

Concentrato Piastrinico per uso rigenerativo

Laura Mazzucco

Responsabile Settore Produzione e Qualificazione Biologica Emocomponenti e Medicina Rigenerativa
S.C. Medicina Trasfusionale
Direttore: dott. Roberto Guaschino



Azienda Ospedaliera Nazionale
SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo
Alessandria



www.regione.piemonte.it/sanita



Sistema Sanitario Regionale del Piemonte

.....CONCENTRATO PIASTRINICO “per uso rigenerativo”

Da questo 1° lavoro...

Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit.* A. RALPH ROSENTHAL, CHRISTINA HARBURY, PETER R. EGBERT, AND EDWARD RUBENSTEIN.

A platelet-fibrinogen-thrombin mixture utilizing autologous platelets was studied for its potential as a corneal adhesive. In the rabbit it demonstrated sufficient adhesive properties to allow 50 per cent of lamellar keratoplasties (autotransplants) to remain in place without the use of sutures. The mixture retains significant adhesive properties for four to six days. It is simple to prepare and apply. It also appears nonantigenic and nontoxic to the cornea; it does not incite inflammation, nor interfere with corneal clarity or the resrowth of corneal ep

Investigative Ophthalmology
November 1975



L' utilizzo delle **piastrine** in medicina rigenerativa iniziò molti anni fa (Rosenthal et al 1975) seguendo il concetto razionale di portare direttamente nella sede delle lesioni tissutali fattori di crescita piastrinici per ricreare un microambiente favorevole alla neoangiogenesi ed alla rigenerazione di nuovo tessuto.

Ampio spettro di terminologia utilizzata in letteratura = enorme confusione!!!!

Knighton et al. 1986 = “Platelet Derived Wound Healing Factors (PDWHFs)”

Ann Surg. 1986 September; 204(3): 322–330.

Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF).
D R Knighton, K F Ciresi, V D Fiegel, L L Austin, and E L Butler

Marx et al. 1998 che lo definisce Platelet rich Plasma (PRP)

“Platelet-rich plasma is an autologous source of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta that is obtained by sequestering and concentrating platelets by gradient density centrifugation. This technique produced a concentration of human platelets of 338% and identified platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta within them.”

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998 Jun;85(6):638-46.

Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Miami School of Medicine, Coral Gables, Fla., USA.

“**PRP**” vengono identificati:

- 👉 preparati ottenuti con le più svariate tecnologie,
- 👉 preparati con concentrazioni di PLT variabile e contenuto cellulare diverso,
- 👉 preparati attivati o non attivati :

Anitua et al. 1999 = PRGF (Plasma Rich in Growth Factors)

Choukroun et al. 2001 = PRF (Platelet Rich Fibrin)

Bielecki et al. 2006 = PRP iniettabile;

Everts and al. 2008 = P- LRP (Platelet – Leucocyte rich Plasma) e PLG (Platelet Leucocyte Gel)



Contrariamente ai prodotti trasfusionali che sono completamente regolati in tutto il mondo il CP per uso rigenerativo è debolmente uniformato e regolatoma assimilabile...

La Medicina Trasfusionale definisce il CP come:

“emocomponente derivato dal sangue intero o da aferesi che contiene la maggior parte di piastrine in forma terapeutica efficace” (R(95)15 Consiglio d’ Europa – Technical Manual AABB)

sono definiti parametri internazionali per: volume, concentrazione, contenuto di piastrine in valore assoluto.

Product	Production system	Processed blood Vol dL	Product Vol. mL	Platelet content x 10 ¹¹	Platelet concentration x 10⁹ per mL
From single blood donation	Differential centrifugation	4.5	50~70 35~70 #	> 0.6	1 – 1.5
From pooled single donations	Differential centrifugation	18-27	120-240	> 2.4	1 – 1.5
From pooled buffy-coats *	Differential centrifugation	18-27	120-240	> 2.4	1 – 1.5
From single donor platelet apheresis	Cell separator	24-53	200-300	>2 3 #	1 – 1.5
From single donor plasma and platelet apheresis	Cell separator	24-53	200-300	>2	1 – 1.5

* Per uso trasfusionale , questo prodotto è ricostituito sostituendo il 70-80% del plasma originale con medium sintetico . Per il PRP per uso topico è richiesta la preparazione con plasma.

AABB recommendation (ref. 2).

concentrazione media di piastrine
utilizzata nella pratica trasfusionale,
pari a 1 -1.5 x 10⁹ mL

concentrazione media di piastrine
utilizzata per uso rigenerativo,
pari a 1 -2 x 10⁹ mL

Ruolo delle piastrine nel Wound Healing

Le piastrine contengono sostanze biologicamente attive, almeno 60 differenti, che sono coinvolte nei meccanismi di riparazione dei tessuti

noti e caratterizzati:

fattori della coagulazione,

fattori vasoattivi,

fattori di crescita : EGF, PDGF, TGF-beta, FGF, VEGF, IGF, CTGF,

famiglie di IL e TNF-alfa

In: Advances in Medicine and Biology, Volume 11
Editor: Leon V. Berhardt

ISBN: 978-1-61728-775-6
© 2009 Nova Science Publishers, Inc.

**Platelet Derivatives: A New Horizon
in Regenerative Medicine**

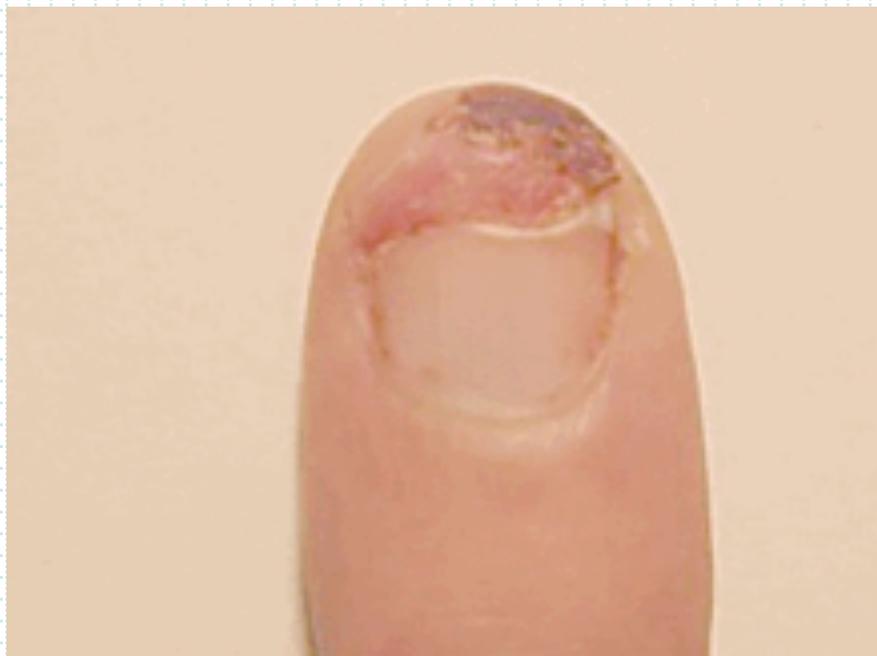
Elia Ranzato^{1,2}, Laura Mazzucco³ and Bruno Burlando¹

“La ferita è stata definita come una **distruzione** di normali strutture anatomiche e più importante, come **disturbo della funzionalità** causata da una lesione traumatica o accidentale”



gli epitelii di rivestimento, con la loro funzione fisiologica di barriera e di protezione verso l'ambiente esterno, sono i **GARANTI** del microambiente degli organi e dei tessuti che subiscono una immediata alterazione al momento della ferita

