



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Derivati piastrinici: un futuro in buiatria?

Relatore: Prof.ssa Flavia Gottardo

Correlatori: Dott. Luca Panozzo

Dott. Giacomo Catarin

Laureando: Gabriele Zandonai

Matricola n. 1161639

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Fisiologia delle piastrine	7
1.2 Struttura delle piastrine	8
1.3 I granuli piastrinici	9
1.4 Azione biologica piastrine	10
1.5 Emoderivati	12
1.6 Principali derivati piastrinici e loro produzione	13
1.7 Effetto dei globuli bianchi nei derivati	24
1.8 Principali punti che influenzano la produzione di derivati	27
1.9 Stoccaggio degli emoderivati	31
1.10 Standardizzazione dei processi produttivi	38
1.11 Esempi di utilizzo in umana e veterinaria	42
1.12 Selezione dei donatori e controllo trasmissione dei patogeni	47
2. OBIETTIVO	53
3. MATERIALI E METODI	55
3.1 Produzione delle sacche	57
3.2 Trattamento in asciutta	60
3.3 Analisi statistica	62
4. RISULTATI	65
4.1 Dati sulla produzione delle sacche	65
4.2 Effetto protettivo del lisato	66
4.3 Selezione degli animali per la resa in concentrato piastrinico	70
4.4 Conservabilità dei fattori di crescita	73

5. DISCUSSIONE	77
6. CONCLUSIONI	85
7. BIBLIOGRAFIA	87
8. SITOGRAFIA	97

RIASSUNTO

Negli ultimi 116 anni le piastrine hanno rivelato un enorme potenziale non solo nell'emostasi, ma anche in numerosi altri processi fisiopatologici quali infiammazione, crescita tissutale e tumorale, aterosclerosi, angiogenesi, e difesa antimicrobica dell'ospite. Queste azioni sono legate ai numerosi fattori contenuti nelle piastrine, rilasciati in seguito alla loro attivazione. Visto il loro potenziale, negli anni si sono quindi cercati metodi per sfruttarli nella medicina rigenerativa, sia umana che veterinaria. Nella prima parte della tesi è stato affrontato il tema degli emoderivati considerando le differenze tra loro e i metodi di produzione, nel tentativo di mettere ordine nell'ampia letteratura disponibile. Uno dei punti più critici di questi prodotti è infatti la mancanza di standardizzazione dei processi produttivi, di accordo sulla nomenclatura e sul loro utilizzo. Sono stato quindi considerati questi aspetti, mettendo in risalto i principali elementi che influiscono sulla produzione dei derivati piastrinici (tempo di centrifugazione, presenza di globuli bianchi, tempistiche di produzioni...) e le loro caratteristiche di conservazione. Quest'ultimo rappresenta infatti un punto cardine, perché va ad influire sulla contaminazione dei prodotti e sulla loro concentrazione di fattori di crescita utili all'azione biologica.

Nella seconda parte della tesi sono riportati i risultati di uno studio condotto in Veneto sull'uso sperimentale del lisato piastrinico (LP) come trattamento alternativo all'antibiotico alla messa in asciutta nelle vacche da latte. Questo emoderivato è bastato prodotto a partire da un concentrato piastrinico, ottenuto in seguito alla centrifugazione del sangue intero, successivamente congelato e scongelato, portando in questo modo al rilascio dei fattori contenuti nei granuli piastrinici. La somministrazione di lisato nei quarti con <400.000 cellule somatiche all'asciutta, si è rivelato avere un potere protettivo sullo sviluppo di infezioni intramammarie e mastiti nella successiva lattazione del tutto equiparabile all'uso di antibiotico. Lo studio ha poi evidenziato come

la resa in concentrato piastrinico sia influenzato dai giorni di lattazione delle bovine e dalla concentrazione di piastrine nel sangue intero. Infine, è stata valutata la conservabilità nel tempo del LP in condizioni di campo (-20°C) ed in condizioni ideali di laboratorio (-80°C), senza riscontrare differenze significative associabili alle diverse condizioni di stoccaggio.

ABSTRACT

Over the past 116 years, platelets have revealed enormous potential not only in haemostasis, but also in numerous other pathophysiological processes such as inflammation, tissue and tumour growth, atherosclerosis, angiogenesis, and antimicrobial host defence. These actions are linked to the numerous factors contained in platelets, released upon their activation. Given their potential, methods have therefore been sought over the years to exploit them in regenerative medicine, both human and veterinary. In the first part of this thesis, the topic of blood products was addressed by considering the differences between them and their production methods, in an attempt to bring order to the extensive literature available. One of the most critical points of these products is in fact the lack of standardisation of production processes, agreement on nomenclature and their use. These aspects have therefore been considered, highlighting the main elements affecting the production of platelet derivatives (centrifugation time, presence of white blood cells, production timing...) and their storage characteristics. The latter is in fact a pivotal point, because it affects the contamination of the products and their concentration of growth factors useful for biological action.

