



**Università
di Genova**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienza Mediche e Farmaceutiche

Corso di laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria

TESI DI LAUREA

“I fattori di crescita autologhi nella rigenerazione ossea. Utilizzo e preparazione dello Sticky Bone.”

Presidente: Chiar.ma Prof.ssa Maria Menini

Relatore: Chiam.mo Prof. Stefano Benedicenti

Correlatore: Prof. a.c. Ezio Gheno

Candidata: Andrea Martina Montegrosso

S4346597

Anno accademico: 2022-2023

Indice

1	FISIOLOGIA DEI PROCESSI DI GUARIGIONE.....	1
1.1	GUARIGIONE DELLA FERITA: PRINCIPI GENERALI	2
1.1.1	<i>Emostasi</i>	4
1.1.2	<i>Infiammazione</i>	10
1.1.3	<i>Fase di proliferazione</i>	16
1.1.4	<i>Fase di rimodellamento</i>	19
1.2	GUARIGIONE DEL TESSUTO OSSEO.....	20
1.2.1	<i>Tessuto osseo</i>	20
1.2.2	<i>Rimodellamento osseo</i>	28
1.2.3	<i>Meccanismi di guarigione</i>	32
1.3	MEDIATORI CHIMICI	37
1.3.1	<i>Principi e meccanismi generali</i>	37
1.3.2	<i>Fibrina</i>	43
1.3.3	<i>Piastrine</i>	45
2	EMOCOMPONENTI NON TRASFUSIONALI.....	48
2.1	INTRODUZIONE	48
2.2	EMOCOMPONENTI AD USO NON TRASFUSIONALE.....	48
2.2.1	<i>Emocomponenti ad uso non trasfusionale autologo od omologhi</i>	51
2.3	CLASSIFICAZIONE DEI PRODOTTI TERAPEUTICI DERIVANTI DA EUNT.....	51
2.3.1	<i>Concentrati piastrinici per uso non trasfusionale</i>	51
2.3.2	<i>Indicazioni cliniche</i>	55
2.4	CONCENTRATI PIASTRINICI DI PRIMA GENERAZIONE	56
2.4.1	<i>PRP</i>	56
2.4.2	<i>PRGF</i>	59
2.5	CONCENTRATI PIASTRINICI DI SECONDA GENERAZIONE	62
2.5.1	<i>PRF</i>	62
2.5.2	<i>CGF</i>	66
2.5.3	<i>Sticky Bone</i>	74
2.6	STICKY BONE PREPARATION DEVICE (SBPD®).....	77
2.6.1	<i>Descrizione del dispositivo</i>	78
2.6.2	<i>Preparazione con SBPD</i>	78
2.6.3	<i>Stima della popolazione cellulare</i>	80
3	SCOPO DELLA TESI.....	81

3.1	DESCRIZIONE DEI CASI.....	83
3.1.1	1° caso.....	83
3.1.2	2° caso.....	87
4	DISCUSSIONE	92
5	CONCLUSIONE	93
6	BIBLIOGRAFIA	93
7	RINGRAZIAMENTI	103

1 FISIOLOGIA DEI PROCESSI DI GUARIGIONE

I meccanismi che il nostro organismo attiva quando subisce una lesione sono: emostasi, fase di infiammazione ed infine rigenerazione. Tutti questi meccanismi fanno parte del più complesso processo di guarigione e sono fortemente condizionati da fattori che possono essere: fattori sistemici (età, sesso, stato ormonale, stato nutrizionale, malattie metaboliche, malattie sistemiche, malattie auto-immuni) o fattori locali (forma, dimensioni, sede, distanza dei lembi, necrosi, infezioni).

Con guarigione delle ferite si intende quell'insieme di processi che il nostro organismo è capace di attuare al fine di riparare un tessuto lesa. Il nostro organismo nel momento in cui si presenta una lesione può rispondere con un processo di rigenerazione, sostituendo le cellule danneggiate con cellule dello stesso tipo (in questo caso avremo un restitutio ad integrum) oppure con un processo di riparazione ovvero andando a sostituire il tessuto danneggiato con tessuto connettivo (in questo caso parliamo di fibrosi). L'inizio di un processo piuttosto che dell'altro dipende da tutta una serie di fattori che vanno a condizionare la risposta del nostro organismo e possono essere fattori sistemici o fattori locali. Per quanto riguarda i fattori sistemici è molto importante prestare attenzione a fattori ormonali e nutrizionali ma anche a particolari fattori legati alla vascolarizzazione ed eventuali disordini metabolici dell'individuo (nel caso del cavo orale, inoltre, è bene prestare attenzione anche al tabagismo); per quanto riguarda invece i fattori locali sono di fondamentale importanza dimensioni e localizzazione della ferita, stato di infezione della ferita e presenza o meno di corpi estranei al suo interno.

In questo capitolo andremo ad analizzare, passo dopo passo, i vari processi che costituiscono la guarigione in generale e successivamente ci concentreremo sulla guarigione del tessuto osseo, di particolare rilievo per la nostra tesi.

1.1 Guarigione della ferita: principi generali

Come sappiamo una qualsiasi lesione cellulare o tissutale, che sia una bruciatura, una lacerazione o una frattura, attiva una serie di eventi capaci di isolare l'area danneggiata e successivamente avviare i processi riparativi, i quali possono essere distinti in processi di rigenerazione e processi di riparazione.

Per definizione, la rigenerazione consiste nel ripristino totale del tessuto danneggiato o perso, come nel mondo animale avviene negli anfibi. La riparazione consiste, invece, nella ricostruzione parziale del tessuto, con frequente alterazione strutturale. Nei mammiferi la rigenerazione di un tessuto o di un organo è un evento pressoché impossibile e l'evento più prossimo è la rigenerazione epatica; ciononostante il termine rigenerazione è di uso comune per indicare la guarigione che può avvenire in tutti quei tessuti con un'elevata capacità proliferativa, che vanno incontro a continua proliferazione e che possono rigenerare dopo un insulto purché le cellule staminali non siano state distrutte.

Nell'uomo la guarigione è un evento che si intreccia e si sussegue al processo infiammatorio dopo la lesione di un tessuto o di un organo e può seguire due strade: la rigenerazione o la sostituzione (o riparazione). Nel primo caso si tratta di una guarigione per sostituzione, le cellule danneggiate vengono rimpiazzate da cellule dello stesso tipo; nel secondo caso il tessuto coinvolto non ha una capacità proliferativa adeguata alla rigenerazione e quindi si ha la sostituzione delle cellule danneggiate con formazioni di tessuto connettivo fibroso che formano una cicatrice permanente. Possiamo immaginare il tipo di guarigione a

cui andrà incontro un determinato tessuto, in base alle cellule che lo popolano, maggiore sarà la capacità proliferative delle suddette cellule e maggiore sarà la probabilità di una guarigione per rigenerazione.

Le cellule possono essere classificate come:

- a) labili: in stato proliferativo.
- b) stabili: in stato quiescente ma, se opportunamente stimolate, in grado di riprendere a proliferare.
- c) perenni: incapaci di proliferare.

Fanno parte dei tessuti a cellule labili il tessuto epiteliale di rivestimento, il tessuto epiteliale mucosecerno e il sangue. Gli organi parenchimatosi hanno, invece, tessuti a cellule stabili ed infine organi come il cuore, il sistema nervoso centrale e i muscoli scheletrici ospitano cellule perenni. Alla base della differente capacità proliferativa ci sono le cellule staminali, dalle quali parte e viene promossa la spinta proliferativa.

Come abbiamo detto, la possibilità di rigenerazione aumenta in base alla capacità proliferativa delle cellule che abitano il tessuto danneggiato ma non sempre questo è possibile. Affinché avvenga la ricostruzione del tessuto con le sue caratteristiche primitive, le cellule staminali devono essere a contatto con il connettivo e, in particolare, nel caso specifico degli epitelii, con la membrana basale. La guarigione è un sistema dinamico e complesso, altamente regolato da processi cellulari, molecolari ed umorali, che inizia subito dopo aver subito la lesione, a distanza di qualche minuto, e può durare mesi o anni.

La guarigione può ulteriormente essere divisa in guarigione di prima intenzione o di seconda intenzione e i meccanismi biologici coinvolti nell'una o nell'altra tipologia sono gli stessi ma cambia la loro intensità. (Marco Mozzati, 2017).

Nel caso di una guarigione per prima intenzione ci troviamo di fronte ad una ferita non infetta, a margini netti ed accostati, con scarsa perdita

di sostanza ed una limitata risposta infiammatoria e formazione di tessuto di granulazione (è il caso di una ferita chirurgica o una ferita che venga suturata). Nel caso di una guarigione per seconda intenzione, invece, ci troviamo di fronte ad una notevole perdita di sostanza, con margini distanti tra loro, e una possibile infezione (ferita sporca/infetta); in questo caso si avrà una massiccia risposta infiammatoria e una forte produzione di tessuto di granulazione, al fine di chiudere per tutta la sua estensione la ferita. Nelle ferite che guariscono per seconda intenzione abbiamo, quindi, sempre presenza di tessuto fibroso e di esiti cicatriziali.

Come abbiamo già detto le fasi della guarigione sono emostasi, infiammazione e proliferazione, che portano, nella maggior parte dei casi, alla rapida chiusura della soluzione di continuo formatasi con la ferita. A queste fasi segue il rimodellamento.

1.1.1 Emostasi

Nel momento in cui intercorre una lesione a livello vascolare la prima risposta che mette in atto il nostro organismo è l'emostasi, al fine di arrestare il sanguinamento. L'emostasi si compone da varie fasi:

- a) fase vascolare o vasocostrizione.
- b) fase piastrinica, nella quale abbiamo la formazione di un tappo piastrinico.
- c) fase coagulativa, nella quale abbiamo la formazione di un coagulo stabile.
- d) fase di trasformazione fibrosa.
- e) fase fibrinolitica, nella quale abbiamo lo smantellamento del coagulo.

1.1.1.1 Fase vascolare

La *fase vascolare* è l'innesco della coagulazione, comincia nel momento stesso in cui il vaso subisce una lesione e vi è l'esposizione del fattore tissutale: si ha una vasocostrizione arteriolare dovuta a meccanismi di difesa neurogeni che provocano spasmo miogeno locale della parete muscolare liscia del vaso e sostenuto dal rilascio locale di fattori, come l'endotelina (potente vasocostrittore di origine endoteliale), evocato dalla lesione stessa, al fine di ridurre il lume del vaso e diminuire, in maniera temporanea, la perdita di sangue. Maggiore è l'entità del danno vasale, maggiore sarà la superficie endoteliale esposta e maggiore sarà la risposta di vasocostrizione. La durata di questa fase può essere racchiusa in un intervallo di tempo che va da pochi minuti ad alcune ore, durante il quale vengono attivate le fasi successive ovvero la fase piastrinica e la fase coagulativa.

1.1.1.2 Fase piastrinica

La lesione porta all'esposizione di diverse sostanze subendoteliali ad azione trombogena, che si trovano nella matrice extracellulare, promuovendo così l'adesione e l'attivazione delle piastrine, le quali a loro volta secernono prodotti che stimolano l'aggregazione piastrinica. Durante la fase piastrinica, quindi, si ottiene la formazione di un tappo emostatico a matrice piastrinica e questo processo, insieme alle reazioni vascolari, prende il nome di emostasi primaria.

Per parlare della fase piastrinica dobbiamo prima fare una piccola introduzione sulle piastrine, alle quali successivamente dedicheremo un capitolo. Le piastrine, o trombociti, sono dei frammenti cellulari privi di nucleo, di circa 1- 4 μ m, derivanti da cellule più grandi, i megacariociti: cellule emopoietiche che iniziano a frammentarsi all'interno del midollo osseo e continuano questo processo una volta

migrate nei vasi sanguinei, in particolare in prossimità dei capillari sanguinei, nei quali, per via delle loro grandi dimensioni, faticano ad entrare. Le piastrine sono normalmente presenti in grandi quantità nel sangue di un individuo sano, in un range fisiologico di 150'000 – 400'000 unità/mm³ (Robbins, 2010). All'interno del citoplasma delle piastrine troviamo un serie di molecole molto importanti per le successive fasi della coagulazione e non solo, ad esempio il fattore XII (o fattore stabilizzante la fibrina), prostaglandine ed ormoni locali che influenzano numerose reazioni tissutali e vascolari locali e il PDGF ovvero il fattore di crescita derivato dalle piastrine, responsabile della proliferazione di diverse linee cellulari dedite alla riparazione della parete vasale (cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e fibroblasti vascolari).

Le piastrine circolano liberamente all'interno dei vasi sanguinei ed in condizioni fisiologiche non si attaccano alla parete dei vasi. Questo è possibile poiché sono rivestite da glicoproteine che ne impediscono l'adesione all'endotelio integro ma che, nel momento in cui si presenta una lesione dello stesso, favoriscono l'adesione alle cellule connettivali sottoendoteliali, in particolar modo in quei punti in cui vi è esposizione di molecole di collagene, solitamente situato negli strati più profondi della parete vasale, e la glicoproteina di adesione vWF. Le piastrine hanno un'emivita di 8 - 12 giorni e svolgono un ruolo attivo all'interno dell'emostasi. All'esaurirsi delle loro funzioni le piastrine vengono eliminate dal circolo ematico interessato dalla lesione tramite il sistema dei macrofagi tissutali.

La formazione del tappo piastrinico, come abbiamo accennato precedentemente, comincia nel momento in cui le piastrine aderiscono alla parete endoteliale lesa, in particolare al collagene esposto e al fattore di Von Willebrand (glicoproteina vWF), derivante dal plasma che si infila nei tessuti danneggiati. È a questo punto che le piastrine vanno incontro ad una serie di modificazioni che porteranno all'emostasi primaria. Primariamente si ha un cambio di forma delle

piastrine e la loro adesione al tessuto connettivo endoteliale: passano dall'essere dei dischi ad essere frammenti di forma irregolare dai quali protrudono numerosi pseudopodi e l'adesione viene mediata soprattutto del fattore di Von Willebrand che agisce come molecola ponte tra la matrice extracellulare e i recettori di superficie piastrinici. Successivamente vi è una violenta contrazione delle proteine contrattili, specificamente actina, miosina e trombostenina, contenute all'interno delle piastrine che causa esocitosi, ovvero la fuoriuscita di numerose sostanze attive. Questa reazione di rilascio ha come fine la degranolazione delle piastrine e delle sostanze contenute al loro interno, in particolare di calcio, fondamentale nella cascata della coagulazione, e di ADP, molecola fortemente coinvolta nell'attivazione dell'aggregazione piastrinica, oltre che importante stimolatore di ulteriore rilascio di ADP (amplificazione del processo). Infine si avrà l'aggregazione piastrinica (segue adesione e secrezione), processo che riceve un grande input sia dalla secrezione di grandi quantità di ADP sia dalla produzione da parte degli enzimi piastrinici di trombossano A₂ (TxA₂, molecola che agisce sulla vasocostrizione). Queste due sostanze vanno a stimolare ed attivare altre piastrine, favorendo così il reclutamento e l'adesione di nuove piastrine a quelle che già hanno aderito alla parete endoteliale lesionata. Si determina quindi, a seguito di una lesione, una sequenza di eventi che causa un'attivazione successiva e sempre crescente di piastrine, fino a formare un vero e proprio tappo piastrinico. Infine, le piastrine permettono, tramite un gradiente chemiotattico, ai leucociti una migliore infiltrazione a livello tissutale, l'attivazione della risposta infiammatoria, stimolano la sintesi di collagene, partecipano alla neo-angiogenesi e alla riepitalizzazione della ferita; tutto questo grazie ad una serie di citochine e fattori di crescita che le piastrine rilasciano e producono una volta attivate e che noi andremo ad analizzare più approfonditamente in un capitolo dedicato. Questa serie di eventi avviene a distanza di pochi minuti dalla lesione stessa e, insieme alla fase di vasocostrizione iniziale, viene

definita come emostasi primaria. Le successive fasi della coagulazione, definite emostasi secondaria, possono non essere necessarie se la lesione in questione è limitata al letto capillare, in quanto queste due prime fasi sono sufficienti ad arrestare la perdita di sangue e riparare l'endotelio danneggiato, nel caso di lesioni molto ridotte. La formazione del tappo piastrinico all'interno del nostro organismo è un meccanismo di fondamentale importanza, poiché ogni singolo giorno, a livello capillare, avvengono migliaia di piccole emorragie, le quali vengono subito arginate. L'emostasi primaria porta alla formazione di un tappo piastrinico ad aggregazione reversibile, il quale può diventare irreversibile nel momento in cui si sovrappone l'attivazione della cascata coagulativa, che genera la formazione di trombina e la conseguente stabilizzazione del tappo piastrinico; si otterrà così un'emostasi secondaria.

1.1.1.3 Fase coagulativa

La fase di coagulazione è la terza componente del processo emostatico e porta alla formazione del coagulo insolubile di fibrina, derivante dalla trasformazione del precursore plasmatico solubile: il fibrinogeno. Oltre alla fibrina, partecipano alla formazione del coagulo anche fibronectina, vitronectina, trombospondina e, ovviamente, piastrine. Questo sistema di reazioni biochimiche viene attivato sempre nei primi minuti successivi alla lesione e ha una velocità direttamente proporzionale alla grandezza della ferita: maggiore sarà l'entità della lesione, più velocemente si avrà la formazione di un coagulo stabile e dell'emostasi secondaria. Nella maggior parte dei casi l'apertura del vaso sarà completamente occlusa dal coagulo nel giro di 3-6 minuti, il quale successivamente (tra i 20 e i 60 minuti dalla lesione) inizierà a ritirarsi, contribuendo ad un ulteriore restringimento del lume vasale. Il coagulo è formato da filamenti di fibrina orientati in tutte le direzioni,

organizzati in maniera tale da formare una rete che possa trattenere tutte le cellule ematiche, le piastrine e il plasma. Questa rete aderisce alla parete lesionata tramite i filamenti di fibrina e impedisce la fuoriuscita di sangue nei tessuti. Inoltre, come visto in precedenza, la presenza di piastrine nel coagulo favorisce l'infiltrazione leucocitaria, mediante il rilascio di citochine e fattori di crescita, e contribuiscono così all'attivazione del processo infiammatorio, alla sintesi del collagene, alla neoangiogenesi e alla riepitelizzazione della ferita.

1.1.1.4 Fase di trasformazione fibrosa e fase fibrinolitica

Il coagulo una volta formato può prendere due strade: nel caso in cui la lesione non sia particolarmente estesa e non si sia verificato un importante stravasato di sangue a livello tissutale, avremo l'invasione del coagulo da parte dei fibroblasti, promossa da un fattore di crescita rilasciato dalle piastrine, fino alla formazione di tessuto connettivo all'interno di tutto il coagulo. Questo processo dura circa 2 settimane, ovvero il tempo necessario per la completa organizzazione del coagulo in tessuto fibroso. Questo è il punto di partenza per i meccanismi dell'infiammazione e della riparazione tissutale. Altrimenti, nel caso di grande fuoriuscita di sangue a livello dei tessuti, si avrà in prima battuta una fase fibrinolitica atta alla dissoluzione del coagulo. Questa fase parte dall'interno del coagulo stesso; infatti durante la formazione della struttura fibrinica, al suo interno, rimangono intrappolate grandi quantità di proteine plasmatiche, tra cui il plasminogeno, precursore della proteina responsabile della lisi del coagulo. È un processo che comincia a distanza di pochi giorni dalla lesione: i tessuti e l'endotelio lesi secernono molto lentamente l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) che trasforma il plasminogeno in plasmina. Ed è proprio la plasmina che pochi giorni più tardi, una volta che le fasi di emostasi si sono concluse e l'emorragia è stata bloccata, va a rimuovere il coagulo,

diventato ormai inutile, permettendo così la riapertura dei vasi e una regolarizzazione del flusso sanguigno nel lume.

1.1.2 Infiammazione

Con *fase infiammatoria* si intende una risposta di tipo protettivo con il fine di liberare l'organismo dalla causa iniziale della lesione e dai prodotti dello stimolo lesivo; questo genere di risposta si attiva indipendentemente dal tipo di lesione, dalla sua sede e dall'agente eziologico da cui è stata innescata. È una risposta complessa del nostro organismo che si verifica a livello dei tessuti e si manifesta principalmente con reazioni di tipo vascolare e leucocitario. Si tratta, generalmente, di un processo acuto e locale, che non interessa tutto l'organismo, volto ad indurre profonde modificazioni secondarie nei tessuti adiacenti la lesione. Le cellule protagoniste della risposta infiammatoria, deputate a combattere invasori esterni e lesioni cellulari, sono principalmente le proteine plasmatiche e globuli bianchi (leucociti) presenti nel sangue, quindi circolanti e capaci di raggiungere qualsiasi distretto corporeo. Il meccanismo dell'infiammazione permette di coordinare le varie reazioni a livello vascolare con il fine di reclutare e far migrare, il più velocemente possibile, leucociti e proteine plasmatiche a livello dei tessuti danneggiati. La fase infiammatoria inizia nel momento in cui si manifesta la lesione e, come adesso inizieremo a vedere, le fasi di emostasi, coagulazione, infiammazione e processi di rigenerazione e riparazione, non sono necessariamente gli uni successivi agli altri bensì si sovrappongono e spesso sono gli stessi tipi di cellule e di mediatori ad intervenire in più fasi della guarigione delle ferite; la risposta infiammatoria è strettamente collegata con i processi di riparazione tissutale.

L'infiammazione acuta ha un esordio precoce e di breve durata, si innesca nel momento in cui si presenta lo stimolo lesivo (nell'arco di pochi minuti da quando è avvenuto l'insulto) e cessa nel momento in cui questo viene eliminato (generalmente nell'arco di qualche giorno). I suoi principali meccanismi di azione sono l'edema, ovvero la formazione di un essudato composto da liquido e proteine plasmatiche, e la migrazione nei tessuti da parte dei leucociti, in particolare granulociti neutrofilici. Macroscopicamente invece i suoi segni principali possono essere identificati nei seguenti: rubor (rossore della parte interessata), tumor (gonfiore), calor (aumento della temperatura dei tessuti infiammati), dolor (dolore) ed infine functio laesa (perdita di funzione della parte interessata). Essendo una risposta aspecifica qualsiasi sia l'insulto ricevuto dall'ospite rimane invariata e consiste in tre componenti che andremo poi a sviscerare in maniera più dettagliata: modificazioni dei diametri vascolari al fine di aumentare il flusso ematico nel distretto colpito, modificazione a livello della microvascolarizzazione capillare che consentono a proteine plasmatiche e leucociti di lasciare il letto vasale ed entrare a livello dei tessuti, accumulo nella sede della lesione ed attivazione al fine di eliminare l'agente lesivo.

Si tratta di una serie di meccanismi volti alla migrazione di leucociti e proteine plasmatiche circolanti nella sede della lesione; il processo di fuoriuscita di liquidi e cellule ematiche all'interno dei tessuti extravascolari, come tessuti interstiziali e cavità corporee, prende il nome di essudazione. Essudato: liquido extravascolare con un'elevata concentrazione proteica, contenente detriti cellulari. Dove è presente essudato è presente aumentata permeabilità capillare e quindi risposta infiammatoria.

La prima reazione a livello vascolare è la vasodilatazione, successiva alla contrazione vasale atta a conseguire l'emostasi, e interessa inizialmente le arteriole e successivamente il letto capillare. Questo porta all'aumento del flusso sanguigno nella zona e alla comparsa dei

classici segni di calor e rubor, ovvero l'eritema della zona infiammata. Questa vasodilatazione è mediata da diverse molecole, in particolare intervengono maggiormente istamina e ossido di azoto (NO), che vanno ad agire sulla muscolatura liscia dei vasi.

Questa vasodilatazione, unitamente alla iniziale fuoriuscita di liquidi a livello interstiziale, causa una stasi, ovvero un rallentamento del flusso nella zona capillare interessata dall'infiammazione, che comporta una congestione vascolare con un accumulo di cellule nella zona, in particolare neutrofili ed altri mediatori dell'infiammazione. Questi mediatori fanno sì che le cellule endoteliali siano attivate ed esprimano un maggior numero di molecole di adesione per i leucociti, i quali a questo punto riescono a passare velocemente la parete vasale ed a raggiungere i tessuti interstiziali. Si ha così la formazione dell'essudato e clinicamente la comparsa di edema.