Il “DISEQUILIBRIO” che si genera a seguito della lesione attiva gli “**eleganti meccanismi**” della rigenerazione che andranno a sostituire la “struttura” che c’era prima dell’insulto



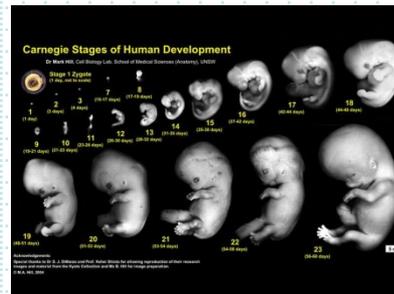
Basse le forme di vita, come le salamandre e i granchi, possono rigenerare i loro tessuti interamente



Gli organismi superiori, tra cui anche l'uomo, hanno perso questa capacità, e possono sostituire solo una quantità limitata di tessuti danneggiati con un processo di guarigione delle ferite e la formazione di cicatrici



Un'eccezione è rappresentata dalla fase fetale, durante la quale la riparazione delle lesioni avviene senza la formazione di cicatrici attraverso un processo di neoformazione di tessuto.



infatti ..anche se la struttura e la funzione del citoscheletro delle cellule nel feto e nell' adulto è identica,
il livello di espressione dei fattori di crescita nella riparazione dei tessuti è diverso



bassa e transitoria quantità di GF

riparazione perfetta

No infiammazione



alta quantità di GF

riparazione con grado variabile
di cicatrizzazione

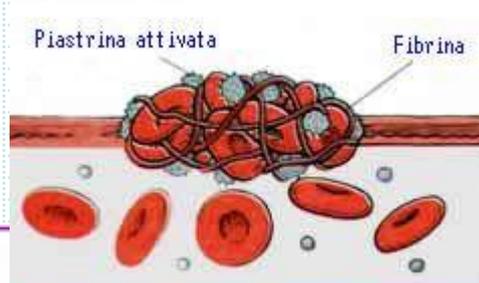
infiammazione

Il processo di guarigione

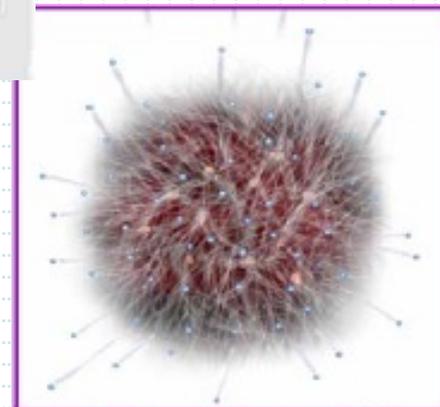
comporta ***tre fasi*** che si sovrappongono in modo consecutivo e ridondante :

- 1) Infiammazione
- 2) proliferazione
- 3) rimodellamento

fuoriuscita del sangue nel sito di lesione, le plt + elementi cellulari vengono a contatto con il collagene e gli altri componenti della matrice extracellulare.



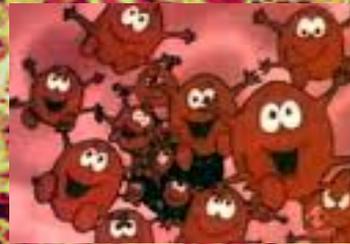
shape change
piastrinico



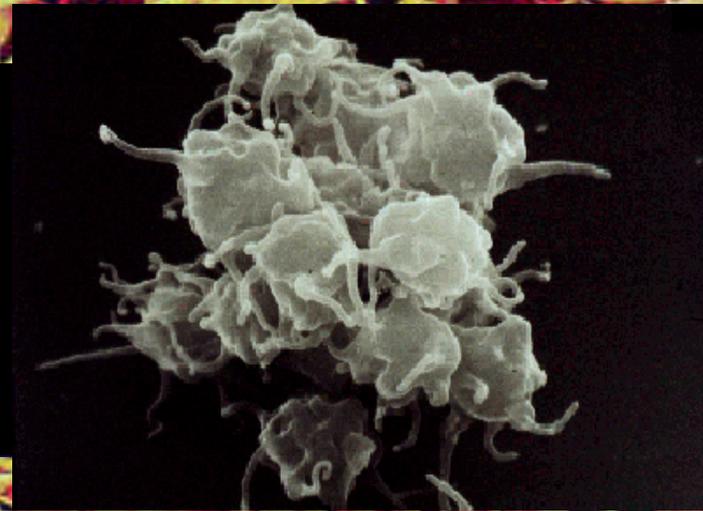
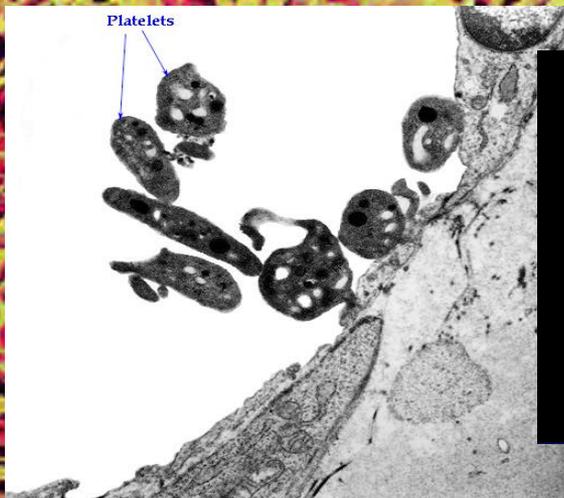
Il coagulo risultante dall' emostasi e fornisce una matrice per l'afflusso di cellule infiammatorie. Dopo l' arrivo delle piastrine dal letto vascolare, migrano verso la ferita neutrofili e monociti in risposta ad agenti chemiotattici. I macrofagi sono coinvolti in questa fase, per degradare e rimuovere i componenti danneggiati del tessuto connettivo, come il collagene, elastina e proteoglicani.

Le piastrine degranulano e secernono mediatori che vengono rilasciati nella zona danneggiata e vengono rilasciati inoltre glicoproteine adesive come la fibronectina e trombospodina che sono ingredienti importanti per la formazione di una transitoria matrice extracellulare.

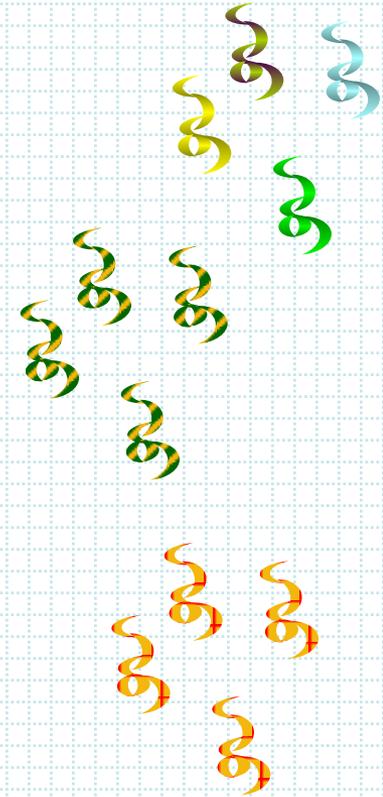
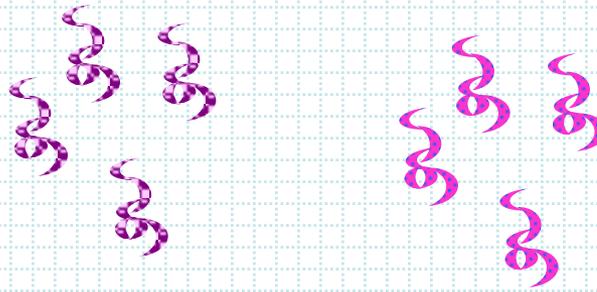
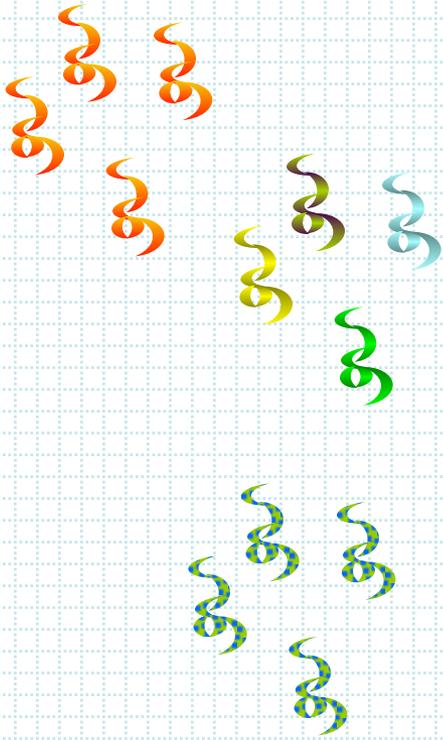
Le **PIASTRINE** da quiescenti (integrità strutturale e funzionale dell' endotelio)



