 1460x10 <sup>3</sup> /μl Attivazione: Ca-gluconate Leucociti: -	Aumento della proliferazione con il 5% PRPr Aumento dell'espressione del collagene II, e PG
	Drengk 2009	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	Aumento della proliferazione dei condrociti ma con inibizione dei markers condrogenici
	Pettersson S 2009	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: - Leucociti: -	Nessun effetto sull'espressione di componenti della matrice su condrociti seminati su scaffold
	Saito 2009	Concentrazione Piastrine: 1081±150x10 <sup>4</sup> /μl Attivazione: Thrombin+CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	Aumento del contenuto di GAG
	Akeda 2006	Concentrazione Piastrine: 1399±174x10 <sup>3</sup> /ml Attivazione: Thrombin+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: -	Aumento della proliferazione cellulare con mantenimento del fenotipo condrocitario Aumento dell'espressione di collagene II e PG
Gaissmaier 2005	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: Thrombin+Ca-gluconate No Leucociti	Aumento della proliferazione dei condrociti ma con inibizione dei markers condrogenici	

	Kaps 2002	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: congelamento/scongelo No Leucociti	Aumento della crescita cellulare superiore a quella indotta da siero su condrociti articolari e nasali Riduzione della deposizione di componenti della matrice nel costrutto condrociti/agarosio
	Yang 2000	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: congelamento/scongelo No Leucociti	Aumento della proliferazione dei condrociti con 1% PS Formazione di una massa di condrociti con 10% PS Aumento dell'espressione di GAG ma inibizione di quella del collagene II
MSCs + condrociti	Mifune 2013	Concentrazione Piastrine: 230x10 <sup>4</sup> /ml Attivazione: Thrombin+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: -	Promozione della proliferazione, adesione, migrazione delle MDSCs ed aumento dell'apoptosi cellulare
	Moreira Teixeira 2012	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: congelamento/scongelo No Leucociti	Aumento dell'espressione del collagene II Proprietà chemoattrattive nell'idrogel
Cellule meniscali	Gonzales 2013	Concentrazione Piastrine: 140±20x10 <sup>9</sup> /l Attivazione: - Leucociti: -	Aumento della proliferazione cellulare con 10% e 20% di PRP, risultati simili a quelli ottenuti con FBS Aumento dell'espressione del collagene di tipo I e dell'aggregano al giorno 7
	Ishida 2007	Concentrazione Piastrine: 104.5x10 <sup>4</sup> /μl Attivazione: - Leucociti: -	Aumento della proliferazione cellulare Nessun effetto nel collagene di tipo II e della sintesi di GAG
Sinoviociti	Browning 2012	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: - Leucociti: present	Aumento delle MMP1, 3, IL6 e decremento del PDGF-ββ, MIP-1β, RANTES Elevata risposta proinfiammatoria
	Anitua 2007	Concentrazione Piastrine: 494x10 <sup>6</sup> /ml Attivazione: CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	Aumento della secrezione di HA No effetti sull'espressione di MMP1, 3, e VEGF
Mesenchymal stem cells	Hildner 2013	Nessuna informazione	Aumento della proliferazione cellulare Aumento di GAG e markers cartilaginei
	Kruger 2012	Concentrazione Piastrine: 0.6–1.3x10 <sup>10</sup> /ml Attivazione: congelamento/scongelo Leucociti: <0.3x10 <sup>4</sup> /ml	Aumento della migrazione cellulare con il 5% PRP Induzione dell'espressione di markers condrogenici Formazione di matrice cartilaginea
	Moreira Teixeira 2012	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: congelamento/scongelo No Leucociti	Aumento della proliferazione, adesione e migrazione delle BMSCs con PL, nessun effetto sull'espressione di collagene II
	Murphy 2012	Concentrazione Piastrine: 10 <sup>6</sup> /μl Attivazione: CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	Effetto mitogenico, aumento della proliferazione e migrazione con ucPRP rispetto ad aPRP
	Mishra 2009	Concentrazione Piastrine: 10 <sup>6</sup> /ml No Attivazione Leucociti: present	Aumento della proliferazione cellulare Aumento dell'espressione di markers condrogenici
	Drengk 2009	Concentrazione Piastrine: - Attivazione: CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	Aumento della proliferazione cellulare, debole differenziazione condrogenica
	Zaky 2008	Concentrazione Piastrine: 1-1.8x10 <sup>6</sup> /μl Attivazione: congelamento/scongelo No Leucociti	Aumento della proliferazione cellulare, con induzione del differenziamento condrogenico
	Kakudo 2008	Concentrazione Piastrine: 132.26x10 <sup>4</sup> /μl Attivazione: Thrombin+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: -	Aumento della proliferazione con il 5% di PRP attivato rispetto al non attivato

**Tabella 2: Studi in vivo**

<b>Pubblicazione</b>	<b>Modello animale</b>	<b>Caratteristiche del PRP</b>	<b>Protocollo</b>	<b>Effetti del PRP</b>
Mifune 2013	36 OA ratti	Concentrazione piastrinica: 230x10 <sup>4</sup> /ml Attivazione: Thr+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: -	1 IA (30 µl)	Promozione della sintesi di collagene II e soppressione dell'apoptosi dei condrociti, ma a 12 w perdita degli effetti benefici
Hapa 2013	42 ratti con lesione condrale	Concentrazione piastrinica: 13.8x10 <sup>9</sup> /l Attivazione: - Leucociti: -	1 IO (150 µl) 1 IA (150 µl)	Aumento dell'espressione del collagene II e migliore guarigione della lesione
Guner 2012	20 OA ratti	Concentrazione piastrinica: - Attivazione: Thr+CaCl <sub>2</sub> Leucociti: -	3 IA (50 µl)	Nessun effetto significativo
Serra 2012	36 conigli con lesione osteocondrale	Concentrazione piastrinica: - Attivazione: CaCl <sub>2</sub> No Leucociti	7 IA (0.25 ml)	Nessun beneficio additivo del PRP
Kwon 2012	21 OA conigli	Concentrazione piastrinica: 2664±970×10 <sup>3</sup> /µl Attivazione: - Leucociti: -	1 IA (0.3 ml)	Rigenerazione della cartilagine in tutti i gradi di OA, specialmente in quella moderata
Milano 2012	30 pecore con lesione condrale	Concentrazione piastrinica: 868±112×10 <sup>3</sup> /ml No Attivazione No Leucociti	5 IA (3ml)	Miglioramento macroscopico, istologico e biomeccanico dopo le microfratture
Milano 2011	30 pecore con lesione condrale	Concentrazione piastrinica: 2x No Attivazione No Leucociti	5 IA (2-3 ml)	Promozione della guarigione della cartilagine fino a 6 mesi, non a 12
Lippross 2011	15 maiali con artrite reumatoide	Concentrazione piastrinica: 1x10 <sup>6</sup> /µl Attivazione: - Leucociti: -	2 IA (5 ml)	Riduzione dell'espressione dei livelli di IL-6 e VEGF, concomitante ripristino delle proteine condrali Riduzione di IL-1b e IGF-1 nei sinoviociti
Milano 2010	15 pecore con lesione condrale	Concentrazione piastrinica: 1415±164x10 <sup>3</sup> /ml PRP Liquido: no attivazione PRP gel: Ca-gluconate+colla di fibrina Leucociti: -	1 IA (5 ml)	Miglioramento macroscopico, istologico e biomeccanico Risultati migliori a 6 m con il PRP gel
Saito 2009	33 OA conigli	Concentrazione piastrinica: 1081±150x10 <sup>4</sup> /µl Attivazione: - No Leucociti	2 IA (100 µl)	Soppressione della progressione dell'OA da un punto di vista morfologico, istologico con PRP impregnato in microsfe
Carmona 2007	4 OA cavalli	Concentrazione piastrinica: 250±71.8x10 <sup>6</sup> /ml Attivazione: CaCl <sub>2</sub> Leucociti: presenti	3 IA (10-20 ml)	Miglioramento nel grado di gonfiore e limitazione funzionale con parametri del liquido sinoviale normali

## **Studi clinici**

La presente ricerca ha identificato 22 studi clinici che hanno incontrato i criteri di inclusione: tra questi, 13 sono “case series”, 4 sono studi comparativi, e 5 sono studi randomizzati. La maggior parte degli articoli pubblicati sono inerenti l'applicazione dei concentrati piastrinici nel ginocchio.

La ricerca sistematica della letteratura ha evidenziato la presenza di 5 studi randomizzati e controllati. Sanchez et al. [21] ha studiato l'efficacia di una singola infiltrazione di PRP senza leucociti rispetto all'HA in 153 pazienti valutati fino a 6 mesi di follow-up. L'unico aspetto in cui è stata trovata una netta superiorità di PRP è stata la percentuale di responder (pazienti con almeno il 50% di riduzione del dolore), significativamente più alta nel gruppo PRP. Analoghe considerazioni sono state fatte da Filardo et al. [22], secondo i risultati preliminari (109 pazienti) del loro studio randomizzato di confronto tra PRP in doppio cieco e HA: nessuna differenza inter-gruppo statisticamente significativa è stata segnalata, solamente una tendenza a favore del PRP a 6 e 12 mesi di follow-up è stata trovata in pazienti affetti da basso grado di degenerazione della cartilagine (Kellgren Lawrence fino a 2). Viceversa, Cerza et al. [23] ha paragonato l'efficacia dell'ACP (autologous conditioned plasma, un PRP con una bassa concentrazione di piastrine e senza leucociti) contro l'HA in 120 pazienti. Sorprendentemente, il gruppo ACP ha mostrato una performance significativamente migliore rispetto all'HA in tutti i gruppi di trattamento, inclusi i pazienti affetti da OA al ginocchio di grado elevato. Infine, uno studio randomizzato pubblicato da Patel et al. [24] è stato il primo a testare il PRP contro salina. Settantotto pazienti affetti da Kellgren di grado I-III OA sono stati inclusi e trattati bilateralmente con una o due infiltrazioni di PRP (3 settimane) o una iniezione di soluzione salina. Nonostante il basso numero di pazienti inclusi (12) è stata osservata una differenza significativa tra PRP e soluzione salina in termini di risultato clinico. È interessante notare che nessuna differenza è stata riportata tra i pazienti che hanno ricevuto una o due infiltrazioni di PRP. Infine, un solo articolo ha indagato l'efficacia del PRP contro l'HA nelle lesioni osteocondrali dell'astragalo su 30 pazienti. Nel breve termine, 28 settimane, è stata evidenziata una prestazione clinica superiore nel gruppo trattato con il PRP.

## **Discussione**

Questa revisione sistematica conferma il crescente interesse nel PRP come trattamento infiltrativo per la degenerazione della cartilagine e l'OA. Il numero dei nomi ed acronimi incontrati nella ricerca eseguita (PRP, PRGF, ACP, PL) rappresenta chiaramente la complessità dell'argomento e spiega la difficoltà nell'analisi della letteratura, nel confronto tra gli studi e nella presenza di risultati contraddittori.

Gli studi pre-clinici hanno dimostrato in generale effetti positivi, supportando l'utilizzo del PRP per le lesioni cartilaginee e per tutti i difetti nei tessuti articolari. Un'infiltrazione non agisce solamente

sulla cartilagine ma anche su tutti i tessuti vicini, il PRP agisce quindi su tutto l'ambiente articolare, come si può notare dagli effetti esercitati in vitro su differenti tipologie cellulari (sinoviali, staminali, meniscali). Inoltre, l'attività chemotattica del PRP potrebbe contribuire al reclutamento di altre cellule in grado di migrare nei tessuti danneggiati innescando la risposta rigenerativa [26,27].

Recenti evidenze pre-cliniche supportano il ruolo del PRP nel modulare l'infiammazione: dopo un'iniziale azione pro-infiammatoria, con stimolazione dei sinoviociti al rilascio di metallo-proteasi e citochine, segue una fase di limitazione della risposta infiammatoria, con diminuzione delle molecole coinvolte e prevenzione della chemiotassi di cellule simil-monociti [28]. Un altro aspetto che emerge dalla letteratura pre-clinica è l'effetto analgesico del PRP, che sarebbe quindi in grado di aumentare i recettori cannabinoidi [29]. Sulla base di queste evidenze, è importante sottolineare che il PRP potrebbe non favorire direttamente la rigenerazione della cartilagine, ma offrire un beneficio in termini di sollievo dai sintomi e miglioramento funzionale, rallentando il processo degenerativo.

Uno dei problemi nell'OA è l'apoptosi, morte cellulare programmata dei condrociti, un possibile bersaglio per le future terapie anti-OA: Mifune [30] ha infatti dimostrato come ci sia una complessa interazione tra membrana sinoviale e i differenti tessuti articolari che potrebbe portare all'apoptosi dei condrociti. L'esatto meccanismo con cui il PRP potrebbe rallentare l'apoptosi rimane poco chiaro, ma recenti evidenze hanno identificato nel il fattore IGF-1 un possibile effettore dell'inibizione, regolando l'espressione della proteina PDCD 5 [31].

I risultati controversi descritti in letteratura evidenziano i limiti degli studi pre-clinici, che non rappresentano esattamente la patofisiologia umana. Nonostante ciò, sebbene questa tipologia di studi non possa sostituirsi a quelli clinici, le osservazioni in vitro ed in vivo possono fornire importanti informazioni sul meccanismo di azione, suggerendo la direzione per il miglioramento dei protocolli.

Anche gli studi clinici riportano un effetto benefico, anche se rapido e limitato nel tempo, in contrasto con il tempo necessario ad indurre un processo di rigenerazione della cartilagine e dei tessuti circostanti. Prima di tutto bisogna sottolineare la sicurezza del trattamento, poiché non sono stati riportanti eventi avversi importanti in seguito ad infiltrazioni di PRP. Inoltre, tutti gli studi clinici sembrano concordare sul fatto che il PRP porta ad alcuni effetti benefici: migliori risultati rispetto alla salina ed una leggera superiorità rispetto alla viscosupplementazione (trattamento con HA). Infine è importante sottolineare come non tutte le categorie di pazienti riportano gli stessi risultati, che sono molto più significativi nei pazienti giovani affetti da osteoartrosi non troppo avanzata [39], e il beneficio clinico è limitato nel tempo e può essere stimato circa intorno ad 1 anno. Questo potrebbe giustificare un trattamento ciclico del PRP, per assicurare risultati duraturi e rimandare procedure molto più invasive.

Numerosi aspetti ancora rimangono da chiarire per capire il meccanismo di azione del PRP e ottenere migliori indicazioni per ottimizzare la terapia per il trattamento delle lesioni della cartilagine e OA.

## **Obiettivo della tesi**

La mancanza di PRP omogenei in letteratura rende difficile paragonare i risultati ottenuti nei vari studi e complicano la ricerca in questo campo, sia negli studi preclinici che nella valutazione dell'efficacia di questo approccio per il trattamento di lesioni dell'apparato muscoloscheletrico nell'uomo. Considerando questi aspetti, l'obiettivo di questo lavoro di Dottorato è quello di approfondire la conoscenza dell'effetto dei concentrati piastrinici attraverso un approccio multidisciplinare, integrando i risultati in vitro ed in vivo al fine di ottimizzare i protocolli di applicazione esistenti ed aumentare il potenziale terapeutico di questo innovativo approccio terapeutico.

# **I PARTE**

## **DALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO” ALL’APPLICAZIONE CLINICA**

# **Effetto di due differenti concentrati piastrinici su colture di condrociti e sinoviociti: proliferazione, espressione genica ed effetto del congelamento**

## **Studio in vitro**

### **Obiettivo**

Nel trattamento con il PRP la concentrazione piastrinica e la presenza o assenza di leucociti rappresentano due aspetti importanti che possono influire sull'effetto nel tessuto bersaglio. In letteratura è stato dimostrato che una concentrazione di piastrine di circa 1000000/ul è associata a risultati biologici positivi nella rigenerazione dell'osso [32]. Inoltre, Chen et al. [33] hanno dimostrato in un modello animale che una concentrazione media di piastrine ( $2,65 \pm 0,2 \times 10^9/\text{ml}$ ) induce la differenziazione osteogenica di cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (BMSCs), al contrario un'alta concentrazione di piastrine ( $8,21 \pm 0,4 \times 10^9/\text{ml}$ ) è stata associata ad effetti negativi, con inibizione della differenziazione osteogenica delle BMSCs e ritardo nella formazione del callo osseo. Per i trattamenti cartilaginei le evidenze cliniche, in cui il PRP applicato varia da una concentrazione da 4 a 8 volte maggiore di quella del sangue, dimostrano l'efficacia anche con concentrazioni minori [20]. Ne deriva che il ruolo della concentrazione piastrinica è di fondamentale importanza, ed in particolare l'interazione con la componente cellulare del PRP è un aspetto da chiarire per migliorarne l'applicazione clinica.

La presenza dei leucociti ed il loro contributo nell'induzione di effetti clinici e biologici è ancora oggetto di dibattito: molti ricercatori considerano i leucociti delle importanti fonti di citochine ed enzimi importanti per la prevenzione delle infezioni; al contrario, altri autori attribuiscono risultati migliori utilizzando dei concentrati piastrinici leuco-depleti, a causa degli effetti deleteri esercitati da proteasi e specie reattive dell'ossigeno rilasciate dai leucociti [36]. Alcuni studi in vitro sottolineano il loro contributo infiammatorio suggerendo effetti potenzialmente nocivi nelle articolazioni trattate. I leucociti inoltre secernono molecole che giocano un ruolo importante nel guidare le cellule nei tessuti [37,38].

Lo studio mira a confrontare in vitro le caratteristiche del PRP ottenuto con due delle procedure più documentate per l'applicazione clinica: una definita "one step", cioè che prevede una sola centrifugazione e porta alla produzione di un PRP mediamente concentrato e sostanzialmente depleto di leucociti, e una tecnica "two step", che prevede due centrifugazioni e identifica un PRP con un maggior numero di piastrine e con una discreta presenza di globuli bianchi. Sono state

quindi valutate e caratterizzate le componenti cellulari, il rilascio di fattori di crescita/molecole pro e anti-infiammatorie, e ne è stato documentato l'effetto su colture di condrociti e sinoviociti.