Come abbiamo già accennato, un ruolo fondamentale all'interno della risposta infiammatoria viene svolto dai leucociti, in particolare quelli con funzione fagocitaria: neutrofili e macrofagi. Infatti, queste cellule sono in grado di inglobare ed uccidere i batteri o altri microorganismi presenti a livello della lesione e fagocitare sostanze estranee e tessuti necrotici. Inoltre, svolgono un ruolo importante anche nei processi di riparazione poiché sintetizzano e secernono importanti fattori di crescita.

Le tappe che deve affrontare un leucocita per passare dal lume vasale al liquido interstiziale sono sostanzialmente tre: adesione all'endotelio, migrazione attraverso la parete vasale e migrazione nei tessuti guidati da uno stimolo chemiotattico.

Adesione dei leucociti all'endotelio: la prima fase è quella della marginazione, ovvero della redistribuzione periferica dei leucociti all'interno del vaso. Questa è dovuta essenzialmente al fenomeno della stasi che comporta una serie di alterazioni emodinamiche e l'aumento di concentrazione di cellule leucocitarie lungo le pareti vasali. A questo

punto inizia il rotolamento: i leucociti, prima singolarmente e poi in aggregati filiformi, aderiscono temporaneamente all'endotelio per poi staccarsi, rotolare e attaccarsi nuovamente in una nuova posizione e ripetono questo processo fino a che non si fermano su un punto di adesioni più saldo, sul quale riescono ad aderire in maniera stabile (forse devo descrivere il processo fisiologico del perché fanno così). Terminato il processo di rotolamento viene a crearsi un legame stabile con la parete vasale ed inizia la fase successiva ovvero quella della migrazione attraverso l'endotelio, detta anche transmigrazione o diapedesi. Questo meccanismo è mediato da un gradiente di concentrazione chimica, infatti, i leucociti migrano attraverso gli spazi interstiziali dell'endotelio guidati dal gradiente chemiotattico delle chemochine, che sono prodotte, e quindi maggiormente concentrate, nella zona della lesione, dove verranno legati da alcune proteine, come le integrine e le proteine della matrice extracellulare, in maniera tale da essere trattenuti nella sede della lesione dove devono svolgere la loro funzione. La chemiotassi è quindi l'ultima fase per i leucociti prima di raggiungere la zona lesa ed è di fondamentale importanza per guidare la risposta infiammatoria nei tessuti interessati dall'insulto lesivo. Si tratta di un vero e proprio movimento orientato lungo un gradiente chimico. Questo gradiente può essere favorito sia da sostanze endogene che esogene. Le sostanze esogene più comuni sono i prodotti batterici mentre le sostanze endogene comprendono numerosi mediatori chimici come: citochine, soprattutto appartenenti alla famiglia delle chemochine, componenti del sistema del complemento e metaboliti dell'acido arachidonico. Tutte queste molecole si legano a specifici recettori transmembrana sulla superficie dei leucociti, i quali vengono così indotti alla produzione di filamenti di actina anteriormente e filamenti di miosina posteriormente che diventano la porzione trainante del leucocita stesso. Il leucocita si muove, quindi, grazie alla formazione di filopodi dai quali viene trainato in direzione dell'estensione (come una macchina a trazione anteriore). La

popolazione dell'infiltrato leucocitario cambia con il passare del tempo; infatti, inizialmente, nelle prime 6-24 ore, la popolazione predominante è composta da neutrofili che, successivamente, 24 – 48 ore, vengono sostituiti da monociti. Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale all'interno della risposta infiammatoria, in particolare grazie alla loro funzione fagocitaria: neutrofili e monociti (trasformati poi in macrofagi), infatti, sono in grado di inglobare ed uccidere i batteri o altri microorganismi presenti a livello della lesione e fagocitare sostanze estranee e tessuti necrotici. Inoltre, svolgono un ruolo importante anche nei processi di riparazione poiché sintetizzano e secernono importanti fattori di crescita.

I primi a raggiungere i margini della ferita ed infiltrarsi nei tessuti, come abbiamo detto, sono i neutrofili. Generalmente rimangono nella ferita per un periodo di 2-5 giorni, salvo infezione della stessa e svolgono attività di fagocitosi dei batteri presenti e del tessuto necrotico, produzione di enzimi che agiscono sull'ECM e produzione di citochine e chemochine che agiscono su altri attori della risposta infiammatoria (ad esempio fattore di necrosi tumorale, chemochine per monociti, proteina infiammatoria macrofagica). Vi sono inoltre indicazioni che lasciano intendere che i neutrofili producano anche fattori di crescita per i cheratinociti e cellule connettivali, quali i fibroblasti. Gradualmente, dopo 48 ore, i neutrofili vengono sostituiti dai monociti i quali a loro volta vengono trasformati in macrofagi dal TGF- β . Questo è dovuto al fatto che i neutrofili non solo sono il tipo cellulare più abbondante in circolazione e che si attaccano più facilmente alla parete endoteliale ma anche al fatto che hanno una vita piuttosto breve (24-48 ore) e vanno velocemente in apoptosi. Al contrario, i monociti sono più longevi e possono anche proliferare all'interno dei tessuti; queste caratteristiche li rendono la popolazione maggiormente concentrata nei processi di infiammazione cronica.

Una volta formatosi l'infiltrato leucocitario all'interno del tessuto il passo successivo consiste nell'*attivazione* vera e propria *dei leucociti* e

consta principalmente di due fasi: il riconoscimento dell'agente lesivo e la conseguente attivazione del leucocita che attacca e distrugge il suo bersaglio, ampliando la risposta infiammatoria. I leucociti, quindi, attueranno tutta una serie di funzioni come la fagocitosi, l'ingestione e la degradazione, al fine di liberare il tessuto da agenti lesivi (come i microbi e i loro prodotti) e da tessuti necrotici e cellule morte.

Oltre a queste funzioni di difesa e "pulizia", i leucociti, in particolare i macrofagi, partecipano e guidano, tramite la produzione di fattori di crescita in grado di stimolare la proliferazione delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e la sintesi di collagene e di enzimi coinvolti nel rimodellamento del tessuto connettivo, al processo di riparazione tissutale. Il macrofago ha quindi il compito di fagocitare tessuti necrotici e batteri ma è di fondamentale importanza anche per avviare la fase successiva della guarigione, ovvero la fase proliferativa. Infatti questo tipo di cellula ha la capacità di secernere fattori di crescita, chemochine e citochine essenziali per la sintesi di ECM da parte delle cellule della cute o della mucosa. In particolare, producono TGF- β , PDGF e IGF (o fattore di crescita insulino simile). Come vedremo più avanti, si tratta di fattori molto importanti per la riparazione dei tessuti, in particolare il TGF- β , il quale contribuisce alla formazione del tessuto di granulazione e ne impedisce la degradazione.

Abbiamo quindi una moltitudine di stimoli differenti che agiscono sul macrofago e tra questi non vi sono solo stimoli pro-infiammatori; infatti, il macrofago può essere attivato o in "maniera classica", pro-infiammatoria con attività microbica, o in "maniera alternativa", antinfiammatoria con attività di controllo sull'infiammazione stessa e fortemente coinvolta nella riparazione tissutale e nella fibrosi. Il macrofago ha quindi una doppia funzione, di regolazione on/off dell'attività infiammatoria, ma come abbiamo visto l'infiammazione è un meccanismo complesso e molto potente e necessita di molteplici sistemi di controllo e segnali di spegnimento, al fine di non danneggiare i tessuti sani circostanti la zona affetta da lesione. L'estinzione della

risposta infiammatoria è possibile sia perché le cellule e i mediatori coinvolti hanno emivita breve e vengono degradati velocemente dopo il loro rilascio, sia poiché con il progredire dell'infiammazione, via via che passa il tempo, si ha un meccanismo di feedback per il quale il processo stesso inizia a produrre tutta una serie di segnali di arresto. Tra questi meccanismi attivi troviamo: il cambiamento del metabolismo dell'acido arachidonico da leucotrieni (molecole pro-infiammatorie) a lipossine (molecole anti-infiammatorie), il rilascio da parte dei macrofagi di citochine anti-infiammatorie, la produzione di molecole anti-infiammatorie a partire dagli acidi grassi polinsaturi e la scarica colinergica che inibisce i macrofagi nella produzione di TNF. A questo punto, se l'infiammazione ha rimosso lo stimolo lesivo e non vi sono risposte anomale da parte del sistema immunitario l'esito dell'infiammazione acuta è la rigenerazione tissutale, soprattutto se parliamo di lesioni non particolarmente estese; altrimenti si può instaurare il meccanismo di fibrosi, in caso di danno molto esteso che supera la capacità di rigenerazione del tessuto stesso, o in infiammazione a carattere cronico.

1.1.3 Fase di proliferazione

La fase proliferativa, che inizia circa 3-20 giorni dopo aver subito l'insulto lesivo, è volta alla riepitelizzazione della ferita e alla sostituzione del coagulo con tessuto di granulazione ed è mediata da molecole chemiotattiche derivanti dal processo infiammatorio. Si ha così, a livello epiteliale e delle mucose, a seguito della dissoluzione del legame cellula-cellula e del legame cellula-ECM, la proliferazione delle stesse in direzione centripeta, ovvero partendo dai margini della ferita e dirigendosi verso il centro fino a raggiungere la fusione degli epiteli neoformati, mentre per quanto riguarda gli strati più profondi, in particolare del derma, dove troviamo i macrofagi, avremo formazione di tessuto di granulazione vascolare e fibrovascolare e tessuto fibroso.

Prima di proseguire e parlare del tessuto di granulazione, dobbiamo introdurre brevemente una fase molto importante nella guarigione: l'angiogenesi.

1.1.3.1 Angiogenesi

Il processo di angiogenesi o neovascolarizzazione è quello attraverso il quale si generano nuovi vasi, in un organismo adulto, a partire da vasi pre-esistenti, per ramificazione od estensione degli stessi oppure tramite reclutamento dal midollo osseo di precursori endoteliali (EPC). Le fasi della angiogenesi sono:

- 1) Vasodilatazione nei rami preesistenti: indotta dall'NO e dall'aumento di permeabilità vasale dato dal VEGF.
- 2) Digestione proteolitica della membrana basale del vaso, ad opera di metalloproteasi (MMP), e delle giunzioni intercellulari fra le cellule endoteliali, ad opera dell'attivatore del plasminogeno, al fine di permettere la gemmazione e la migrazione delle cellule endoteliali a livello interstiziale.
- 3) Migrazione delle cellule endoteliali verso lo stimolo angiogenetico.
- 4) Proliferazione delle cellule endoteliali lungo la direttrice dello stimolo angiogenetico, con formazione di gettoni endoteliali solidi e proliferazione delle cellule contigue al fronte migrante di cellule.
- 5) Maturazione, a seguito dell'inibizione della proliferazione, che porta alla formazione, a partire dai gettoni endoteliali, di nuovi tubi capillari.
- 6) Reclutamento e differenziamento di cellule periendotheliali, al fine di costituire il vaso maturo (cellule muscolari lisce e periciti).

In tutte queste fasi del processo angiogenetico sono coinvolti numerosi fattori di crescita, tra cui il più importante, senza ombra di dubbio, nell'adulto, è il VEGF. Il VEGF, o Vascular Endothelial Growth Factor, è secreto, virtualmente, da tutti i tipi di cellule sottoposte ad ipossia, in particolare da vari tipi di cellule mesenchimali e stromali, e svolge una serie di importanti funzioni, tra cui: induzione dell'angiogenesi, aumento della permeabilità vasale, stimolazione delle cellule endoteliali a migrare (e altre, che analizzeremo meglio nel capitolo dedicato ai fattori di crescita).

1.1.3.2 Tessuto di granulazione

Riprendendo al fine del capitolo precedente vediamo i tipi di tessuto di granulazione e vediamo come si arriva all'ultima fase della guarigione, ovvero il rimodellamento.

Nel tessuto di granulazione vascolare possiamo trovare le gemme endoteliali che daranno origine ai futuri vasi neoformati, i fibroblasti e ancora qualche macrofago, utile per dare gli stimoli proliferativi e fagocitare i residui cellulari. Questo tessuto è di particolare interesse poiché è da qui che si svilupperà la nuova rete capillare, fondamentale per trasportare nutrienti ed ossigeno all'interno del tessuto e permettere così la migrazione e proliferazione cellulare. Questa rete capillare, come abbiamo detto, prende origine da vasi già esistenti, in un processo chiamato angiogenesi.

Nel tessuto di granulazione fibrovascolare, invece, troviamo sia vasi che fibroblasti attivati atte a depositare fibrille di collagene di tipo III, le une allineate alle altre a formare spessi fasci, e molecole dell'ECM, glicosamminoglicani, fibronectina, proteoglicani ed acido ialuronico. Nel tessuto neoformato vi è, quindi, una grande componente vascolare, che dà il tipico colore rosso al tessuto di granulazione, e una componente cellulare che si appresta, via via che deposita e produce sostanze, a sostituire la matrice fibrinica. Nel momento in cui la

sostituzione della matrice di fibrina sarà completa avremo la chiusura della ferita da parte del tessuto di granulazione, ovvero un tessuto che può essere traumatizzato facilmente e di scarsa qualità. Dalla seconda settimana in poi, le cellule del tessuto di granulazione vanno in apoptosi, il tessuto si ritira e diminuisce sempre più e viene sostituito da fibre collagene che andranno a formare la cicatrice.

1.1.4 Fase di rimodellamento

La transizione da tessuto di granulazione a tessuto cicatriziale fibroso comporta una modificazione tissutale a livello della composizione dell'ECM che può durare fino ad un anno dalla comparsa della ferita e prende il nome di rimodellamento. Infatti, la cicatrizzazione è ultimata già a 4-5 settimane dalla ferita, così come la riepitelizzazione della ferita e la scomparsa quasi completa dell'infiltrato infiammatorio ma prosegue il processo di maturazione del tessuto cicatriziale, per un periodo variabile dai 2-3 mesi, fino all'anno.

Durante questa fase le cellule del tessuto di granulazione vanno in apoptosi, scompare l'endotelio vascolare e il collagene di tipo III viene sostituito da fibrille di collagene tipo I. Questo tipo di collagene si organizza in fasci paralleli e, nonostante abbia una diversa organizzazione rispetto al collagene del derma sano (a trama basale), porta ad una continuità tra ferita e tessuto sano. Giocano un ruolo fondamentale, durante questi processi, le metalloproteasi della matrice (MMP), ovvero una famiglia di enzimi attivata da stimoli derivanti dagli stessi fattori di crescita, ad esempio PDGF e FGF ma anche da citochine, come IL-1 e TNF, che inducono la produzione del nuovo collagene. In questa fase sono ancora presenti fibroblasti, per la produzione di collagene, e miofibroblasti, i quali contraendosi riducono le dimensioni della cicatrice in via di sviluppo. Sempre in questa fase si

ha un rallentamento dell'attività angiogenetica e dell'attività metabolica della ferita acuta, fino al suo completo arresto. L'aspetto clinico della ferita cambierà, dunque, da roseo, traumatizzabile e delicato a pallido e fibrotico, dovuto al fatto che una ferita matura è acellulare ed avascolare. Maggiore è la dimensione iniziale del tessuto di granulazione e maggiore sarà l'esito cicatriziale fibroso che si verrà a formare.

1.2 Guarigione del tessuto osseo

Nel capitolo precedente abbiamo analizzato un generico processo di guarigione e gli eventi che si susseguono in caso occorra una lesione, qualsiasi essa sia; in questo capitolo, invece, andremo a trattare specificamente il processo di guarigione del tessuto osseo.

Prima di parlare di principi biologici della guarigione però è opportuno fare un'introduzione sul tessuto osseo.

1.2.1 Tessuto osseo

Il tessuto osseo è un tessuto biologico caratterizzato da grande durezza e resistenza, con duplice funzione: strutturale e di riserva per alcuni sali minerali. Si tratta di un tessuto connettivo di sostegno costituito da una *parte cellulare* immersa in una abbondante *matrice extracellulare*, la quale, oltre ad essere formata da fibre e sostanze di origini glicoproteica, è mineralizzata. È proprio questa sua caratteristica tipica a differenziarlo, in primis, dagli altri tipi di tessuto connettivo. L'osso può essere distinto in due parti, una parte più esterna, molto dura e compatta, priva di cavità, chiamata corticale, ed una parte più interna, leggera ma resistente, costituita da tessuto spugnoso e caratterizzata da

una struttura trabecolare, chiamata spongiosa. Questo tessuto, al contrario di quello che si potrebbe pensare intuitivamente, non è una struttura rigida statica bensì, anche nella vita adulta, va incontro ad un dinamico e continuo processo di rimaneggiamento e rinnovamento, detto rimodellamento. A differenza di quello che succede a partire dallo sviluppo fetale fino ad arrivare alla seconda decade di vita, dove i cambiamenti che avvengono a livello dell'osso sono principalmente volti al costituire l'osso per forma e dimensione, processo detto modellamento, nell'età adulta si ha questo meccanismo di turnover cellulare, continuo ed asincrono nelle varie parti dello scheletro, con un fine funzionale e di adattamento agli eventuali cambiamenti di carico a cui possono essere sottoposte le ossa; senza dimenticare l'importante funzione di mantenimento dell'omeostasi del calcio (come abbiamo detto il tessuto osseo può essere una fonte o una riserva di minerali, all'occorrenza).

1.2.1.1 Matrice ossea

La *matrice ossea* o *matrice extracellulare* è composta per il 30-35% da una parte organica, maggiormente costituita da collagene di tipo I e una piccola parte di glicosaminoglicani ed altre proteine, detta *osteoides* e per il 65-70% da una parte inorganica ricca di minerali. Le due componenti conferiscono all'osso l'una flessibilità e l'altra robustezza. Da un punto di vista qualitativo, la composizione della matrice ossea è pressoché identica a quella cartilaginea; si diversificano soprattutto da un punto di vista quantitativo: infatti, la concentrazione di proteoglicani nella cartilagine si aggira intorno al 30-40% del peso secco, mentre nell'osso è molto bassa (circa 0,2-1%), in questo modo avremo la prevalenza del collagene sugli altri costituenti (circa il 20% del peso secco). La matrice ossea può assumere due tipi di organizzazione, dipendenti dalla disposizione delle fibre collagene al suo interno: woven bone od osso lamellare. L'organizzazione a "woven bone", o osso fibroso o a fibre intrecciate, è tipica dell'embrione e del feto ma

anche di tutte quelle situazioni in cui vi è necessità di deporre nuovo osso velocemente, come nel caso delle fratture. In questo tipo di osso che si viene a formare, le fibre collagene si intrecciano tra di loro in maniera disordinata, a differenza dell'osso lamellare dove le fibre collagene si dispongono parallelamente le une alle altre, conferendo così maggior elasticità e minor resistenza al tessuto osseo. In particolare, nell'osso lamellare, le fibrille di collagene si orientano nella stessa direzione all'interno di una determinata lamella ossea e nella successiva, saranno sì parallele ma rivolte in una diversa direzione. È bene ricordare che, nell'adulto, la presenza di osso a fibre intrecciate non è mai da considerarsi normale nonostante non sia un segno specifico per alcuna patologia e che, una volta deposto, viene rapidamente riassorbito per essere rimpiazzato con tessuto osseo di tipo lamellare. Questo tipo di tessuto deriva dal rimaneggiamento di osso fibroso od osso preesistente e consiste in una struttura più organizzata nella quale vi è un orientamento ordinato delle fibre collagene, che si dispongono parallelamente le une alle altre e in strati sovrapposti, formando così le lamelle ossee. Tra le lamelle troviamo le lacune ossee, cavità ellissoidali, non mineralizzate, scavate all'interno della matrice ossea, che ospitano gli osteociti, i cui prolungamenti protendono all'interno dei canalicoli ossei, attraverso i quali attingono sostanze nutritive. Oltre al collagene nella matrice ossea organica sono presenti proteine di adesione, osteocalcina, osteonectina e BPM (Bone morphogenetic protein o Proteina morfogenetica dell'osso), che costituiscono circa il 10% della parte organica. L'osteocalcina, dopo il collagene, è la componente più abbondante della matrice organica ed è un prodotto specifico degli osteoblasti. La sua sintesi è stimolata dal calcitriolo, forma attiva della vitamina D3, e non tutta la produzione è destinata a rimanere nel tessuto osseo; infatti, una parte viene immessa in circolo ed è proprio la sua concentrazione sierica, ad oggi, il miglior indicatore dell'attività osteoblastica e indicatore di formazione di nuovo tessuto osseo. L'osteonectina costituisce il 3% della componente organica della

matrice ed è in grado di legarsi al collagene e all'idrossiapatite; il suo ruolo in vitro sembra essere collegato alla mineralizzazione del collagene di tipo I ma questa sua funzione non è confermata in vivo (nonostante si sia evidenziato come in alcune patologie osteopeniche, quali l'osteogenesi imperfetta, vi sia una riduzione di produzione di osteonectina). Infine, le BPM fanno parte della famiglia delle proteine regolatrici TGF- β , coinvolte principalmente nel processo di riparazione delle fratture, in quanto capaci di attivare ed accelerare questo processo. La parte inorganica mineralizzata è costituita in maggior percentuale da idrossiapatite, un composto di calcio, ossigeno fosforo e idrogeno, che forma sottili cristalli a forma di prismi, della lunghezza di 20-40 nm e dello spessore di circa 1,5-3 nm.

1.2.1.2 Parte cellulare

Il tessuto osseo è "abitato" da diversi tipi cellulari che prendono parte a diversi processi che avvengono al suo interno, quali la deposizione della matrice, la regolazione del metabolismo del calcio, il rimodellamento osseo.

Prima di parlare degli osteoblasti, cellule note come in grado di sintetizzare osso, facciamo un piccolo accenno alle cellule osteoprogenitrici ovvero un tipo di cellule staminali mesenchimali pluripotenti (MSC) che si localizzano a livello di tutte le superfici ossee. Questo tipo di cellule si differenziano, sotto stimolo delle BPM, in uno stadio intermedio osteo-condroprogenitore, un precursore in grado di differenziare sia in osteoblasti che in condroblasti. A questo punto interverranno profili genici differenti che porteranno la differenziazione in una direzione piuttosto che nell'altra; fondamentale per la differenziazione in senso osteoblastica è il gene Runx2, la cui assenza o mutazione provoca gravi anomalie in senso osteogenico e nei processi di ossificazione; infatti, questo gene ha come bersaglio trascrizionale molteplici geni coinvolti nell'attività di osteocalcina, osteonectina e

collagene di tipo 1. Le cellule che esprimono questo profilo genico saranno in grado di diventare precursori degli osteoblasti, pre-osteoblasti ed inizieranno a proliferare e sintetizzare fosfatasi alcalina (ALP). È in questa fase che le cellule vanno incontro ad un mutamento di morfologico e funzionale: diventano più grandi e con aspetto cuboide ed iniziano a sintetizzare le proteine della matrice ossea. Si va successivamente incontro alla maturazione completa in osteoblasti funzionali, in cui le cellule raggiungono il massimo livello di produzione collagenica e di proteine della matrice e nella quale, da un punto di vista istologico, appaiono come di forma cuboidale con un grande nucleo rotondo in posizione basale, disposte in un'unica fila di cellule dall'aspetto epitelioidale. La funzione osteoblastica è quella di partecipare attivamente alla formazione del tessuto osseo, secernendo la parte organica della matrice ossea e regolando la deposizione dei sali minerali. Sono, infatti, particolarmente presenti in corrispondenza di tutte quelle superfici ossee in espansione e negli strati osteogenici di periostio ed endostio durante il periodo di morfogenesi dell'osso. È bene notare come, nonostante le importantissime funzioni, solo il 5% delle cellule residenti nell'osso siano osteoblasti. Completato il differenziamento e la loro funzione il destino degli osteoblasti può prendere tre strade: 1) morire per apoptosi, 2) differenziarsi in osteociti, 3) diventare bone-lining cells, ovvero cellule di rivestimento quiescenti di forma appiattita che si dispongono lungo la superficie ossea, con il fine di impedire il contatto diretta tra matrice ossea ed osteoclasti.