Il trauma scopre la matrice extracellulare subendoteliale (ECM) e innesca l'adesione, l'attivazione, l'aggregazione e la degranulazione piastrinica.



risposta all'attivazione...



Fattori solubili

citochine

chemochine

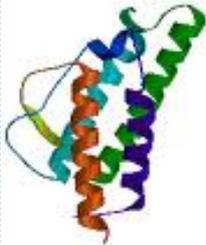
fattori di crescita

ormoni, elettroliti

Fattori solubili

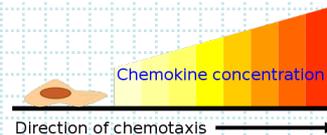
Citochine

Sono molecole proteiche che mediante il legame a recettori di membrana o citoplasmatici modulano: crescita, differenziamento e morte della cellule bersaglio.



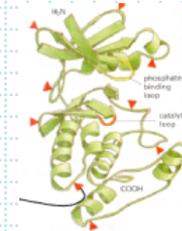
Chemochine

Le chemochine sono una sottoclasse di citochine con azione chemotattica. La loro funzione caratteristica è stimolare la migrazione cellulare.



Fattori di Crescita

In passato _ "fattore di crescita" = controllo della proliferazione cellulare. *Oggi* _ questi fattori sono importanti per una serie complessa di eventi: l' interazione cellula-cellula e cellula-matrice ed hanno un ruolo chiave nelle fasi del processo di guarigione di ferite. Si legano a recettori di superficie (tirosina-chinasi, serina-chinasi o treonina-chinasi) che trasducono il segnale all' interno della cellula fino ad indurne la proliferazione o il differenziamento.

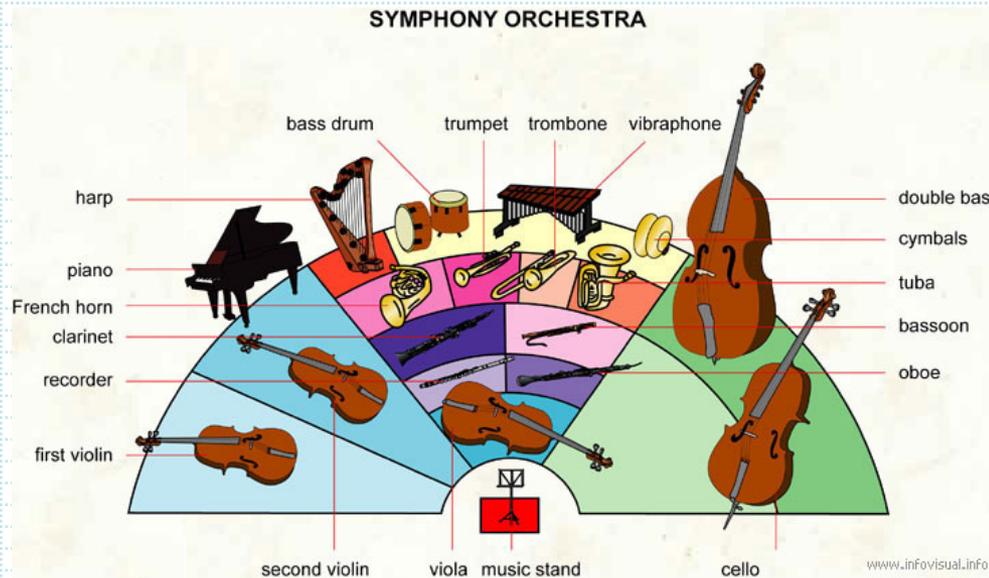


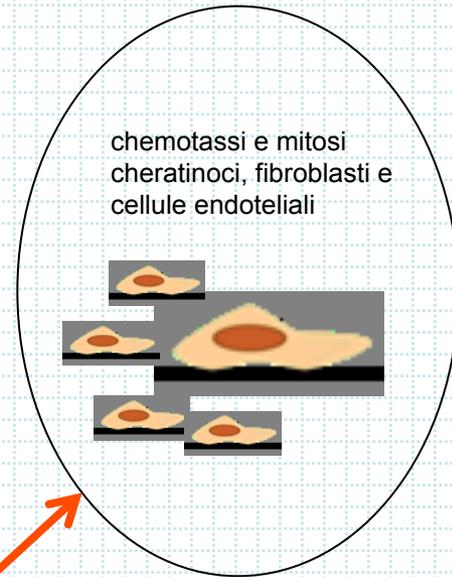
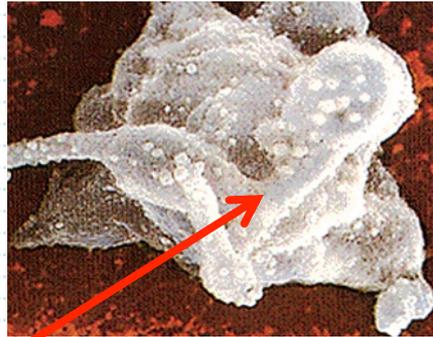
Le piastrine forniscono un pool di fattori di crescita che vengono liberati in modo sinergico e contemporaneo provocando un effetto biologico significativamente maggiore rispetto all' azione di un singolo fattore

[Platelet-Derived Factors Involved in Tissue Repair—From Signal to Function](#)