## **Materiali e Metodi**

### *Preparazione del PRP*

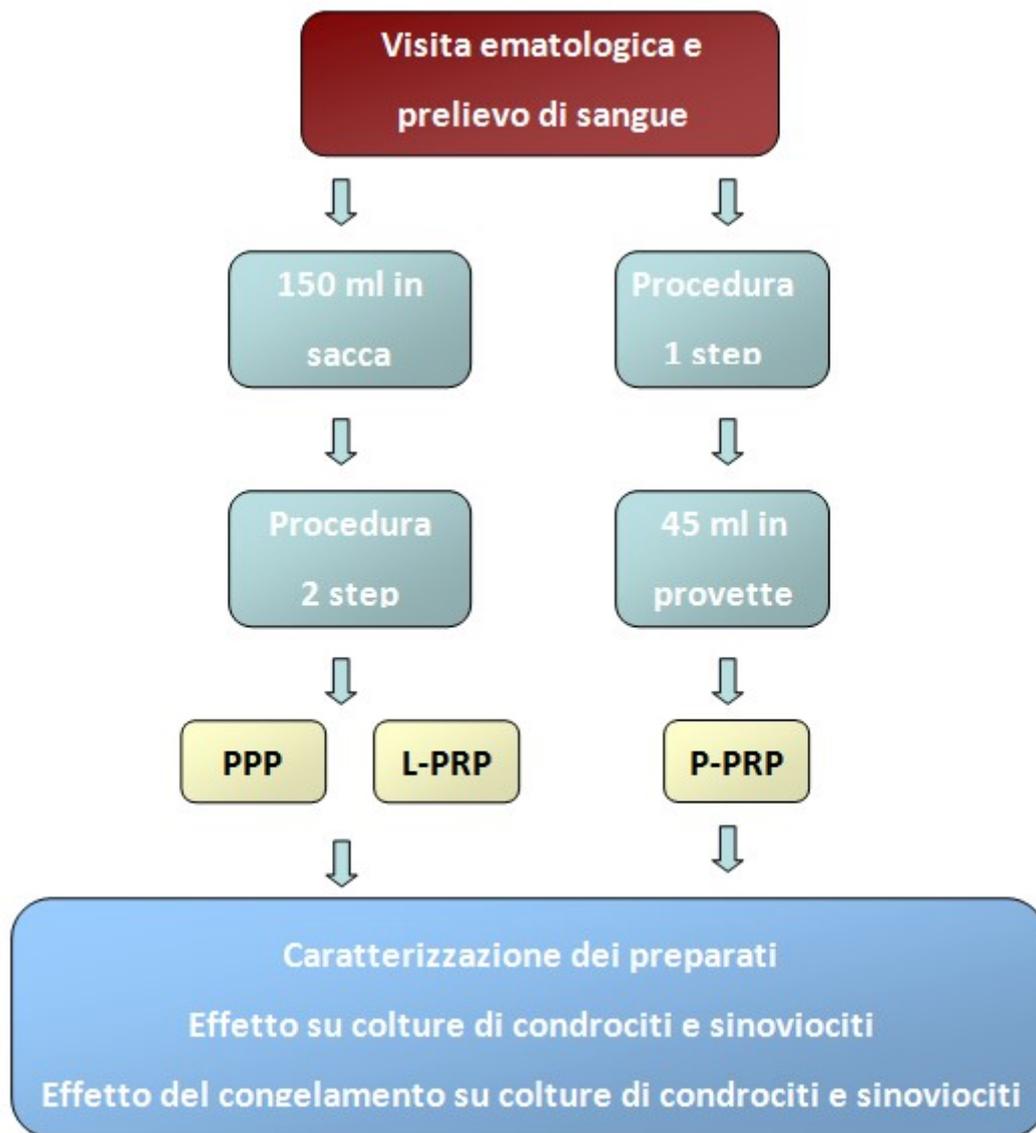
Il Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ha approvato il protocollo di studio e tutti i pazienti arruolati hanno firmato il consenso per la partecipazione. L'identità del donatore è stata mantenuta anonima e tutti i campioni utilizzati sono stati codificati. Sono stati arruolati su base volontaria 10 maschi sani con un'età compresa fra i 25 e 39 anni ( $28,9 \pm 3,1$  anni), senza patologie sistemiche, non fumatori, con valori di Hb  $>11\text{g}/100\text{ml}$  e/o valori piastrinici  $>150,000/\text{mm}^3$ . È stato fatto divieto di assunzione di FANS nei 5 giorni precedenti il prelievo ematico ed è stata vietata l'assunzione di latte e derivati la mattina del prelievo. I volontari sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso periferico previa visita ematologica presso il Centro di Medicina Trasfusionale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli e le preparazioni sono state poi effettuate presso il Laboratorio di Immunoreumatologia e rigenerazione tissutale e Laboratorio RAMSES dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

Sono stati raccolti in totale circa 195 mL di sangue suddivisi come illustrato in Figura 3: 150 ml di in una sacca contenente 21 ml di sodio citrato e centrifugati (15 minuti a 750xg), procedura che permette l'eliminazione della maggior parte dei globuli rossi mentre il buffy-coat e il plasma sovrastanti sono stati trasferiti in una nuova sacca (tramite un circuito chiuso) e nuovamente centrifugati (10 minuti a 3800xg). Il PRP ottenuto (L-PRP, cioè ricco in leucociti) e il PPP sono stati mandati presso il Laboratorio di Immunoreumatologia e rigenerazione tissutale e Laboratorio RAMSES per le successive analisi.

Un campione aggiuntivo di 45 ml è stato raccolto in 5 provette contenenti 1 ml di tri-sodio citrato (3,8%) come anticoagulante e centrifugati (8 minuti a 460xg). Successivamente, per ciascuna provetta, è stato prelevato 1 ml di sospensione situata immediatamente sopra i globuli rossi, evitando di raccogliere i leucociti (P-PRP, PRP puro), secondo il protocollo di Anitua et al.[40].

Il numero di piastrine e leucociti in ciascun campione è stato determinato mediante un analizzatore automatico COULTER LH 750, con linearità  $5-1000 \times 10^3/\text{mm}^3$  per le piastrine e  $0.1-100 \times 10^3/\text{mm}^3$  per i leucociti nel Laboratorio di Patologia Clinica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli.

Ciascun preparato è stato diviso in aliquote per le procedure sperimentali previste: analisi dei fattori solubili, effetto sulla crescita di condrociti e cellule sinoviali, ed effetto del congelamento sul rilascio dei fattori di crescita e sul metabolismo di condrociti e sinoviociti.



**Figura 2: Schema della raccolta di sangue dai donatori e preparazione dei due PRP**

### *Attivazione del PRP*

I campioni di ciascun gruppo sono stati attivati con 10% CaCl<sub>2</sub> ed incubate a 37°C per 7 giorni. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati centrifugati (15 minuti a 2800xg) e i sopranatanti contenenti i fattori rilasciati dai granuli piastrinici raccolti e conservati a -30°C fino alle analisi per le determinazioni immunologiche.

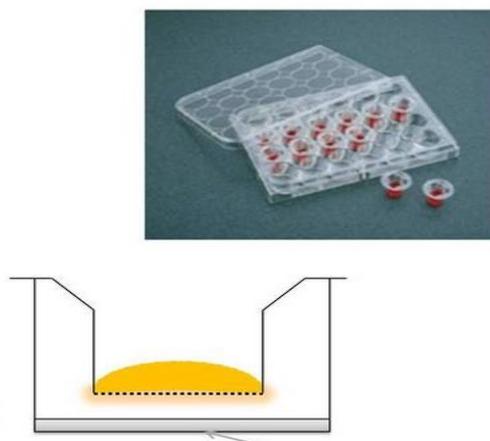
### *Rilascio dei fattori solubili*

I sopranatanti ottenuti in seguito all'attivazione del PPP, P-PRP, L-PRP fresco e congelato sono stati valutati per il rilascio di IL-1b, VEGF, TGF-b1, PDGF-AB/BB e FGF-b. I campioni in duplicato sono stati valutati simultaneamente avvalendosi del Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad Laboratories) [41]. Tale sistema consente l'analisi quantitativa simultanea di diversi fattori in un unico pozzetto di una micropiastra e utilizza differenti "set" di biglie ciascuno con uno

specifico codice-colore. Ogni “set” di biglie è coniugato ad un anticorpo specifico per un determinato fattore solubile. L’incubazione di biglie con diversa specificità con il campione di siero/plasma consentirà il legame delle molecole corrispondenti che verranno quantificate mediante l’uso di anticorpi secondari fluorescenti. L’identificazione del codice-colore della biglia (corrispondente ad una specifica molecola) e la quantificazione dell’intensità di fluorescenza (proporzionale alla quantità di molecola nel campione) sono state effettuate utilizzando un sistema di analisi a due laser.

#### *Isolamento delle cellule - Condrociti*

Per l’isolamento dei condrociti [42] i campioni di cartilagine articolare sono stati ottenuti da 4 pazienti con OA, prelevati a seguito di protesi di ginocchio, con un grado di Kellgren-Lawrence II-III. La cartilagine, dopo essere stata sminuzzata, è stata trattata mediante digestioni enzimatiche successive: 30 minuti a 37°C in 1 mg/ml di ialuronidasi (10ml/gr di cartilagine) (Sigma) 1h a 37°C con 5 mg/ml di pronasi (10ml/gr di cartilagine) (Sigma) e 1 h circa con 2 mg/ml di collagenasi (20ml/gr di cartilagine) (Sigma). L’azione della collagenasi è stata quindi bloccata mediante l’aggiunta di terreno Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) contenente il 10% di siero bovino fetale (FBS) (Biological Industries). I condrociti così ottenuti sono stati contati (mediante colorazione vitale con eosina), seminati in fiasca ed espansi in coltura. Al passaggio 3 le cellule sono state staccate e seminate in piastre da 12 pozzetti alla densità di 250.000 cellule/pozzetto e tenute in coltura in DMEM privo di FBS per 24 ore a 37°C per permettere alle cellule di aderire. Per evitare il contatto diretto tra condrociti e gel piastrinico è stato utilizzato un dispositivo Transwell (Costar). Successivamente le cellule sono state coltivate, per 7 giorni, in terreno DMEM senza FBS con l’aggiunta rispettivamente di L-PRP, P-PRP e PPP alle concentrazioni del 5, 10 e 20%. I PRP ed il PPP sono stati precedentemente attivati, mediante l’aggiunta del 10% di calcio cloruro e posti nelle transwell (Figura 3).



**Figura 3: Rappresentazione dell’allestimento delle colture in vitro**

### *Isolamento delle cellule - Sinoviociti*

I campioni di tessuto sinoviale sono stati ottenuti da pazienti con OA (n = 3 Kellegren-Lawrence grado II-III) sottoposti ad intervento di artroprotesi di ginocchio. I sinoviociti sono stati isolati secondo il seguente protocollo: il tessuto sinoviale è stato lavato due volte in tampone fosfato (PBS) e sezionato in piccoli frammenti. Successivamente, sono stati eseguiti due trattamenti enzimatici consecutivi: il primo con 0,1% tripsina in PBS a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub> per 30 minuti, il secondo con 0,1% di collagenasi P a 37 ° C per 1 ora in rotazione costante. La sospensione cellulare è stata quindi filtrata e centrifugata a 500 g per 10 min. Le cellule sono state risospese e mantenute in coltura in terreno OptiMEM con 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml streptomicina in atmosfera umidificata a 37 °C con 5% di CO<sub>2</sub>. Tutte le valutazioni sono state eseguite su cellule ottenute tra il terzo e il quinto passaggio.

I sinoviociti sono stati seminati ad una densità di 40000-500000 cellule per cm<sup>2</sup> e mantenuti con terreno privo di siero per 24 ore. Successivamente, il terreno di coltura è stato addizionato con 5%, 10% o 20% (vol/vol) di PRP ottenuto in base alle due diverse tecniche di preparazione (L-PRP e P-PRP) e di PPP, precedentemente attivato con 10% di cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub> 22,8 mM concentrazione finale). Parallelamente sono state allestite colture di controllo mantenute in terreno con o senza siero fetale bovino (FCS) al 10%. Il periodo di studio è stato di sette giorni e durante questo tempo il mezzo di coltura non è stata cambiato. Per evitare il contatto diretto tra sinoviociti e gel piastrinico è stato utilizzato un dispositivo Transwell (Costar).

Dopo 7 giorni di coltura, i surnatanti sono stati raccolti e conservati a -80° C, i condrociti ed i sinoviociti sono stati sottoposti alle procedure di estrazione dell'RNA con Trizol (Invitrogen) per l'analisi dell'espressione genica.

### *Proliferazione*

La vitalità e la proliferazione cellulare, in presenza di L-PRP fresco, P-PRP e PPP sono state valutate a 0,3,7 giorni mediante il test Alamar Blue (MABAs) [43]. L'Alamar blue è un indicatore redox fluorimetrico/colorimetrico che viene internalizzato dalle cellule e convertito dalla forma ossidata non fluorescente/blu a quella ridotta fluorescente/rossa. La sua riduzione è indice dell'attività metabolica ed è correlabile con il numero di cellule. I sinoviociti ed i condrociti sono stati incubati con una soluzione di Alamar Blue al 10% in terreno DMEM ed incubati per tre ore a 37°C. Terminata l'incubazione, è stata valutata la fluorescenza dei campioni tramite lettura fluorimetrica (CytoFluor<sup>TM</sup> 2350, Millipore, Bedford, MA) alle seguenti lunghezze d'onda: eccitazione 490 nm, emissione 540 nm. I risultati ottenuti sono stati espressi come percentuale della riduzione di Alamar Blue.

### *Valutazione dell'espressione genica di condrociti e sinoviociti*

Per quanto riguarda l'espressione genica, sono stati valutati il collagene di tipo II, Aggrecano, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ), VEGF, FGF- $\beta$ , HGF, TGF- $\beta$ , Hyaluronic Acid Synthase-2 (HAS-2), Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1 (TIMP-1), and Matrix Metalloproteinases-13 (MMP-13).

Mentre, nei sinoviociti è stata analizzata l'espressione di IL1beta, IL6, IL8/CXCL8, IL 10, IL 13, TNF alpha, IL-10, IL-4, IL-13, HGF, VEGF, FGF-2, TGF beta, MMP13, TIMP1, TIMP3, TIMP4, e infine le sintasi dell'acido ialuronico HAS-1,2,3. In entrambe le popolazioni cellulari l'analisi è stata effettuata dopo trattamento per 7 giorni di coltura con le differenti concentrazioni di L-PRP, P-PRP e PPP.

A tal fine, l'RNA è stato estratto dalle cellule utilizzando il lisante TRIzol (Invitrogen, Life Technologies). Successivamente i campioni sono stati trattati con cloroformio ed isopropanolo, in modo da purificare l'RNA dal DNA e dalle proteine, l'RNA è stato quindi retrotrascritto a cDNA utilizzando SuperScript First-Strand kit (Invitrogen) e la procedura di Real-Time PCR è stata effettuata utilizzando lo strumento "LightCycler" (Roche) ed il SYBRGreen come sonda fluorescente. I valori soglia sono stati determinati per ogni campione; la specificità degli amplificati è stata confermata da analisi delle curve di melting. I dati ottenuti con la Real-Time PCR sono stati analizzati utilizzando il metodo di quantificazione descritto da Livak et al. [40]. La normalizzazione dei risultati è avvenuta sulla base dei livelli di glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) considerato come gene di riferimento costitutivamente espresso.

### *Misurazione dei livelli di HA*

I livelli di HA nei surnatanti delle cellule sono stati valutati utilizzando un kit commerciale DuoSet ELISA (R&D Systems). È stata creata una curva con 6 punti standard utilizzando triplici diluizioni seriali ed uno standard di 90000 ng/mL. La precisione dei metodi è stata verificata analizzando l'accordo tra i valori attesi e misurati di Bland-Altman (ogni differenza tra le misure ripetute e valori attesi non supera il 95% intervallo di confidenza). L'affidabilità del test è stata stimata con il coefficiente alfa di Cronbach (0.99). In questo saggio è possibile rilevare l'acido ialuronico a basso (15-40 kDa), medio (75-350 kDa) e alto peso molecolare (950 kDa). Questi risultati sono stati normalizzati per il numero di cellulare e sono espressi in ng/106 condrociti e sinoviociti.

### *Analisi dell'effetto del congelamento sulle caratteristiche del PRP e sulle abilità di indurre effetti in colture di condrociti e sinoviociti*

Una parte di L-PRP è stata utilizzata per valutare l'effetto del congelamento/scongelamento (2 ore a -30°). L-PRP fresco e congelato è stato caratterizzato per il rilascio di IL-1 $\beta$ , HGF, PDGF AB / BB, TGF- $\beta$ 1, e VEGF a 1 ora e 7 giorni dopo l'attivazione. Parallelamente è stato aggiunto ai terreni di coltura di condrociti e sinoviociti, valutando a 7 giorni, la proliferazione, l'espressione genica, e livelli di proteine secrete.

### *Analisi statistica*

I dati riguardanti la caratterizzazione delle preparazioni di PRP sono state analizzate con il test di Friedman per paragoni multipli di dati accoppiati e quando necessaria, applicando la correzione post hoc di Bonferroni (valori di  $p < 0,017$  sono stati considerati significativi).

I risultati ottenuti dalle valutazioni dei fattori solubili sono stati elaborati in base al General Linear Model (GLM). Dal momento che i dati hanno mostrato di seguire una distribuzione asimmetrica, sono stati normalizzati mediante trasformazione logaritmica. Tutti i dati così trasformati sono risultati normalmente distribuiti, come verificato dal test di Kolmogorov Smirnov.

Il GLM è stato applicato considerando il tipo di preparazione (PPP, P-PRP, L-PRP) e la loro associazione co-variata come variabili fisse ed i volontari come effetto random e in caso di risultato significativo è stata eseguita la correzione Sidak post-hoc per confronti multipli.  $\eta^2$  parziale è stato considerato come indicatore della forza dell'associazione tra gli effetti fissi e la concentrazione dei fattori solubili.

## **Risultati**

### *Caratterizzazione dei PRP*

In Tabella 3 e Tabella 4 sono riportati i valori delle concentrazioni di piastrine e leucociti nei differenti preparati.

**Tabella 3: Concentrazione piastrine e leucociti nei differenti preparati utilizzati per l'analisi dei condrociti, media dei 10 volontari**

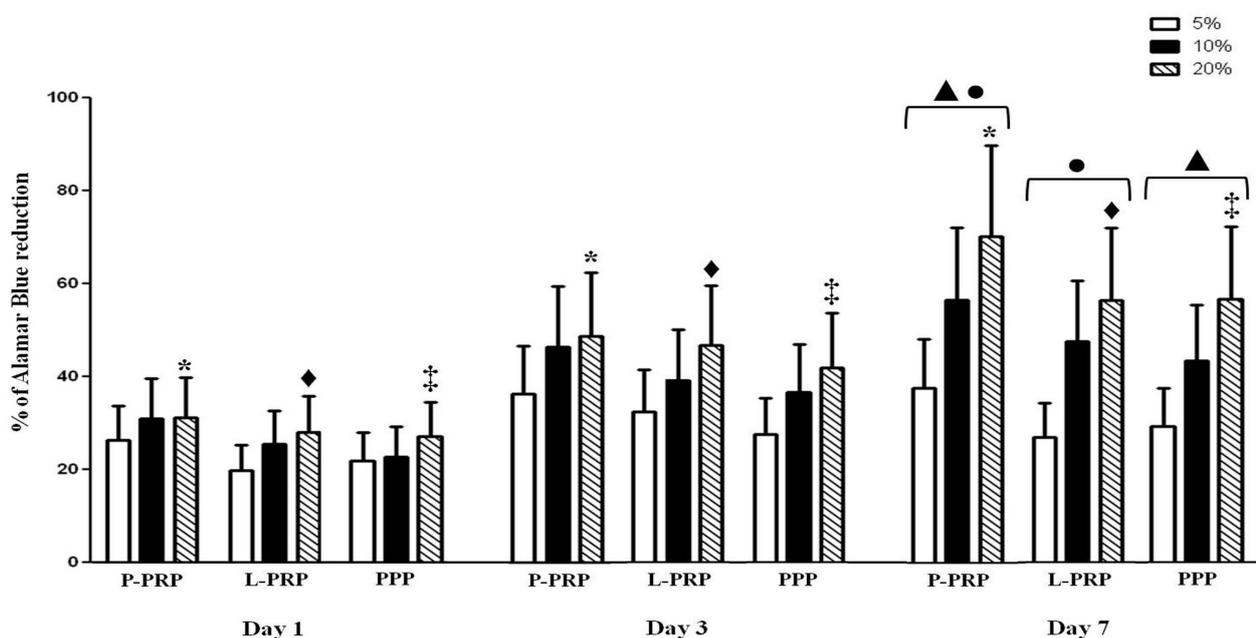
	PPP	P-PRP	L-PRP
Piastrine/mm3	6.000	194.000	929.000
Leucociti/mm3	0	<200	5.500

**Tabella 4: Concentrazione piastrine e leucociti nei differenti preparati per l'analisi dei sinoviociti, media dei 7 volontari**

	PPP	P-PRP	L-PRP
Piastrine/mm3	9.000	158.000	963.000
Leucociti/mm3	0	<200	5.400

### *Proliferazione dei condrociti*

I risultati della proliferazione cellulare su condrociti stimolati con tre differenti concentrazioni di PRP e PPP sono riportati in Figura 4. In quest'ultima si può notare un aumento, dose dipendente, della proliferazione cellulare a partire dal giorno 3 fino al giorno 7. Questo aumento risulta essere però statisticamente significativo solo per le dosi più alte del giorno 7 rispetto sia ai giorni 1 e 3 ( $p < 0.05$ ). Per quanto riguarda gli effetti dei due tipi di PRP (L-PRP e P-PRP) e del PPP sui condrociti, questi non hanno mostrato delle differenze nei primi giorni di colture, mentre a 7 giorni il P-PRP risulta stimolare molto la proliferazione rispetto agli altri due trattamenti ( $p < 0.05$ ).