Gli osteociti rappresentano il 90-95% delle cellule residenti nel tessuto osseo e si trovano all'interno delle lacune ossee, piccole cavità lenticolari scavate all'interno delle lamelle. Sono cellule molto longeve (possono vivere fino a 25 anni) e, da un punto di vista morfologico, si tratta di cellule inglobate all'interno della matrice ossea piuttosto appiattite, dalle quali dipartono numerosissimi prolungamenti che si inseriscono e si sviluppano all'interno di una rete di canalicoli all'interno dell'osso stesso. È proprio grazie a questa forma e questi

prolungamenti che gli osteociti possono mettersi in contatto con altri osteociti e con le cellule lungo la superficie ossea. Come già riportato in precedenza, l'osteocita si forma a partire dall'osteoblasto che al termine del suo percorso di differenziazione può diventare osteocita. L'osteoblasto nel corso della sua maturazione cambia morfologia, viene circondato da matrice ossea nella quale rimane imprigionato e muta o cessa l'espressione di marker osteoblastici, iniziando ad esprimere marker degli osteociti, in particolare DMP-1 (dentin matrix protein) e Sost, il cui prodotto, la sclerostina, inibisce il differenziamento degli osteoblasti. Questa loro forma e localizzazione è fortemente correlata alla loro funzione di trasformazione di stimoli meccanici, che l'osso subisce, in segnali e stimoli biochimici, meccano-trasduzione, ed essere quindi coinvolti nel rimodellamento osseo e nell'omeostasi del calcio. Infatti, nonostante siano considerate uno stadio di quiescenza osteoformativa dell'osteoblasto, queste cellule, sembrano essere coinvolte nel metabolismo dell'osso e non inerti: potrebbero partecipare allo scambio dei minerali all'interno dell'osso, intervenendo attivamente nella regolazione della concentrazione di calcio all'interno dell'organismo.

Gli osteoclasti sono le cellule deputate al riassorbimento osseo e a differenza degli osteociti, che originano dagli osteoblasti e hanno dunque lo stesso progenitore, questo tipo di cellule deriva da un precursore appartenente alla linea monociti-macrofagi e cioè da una cellula mesenchimale emopoietica. Il differenziamento in senso osteoclastico avviene soprattutto grazie a due specifici fattori di crescita: RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB Ligand) e M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Dopo essersi differenziati come singole cellule, gli osteoclasti si fondono, formando celle giganti polinucleate, e polarizzano andando a formare così un'area, in grado di aderire alla superficie ossea, detta sealing zone o zona di saldatura, distinta e separata dall'osso preesistente; è in questa specifica zona, separata e delimitata rispetto al resto del tessuto, che

avverrà il riassorbimento osseo. Queste aree in cui l'osteoclasta aderisce, spesso diventano simili a degli avvallamenti, detti fossette o lacune di Howship, proprio per via dell'azione erosiva sulla superficie ossea dell'osteoclasta stesso. L'azione erosiva dell'osteoclasto è chiaramente visibile nell'istologia poiché intorno ad esso si viene a formare un orletto striato, detto ruffled border od orletto arruffato, costituito da piccoli prolungamenti citoplasmatici molto irregolari, tra i quali si possono vedere cristalli di idrossiapatite (parte inorganica della matrice ossea) e talvolta fibrille di collagene (parte organica della matrice ossea), derivanti dalla lisi del tessuto osseo. Il processo di riassorbimento osseo attuato dagli osteoclasti è piuttosto complesso ma in definitiva possiamo dividerlo in tre fasi: 1) adesione alla matrice ossea, 2) creazione di un ambiente acido per solubilizzare la parte inorganica ed infine 3) digestione enzimatica della matrice organica.

- 1) L'adesione dell'osteoclasta alla superficie ossea avviene mediante dei recettori integrinici che riconoscono determinate proteine della matrice extracellulare. Si viene rapidamente a creare, perifericamente al sincizio, una zona sferica, simile ad un anello, detta appunto zona sigillante (o zona chiara per l'aspetto istologico), nella quale sono presenti i podosomi ovvero numerose strutture cellulari puntiformi deputate all'adesione, ricche di actina, con duplice funzione: isolare l'area nella quale si svolgerà l'attività erosiva e trasmettere i segnali di trasmissione per far sì che l'osteoclasta si attivi.
- 2) L'acidificazione dello spazio extracellulare, delimitato dalla zona sigillante tramite i podosomi, da inizio al riassorbimento della matrice ossea. Questo processo è mediato da una pompa protonica, presente all'interno dell'orletto striato, che riversa grandi quantità di ioni H^+ all'interno di questo spazio, i quali, a loro volta, provocano un abbassamento del pH a 4.5 ed una conseguente solubilizzazione dei cristalli di idrossiapatite, la parte inorganica della matrice extracellulare.

3) A seguito dell'esposizione della parte organica della matrice interverrà la digestione enzimatica della stessa. Questo è possibile grazie al rilascio di una proteasi lisosomiale, catepsina K, ed una collagenasi facente parte della famiglia delle metalloproteasi. I prodotti di degradazione della matrice extracellulare, a questo punto, possono essere endocitati dall'osteoclasta ed attraverso un meccanismo di transitosi vengono esocitati dalla superficie opposta della cellula.

Tutti questi tre tipi di cellule residenti all'interno del tessuto osseo (osteoblasti, osteociti ed osteoclasti) intervengono attivamente e dialogano tra di loro al fine di regolare finemente e mantenere in equilibrio il processo di rimodellamento osseo.

Di questa rete di segnali positivi fanno parte gli osteoblasti che sono in grado di stimolare, per via paracrina, la differenziazione degli osteoclasti. A mediare questo processo vi sono RANKL e M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor). M-CSF è una citochina, può essere di membrana o secreta, che stimola proliferazione e differenziamento dei pre-osteoclasti. RANKL, espresso non solo da osteoblasti ma anche altri tipi cellulari come osteociti e cellule dell'immunità, è principalmente una molecola di superficie, il cui legame con il suo recettore specifico determina il completamento della maturazione degli osteoclasti e la loro fusione. RANKL a sua volta è regolato da un'altra molecola prodotta dagli osteoblasti, l'osteoprotegrina (Opg), la quale si lega col recettore specifico di RANKL per impedirne il legame e, in questo modo, regolarne l'effetto osteoclastogenico e quindi il differenziamento degli osteoclasti. L'osteoclastogenesi non è regolata solo da questi due meccanismi, nonostante siano i principali, ma anche da altri mediatori, quali PTHrp (ParaThyroid hormone related Protein), IL-1 e TNF α e dagli osteociti; recenti studi, infatti, hanno dimostrato che gli osteociti, andando in apoptosi, possono attivare la funzione degli osteoclasti, tramite il

massivo rilascio di fattori osteoclastogenici come RANKL, IL-1, IL-6 e TNF α .

Gli osteoclasti, a loro volta, contribuiscono alla regolazione del processo di rimodellamento osseo attraverso due meccanismi. Il primo consiste nella liberazione di fattori come TGF- β , il quale, rilasciato durante la degradazione della matrice extracellulare, garantisce un corretto accoppiamento tra distruzione e deposizione poiché induce, nel sito di degradazione, migrazione di cellule stromali del midollo, ed IGF-1, il quale agisce sul differenziamento degli osteoblasti e sulla loro capacità di indurre osteoclastogenesi tramite l'espressione di RANKL e M-CSF.

Per quanto riguarda le molecole prodotte dagli osteoclasti troviamo CT-1 che è in grado, da un lato, di aumentare il differenziamento e l'attività osteoblastica e, dall'altro, di inibire l'espressione di sclerostina che, come abbiamo già visto, è una molecola prodotta dagli osteociti e deputata ad inibire gli osteoblasti; CTHRC-1, prodotto da osteoclasti maturi ove presenti alte concentrazione di ioni calcio e fosfato, stimola l'osteoblastogenesi; SEMA₄D che inibisce la formazione dell'osso legandosi ad un recettore sugli osteoblasti; e ancora Ephrin B2, ovvero una proteina di membrana degli osteoclasti che si lega direttamente al suo recettore sugli osteoblasti, stimolandone il differenziamento.

Come abbiamo detto tutta questa rete di segnali di feedback ha lo scopo di regolare le fasi e il timing del complesso processo di rimodellamento.

1.2.2 Rimodellamento osseo

Il rimodellamento osseo avviene grazie all'azione sinergica dei tre tipi cellulari propri del tessuto osseo – osteoblasti, osteociti ed osteoclasti – i quali creano una vera e propria unità funzionale, denominata unità multicellulare di base (Basic Multicellular Unit o BMU). Nelle prime fasi di vita, durante la crescita scheletrica, prevale il modellamento

osseo e l'equilibrio di questi processi è spostato verso la deposizione di matrice ossea. Successivamente, una volta raggiunta la maturità scheletrica, si avrà il coordinamento di riassorbimento e neoapposizione ossea, al fine di mantenere la massa ossea e di riparare l'osso, sostituendolo con un tessuto neoformato più competente, da tutti quegli stimoli meccanici a cui è costantemente sottoposto e che vanno a creare delle vere e proprie aree microtraumatizzate; è, infatti, dalle zone maggiormente sottoposte a carico che comincia il processo di rimodellamento. Ogni anno, in uno scheletro adulto dove vi sia un rimodellamento osseo fisiologico, viene sostituito circa il 10% della massa ossea. Questo equilibrio rimane costante e ben bilanciato fino alla quarta decade di età, dove intervengono tutta una serie di fattori che spostano l'ago della bilancia verso il riassorbimento osseo e, di conseguenza, ad una stabile riduzione della massa ossea.

Ogni ciclo di rimodellamento osseo è costituito da tre fasi che si susseguono l'una all'altra: fase di attivazione, fase di inversione, fase di terminazione.

1.2.2.1 Fase di attivazione

La fase di attivazione è la prima fase del ciclo di rimodellamento osseo ed inizia con il reclutamento dei pre-osteoclasti, la loro aggregazione e mutamento in osteoclasti maturi e l'inizio del processo di riassorbimento che mettono in atto. Come sappiamo gli osteoclasti derivano da precursori mesenchimali della linea emopoietica che sono richiamati da fattori chemiotattici come MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), prodotto da osteoblasti ed osteociti. Gli osteoblasti, inoltre, sono responsabile della produzione di alcune molecole che stimolano il differenziamento terminale degli osteoclasti e l'attivazione degli stessi, quali RANKL e M-CSF, come abbiamo visto in precedenza. L'osteoclastogenesi, quindi, inizia nel momento in cui i precursori emopoietici interagiscono con queste molecole di

origine osteoblastica ed osteocitica, dalle quali ne deriva anche una regolazione. Una volta avviata l'acidificazione dell'area compresa nella zona sigillante dell'osteoclasta e la digestione enzimatica della matrice organica, avremo il rilascio dalla matrice di alcuni fattori di crescita, come TGF- β , BMPs (bone morphogenetic protein) ed IGF-1 (insuline-like growth factor), le cui funzioni sono già state analizzate. Una volta terminato il processo di riassorbimento si avvia la fase di transizione.

1.2.2.2 Fase di transizione

È durante questa fase che si ha un'inversione a livello cellulare da riassorbimento osseo a neoformazione ossea. Questo meccanismo prende il nome di coupling ed è finemente regolato da fattori di accoppiamento. Questo processo, infatti, introdotto per la prima volta nel 1960, definisce il perfetto equilibrio tra riassorbimento e neoapposizione della matrice ossea. Alcuni di questi fattori di accoppiamento sono rilasciati dalla matrice stessa durante la sua degradazione – TGF- β , IGF-1, IGF-2 e BMPs –, altri sono molecole secrete dagli osteoclasti – le clastochine come CTHRC – ed altri ancora derivano dal contatto diretto tra osteoclasti ed osteoblasti mediato dalle efrine (ad esempio Ephrin B2). Tutti questi fattori consentono di reclutare pre-osteoblasti all'interno della lacuna di riassorbimento (lacuna di Howship), di farli proliferare ed infine differenziare in osteoblasti maturi.

I fattori liberati dalla matrice, quali TGF- β , BMPs, IGF-1 ed IGF-2 stimolano il reclutamento dei pre-osteoblasti e promuovono proliferazione e differenziazione in senso osteogenico, regolando l'espressione di importanti fattori trascrizionali RUNX-2. Questi però non sono sufficienti al completo arresto dell'attività osteoclastica e l'avvio di quella osteoblastica, quindi intervengono le clastochine prodotte dagli osteoclasti come CTHRC (già descritta in precedenza) e S1P (sphingosine 1-phosphate), mim-1 (myb-induced myeloid protein-

1), PDGF BB (Bpolypeptide chain platelet-derived growth factor homodimeric) ed infine HGF (hepatocyte growth factor). S1P e mim-1 stimolano rispettivamente la migrazione all'interno della lacuna di Howship e la proliferazione degli osteoblasti; inoltre, S1P, interagendo con il suo recettore espresso sulla membrana dei precursori osteoblastici, ne stimola la sopravvivenza e aumenta l'espressione del fattore RANKL. Un altro meccanismo di regolazione è mediato dall'apoptosi degli osteoclasti, indotta dagli elevati livelli di calcio a seguito della digestione della matrice extracellulare, che inibisce la produzione di PDGF BB (un'isoforma del Platelet Derived Growth Factor), contribuendo così all'attivazione del processo di differenziazione degli osteoblasti. Nella transizione tra riassorbimento e neoformazione ossea possiamo identificare un altro meccanismo molto importante ovvero quello rappresentato dal contatto diretto tra osteoclasti ed osteoblasti, mediato da molecole molto particolari, dette efrine. Le efrine, infatti, hanno la particolarità di poter trasdurre il segnale in maniera bidirezionale: nel momento in cui una cellula che esprime un recettore efrinico interagisce con una cellula che esprime il suo ligando, i segnali vengono trasdotti in entrambe le cellule, rispettivamente tramite meccanismi di signaling 'reverse' e signaling 'forward'. Sono state individuate due famiglie di efrine, quelle di classe A e quelle di classe B, che legano, reciprocamente, con maggiore affinità i recettori EphA e gli EphB. Durante il rimodellamento osseo gli osteoclasti maturi esprimono la molecola Ephrin B2 che si lega al suo recettore di membrana EphB4 espresso dai pre-osteoblasti, si attiva, a seguito del legame, la segnalazione bidirezionale che, da un lato, sopprime il riassorbimento osteoclastico e, dall'altro, stimola la neoformazione e deposizione ossea, coadiuvando così la fase di transizione tra questi due meccanismi.

Una volta che si è conclusa la fase di differenziazione degli osteoblasti può avere inizio il processo di formazione dell'osso che comporta la sostituzione con nuova matrice osteoide dell'osso riassorbito all'interno

della lacuna di Howship e la sua successiva mineralizzazione. Questa è una fase molto lenta e molto più duratura rispetto al processo di riassorbimento. Ultimato il processo di formazione ossea avremo, da parte degli osteociti, la secrezione di sclerostina (SOST) a livello dei canalicoli, la quale andrà ad inibire la neoapposizione operata dagli osteoblasti, dando inizio all'ultima fase del processo di riassorbimento: la fase terminale.

1.2.2.3 Fase terminale

È in questa fase che gli osteoblasti, a seguito della deposizione e mineralizzazione dell'osso, che dura in media 200 giorni, subiscono un cambio strutturale, probabilmente ad opera della sclerostina, e diventano cellule di rivestimento (bone lining cell), quiescenti, di forma appiattita, che si vanno a disporre lungo la superficie ossea.

1.2.3 Meccanismi di guarigione

I meccanismi di guarigione di una lesione ossea, come può essere una frattura ma anche l'inserimento di un impianto – entrambi gli eventi comportano localmente la perdita di continuità del tessuto osseo – sono assimilabili, per molti aspetti, alla formazione ossea che avviene durante lo sviluppo scheletrico. Si tratta di un meccanismo complesso che coinvolge una complessa rete di interazioni comprendente cellule, fattori di crescita e matrice extracellulare. Consiste, inoltre, in un processo altamente efficiente poiché, a differenza di quanto avviene a carico dei tessuti molli dove ci può essere la formazione di tessuto cicatriziale, con conseguente perdita di funzione, nel caso del tessuto osseo la guarigione prevede il completo ripristino, sia da un punto di vista morfologico, sia da un punto di vista funzionale. Generalmente, la lesione è guarita, per rigenerazione del tessuto osseo – ovvero, come abbiamo già visto in precedenza, guarigione della discontinuità per sostituzione con lo stesso tipo di tessuto – in circa 6-8 settimane. Degli

attori del processo di guarigione, come abbiamo accennato, fanno parte le cellule, la cui origine però non è ancora del tutto chiarita; infatti, nonostante si sia visto che sia nel periostio – strato di connettivo fibroso che avvolge e riveste la superficie tutte le ossa, ad eccezione delle superfici articolari e delle inserzioni tendinee – sia nel midollo osseo vi sono abbondanti riserve di cellule staminali che possono differenziare nei tipi cellulari atti ad avviare il corretto processo di guarigione ossea, alcuni studi hanno dimostrato come esso possa avvenire anche in assenza dei progenitori derivanti da queste due strutture. Si è quindi pensato che le fonti dei progenitori non siano solo midollo e periostio ma che possa essere multipla e comprenda anche sangue, vasi e tessuto circostante.

La guarigione può essere:

- 1) Primaria: corticale, diretta.
- 2) Secondaria: spontanea, indiretta.

1.2.3.1 Guarigione primaria

In questo caso non c'è formazione del callo osseo bensì di una struttura membranosa tra i due monconi di osso che è in grado di supportare lo scheletro. Questa guarigione è possibile solo se è presente, in primo luogo, un pressoché perfetto allineamento tra i due segmenti ossei e la loro riduzione tra le due parti di osso coinvolte nella frattura e, in secondo luogo, se è applicata una forza costante ed uniforme che stabilizzi, senza comprimere, le due estremità ossee. È il tipo di guarigione più raro e comporta fasi intermedie caratterizzate da un'importante fragilità del tessuto neoformato. È importantissima la fissità dei monconi ossei, altrimenti, nei piccoli gap, dove sta avvenendo la neoformazione di tessuto osseo, a seguito di micromovimenti, si verifica la distruzione dei fragili tessuti tipici di questo tipo di guarigione e conseguentemente a ciò avviene un processo di riassorbimento osseo, dovuto all'invasione da parte degli osteoclasti

della rima di frattura, provocando ulteriore mobilità e allontanamento delle estremità ossee.

1.2.3.2 Guarigione secondaria

Questo tipo di guarigione ossea avviene spontaneamente e consta di un'iniziale fase infiammatoria e cui segue una fase riparativa, dove avviene la formazione del callo, per arrivare infine al rimodellamento con neoformazione ossea, guidato dalle forze che agiscono sull'osso. In questo tipo di guarigione si parte da tessuti più molli, in grado di tollerare le deformazioni, come il tessuto connettivo, che vengono sostituiti via via da tessuti sempre più rigidi. Questo processo è detto, per l'appunto, spontaneo o secondario ed avviene se non è possibile ottenere una sufficiente immobilità dei capi ossei interessati dalla frattura. A livello cellulare i protagonisti principali della guarigione sono le cellule infiammatorie, le cellule vasali, i precursori osteocondrali ed infine gli osteoclasti; a livello molecolare, invece, vi sono numerosissimi fattori che regolano il processo di guarigione e sono: fattori di crescita, citochine pro-infiammatorie, fattori che stimolano l'angiogenesi e fattori che stimolano osteogenesi. Studi a livello istologico hanno dimostrato come nell'uomo questo tipo di guarigione avvenga mediante quattro tappe che andremo ad analizzare singolarmente.

1.2.3.2.1 Prima tappa: fase infiammatoria

L'innescò del processo infiammatorio è un'inevitabile conseguenza, non solo della frattura ossea, ma anche delle lesioni dei tessuti molli circostanti e dei vasi sanguinei.

In seguito alla lesione si verifica un sanguinamento all'interno della rima di frattura che viene arginato dai tessuti circostanti; si viene a formare un ematoma che si organizza in coagulo. All'interno di questo coagulo vengono richiamate piastrine e cellule del processo infiammatorio, in particolare, proprio come avviene nella guarigione di

una qualsiasi ferita e come abbiamo già visto nei capitoli precedenti, sarà invaso inizialmente da granulociti e successivamente da macrofagi, al fine di ridurre e prevenire il rischio di infezioni e di produrre in loco citochine e fattori di crescita. Il coagulo può così andare verso la trasformazione in trombo fibrinoso e questa fase prevede la produzione di importanti molecole pro-infiammatorie, come IL-6, IL-1 e TNF, e di altri fattori con funzione di regolazione sui vari tipi cellulari che interverranno nel processo di guarigione; tra questi troviamo TGF- β , PDGF, VEGF, FGF, BMP e M-CSF. Tutte queste molecole prodotte all'interno del sito danneggiato attuano un meccanismo di feedback positivo sul processo infiammatorio e sul reclutamento di cellule staminali mesenchimali all'interno dello stesso.

1.2.3.2.2 Seconda tappa: formazione del callo fibrocartilagineo

Questa seconda fase è caratterizzata dall'azione di fibroblasti e condroblasti che, tramite un processo di ossificazione endondrale, portano alla costituzione di un callo morbido che fornisce un, seppur blando, supporto meccanico alla frattura e che fornirà da modello per la successiva formazione del callo duro.

In questa fase intervengono in primis i condrociti, derivanti dai loro progenitori mesenchimali, che proliferano e sintetizzano matrice ossea in maniera tale che vada a colmare la discontinuità ossea, ricongiungendo le estremità. Verso la fine di questo procedimento i condrociti ipertrofizzano, attuano il processo di mineralizzazione della matrice ed infine vanno in apoptosi. I fibroblasti intervengono con deposizione di tessuto fibroso nel caso in cui vi siano zone dove vi sia assenza di cartilagine. Tutta questa fase è avascolare, non vi è ancora stata neoangiogenesi. Per passare alla tappa successiva si rende necessaria la formazione di un nuovo sistema vascolare all'interno di questo callo morbido neoformato e questo processo di neoangiogenesi è mediato e regolato da diversi fattori, tra cui alcune angioproteine, VEGF, BMP, FIGF-1, e TGF- β .

1.2.3.2.3 Terza tappa: formazione del callo duro

In questa fase, chiamata anche formazione dell'osso primario, si verifica la maggior parte dell'attività osteogenica del processo di guarigione. È, infatti, contraddistinta da un'elevata attività osteoblastica e dalla mineralizzazione della matrice ossea, che inizia nelle aree maggiormente stabili del callo ovvero a livello periferico. La formazione del callo duro avviene solo grazie alla guida fornitagli dal callo fibrocartilagineo (callo morbido) che quindi non deve essere rimosso. Al termine di questa fase troveremo appunto l'osso primario, ovvero un osso irregolare che deve ancora andare incontro ad alcune modifiche prima di diventare osso maturo

1.2.3.2.4 Quarta tappa: rimodellamento osseo

È la fase finale del processo di guarigione ossea e consiste nel rimodellamento della matrice ossea, formata nelle fasi precedenti, nella sua configurazione finale, ovvero quella del tessuto osseo originale che ha subito il danno; si definisce anche formazione dell'osso secondario. Come abbiamo detto, il processo di guarigione ha un'efficienza altissima e non punta solo ad eliminare la discontinuità bensì ha come obiettivo la completa restitutio ad integrum morfologica e funzionale e non c'è modo migliore di ottenerla se non ripristinando esattamente lo stesso tipo di tessuto che ha subito la lesione. Nel rimodellamento si susseguono le fasi di riassorbimento dell'osso preesistente, ad opera degli osteoclasti, a quelle di deposizione di osso di tipo lamellare, operata dagli osteoblasti.

Queste quattro fasi descrivono in maniera compiuta il processo di guarigione ossea ma oggi sappiamo che non sono esattamente le une successive alle altre e che ci possono essere delle sovrapposizioni, motivo per il quale negli ultimi anni è stata suggerita una classificazione che divide la guarigione in momenti anabolici (di sintesi) e momenti catabolici (di demolizione).