Transfusion Medicine Reviews, Volume 24, Issue 3, July 2010, Pages 218-234

Laura Mazzucco, Piero Borzini, Rajalakshmi Gope





f
e
r
i
t
a

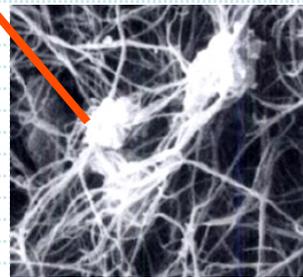
PLASMINOGENO e METALLOPROTEASI

VEGF
FGFb

EGF

PDGF

TGFβ

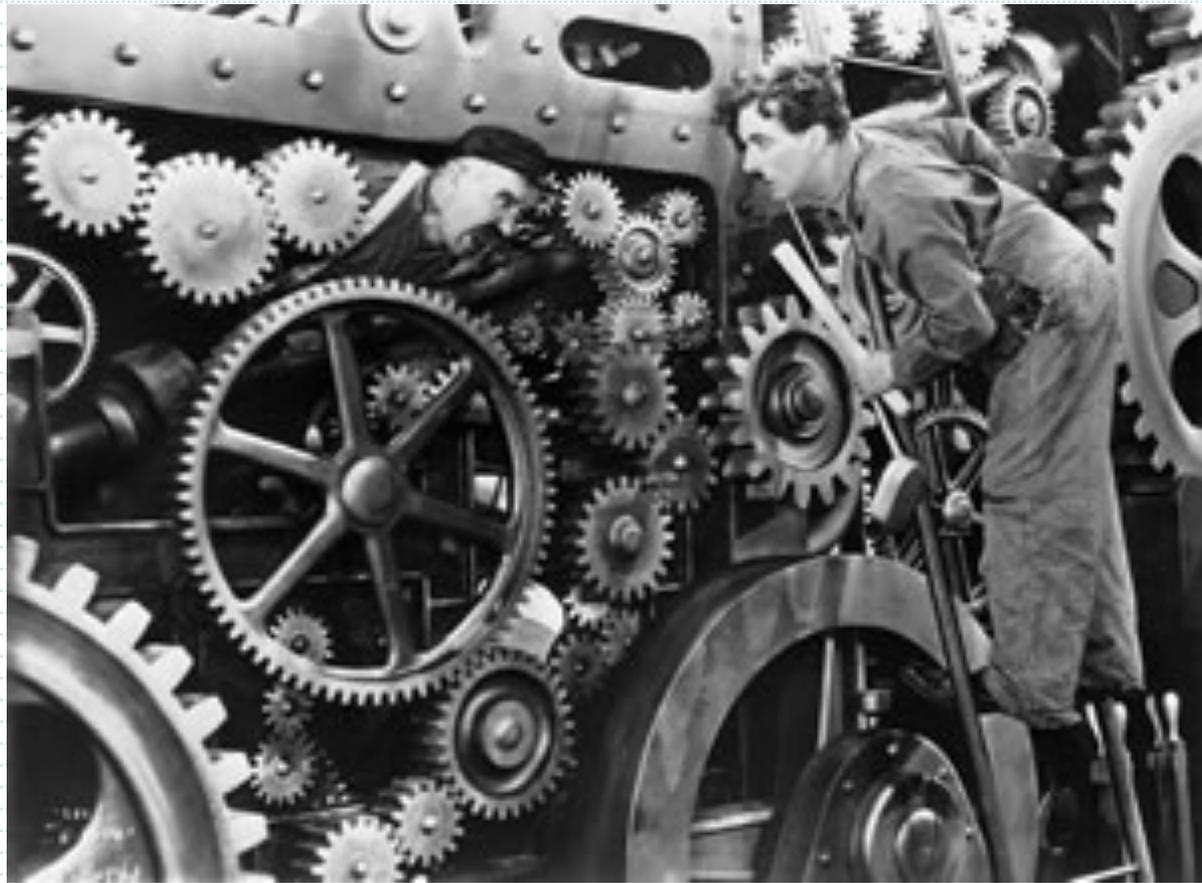


MITOGENO
CHEMOTATTICO

TRASFORMAZIONE DEI
FIBRO IN MIOFIBROBLASTI

ATTIVAZIONE DEI GENE DEL
CTGF DEI FIBROBLASTI
PER PRODURRE MATRICE

TGFβ / CTGF = FIBROSI e CHELOIDE

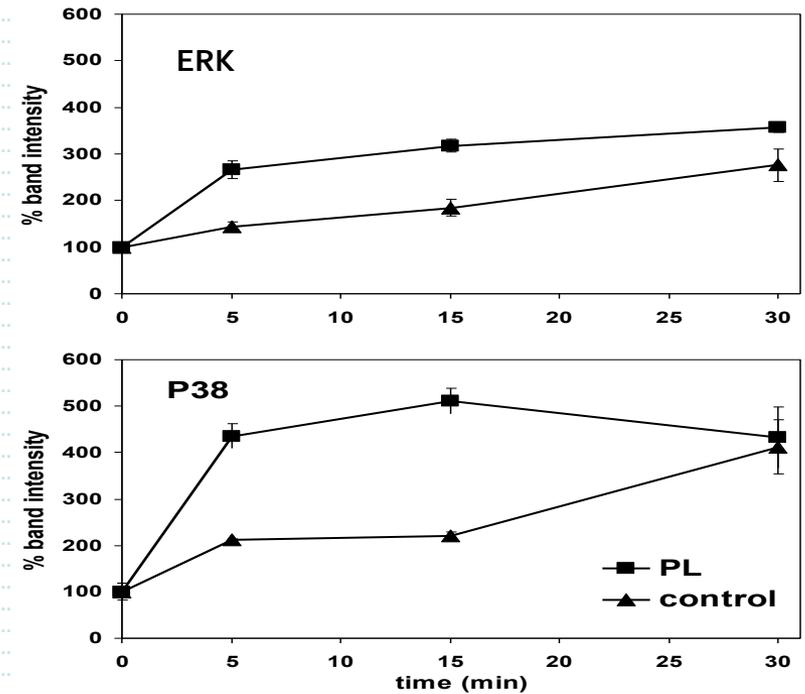
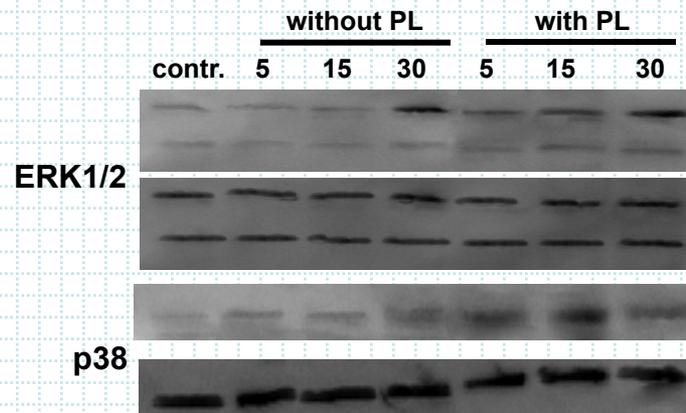


“Meccanismi *in vitro*”

Trasduzione del segnale

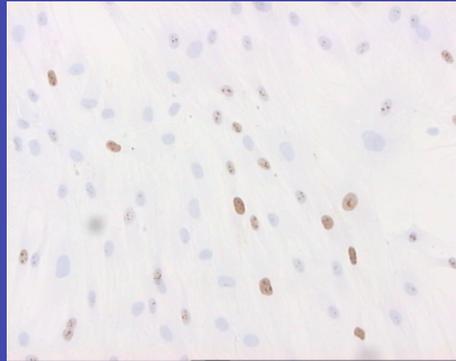
•Attivazione di MAP Kinasi: ERK e p38

- ERK e p38 regolano motilità, proliferazione e differenziazione della cellula nei meccanismi di riparazione della ferita

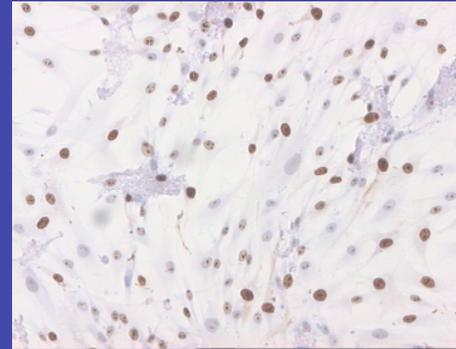


Valutazione della proliferazione

INDICE DI MITOSI

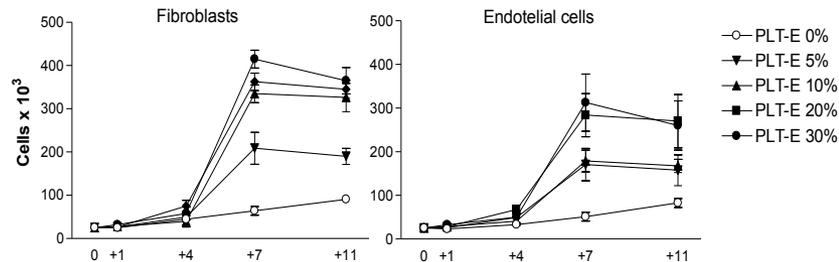


Controllo (Ki67 test)