**Figura 4: Proliferazione espressa come % di riduzione dell'Alamar blue di condrociti umani cresciuti in presenza di P-PRP e L-PRP. I dati sono espressi come media e deviazione standard**

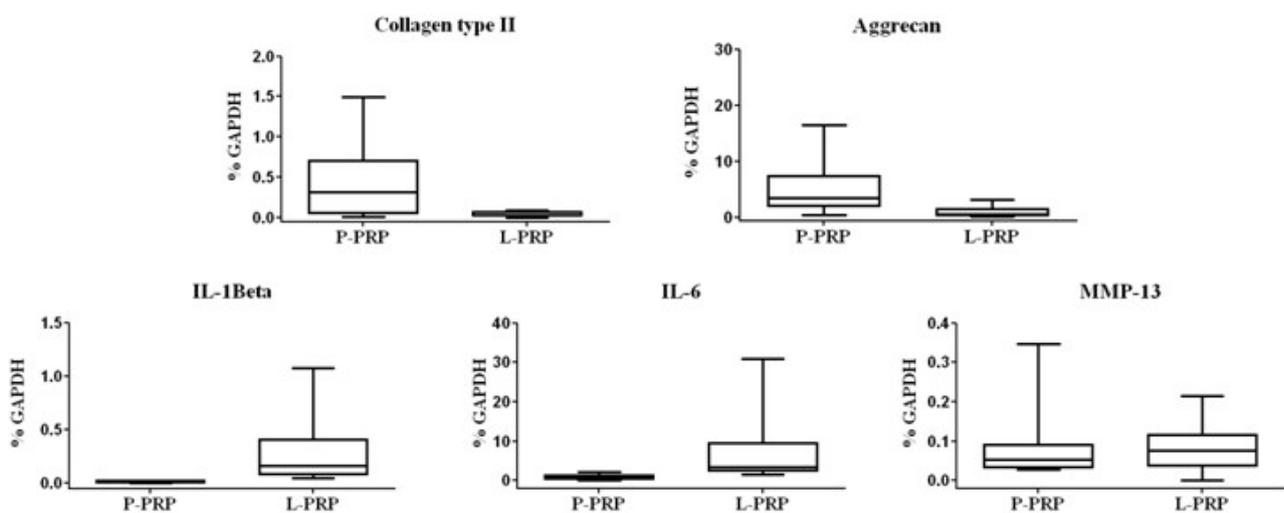
### *Proliferazione dei sinoviociti*

In presenza di L-PRP, P-PRP e PPP la cinetica di proliferazione dei sinoviociti appare sovrapponibile, infatti non sono emerse differenze statisticamente significative in corrispondenza dei diversi tempi sperimentali considerati.

### *Espressione genica nei condrociti*

Per valutare gli effetti dei differenti trattamenti sulle cellule sono stati analizzati, mediante Real-time PCR, alcuni geni coinvolti nell'omeostasi cartilaginea. In generale, non si sono osservati degli effetti dose-dipendenti. Al contrario i diversi tipi di PRP (L-PRP e P-PRP) ed il PPP stimolano in modo differente l'espressione genica, come mostrato in Figura 5. Per quanto riguarda i markers

cartilaginei quali collagene II ed aggregano, i loro livelli sono più alti nelle cellule trattate con P-PRP rispetto a quelle stimulate con L-PRP e PPP ( $p < 0.05$ ). Un andamento differente è stato osservato per i geni infiammatori; in particolare IL-1 $\beta$  e IL-6 sono molto espressi in condrociti cresciuti in presenza di L-PRP ( $p < 0.05$ ), al contrario i valori di IL-8 e TNF- $\alpha$  tendono ad essere più elevati nelle cellule trattate con P-PRP e PPP. I livelli genici dei fattori di crescita VEGF e FGF- $\beta$  sono notevolmente indotti dalla presenza di L-PRP ( $p < 0.05$ ), mentre l'espressione dell'HGF è stimolata principalmente dal P-PRP ( $p < 0.05$ ) (Figura 5). Il TGF- $\beta$  e l'MMP-13, al contrario, sono espressi in modo simile con tutti e tre i tipi di trattamenti; per quanto riguarda i livelli del gene HAS-2, questi sono indotti dalla presenza del L-PRP, così come i geni TIMP-1 e IL-10 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 5: Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard.**

#### *Secrezione di Acido ialuronico dai condrociti*

La presenza dell'HA nei sovranatanti delle cellule coltivate a 7 giorni in presenza del 5%, 10%, o 20% P-PRP, L-PRP, o PPP è mostrata in Figura 6. L'aggiunta del 10% e del 20% di ciascuna formulazione produce un effetto significativamente maggiore rispetto al 5% ( $p < 0,05$ ). L-PRP induce una secrezione notevolmente maggiore rispetto all'acido ialuronico rispetto al P-PRP e PPP ( $p < 0.05$ ).

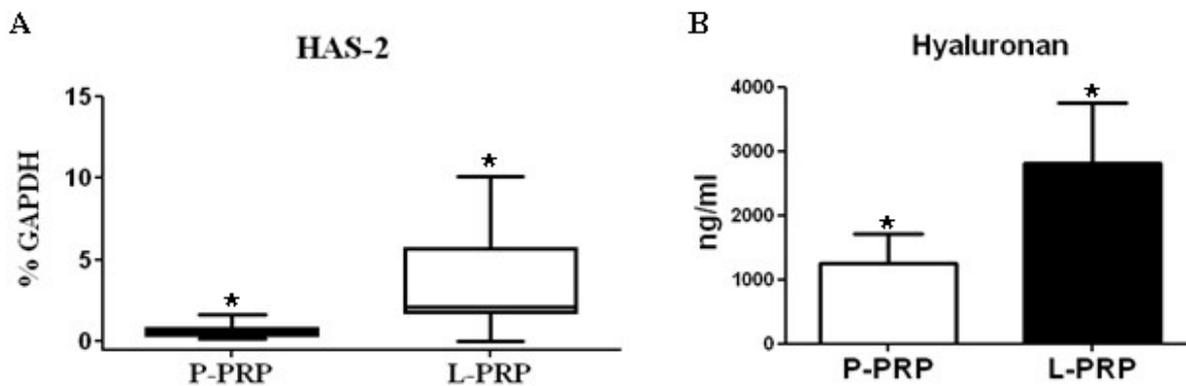


Figura 6: Livelli di acido ialuronico nel terreno di coltura dei condrociti in presenza dei 3 differenti preparati a 7 giorni. I dati sono espressi come media e deviazione standard.

### Espressione genica nei sinoviociti

In presenza di L-PRP, l'espressione genica di IL-1 beta e IL-8 appare significativamente più alta rispetto a quanto evidenziato in presenza di P-PRP ( $p < 0.0001$ ) e PPP ( $< 0.001$ ) (Figura 7). Inoltre, considerando l'associazione dose-trattamento per quanto riguarda l'espressione genica dell'IL-1 beta l'andamento incrementale della curva dose-risposta relativo a L-PRP risulta differire in maniera significativa rispetto a quello corrispondente sia al P-PRP che al PPP ( $p < 0.01$ ). Per quanto riguarda invece l'espressione genica di TNF alpha e IL-6 le diverse preparazioni di PRP e il PPP inducono effetti assolutamente sovrapponibili.

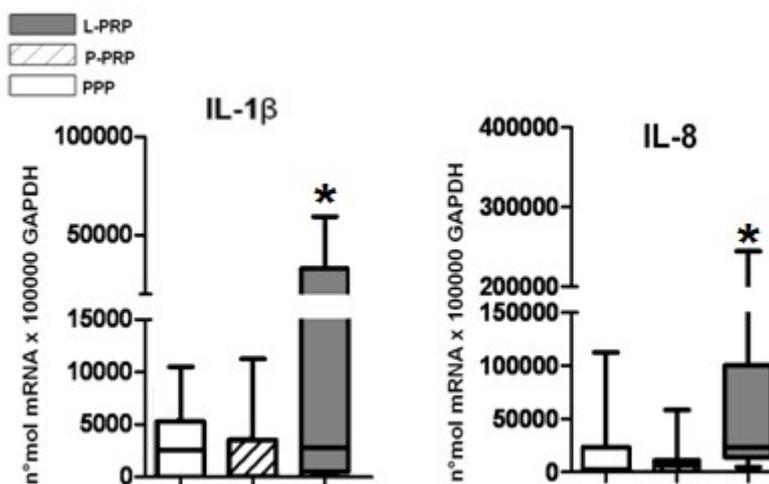
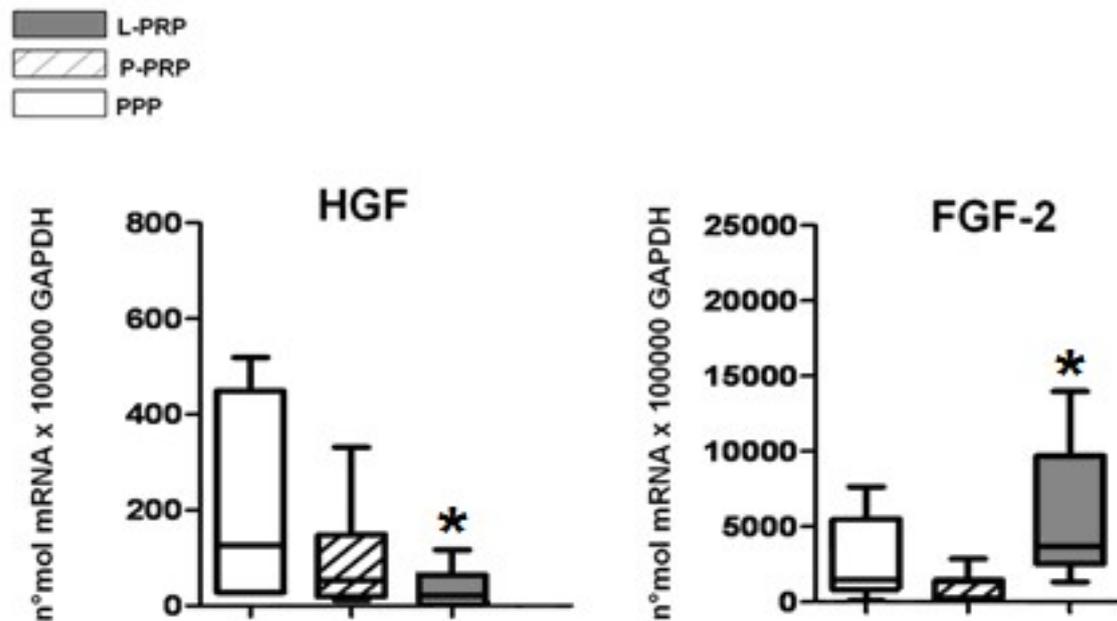


Figura 7: Espressione genica dei fattori pro-infiammatori in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole \*100,000 GAPDH.

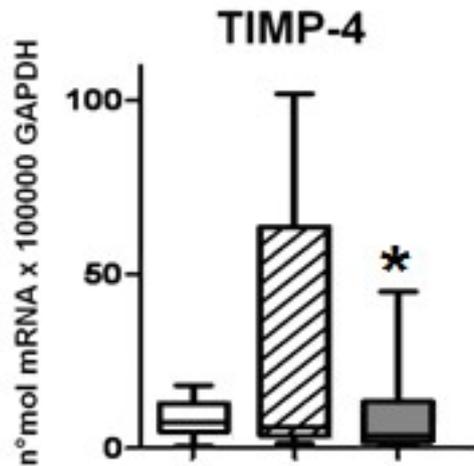
L'espressione genica di IL-4 e IL-13 risulta essere al di sotto della sensibilità metodologica, mentre l'espressione di IL-10 non è modulata in maniera differenziale dalle due diverse preparazioni di PRP e dal PPP.

Tra i fattori di crescita, VEGF e TGF beta non appaiono essere espressi in maniera differenziale in presenza di L-PRP e P-PRP, mentre HGF e FGF-2 risultano differentemente modulati da L-PRP rispetto a P-PRP. In particolare, in presenza di L-PRP l'espressione di HGF e FGF-2 risulta essere rispettivamente diminuita e aumentata in confronto a quanto sia stato rilevato in presenza di P-PRP (HGF:  $p < 0.001$ ; FGF-2:  $p < 0.05$ ) o PPP (HGF:  $p < 0.001$ ; FGF-2:  $p < 0.01$ ) (Figura 8). Inoltre, per quanto riguarda l'espressione di HGF è emerso un effetto dose-risposta inversamente proporzionale e statisticamente significativo (5% vs 20%  $p < 0.05$ ).



**Figura 8: Espressione genica dei fattori di crescita in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole \*100,000 GAPDH.**

L'espressione di MMP-13, uno dei più importanti enzimi di degradazione della matrice, appare inversamente correlata alle concentrazioni di PRP, indipendentemente dal tipo di preparazione (5% vs 10%:  $p < 0.05$ ; 5% vs 20%:  $p < 0.05$ ). Per quanto riguarda gli inibitori tissutali degli enzimi di degradazione della matrice, TIMP-1, TIMP-3, TIMP-4, solo il TIMP-4 appare essere differentemente modulato in presenza delle due diverse preparazioni di PRP, in particolare L-PRP determina una diminuzione statisticamente significativa dell'espressione di TIMP-4 rispetto a quanto evidenziato in presenza di P-PRP ( $p = 0.021$ ) (Figura 9).



**Figura 9: Espressione genica di TIMP-4 in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati.**  
**I dati sono espressi per numero di molecole \*100,000 GAPDH.**

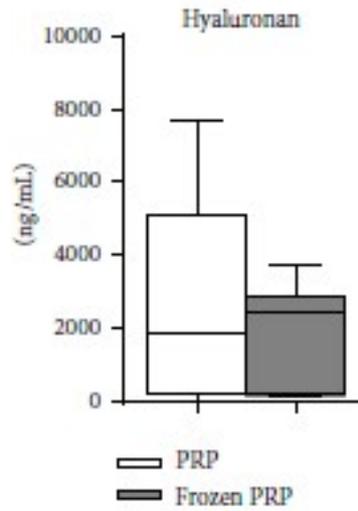
*Effetto del congelamento sulle proprietà biologiche del PRP*

I risultati hanno mostrato che nel PRP congelato il rilascio immediato dei fattori era simile o di poco inferiore a quello del PRP fresco. Le concentrazioni di TGF- $\beta$ 1 e PDGF AB/BB sono risultate significativamente ridotte dopo il congelamento sia a 1 ora sia a 7 giorni, mentre la concentrazione di HGF era significativamente più bassa nel PRP congelato a 7 giorni. Nel PRP fresco, le concentrazioni di IL-1 $\beta$  e HGF subito un significativo ulteriore aumento dopo 7 giorni.

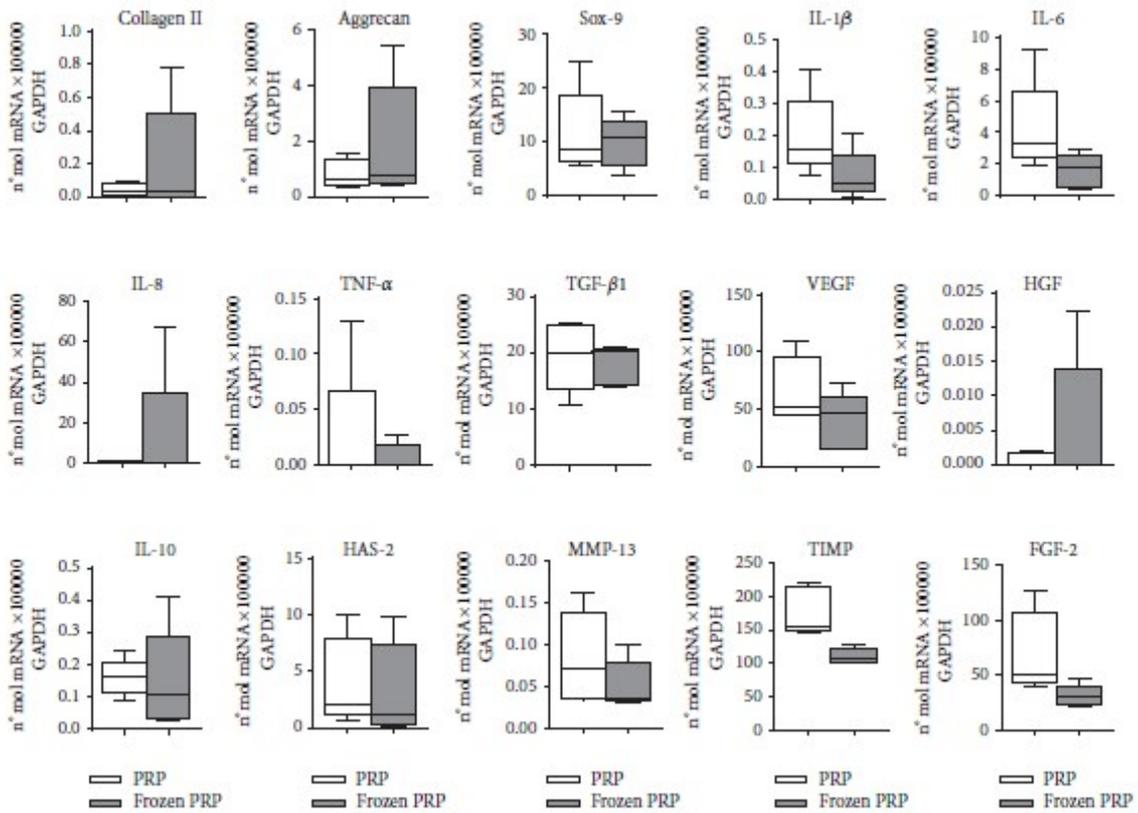
**Tabella 5: Concentrazione dei fattori solubili nel L-PRP fresco e congelato a 1 ora e a 7 giorni dall'attivazione**

Fattori	Campione	1 ora	7 giorni	Significatività
<b>IL-1b</b>	PRP	1,015	70,11	p<0,01
	PRP congelato	1,22	14,43	NS
	p value	NS	NS	
<b>PDGF AB/BB</b>	PRP	107861,6	103553,4	NS
	PRP congelato	33849,8	52511,5	NS
	p value	p<0,005	p<0,01	
<b>VEGF</b>	PRP	27714,68	31670,63	NS
	PRP congelato	17388,90	6035,78	NS
	p value	p<0,01	p<0,01	
<b>HGF</b>	PRP	247,20	380,89	p<0,01
	PRP congelato	253,68	212,77	NS
	p value	NS	p<0,01	

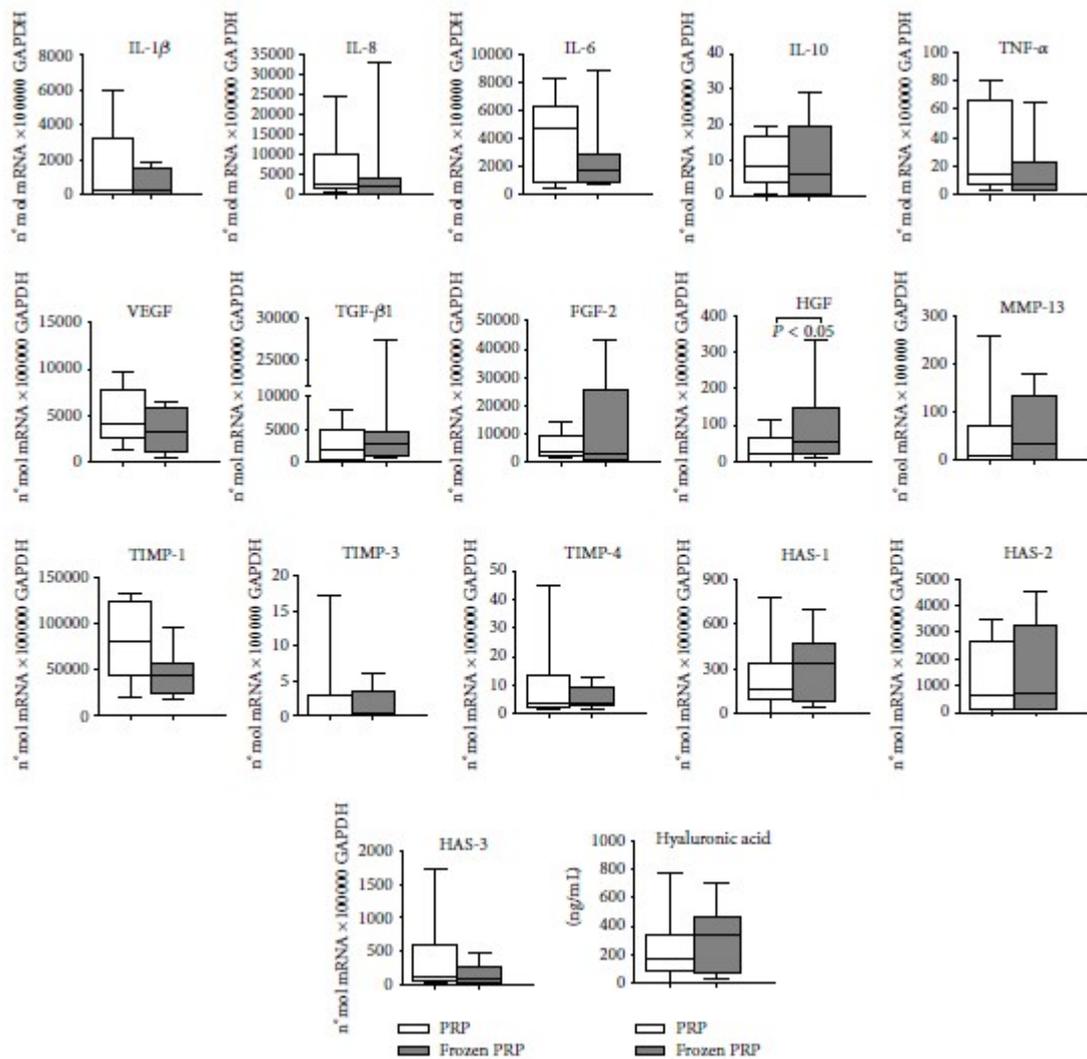
Per quanto riguarda la secrezione di acido ialuronico nei condrociti e l'espressione genica (Figura 10 e Figura 11) coltivati con entrambi i preparati sono stati riscontrati livelli di espressione simili, mentre nei sinoviociti l'espressione di HGF è stata maggiore nel PRP congelato (Figura 12).