1.2.3.3 Fattori che influenzano la guarigione

I fattori che possono intervenire ed alterare il processo di guarigione, riducendone l'efficacia o rallentandolo, sono molteplici e possono essere sia locali che sistemici. Tra i fattori locali da tenere in considerazione ci sono: la mancata o ridotta vascolarizzazione della zona di guarigione, l'insorgenza di un'infezione, lo sviluppo di tessuto fibroso ad alta capacità proliferativa, ma anche la grandezza della lesione. Tra i fattori sistemici da tenere in considerazione ci sono lo stato metabolico del paziente, l'assunzione di determinati farmaci che possono inibire od interagire coi processi di guarigione, età e sesso dell'individuo, fattori genetici, l'uso di dispositivi di fissazione chirurgica o alcune patologie.

1.3 Mediatori chimici

Abbiamo più volte citato nei capitoli precedenti i mediatori chimici nel susseguirsi delle fasi dell'infiammazione e della guarigione e talvolta accennato la loro funzione. In questo capitolo andremo ad analizzarli in maniera più dettagliata e a sviscerare le loro funzioni.

1.3.1 Principi e meccanismi generali

I mediatori chimici delle fasi della guarigione vengono prodotti localmente durante tutte le fasi della guarigione (emostasi, infiammazione, formazione del tessuto di granulazione, rimodellamento) e sono molecole o derivanti dal plasma o prodotte de novo ed in situ dalle cellule presenti nella lesione o, ancora, possono essere molecole racchiuse all'interno di granuli che possono essere liberate velocemente, tramite esocitosi, dalle cellule, in seguito a determinati stimoli (ex. istamina). Tra i principali tipi cellulari, che

agiscono durante l'infiammazione, i responsabili della produzione dei mediatori sono le piastrine, i monociti ed i macrofagi, i mastociti, i neutrofili e le cellule mesenchimali; inoltre, anche la maggior parte delle cellule di tipo epiteliale sono in grado, se indotte da uno stimolo, di produrre determinati mediatori. Per quanto riguarda i mediatori di derivazione plasmatica, sono prodotti a livello epatico ed immessi nel circolo sanguigno sotto forma di precursori inattivi e quindi non in grado di esercitare la loro funzione finché non attivati da specifiche reazioni (spesso si tratta di clivaggi proteolitici). In linea generale i mediatori sono prodotti in risposta a vari stimoli, come la presenza di microbi o di tessuti necrotici o danneggiati, in maniera tale da assicurare l'attivazione del processo infiammatorio solo dove e quando è strettamente necessario. Generalmente esplicano la loro funzione nel momento in cui si concretizza il legame con specifici recettori, a loro dedicati, a livello delle cellule target (le cellule bersaglio del mediatore) o per via enzimatica diretta o causando danno ossidativo. È importante ricordare che esistono fattori che agiscono solo su un determinato tipo di cellula, che ci sono mediatori meno selettivi, che possono agire su differenti tipi di cellule ma anche che alcuni mediatori, a seconda della cellula bersaglio alla quale si legano, possono generare effetti diversi. Inoltre, il mediatore può avere un'azione diretta sulla cellula bersaglio oppure, una volta legata al suo recettore, può indurre il rilascio di ulteriori fattori, detti mediatori secondari. I mediatori secondari possono svolgere un'azione in accordo con i mediatori chimici primari e dare luogo ad una amplificazione della risposta oppure possono svolgere funzioni da diverse fino ad opposte ed agire quindi come modulatori. Infine, la maggior parte dei mediatori ha un tempo di decadimento piuttosto breve – si degradano velocemente o vengono inattivati tramite via enzimatica o vengono inibiti o fagocitati - ed agiscono tramite fini meccanismi di regolazione che ne modulano l'azione; questo è necessario poiché la sovra-espressione di alcuni mediatori può essere potenzialmente dannosa per l'organismo.

Nei sottocapitoli successivi andremo a descrivere i principali.

1.3.1.1 Le amine vasoattive: istamina e serotonina

Questa classe di mediatori, in particolare istamina e serotonina, sono definite vasoattive per via dei loro importanti effetti a livello dei vasi sanguinei. Si tratta di molecole preformate, che la cellula non deve produrre sul momento, immagazzinate all'interno delle stesse, e sono i primi mediatori rilasciati durante il processo infiammatorio (infatti, ricordando la prima tematica affrontata, per quanto concerne i processi di guarigione, sappiamo che la fase vascolare è la prima fase dell'infiammazione).

Istamina

Questa molecola vede come sua fonte principale i mastociti, generalmente presenti a livello del tessuto connettivo adiacente ai vasi sanguinei, ma si trova anche a livello dei granulociti basofili e delle piastrine. Il rilascio di istamina, attraverso il meccanismo di degranolazione, da parte dei mastociti può essere indotto da molti stimoli: da lesioni fisiche o termiche, da reazione allergica, da frammenti delle proteine del complemento detti anafilotossine, da neuropeptidi, da citochine o da proteine di origine leucocitaria. L'effetto dell'istamina a livello vasale consiste nella vasodilatazione delle arteriole ed una aumentata permeabilità a livello delle venule, per innescare il meccanismo della stasi. È considerata la principale responsabile dell'aumento immediato di permeabilità vascolare ed esplica i suoi effetti vasoattivi nel momento in cui lega le cellule dell'endotelio microvascolare tramite i suoi recettori H.

Serotonina

Si tratta di un altro mediatore vasoattivo preformato con un'azione assimilabile a quella dell'istamina ma con fonti differenti, infatti è presente, principalmente a livello delle piastrine e di alcune cellule

neuroendocrine mentre è completamente assente a livello dei mastociti. Il suo rilascio, da parte delle piastrine, è indotto dall'aggregazione piastrinica, la quale avviene a seguito del contatto delle stesse con molecole come il collagene e la trombina, a riprova dello stretto intreccio tra i processi di coagulazione e quelli dell'infiammazione.

1.3.1.2 Il sistema del complemento

Si tratta di un sistema formato da più di 20 proteine coinvolto, sia nell'immunità innata che in quella acquisita, nella difesa dell'organismo nei confronti dei microbi patogeni e che sfocia nella loro lisi. Le proteine del complemento, essendo parte dei mediatori di derivazione plasmatica, si trovano nel plasma in forma inattiva e vengono attivate tramite enzimi proteolitici. L'attivazione del complemento da origine ai prodotti del complemento le cui funzioni principali sono: aumento della permeabilità, chemiotassi ed opsonizzazione (un sistema mediato dalle opsonine tramite il quale vengono "marcati" i batteri in maniera tale che possano essere riconosciuti e fagocitati). Tra i più importanti componenti del complemento coinvolti nell'infiammazione ricordiamo C_3 e C_5 , che a livello dell'essudato infiammatorio possono essere attivati tramite diversi enzimi proteolitici.

1.3.1.3 I metaboliti dell'acido arachidonico

L'acido arachidonico (AA) è una molecola contenuta a livello dei fosfolipidi presenti nella membrana cellulare, sotto forma di estere, che, a seguito dell'attivazione cellulare da parte di stimoli derivanti da prodotti microbici o altri mediatori dell'infiammazione, viene rapidamente convertito per via enzimatica al fine di produrre, ad esempio prostaglandine e leucotrieni, dei mediatori lipidici attivi che, per via extra o intra cellulare, influenzano e modulano vari processi biologici, tra cui infiammazione ed emostasi. Tra gli stimoli che

determinano il rilascio dell'acido arachidonico, grazie all'enzima fosfolipasi A₂, troviamo l'aumentata concentrazione di Ca²⁺ citoplasmatica e l'attivazione di alcune chinasi a seguito di stimoli esterni. I mediatori derivanti dalla trasformazione dell'acido arachidonico, da parte di enzimi quali ciclossigenasi e lipossigenasi, sono gli eicosanoidi, di cui fanno parte prostaglandine, prostaciline, leucotriene e trombossani. Tutti i mediatori derivanti dall'acido arachidonico agiscono in maniera tardiva rispetto ad istamina e serotonina, essendo, a differenza loro, prodotti de novo e non preformati, ed agiscono sia a livello locale che sistemico. Le prostaglandine, infatti, agiscono a livello locale provocando vasodilatazione e favorendo l'edema ma sono coinvolte anche nella patogenesi del dolore e della febbre. I trombossani, tra cui citiamo TxA₂, sono potenti vasocostrittori e induttori di aggregazione piastrinica. I leucotrieni sono sintetizzati principalmente dai leucociti e sono dei potenti agenti chemiotattici proprio nei confronti di questo tipo cellulare, oltre ad avere effetti a livello vascolare; infatti, sono in grado di stimolare: l'aggregazione e l'adesione dei leucociti all'endotelio delle venule, attivare la risposta neutrofilica e determinare il rilascio di enzimi lisosomiali.

1.3.1.4 Il sistema delle chinine

Il sistema delle chinine, o sistema chinina-callicreina, è un sistema coinvolto in maniera attiva in alcuni meccanismi fondamentali dell'organismo dell'uomo, tra cui infiammazione, coagulazione del sangue e nel dolore. Le chinine sono polipeptidi vasoattivi derivanti da alcune proteine plasmatiche, dette chininogeni, a seguito dell'azione di enzimi ad azione proteolitica chiamati callicreine. Il fine ultimo di questo sistema è la sintetizzazione di bradichinina, un mediatore molto potente che viene poi velocemente degradato. La bradichinina, infatti, è una molecola in grado di aumentare la permeabilità vascolare,

provocare la contrazione della muscolatura liscia, dare vasodilatazione e, se iniettata nella cute, determinare dolore.

1.3.1.5 Le citochine e le chemochine

Le citochine sono una famiglia di proteine prodotte da molteplici tipi cellulari – prevalentemente linfociti e macrofagi attivi ma anche cellule del tessuto epiteliale e connettivo o cellule endoteliali – in grado di modulare la funzione di altre cellule. Le chemochine, invece, sono una famiglia di proteine di dimensioni piuttosto ridotte (8-10 kDa), che svolgono come funzione principale la chemiotassi di specifici tipi leucocitari. Sono molecole coinvolte attivamente nella risposta immunitaria, nell'infiammazione, sia acuta che cronica, e in tutte le fasi della guarigione. Questi due tipi di cellule sono coinvolte attivamente in tutto il processo di guarigione e ne condizionano il successo partecipando alla complessa integrazione di segnali che coordina diversi processi cellulari.

Insieme a citochine e chemochine vengono spesso citati i fattori di crescita. Il termine fattori di crescita, in passato, veniva spesso usato in maniera interscambiabile con quello citochina, tuttavia, al giorno d'oggi si tende a fare una distinzione tra questi due tipi di molecole: i fattori di crescita sono quelle molecole che hanno effetti positivi sulla proliferazione cellulare, le citochine hanno un effetto neutro – dove con effetto neutro si intende che alcune possono svolgere la funzione di un fattore di crescita e quindi indurre effetti positivi sulla proliferazione, altre, invece possono inibirla o persino indurre la morte cellulare – sulla proliferazione; dei fattori di crescita parleremo più avanti in un capitolo dedicato.

1.3.2 Fibrina

Nel corso della nostra trattazione abbiamo più volte ribadito come, nel momento in cui vi sia una lesione vascolare, il primo processo attuato dal nostro organismo sia volto all'arresto dell'emorragia locale. Questo avviene tramite l'aggregazione piastrinica e l'innescarsi della cascata coagulativa che, come risultato finale, portano alla conversione del fibrinogeno, precursore solubile, in fibrina, che forma una rete insolubile a livello della lesione e pone le basi del coagulo. La fibrina, infatti, dapprima argina il sanguinamento e successivamente funge da matrice iniziale per i processi di guarigione poiché favorisce l'adesione da parte dei leucociti e promuove la formazione del tessuto di granulazione. Si tratta di una matrice provvisoria in quanto, una volta che fibroblasti e cellule endoteliali hanno espresso i propri recettori, le integrine, invadono il coagulo, che è ricco di fibrina e fibronectina (glicoproteina che favorisce l'adesione cellulare alla matrice), nello spazio della ferita e cominciano a deporre la nuova matrice extracellulare permanente. La fibrina è quindi un'importante proteina coinvolta nei processi di emostasi, dell'infiammazione e nella riparazione tissutale. Viene prodotta a partire dal fibrinogeno, una glicoproteina solubile, prodotta dal fegato, con una concentrazione fisiologica plasmatica di circa 2-4mg/ml, che può raddoppiare nell'eventualità di un processo infiammatorio acuto. Questo aumento è essenziale per un'efficiente formazione del coagulo ma può anche essere pericoloso in quanto l'iperfibrinogenemia aumenta il rischio di trombosi. Visto il ruolo centrale della fibrina, e, quindi, del suo precursore, il fibrinogeno, e la loro interazione con svariati tipi cellulari, è intuitivo che mutazioni del fibrinogeno o alterazioni nel processo di formazione della fibrina possono influenzare in maniera importante la guarigione delle ferite, così come possono influenzare o determinare alcune patologie. Inoltre, essendo il processo di formazione del coagulo e della rete fibrinica complesso e molto articolato, nel quale

intervengono numerosi fattori che regolano le varie tappe del fenomeno, le alterazioni si possono presentare non solo a carico di fibrinogeno e fibrina ma anche a carico di alcune di queste proteine, che modificano quindi le proprietà meccaniche e biochimiche, nonché la funzione e la struttura, del prodotto finale, modificando così il naturale decorso del processo di guarigione.

Come abbiamo detto la fibrina ha interazioni con diversi tipi cellulari e costituisce una vera e propria molecola ponte anche per le interazioni cellula-cellula. La fibrina inoltre costituisce una rete sulla quale le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, i cheratinociti, i leucociti ed i fibroblasti, possono aderire, proliferare ed organizzarsi al fine di finalizzare alcune delle loro funzioni specifiche. Tra le sue varie interazioni cellulari, di particolare interesse sono quelle con le cellule infiammatorie. Infatti, a seguito della formazione del coagulo, questo viene velocemente invaso da cellule ad azione fagocitaria – granulociti e monociti – attratte da prodotti di degradazione della fibrina, da frammenti di collagene, trombina, fibronectina, elastina e dal TGF- β – che eliminano eventuali contaminanti di origine batterica, tramite produzione di enzimi digestivi e radicali liberi dell'ossigeno.

Per quanto riguarda l'interazione della fibrina con le cellule endoteliali, possiamo vedere come questa abbia un ruolo anche nel processo di angiogenesi. Infatti, le cellule endoteliali arrivano nella matrice fibrinica provvisoria, e quindi nel coagulo, a seguito della stimolazione di alcuni fattori di crescita come VEGF e FGF-2, che inducono le cellule endoteliali a proliferare e migrare dai tessuti adiacenti alla struttura di fibrina. Le cellule endoteliali si legano alla fibrina tramite le integrine e qui cominciano il processo di angiogenesi, proliferando e mutando la loro forma, assumendo un aspetto allungato. Al termine del processo c'è la stabilizzazione vasale grazie all'interazione con i periciti e la formazione della membrana basale. Durante questo processo le cellule endoteliali degradano la fibrina, avendo un'azione induttiva sulla plasmina, le metalloproteasi e la sintesi di radicali liberi.

Le ultime interazione della fibrina sono quelle con i fibroblasti che invadano il coagulo intorno al quinto giorno, sempre sotto induzione di alcuni fattori di crescita – PDGF e TGF- β – di fibrina e fibronectina e si occupano di sostituire la fibrina con collagene di tipo I e le altre proteine che andranno a formare la matrice extracellulare. Dal settimo giorno, la matrice extracellulare neoformata è abbondante e i fibroblasti cambiano il loro tipo in miofibroblasti, i quali provvederanno alla contrazione della ferita.

In conclusione, possiamo dire che la fibrina occupa in ruolo effettivamente attivo all'interno dei processi di guarigione poiché non è solamente impiegata nella formazione di una struttura stabile ed insolubile che funga da guida alla deposizione della nuova matrice extracellulare, bensì ha diverse interazioni cellulari ed è in grado di reclutare cellule, favorirne la migrazione, l'adesione e la proliferazione e partecipare al processo neoangiogenetico.

1.3.3 Piastrine

Le piastrine, o trombociti, sono frammenti di grandezza compresa tra 1 e 4 micrometri e forma discoidale, facenti parte degli elementi figurati del sangue, che derivano da cellule progenitrici di origine emopoietica, i megacariociti. Si tratta di frammenti cellulari, circolanti nel sangue, privi di nucleo ed altamente specializzati, fondamentali per i processi di emostasi e trombosì. Sulla loro membrana, le piastrine, esprimono numerosi recettori e molecole di adesione ed inoltre presentano differenti tipi di granuli che contengono vari mediatori (Marco Mozzati, 2017). A partire da questo si capisce come non solo il loro utilizzo sia fondamentale nel ripristinare l'emostasi in un individuo, ma come siano coinvolte anche in fenomeni immunitari, infiammatori, riparativi e di rigenerazione di tessuti lesi o danneggiati, oltre che nel mantenimento della funzione di determinati organi.

Citando il processo di guarigione non possiamo non pensare a tutte le interconnessioni con le fasi del processo infiammatorio, che richiedono tutta una serie di interazioni atte al fine regolamento dei complessi fenomeni di migrazione e proliferazione cellulare, di organizzazione e rimodellamento della matrice extracellulare, di differenziamento dei tipi cellulari o ancora dell'angiogenesi; ebbene le piastrine sono coinvolte in ciascuno di questi processi. Prendiamo come punto di partenza un danno a livello tissutale: i primi sistemi che vengono attivati dal nostro organismo sono quello della coagulazione, al fine di raggiungere emostasi e formazione di un coagulo stabile, e quello infiammatorio, che innescano i primi eventi per la guarigione della ferita. Le piastrine sono le prime cellule ad arrivare ed intervenire localmente nel sito lesione e, a seguito della loro attivazione, iniziano a rilasciare innumerevoli mediatori – tramite α -granuli, corpi densi e lisosomi – facenti parte della famiglia delle chemochine, delle citochine e dei fattori di crescita.

Gli α -granuli sono i granuli citoplasmatici più numerosi e sono preposti, a seguito di attivazione, al rilascio di importanti mediatori che inducono il principio dei fenomeni di emostasi ed infiammatori. Alcuni di questi mediatori sono deputati alla promozione dell'interazione tra piastrine ed altri tipo cellulari, come leucociti, e le proteine plasmatiche con le pareti vasali (ad esempio la P-selectina); altri attivano e reclutano cellule nel sito della lesione. Inoltre, questi granuli sono in grado di catturare alcune proteine plasmatiche, quali fibrinogeno ed immunoglobuline, e stoccarle come riserva, per essere poi rilasciate molto rapidamente dopo l'attivazione.

I corpi densi, invece, contengono ADP, ATP e serotonina che favoriscono l'aggregazione piastrinica e promuovono la vasocostrizione e la sintesi di citochine pro-infiammatorie. I lisosomi, come dice il nome, contengono enzimi lisosomiali quali glicosidasi e proteasi ma anche proteine con attività antibatterica. Questi enzimi partecipano alla distruzione dell'eventuale componente batterica, alla

degradazione della matrice extracellulare, alla trombolisi e all'inattivazione e degradazione dell'eparina.

Classicamente, il rotolamento e l'adesione dei leucociti sull'endotelio infiammato è mediato da proteine, chiamate selectine, espresse dalle cellule endoteliali; nonostante ciò, le piastrine ricoprono un certo ruolo nel fornire molecole di adesione per il reclutamento secondario dei linfociti. Infatti, le piastrine, una volta attivate, esprimono le P-selectine che migrano dai granuli alla superficie cellulare, e citochine pro-infiammatorie con la funzione di regolare l'adesione e l'attivazione dei leucociti a livello della lesione (Jenne CN, 2013) (Ghasemzadeh M, 2013). Vi sono poi altre importanti molecole di adesione, che fanno parte della famiglia delle integrine, con struttura proteica transmembrana, che mediano il legame con molecole della matrice extracellulare – fibronectina e collagene – e con molecole presenti sulla superficie di alcuni tipi cellulari. Infine, i trombociti esprimono dei mediatori che promuovono l'adesione con leucociti e cellule endoteliali ovvero immunoglobuline, molecole di adesione tra piastrine ed endotelio ed alcune glicoproteine. Ci sono infine i metaboliti dell'acido arachidonico, gli eicosanoidi, che portano alla sintetizzazione di molecole lipidiche pro-infiammatorie (PAF), di leucotrieni ed altri – come le prostaglandine. Il PAF media l'adesione delle piastrine con i neutrofili; una volta generatosi il contatto cellula-cellula queste si forniscono vicendevolmente alcuni precursori per produrre delle lipossine, molecole in grado di inibire la chemiotassi neutrofilica e di portare il processo infiammatorio verso la conclusione per avviare successivamente le fasi riparative (Robbins, 2010).

Come abbiamo detto le piastrine sono coinvolte in numerose fasi dei processi di guarigione ed infatti, oltre alla loro interazione con i leucociti, i fattori rilasciati dalle piastrine possono mediare e regolare proliferazione e migrazione di tipi cellulari coinvolti nella riparazione tissutale, quali fibroblasti, cellule muscolari lisce e cellule staminali mesenchimali; regolano l'importante meccanismo dell'angiogenesi,

rilasciando alcuni mediatori che possono promuovere la neo-angiogenesi ed altri che possono, invece, inibirla.

2 EMOCOMPONENTI NON TRASFUSIONALI

2.1 Introduzione

Gli emocomponenti sono frazioni del sangue intero ricavati mediante metodi fisici semplici, generalmente basati sul principio della centrifugazione. Gli emocomponenti si distinguono in tre gruppi principali: emazie (i globuli rossi), plasma e piastrine. Possono essere somministrati per via trasfusionale o per via topica e infiltrativa; questi ultimi sono comunemente chiamati **emocomponenti per uso non trasfusionale** (EUNT) (Marco Mozzati, 2017).

È importante non confondere emocomponenti con emoderivati poiché questi ultimi vengono prodotti a partire dal sangue intero, proprio come gli emocomponenti ma a differenza loro vengono sottoposti a procedimenti industriale e quindi sono da considerarsi come farmaci a tutti gli effetti (ad esempio albumina e fattori della coagulazione).

2.2 Emocomponenti ad uso non trasfusionale

Per la legge italiana, secondo il Decreto del Ministero della Salute 1° Agosto 2019 “Modifiche al decreto 2 novembre 2015” recante “Disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti”, con **emocomponenti ad uso non trasfusionale**

si intendono quei prodotti allogenici o autologhi da utilizzarsi non a fini di trasfusione, le cui modalità di applicazione sono:

- Per superfici cutanee o mucose
- Per infiltrazione articolare o intra-tissutale
- Come materiale con applicazione locale in sede chirurgica, puro o addizionato a materiali biologici non cellulari o a dispositivi medici
- Come materiale da utilizzare *in vitro* in ambiente di laboratorio per studi clinici approvati

Si tratta di componenti ricavate a partire dal sangue intero, possono essere singole oppure mischiate in varie combinazioni, che fungono da prodotto terapeutico, ad azione locale, per implementare il processo di guarigione dei tessuti. Questa classe di emocomponenti è costituita da: piastrine, lisato piastrinico, siero, plasma, trombina, fibrina e fibrinogeno e altre proteine plasmatiche. Gli emocomponenti contenente piastrine o concentrato piastrinico sono prodotti ad alta concentrazione di fattori di crescita, principali responsabili dell'attività chemiotattica e dell'induzione della proliferazione e differenziamento cellulare. Tra i più importanti fattori di crescita piastrinici troviamo il PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), il TGF- β (Trasforming Growth Factor), il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ed EGF (Epidermal Growth Factor). Generalmente, le piastrine iniziano a rilasciare i propri fattori di crescita una volta entrate in contatto con le molecole di collagene e gli ioni calcio presenti nella lesione, tramite adesione e secrezione del contenuto degli α -granuli. Con gli EUNT, invece, si può anticipare questa fase, attivando già le piastrine prima dell'applicazione in situ, per mezzo di trombina, ioni calcio o superfici di vetro. Così facendo la cinetica di rilascio dei fattori di crescita all'interno dei tessuti viene modificata, determinando una distribuzione e diffusione all'interno della lesione precoce. Per la struttura dell'emocomponente fondamentali sono le proteine plasmatiche come

la fibronectina, la vitronectina e la fibrina, che mediano l'adesione cellulare e costituiscono una matrice che funge da struttura guida per la neoformazione del tessuto osseo, connettivo ed epiteliale. Il reticolo di fibrina che si viene a formare, inoltre, ha l'importante funzione di trattenere le piastrine al suo interno e rallentare il rilascio dei fattori di crescita, che avviene così in maniera più graduale all'interno dei tessuti e determina un intervallo d'azione prolungato.