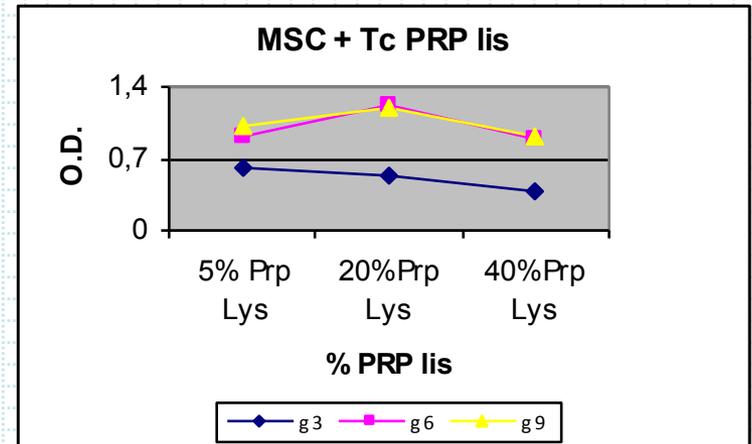


Pulse con PLT lys (Ki67 test)

CURVE DI CRESCITA

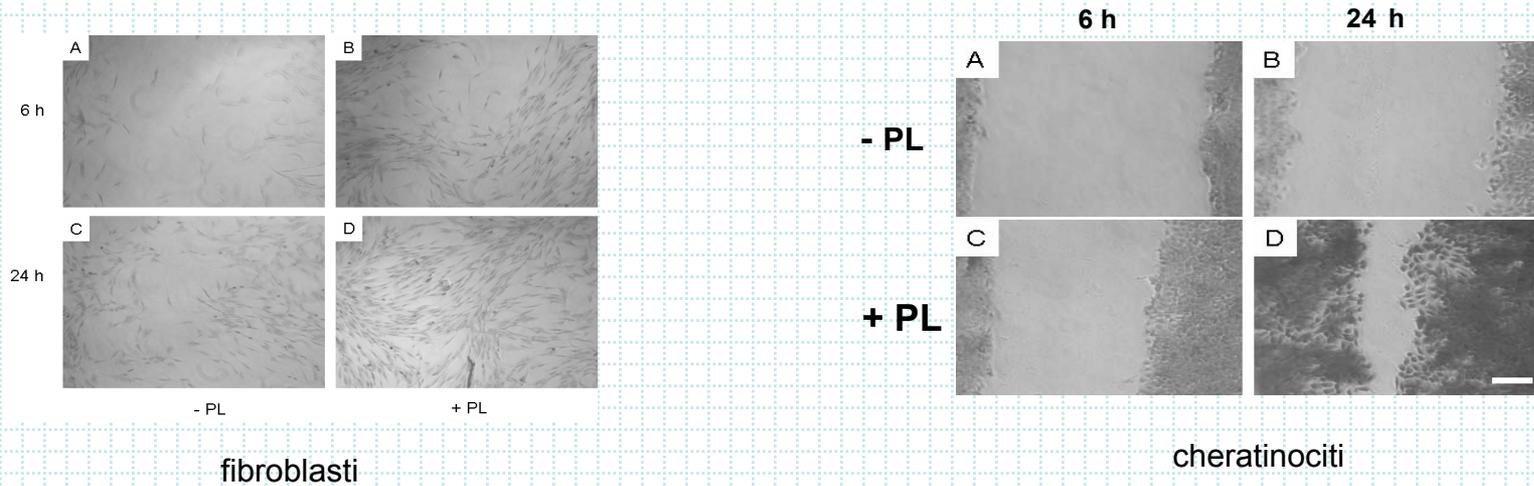


Effetto dose dipendente



Mimesi di ferita: Scratch Wound Assay.

valuta la migrazione delle cellule *in vitro* con la creazione di un "graffio" su un monostrato di cellule, l'effetto viene misurato sull'analisi e confronto di immagini acquisite ad intervalli regolari



CUTANEOUS BIOLOGY

BJD British Journal of Dermatology

Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes

E. Ranzato, M. Patrone, L. Mazzucco* and B. Burlando

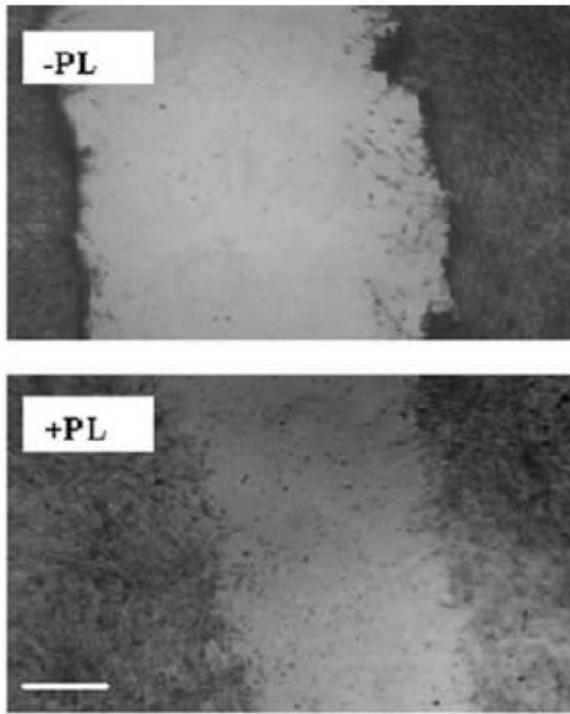
Department of Environmental and Life Sciences, University of Piemonte Orientale, via Bellini 25/G, 15100 Alessandria, Italy

*Department of Haematology & Blood Transfusion Medicine, Ospedale Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

British Journal of Dermatology 2008



Mioblasti C2C12



Cellule endoteliali

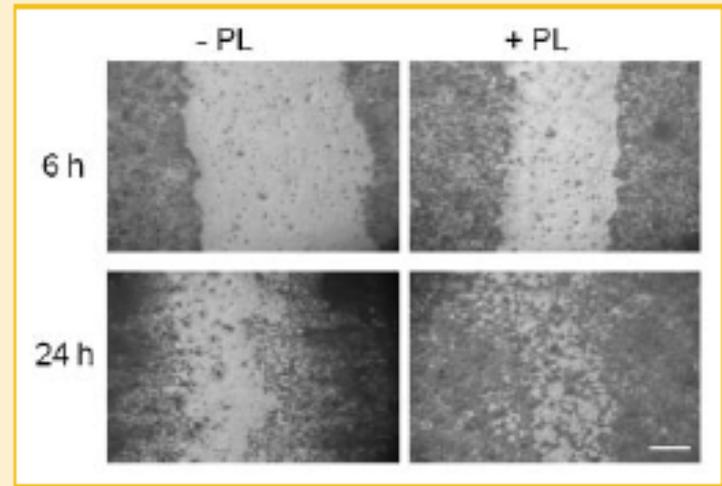


Fig. 2. Phase contrast micrographs of wound scratched HuVEC cells that were fixed and stained with blue-toluidine at 6 or 24 h after scratching, in the presence or absence of 20% PL. Scale bar: 300 μ m.