**Figura 10:** Livelli di acido ialuronico nel terreno di coltura dei condrociti in presenza del 10% di PRP fresco o congelato a 7 giorni. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014)



**Figura 11:** Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014)



**Figura 12: Espressione dell'mRNA in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati.**

**I dati sono espressi per numero di molecole \*100,000 GAPDH. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014)**

## Discussione

I risultati di questo studio dimostrano che L-PRP e P-PRP inducono effetti differenti su colture di condrociti e sinoviociti in vitro, probabilmente a causa della differente composizione dei preparati in termini di piastrine, contenuto di leucociti, fattori di crescita ed altre molecole bio-attive. Per quanto riguarda la proliferazione, l'unica differenza si riscontra nei condrociti, in cui l'aggiunta dei PRP a differenti concentrazioni è in grado di indurre un effetto dose-dipendente, che al giorno 7 risulta statisticamente maggiore nei condrociti trattati con P-PRP. Nell'analisi dell'espressione genica non è stata riscontrata nessuna relazione dose-dipendente per tutte le formulazioni considerate. Nonostante ciò, nei condrociti i campioni incubati con P-PRP mostrano un'espressione elevata dei geni coinvolti nelle reazioni anaboliche, come collagene di tipo II, aggrecani e HGF. Molto interessanti sono i risultati nei sinoviociti, il cui il P-PRP induce un effetto simile al PPP, probabilmente dovuto alla bassa concentrazione piastrinica, che potrebbe non essere sufficiente per

sostenere una modulazione rilevante nei 7 giorni. Inoltre, la presenza delle proteine plasmatiche e fattori di crescita nel PPP potrebbero indurre l'espressione di marcatori condrogenici. Infatti, studi in vitro hanno dimostrato che il plasma contiene almeno 200 proteine coinvolte nell'omeostasi e nella guarigione dei tessuti [45].

Al contrario, L-PRP induce meccanismi differenti coinvolgendo vie anaboliche e cataboliche: nei condrociti è in grado di regolare positivamente l'espressione di IL-1b, IL-6, VEGF, FGF-2. Contemporaneamente è in grado di sostenere elevati livelli di espressione del gene HAS-2 in accordo con gli alti livelli di acido ialuronico secreto stimolati dallo stesso preparato.

Similmente, nei sinoviociti è in grado di regolare positivamente l'espressione di fattori pro-infiammatori come IL-1b, IL-8/CXCL8 e FGF-b e negativamente TIMP-4 e HGF, ma non induce nessun effetto sulle HA sintasi. Da letteratura, FGF-2 e HGF sembrano esercitare effetti opposti sulla cartilagine affetta da OA: il primo ha un effetto catabolico e antianabolico, il secondo è noto per esercitare un effetto anti-infiammatorio regolando negativamente Nf-Kb [28]. Inoltre, una bassa espressione di TIMP-4 è stata trovata in presenza di L-PRP. IL-1b, IL-8/CXCL8 sono noti per il ruolo pro-infiammatorio nell'OA come riportato diffusamente in letteratura [46], e la loro elevata espressione potrebbe essere ricondotta agli elevati livelli di PDGF e TGF-b presenti nell'L-PRP. È stato infatti dimostrato in precedenti studi in vitro [47,48,49] che il PDGF e il TGF-b sono in grado di potenziare l'espressione di molecole pro-infiammatorie in colture di sinoviociti. Inoltre, dal momento che IL-1b è in grado di regolare la propria produzione e quella di IL-8, un'altra possibile spiegazione è negli elevati livelli di IL-1b presenti nel L-PRP, probabilmente dovuti alla concentrazione maggiore dei leucociti rispetto al P-PRP. L'effetto esercitato dai PRP sull'espressione delle sintasi dell'HA nei sinoviociti, in contrasto con quanto fino ad ora riportato in letteratura [50], che riporta una regolazione positiva della produzione di acido ialuronico indotta dal PRP. La ragione di questi risultati discordanti potrebbero risiedere nei tempi sperimentali scelti: infatti mentre Anitua et al. [47] ha osservato questo effetto a 72 ore, i risultati di questo studio sono stati valutati a 7 giorni per riprodurre lo schema di applicazione clinica, e in questo tempo sperimentale l'effetto del PRP sull'HA potrebbe non essere più visibile. Queste due preparazioni di PRP sono state paragonate anche in uno studio clinico pubblicato nel 2012 [51], in cui la presenza dei leucociti non sembra influenzarne l'efficacia terapeutica nel trattamento delle patologie degenerative della cartilagine, anche se eventi avversi minori sono stati registrati più frequentemente nei pazienti trattati con L-PRP.

Per quanto riguarda l'effetto del congelamento, i risultati dimostrano che nel preparato congelato il rilascio di fattori a 1 ora e 7 è significativamente differente; mentre per quanto riguarda il rilascio del TGF-b e PDGF AB/BB risulta simile o leggermente inferiore al L-PRP fresco. Una situazione differente è stata descritta per l'HGF, che mostra una concentrazione simile in entrambi i PRP

fresco e congelato a 1 h, ma a 7 giorni ne sono stati osservati elevati livelli elevati nel preparato fresco rispetto a quello congelato. Tale condizione può essere correlata alle lesioni da congelamento [52] che rendono le piastrine meno sensibili all'azione degli agenti aggreganti. Particolarmente interessante è il caso dell'IL-1b, il cui rilascio immediato non differisce significativamente tra i due preparati, ma, al tempo sperimentale 7 giorni, il PRP congelato mostra una concentrazione minore di IL-1b rispetto al PRP fresco (14,4pg/mL vs 70,1pg/mL rispettivamente anche se non statisticamente significativa) e l'aumento di IL-1b da 1h a 7 giorni è stato osservato solo nel PRP fresco. La spiegazione di questi livelli ridotti di IL-1b nel preparato congelato risiede nel fatto che le procedure di congelamento e scongelamento potrebbero portare alla distruzione dei leucociti, diminuendo così il rilascio della citochina.

Un altro aspetto chiave che emerge dai risultati è la cinetica di rilascio dei fattori di crescita: dati di letteratura dimostrano come il rilascio della maggior parte dei fattori dalle piastrine avvenga poco dopo l'attivazione arrivando ad una concentrazione di 3/5 volte superiore rispetto al valore basale [53]. I dati di questo studio mostrano una possibile deviazione da questa cinetica di rilascio nel preparato congelato, che mostra nessuna differenza significativa ad 1h e 7 giorni, suggerendo quindi un rilascio costante di fattori nel tempo (piuttosto che un picco precoce con decremento a 7 giorni). Inoltre, nel PRP fresco vengono rilasciate molte più molecole sia ad 1h sia a 7 giorni, ed entrambi IL-1b e HGF mostrano un incremento a 7 giorni rispetto a 1h.

Nonostante le differenze osservate nel rilascio dei fattori, entrambi i PRP fresco e congelato hanno indotto in maniera simile proliferazione cellulare e produzione di componenti della matrice sia in condrociti che sinoviociti. Similmente l'analisi dell'espressione genica ha indicato che il preparato congelato non perde o riduce la propria abilità di stimolare l'anabolismo dei condrociti.

Nei sinoviociti, entrambe le preparazioni inducono effetti simili nell'espressione di fattori pro/anti infiammatori e anticatabolici, mentre un'elevata espressione di HGF è stata associata all'incubazione con il PRP congelato. Dal momento che la letteratura dimostra che IL-1b inibisce la produzione sinoviale di HGF [50] e che bassi livelli di IL-1b sono stati trovati nel PRP congelato, l'elevata espressione di HGF nei sinoviociti potrebbe essere dovuta alla riduzione dell'effetto inibitore di IL-1b. Come già precedentemente riportato, HGF è un noto fattore anti-infiammatorio [28] e dal momento che l'infiammazione sinoviale gioca un ruolo critico nei sintomi e nella progressione dell'OA, i livelli elevati di HGF potrebbero rappresentare un svolgere un ruolo chiave da indagare in maniera più approfondita nella terapia con il PRP.

Da un punto di vista clinico, questi risultati suggeriscono in primo luogo che il congelamento dei concentrati piastrinici sia una opzione valida e sicura, in grado di preservare in maniera sufficientemente buona la qualità dei fattori contenuti e l'abilità nell'indurre proliferazione cellulare e produzione dei componenti della matrice, in secondo luogo può semplificare la gestione dei

pazienti sottoposti a cicli multipli di infiltrazioni di PRP, permettendo un prelievo di sangue unico e quindi meno disagio per il paziente.

# **Analisi dell'influenza della metodologia di attivazione sul rilascio delle molecole dalle piastrine**

## **Studio in vitro**

### **Obiettivo**

Tra le tante variabili che influiscono sul rilascio dei fattori di crescita dal PRP, l'attivazione delle piastrine è un elemento chiave che influenza la disponibilità delle molecole e quindi la rigenerazione del tessuto.

Il termine attivazione è legato a 2 processi chiave che avvengono durante la preparazione del PRP: a) la degranolazione delle piastrine per permettere il rilascio dei fattori di crescita dagli  $\alpha$ -granuli e 2) il taglio proteolitico del fibrinogeno come evento iniziale del processo di coagulazione per permettere la formazione del gel piastrinico e confinare pertanto la secrezione delle molecole al sito designato [37]. Uno step di attivazione è incluso nella maggioranza dei protocolli terapeutici, comunemente aggiungendo trombina e calcio cloruro da soli o in combinazione. Alcuni medici preferiscono iniettare il PRP nella sua forma "liquida", confidando nel contenuto di collagene del tessuto bersaglio per iniziare il processo di coagulazione [37]. Ma tutt'ora non è ancora chiaro quale sia il metodo di attivazione più idoneo.

Attualmente in letteratura non c'è nessuna evidenza sulla metodologia di attivazione più idonea, e la scelta della strategia si basa esclusivamente su ragioni pratiche piuttosto che supportate da studi in vitro che ne giustificano il razionale. Lo scopo di questo studio è quello quindi di paragonare differenti strategie di attivazione del PRP, valutando il rilascio dei fattori di crescita piastrinici in termini di concentrazione e cinetica. Verranno confrontati gli attivatori più comunemente utilizzati (calcio cloruro e trombina da soli ed in combinazione) e il collagene di tipo I al fine di mimare la condizione clinica in cui la sua presenza nei tessuti bersaglio può indurre l'attivazione piastrinica in situ [54].

### **Materiali e Metodi**

Il Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ha approvato il protocollo di studio e tutti i pazienti arruolati hanno firmato il consenso per la partecipazione. L'identità del donatore è stata mantenuta anonima e tutti i campioni usati sono stati codificati. IL PRP, PPP, e la trombina autologa sono stati ottenuti da 10 volontari maschi sani, senza patologie sistemiche, non fumatori, con valori di Hb > 11g/100ml e/o valori piastrinici > 150,000/mm<sup>3</sup> (mean age  $\pm$  DS: 28,3  $\pm$  3,5 anni), sottoposti ad un prelievo di sangue venoso periferico di 150 mL in un ambulatorio dedicato all'interno dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. È stato fatto divieto di assunzione di FANS nei 5 giorni

precedenti il prelievo ematico ed è stata vietata l'assunzione di latte e derivati la mattina del prelievo. I campioni di sangue sono stati portati presso il Laboratorio di Immunoreumatologia e rigenerazione tissutale e Laboratorio RAMSES per le successive analisi.

#### *Preparazione dei campioni*

Il PRP, PPP e la trombina autologa sono state ottenute mediante separazione (Angel, Cytomedix Inc., Gaithersburg, MD): 150 mL di sangue venoso periferico è stato prelevato da ciascun volontario e trasferito nella centrifuga Angel, dove è stato sottoposto a 2 centrifugazioni consecutive, una prima a 3500 rpm per 3 minuti e una seconda a 3000 rpm per 22 minuti. Il PRP è stato estratto dal buffy coat in una siringa sterile vuota. Il PPP è stato raccolto in un'altra sacca e trasferito in una siringa. La trombina autologa è stata preparata a partire dal PPP seguendo le istruzioni del dispositivo medico utilizzato.

La concentrazione delle piastrine e il numero delle cellule bianche del sangue di ogni preparato è stata analizzata in tutti i preparati e nel sangue periferico mediante un contatore automatico (Coulter LH 750 Haematology Analyzer Beckman Coulter SRL, Milano; linearità  $5-1000 \times 10^3$  uL for platelet count e  $0,1-100 \times 10^3$  uL per i globuli bianchi).

#### *Attivazione*

Il PRP è stato attivato con 10% di  $\text{CaCl}_2$  (concentrazione finale 22,8 mM), 10% di trombina autologa, 10% di  $\text{CaCl}_2$  combinato con trombina autologa oppure con 10% di collagene di tipo I (concentrazione finale 4 ug; Mascia Brunelli SpA, Milano). Il PRP non attivato e il PPP sono stati utilizzati come controllo. I campioni sono stati incubati per 15, 30 minuti, 1, 2, e 24 ore a 37°C e successivamente centrifugati a 2800xg per 15 minuti a 20°C, raccogliendo i supernatanti e conservandoli a -80°C fino all'utilizzo.

#### *Valutazione del rilascio dei fattori di crescita*

In questo studio abbiamo valutato 3 fattori di crescita scelti tra i più comunemente presenti nel PRP e coinvolti nel processo di rigenerazione tissutale (TGF- $\beta$ 1, PDGF AB, e VEGF) e due mediatori dell'infiammazione (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). Il PRP attivato con le differenti metodiche e il PPP sono stati valutati per il rilascio di VEGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN). I campioni sono stati scongelati a 4°C e centrifugati prima dell'analisi; successivamente sono stati valutati in duplicato utilizzando un saggio immunologico enzimatico quantitativo. I risultati sono stati espressi in pg/mL.

#### *Analisi statistica*

Tutti i dati normalmente distribuiti sono stati espressi in termini di media e deviazione standard; la mediana è stata utilizzata per i dati non normalmente distribuiti. Il test Kolmogorov Smirnov è stato utilizzato per testare la normalità delle variabili continue. L'area sotto la curva di rilascio ai tempi sperimentali è stata calcolata per ogni metodo di attivazione per quantificare la quantità e la cinetica di rilascio delle molecole. Il General Linear Model per misure ripetute con il test di Sidak per paragoni multipli è stato utilizzato per verificare le differenze ai diversi tempi sperimentali in ogni metodo di attivazione. IL GLM per misure ripetute è stato anche utilizzato per verificare l'influenza dei differenti metodi di attivazione. Per tutti i test,  $p < 0,05$  è considerata significativa. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con SPSS v. 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## Risultati

### *Concentrazione piastrinica e numero di globuli bianchi*

Il numero medio di piastrine per millimetro cubo è  $215,7 \pm 76,3$  per il sangue periferico,  $23,7 \pm 13,6$  per il PPP e  $974,7 \pm 353,2$  per il PRP. La concentrazione media dei globuli bianchi per millimetro cubo è  $5,4 \pm 0,8$  per il sangue periferico,  $0,1 \pm 0,0$  per il PPP e  $19,7 \pm 6,4$  per il PRP.

### *Formazione del coagulo*

Gli attivatori utilizzati hanno indotto un differente grado di aggregazione piastrinica. In particolare i campioni di PRP attivati con  $\text{CaCl}_2$ , trombina e  $\text{CaCl}_2$ /trombina hanno formato un coagulo visibile entro i primi 15 minuti e persistente fino alle 24 ore: nei campioni attivati con trombina e  $\text{CaCl}_2$ /trombina il coagulo è risultato stabile già dai 15 minuti, mentre nell'attivazione con  $\text{CaCl}_2$  il coagulo raggiunge la stabilità ai 30 minuti. Nei campioni attivati con il collagene non si evidenzia la presenza del coagulo in nessuno dei tempi sperimentali osservati.



Figura 13: Formazione del coagulo a 24 ore nei differenti gruppi di attivazione

### Rilascio di fattori di crescita e citochine

Non sono stati rilevati livelli di IL-1b e TNF-a nei campioni in nessuno dei tempi sperimentali. Livelli significativamente bassi di fattori di crescita sono stati trovati nel PPP e nel PRP non attivato rispetto ai campioni attivati ( $p < 0,05$ ). Gli effetti delle differenti metodologie di attivazione su rilascio e cinetica sono mostrate in Figura 14.

### Cinetica di rilascio dei fattori di crescita

Per quanto riguarda IL-1b e TNF-a, non sono stati trovati valori rilevanti di tali molecole in nessuno dei tempi sperimentali e in nessuno dei campioni analizzati. Livelli minori di molecole rilasciate sono state trovate nel PPP e nel PRP non attivato rispetto al PRP attivato ( $p < 0,05$ ). Gli effetti dei diversi metodi di attivazione sul rilascio delle molecole dal PRP sono mostrati in Figura 14, e in tabella 8 sono riportate le significatività.

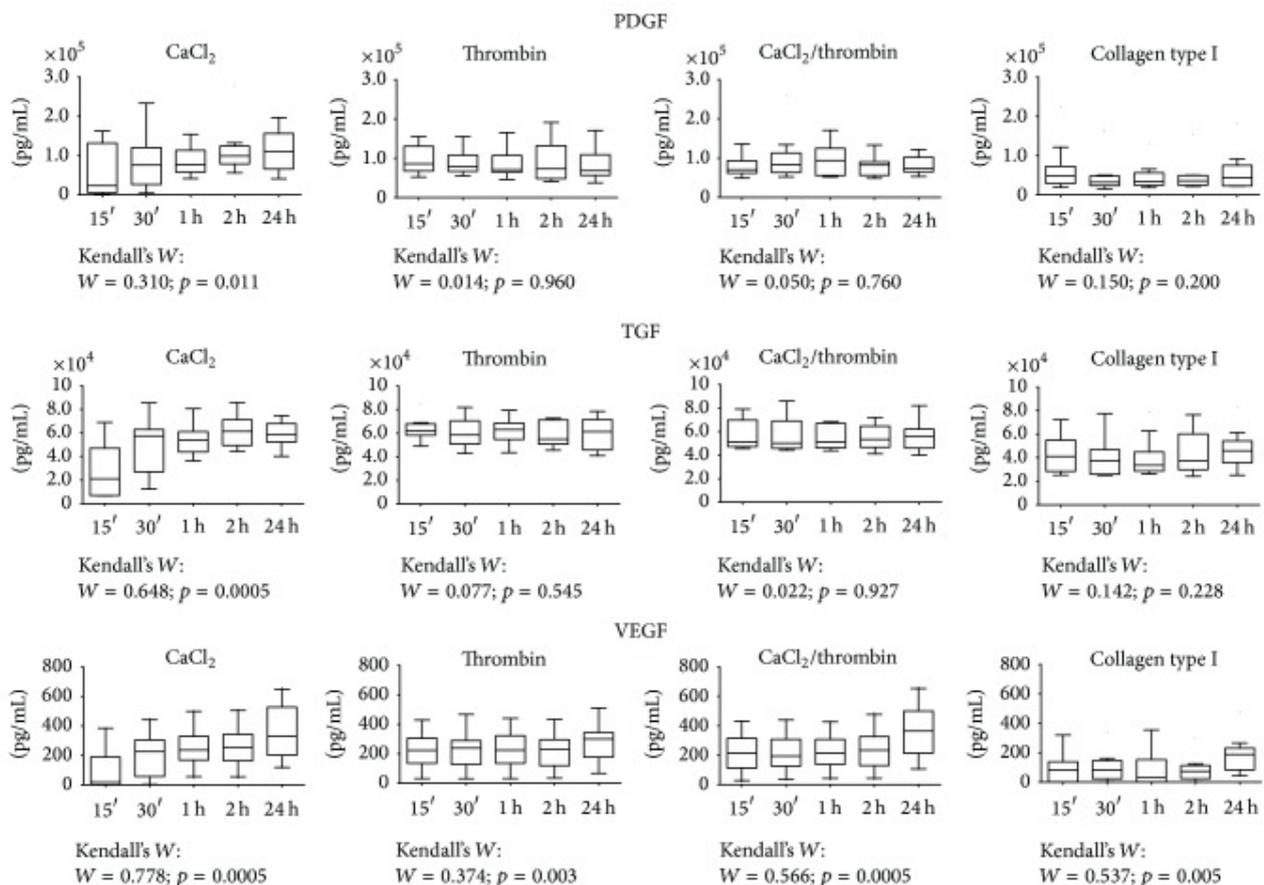


Figura 14: Cinetica di rilascio dei fattori di crescita nei campioni attivati secondo protocollo. (Cavallo et al.