All'interno dei concentrati piastrinici, i leucociti non sono un prodotto di per sé voluto e la loro concentrazione varia a seconda della metodica utilizzata per la centrifugazione del sangue intero. I leucociti, infatti, che non vengono utilizzati sotto forma di concentrati leucocitari, generalmente non vengono separati dai concentrati piastrinici, poiché servirebbero apposite metodiche di filtrazione, sono riscontrati all'interno del concentrato piastrinico a livello del buffy coat, uno strato cellulare biancastro che troviamo subito al di sopra della frazione eritrocitaria. Nel buffy coat, oltre ai leucociti, residua anche una discreta concentrazione piastrinica, motivo per il quale al fine di ottenere un concentrato piastrinico valido è necessario andare a prelevarlo almeno in parte; la naturale conseguenza del prelievo di buffy coat è l'inevitabile contaminazione del concentrato da parte dei leucociti, altrimenti otterremmo concentrati piastrinici con scarse percentuali di trombociti. Questo involontario prelievo leucocitario è molto discusso poiché la popolazione maggiormente rappresentata è quella dei granulociti neutrofili, i quali una volta liberati nei tessuti rilasciano enzimi proteolitici e specie reattive dell'ossigeno, ad attività pro-infiammatoria, in grado di danneggiare i tessuti trattati con l'emocomponente; per contro la contaminazione leucocitaria sembra utile poiché sviluppa un'attività antibatterica ed immunomodulatoria all'interno del sito trattato.

2.2.1 Emocomponenti ad uso non trasfusionale autologo od omologhi

Da definizione ministeriale gli emocomponenti non trasfusionali ammessi nella professione medica possono essere *autologhi* od *omologhi*. Autologo significa che l'emocomponente deriva da un prelievo effettuato sul paziente stesso che fruirà dell'emocomponente, omologo, invece, indica quell'emocomponente derivato da un paziente donatore. È importante ricordare che, ove possibile, sono sempre da preferire gli emocomponenti di derivazione autologa per minimizzare i rischi di trasmissioni virali e di reazioni immunologiche. Infatti, nonostante il rischio si avvicini notevolmente allo zero, soprattutto grazie alle metodiche di screening, non si può del tutto escludere, nel caso di emocomponente omologo, il rischio di trasmissione di virus come HIV, HBV, HCV o di virus che non vengono ricercati a livello ematico come il West Nile Virus; e non si può escludere il rischio di reazioni immunitarie anticorpali, a seguito dell'esposizione dell'organismo ad antigeni omologhi, che possono compromettere future trasfusioni, trapianti o dare risposte cliniche negative.

2.3 Classificazione dei prodotti terapeutici derivanti da EUNT

2.3.1 Concentrati piastrinici per uso non trasfusionale

I concentrati piastrinici per uso non trasfusionale, o CPUNT, sono storicamente identificati come PRP (Platelet-Rich Plasma o plasma ricco di piastrine) e hanno, in letteratura, acquisito differenti nomenclature, alle quali si sono poi aggiunte le varie definizioni commerciali. Questo genera un po' di confusione soprattutto in virtù

delle differenze di contenuto – in termini di concentrazione piastrinica, fibrinica e leucocitaria, di funzionalità, di anticoagulanti e di attivatori – e delle differenze di preparazione dei vari concentrati – metodo di centrifugazione, tipo di materiale utilizzato nella realizzazione delle provette, tempistiche di attivazione (Dohan DM, 2006). Effettivamente, tutte queste possibili variabili rendono i vari concentrati piastrinici diversi tra di loro in termini di effetto biologico e rende difficile una comparazione diretta tra di essi. Recentemente, è stata proposta una classificazione basata sulla concentrazione e la struttura fibrinica e sulla concentrazione di leucociti presente all'interno del concentrato (M. Dohan Ehrenfest D, 2012-2013) (Dohan Ehrenfest DM, 2009). Si sono così potuti distinguere due gruppi di concentrati piastrinici:

- PRP o Platelet-Rich Plasma, ovvero un plasma in cui prevale la componente piastrinica
- PRF o Platelet-Rich Fibrin, ovvero un concentrato in cui prevale la fibrina polimerizzata

Ognuno di questi due gruppi è poi suddivisibile, sulla base della presenza o assenza di componente leucocitaria, in altre due sottocategorie: la loro nomenclatura potrà essere preceduta da una “P”, di *pure*, nel caso in cui si tratti di concentrati puri e privi di contaminazione (P-PRP o P-PRF) o potrà essere preceduta da una L, di *leukocyte*, nel caso in cui vi sia contaminazione leucocitaria (L-PRP o L-PRF).

2.3.1.1 PRP o Platelet-Rich Plasma

Si tratta di un prodotto caratterizzata da una concentrazione piastrinica superiore al valore fisiologico, che può variare, anche in maniera molto importante, in base alla metodica di preparazione che viene utilizzata e alla conta piastrinica del paziente sottoposto al prelievo. Vi è riscontro terapeutico del suo effetto nel caso di concentrazioni di $2300 \times 10^3/\mu\text{l}$, l'effetto è proporzionale alla concentrazione di piastrine e quindi,

ragionevolmente, alla concentrazione di fattori di crescita rilasciati. Il valore soglia è stato attestato a circa $1000 \times 10^3/\mu\text{l}$ ovvero 4-5 volte la concentrazione fisiologica nel sangue periferico e si è visto come valori molto elevati producano un effetto paradossale, determinando inibizione e livello del differenziamento cellulare. Oltre la componente principale, quella piastrinica, nel PRP troviamo anche plasma e piccole concentrazioni di anticoagulanti. Possiamo poi trovare a seconda dell'avvenuto prelievo del buffy coat o meno, bassi livelli di leucociti e quindi avremo a che fare con un P-PRP, oppure alti livelli e quindi avremo a che fare con un L-PRP ovvero un concentrato leucopiastrinico. Il PRP può essere utilizzato sia in forma liquida, per via infiltrativa, sia in forma coagulata, dopo essere stato attivato da trombina, calcio o batroxobina. In questo secondo caso si viene a formare prodotto di consistenza semi-solido definito gel piastrinico, costituito da un reticolo di fibrina, a legami bivalenti, che intrappola piastrine e leucociti.

2.3.1.2 PRF o Platelet-Rich Fibrin

Si tratta di un prodotto che per la sua struttura può essere definito biomateriale: è costituito da una struttura di fibrina densa e caratterizzata da legami tetraivalenti che gli conferiscono stabilità. Il PRF si ottiene a partire dal sangue intero, che viene prelevato senza anticoagulante in maniera tale che la polimerizzazione della fibrina avvenga durante la centrifugazione. Con questa metodica di preparazione le piastrine rimangono intrappolate nella rete di fibrina che si viene a creare durante il processo di coagulazione e si dispongono principalmente nella parte superiore del coagulo. Con questo tipo di gel si ha una lunga azione di stimolo a livello tissutale, in quanto i fattori di crescita vanno ad impregnare la matrice fibrinica e riescono a persistere in loco per un periodo di tempo considerevole. Anche in questo tipo di concentrato si possono ottenere concentrati poveri di leucociti e ricchi

di leucociti ma a differenza del PRP, per le sue caratteristiche fisico-strutturali non è adatto alla somministrazione per infiltrazione.

2.3.1.3 Colliri

I colliri sono prodotti a partire da siero o da concentrato piastrinico in plasma e in base alla componente ematica di origine assumono caratteristiche differenti

- Colliri da siero autologo: si tratta di una soluzione acquosa contenente proteine sieriche residue a seguito della coagulazione, quali albumina, fibronectina e fattori di crescita. Inoltre, contiene vitamine, immunoglobuline, proteine del complemento ed enzimi ad azione antimicrobica – come il lisozima. Ha caratteristiche chimiche, come pH ed osmolarità, molto simile alle lacrime naturali e viene addizionato con soluzione salina per renderne confortevole l'applicazione. Queste peculiarità lo rendono ideale per l'applicazione in campo oftalmico.
- Colliri da lisato di piastrine autologo: si tratta di una soluzione acquosa contenente proteine sieriche e grandi quantità di fattori di crescita; rispetto al collirio derivante da siero contiene concentrazioni molto più elevate dei fattori EGF e PDGF, coinvolti nella riparazione e nel mantenimento dell'epitelio corneale. Questa grande concentrazione di fattori di crescita è a scapito delle altre componenti, infatti, le quantità di fibronectina e vitamine è molto ridotta. Anche questo genere di preparazione viene addizionato con soluzione salina al 30% circa, per facilitarne l'applicazione.

2.3.1.4 Metodi di applicazione dei CPUNT

Come accennato i concentrati piastrinici ad uso non trasfusionale possono essere applicati principalmente tramite due vie di somministrazione: quella topica e quella per infiltrazione intra-tissutale.

Per quanto riguarda l'applicazione topica su superfici cutanee o mucose si deve ricorrere alle formulazioni semi-solide come il gel di PRP o il PRF. Se invece l'applicazione fosse a livello di una lesione ossea o di una lacuna ossea, allora possiamo integrare al nostro CPUNT del biomateriale autologo, allogenico, xenogenico od alloplastico, in maniera tale che questo venga trattenuto e consolidato all'interno della struttura gelificata del nostro concentrato.

Per quanto riguarda l'applicazione per via infiltrativa si deve utilizzare il PRP liquido, o senza apportare alcuna modifica o aggiungendo appena prima dell'infiltrazione calcio o trombina al fine di attivarlo e di velocizzare il rilascio di fattori di crescita a livello della zona interessata. Per poter eseguire correttamente questa procedura, senza che vi siano rischi per i tessuti circostanti e per raggiungere con precisione il sito interessato, è necessario effettuarla con assistenza ecografica.

2.3.2 Indicazioni cliniche

Oggi è disponibile un'ampia letteratura riguardante i CPUNT pressoché in ogni campo della medicina ma sono ancora pochissime le metanalisi o le revisioni sistematiche che ne definiscano l'efficacia definitiva nella pratica clinica, tuttavia, numerosi studi randomizzati ne suggeriscono l'impiego in svariati campi d'applicazione. Emerge a partire da ciò la necessità di effettuare studi con una casistica più ampia ma anche di ottenere una maggiore standardizzazione e definizione dei prodotti utilizzati per poter confrontare con maggior precisione i risultati degli studi. Ad oggi è descritto l'utilizzo di CPUNT in vari

distretti anatomici quali: cute, osso, cartilagini ed articolazione ed a livello oculare.

2.3.2.1 Controindicazioni

Sulla base della letteratura non sembrano essere presenti controindicazioni nell'utilizzo dei concentrati piastrinici ad uso non trasfusionale.

2.4 Concentrati piastrinici di prima generazione

I concentrati piastrinici di prima generazione sono i primi ad essere stati sviluppati e constano di alcune caratteristiche ben definite. Questo tipo di concentrati ha bisogno dell'aggiunta di attivatori, motivo per il quale, da un certo punto di vista vengono ritenuti meno sicuri in quanto vi è possibilità di reazioni immunologiche, come trombina e cloruro di calcio e hanno una polimerizzazione improvvisa della fibrina – più o meno veloce a seconda della quantità di anticoagulante presente nel preparato. Inoltre, hanno un'organizzazione tridimensionale della rete di fibrina costituita da legami tetra-molecolari o bi-molecolari e una forte concentrazione di trombina; questo consente l'ispessimento dei polimeri di fibrina: ciò porta a una rete rigida, poco favorevole all'inglobamento di citochine e alla migrazione cellulare. Questa struttura rigida offre una grande resistenza di questo gel, adatta a sigillare saldamente i tessuti biologici.

2.4.1 PRP

Il Platelet-Rich Plasma è un emocomponente ad uso non trasfusionale di prima generazione ed è il più noto fra i CPUNT. Il suo uso è largamente diffuso in diverse branche della medicina e nell'ingegneria tissutale per la sua capacità di implementare la rigenerazione tissutale.

Il PRP, al quale negli anni sono stati attribuiti svariati nomi – commerciali e non – è una frazione di plasma autologo la cui concentrazione piastrinica è superiore a quella basale. Si tratta, quindi, di un gel contenente principalmente piastrine, ma anche altre componenti cellulari, quali i leucociti, fortemente concentrate ed in grado di rilasciare una proporzionale concentrazione di fattori di crescita all'interno del sito trattato.

Per la preparazione del PRP sono state immesse sul mercato, nel corso degli anni, differenti sistematiche che adattano anche differenti macchine per la centrifugazione e differenti protocolli operativi; questo ha portato il generarsi di prodotti che possono essere anche piuttosto diversi tra di loro. Ci sono parametri estremamente variabili: il sistema può essere chiuso e prevedere degli step da eseguire manualmente, la quantità di sangue da prelevare può essere differente e anche velocità di centrifugazione, forza centrifuga relativa e durata della centrifugazione, possono essere differenti. Nonostante queste variabili portino a prodotti finali la cui concentrazione piastrinica è molto differente tra loro, si è cercato di stabilire un valore ottimale e si è stabilito che la concentrazione ideale si attesta intorno a 10^6 piastrine su microlitro ovvero 4-5 volte il valore fisiologico (Marx, 2004) (Harmon K, 2013). Concentrazioni minori non sono sufficienti per un effetto rigenerativo ottimale mentre concentrazioni maggiore sembrano persino possano avere un effetto inibitorio (Harmon K, 2013) (G Weibrich, 2004).

Gli step caratterizzanti la preparazione del PRP e che infatti sono comuni in tutte le metodiche sono:

- La raccolta del sangue avviene all'interno di provette contenenti **anticoagulante**.
- La **centrifugazione** consta di due cicli consecutivi al termine dei quali si ottiene un preparato liquido contenente in concentrazioni molto elevate sia piastrine che leucociti.

- L'**attivazione**, che deve essere effettuata poco prima dell'utilizzo, al fine di indurre l'aggregazione piastrinica. È in questo momento che il PRP passa dall'essere un liquido allo stato di gel.

Questi sono i passaggi imprescindibili che contraddistinguono il PRP ed andremo ad analizzarli singolarmente.

L'**anticoagulante** è essenziale per mantenere il PRP liquido ed inattivo durante le fasi chirurgiche dei nostri interventi e per poterlo utilizzare al momento del bisogno. Inoltre, è fondamentale anche in tutte quelle pratiche che prevedono l'utilizzo del PRP allo stato liquido, dalla somministrazione per via infiltrativa, all'utilizzo come collirio, fino all'utilizzo che se ne fa per trattare le superfici implantare prima dell'inserimento.

I due cicli di **centrifugazione** sono imprescindibili in quanto, nel primo andremo a separare gli eritrociti dal resto, il secondo invece agirà sulla concentrazione delle piastrine. Nel primo ciclo, infatti, quello che andremo ad ottenere sarà uno strato inferiore contenente i globuli rossi ed uno superiore dove ci sarà plasma, piastrine, fattori di crescita e leucociti. Nel secondo ciclo, effettuato in una nuova provetta contenente solo il plasma (scartiamo quindi la parte di globuli rossi derivante dalla prima centrifugazione), quello che andremo ad ottenere è una porzione inferiore di plasma ricco di piastrine e quindi con elevata concentrazione ed una seconda porzione sovrastante la cui concentrazione piastrinica è molto ridotta; questa seconda frazione prende il nome di PPP, plasma povero di piastrine o Platelet-Poor Plasma.

Il PRP liquido prima del suo utilizzo deve andare incontro al passaggio dell'**attivazione**. L'attivazione si può ottenere con l'aggiunta di trombina, autologa o bovina, batroxobina o cloruro di calcio. Questa attivazione induce l'aggregazione piastrinica a seguito della fusione delle membrane dei granuli citoplasmatici con la membrana della

piastrina stessa, e il conseguente rilascio immediato dei fattori di crescita e degli enzimi contenuti al loro interno. Si tratta di un processo molto veloce, infatti, nei primi dieci minuti vengono rilasciate circa il 70% delle sostanze contenute nei granuli e dopo un'ora ne sono state rilasciate quasi il 100%. A questo punto le piastrine continuano a sintetizzare fattori di crescita per circa sette giorni, dopo di che, una volta esaurite le loro capacità di sintesi e secrezione vanno incontro a lisi. Inoltre, l'attivazione del PRP induce un cambiamento a livello di forma del PRP stesso, che passa dall'essere liquido all'essere un gel. Questo gel, costituito da una matrice di fibrina piuttosto spessa e rigida, ha la capacità di modulare il rilascio dei fattori di crescita da parte delle piastrine.

2.4.1.1 Applicazioni

Il PRP è un prodotto molto versatile poiché, a seconda dello scopo che si vuole raggiungere, può essere somministrato in maniera differente. Come abbiamo detto può essere lasciato liquido ed essere infiltrato nel tessuto di nostro interesse o può essere attivato in forma di gel e posizionato dove ci serve che esplichi la sua azione sui tessuti, ma non solo. Infatti, il PRP può essere mischiato con osso particolato per essere poi innestato, può essere applicato in strati alterni con materiali da innesto, può essere utilizzato in forma di membrana – a seguito di una adeguata compressione – grazie alla sua struttura fibrinica, può essere utilizzato per bagnare le superfici implantari o, ancora, può essere utilizzato per riparare alcune lacerazioni tissutali, come ad esempio piccole comunicazioni oro-antrali che si vengono a creare a seguito della lacerazione della membrana di Schneider.

2.4.2 PRGF

Un altro concentrato piastrinico ad uso non trasfusionale di prima generazione molto conosciuto ed usato è il PRGF-ENDORET® ovvero

il Platelet-Rich in Growth Factors o plasma ricco di fattori di crescita. Questo prodotto, realizzato da Biotechnology Institute a seguito delle ricerche del dottor Eduardo Anitua, è un prodotto di derivazione autologa, privo di leucociti e con un'adeguata concentrazione piastrinica. È un prodotto i cui protocolli sono codificati ed univoci, non vi sono strumenti o metodiche diverse che si possono utilizzare per arrivare ad avere come risultato finale un PRGF, da quelle dichiarate nel momento della pubblicazione degli studi pilota. A differenza dagli altri CPUNT, il PRGF si ottiene a partire da piccoli, anche se pur sempre variabili, volumi sanguinei (30-90 cm³) e si ottiene con una sola centrifugazione, senza passaggi particolarmente complessi da dover eseguire. L'anticoagulante utilizzato per la preparazione del PRGF è il citrato di sodio che consente di non danneggiare od alterare i recettori di membrana presenti sulle piastrine; invece, l'attivazione avviene per mezzo di cloruro di calcio, in maniera tale da sfruttare la trombina autologa del paziente stesso. Il mancato utilizzo di trombina bovina consente al PRGF di collocarsi in una fascia di biosicurezza per il paziente più alta rispetto ad altri CPUNT, come ad esempio il PRP, poiché si riducono i rischi di reazioni immunitarie. Infatti, l'inserimento di cloruro di calcio al PRFG consente attivare la trombina autologa che, a sua volta, va a frammentare il fibrinogeno in fibrina che forma dei monomeri; questi monomeri vanno poi ad unirsi ed a formare una matrice di fibrina tridimensionale con elevata stabilità. Contestualmente le piastrine si attivano e rilasciano le sostanze contenute nei granuli citoplasmatici per esocitosi. Si ha così un massivo rilascio di fattori di crescita che, però, non hanno la possibilità di disperdersi nei tessuti, infatti, il fitto reticolo di fibrina costituisce una barriera alla diffusione rapida ed immediata di questi fattori, che quindi avviene in maniera modulata e costante nel tempo. Questo rilascio prolungato consente alle molecole rilasciate di intervenire ed avere un effetto bioattivo durante tutte le fasi di rigenerazione.

L'applicazione del PRGF ha effetti mitogeni, differenziatori ed angiogenetici, garantitigli dal PRGF, ma ha anche effetti per quanto riguarda una riduzione del processo infiammatorio e del dolore; questo effetto sembrerebbe essere particolarmente presente nel PRGF poiché non solo rilascia fattori agisce in quel senso ma anche la scarsissima presenza/assenza di leucociti.

Per quanto riguarda i protocolli, abbiamo detto che la metodica di preparazione è altamente codificata. La preparazione del PRGF comincia con un prelievo venoso all'interno della provetta con anticoagulante e la successiva centrifugazione. La centrifuga ha un programma standard in maniera tale da semplificare il più possibile la procedura e minimizzare la possibilità di errore. Terminata la centrifuga sarà avvenuta una divisione in base al peso cellulare e quindi avremo, sul fondo della provetta, la parte rossa contenente gli eritrociti, subito sopra troveremo un sottile strato di leucociti, poi di piastrine ed infine di plasma. A questo punto con un pennarello si va ad indentificare la parte leucocitaria, che è di circa 0,2-0,3 ml e si trova subito al di sopra della frazione eritrocitica, e la parte di frazione povera di fattori di crescita, o frazione 1, e quella ricca di fattori di crescita, frazione 2; il volume della frazione 2, ovvero quella ricca di fattori di crescita, è sempre di 2 ml, quello della frazione 1, la frazione povera, è variabile di paziente in paziente. A questo punto si procede al frazionamento delle due frazioni, all'interno di due provette denominate F1 ed F2, tramite l'utilizzo di uno specifico dispositivo che agisce per aspirazione. A questo punto si può procedere con l'attivazione delle due frazioni ed otterremo un coagulo da F2 e una membrana di fibrina da F1.

2.4.2.1 Applicazioni

Il PRGF può essere usato sia da solo che combinato con altri biomateriali; si può utilizzare il coagulo di PRGF da mettere all'interno

del sito e sfruttare l'effetto dei fattori di crescita, con stimolazione della proliferazione, del differenziamento e della neo-angiogenesi o si può mischiare a materiali di origine naturale quali particolato di osso autologo od omologo (derivante da specie umana) o eterologo (come l'osso di origine bovina) oppure da materiali di sintesi, come osso xenogenico. A livello dei difetti ossei, infatti, il PRGF con aggiunta di biomateriale, una volta polimerizzato, consente una migliore gestione dell'innesto, grazie alla consistenza gel di questo materiale ed induce miglioramenti a livello dei processi di osteogenesi.

2.5 Concentrati piastrinici di seconda generazione

Questa seconda generazione di concentrati piastrinici ha alcune caratteristiche che li accomuna tra di loro e differenzia dalla generazione precedenti. La principale caratteristica è l'assenza di anticoagulanti, infatti in questo modo si vanno ad eliminare i rischi di reazioni immunitarie da parte del paziente. Un'altra caratteristica è la polimerizzazione lenta della fibrina a seguito del contatto con le pareti di vetro della provetta; questa determina una concentrazione fisiologica di trombina ed un'organizzazione tridimensionale della matrice che consente alla fibrina di creare una fitta rete sottile e flessibile, la quale andrà poi ad imbibirsi di fattori di crescita e fungerà da struttura di supporto per la migrazione cellulare.

2.5.1 PRF

Il PRF ovvero Platelet-Rich Fibrin, o fibrina ricca di piastrine, è un emocomponente ad uso non trasfusionale di seconda generazione che nasce in Francia, a seguito degli studi del dottor Choukroun et al., nel 2001 (Choukroun J, 2001). Viene identificato come di seconda

generazione poiché in questo tipo di emocomponente si elimina completamente ogni rischio associato all'aggiunta di un anticoagulante e di un attivatore.

Il PRF sfrutta le componenti presenti nel sangue stesso per fornire velocemente, a seguito di prelievo ed un ciclo di centrifugazione, un coagulo di fibrina ricco di citochine e fattori di crescita, che funga da ambiente favorevole per la migrazione cellulare ed una rapida vascolarizzazione.