Cell Biology International 33 (2009) 911–917

Cell
Biology
International
www.elsevier.com/locate/cbi

Scratch wound closure of C2C12 mouse myoblasts is enhanced by human platelet lysate

Elia Ranzato^{a,*}, Valeria Balbo^b, Francesca Boccafoschi^{b,c}, Laura Mazzucco^b, Bruno Burlando^a

^a Department of Environment and Life Sciences, DISAV, University of Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", viale Terasa Michel 11, 15121 Alessandria, Italy
^b Department of Hematology & Blood Transfusion Medicine, Ospedale Sant'Antonio e Biogas e Centro Arterio, Alessandria, Italy
^c DIMEC, Department of Mechanics, Politecnico University of Torino, Torino, Italy

Received 25 January 2009; revised 13 May 2009; accepted 15 June 2009

ARTICLE

Journal of Cellular Biochemistry 110:783–793 (2010)

Journal of Cellular
Biochemistry

Role of ERK1/2 in Platelet Lysate-Driven Endothelial Cell Repair

Elia Ranzato,^{1,2*} Francesca Boccafoschi,³ Laura Mazzucco,⁴ Mauro Patrone,¹ and Bruno Burlando¹



DOSAGGIO DEI FATTORI DI CRESCITA

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE: Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34:665-671

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overvest EP, Box HA, van Zundert A: Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* 2006; 38:174-187

Borzini P, Mazzucco L: Tissue regeneration and in-loco administration of platelet derivatives. Clinical outcome, heterogeneous products, heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005; 35:1759-1767

Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel

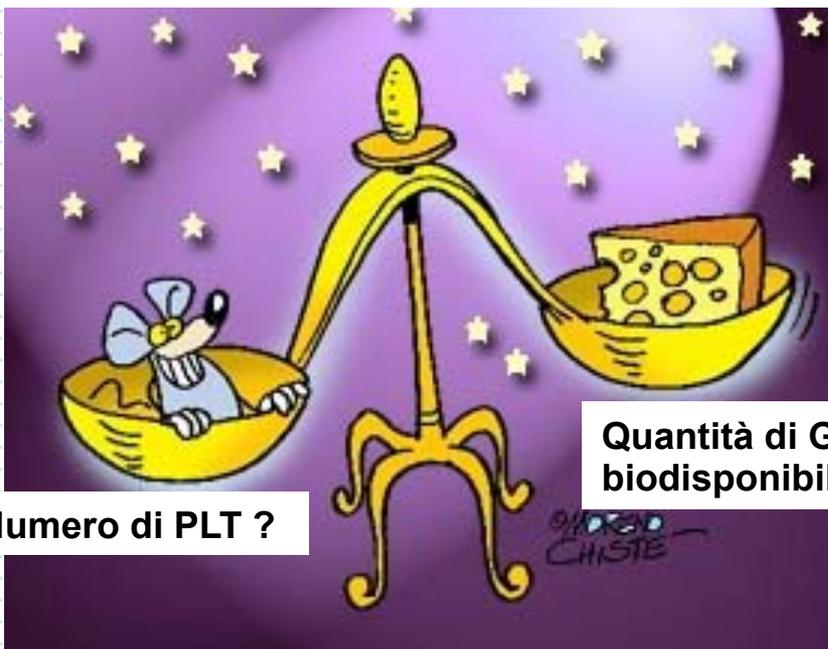
Chen Y, Su, Yi P, Kuo, Heng-Lu, Nieh, Yu H, Tseng, and Thierry Burnouf
TRANSFUSION Volume 48, November 2008

	PDGF-AB	PDGF-BB	TGF-β1	TGF-β2	b-FGF	VEGF	EGF	IGF-1
ng / 10 ⁹ platelets	56 (15-84)	11 (2-18)	113 (24-164)	0.046 (0.015-0.15)	0.018 (0.003-0.107)	0.61 (0.09-1.48)	2.28 (0.44-3.65)	61 (35-92)

Greppi N, Mazzucco L, et al 2010 *in press*

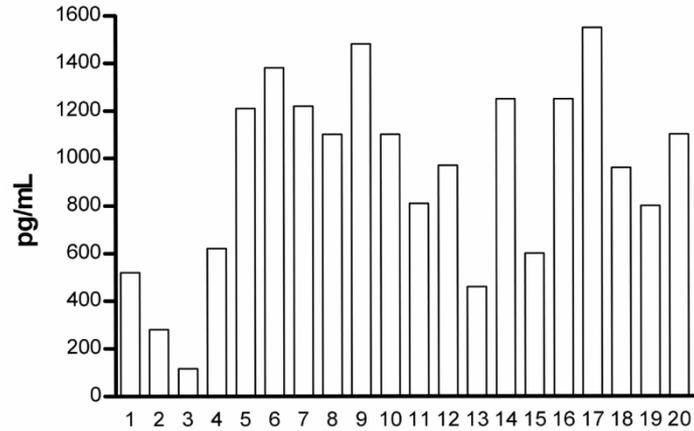
QUALITA' SPECIFICHE DI PRODOTTO / mL		
	valore medio	riferimento
concentrazione media piastrine/mL	1.2 x 10 ⁹	0.7 – 1.9 x 10 ⁹
concentrazione media PDGF-BB ng/mL	16	4 – 34
concentrazione media TGFβ ng/mL	17	17 – 22

**C' è un rapporto diretto
tra numero di piastrine e Fattori di Crescita rilasciati?
quale è la dose ottimale?**



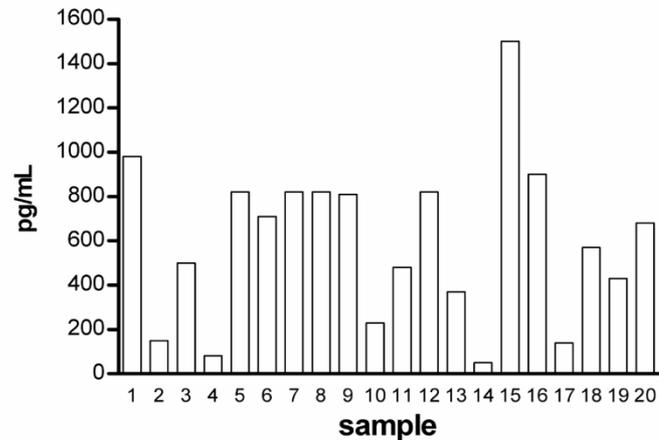
variabili: quantità individuale di GF
metodo di preparazione del CP
biodisponibilità

TGF



Variabilità individuale

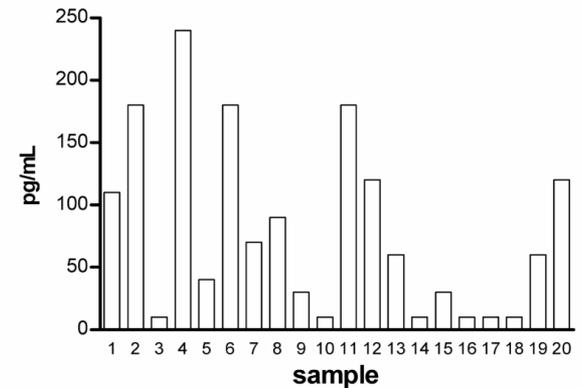
VEGF



Efficacia clinica = incremento di PLT da 4 - 6 volte rispetto al valore basale

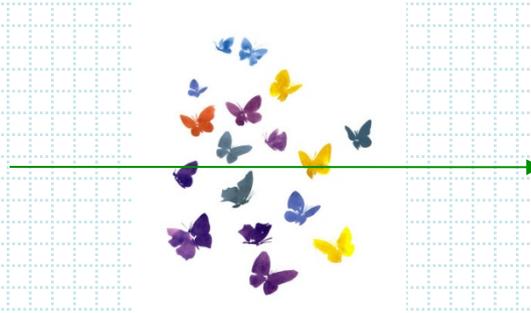
Borzini P, Mazzucco L: Tissue regeneration and in-loco administration of platelet derivatives. Clinical outcome, heterogeneous products, heterogeneity of the effector mechanisms. *Transfusion* 2005; 35:1759-1767