Biomed Res Int 2016)

**Tabella 6: Differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra attivatori per rilascio dei fattori di crescita nei tempi sperimentali osservati (in grassetto sono evidenziati gli attivatori che determinano i valori più elevati in termini di rilascio)**

Fattori di Crescita	Tempo sperimentale	Comparazione
PDGF	15 minuti	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
	30 minuti	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
	2 ore	Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	24 ore	CaCl <sub>2</sub> vs Thr
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		CaCl <sub>2</sub> vs Col I
TGF-b1	15 minuti	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	30 minuti	Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	1 ora	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	2 ore	Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
CaCl <sub>2</sub> vs Col I		
24 ore	Thr vs Col I	
	Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I	
	CaCl <sub>2</sub> vs Col I	
VEGF	15 minuti	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	30 minuti	Thr vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
	1 ora	Thr/CaCl <sub>2</sub> vs CaCl <sub>2</sub>
		Thr vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		CaCl <sub>2</sub> vs Col I
2 ore	Thr vs Col I	
	Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I	
	CaCl <sub>2</sub> vs Col I	
24 ore	Thr vs Col I	
	Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Col I	

		CaCl <sub>2</sub> vs Col I
		Thr/CaCl <sub>2</sub> vs Thr

## Discussione

Il principale risultato di questo studio è che la modalità di attivazione influenza la formazione del coagulo, portando a differenze in termini di concentrazione e rilascio nel tempo dei fattori piastrinici. L'attivazione del PRP con il collagene di tipo I non porta al medesimo rilascio delle molecole rispetto agli altri attivatori: infatti i dati raccolti dimostrano una minore concentrazione di TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB e VEGF. Per quanto riguarda le cinetiche di rilascio, la trombina da sola o la combinazione trombina/CaCl<sub>2</sub> e il collagene di tipo I presentano cinetiche simili, seppur con quantità differenti: infatti stimolano un rapido rilascio dei fattori che rimangono stabili fino a 24 ore, risultati in linea con quanto riporta Fufa [55], il quale dimostra che trombina e collagene di tipo I stimolano un immediato rilascio dei fattori che rimane stabile fino a 10 giorni. Al contrario il CaCl<sub>2</sub> mostra un graduale rilascio nel tempo, con valori iniziali bassi seguiti da un progressivo aumento dei fattori arrivando a livelli simili o leggermente superiori agli altri attivatori.

Da un punto di vista clinico è un importante concetto da tenere in mente quando bisogna scegliere la tipologia di attivatore, in quanto i fattori di crescita sono molecole potentissime ed una minima variazione della loro concentrazione potrebbero interferire con i processi di guarigione del tessuto [56,57]. Infatti, se una bassa concentrazione di fattori potrebbe non essere sufficiente ad innescare un processo rigenerativo, al contrario un'elevata quantità potrebbe avere un effetto inibitorio [58,59,60]. Inoltre, una rapida attivazione potrebbe essere associata ad una diminuzione della disponibilità dei fattori di crescita nel tempo [61]. I fattori di crescita hanno una breve emivita (da minuti a ore) e se non sono utilizzati entro un tempo limitato dal rilascio, potrebbero essere degradati prima che nuovi recettori diventino disponibili [62,63].

Un altro importante aspetto è la forma fisica in cui si presentano i concentrati piastrinici, che può variare da quella liquida a quella di un gel solido, permettendo quindi sia l'applicazione chirurgica che quella minimamente invasiva dell'infiltrazione. Lo studio sottolinea come i differenti attivatori influenzino l'aggregazione piastrinica in maniera differente: in particolare, l'utilizzo del CaCl<sub>2</sub> induce la formazione del coagulo entro 30 minuti dall'aggiunta, mentre la trombina da sola o in combinazione con CaCl<sub>2</sub> provoca una più rapida formazione del coagulo, che si può notare già a 15 minuti. Al contrario, il collagene di tipo I induce una minore aggregazione, infatti non è possibile notare il coagulo in nessuno dei tempi sperimentali. Questo risultato è parzialmente in contrasto con quanto riportato da Fufa [55], il quale descrive la formazione del coagulo in seguito ad attivazione con il collagene (sebbene meno reattivo rispetto a quello indotto dalla trombina). Probabilmente la differenza risiede nelle differenti condizioni sperimentali e nella diversa composizione del PRP. Sebbene la mancanza del coagulo non rappresenti un problema nel momento in cui si va a trattare

un'osteartrosi, in cui il PRP liquido permette di raggiungere tutti i tessuti bersaglio, la forma liquida potrebbe impedire altre tipologie di applicazione [20]. Questo è il caso delle iniezioni intratendinee, in cui la permanenza del PRP nella forma liquida può causare la dispersione dei fattori dal sito della lesione [54].

I risultati di questo studio confermano l'importanza del metodo utilizzato per l'attivazione del PRP, determinando sia la forma fisica sia la quantità dei fattori rilasciati. Non è solo il livello dei fattori di crescita infatti che determina la risposta del tessuto, ma anche l'abilità di agire sulla zona da trattare. Quindi la strategia di attivazione deve essere scelta non solo in base al tipo di applicazione clinica (iniettiva, a cielo aperto o artroscopica), ma anche in accordo con l'effetto biologico desiderato nel tessuto bersaglio. Studi futuri dovranno dimostrare se queste differenze nella modalità di attivazione si traducono in effetti diversi in colture cellulari.

# **II PARTE**

## **DALLA CLINICA ALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO”**

# La normativa sull'utilizzo degli emoderivati: dall'Europa all'Italia

## Indagine legislativa

### Obiettivo

Il recente interesse nell'utilizzo del PRP come trattamento infiltrativo ha portato ad una larga diffusione dell'utilizzo dei concentrati piastrinici. In questo contesto è interessante capire come viene regolato da un punto di vista normativo l'utilizzo del sangue autologo ai fini topici. Dal momento che il PRP è un derivato ematico, i concentrati piastrinici sono strettamente regolati in Europa, per assicurare il controllo di tutti le fasi inerenti la preparazione, conservazione e perciò la sicurezza e la qualità di questi prodotti.

In collaborazione con un avvocato specializzato nella legislazione delle terapie biologiche applicate alla medicina, abbiamo delineato il quadro legislativo Europeo che regola l'utilizzo dei prodotti derivanti dalla manipolazione del sangue attraverso dispositivi medici. L'analisi non si focalizzerà sui dispositivi medici, regolati da un'altra direttiva Europea (93/42), che ha differenti categorie di rischio e richiede pertanto un sistema normativo particolare.

### Il quadro normativo in Europa

Attualmente in Europa, il quadro normativo che regola l'utilizzo del sangue è disciplinato dalla Direttiva 2002/98/EC del Consiglio e Parlamento Europeo, 27 Gennaio 2003, che sancisce le regole di qualità e sicurezza per il prelievo, il controllo, il processamento, la conservazione e la distribuzione del sangue umano e dei suoi componenti. Ogni nazione all'interno della Comunità Europea recepisce tale direttiva con sistemi regolatori interni.

I punti salienti della Direttiva 2002/98/EC assicurano un elevato livello di protezione della salute umana, e i principi fondamentali sono riassunti di seguito:

- *Licenze per i centri ematologici.* Gli stati membri devono assicurare che l'attività riguardante la raccolta del campione ematico e il suo controllo sia espletata solamente da centri ematologici che abbiano ottenuto un'autorizzazione, accreditamento o licenza a questo scopo da un'autorità appropriata, riconosciuta da ogni stato membro secondo il proprio piano normativo istituzionale.
- *Ruolo del Responsabile del Servizio Trasfusionale.* Il capo del servizio trasfusionale, sotto la propria responsabilità, dovrà assicurare che ciascuna unità di sangue o prodotto del sangue abbia le qualificazioni richieste, per qualsiasi uso, sia raccolto e controllato e se destinato

alla trasfusione, sia processato, conservato, distribuito e assegnato in accordo con il regolamento vigente.

- *Staff qualificato.* Lo staff che partecipa nelle fasi di prelievo, controllo, processamento, conservazione, distribuzione e assegnazione del sangue umano e dei suoi componenti deve avere la qualifica richiesta per queste mansioni dalla normativa vigente, ricevendo un adeguato addestramento professionale periodicamente aggiornato.
- *Sistema di gestione della qualità.* Gli stati membri devono adottare le misure necessarie affinché il servizio trasfusionale e le unità di raccolta mettano in atto e mantengano un sistema di gestione della qualità basato sui principi della buona pratica clinica e in accordo con le leggi nazionali.
- *Utilizzo di un sistema penale rigoroso* per interrompere servizi di trasfusione non autorizzati.

### **La posizione della Commissione Europea**

Nell'Ottobre del 2012 a Bruxelles si è svolto il Meeting delle Autorità competenti in materia di sangue e suoi componenti (11-12 Ottobre 2012 Bruxelles, quello che viene riportato deriva dal Report successivo al meeting). Riguardo al PRP la Commissione, a seguito di consultazione con il servizio legale SANCO (Direttore generale per la salute e la protezione dei consumatori), dichiarò che questa procedura sarebbe dovuta ricadere nell'ambito delle direttive sul trattamento del sangue, sebbene le autorità nazionali competenti abbiano sottolineato come possa risultare difficile allineare tali procedure con la direttiva 2002.

Il servizio legale SANCO ritiene che queste procedure saranno in futuro oggetto di unificazione delle regolamentazioni da parte dell'Unione Europea. Questa posizione è stata confermata nel Meeting delle Autorità competenti in materia di sangue e suoi componenti di Aprile 2013 (Bruxelles) ed è oggetto di uno dei punti dell'ordine del giorno annuale delle autorità Europei competenti in materia di organi e tessuti.

### **La normativa in Italia**

Da un punto di vista legale, il termine “topico” è equivalente al termine “non-infusione” e indica tutte le applicazioni terapeutiche nelle quali i componenti ematici non sono stati oggetto di trasfusione al paziente ma utilizzati direttamente nella zona patologica attraverso molteplici modi (iniezione intra-articolare, per via cutanea, sub cutanea, ...).

*Emocomponenti, non emoderivati*

Un grande vantaggio di queste procedure è quello di ottenere i prodotti finali, attraverso prelievi minimi di sangue dal paziente. Pertanto la preparazione dei concentrati piastrinici non è considerata come la produzione di emoderivati, ma come un frazionamento del sangue stesso.

A seguito di autorizzazioni da autorità competenti, è tecnicamente possibile per un chirurgo ortopedico preparare i concentrati piastrinici, utilizzando macchinari appropriati, a circuito chiuso o molto più comunemente in ambiente asettico, con marchio CE, che sono in grado di centrifugare/filtrare il sangue raccolto e separare completamente il plasma ricco di piastrine per l'utilizzo terapeutico.

#### *Sicurezza, Utilizzo, Preparazione (Minima manipolazione)*

La minima manipolazione si riferisce ai componenti del sangue che non interagiscono con ulteriori farmaci o sostanze e vengono preparati in tempi ragionevolmente veloci. Dal momento che si tratta di donatori autologhi l'unico rischio sono le cattive pratiche nel sistema di preparazione. In questo caso i componenti del sangue avranno un'indicazione di trattamento topica e perciò sotto la classificazione infusione.

I concentrati piastrinici possono essere ottenuti con semplici metodiche (centrifugazione, separazione). La manipolazione in questione può essere quindi considerata minima (anche nell'ipotesi in cui non vi è un semplice centrifugazione del sangue autologo ma la formazione di un gel aggiungendo un opportuno agonista o per mezzo fisico).

Queste manipolazioni non producono alcuna proliferazione cellulare poiché le piastrine sono elementi cellulari senza nucleo, che rilasciano citochine in seguito a cambiamento conformazionale in tutte le procedure di aferesi.

I prodotti in questione sono prodotti del sangue. Il Comitato per le Terapie Avanzate (CAT) riunitosi il 13 Novembre 2009, identificò i "trombociti freschi o congelati isolati da sangue autologo o allogeneico" come "prodotti per la guarigione dei tessuti in ortopedia e chirurgia dentale", classificandoli come terapie non avanzate.

#### *Aspetti operativi: il Sistema delle autorizzazioni*

La manipolazione del sangue è per legge (219/2005) limitata ai servizi di trasfusionali. I servizi di trasfusione sono strutture pubbliche accreditate, normalmente identificate negli ospedali, che sono responsabili di tutte le attività concernenti la raccolta, lo stoccaggio, il trasporto, e l'assegnazione del sangue e dei suoi componenti. Tuttavia, è stato riconosciuto, da un punto di vista giuridico, che il servizio fornito dai centri trasfusionali può essere esteso anche alla preparazione ambulatoriale "a distanza" di componenti del sangue autologo per uso topico mediante accordi che prevedono i seguenti punti:

- Il servizio mantiene il controllo sull'elaborazione remota di componenti del sangue, tra cui la tracciabilità, e cioè la registrazione della procedura.
- Medici e/o chirurghi di fornire al paziente un trattamento terapeutico efficace e rapido con i vantaggi logistici (senza bisogno di pre-donazione, prodotto fresco, e non congelati, ridotta la raccolta di sangue).

L'accordo tra i medici e le strutture trasfusionali permette al medico la preparazione in ambulatorio di emocomponenti ad uso topico sotto il controllo del Servizio Trasfusionale competente: qualsiasi manipolazione del sangue e componenti senza la prevista autorizzazione costituisce un'azione criminale.

### **Discussione**

In Europa l'utilizzo dei concentrati piastrinici è regolato da una direttiva unica ma in ogni paese la via "legale" per utilizzarla dipende dal protocollo e quindi la normativa finisce per essere eterogenea e spesso complessa, talvolta necessitando di una specifica autorizzazione di altre figure mediche coinvolte nelle fasi di processazione oltre al chirurgo, come ad esempio servizi di trasfusione. Questi requisiti rendono difficile per i medici in alcuni paesi l'utilizzo del PRP nelle pratiche cliniche. La mancanza di omogeneità nel panorama legale Europeo porterà la Comunità Europea nel prossimo futuro ad intervenire per uniformare le regole di utilizzo di questa particolare classe di biomateriali. In altri paesi europei, in alcuni casi, i componenti del sangue sono considerati come prodotti sanguigni o, in altri casi, come farmaci. Tuttavia, a seconda della quantità, l'elaborazione e il protocollo clinico, in alcuni casi, possono essere utilizzati in modo meno restrittivo, sotto il controllo del medico. A differenza della situazione italiana, i medici sottoporranno il protocollo alle autorità competenti del rispettivo paese per ricevere consigli su come utilizzare i componenti del sangue specifici e per determinare se l'autorizzazione è necessaria o se la terapia può essere eseguita liberamente sotto il controllo e la responsabilità del medico.

# **Analisi dei dati relativi all'applicazione clinica del PRP**

## **Studio clinico randomizzato, in doppio cieco, PRP vs Acido Ialuronico: risultati preliminari**

### **Obiettivo**

L'utilizzo del PRP per accelerare la guarigione clinica dei tessuti è ampiamente descritto in letteratura [20]. In particolare dagli studi sino ad ora disponibili è emerso come il gruppo di pazienti con migliore risposta clinica sia quello dei soggetti di giovane età con grado lieve di degenerazione articolare: in tale specifica fascia di pazienti il trattamento con fattori di crescita di derivazione piastrinica potrebbe determinare risultati superiori a quelli di altri trattamenti conservativi comunemente utilizzati in pratica clinica [39]. Ad oggi tuttavia non esiste alcun lavoro di alta qualità metodologica che permetta di asserire con certezza e fondatezza statistica tale indicazione nell'applicazione del PRP. Scopo di tale studio è di valutare l'efficacia della terapia infiltrativa del concentrato autologo di piastrine nel trattare lesioni degenerative cartilaginee di grado lieve-moderato (vedi criteri di inclusione) e di comparare l'outcome clinico con quello di un farmaco già ampiamente utilizzato in commercio (HA ad alto peso molecolare).

### **Materiali e Metodi**

Il Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli ha approvato il protocollo di studio e tutti i pazienti arruolati hanno firmato il consenso per la partecipazione allo studio. Ogni paziente oggetto di studio è stato inserito nella lista di randomizzazione ottenuta con l'aiuto di un esperto statistico, e per garantire la doppia cecità, la lista è stata conservata presso un ufficio dedicato, contattato telefonicamente dal medico addetto al trattamento per la comunicazione del gruppo assegnato (PRP o HA) solo al momento della prima infiltrazione di ogni paziente.

Tutti i pazienti, adeguatamente edotti riguardo la tipologia dello studio (randomizzato in doppio cieco) e le relative condizioni di adesione, si sono recati la mattina presso il Servizio di Medicina Trasfusionale. In tale sede l'ematologo, in assenza di controindicazioni, ha eseguito il prelievo ematico di 150 ml, da cui è stato ottenuto il PRP, successivamente conservato mediante congelamento presso lo stesso Servizio. Ad una settimana dal prelievo ematico i pazienti si sono presentati presso la I Clinica Ortopedica Traumatologica per eseguire la visita basale e le opportune misurazioni previste dal protocollo, nonché per la prima infiltrazione intra-articolare al ginocchio di PRP o di HA. Dopo l'infiltrazione il paziente è stato medicato e tenuto in osservazione per il tempo sufficiente ad escludere complicazioni immediate. La procedura infiltrativa è stata ripetuta settimanalmente per i successivi 14 giorni, per terminare il ciclo di 3 infiltrazioni come da

protocollo. In concomitanza con le infiltrazioni di PRP, nei pazienti che presentavano versamento articolare, appena prima dell'iniezione è stato prelevato un piccolo campione di liquido sinoviale (1 ml). Al tempo stesso è stato prelevato un campione di sangue periferico, raccolto in una provetta con citrato di sodio. Il plasma ottenuto mediante centrifugazione è stato diviso in aliquote. Sia il liquido sinoviale che il plasma sono stati congelati a  $-30^{\circ}$  C fino al momento della valutazione descritta nel capitolo successivo. Terminato il ciclo infiltrativo, il paziente è stato sottoposto, come da protocollo, a visite di follow-up programmate a 2, 6 e 12 mesi dall'ultima infiltrazione per la valutazione degli esiti della terapia mediante opportuni score di valutazione. La valutazione clinica dei pazienti a livello basale e nei successivi controlli è stata effettuata da personale medico non a conoscenza della sostanza infiltrata, così da garantire il doppio cieco dello studio. In concomitanza delle visite di follow-up a 2, 6 e 12 mesi, al paziente è stato prelevato un campione di sangue periferico, raccolto in una provetta con citrato di sodio e, se possibile, di liquido sinoviale. Il plasma ottenuto mediante centrifugazione è stato diviso in aliquote e congelato a  $-30^{\circ}$  C.

In questo lavoro di tesi verranno analizzati l'outcome clinico dei pazienti arrivati a f-up di 6 e 12 mesi dopo l'ultima infiltrazione e i dati relativi all'analisi del liquido sinoviale e plasma a 2,6, e 12 mesi di f-up.

### *Selezione dei pazienti*

I criteri di inclusione allo studio sono stati i seguenti: età tra i 18 e 60 anni; lesioni monolaterali; segni e sintomi di patologia degenerativa della cartilagine del ginocchio (dolore o gonfiore da almeno 4 mesi); imaging positiva per lieve patologia degenerativa articolare del ginocchio o artrosi lieve (radiografie o RMN con grado da 0 a II della classificazione di Kellgren-Lawrence).

I criteri di esclusione sono stati i seguenti: malattie ematologiche (coagulopatie); pazienti in terapia con anticoagulanti-antiaggreganti; malattie cardiovascolari importanti (stenosi aortica, angina instabile); diabete mellito; stato di immunodepressione; malattie neoplastiche in atto; malattie dismetaboliche; malattie infiammatorie sistemiche in atto (non si considerano controindicazioni assolute gli esiti stabilizzati di tali patologie); assunzione di FANS nei 5 giorni precedenti la donazione di sangue; pazienti che con valori di Hb  $<11$  g/dl e di piastrine  $<150.000$ /mmc; disturbi mentali o psichiatrici che possano precludere la possibilità di aderire correttamente al protocollo.