Il protocollo per ottenere il PRF è piuttosto semplice. Si preleva un campione di sangue in una provetta di vetro da 10 ml, senza anticoagulante al suo interno, e si procede immediatamente ad un ciclo di centrifugazione a 750 g, per 12 minuti. L'assenza di anticoagulante implica una rapida attivazione, nel giro di pochi minuti, della maggior parte delle piastrine a contatto con le pareti della provetta di vetro e l'inizio della cascata della coagulazione. Il fibrinogeno è inizialmente concentrato nella parte superiore della provetta, fino a che la trombina circolante non lo trasforma in fibrina. A quel punto si ottiene un coagulo di fibrina al centro della provetta, collocato tra uno strato inferiore di globuli rossi ed uno superiore costituito da PPP, Platelet-Poor Plasma. Il protocollo è molto semplice ma il suo successo è interamente dipendente dalla velocità di esecuzione. Infatti, dal momento in cui il sangue entra in contatto con le pareti della provetta inizia il processo di coagulazione e quindi bisogna essere molto veloci ad avviare la centrifugazione, al fine di ottenere un PRF clinicamente utilizzabile; se la manipolazione non dovesse essere sufficientemente rapida, la fibrina inizierebbe a coagulare diffusamente all'interno della provetta ed a seguito della centrifugazione troveremmo un coagulo di sangue eccessivamente piccolo e privo della giusta consistenza.

Il PRF è quindi un coagulo formato da fibrina polimerizzata lentamente, e non bruscamente come avviene nei concentrati di prima generazione che utilizzano attivatori, e funge da primo substrato per l'inizio della

guarigione. Al suo interno rimangono intrappolate le piastrine, che attivate rilasciano i fattori di crescita e generano una chemiotassi all'interno della matrice di fibrina, dando inizio alle prime fasi del processo di guarigione. Questo coagulo di fibrina è in grado di rilasciare i fattori di crescita in maniera modulata, con una concentrazione che rimane più o meno costante per circa una settimana, e questo consente un rimodellamento dei tessuti circostanti.

Ad oggi il protocollo per la preparazione del PRF è stato modificato. Infatti, in seguito a numerosi studi che sono stati fatti a partire dal 2012, si è visto come a svolgere un ruolo fondamentale nella vascolarizzazione e nella rigenerazione ossea siano i globuli bianchi; in particolare i granulociti, essendo produttori di BMP-2, che stimola la vascolarizzazione e incrementa la funzionalità dei monociti, fondamentali nella rigenerazione ossea (Soltan, Rohrer, & Prasad, 2012) (Pirracò RP, 2013). Si è quindi deciso di ridurre la forza di centrifugazione impiegata per la preparazione del PRF, al fine di mantenere il più possibile la funzionalità dei macrofagi, che ora si attesta intorno ai 200 RCF (RCF ovvero relative centrifugal force: è il rapporto tra la forza agente su una particella posta in rotazione e il peso della stessa e viene indicata con un numero che rappresenta un multiplo della forza di gravità terrestre, quindi "x g") (Marco Mozzati, 2017). Inoltre, l'utilizzo di un nuovo tipo di provetta ha consentito di ridurre i tempi della centrifugazione ad 8 minuti (A-PRF tubo). Questa serie di modifiche permette di ottenere un PRF maggiormente ricco di cellule della serie bianca e di rendere la matrice di fibrina meno densa, questo porta ad una più rapida colonizzazione da parte delle cellule; con questo protocollo si ottiene dunque una matrice con funzionalità migliorata rispetto alla precedente.

2.5.1.1 Applicazioni

Il PRF, grazie ai suoi effetti di induzione sull'angiogenesi e sull'immunità e grazie alla sua struttura che riesce a guidare la rigenerazione dei tessuti influenzando il metabolismo delle cellule epiteliali e dei fibroblasti, ha ampie applicazioni in campo medico.

Viene utilizzato in differenti branche della medicina come l'odontoiatria – per la preservazione degli alveoli post-estrattivi, per gli innesti ossei e per migliorare la guarigione dei tessuti molli – l'ortopedia – per gli innesti ossei – e in dermatologia – per la guarigione di ferite, piaghe da decubito ed ulcere diabetiche.

Nella pratica odontoiatrica, in particolare, viene utilizzato nelle procedure di rialzo mascellare, nella preservazione dell'alveolo post-estrattivo, in forma di membrana nella ricopertura radicolare a seguito di recessione gengivale, negli innesti per riparare difetti ossei parodontali – come difetti di forcazione – e negli aumenti di tessuto molle.

Infine, se adeguatamente trattato il PRF può anche essere utilizzato per iniezione. Per ottenere un PRF iniettabile si deve prelevare il sangue, metterlo in una provetta appositamente progettata e fare un ciclo di centrifugazione per 3 minuti con una forza di circa 60 g. Otteniamo, in questo modo, un PRF liquido le cui concentrazioni di piastrine sono simili a quelle di PRP e PRGF mentre quelle di leucociti sono circa 20 volte maggiori. Inoltre, il PRF iniettabile, anche detto i-PRF, contiene sul totale delle cellule di cui è composto, un 2% di cellule staminali mesenchimali. L'i-PRF viene iniettato, insieme a frammenti di A-PRF, negli innesti ossei e coagula molto velocemente, circa 1 minuto, rendendoli più coesi e dandogli così una migliore malleabilità e maneggevolezza.

2.5.2 CGF

Il CGF ovvero Concentrated Growth Factor, o concentrato di fattori di crescita, è un CPUNT di seconda generazione che concentra in un piccolo volume molteplici fattori di crescita e cellule. Concettualmente, si tratta di un prodotto simile al PRF ma il differente protocollo operativo con cui si prepara, in particolare la differente velocità di centrifugazione, porta alla formazione di un prodotto la cui matrice di fibrina è maggiormente densa, grande e ricca di fattori di crescita. Il CGF risulta particolarmente adeguato per quanto riguarda la medicina rigenerativa siccome si tratta di un materiale con molta versatilità e con ottime capacità di rigenerazione. In medicina rigenerativa si ricercano quattro fattori fondamentali per la rigenerazione di un tessuto e sono: una adeguata vascolarizzazione, una buona struttura di base (scaffold), presenza di fattori di crescita e presenza di cellule. Questi elementi sono tutti presenti nel CGF, infatti, grazie alla sua consistenza, costituisce un buono scaffold temporaneo sul quale possono migrare le cellule ed innestarsi i processi di guarigione; si tratta, infatti, di una matrice organica costituita da una rete di fibrina in grado di trattenere al suo interno piastrine e leucociti e di consentire il rilascio fattori di crescita.

2.5.2.1 Preparazione del CGF

Il CGF è un emocomponente ad uso non trasfusionale ricavato dal sangue venoso periferico attraverso un particolare protocollo di preparazione ideato dal dottor Luigi Sacco, nel 2006 (Sacco, 2006).

Per la preparazione del CGF si esegue prelievo venoso e il sangue periferico viene raccolto in una provetta, di plastica – in polietilene tereftalato (PET) rivestita in silice – o di vetro dedicata, da 10ml priva di altre sostanze esogene (non vi è utilizzo di anticoagulanti). Immediatamente si passa alla centrifugazione delle provette, che generalmente sono in numero di 2 o 4 per un totale di quantità massima

60ml di sangue raccolto, e sottoposte a un protocollo di centrifugazione particolare che consta di velocità alternate e controllate attraverso un rotore; la macchina da centrifugazione che si usa per ottenere il CGF è MEDIFUGE 200, Silfradent srl, Forlì, Italia. Si tratta di un protocollo di centrifugazione standard che deve svolgersi a temperatura ambiente e prevede: una prima fase di accelerazione della durata di 30 secondi; una seconda fase di 2 minuti a 2700 rpm/735 g; una terza fase di 4 minuti a 2400 rpm/580 g; una quarta fase di 4 minuti a 2700 rpm/735 g; una quinta fase di 3 minuti a 3000 rpm/905 g ed infine, un'ultima fase di 33 secondi di decelerazione e l'arresto del rotore. Queste fasi sono tutte automatizzate, è la macchina che le esegue una dopo l'altra e consente uno snellimento delle procedure. Al termine di questo processo, della durata circa di 14 minuti, si ottiene una stratificazione all'interno della provetta, dovuta alla separazione degli elementi corpuscolati del sangue e alla formazione della rete di fibrina. Partendo dall'altro possiamo quindi osservare una frazione liquida di plasma, detto PPP o Platelet Poor Plasma, una frazione densa e gelatinosa, costituita dal CGF ed infine la frazione contenente i globuli rossi.

A questo punto, con l'ausilio di una pinzetta, si procede all'estrazione delle parti solide, ovvero il CGF e la parte contenente gli eritrociti (RBC) e, dopo averli rovesciati su un apposito cestello, si può procedere ad operare un taglio, grazie a delle forbici, per separare le due parti in continuità tra loro. È importante aver cura di operare il taglio qualche millimetro sotto l'interfaccia tra CGF e RBC. In questo modo, otterremo il CGF isolato e potremo identificare 3 componenti: una parte di un colore giallo, una parte rossa ed una terza parte rappresentata dall'interfaccia tra le due, detta buffy coat.

2.5.2.2 Struttura del CGF

La parte bianca del CGF è costituita da una rete di fibrina e plasma che, nel momento in cui il preparato di CGF viene disteso su una superficie,

tende a fuoriuscire spontaneamente. Attraverso studi effettuati con microscopio elettronico a scansione si è visto come questa parte bianca sia costituita sia da elementi fibrillari sottili, sia spessi tra i quali troviamo elementi piastrinici intercalati. In particolare, si è notato come la rete di fibrina sia notevolmente fitta e compatta, con maglie molto strette, in prossimità del buffy coat, e quindi dell'interfaccia tra parte bianca e parte rossa del CGF, mentre è più lassa, con le maglie più larghe e rarefatte, man mano che ci si allontana dall'interfaccia.

Per quanto riguarda parte rossa del CGF, principalmente è costituita da globuli rossi facilmente identificabili, sia con le colorazioni standard utilizzate per lo striscio di sangue – come May Grunwald-Giemsa – sia con ematossilina-eosina.

Per quanto riguarda l'interfaccia, invece, è possibile identificare, tramite tecniche di immunoistochimica unitamente a colorazione come ematossilina ed eosina, sia i trombociti che la parte leucocitaria. Una problematica che si si è posti analizzando il CGF è stata quella di quantificare il numero di piastrine e quindi la concentrazione all'interno del coagulo. Infatti, essendo questo solido, a differenza degli altri CPUNT, non era possibile procedere con i classici metodi di conta. In primis, quindi, si è pensato di sottoporre la struttura solida a compressione, in maniera tale che le cellule ne fuoriuscissero e si potesse procedere alla quantificazione delle piastrine (David M Dohan Ehrenfest, 2010); come si può ben immaginare, non era una metodica esente da errori, infatti, alcune cellule potevano rimanere intrappolate all'interno e falsare il risultato finale. Si è allora pensato di poter ricavare il numero di piastrine tramite una metodica di sottrazione indiretta, questo metodo prevedeva: una conta delle piastrine in un volume di sangue intero e la sottrazione delle piastrine presenti nel PPP, nello strato RBC e nell'essudato (Hideo Masuki, 2016). Ma anche questa metodica non era precisa, infatti, non si poteva sapere quante piastrine, di quel numero ottenuto, fossero effettivamente integre all'interno del CGF. Infine, si è pensato un altro metodo che consiste

nel prelevare il sangue e metterlo in una provetta contenente anticoagulante (non previsto nel protocollo classico per ottenere CGF) e sottoporla alla centrifugazione standard per l'ottenimento del CGF (Borsani E, 2015). In questo modo viene ricavato CGF in forma liquida nel quale sono presenti circa la metà delle piastrine totali, concentrate principalmente a livello del buffy coat; nel resto del prodotto, invece, non sembra esserci popolazione piastrinica, lasciando presupporre che vengano disintegrate durante il procedimento di centrifugazione. È grazie a questa supposizione che si può ipotizzare la cinetica di rilascio dei fattori di crescita all'interno del CGF: infatti, una parte sembra essere subito fruibile, poiché si trova libera a seguito della distruzione delle piastrine, a cui segue una parte di fattori di crescita che si rendono disponibili più lentamente poiché sarà ad opera delle piastrine rimaste integre, che devono andare contro al processo di attivazione e degranulazione che ha come fine l'esocitosi dei fattori di crescita.

Nel buffy coat non si concentrano maggiormente solo le piastrine bensì anche i leucociti, il cui ruolo nei processi di rigenerazione dei tessuti, come abbiamo già accennato, è ancora piuttosto controverso e discusso. Oggigiorno, però, un sempre maggior numero di studi sembra confermare l'effetto positivo sui processi di guarigione di queste cellule, che deriverebbe dalla loro attività antimicrobica ed immunomodulatoria, oltre che dall'elevata sintesi di VEGF.

Ad influenzare la struttura del CGF ci sono poi fattori riguardanti la strumentazione utilizzata per ottenerlo; infatti, materiale e forma della provetta in cui viene raccolto il sangue periferico influenzano la formazione della rete di fibrina e la distribuzione cellulare all'interno del CGF. L'utilizzo di una provetta di vetro o di una provetta di plastica rivestita di silice da risultati leggermente diversi e, oltre al materiale, anche la forma del fondo della provetta, che può essere roondo o conico, può modificare il risultato finale per quanto riguarda la distribuzione (Bonazza V, 2016). Sembra, per l'appunto, che per ottenere un CGF leggermente più grande sia necessaria una provetta di vetro a fondo

conico: in questo modo, infatti, le cellule si distribuiscono in maniera meno compatta a livello del buffy coat (Borsani E, 2015).

Per quanto riguarda le proprietà meccaniche del CGF è importante sapere che non è in grado, a seguito di una compressione, di ritornare alla sua forma originaria, bensì assume in maniera definitiva la nuova forma; in virtù di ciò, il CGF può essere usato come tale oppure a seguito di una compressione a cui è sottoposto tramite apposite pinze, può essere utilizzato in forma di membrana.

2.5.2.3 Fattori di crescita

Prima di parlare dei fattori di crescita a livello del CGF è bene fare un cappello introduttivo su quali siano e sulle loro funzioni in generale. Faremo quindi un breve elenco ed analisi di tutti i fattori di crescita che vengono rilasciati dalle piastrine e dalle cellule contenute nei CPUNT, alcuni già più volte menzionati, ed entreremo poi nell'argomento in relazione al CGF.

PDGF

Il PDGF o Platelet Derivated Growth Factor, è una glicoproteina con un peso molecolare di circa 30kd e nonostante sia stata descritto nei granuli alfa delle piastrine, è sintetizzata e secreta anche da altre cellule, quali macrofagi e cellule endoteliali. Sembra essere il primo fattore di crescita presente in una ferita: dà inizio alla guarigione del tessuto connettivo, compresa la rigenerazione e la riparazione dell'osso.

Ha moltissime funzioni ed è fortemente coinvolto nei processi di guarigione e rigenerazione tissutale. Le sue funzioni includono: attività di chemiotassi nei confronti dei polimorfonucleati e delle cellule dell'infiammazione, attività mitogena per fibroblasti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, stimolazione nei confronti della migrazione cellulare, dell'angiogenesi e nella contrazione delle ferite e deposizione della matrice extracellulare (in particolare di collagene di tipo I),

stimolazione nei confronti della maturazione ossea ed infine aumento della proliferazione delle cellule staminali mesenchimali.

TGF

TGF- α o fattore trasformante α è prodotto da macrofagi, linfociti T, cheratinociti e da molti tessuti e ha una funzione simile all'EGF, ovvero stimola la replicazione degli epatociti e della maggior parte delle cellule epiteliali.

TGF- β o fattore trasformante β è un importantissimo fattore di crescita che interviene in molti processi della guarigione. Fa parte di una superfamiglia composta da circa 30 polipeptidi che comprende le 3 isoforme del TGF- β ed altri importanti fattori, come ad esempio le BMP. Il TGF- β ha molte funzioni che possono anche essere antitetiche tra di loro a seconda del bersaglio cellulare. Tra le sue funzioni troviamo: chemiotassi e mitogenesi di fibroblasti, di cellule endoteliali ed epiteliali e dei precursori degli osteoblasti, stimolazione degli osteoblasti a deporre tessuto osseo, inibizione delle metalloproteasi, chemiotassi delle cellule infiammatorie.

VEGF

Il VEGF o fattore di crescita endoteliale vascolare viene prodotto da svariati tipi cellulari, tra cui anche le piastrine e ha come funzioni principali quelle di aumentare la permeabilità vasale, di stimolare l'angiogenesi e di essere mitogenico per le cellule endoteliali

EGF

EGF o fattore di crescita epidermico è un fattore di crescita sintetizzato da piastrine e macrofagi e presente all'interno della saliva, delle urine, del latte materno e del plasma. Ha funzioni mitogeniche per cheratinociti e fibroblasti, di stimolazione della migrazione di cheratinociti e induzione della formazione del tessuto di granulazione.

FGF

È la famiglia dei fattori di crescita fibroblastici che sono prodotti da macrofagi, mastociti, linfociti T, cellule endoteliali e fibroblasti. Tra le loro funzioni troviamo: chemiotassi nei confronti dei fibroblasti, attività mitogenica per fibroblasti e cheratinociti, stimolazione della migrazione dei cheratinociti, angiogenesi, ed induzione della contrazione delle ferite e della deposizione della matrice.

Questi, insieme ad altri già descritti all'interno della nostra trattazione, sono i fattori di crescita principali che intervengono nei processi di guarigione, che sono contenuti nelle piastrine e nei leucociti e che incontreremo parlando del CGF.

Il rilascio di fattori di crescita da parte del CGF è stato oggetto di studio da parte di Borsani e colleghi nel 2015, i quali hanno effettuato un test in vitro, utilizzando il test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, in italiano saggio immuno-assorbente legato ad un enzima) e valutando la cinetica di rilascio dei fattori nel tempo (Borsani E, 2015). Questo studio è stato effettuato ponendo il CGF ad una temperatura di incubazione di 37° C, per un intervallo di tempo compreso tra 5 ore ed 8 giorni, e si è osservato come ogni fattore di crescita abbia una cinetica di rilascio propria e anche come le quantità rilasciate varino da fattore a fattore. In particolare, si è visto come alcuni fattori, come ad esempio BDNF e TNF- α , siano caratterizzati da un rapido rilascio e massimo accumulo precoce (intervallo di un giorno); alcuni altri, come VEGF e BMP-2, abbiano un rilascio più lento e raggiungano il massimo accumulo in un intervallo di 6-8 giorni; ed altri ancora, come TGF- β , PDGF e IGF-1, abbiano un accumulo costante. Queste differenze sembrano essere dovute alla diversa quantità di fattori di crescita accumulata all'interno dei granuli- α delle proteine e alla diversa capacità trascrizionale di questi fattori, dettata da un differente accumulo di m-RNA all'interno delle piastrine: gli α -granuli possono esocitare fattori di crescita finché non esauriscono la riserva di fattore “pre-confezionato” o finché non esauriscono gli m-RNA da trascrivere per quei determinati fattori e quindi la capacità di sintetizzarli –

processo che può perdurare per più di una settimana dall'attivazione della piastrina (Senzel L, 2009). Le diverse cinetiche suggeriscono un preciso ed organizzato rilascio al fine di sostenere e guidare la rigenerazione. Si è visto, inoltre, come le concentrazioni dei fattori di crescita siano molto variabili da soggetto a soggetto, suggerendo che i risultati finali potrebbero essere influenzati dalle caratteristiche biologiche individuali. Riguardo a ciò, uno studio di Weibrich et al., suggerisce che individui differenti richiedano concentrazioni di piastrine differenti, al fine di ottenere uno stesso effetto biologico (Weibrich G, 2002). È stato quindi ricercato un valore soglia della concentrazione piastrinica per il quale l'effetto biologico possa essere comparabile nei pazienti, a prescindere dalle caratteristiche individuali, e questo soglia, secondo Marx, si colloca ad una concentrazione di 1×10^6 piastrine/ μl (Marx, 2004).

Tra gli studi che hanno valutato la cinetica dei fattori di crescita e il loro accumulo a livello tissutale troviamo anche lo studio di Honda et al, del 2013, nel quale si è analizzato il rilascio di fattori di crescita per un periodo di 13 giorni, incubando il CGF ad una temperatura di 37°C e sostituendo e prelevando il terreno di coltura ogni 2 giorni (Honda H, 2013). I fattori di crescita per cui è stata testata la concentrazione sono TGF- β , PDGF-BB, TNF- α e IL-1 β e si è visto che tutti diminuivano nel tempo e che solo il TGF- β era rilevabile a distanza di 13 giorni.

Per quanto riguarda, la concentrazione di VEGF e TGF- β 1 è stata valutata anche nel siero rilasciato dal CGF a distanza di un giorno dal prelievo e si è osservato un aumento della concentrazione di questi fattori rispetto al tempo 0 (del prelievo) (Chen F, 2016). La concentrazione dei fattori di crescita è stata testata anche per quanto riguarda l'estratto di CGF, ovvero il liquido che fuoriesce dal CGF a seguito di una compressione del CGF all'interno di una siringa e si è osservato che i valori all'interno di questo liquido sono paragonabili o più alti rispetto a quelli sierici (Honda H, 2013) (Park S-H, 2016). Infine, la presenza di VEGF e TGF- β 1 nel CGF è stata confermata

anche mediante l'utilizzo di esami immunocistochemici (Chen F, 2016) (Luigi Fabrizio Rodella, 2011).

Tutti questi studi sembrano confermare che il CGF contenga al suo interno tutta una serie di fattori di crescita immediatamente disponibile (come abbiamo detto in precedenza vi è una parte di piastrine che subisce lisi durante la centrifugazione e quindi una parte di fattori di crescita imbibisce già il coagulo al termine della centrifugazione).

Sono stati effettuati studi anche per quanto riguarda l'attività del CGF su vari tipi cellulari, per vedere come e se influenzasse il differenziamento e/o la proliferazione. Abbiamo ad esempio uno studio del gruppo Borsani, del 2015, dove, attraverso un sistema di colture di cellule umane in vitro, si è visto come il CGF abbia un'azione positiva per quanto riguarda l'attivazione cellulare e la stimolazione di fibroblasti, osteoblasti e cellule endoteliali con un effetto pari a quello sulle cellule poste nel loro terreno di coltura ideale (Borsani E, 2015).

Vi sono poi studi riguardanti gli effetti di CGF sulle cellule staminali mesenchimali e si è visto che, stimolando questa linea cellulare con estratto di CGF, ricavato mediante compressione del CGF solido in una siringa, si ha un'induzione alla proliferazione e maturazione osteogenica e alla mineralizzazione delle cellule staminali mesenchimali (Honda H, 2013); altri studi hanno messo nella stessa coltura CGF e cellule del legamento parodontale di cane ed è stato osservato un significativo effetto di promozione da parte del CGF per quanto riguarda la proliferazione e la differenziazione di questo tipo cellulare (Yu B, 2014).

2.5.3 Sticky Bone

Lo Sticky Bone, od osso appiccicoso, è un tipo di biomateriale composito utilizzato nei processi di rigenerazione ossea e consta di una

parte solida usata come scaffold, ad esempio osso particolato, ed una parte liquida derivante da un CPUNT, come PRF o CGF, della quale sfrutta le proprietà bioattive. Questo tipo di biomateriale è particolarmente adatto alla pratica clinica poiché non consta di un sostituto osseo in forma libera bensì coagulata, grazie ai concentrati piastrinici, facilitandone così il posizionamento da parte dell'operatore durante le procedure di innesto osseo. Il concetto di Sticky Bone è piuttosto recente, la prima menzione risale al 2011, da parte di Sohn et al, che introducono il concetto di innesto osseo arricchito con fattori di crescita e successivamente da Mourão. Nel 2015, Sohn e collaboratori, hanno descritto in maniera completa il protocollo ottimizzato per la produzione di uno Sticky Bone composto da una membrana di CGF e da una matrice di innesto osseo arricchita di fattori di crescita ed hanno portato dei casi clinici a supporto dell'utilizzo di questo materiale, evidenziano che, il suo utilizzo all'interno di un difetto osseo, contribuisce a ridurre al minimo la perdita ossea durante i processi di guarigione (Sohn, et al., 2011) (Mourão, Valiense, Melo, Mourão, & Maia, 2015).

L'utilizzo di questi biomateriali autologhi comporta un notevole rilascio di fattori di crescita, citochine e mediatori che contribuiscono al processo di guarigione e alla rigenerazione dei tessuti (Da Silva, et al., 2021) (Mourão, de Mello-Machado, Javid, & Moraschini, 2020); è comprovato l'effetto sui tessuti molli, mentre non c'è ancora un consenso unanime sulla loro effettiva stimolazione a livello del tessuto osseo (Damsaz, et al., 2020). Nonostante ciò, grazie a facilità di manipolazione, riduzione dei tempi chirurgici e l'agglutinazione del biomateriale da innesto, lo sticky bone assume un ruolo significativo all'interno delle procedure chirurgiche di rigenerazione ossea (De Almeida Barros Mourão, et al., 2019).