FGF



Processi di manipolazione / preparazione

Le piastrine sono estremamente sensibili e tutte le fasi del processo di preparazione **non devono** creare uno stress eccessivo tale da indurre rilascio di fattori di crescita



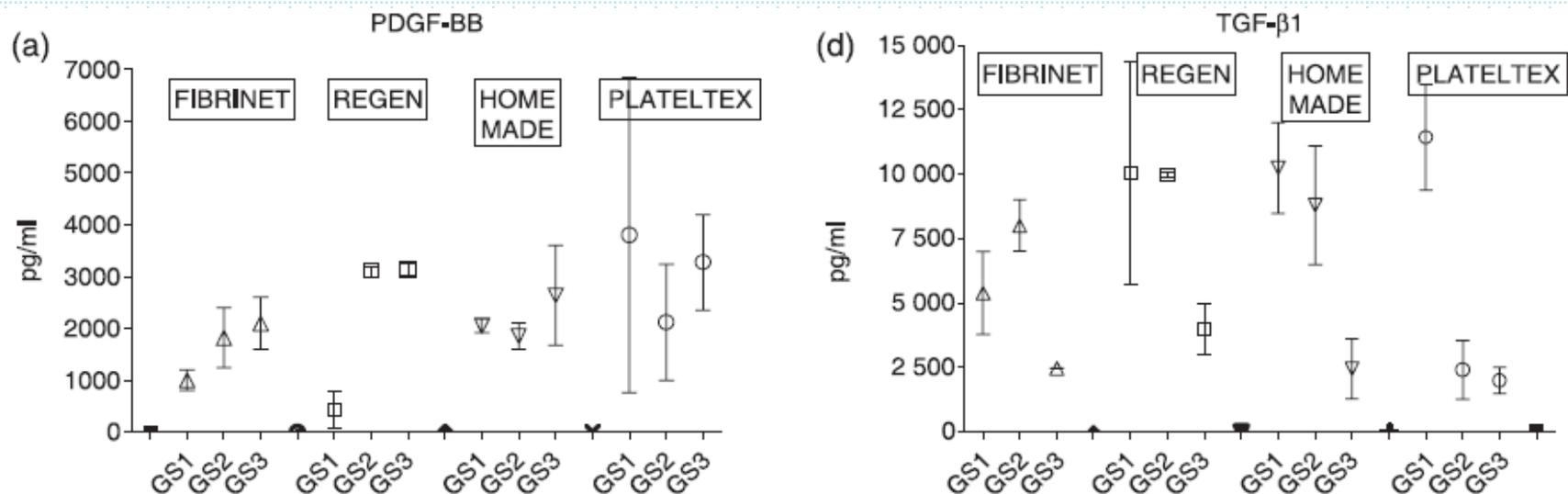
Step 1 Step 2 Step 3 Step 4 end

Not every PRP-gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet[®], RegenPRP-Kit[®], Plateltex[®] and one manual procedure

L. Mazucco,¹ V. Balbo,¹ E. Cattana,¹ R. Guaschino¹ & P. Borzini*

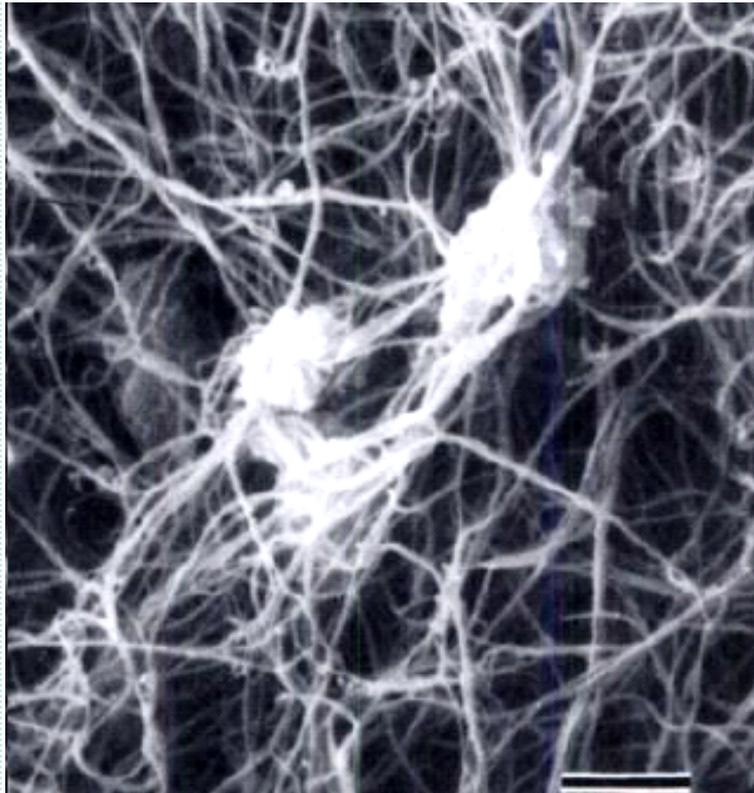
¹Centro Trasfusionale e Laboratorio Biotechnologie, Ospedale 'SS Antonio e Biagio', Alessandria, Italy

Conclusions Similar methods for platelet gel preparation revealed different performances concerning growth factor recovery and the kinetics of its release from the gel. It is unclear whether these noticeable differences are important for clinical management.