I pazienti sono stati divisi, in base alla lista di randomizzazione, in due gruppi omogenei: a metà dei pazienti (gruppo controllo) è stato somministrato HA ad alto peso molecolare (Hyalubrix®, peso molecolare maggiore di 1500 KDa); l'altra metà (gruppo di studio) è stata trattata con PRP.

### *Valutazione pazienti*

I pazienti arruolati sono stati sottoposti a valutazione basale prima del trattamento e prospetticamente a 6 e 12 mesi di follow-up. Per la valutazione clinica sono stati utilizzati una serie di indici internazionali:

- International Knee Documentation Committee (IKDC): sviluppato e pubblicato nel 1993, ed è definito come un questionario specifico per l'articolazione del ginocchio per la misurazione dei sintomi, funzionalità ed attività sportive ed ha il vantaggio di poter essere utilizzato per differenti patologie articolari.
- Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS): è un questionario che deriva dal WOMAC, focalizzato per pazienti sportive giovani e di mezza età che necessitano di particolari attenzioni nella valutazione post trattamento.
- Tegner Score: per valutare il livello dell'attività sportive e dell'attività giornaliera.

## Risultati

Sono stati arruolati in tutto 180 pazienti, di cui 145 arrivati a 12 mesi di follow-up. L'analisi è stata condotta infine su 111 pazienti (58 PRP e 53 HA), poiché 3 pazienti (1 PRP e 2 HA), al termine del ciclo infiltrativo, hanno continuato a manifestare intenso dolore e deficit funzionale, tale da richiedere un ulteriore trattamento e 4 non hanno completato il ciclo di infiltrazioni e 27 drop out (non sono più tornati a controllo). Nel gruppo di pazienti trattati con PRP sono stati valutati 58 pazienti, di cui 44 maschi e 14 femmine, con età media di  $43,6 \pm 9,2$  anni. Per quanto concerne il gruppo trattato con HA, sono stati valutati 53 pazienti (29 maschi e 24 femmine) di età media  $49,5 \pm 7,1$  anni. Il Body Mass Index (BMI) medio per gruppo è  $25,27 \pm 3,9$  nel gruppo del PRP e  $26,2 \pm 4,8$  nel gruppo dell'HA. Si tratta di pazienti con quadro degenerativo lieve con Kellgren omogeneo inferiore a II. In Tabella 7 sono riportati i valori medi per gruppo ai differenti follow up e le significatività.

**Tabella 7: Punteggi degli score utilizzati nei pazienti trattati con PRP e HA.**

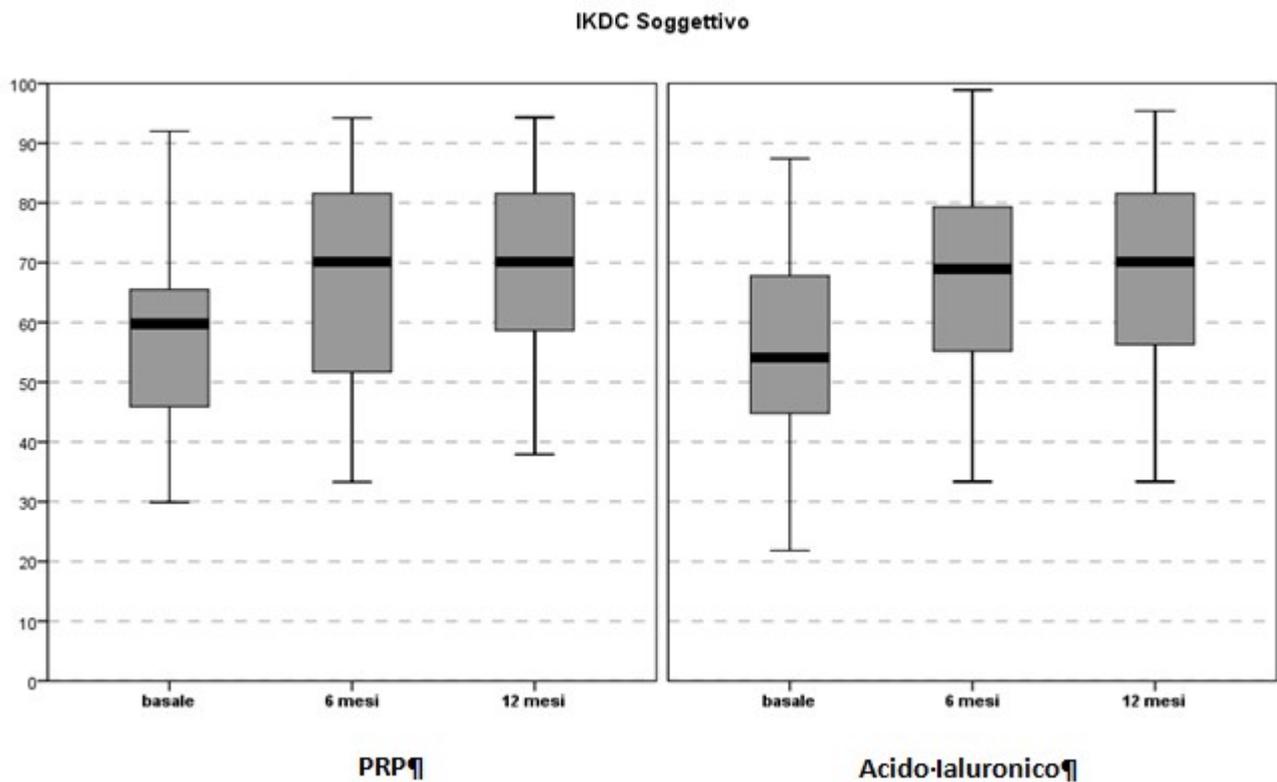
**I dati sono espressi come media e deviazione standard.**

Score	Trattamento	Valore basale	Valore a 6 mesi	Valore a 12 mesi	Significatività
IKDC sogg	PRP	$57,81 \pm 13,9$	$68,2 \pm 16,3$	$69,2 \pm 14,8$	Basale vs 6 e 12 mesi ( $p < 0,05$ )
	HA	$55,7 \pm 14,8$	$68,06 \pm 16,003$	$68,3 \pm 17,3$	
TEGNER	PRP	$3,3 \pm 1,2$	$4,2 \pm 1,6$	$4,2 \pm 1,4$	
	HA	$3,04 \pm 1,4$	$3,66 \pm 1,6$	$3,85 \pm 1,6$	
KOOS dolore	PRP	$71,09 \pm 17,8$	$78,81 \pm 18,1$	$79,71 \pm 17,4$	
	HA	$68,20 \pm 16,1$	$80,31 \pm 15,1$	$81,64 \pm 16,22$	
KOOS sintomi	PRP	$69,58 \pm 17,1$	$77,2 \pm 16,2$	$76,48 \pm 16,2$	
	HA	$67,66 \pm 15,7$	$77,9 \pm 15,7$	$80,6 \pm 14,2$	
KOOS ADL	PRP	$78,35 \pm 15,7$	$84,4 \pm 18,6$	$84,07 \pm 18,7$	
	HA	$75,73 \pm 16,7$	$85,02 \pm 14,9$	$86,1 \pm 15,2$	
KOOS	PRP	$44,67 \pm 27,4$	$56,48 \pm 28,6$	$55,62 \pm 25,7$	

<b>Recupero Sport</b>	HA	39,9 ± 25,7	52,17 ± 25,4	56,23 ± 29,1
<b>KOOS</b>	PRP	35,24 ± 19,4	49,19 ± 23,5	50,56 ± 23,5
<b>Qualità della vita</b>	HA	41,7 ± 20,1	56,22 ± 21,4	58,8 ± 22,7

Tra gli eventi avversi minori sono da riportare quelli a breve termine: in particolare si è registrato il dolore e il gonfiore nel ginocchio trattato nei giorni immediatamente successivi all'infiltrazione. Comparando i due trattamenti, in base ai dati forniti, possiamo concludere che, nel periodo post-infiltrativo, il trattamento con PRP ha causato dolore in misura significativamente maggiore rispetto a quello con HA. Questa sintomatologia è risultata comunque auto-limitantesi nel tempo, senza sequele nel lungo termine.

I risultati finali su 111 pazienti evidenziano un significativo miglioramento nella funzionalità del ginocchio e nella riduzione dei sintomi a 6 e 12 mesi di follow-up, senza differenze significative tra i due trattamenti (PRP vs. HA), Tabella 7. Nessuna differenza significativa è stata inoltre identificata nell'analisi tra gruppi a nessun follow-up ed in nessuno degli score clinici utilizzati.



**Figura 15: Rappresentazione grafica del miglioramento dello score IKDC soggettivo nei due gruppi di trattamento**

## Discussione

I risultati di questo studio clinico randomizzato, in doppio cieco non mostrano nessun beneficio additivo delle infiltrazioni di PRP rispetto all'HA nel trattamento dei pazienti giovani (entro i 60 anni di età) con OA lieve del ginocchio. I pazienti sono mantenuti in cieco rispetto al trattamento fino al controllo finale a 12 mesi, e il risultato clinico è stato analizzato mediante opportuni score

autosomministrati al paziente. Sebbene un miglioramento clinico sia stato osservato in seguito al trattamento a 6 mesi mantenuto stabile fino a 12 mesi, non è stata riscontrata nessuna differenza rispetto al trattamento con HA.

Questi risultati sono in accordo con quanto precedentemente pubblicato [39], in un RCT in cui gli effetti benefici del PRP rispetto all'HA su una popolazione di 192 pazienti con range di età dei pazienti arruolati molto ampio, includendo persone fino agli 80 anni, con conseguente ampio spettro di patologie cartilaginee trattate, dalla condropatia semplice all'artrosi conclamata. Infatti il PRP non può essere considerato come trattamento di prima linea per quei pazienti affetti da degenerazione della cartilagine articolare, anche da un punto di vista puramente logistico, limitando il suo impiego a pazienti che non hanno tratto beneficio da altri trattamenti conservativi. Inoltre possono essere sottolineati i seguenti aspetti: in primo luogo, i risultati confermano la sicurezza del PRP quale metodo terapeutico, come già riportato dagli altri studi precedentemente descritti [20]: non sono state riportate complicazioni maggiori quali infezioni, marcata atrofia muscolare, trombosi venosa profonda, febbre, ematomi, formazioni di aderenze, ipertrofia tissutale. Il trattamento con PRP inoltre non ha causato eventi di intolleranza in nessun paziente. Sono stati registrati degli eventi avversi minori nel breve termine: i pazienti hanno lamentato dolore e gonfiore in maniera moderata nei giorni successivi alle infiltrazioni, sintomatologia più accentuata nel gruppo del PRP rispetto al gruppo trattato con HA. Questo fatto è probabilmente legato alla presenza dei leucociti nel preparato piastrinico [22,37]. Comunque tali reazioni di dolore e gonfiore nel periodo immediatamente successivo all'infiltrazione intra-articolare non ha influito sui risultati a 12 mesi di follow-up [22].

L'analisi è stata condotta fino a 12 mesi dopo l'ultima infiltrazione, sono necessari quindi ulteriori studi per valutare se il PRP può portare a maggiori benefici rispetto HA a medio/lungo termine, valutando differenti aspetti, come score di out come clinico o il numero re-interventi rispetto ai pazienti trattati con HA.

# Analisi del liquido sinoviale e del plasma in pazienti trattati con PRP e Acido Ialuronico

## Studio in vitro

### Obiettivo

La presenza dei leucociti nei concentrati piastrinici è oggetto di forte dibattito nella comunità scientifica, con autori che ne supportano il potenziale anti-infettivo e altri che ne esasperano il contributo infiammatorio [37]. Lo scopo di questo studio è quindi quello di analizzare gli effetti locali e sistemici indotti da un PRP ricco in leucociti, attraverso una caratterizzazione del liquido sinoviale e del sangue periferico ottenuti da soggetti trattati per l'OA del ginocchio.

### Materiali e Metodi

Tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso scritto e il Comitato Etico locale ha approvato il protocollo di studio. L'identità del donatore è stata mantenuta anonima e tutti i campioni usati sono stati codificati. In questo studio sono stati analizzati campioni di liquido sinoviale e sangue periferico prelevati prima del trattamento, in corrispondenza di ciascuna infiltrazione e a 2, 6, 12 mesi dopo il trattamento di 36 pazienti dei 180 trattati per OA del ginocchio e descritti nel capitolo precedente.

#### *Determinazione del numero di piastrine e leucociti*

La conta di piastrine e leucociti è stata eseguita mediante un analizzatore automatico Coulter LH 750 (Beckman Coulter Inc. Miami, Fl, USA): linearità  $5-1000 \times 10^3/\mu\text{L}$  per la conta delle piastrine e  $0,1-100 \times 10^3/\mu\text{L}$  per la conta delle cellule bianche.

#### *Valutazione dei fattori solubili*

L-PRP, plasma e liquido sinoviale sono stati testati per la presenza di citochine pro- (IL-1b, IL-6,8,17) e anti-infiammatorie (IL-4,10,13), come pure di fattori di crescita (FGF-b, HGF, PDGF-AB/BB). Prima delle valutazioni, i campioni sono stati centrifugati per rimuovere eventuali detriti. La viscosità del liquido sinoviale è stata ridotta da trattamento con la ialuronidasi (Tipo IV-S, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) alla concentrazione di 20U/mL per 30 minuti a 37°C, seguita da centrifugazione. I campioni in duplicato sono stati valutati contemporaneamente utilizzando il kit di saggio immunologico Multiplex (Bio-rad Laboratories, CA, USA), descritto precedentemente.

### Analisi statistica

I valori sono riportati come mediana, range interquartili, media e deviazione standard. Differenze nella concentrazione di citochine nel tempo sono state analizzate utilizzando il test di Friedman-ANOVA. Differenze all'interno dei gruppi sono state analizzate tramite il test di Wilcoxon per valori appaiati; le differenze tra gruppi sono state analizzate con il test Mann-Whitney U test. Al fine di ottenere una potenza pari a 0.8 per il test di Wilcoxon per paragonare la differenza tra i valori IL-1b pre- e post- trattamento, con un valore basale di 0,22 pg/mL e una deviazione standard di 0,09 di variazione, il numero minimo di pazienti richiesto è di 13 sottoposti a trattamento con PRP. Il livello della significatività statistica è stato settato a  $p < 0,05$ . I dati sono stati analizzati utilizzando il software Statistica 6 (Stat.Soft. Inc., Tulsa, USA).

### Risultati

I pazienti da cui sono stati prelevati i campioni risultano omogenei per età, sesso e BMI. Il numero medio di piastrine nel campione L-PRP è  $1056 \times 10^3 / \mu\text{L}$  e il numero medio di leucociti  $8,8 \times 10^3 / \mu\text{L}$ . La caratterizzazione del contenuto di L-PRP e la concentrazione delle citochine nei campioni basali di plasma e liquido sinoviale sono riportata in dettaglio in Tabella 8 e Tabella 9 rispettivamente.

**Tabella 8: Concentrazione delle citochine nell'L-PRP (media)**

IL-1b	IL-6	IL-8	IL-17	IL-4	IL-10	IL-13
0,79	1,61	14,36	0,095	0,00	0,00	0,34

**Tabella 9: Concentrazione dei fattori di crescita nell'L-PRP (media)**

FGF-b	HGF	PDGF-AB/BB
0	399,20	11445,51

**Tabella 10: Valori basali della concentrazione di citochine in plasma e liquido sinoviale**

Citochine	Trattamento	Plasma vs Liquido Sinoviale
IL-1b	HA	$p=1,0000$
	L-PRP	$p=0,2858$
IL-6	HA	$p=0,0005$
	L-PRP	$p < 0,0001$
IL-8	HA	$p=0,0001$
	L-PRP	$p=0,0003$
IL-17	HA	Non rilevante
	L-PRP	Non rilevante
IL-4	HA	Non rilevante
	L-PRP	Non rilevante
IL-10	HA	Non rilevante
	L-PRP	Non rilevante
IL-13	HA	$p=0,0591$
	L-PRP	$p=0,0231$

### *Analisi delle citochine*

L'analisi delle citochine del plasma e del liquido sinoviale mostra come non ci sia nessuna differenza tra i tempi sperimentali, come mostrato in figura 15. Inoltre, nessuna differenza è stata osservata paragonando i due trattamenti L-PRP e HA in tutti i tempi sperimentali, eccetto per IL-8 che ha mostrato livelli significativamente più alti nel liquido sinoviale di pazienti trattati con acido ialuronico a 2 settimane (Mann-Whitney U test:  $p < 0,005$ ).

### *Analisi dei fattori di crescita*

Nel L-PRP, la concentrazione di FGF-b e HGF è simile a quella riscontrata nel liquido sinoviale, mentre PDGF-AB/BB, non rilevata nel liquido sinoviale, è risultata presente in alte concentrazioni nel L-PRP.

L-PRP e HA hanno mostrato simili concentrazioni di fattori di crescita sia a livello locale (liquido sinoviale) sia a livello sistemico (sangue periferico). Inoltre, la concentrazione di FGF-b, HGF e PDGF AB/BB nel liquido sinoviale è risultata stabile ad ogni tempo sperimentale a prescindere dal gruppo di appartenenza.

## **Discussione**

Questo studio dimostra che le infiltrazioni intra-articolari di L-PRP non modificano i livelli sistemici e locali delle citochine pro-infiammatorie (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-17) in pazienti con OA, a 7 giorni dal trattamento. Inoltre nessuna differenza significativa è stata rilevata tra le concentrazioni di citochine indotte dalle infiltrazioni di L-PRP e HA, sia localmente che a livello sistemico.

Dal momento che IL-1b è prodotto principalmente da leucociti attivati, la bassa concentrazione di questa citochina nei campioni di L-PRP suggerisce un contributo negativo di queste cellule alla condizione di infiammazione sistemica basale. L'osservazione di elevati livelli per IL-6, IL-8 e IL-13 nel liquido sinoviale rispetto al plasma conferma una produzione locale di queste citochine indipendente [64,65]. La differenza a livello locale e sistemico non è univocamente descritta e si pensa possa dipendere dalla severità della patologia, localizzazione articolare, livello di infiammazione locale e sensibilità del metodo di rilevazione. Nel corso del periodo di osservazione longitudinale, non sono state osservate modificazioni tempo-dipendenti nelle concentrazioni di citochine di plasma e liquido sinoviale in entrambi i gruppi, suggerendo che la somministrazione di L-PRP rispetto a quella di HA non mantiene una spinta significativa di citochine pro- o anti-infiammatorie a 7 giorni dopo ciascuna infiltrazione.

In particolare, questi risultati suggeriscono che la presenza di leucociti non induce una rilevante modulazione positiva di mediatori pro-infiammatori in vivo. Tuttavia, non possiamo escludere una

risposta precoce, come si verifica in alcuni modelli animali, dove è stato descritto un aumento di IL-6 entro sei ore dopo l'iniezione PRP [27].

Analogamente, anche l'analisi del gruppo di citochine anti-infiammatorie (IL-4, IL-10 e IL-13) hanno evidenziato concentrazioni trascurabili nei fluidi analizzati, escludendo una modulazione della risposta locale e sistemica.

Tuttavia, dal momento che i nostri risultati non hanno mostrato up-regolazione di mediatori infiammatori 7 giorni dopo l'infiltrazione di PRP, i potenziali effetti negativi di precoci possono essere attribuiti a solo temporanea, mite e auto-limitante effetto infiammatorio dei leucociti.

Similmente, per quanto riguarda i fattori FGF-b, HGF e PDGF-AB / BB, non abbiamo osservato nessuna modifica della loro concentrazione nel liquido sinoviale dopo ogni iniezione. Queste osservazioni possono suggerire un assorbimento in vivo attraverso un legame a recettori specifici, che dovranno essere dimostrate da futuri studi opportunamente disegnati. Inoltre, dal momento che questi fattori mostrano proprietà anti-apoptotiche nei confronti dei condrociti, la diminuzione della risposta infiammatoria e l'aumento della sintesi di componenti della matrice della cartilagine, questo potenziale meccanismo potrebbe essere vantaggioso per migliorare l'effetto anabolico nelle articolazioni affette da processo osteoartrosico. Tuttavia non possiamo escludere che questi processi degenerativi intra-articolari potrebbero rendere queste molecole non bio-disponibili.

# Acido Ialuronico e PRP in combinazione azione sinergica?

## Studio in vitro

### Obiettivo

Negli ultimi anni sta emergendo l'idea che la combinazione del PRP e acido ialuronico possa fornire benefici maggiori rispetto ai trattamenti singoli, basandosi sul fatto che agiscono mediante meccanismi di azione differenti [66]. Il seguente studio ha l'obiettivo di investigare l'effetto della combinazione di PRP e HA a differenti concentrazioni su colture cellulari di condrociti, in ambiente infiammatorio o meno.