2.5.3.1 Preparazione dello Sticky Bone

Per la preparazione dello Sticky Bone si esegue un prelievo di sangue venoso periferico di circa 20cc, che viene suddiviso all'interno di 2 provette non rivestite (tappo bianco), per ottenere la separazione in fase liquida, che ci permetterà di agglutinare l'osso, e in 2-4 provette rivestite di borosilicato (tappo rosso), senza anticoagulanti, per ottenere il CGF. Queste provette subiscono un ciclo di centrifugazione a 2400-2700 giri, con un dispositivo dotato di rotore in grado di generare velocità alternate e controllate, per 12 minuti; ovvero un normale ciclo di centrifugazione. Per la preparazione della fase liquida, a secondo dei protocolli descritti dai vari autori, la centrifugazione può variare dai 2 ai 12 minuti. Con il protocollo della centrifugazione breve possiamo arrestare la centrifugazione a seconda della quantità di fattori di crescita che vogliamo ottenere: la maggior concentrazione si ha a 2 minuti dall'inizio. Arrestiamo, quindi, il nostro ciclo a due minuti e preleviamo solo la provetta dalla quale ricaveremo la fase liquida, inseriamo al suo posto una provetta piena di acqua, in modo da bilanciare le forze durante la centrifugazione e facciamo ripartire il ciclo per i restanti 10 minuti (Temmerman, et al., 2016). Nella provetta in plastica con tappo bianco troveremo due frazioni: lo strato superiore, dove troveremo la fase liquida del plasma e uno strato inferiore, contenente globuli rossi, che verrà scartato. Al termine della centrifugazione nelle provette in borosilicato potremo identificare 3 strati: lo strato superiore costituito da plasma povero di piastrine (PPP), lo strato intermedio, costituito da un buffy coat rappresentato da una grande porzione di fibrina polimerizzata molto densa che contiene i fattori di crescita, ed infine lo strato inferiore costituito da globuli rossi. A questo punto, il coagulo di fibrina una volta prelevato dalla provetta potrà essere utilizzato per altre preparazioni: membrane, ponchos, plugs. Si preleva la porzione più vicina all'interfaccia del buffy coat con una siringa, e si aggiunge al particolato polvere d'osso, lasciandola polimerizzare per 5-10 minuti, in maniera tale da formare lo sticky bone; per accelerare la

polimerizzazione si aggiunge anche l'essudato ricavato dalla compressione della membrana di CGF. L'essudato, nello strato RBC, contiene fattori di crescita e trombina autologa; per questa ragione, la polimerizzazione viene accelerata. Una volta completata la polimerizzazione lo sticky bone si presenta compatto, stabile e non rilascia granuli o particelle di osso neanche se scosso; questo è possibile grazie alla rete di fibrina al quale è fortemente interconnesso.

Come già detto, i biomateriali autologhi presentano un rilascio significativo di citochine e fattori di crescita e contribuiscono alla guarigione dei tessuti e, anche se non c'è ancora consenso sulla loro efficacia riguardo la neoformazione del tessuto osseo, sono considerati un importante contributo nelle procedure di aumento di volume osseo.

2.6 Sticky Bone Preparation Device (SBPD®)

Lo Sticky Bone Preparation Device (SBPD) è un nuovo dispositivo brevettato che nasce per semplificare il confezionamento dello sticky bone. Infatti, prima del suo sviluppo i protocolli disponibili per la preparazione e la miscelazione dello sticky bone prevedevano la miscelazione manuale del sostituto osseo con l'emocomponente ad uso non trasfusionale; la metodica era operatore-dipendente, E rendeva difficilmente standardizzabile il protocollo. Questo innovativo dispositivo produce, composti di materiali sostitutivi ossei particolati e concentrati piastrinici senza manipolazione manuale.

Rifacendoci al lavoro del Dr. Gheno, dove è stato confrontato, il biomateriale risultante con le preparazioni di SB miscelate a mano e quelle risultanti dalla miscelazione tramite SBPD (Ezio Gheno, 2022). Per quanto riguarda i parametri in vitro, sono stati analizzati il contenuto cellulare e la capacità di rilasciare fattori di crescita e citochine rilevanti per la rigenerazione dei tessuti. Inoltre verranno presentati alcuni casi in cui è stato usato il device per la produzione di

sticky bone, utilizzato in differenti procedure chirurgiche di rigenerazione ossea.

2.6.1 Descrizione del dispositivo

Il dispositivo è realizzato in poliammide termoplastico specificatamente progettato per soddisfare i requisiti più stringenti delle applicazioni medicali ed è sterilizzabile una volta in autoclave. Esso è costituito da uno stelo avente una lunghezza complessiva di circa 90 mm. Nella parte centrale è presente un “filtro” costituito da un “disco” dotato di fori con un diametro utile per consentire il flusso della porzione corpuscolare del sangue e trattenere il sostituto osseo particolato. Nella parte superiore dell'SBPD, è presente una “mezzaluna” preposta all'estrazione del dispositivo dalla provetta dove è destinata ad essere collocata per espletare la sua funzione. Il brevetto del dispositivo è registrato presso l'Ufficio Europeo dei Brevetti (n. 102020000022009).

L'uso del dispositivo è destinato alla miscelazione di concentrati piastrinici, ottenuti attraverso i protocolli di centrifugazione delle diverse aziende produttrici di centrifughe, con particolato osseo di origine autologa, omologa, eterologa o sintetica, nondimeno può essere utilizzata la dentina autologa ottenuta da vari metodi di macinazione.

2.6.2 Preparazione con SBPD.

Il dispositivo è destinato ad essere inserito nelle “provette” di dimensioni standard, preferibilmente in borosilicato, utilizzate nelle centrifughe del commercio atte a creare una separazione ematica per uso non trasfusionale, attraverso diversi protocolli proprietari. Dopo aver prelevato un'opportuna quantità di sangue periferico, lo si raccoglie in una provetta quasi a riempimento, seguito dal posizionamento del dispositivo e dall'aggiunta di una determinata

quantità di sostituto osseo particolato (di origine autologa, omologa, eterologa o sintetica) che andrà ad “appoggiarsi” al disco senza oltrepassarlo poiché il diametro dei fori ne impedisce l’attraversamento. Inserita la provetta nella centrifuga (facendo attenzione ad inserire una provetta dello stesso peso in posizione diametralmente opposta, per un opportuno bilanciamento del moto) e dopo averla azionata in accordo al protocollo del fabbricante della centrifuga, il sangue contenuto nella provetta, ed in particolare la sua porzione corpuscolare, può viceversa passare attraverso i detti fori, consentendo la miscelazione del biomateriale da innesto osseo con l’aggregato piastrinico che si genera verso la fine delle fasi di centrifugazione. Al termine del processo di centrifugazione, nella parte superiore dell’SBPD una “mezzaluna” appositamente progettata permette la rimozione del dispositivo insieme al biomateriale particolare mescolato all’aggregato piastrinico. Il materiale da innesto così ottenuto, costituito da una miscela di sostituto osseo particolato e di concentrato piastrinico ricco di fattori di crescita, ottenuto dal sangue del paziente, risulterà particolarmente efficace nella promozione ed accelerazione dei processi di osteogenesi per la rigenerazione ossea del sito ricevente.

Dopo la centrifugazione, il sostituto osseo particolato si presenta saldamente agglomerato con il coagulo di fibrina prodotto dalla centrifugazione del sangue.

Gheno ed altri hanno condotto uno studio per determinare se l'uso dell'SBPD® influisse sulle proprietà biologiche del materiale ottenuto, sono stati prodotti anche campioni, per confronto, senza l'uso del dispositivo (Ezio Gheno, 2022). Questi sono stati prodotti a partire dallo stesso donatore, secondo il protocollo proposto da Temmerman et al., adattato alla produzione di CGF (Temmerman, et al., 2016). In breve, campioni di sangue, raccolti in provette con tappo rosso (10 mL) senza alcun additivo, e centrifugati con gli stessi passaggi sequenziali descritti in precedenza, con dispositivo Medifuge (Silfradent, Italia). Il CGF è stato raccolto e miscelato con 500 mg di xenotrapianto bovino

(Bioinnovation Biomedical, San Paolo, Brasile). Dopo circa 12 minuti di polimerizzazione, è stato possibile ottenere lo sticky bone.

2.6.3 Stima della popolazione cellulare

La stima della popolazione cellulare dello sticky bone ottenuto tramite SBPD è stata fatta con il metodo della sottrazione dove: conta delle cellule ossee = "sangue intero" - frazioni ematiche post-elaborazione (essudato + PPP + RBC). Per quantificare RBC, leucociti e piastrine questi campioni sono stati analizzati con macchinario per analisi ematologiche, il Counter 19 CP (Wiener Lab, Rosario, Argentina). I campioni di osso appiccicoso e di sangue intero (n = 3 per gruppo sperimentale) sono stati preparati come descritto e messi in coltura per 7 giorni. È stato poi usato un kit in grado di quantificare in grado di quantificare IL-1 β , IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, CCL11, FGF-b, CSF3, CSF2, IFN γ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL-4, PDGF, CCL5, TNF α e VEGF (27-plex panel, Biorad Inc., Hercules, CA, USA). In questo modo si è visto che il contenuto di piastrine all'interno dello sticky bone rientrava nell'intervallo di valori di riferimento di laboratorio e che il 90% di piastrine e leucociti totali erano stati trattenuti all'interno dello sticky bone. Inoltre, la preparazione effettuata con SBPD ha ottenuto un aumento di quasi due volte della concentrazione dei leucociti (p < 0,05) e con un contenuto di globuli rossi molto più basso rispetto ai campioni di sangue intero, sia per la preparazione SB che per quella SBPD. Non è stata riscontrata alcuna differenza statistica tra i campioni di sticky bone ottenuti manualmente e quelli preparati con SBPD per quanto riguarda il numero di cellule. Per quanto riguarda il rilascio dei fattori di crescita, invece, sono stati riscontrati livelli della maggior parte degli analiti abbastanza simili tra SBPD e SB, ma con riscontro di differenze significative per FGFb, IL-5, MCP-1 e MIP-1b, che sono stati rilasciati

in misura significativamente maggiore dai campioni SBPD® dopo 7 giorni ($p < 0,05$).

3 Scopo della tesi

In campo chirurgico sono state introdotte diverse tecniche per l'utilizzo dei concentrati piastrinici al fine di favorire la rigenerazione del tessuto osseo. Il plasma ricco di piastrine (PRP) e le piastrine ricche di fattori di crescita (PRGF) appartengono alla prima generazione di concentrati/aggregati piastrinici e richiedono anticoagulanti con trombina e/o cloruro di calcio per indurre il coagulo di fibrina (Ehrenfest, Rasmusson, & Albrektsson, 2009). Il plasma ricco di piastrine (PRP) può avere alcuni vantaggi nel ridurre complicazioni come l'osteite alveolare e migliorare la guarigione dei tessuti molli delle cavità estrattive (Alissa, Esposito, Horner, & Oliver, 2010). Il PRP ha mostrato risultati migliori nella terapia parodontale in associazione con altri materiali rispetto a quando viene utilizzato da solo, suggerendo che la selezione specifica di agenti/procedure combinate con il PRP potrebbe essere importante. La seconda generazione di concentrati piastrinici, inizialmente rappresentata dalla fibrina ricca di piastrine (PRF), utilizza il sangue venoso del paziente senza ausilio di anticoagulante od altro additivo per ottenere la polimerizzazione della fibrina. I fattori di crescita concentrati (CGF) sono un altro biomateriale di seconda generazione derivato da sangue autologo, proposto da Sacco nel 2006, prodotto centrifugando campioni di sangue con un processo di centrifugazione specifico ed utilizzando una centrifuga speciale (Medifuge, Silfradent, Italia). Infatti, mentre la PRF utilizza una velocità di centrifugazione costante, sia verticale che orizzontale, i protocolli CGF impiegano velocità di centrifugazione variabili per produrre una matrice di fibrina più ricca di fattori di crescita, più densa e più grande, che facilita la manipolazione durante le procedure

chirurgiche (Sohn, et al., 2011). Sono stati riportati risultati interessanti per quanto riguarda il CGF nella rigenerazione del tessuto osseo, come l'induzione di neoformazione ossea nel seno mascellare, in assenza di complicazioni postoperatorie e il contributo alla formazione di nuovo osso in ampi difetti ossei diafisari con la tecnica Masquelet (Kim, et al., 2014) (Ali, Bakry, & Abd-Elhakam, 2015) (Arican, et al., 2022). È stato inoltre proposto in protocolli modificati che combinano la sua matrice di fibrina con albumina denaturata, membrane in rete di titanio, proteina morfogenetica dell'osso-2 (BMP-2) o materiali particolati come nel caso dello sticky bone (Mourão, et al., 2018) (Wang, et al., 2021) (Kabir, et al., 2021) (Sohn, et al., 2011).

L'"osso appiccicoso" è un tipo di biomateriale composito che facilita il processo di rigenerazione ossea quando un sostituto osseo particolato viene utilizzato come impalcatura, beneficiando delle proprietà bioattive di un aggregato piastrinico autologo come PRF e CGF (Sohn, et al., 2011) (Sohn, Huang, Kim, Park, & Park, 2015) (De Almeida Barros Mourão, et al., 2019). In genere, i chirurghi inseriscono i materiali da innesto osseo con l'uso di una soluzione salina per facilitare il trasporto al sito operato, in questa procedura può comportare una notevole perdita di materiale (De Almeida Barros Mourão, et al., 2019). Attraverso la combinazione con concentrati piastrinici, è possibile ottenere un materiale coagulato che consente di posizionare l'innesto nell'ospite con maggiore precisione e riducendo quasi a zero la perdita di particelle del biomateriale. È in questo genere di procedure che si inserisce il dispositivo precedentemente descritto, al fine di facilitare la produzione di "osso appiccicoso" da parte del chirurgo e/o degli assistenti, poiché si rende non necessaria la fase di manipolazione. Al contrario, nella preparazione senza il dispositivo, è necessario produrre e raccogliere il plasma arricchito, mescolarlo con il sostituto osseo ed attendere l'agglutinazione prima di iniziare la procedura chirurgica. Nel protocollo SBPD[®], il dispositivo ha permesso di miscelare e

centrifugare contemporaneamente, ottenendo un materiale pronto all'uso e di facile gestione per le tecniche di rigenerazione ossea.

Lo scopo di questo lavoro è quello di presentare dei casi in cui è stato usato il dispositivo SBPD per preparare lo sticky bone e sono state poi applicate diverse tecniche chirurgiche.

3.1 Descrizione dei casi

3.1.1 1° caso

Paziente di 45 anni, uomo, si presenta con una sella edentula, da 3 anni, a livello del 24 e richiede una riabilitazione di tipo fisso, implantare. Si procede con anamnesi, esame obiettivo intra-orale e si eseguono esami radiografici per valutare la fattibilità della riabilitazione implantare.

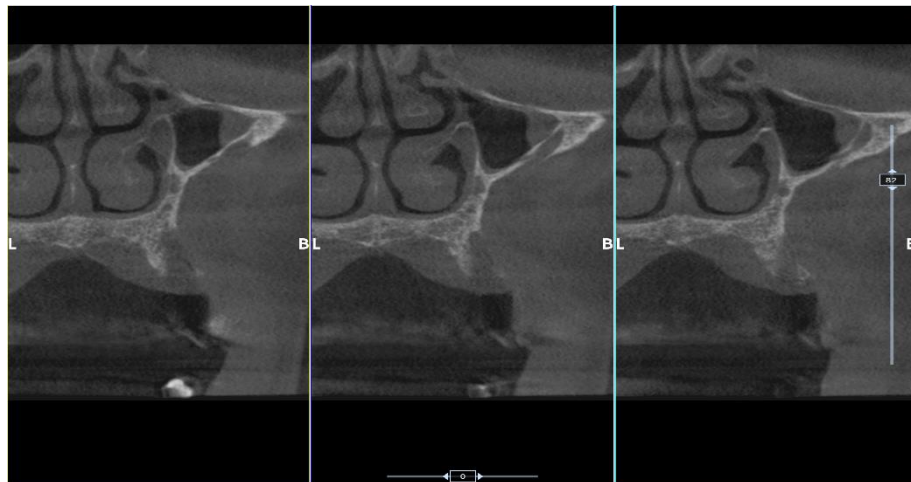


Figura 1 Immagine radiografica iniziale

All'esame obiettivo si osserva a livello della sella edentula, sul versante vestibolare, una concavità dovuta al riassorbimento alveolare orizzontale, confermata dalle immagini radiografiche. Questo riassorbimento della cresta alveolare è fisiologico in caso di estrazione dentale, infatti, a distanza di 12 mesi da un'estrazione si ha una

contrazione della cresta alveolare pari al 50%, a carico prevalentemente del lato vestibolare, e successivamente il volume osseo rimane stabile.

Si procede, quindi, programmando tramite software digitale, ODS-Oxy Digital Solutions, l'inserimento di un impianto OXY implant PSK micro 3,5x11,5 in regione 24 e si concorda, con il paziente, un aumento di volume osseo, specialmente a livello vestibolare, al fine di ricreare il volume osseo e migliorare l'inestetismo dato dalla depressione ossea.

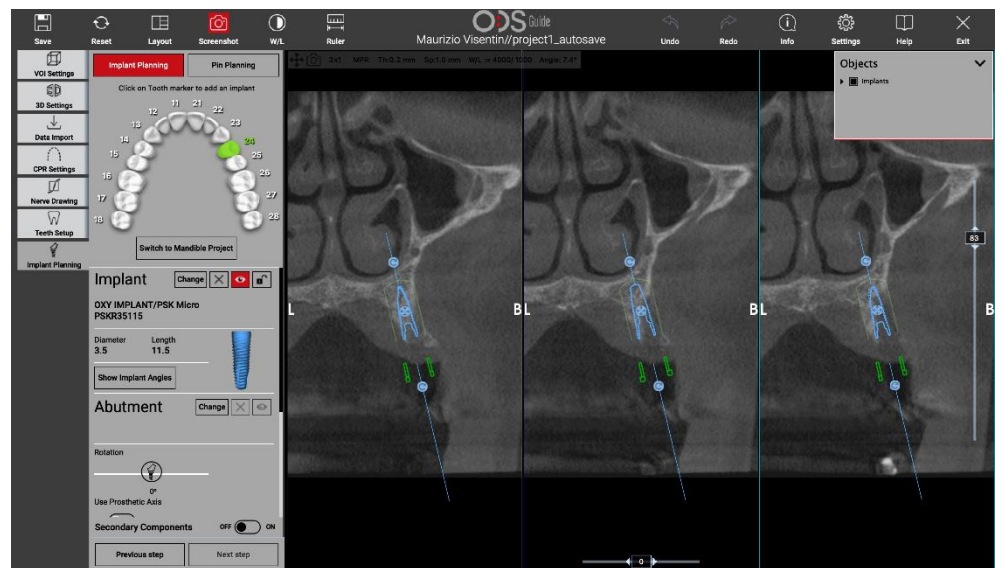


Figura 2 Progettazione con software digitale

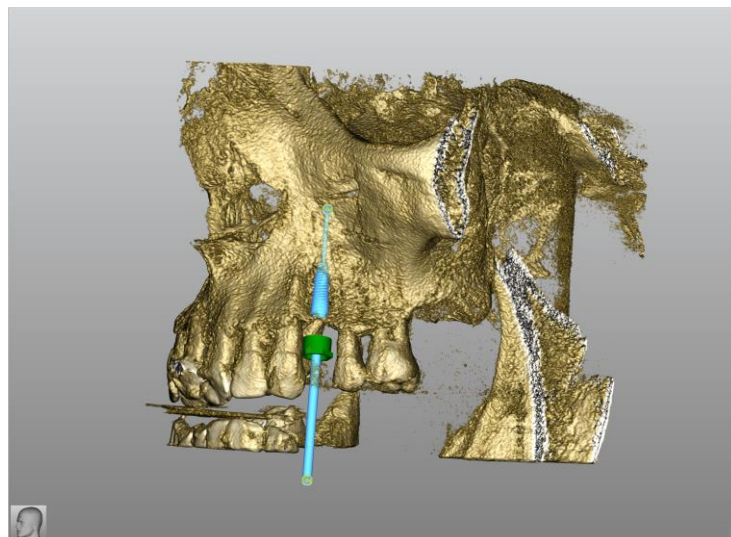


Figura 3 Ricostruzione 3D

Il giorno dell'intervento, prima di iniziare con le procedure chirurgiche, è stato raccolto, tramite prelievo con il kit BD Vacutainer Safety-Lok,

il sangue venoso del paziente all'interno di due provette da 10mL con tappo rosso, senza l'aggiunta di additivi. Al termine del prelievo le due provette sono state aperte, al loro interno è stato inserito il filtro SBPD e, con l'ausilio di un imbuto metallico sterile, sono stati aggiunti 0,5cc di sostituto osseo particolato per provetta (OsteoBiol Gen-Os® - Tecnos). Una volta richiuse le provette, sono state riposte all'interno della centrifuga (seguendo il protocollo precedentemente descritto), al fine di ottenere lo sticky bone.

Al paziente è stata prescritta terapia antibiotica: amoxicillina/acido clavulanico 1 g, 1 ora prima dell'intervento ed a seguire 1 g ogni 8 h x 5 gg e terapia antidolorifica con ketoprofene 80 mg ogni 12 ore. Il paziente è stato sottoposto ad uno sciacquo preliminare con collutorio a base di clorexidina allo 0,20%. La zona interessata viene infiltrata con anestetico locale a base di articaina 40mg/ml con adrenalina 1:100.000. È stata eseguita un'incisione in cresta, con uno scarico mesiale ed uno distale; si è, quindi, proceduto a scollare il lembo a tutto spessore. Esposto l'osso, è stata eseguita la preparazione implantare e l'inserimento di un impianto OXY implant PSK micro di 3.5mm di diametro e 11.5mm di lunghezza, come precedentemente progettato tramite software. Una volta posizionato l'impianto è stato prelevato lo sticky bone dalle provette, tramite pinzette sterili, ed è stato posizionato e modellato vestibolarmente al sito implantare; il tutto è stato poi ricoperto con una membrana di CGF, ricavata anch'essa dalla centrifugazione del sangue del paziente, per mantenere in posizione e proteggere l'innesto di biomateriale e per favorire un'ottimale guarigione dei tessuti molli. Infine, è stata eseguita sutura a punti

staccati per ottenere una guarigione di prima intenzione.

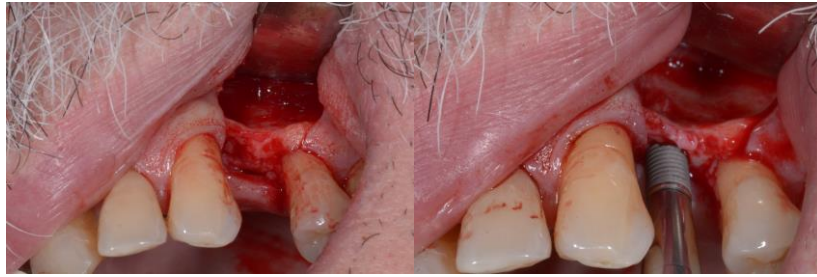


Figura 4 Lembo di accesso

Figura 5 Inserimento impianto



Figura 6 Sticky Bone

Figura 7 Sticky Bone e CGF in sede

Dopo 2 settimane è stata effettuata la rimozione punti. Dopo 8 settimane è stata effettuata una valutazione clinica e radiografica del sito, che ha mostrato una guarigione eccellente dei tessuti molli, un bel volume osseo vestibolare, con una ripristinata convessità del mascellare, e un'ottima stabilità implantare. Al controllo a 6 mesi il volume osseo è stabile.



Figura 8 Rx finale

3.1.2 2° caso

Paziente di 58 anni, uomo, si presenta alla nostra attenzione per valutare la riabilitazione fissa, di tipo implantare, del primo quadrante, in regione posteriore. Si procede con anamnesi, esame obiettivo intra ed extra orale e si eseguono esami radiografici per valutare la fattibilità della riabilitazione implantare.