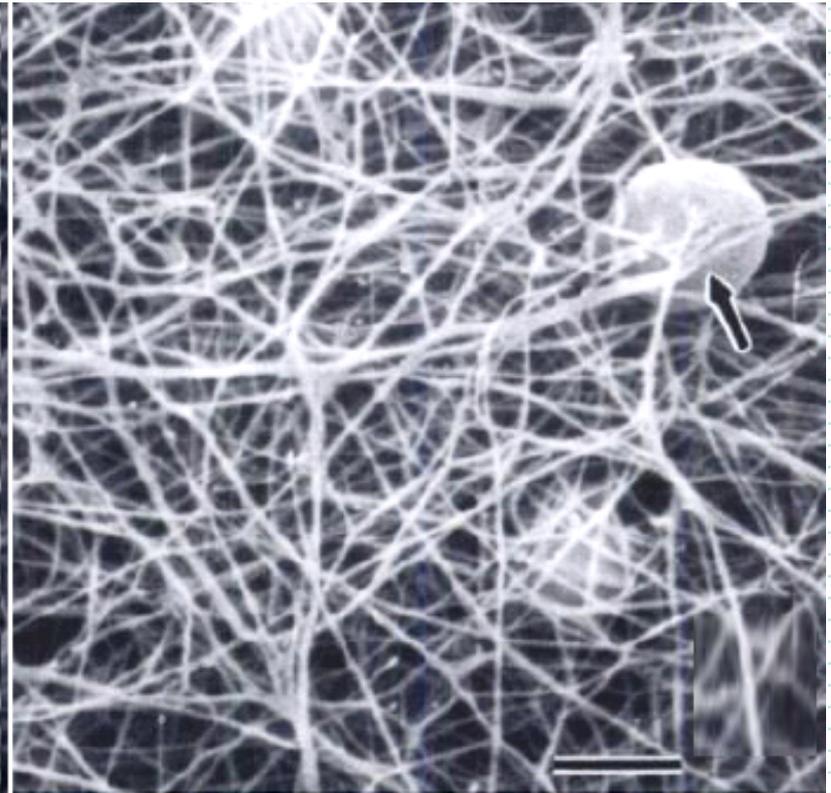




Tipologia di attivazione



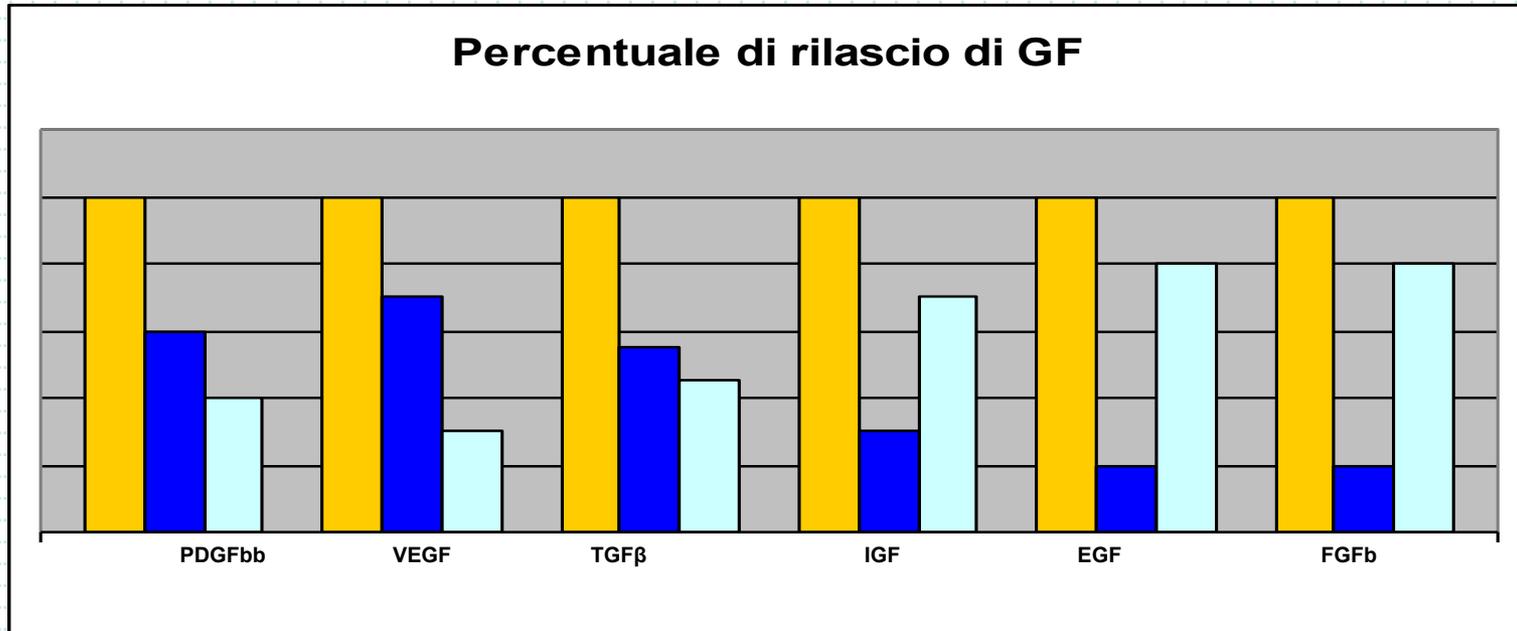
Attivazione con trombina



Attivazione con batroxobina

FIBRINA????? sembrerebbe.....ma è da confermare

Gel piastrinico - preparazione HM



- 100% CP pre attivazione
- % G1 attivazione
- % G7 incubazione a 37°C

Dati non pubblicati

ORIGINAL PAPER

Not every PRP-gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet®, RegenPRP-Kit®, Plateletex® and one manual procedure

L. Mazzoni, V. Ballo, E. Cattani, R. Giacchini, E. P. Borzini
*Centro Trapianto e Laboratorio Biomolecolare, Ospedale SS Antonio e Biagio, Alessandria, Italy

La fibrina quindi con la sua architettura gestisce assorbimento e rilascio di GF al tessuto circostante

Nell' ambito dell' introduzione di **nuove lavorazioni di prodotto...**

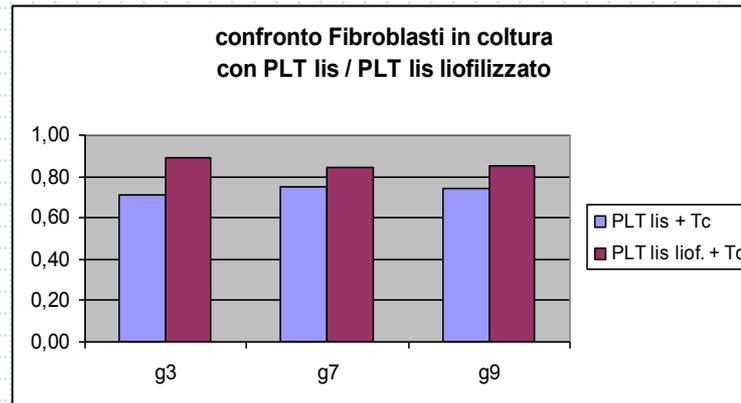
INATTIVAZIONE VIRALE

Trattamento CP con sistema di inattivazione (UV)	VEGF pg/mL	FGF pg/mL	IGF ng/mL	PDGFbb pg/mL	TGF (pg/ml)
CP	1551	245	47	23749	8070
CP inattivato	1069	184	46	17058	4654

Dati preliminari: studio coll. SIMT CUNEO – SIMT Alessandria

mantenimento e conservazione delle proprietà biologiche ...

LIOFILIZZAZIONE



Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds

Giorgio Pietramaggiore, MD^{1,2}; Arja Kaipainen, MD, PhD³; Joshua M. Czezugza, MS⁴; Christopher T. Wagner, PhD⁵; Dennis P. Orgill, MD, PhD⁶

Wound Rep Reg (2006) 14 573-580

Wound-healing properties of trehalose-stabilized freeze-dried outdated platelets

Ruth Sum; Sarah Heger; Giorgio Pietramaggiore; Dennis P Orgill; Josh Dev; Alan Rudolph; Cindy Green; G. Michael Espartero; and David Ho

TRANSFUSION Volume 47, April 2007

valutazione di influenza del trattamento sull' efficacia...

CONCLUSIONI

Il tentativo di ciascuno di noi è quello di avere una risposta per ciascuno di questi punti:

- a. sapere di che cosa si parla
- b. sapere come funziona
- c. sapere come (e quando) si usa
- d. sapere quanto costa e quanto rende (sia sul piano dell'efficacia clinica che sull'organizzazione per la preparazione e l'uso)
- e. garantire un minimo di standardizzazione di prodotto
- f. dare un nome a un prodotto (o più prodotti)
- g. indicare un costo di produzione del prodotto
- h. indicare una tariffa di rimborso per il suo utilizzo
- i. formare personale tecnico specializzato
- j. organizzare una rete di servizio

e allora sarà tutto più facile, chiaro e semplice



Dott. Piero Borzini

**Dott.ssa Valeria Balbo
Dott.ssa Elena Cattana
Dott.ssa Michela Peri
Dott.ssa Valentina Bisio
Prof. Mauro Patrone
Dott. Elia Ranzato
Prof. Bruno Burlando
Prof.ssa Maria Cavaletto**



Dott. Roberto Guaschino e tutti i colleghi del SIMT di Alessandria