### Materiale e metodi

#### *Preparazione del PRP*

Tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso scritto e il Comitato Etico locale ha approvato il protocollo di studio. L'identità del donatore è stata mantenuta anonima e tutti i campioni usati sono stati codificati. Il PRP è stato prodotto a partire da 12 volontari maschi sani, (mean age  $\pm$  DS:  $\pm$  anni) sottoposti ad un prelievo di sangue venoso periferico di 180 mL. I volontari non presentavano malattie sistemiche o infezioni, erano non fumatori e si sono astenuti dal prendere FANS i 5 giorni precedenti il prelievo. Valori di emoglobina inferiori a 11 g/dL o una concentrazione di piastrine inferiore a  $150 \times 10^3$  uL. Il PRP è stato ottenuto tramite filtrazione utilizzando il kit Celeris-Pall: si tratta di un sistema chiuso che mediante un filtro separa le piastrine, successivamente diluite e raccolte in una siringa. Successivamente è stato caratterizzato mediante.

#### *Allestimento colture*

I condrociti umani sono stati isolati come da protocollo precedentemente descritto e utilizzati secondo il seguente disegno sperimentale:

**Tabella 11: Disegno sperimentale**

	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4	Gruppo 5	Gruppo 6
Condrociti	Solo terreno	PRP 10%	HA 10%	PRP 80%- HA 20%	PRP 20%- HA 80%	Plasma 10%

Gli effetti dei differenti trattamenti sperimentali sono stati analizzati in termini di proliferazione a 0, 1, 3 e 7 giorni utilizzando il saggio Alamar blue, precedentemente descritto, ed in termini di

espressione genica delle principali molecole pro-/anti- infiammatorie, pro-/anti-cataboliche e anaboliche a 1 e 7 giorni.

### *Analisi statistiche*

Tutti i dati normalmente distribuiti sono stati espressi in termini di media e deviazione standard; la mediana è stata utilizzata per i dati non normalmente distribuiti. Il test Kolmogorov Smirnov è stato utilizzato per testare la normalità delle variabili continue. Il General Linear Model per misure ripetute con il test di Sidak per paragoni multipli è stato utilizzato per verificare le differenze ai diversi tempi sperimentali.

Il Test ANOVA è stato utilizzato per testare le differenze tra gruppi di dati continui, normalmente distribuiti e omoschedastici; il test Mann Whitney è stato utilizzato altrimenti. Il test ANOVA seguito dal test post hoc di Scheffè per paragoni accoppiati utilizzato per le differenze tra gruppi. IL GLM per misure ripetute è stato anche utilizzato per verificare l'influenza dei differenti trattamenti sulla proliferazione e l'espressione genica. Il test di Pearson Chi quadro è stato utilizzato per valutare le variabili tra i gruppi. Per tutti i test,  $p < 0,05$  è considerata significativa. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con SPSS v. 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

## **Risultati**

### *Concentrazione piastrinica e numero di globuli bianchi*

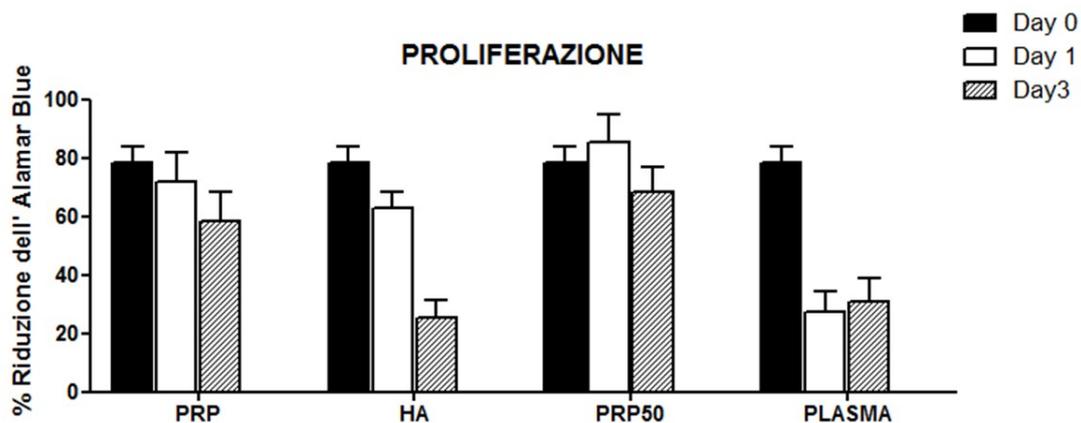
Il numero medio di piastrine per millimetro cubo è  $209,8 \pm 59,2 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il sangue periferico,  $0,1 \pm 0,0 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il PPP,  $676,4 \pm 222,1 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il PRP. La concentrazione media dei globuli bianchi per millimetro cubo è  $6,8 \pm 1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il sangue periferico,  $0,1 \pm 0,0 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il PPP e  $15,7 \pm 3,8 \times 10^3/\mu\text{L}$  per il PRP.

Dal momento che le differenti combinazioni di PRP/HA non mostrano differenze significative nei parametri valutati sono stati rappresentati graficamente i valori della combinazione 50/50.

### *Proliferazione*

I risultati della proliferazione cellulare su condrociti sono riportati in Figura 18. Per quanto riguarda la proliferazione nel tempo, il gruppo trattato con il plasma presenta una significativa diminuzione della proliferazione al day 1 e day 3 rispetto al day 0 ( $p < 0,05$ ) senza alcuna differenza tra i due tempi sperimentali osservati. Il gruppo trattato con l'acido ialuronico presenta una progressiva diminuzione della proliferazione nel tempo (day 0 vs day 1; day 1 vs day 3; day 0 vs day 3  $p < 0,05$ ). Per quanto riguarda il gruppo trattato con il PRP e con la combinazione PRP/HA entrambi presentano una diminuzione della proliferazione al day 3 rispetto al day 0 ( $p < 0,05$ ).

Per quanto riguarda le differenze tra i trattamenti, il plasma presenta valori di proliferazione inferiori rispetto al PRP e alla combinazione PRP/HA sia al day 1 ( $p<0,05$ ) che al day 3 ( $p<0,05$ ), mentre induce una minor proliferazione al day 1 ( $p<0,05$ ) che raggiunge valori simili al day 3 ( $p<0,05$ ) rispetto all'HA. La combinazione PRP/HA inoltre presenta valori più elevati di proliferazione rispetto all'HA in entrambi i tempi sperimentali ( $p<0,05$ ). Nessuna differenza nella modulazione della proliferazione dei condrociti è stata osservata tra PRP e PRP/HA in nessuno dei tempi sperimentali considerati.



**Figura 16:** Proliferazione espressa come % di riduzione dell'Alamar blue di condrociti umani cresciuti in presenza di plasma, PRP, HA, PRP/HA. I dati sono espressi come media e deviazione standard

**Tabella 12:** Significatività tra gruppi

Gruppi		p
Plasma	HA	,000
	PRP50	,000
	PRP	,000
HA	PRP50	,000
	PRP	,53
PRP50	PRP	,128

### *Espressione genica*

Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione genica, sono stati valutati i più comuni geni coinvolti nella produzione di molecole della matrice, infiammatorie e del dolore (Figura 17, Tabella 13 e 14). Aggregano: in generale il plasma induce alti livelli di espressione paragonato a tutti i trattamenti ( $p<0,05$ ). Per quanto riguarda il trend di espressione nel tempo, il plasma e l'HA si comportano in maniera simile con un incremento nell'espressione al day 1 ( $p<0,05$ ), senza alcuna differenza tra i due gruppi, che diminuisce al day 3 ( $p<0,05$ ). Il PRP e la combinazione PRP/HA portano ad una

diminuzione progressiva dell'espressione in maniera simile, risultando in livelli inferiori al day 3 rispetto all'HA.

Collagene 2: l'HA induce elevati livelli di espressione del collagene al day 1 rispetto al plasma, al PRP e alla combinazione PRP/HA ( $p < 0,05$ ). Nessuna differenza è stata osservata tra i trattamenti al day 3.

Sox-9: l'HA induce elevati livelli di Sox-9 sia al day 1 ( $p < 0,05$ ) sia al day 3 ( $p < 0,05$ ) rispetto a tutti i gruppi di trattamento restanti gruppi, con un aumento progressivo nel tempo ( $p < 0,05$ ).

MMP-13: il PRP e la combinazione PRP/HA inducono un'elevata espressione di MMP-13 senza nessuna differenza significativa tra i due trattamenti, ma superiore ai livelli indotti dall'HA ( $p < 0,05$ ).

VEGF: al day 1 l'espressione del fattore indotta dai gruppi non è significativa. Al contrario al day 3 l'HA è in grado di indurre elevati livelli di espressione di VEGF rispetto agli altri gruppi ( $p < 0,05$ ).

CD44: il plasma, il PRP e la combinazione PRP/HA mostrano un simile pattern di espressione che diminuisce progressivamente nel tempo ( $p < 0,05$ ) senza differenza significativa tra i gruppi. L'HA induce un'espressione maggiore di CD44 rispetto agli altri trattamenti ( $p < 0,05$ ), con un picco al day 1 rispetto al day 3 ( $p < 0,05$ ).

NGF: il PRP e la combinazione PRP/HA inducono bassi livelli di NGF in tutti i tempi sperimentali considerati ( $p < 0,05$ ). Il plasma induce elevati livelli di NGF al day 1 che diminuiscono fino a raggiungere livelli simili al PRP e PRP/HA ( $p < 0,05$ ). Similmente l'HA induce elevati livelli al day 1 ( $p < 0,05$ ) ma rimangono significativamente più elevate del PRP e PRP/HA ( $p < 0,05$ ).

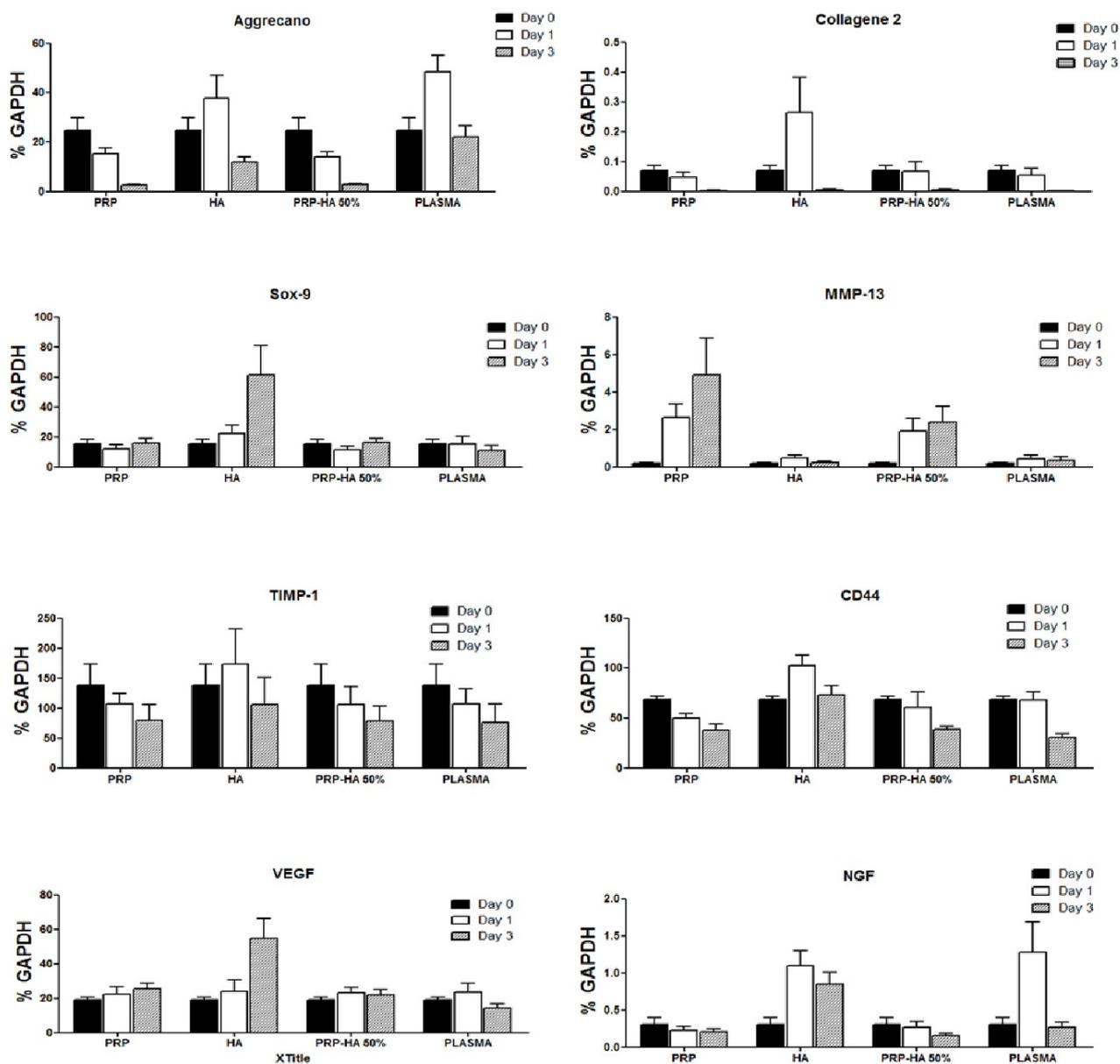


Figura 17: Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard

Tabella 13: Analisi di follow-up, significatività nei tempi sperimentali.

	0 vs 1	0 vs 3	1 vs 3
<b>AGGREGANO</b>			
Plasma	NS	NS	p<0,005
HA	p<0,005	p<0,005	p<0,005
PRP 50	p<0,005	p<0,005	p<0,005
PRP	p<0,005	p<0,005	p<0,005
<b>COLLAGENE 2</b>			
Plasma	NS	p<0,005	NS
HA	p<0,005	p<0,005	p<0,005
PRP 50	NS	p<0,005	p<0,005

<b>PRP</b>	NS	p<0,005	NS
<b>SOX 9</b>			
<b>Plasma</b>	NS	NS	NS
<b>HA</b>	p<0,005	p<0,005	p<0,005
<b>PRP 50</b>	p<0,005	NS	NS
<b>PRP</b>	NS	NS	NS
<b>MMP13</b>			
<b>Plasma</b>	p<0,005	p<0,005	NS
<b>HA</b>	NS	p<0,005	p<0,005
<b>PRP 50</b>	p<0,005	p<0,005	NS
<b>PRP</b>	p<0,005	NS	p<0,005
<b>TIMP-1</b>			
<b>Plasma</b>	NS	NS	NS
<b>HA</b>	NS	NS	NS
<b>PRP 50</b>	NS	NS	NS
<b>PRP</b>	NS	NS	NS
<b>VEGF</b>			
<b>Plasma</b>	NS	p<0,005	NS
<b>HA</b>	NS	p<0,005	p<0,005
<b>PRP 50</b>	p<0,005	NS	NS
<b>PRP</b>	NS	NS	NS
<b>CD44</b>			
<b>Plasma</b>	p<0,005	p<0,005	p<0,005
<b>HA</b>	NS	p<0,005	p<0,005
<b>PRP 50</b>	p<0,005	p<0,005	p<0,005
<b>PRP</b>	p<0,005	p<0,005	NS
<b>NGF</b>			
<b>Plasma</b>	NS	NS	NS
<b>HA</b>	NS	p<0,005	NS
<b>PRP 50</b>	NS	NS	NS
<b>PRP</b>	NS	NS	NS

**Tabella 14: Significatività tra gruppi dell'espressione genica**

<b>COLLAGENE</b>	<b>Gruppi</b>	<b>Significatività day 1</b>	<b>Significatività day 3</b>
Plasma	HA	0,001	NS
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	0,000	NS
	PRP	0,002	NS
PRP50	PRP	NS	NS
<b>AGGRECANO</b>			
Plasma	HA	NS	0,006

	PRP50	0,023	0,000
	PRP	0,035	0,000
HA	PRP50	NS	0,004
	PRP	NS	0,029
PRP50	PRP	NS	NS
<b>SOX 9</b>			
Plasma	HA	0,000	0,009
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	0,000	0,013
	PRP	0,000	0,024
PRP50	PRP	NS	NS
<b>MMP 13</b>			
Plasma	HA	NS	NS
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	0,000	0,012
	PRP	0,042	0,021
PRP50	PRP	NS	NS
<b>TIMP-1</b>			
Plasma	HA	NS	NS
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
PRP50	PRP	NS	NS
<b>VEGF</b>			
Plasma	HA	NS	0,000
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	NS	0,000
	PRP	NS	0,000
PRP50	PRP	NS	NS
<b>CD44</b>			
Plasma	HA	0,013	0,000
	PRP50	NS	NS
	PRP	NS	NS
HA	PRP50	0,001	0,000
	PRP	0,001	0,000
PRP50	PRP	NS	NS
<b>NGF</b>			
Plasma	HA	NS	0,008
	PRP50	0,008	NS
	PRP	0,029	NS

HA	PRP50	0,000	0,000
	PRP	0,031	0,000
PRP50	PRP	NS	NS

## Discussione

Questo studio in vitro dimostra che la combinazione PRP/HA non sembra avere un effetto sinergico su colture di condrociti, in termini di proliferazione ed espressione genica, indipendentemente dalle concentrazioni utilizzate. Infatti, sia per quanto riguarda la proliferazione sia per quanto riguarda l'espressione genica la combinazione mostra un effetto comparabile a quello indotto dal PRP da solo.

Molti studi hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo di PRP e HA per il trattamento dell'OA [67,68], con buoni risultati ma limitati nel tempo. Solamente negli ultimi anni sta emergendo la possibilità di utilizzarli in combinazione, in virtù del meccanismo biologico differente che sta alla base della loro azione [66] e ipotizzando quindi un'azione sinergica. Lana et al. [69] hanno condotto uno studio randomizzato in doppio cieco su una popolazione di 105 pazienti con un grado di OA del ginocchio lieve-moderato: i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi, PRP, HA e PRP+HA, riportando risultati funzionali migliori utilizzandoli in combinazione. È interessante notare come PRP+HA porti ad un miglioramento significativo fino a 30 giorni e fino al primo anno dal trattamento, in comparazione con i risultati indotti singolarmente da PRP e HA (rispettivamente). Al contrario, Dallari et al. [70] non ha descritto nessun effetto additivo del PRP-HA nel trattamento dell'OA dell'anca rispetto al PRP da solo. In questo quadro abbastanza contraddittorio gli studi in vitro possono fornire alcune indicazioni utili che possono essere tradotti in miglioramenti della pratica clinica. In questo disegno sperimentale abbiamo testato differenti combinazioni di PRP e HA (50%-50%; 20%-80% e 80%-20%) ed è stato studiato l'effetto su condrociti in termini di proliferazione cellulare ed espressione genica. Per quanto riguarda l'effetto sulla proliferazione, la combinazione di PRP/HA induce una maggiore proliferazione dei condrociti rispetto all'HA e al plasma in entrambi i tempi sperimentali ed in maniera simile al PRP da solo. Nell'analisi dell'espressione genica, PRP e PRP/HA non sono in grado di esprimere in maniera significativamente elevata i geni coinvolti nel metabolismo dei condrociti rispetto all'HA e al plasma. Questo probabilmente è dovuto alla tipologia di PRP utilizzato, la cui concentrazione piastrinica potrebbe non essere sufficiente ad indurre un effetto sui fattori del metabolismo dei condrociti. È interessante notare però che PRP e PRP/HA mantengono significativamente bassi i valori di VEGF rispetto all'HA. È noto infatti che elevati livelli di VEGF indentifichino una progressione nell'OA [71], alla luce di questo il PRP potrebbe essere in grado di ritardare il

processo patologico articolare influenzando anche sul dolore. Similmente, i bassi livelli di NGF riscontrati nei gruppi trattati con PRP e PRP/HA potrebbero suggerirne un ruolo nella regolazione del dolore. Studi clinici hanno infatti dimostrato che negli adulti iniezioni di NGF sono legate al dolore [72], dando il via ad una serie di strategie anti-NGF per la riduzione del dolore nel ginocchio affetto da OA. Sfortunatamente, questa tipologia di trattamento è legata ad eventi avversi, come osteonecrosi e rapida evoluzione della patologia articolare [73,74]. Il PRP quindi potrebbe rappresentare un'interessante approccio per la diminuzione del dolore e la rigenerazione del tessuto. Ulteriori studi dovranno approfondire il meccanismo alla base dell'interazione tra PRP e HA e chiarirne di conseguenza l'applicazione in campo clinico.