Figura 9 Sella edentula con evidente atrofia crestale

Già in fase di valutazione clinica si evidenzia una cresta alveolare molto sottile e riassorbita, con uno spessore molto ridotto. Si decide quindi di svolgere una CBCT per valutare in maniera più precisa il volume e la qualità ossea ed effettuare una progettazione della riabilitazione.

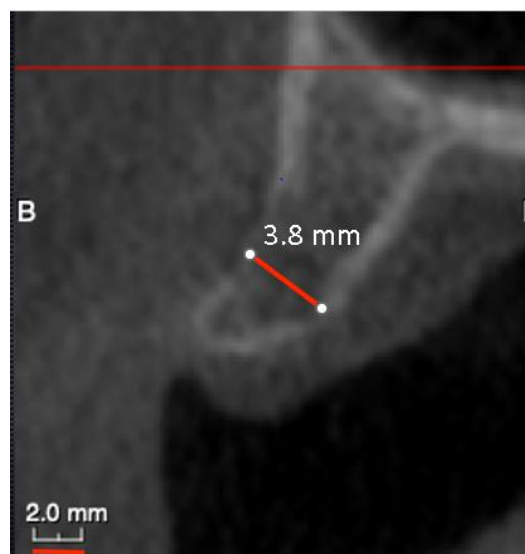


Figura 10 Spessore cresta

Dalla CBCT si misura uno spessore di 3.8mm e si decide, quindi, di proseguire al posizionamento di due impianti, andando ad espandere, in fase di preparazione del sito implantare, con delle apposite frese, la cresta atrofica.

Questo protocollo è indicato per espandere un osso più stretto in cresta e con una base più ampia, come in questo caso.

Il giorno dell'intervento, prima di iniziare con le procedure chirurgiche, è stato raccolto, tramite prelievo con il kit BD Vacutainer Safety-Lok, il sangue venoso del paziente all'interno di due provette da 10mL con tappo rosso, senza l'aggiunta di additivi. Al termine del prelievo le due provette sono state aperte, al loro interno è stato inserito il filtro SBPD e, con l'ausilio di un imbuto metallico sterile, è stato aggiunto 1g di sostituto osseo particolato (OsteoBiol® Gen-Os; Tecnossl, Giaveno, Italy). Una volta richiuse le provette, sono state riposte all'interno della centrifuga (seguendo il protocollo precedentemente descritto), al fine di ottenere lo sticky bone.

Successivamente è stata infiltrata la zona con anestetico: articaina 40mg/ml con adrenalina 1:100-000. È stata eseguita un'incisione in cresta ed è stato scollato un lembo a tutto spessore. Si è, quindi, proceduto con la preparazione del primo sito implantare in zona 16; in primis si è usata una fresa pilota, per creare una guida della nostra preparazione e successivamente, frese Densah® Bur di diametro via via crescente e motore chirurgico impostato in modalità Reverse Densifying Mode, sotto abbondante irrigazione. Questo ha consentito

che mano a mano che il diametro della fresa aumentava, l'osso si espandeva lentamente ed in maniera plastica e prevedibile, fino al raggiungimento del diametro previsto in fase di progettazione, con una deiscenza ossea minima, che ha permesso l'inserimento degli impianti, per la loro lunghezza totale, in osso autologo, senza esposizione di spire. Terminata la preparazione, è stato inserito un impianto OXY implant PSK micro 3,5 x 8,5.

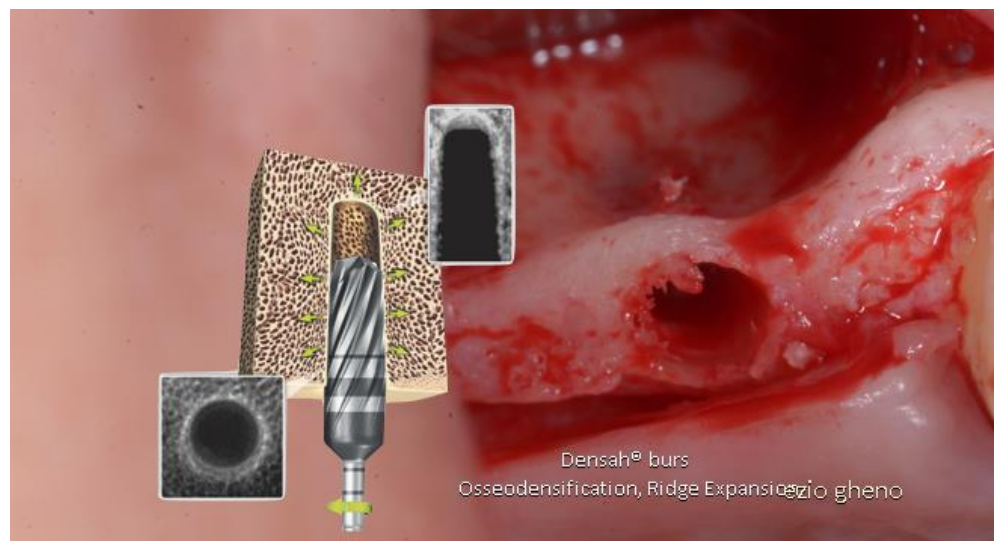


Figura 11 Preparazione sito implantare con espansione alveolare

È stata poi eseguita la stessa procedura per quanto riguarda la preparazione del sito implantare in zona 14 ed è stato posizionato un impianto OXY implant PSK micro 3,5 x 13.



Figura 12 Posizionamento impianto



Figura 13 SBPD e coagulo di sticky bone

Terminata la fase implantare, è stato prelevato lo sticky bone dalle provette, con l'ausilio di pinzette sterili, ed è stato posizionato sul lato vestibolare, dove era presente una notevole concavità data da un riassorbimento osseo crestale fisiologico. A questo punto, il tutto è stato ricoperto con una membrana di CGF, ottenuta anch'essa a seguito della

centrifugazione del sangue del paziente, in maniera tale da mantenere in posizione il coagulo di biomateriale e da favorire una migliore guarigione da parte dei tessuti molli. Si è, infine, proceduto all'accostamento del lembo e alla sutura per ottenere una guarigione di prima intenzione.



Figura 14 e 15 Posizionamento e modellazione sticky bone



Figura 16 e 17 Posizionamento CGF e sutura per prima intenzione

A seguire sono stati eseguiti controlli della guarigione, rimozione dei punti, connessione e protesizzazione degli impianti. Di seguito possiamo vedere tramite immagini radiografiche e foto intra-orali i risultati ottenuti (gli impianti si presentano osteointegrati, con una buona stabilità con tessuti molli sani e senza segni di infiammazione, il difetto osseo vestibolare assente grazie all'innesto con sticky bone e l'estetica del sorriso nettamente migliorata).

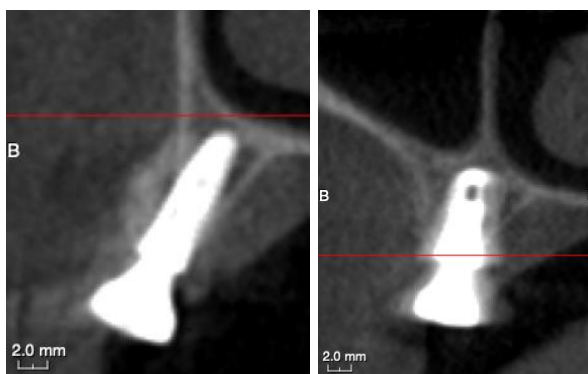


Figura 18 e 19 Impianto zona 16 ed impianto zona 16



Figura 20 e 21 Connessione e Protesizzazione

4 Discussione

Oggigiorno, visti i progressi fatti in campo medico per quanto riguarda i biomateriali, la tecnologia che permette, tramite software, di programmare in maniera accurata i trattamenti e la richiesta sempre maggiore di riabilitazioni fisse implantari, che ripristino la funzione e garantiscano un risultato estetico, ci si trova sempre più spesso, nella pratica clinica, ad affrontare casi in cui possono essere necessari interventi di rigenerazione ossea. Le possibilità sono molteplici – dal prelievo ed innesto di osso autologo, alla distrazione ossea, all’innesto di biomateriali, eccetera eccetera – e non entreremo nel merito di ognuna di queste ma è proprio in questo scenario che si colloca il nuovo dispositivo Sticky Bone Preparation Device.

Questo dispositivo permette di ottenere facilmente e con un protocollo semplificato dello sticky bone che può essere utilizzato nella quotidiana pratica clinica.

Lo studio pilota ha dimostrato che lo sticky bone ottenuto tramite metodo standard e quello ottenuto con SBPD sono prodotti molto simili ma con qualche punto a favore del secondo; infatti, si è visto come alcuni fattori di crescita, quali FGFb, IL-5 e MIP-16.

Oltre a ciò, è importante ricordare come questo tipo di dispositivo funzioni con moltissimi tipi di biomateriale, autologhi ed eterologhi, come mostrato nei casi precedentemente descritti e come possa essere inserito all’interno di diverse centrifughe per emocomponenti.

Nei casi precedentemente descritti l’utilizzo dello SBPD ha permesso di fare un intervento di ripristino di un adeguato volume osseo in una zona estetica e uno di espansione di cresta alveolare con aumento tramite sticky bone del volume crestale, in maniera semplificata proprio grazie al suo protocollo, con il quale si ottiene lo sticky bone in maniera più veloce e con una minore manipolazione da parte dell’operatore.

5 Conclusione

In conclusione, possiamo affermare che, visti i risultati clinici riportati a seguito dell'utilizzo di sticky bone ottenuto tramite SBPD, questo nuovo dispositivo si pone come un'eccellente alternativa al procedimento standard per lo sticky bone sia per quanto riguarda la facilità e la predicibilità garantiti dal protocollo, sia per quanto riguarda la facilità di utilizzo nella pratica clinica, sia per quanto riguarda la capacità del dispositivo di agglutinare con il sangue del paziente diversi tipi di biomateriali e, non ultimo, per gli eccellenti risultati clinici ottenuti, sia in termini di guarigione ossea che tissutale.

6 Bibliografia

- Ali, S., Bakry, S., & Abd-Elhakam, H. (2015). H. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: A systematic review. *J. Oral Implantol.*
- Alissa, R., Esposito, M., Horner, K., & Oliver, R. (2010). The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: An explorative randomised clinical trial. *Eur. J. Oral Implantol.*
- Arıcan, G., Özmeriç, A., Fırat, A., Kaymaz, F., Ocak, M., Çelik, H., & Alemdaroğlu, K. (2022). Micro-ct findings of concentrated growth factors (cgf) on bone healing in masquelet's technique—An experimental study in rabbits. *Arch. Orthop. Trauma Surg.*
- Bonazza V, B. E. (2016). How the different material and shape of the blood collection tube influences the Concentrated Growth Factors production. *Microsc Res Tech.*

- Borsani E, B. V. (2015). Biological Characterization and In Vitro Effects of Human Concentrated Growth Factor Preparation: An Innovative Approach to Tissue Regeneration. *Biology and Medicine* 07(05).
- Chen F, P. S. (2016). [Distribution and content of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor in each layer of concentrated growth factors]. *Journal of Peking University. Health Sciences*, 01.
- Choukroun J, A. F. (2001). Une opportunit  en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*.
- Da Silva, M., Mourão, C., Mello-Machado, R., Montemezzi, P., Barbosa, R., Sartoretto, S., . . . a, e. (2021). Effects of Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on Pain, Soft Tissue Healing, Growth Factors, and Cytokines after Third Molar Extraction: A Randomized, Split-Mouth, Double-Blinded Clinical Trial. *Appl. Sci*.
- Damsaz, M., Castagnoli, C., Eshghpour, M., Alamdari, D., Alamdari, A., Noujeim, Z., & Haidar, Z. (2020). Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures. *Front Surg*.
- David M Dohan Ehrenfest, M. D.-B. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*.
- De Almeida Barros Mourão, C., Lourenço, E., Nascimento, J., Machado, R., Rossi, A., Leite, P., . . . Calasans-Maia, M. (2019). Does the association of blood-derived growth factors to nanostructured carbonated hydroxyapatite contributes to the maxillary sinus floor elevation? A randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig*.
- Dohan DM, C. J. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*.

- Dohan Ehrenfest DM, R. L. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*.
- Ehrenfest, D., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*
- Ezio Gheno, G. G.-M.-S. (2022). “Sticky Bone” Preparation Device: A Pilot Study on the Release of Cytokines and Growth Factors.
- G Weibrich, T. H. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration.
- Ghasemzadeh M, H. E. (2013). Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory. *Vol. 131, Thrombosis Research*.
- Harmon K, H. R. (2013). Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma.
- Hideo Masuki, T. O.-Y. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*.
- Honda H, T. N. (2013). Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model. *J Artif Organs*.
- Jenne CN, U. R. (2013). Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and. *Vol. 35, International Journal of Laboratory Hematology*.
- Kabir, M., Hirakawa, A., Zhu, B., Yokozeeki, K., Shakya, M., Huang, B., & Murata, M. (2021). Mechanical Properties of Human Concentrated Growth Factor (CGF) Membrane and the CGF Graft with Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) onto Periosteum of the Skull of Nude Mice. *Int. J. Mol. Sci*.

- Kim, J.-M., Sohn, D.-S., Bae, M.-S., Moon, J.-W., Lee, J.-H., & Park, I.-S. (2014). Flapless transcrestal sinus augmentation using hydrodynamic piezoelectric internal sinus elevation with autologous concentrated growth factors alone. *Implant. Dent.*
- Luigi Fabrizio Rodella, G. F. (2011). Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech.*
- M. Dohan Ehrenfest D, B. T. (2012-2013). In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.*
- Marco Mozzati, M. G. (2017). *Emocomponenti autologhi come stimolanti della guarigione dei tessuti.*
- Marx, R. E. (2004). Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support. *J Oral Maxillofac Surg.*
- Mourão, C., de Mello-Machado, R., Javid, K., & Moraschini, V. (2020). The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin in the management of soft tissue healing and pain in post-extraction sockets: A randomized clinical trial. *J Craniomaxillofac Surg.*
- Mourão, C., Gheno, E., Lourenço, E., de Lima Barbosa, R., Kurtzman, G., Javid, K., . . . al., e. (2018). Characterization of a new membrane from concentrated growth factors associated with denaturated Albumin (Alb-CGF) for clinical applications: A preliminary study. *Int. J. Growth Factors Stem Cells Dent.*
- Mourão, C., Valiense, H., Melo, E., Mourão, N., & Maia, M. (2015). Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir.*
- Park S-H, P. K.-S.-A. (2016). Comparison of removal torques of SLActive® implant and blasted, laser-treated titanium implant in rabbit tibia bone

- healed with concentrated growth factor application. *The Journal of Advanced Prosthodontics*.
- Pirracò RP, R. R. (2013). Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Robbins, C. (2010). *Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale. Volume II*.
- Sacco. (2006). Lecture at international academy of implant prosthesis and osteoconnection . Lecture.
- Senzel L, G. D. (2009). The platelet proteome. *Vol. 16, Current Opinion in Hematology*.
- Sohn, D.-S., Heo, J.-U., Kwak, D.-H., Kim, D.-E., Kim, J.-M., Moon, J.-W., . . . Park, I.-S. (2011). Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone. *Implant Dent*.
- Sohn, D.-S., Huang, B., Kim, J., Park, W., & Park, C. (2015). Utilization of autologous concentrated growth factors (CGF) enriched bone graft matrix (Sticky bone) and CGF-enriched fibrin membrane in Implant Dentistry. *J. Implant Adv. Clin. Dent*.
- Soltan, M. D., Rohrer, M. D., & Prasad, H. S. (2012). Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant dentistry*.
- Temmerman, A., Vandessel, J., Castro, A., Jacobs, R., Teughels, W., Pinto, N., & Quirynen, M. (2016). The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: A split-mouth, randomized, controlled clinical trial. . *J. Clin. Periodontol*.
- Wang, X., Wang, G., Zhao, X., Feng, Y., Liu, H., & Li, F. (2021). Short-Term Evaluation of Guided Bone Reconstruction with Titanium Mesh Membranes and CGF Membranes in Immediate Implantation of Anterior Maxillary Tooth. *Biomed. Res. Int*.

- Weibrich G, K. W. (2002). Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants*.
- Yu B, W. Z. (2014). Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro. *Mol Med Rep*.
- Ali, S., Bakry, S., & Abd-Elhakam, H. (2015). H. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: A systematic review. *J. Oral Implantol*.
- Alissa, R., Esposito, M., Horner, K., & Oliver, R. (2010). The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: An explorative randomised clinical trial. *Eur. J. Oral Implantol*.
- Arıcan, G., Özmeriç, A., Fırat, A., Kaymaz, F., Ocak, M., Çelik, H., & Alemdaro ğlu, K. (2022). Micro-ct findings of concentrated growth factors (cgf) on bone healing in masquelet's technique—An experimental study in rabbits. *Arch. Orthop. Trauma Surg*.
- Bonazza V, B. E. (2016). How the different material and shape of the blood collection tube influences the Concentrated Growth Factors production. *Microsc Res Tech*.
- Borsani E, B. V. (2015). Biological Characterization and In Vitro Effects of Human Concentrated Growth Factor Preparation: An Innovative Approach to Tissue Regeneration. *Biology and Medicine 07(05)*.
- Chen F, P. S. (2016). [Distribution and content of transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor in each layer of concentrated growth factors]. *Journal of Peking University. Health Sciences, 01*.

- Choukroun J, A. F. (2001). Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*.
- Da Silva, M., Mourão, C., Mello-Machado, R., Montemezzi, P., Barbosa, R., Sartoretto, S., . . . a, e. (2021). Effects of Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) on Pain, Soft Tissue Healing, Growth Factors, and Cytokines after Third Molar Extraction: A Randomized, Split-Mouth, Double-Blinded Clinical Trial. *Appl. Sci*.
- Damsaz, M., Castagnoli, C., Eshghpour, M., Alamdari, D., Alamdari, A., Noujeim, Z., & Haidar, Z. (2020). Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures. *Front Surg*.
- David M Dohan Ehrenfest, M. D.-B. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*.
- De Almeida Barros Mourão, C., Lourenço, E., Nascimento, J., Machado, R., Rossi, A., Leite, P., . . . Calasans-Maia, M. (2019). Does the association of blood-derived growth factors to nanostructured carbonated hydroxyapatite contributes to the maxillary sinus floor elevation? A randomized clinical trial. *Clin. Oral Investig*.
- Dohan DM, C. J. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*.
- Dohan Ehrenfest DM, R. L. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*.
- Ehrenfest, D., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*.

- Ezio Gheno, G. G.-M.-S. (2022). “Sticky Bone” Preparation Device: A Pilot Study on the Release of Cytokines and Growth Factors.
- G Weibrich, T. H. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration.
- Ghasemzadeh M, H. E. (2013). Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory. *Vol. 131, Thrombosis Research*.
- Harmon K, H. R. (2013). Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma.
- Hideo Masuki, T. O.-Y. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*.
- Honda H, T. N. (2013). Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. *J Artif Organs*.
- Jenne CN, U. R. (2013). Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and. *Vol. 35, International Journal of Laboratory Hematology*.
- Kabir, M., Hirakawa, A., Zhu, B., Yokozeki, K., Shakya, M., Huang, B., & Murata, M. (2021). Mechanical Properties of Human Concentrated Growth Factor (CGF) Membrane and the CGF Graft with Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) onto Periosteum of the Skull of Nude Mice. *Int. J. Mol. Sci*.
- Kim, J.-M., Sohn, D.-S., Bae, M.-S., Moon, J.-W., Lee, J.-H., & Park, I.-S. (2014). Flapless transcrestal sinus augmentation using hydrodynamic piezoelectric internal sinus elevation with autologous concentrated growth factors alone. *Implant. Dent*.
- Luigi Fabrizio Rodella, G. F. (2011). Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech*.

- M. Dohan Ehrenfest D, B. T. (2012-2013). In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*.
- Marco Mozzati, M. G. (2017). *Emocomponenti autologhi come stimolanti della guarigione dei tessuti*.
- Marx, R. E. (2004). Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support. *J Oral Maxillofac Surg*.
- Mourão, C., de Mello-Machado, R., Javid, K., & Moraschini, V. (2020). The use of leukocyte- and platelet-rich fibrin in the management of soft tissue healing and pain in post-extraction sockets: A randomized clinical trial. *J Craniomaxillofac Surg*.
- Mourão, C., Gheno, E., Lourenço, E., de Lima Barbosa, R., Kurtzman, G., Javid, K., . . . al., e. (2018). Characterization of a new membrane from concentrated growth factors associated with denaturated Albumin (Alb-CGF) for clinical applications: A preliminary study. *Int. J. Growth Factors Stem Cells Dent*.
- Mourão, C., Valiense, H., Melo, E., Mourão, N., & Maia, M. (2015). Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*.
- Park S-H, P. K.-S.-A. (2016). Comparison of removal torques of SLActive® implant and blasted, laser-treated titanium implant in rabbit tibia bone healed with concentrated growth factor application. *The Journal of Advanced Prosthodontics*.
- Pirracò RP, R. R. (2013). Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Robbins, C. (2010). *Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale. Volume II*.

- Sacco. (2006). Lecture at international academy of implant prosthesis and osteoconnection . Lecture.
- Senzel L, G. D. (2009). The platelet proteome. *Vol. 16, Current Opinion in Hematology*.
- Sohn, D.-S., Heo, J.-U., Kwak, D.-H., Kim, D.-E., Kim, J.-M., Moon, J.-W., . . . Park, I.-S. (2011). Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone. *Implant Dent*.
- Sohn, D.-S., Huang, B., Kim, J., Park, W., & Park, C. (2015). Utilization of autologous concentrated growth factors (CGF) enriched bone graft matrix (Sticky bone) and CGF-enriched fibrin membrane in Implant Dentistry. *J. Implant Adv. Clin. Dent*.
- Soltan, M. D., Rohrer, M. D., & Prasad, H. S. (2012). Monocytes: super cells for bone regeneration. *Implant dentistry*.
- Temmerman, A., Vandessel, J., Castro, A., Jacobs, R., Teughels, W., Pinto, N., & Quirynen, M. (2016). The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: A split-mouth, randomized, controlled clinical trial. . *J. Clin. Periodontol*.
- Wang, X., Wang, G., Zhao, X., Feng, Y., Liu, H., & Li, F. (2021). Short-Term Evaluation of Guided Bone Reconstruction with Titanium Mesh Membranes and CGF Membranes in Immediate Implantation of Anterior Maxillary Tooth. *Biomed. Res. Int*.
- Weibrich G, K. W. (2002). Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants*.
- Yu B, W. Z. (2014). Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro. *Mol Med Rep*.

7 Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Stefano Benedicenti per avermi guidato e supportato in questa importante fase del mio percorso accademico.

Un sentito grazie al Dott. Ezio Gheno, correlatore di tesi, per le dritte indispensabili e il sostegno nella realizzazione di ogni capitolo della mia tesi, oltre che per avermi messo a disposizione i suoi casi.

Un grande ringraziamento anche a tutti i miei colleghi, che io, come se fossimo ai tempi della scuola, chiamo sempre compagni. Specialmente, a Gigi, Jack, Lore e Richi con i quali fin dal primo anno ho condiviso questo percorso e che hanno contribuito al vivere spensieratamente e in maniera leggera esami e tirocini.

Ringrazio di cuore mia mamma e mio papà che mi hanno aiutata nel sostenere questo percorso e che ne hanno aspettato con pazienza la fine, ben consci del fatto che da oggi ne comincia uno più difficile e nuovo.

Un grazie va anche a mio nonno e a mia nonna, scomparsa da poco, che per anni, agli amici, alla domanda “E la nipotina cosa fa?” hanno dovuto rispondere “Studia ancora!”, senza potersi pavoneggiare come tutti i bravi nonni non vedono l’ora di fare.

Ringrazio, infine, il mio fidanzato che, ok, mi ha sostenuta e supportata ma soprattutto sopportata durante tutti questi anni; per tutte le mattine in cui l’ho svegliato per far colazione insieme prima di andare in università e per tutte quelle notti in cui l’ho tenuto sveglio per aiutarmi a ripetere.