# Conclusioni

Il Lavoro svolto in questi 3 anni ha permesso di approfondire la conoscenza sull'utilizzo del PRP per il trattamento dell'OA:

- Senza dubbio il PRP può essere considerato un trattamento sicuro, poiché i dati clinici mostrano l'assenza di eventi avversi post trattamento. Non può essere considerato come trattamento di prima linea per quei pazienti affetti da degenerazione della cartilagine articolare, anche da un punto di vista puramente logistico, limitando il suo impiego a pazienti che non hanno tratto beneficio da altri trattamenti conservativi. Particolare importanza rivestono la concentrazione delle piastrine, dei leucociti e il metodo di attivazione, che possono essere modulati al fine di crear il PRP idoneo al tipo di patologia da trattare.
- L-PRP e P-PRP esercitano effetti differenti su colture di condrociti e sinoviociti in vitro, probabilmente a causa della differente composizione dei preparati in termini di piastrine, contenuto di leucociti, fattori di crescita ed altre molecole bio-attive. Nonostante la presenza di leucociti sia associata ad una maggiore espressione di marker infiammatori, L-PRP è in grado di esprimere maggiormente i geni dell'HAS e promuovere la secrezione di HA. D'altro canto il fatto che nei sinoviociti il P-PRP eserciti un'azione simile al plasma potrebbe essere imputato ad una concentrazione piastrinica troppo bassa per indurre un effetto sui fattori.
- Nonostante le differenze osservate nel rilascio dei fattori, entrambi i PRP fresco e congelato hanno indotto in maniera simile proliferazione cellulare e produzione di componenti della matrice sia in condrociti che sinoviociti. Similmente l'analisi dell'espressione genica ha indicato che il preparato congelato non perde o riduce la propria abilità di stimolare l'anabolismo dei condrociti.
- L'attivazione è un altro aspetto cruciale nel trattamento con il PRP, determinando sia la sua forma fisica sia la quantità dei fattori rilasciati. Non è solo il livello dei fattori di crescita infatti che determina la risposta del tessuto, ma anche l'abilità di agire sulla zona da trattare. Quindi la strategia di attivazione deve essere scelta non solo in base al tipo di applicazione clinica (iniettiva, a cielo aperto o artroscopica), ma anche in accordo con l'effetto biologico desiderato nel tessuto bersaglio.
- Infine, la combinazione PRP/HA non sembra avere un effetto sinergico su colture di condrociti, in termini di proliferazione ed espressione genica, indipendentemente dalle concentrazioni utilizzate. Infatti, sia per quanto riguarda la proliferazione sia per quanto

riguarda l'espressione genica la combinazione mostra un effetto comparabile a quello indotto dal PRP da solo. Ulteriori studi dovranno approfondire le possibili interazioni tra PRP e HA per comprendere il reale beneficio clinico.

## Bibliografia

1. Lories RJ (2008). Joint homeostasis, restoration, and remodeling in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 22(2):209–220.
2. Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnič M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN (2012). Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(3):423–435.
3. Hunter DJ, Felson DT (2006). Osteoarthritis *BMJ* 18;332(7542):639–642.
4. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64(6):1697-707.
5. Bijlsma JW1, Berenbaum F, Lafeber FP (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011 Jun 18;377(9783):2115-26.
6. Cucchiaroni M, de Girolamo L, Filardo G, Oliveira JM, Orth P, Pape D, Reboul P (2016). Basic science of osteoarthritis. *J Exp Orthop.* 3(1):22.
7. Luyten FP, Denti M, Filardo G, Kon E, Engebretsen L (2012). Definition and classification of early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(3):401-6.
8. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P (2016). Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 24(6):1753-62.
9. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 Nov;8(11):665-73.
10. Kon E, Filardo G, Drobnic M, Madry H, Jelic M, van Dijk N, Della Villa S (2012). Non-surgical management of early knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(3):436–449.
11. Gomoll AH, Filardo G, de Girolamo L, Espregueira-Mendes J, Marcacci M, Rodkey WG, Steadman JR, Zaffagnini S, Kon E (2012). Surgical treatment for early osteoarthritis. Part I: cartilage repair procedures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(3):450–466.
12. Gomoll AH, Filardo G, Almqvist FK, Bugbee WD, Jelic M, Monllau JC, Puddu G, Rodkey WG, Verdonk P, Verdonk R, Zaffagnini S, Marcacci M (2012). Surgical treatment for early osteoarthritis. Part II: allografts and concurrent procedures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(3):468–486.
13. Della Villa S, Kon E, Filardo G, Ricci M, Vincentelli F, Delcogliano M, Marcacci M (2010). Does intensive rehabilitation permit early return to sport without compromising the clinical outcome after arthroscopic autologous chondrocyte implantation in highly competitive athletes? *Am J Sports Med.* 38(1):68–77.

14. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Iacono F, Marcacci M (2011). Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: a prospective 7-year follow-up study. *Am J Sports Med.* 39(10):2153–2160.
15. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Patella S, Altadonna G, Balboni F, Bragonzoni L, Visani A, Marcacci M (2012). Second-generation arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 20(9):1704–1713.
16. Filardo G, Vannini F, Marcacci M, Andriolo L, Ferruzzi A, Giannini S, Kon E (2013). Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage regeneration in osteoarthritic knees: results and failures at midterm follow-up. *Am J Sports Med.* 41(1):95–100.
17. Kon E, Filardo G, Condello V, Collarile M, Di Martino A, Zorzi C, Marcacci M (2011). Second-generation autologous chondrocyte implantation: results in patients older than 40 years. *Am J Sports Med.* 39(8):1668–1675.
18. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 469(10):2706-15.
19. Anitua E, Sánchez M, Orive G (2010). Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 15;62(7-8):741-52.
20. Kon E, Filardo G, Matteo BD, Marcacci M (2013). PRP for the treatment of cartilage pathology. *Open Orthop J.* 3(7):120–128.
21. Sanchez M, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A, Albillos J, Ga´rate R, Aguirre JJ, Padilla S, Orive G, Anitua E (2012) A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy* 28(8):1070–1078.
22. Filardo G, Kon E, Di Martino A, Di Matteo B, Merli ML, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M (2012) Platelet-rich plasma vs hyaluronic acid to treat knee degenerative pathology: study design and preliminary results of a randomized controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 23;13(1):229.
23. Cerza F, Carni` S, Carcangiu A, Di Vavo I, Schiavilla V, Pecora A, De Biasi G, Ciuffreda M (2012) Comparison between hyaluronic acid and platelet-rich plasma, intra-articular infiltration in the treatment of gonarthrosis. *Am J Sports Med.*
24. Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A (2013) Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med* 41(2):356–364.

25. Mei-Dan O, Carmont MR, Laver L, Mann G, Maffulli N, Nyska M (2012) Platelet-rich plasma or hyaluronate in the management of osteochondral lesions of the talus. *Am J Sports Med* 40(3):534–541
26. Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C (2012). Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. *J Orthop Res.* 30(6):845-52.
27. Moreira Teixeira LS, Leijten JC, Wennink JW, Chatterjea AG, Feijen J, van Blitterswijk CA, Dijkstra PJ, Karperien M (2012). The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation. *Biomaterials.* 33(14):3651–3661.
28. Pereira RC, Scaranari M, Benelli R, Strada P, Reis RL, Cancedda R, Gentili C (2013). Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution. *Tissue Eng Part A.* 19(11-12):1476-88.
29. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH (2012). Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *J Control Release.* 159(3):332-7.
30. Mifune Y, Matsumoto T, Takayama K, Ota S, Li H, Meszaros LB, Usas A, Nagamune K, Gharaibeh B, Fu FH, Huard J (2013). The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthritis Cartil.* 21(1):175–185.
31. Yin Z, Yang X, Jiang Y, Xing L, Xu Y, Lu Y, Ding P, Ma J, Xu Y, Gui J (2013). Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: an in vitro study. *J Biomater Appl.*
32. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34(4):665–671.
33. Chen L, Yang X, Huang G, Song D, Ye XS, Xu H, Li W (2013). Platelet-rich plasma promotes healing of osteoporotic fractures. *Orthopedics* 36(6):e687–e694.
34. Smyth NA, Murawski CD, Fortier LA, Cole BJ, Kennedy JG (2013). Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: review of basic science evidence. *Arthroscopy.* 29(8):1399-409.
35. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA (2011). Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* Oct;39(10):2135-40.

36. Sánchez M, Delgado D, Sánchez P, Fiz N, Azofra J, Orive G, Anitua E, Padilla S (2014). Platelet rich plasma and knee surgery. *Biomed Res Int.* 2014:890630.
37. Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL (2012). Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 22(1):33–42.
38. Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M (2015). Platelet-rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy--a systematic review. *Musculoskelet Surg.* 99(1):1-9.
39. Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M (2011). Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 19(4):528-35.
40. Anitua E, Orive G, Aguirre JJ, Andía I (2008) Five-year clinical evaluation of short dental implants placed in posterior areas: a retrospective study. *J Periodontol.* 79(1):42-8.
41. Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, Facchini A Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology.* 2006 Oct-Dec;7(5-6):449-59.
42. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAff 11): molecular, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials.* 2002 Feb;23(4):1187-95.
43. Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE (1994) A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170(2):211-24.
44. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25(4):402-8.
45. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy.* 2012 Mar;28(3):429-39.
46. Berenbaum F (2013) Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 21(1):16-21.
47. Cheon H, Yu SJ, Yoo DH, Chae IJ, Song GG, Sohn J (2002) Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol* 127:547–552.

48. Cheon H, Sun YK, Yu SJ, Lee YH, Ji JD, Song GG, Lee JH, Kim MK, Sohn J (2004) Platelet-derived growth factor-AA increases IL-1beta and IL-8 expression and activates NF-kappaB in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Immunol.* 60:455–462.
49. Rosengren S, Corr M, Boyle DL (2010) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 12:R65.
50. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J, Andia I (2007) Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)* 46:1769–1772.
51. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino Alessandro, Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M (2012) Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:2082–2091.
52. Holme S (1998) Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sanguinis* 74(2):207-216.
53. Zhu Y1, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, Peng J (2013) Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage.* 21(11):1627-37. doi: 10.1016/j.joca.2013.07.017. Epub 2013 Aug 7.
54. Di Matteo B, Filardo G, Kon E, Marcacci M (2015) Platelet-rich plasma: evidence for the treatment of patellar and Achilles tendinopathy--a systematic review. *Musculoskelet Surg* 99(1):1-9.
55. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM (2008) Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg* 66(4):684-90.
56. Torricelli P, Fini M, Filardo G, Tschon M, Pischedda M, Pacorini A, Kon E, Giardino R (2011) Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *Int Orthop* 35(10):1569-76.
57. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34(4):665-71.
58. Han B., Woodell-May J., Ponticiello M., Yang Z., Nimni M (2009) The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *The Journal of Bone & Joint Surgery—American Volume* 91(6):1459–1470.
59. Iberts B., Bray D., Lewis J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd. New York, NY, USA: Garland Publishing; 1994.

60. Ranly D. M., McMillan J., Keller T. (2005) Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation: a study of immunocompromised mice. *Journal of Bone and Joint Surgery A.* 87(9 I):2052–2064.
61. DeLong J. M., Russell R. P., Mazzocca A. D (2012) Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy* 28(7):998–1009.
62. Harrison S., Vavken P., Kevy S., Jacobson M., Zurakowski D., Murray M. M (2011) Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *The American Journal of Sports Medicine* 39(4):729–734.
63. Bir S. C., Esaki J., Marui A. (2009) Angiogenic properties of sustained release platelet-rich plasma: characterization in-vitro and in the ischemic hind limb of the mouse. *Journal of Vascular Surgery* 50(4):870–879.
64. Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K, Kagawa J (2000) Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 6:71–79.
65. Mabey T, Honsawek S, Saetan N, Poovorawan Y, Tanavalee A, Yuktanandana P (2014) Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis. *Int Orthop* 38:1885–1892.
66. Andia I, Abate M. Knee osteoarthritis: hyaluronic acid, platelet-rich plasma or both in association? *Expert Opin Biol Ther.* 2014 May;14(5):635-49.
67. Filardo G, Di Matteo B, Di Martino A, Merli ML, Cenacchi A, Fornasari P, Marcacci, Kon E. (2015) Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* Jul;43(7):1575-82.
68. Filardo G, Kon E, Longo UG, Madry H, Marchettini P, Marmotti A, Van Assche D, Zanon G, Peretti GM (2016) Non-surgical treatments for the management of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* Jun;24(6):1775-85.
69. Lana JF, Weglein A, Sampson SE, Vicente EF, Huber SC, Souza CV, Ambach M, Vincent H, Urban-Paffaro A, Onodera CM, Annichino-Bizzacchi JM, Santana MH, Belangero WD (2016) 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. *J Stem Cells Regen Med.* Nov 29;12(2):69-78.
70. Dallari D, Stagni C, Rani N, Sabbioni G, Pelotti, Torricelli P, Tschon M, Giavaresi G (2016) Ultrasound-Guided Injection of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid, Separately and in Combination, for Hip Osteoarthritis: A Randomized Controlled Study. *Am J Sports Med.* Mar;44(3):664-71.

71. Hamilton JL, Nagao M, Levine BR, Chen D, Olsen BR, Im HJ (2016) Targeting VEGF and Its Receptors for the Treatment of Osteoarthritis and Associated Pain. *J Bone Miner Res.* May;31(5):911-24.
72. Eibib, J, Strasser, B. C. & Ross, G. M. (2012) Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor. *Neurochem. Int.* 6, 1266–1275.
73. Schnitzer, T. J. & Marks, J. A. (2015) A systematic review of the efficacy and general safety of antibodies to NGF in the treatment of OA of the hip and knee. *Osteoarthritis Cartilage* 23 (Suppl. 1), S8–S17.
74. Lane, N. E. et al. (2010) Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N. Engl. J. Med* 363: 1521–1531.

# INDICE

INTRODUZIONE.....	2
Materiali e Metodi.....	4
Risultati .....	5
Studi clinici .....	9
Discussione .....	9
I PARTE.....	12
DALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO” ALL’APPLICAZIONE CLINICA.....	12
Studio in vitro.....	13
Obiettivo.....	13
Materiali e Metodi.....	14
Preparazione del PRP .....	14
Attivazione del PRP .....	15
Rilascio dei fattori solubili .....	15
Isolamento delle cellule - Condrociti .....	16
Isolamento delle cellule - Sinoviociti.....	17
Proliferazione .....	17
Valutazione dell’espressione genica di condrociti e sinoviociti .....	18
Misurazione dei livelli di HA.....	18
Analisi dell’effetto del congelamento sulle caratteristiche del PRP e sulle abilità di indurre effetti in colture di condrociti e sinoviociti .....	18
Analisi statistica .....	19
Risultati .....	19
Caratterizzazione dei PRP .....	19
Proliferazione dei condrociti .....	20
Proliferazione dei sinoviociti .....	20
Espressione genica nei condrociti .....	20
Secrezione di Acido ialuronico dai condrociti .....	21
Espressione genica nei sinoviociti .....	22
Effetto del congelamento sulle proprietà biologiche del PRP .....	24
Discussione .....	26
Studio in vitro.....	30
Obiettivo.....	30
Materiali e Metodi.....	30

Preparazione dei campioni .....	31
Attivazione .....	31
Valutazione del rilascio dei fattori di crescita.....	31
Analisi statistica .....	31
Risultati .....	32
Concentrazione piastrinica e numero di globuli bianchi.....	32
Formazione del coagulo .....	32
Rilascio di fattori di crescita e citochine .....	33
Cinetica di rilascio dei fattori di crescita .....	33
Discussione .....	35
II PARTE .....	37
DALLA CLINICA ALLA SPERIMENTAZIONE “IN VITRO” .....	37
Indagine legislativa .....	38
Obiettivo.....	38
Il quadro normativo in Europa .....	38
La posizione della Commissione Europea .....	39
La normativa in Italia .....	39
Emocomponenti, non emoderivati .....	39
Sicurezza, Utilizzo, Preparazione (Minima manipolazione) .....	40
Aspetti operativi: il Sistema delle autorizzazioni .....	40
Discussione .....	41
Studio clinico randomizzato, in doppio cieco, PRP vs Acido Ialuronico: risultati preliminari.....	42
Obiettivo.....	42
Materiali e Metodi.....	42
Selezione dei pazienti.....	43
Valutazione pazienti.....	43
Risultati .....	44
Discussione .....	45
Studio in vitro.....	47
Obiettivo.....	47
Materiali e Metodi.....	47
Determinazione del numero di piastrine e leucociti.....	47
Valutazione dei fattori solubili.....	47
Analisi statistica .....	48
Risultati .....	48

Analisi delle citochine.....	49
Analisi dei fattori di crescita .....	49
Discussione .....	49
Studio in vitro.....	51
Obiettivo.....	51
Materiale e metodi .....	51
Preparazione del PRP .....	51
Allestimento colture.....	51
Analisi statistiche .....	52
Risultati .....	52
Concentrazione piastrinica e numero di globuli bianchi.....	52
Proliferazione .....	52
Espressione genica .....	53
Discussione .....	58

# INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: Diagramma PRISMA della selezione degli articoli .....	5
Figura 2: Schema della raccolta di sangue dai donatori e preparazione dei due PRP .....	15
Figura 3: Rappresentazione dell'allestimento delle colture in vitro .....	16
Figura 4: Proliferazione espressa come % di riduzione dell'Alamar blue di condrociti umani cresciuti in presenza di P-PRP e L-PRP. I dati sono espressi come media e deviazione standard....	20
Figura 5: Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard. ....	21
Figura 6: Livelli di acido ialuronico nel terreno di coltura dei condrociti in presenza dei 3 differenti preparati a 7 giorni. I dati sono espressi come media e deviazione standard. ....	22
Figura 7: Espressione genica dei fattori pro-infiammatori in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole *100,000 GAPDH. ....	22
Figura 8: Espressione genica dei fattori di crescita in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole *100,000 GAPDH. ....	23
Figura 9: Espressione genica di TIMP-4 in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole *100,000 GAPDH.....	24
Figura 10: Livelli di acido ialuronico nel terreno di coltura dei condrociti in presenza del 10% di PRP fresco o congelato a 7 giorni. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014).....	25
Figura 11: Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014).....	25
Figura 12: Espressione dell'mRNA in colture di fibroblasti trattati con tutti i preparati. I dati sono espressi per numero di molecole *100,000 GAPDH. (Roffi et al. Biomed Res Int 2014).....	26
Figura 13: Formazione del coagulo a 24 ore nei differenti gruppi di attivazione.....	32
Figura 14: Cinetica di rilascio dei fattori di crescita nei campioni attivati secondo protocollo. (Cavallo et al. Biomed Res Int 2016).....	33
Figura 15: Rappresentazione grafica del miglioramento dello score IKDC soggettivo nei due gruppi di trattamento .....	45
Figura 16: Proliferazione espressa come % di riduzione dell'Alamar blue di condrociti umani cresciuti in presenza di plasma, PRP, HA, PRP/HA. I dati sono espressi come media e deviazione standard .....	53

Figura 17: Espressione dell'mRNA nei condrociti incubati con i differenti preparati. I dati sono stati normalizzati rispetto a GAPDH ed espresse come percentuale dei geni di riferimento. I dati sono espressi come media e deviazione standard.....55

# INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1: Studi in vitro .....	6
Tabella 2: Studi in vivo.....	8
Tabella 3: Concentrazione piastrine e leucociti nei differenti preparati utilizzati per l'analisi dei condrociti, media dei 10 volontari .....	19
Tabella 4: Concentrazione piastrine e leucociti nei differenti preparati per l'analisi dei sinoviociti, media dei 7 volontari.....	19
Tabella 5: Concentrazione dei fattori solubili nel L-PRP fresco e congelato a 1 ora e a 7 giorni dall'attivazione.....	24
Tabella 6: Differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ) tra attivatori per rilascio dei fattori di crescita nei tempi sperimentali osservati (in grassetto sono evidenziati gli attivatori che determinano i valori più elevati in termini di rilascio).....	34
Tabella 7: Punteggi degli score utilizzati nei pazienti trattati con PRP e HA. I dati sono espressi come media e deviazione standard.....	44
Tabella 8: Concentrazione delle citochine nell'L-PRP (media) .....	48
Tabella 9: Concentrazione dei fattori di crescita nell'L-PRP (media).....	48
Tabella 10: Valori basali della concentrazione di citochine in plasma e liquido sinoviale .....	48
Tabella 11: Disegno sperimentale.....	51
Tabella 12: Significatività tra gruppi .....	53
Tabella 13: Analisi di follow-up, significatività nei tempi sperimentali. ....	55
Tabella 14: Significatività tra gruppi dell'espressione genica.....	56