In the second part of the thesis, the results of a study conducted in Veneto on the experimental use of platelet lysate (LP) as an alternative treatment to antibiotics at the dry period in dairy cows are reported. This haemoderivate was produced from a platelet concentrate, obtained after centrifugation of whole blood, which was subsequently frozen and thawed, thus leading to the release of the factors contained in the platelet granules. The administration of lysate in quarters with <400,000 somatic cells at dry calving was found to have a protective power on the development of intramammary infections and mastitis in the subsequent lactation fully comparable to the use of antibiotics. The study also highlighted how the yield of platelet concentrate is influenced by the days of lactation of the cows and the concentration of platelets in the

whole blood. Finally, the shelf life of LP under field conditions (-20°C) and under ideal laboratory conditions (-80°C) was evaluated, without finding significant differences associated with the different storage conditions.

1. INTRODUZIONE

1.1 Fisiologia delle piastrine

I primi studi riguardo alle piastrine risalgono a James Homer Wright, che nel suo "Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites" del 1902 descrive queste "piastre bluastre o porporee, rotondeggianti o ovali, di solito del diametro di circa 1/3-1/2 rispetto ai globuli rossi". Wright riuscì in seguito a dimostrare che queste piastre, che lui definisce "platelets", derivano da cellule progenitrici a livello dei sinusoidi del midollo osseo, i megacariociti. Raggiunto un certo livello di maturazione, infatti, dagli pseudopodi di queste cellule si formano le piastrine. In studi successivi Wright dimostrò come in condizioni patologiche quali anemie perniciose, emorragie e leucemie, il numero di megacariociti e piastrine diminuisce; oltre che le piastrine sono la principale componente dei trombi arteriosi. Questi lavori di Wright sono la base scientifica sulla quale hanno lavorato gli studi degli ultimi 116 anni riguardanti le piastrine si sono basati. (Gremmel et al., 2016).

I trombociti possiedono una vita media di dieci giorni, vengono poi rimossi dal circolo dai macrofagi epatici e splenici. Non avendo nucleo non sono in grado di andare incontro a mitosi, ma si formano nel midollo osseo a partire dai megacariociti, che a loro volta originano a partire da cellule staminali ematopoietiche. Le piastrine si formano dalla gemmazione di piccole parti di citoplasma, avvolte da una porzione di membrana cellulare. Ciascun megacariocita può dare origine a circa 6000 piastrine. Le piastrine non abbandonano mai il circolo sanguigno e vengono stoccate nei vasi sanguigni della milza dalla quale, in caso di necessità, vengono rilasciate per contrazione della stessa (pool splenico). L'ormone che regola la produzione di piastrine è la trombopoietina (TPO), prodotta principalmente a livello epatico. L'ormone va ad agire sia favorendo la differenziazione cellulare dei megacariociti, che la loro frammentazione in piastrine (Sjaastad et al., 2013).

1.2 Struttura delle piastrine

Le piastrine, o trombociti, sono frammenti cellulari presenti in circolo nell'ordine di $2,5-5 \times 10^5$, a seconda della specie. Non presentano nucleo e la loro struttura nel complesso può essere divisa in una zona periferica, in una zona sol-gen ed una zona contenente gli organelli. La zona periferica è quella che presenta, a livello del glicocalice (strato più esterno della membrana plasmatica), le glicoproteine necessarie per interagire con i vasi danneggiati, per l'attivazione, l'aggregazione e l'adesione piastrinica, nonché per la contrazione del coagulo. Sotto il glicocalice si trova uno strato lipidico importante per la coagulazione, contenendo il fattore tissutale che è il responsabile dell'attivazione della protrombina in trombina. La sottomembrana che giace sotto allo strato lipidico è molto importante per la funzionalità piastrinica: contiene infatti sottili filamenti di actina che formano il citoscheletro contrattile della piastrina insieme a miosina e calmodulina, permettendole di cambiare forma e di traslocare recettori e sostanze. In questa zona, inoltre, sono contenute numerose proteine che intervengono nella cascata della coagulazione piastrinica: trombospondina, il fattore V, il fattore Von Willebrand e la P-selectina. La zona sol-gen è formata da matrice densa, all'interno della quale troviamo microtubuli e microfilamenti, glicogeno, vescicole ed organelli secretori. I microtubuli sembrano avere un ruolo importante nel mantenimento della forma della piastrina mentre i microfilamenti formano la componente citoplasmatica del citoscheletro. Con l'attivazione delle piastrine il citoscheletro svolge due funzioni fondamentali: determina il rilascio dei granuli piastrinici ed attiva gli organelli piastrinici, normalmente sospesi dallo stesso citoscheletro allo stato inattivo nel citoplasma di un trombocita latente. La zona degli organelli contiene tre principali tipi di strutture secretorie: gli α -granuli, i granuli densi ed i lisosomi. In aggiunta a questi, le piastrine contengono anche mitocondri, glicosomi ed accumuli di glicogeno, importanti per il metabolismo energetico della cellula.

Gli α -granuli nelle piastrine a riposo sono tenuti separati dai filamenti citoscheletrici di actina, per impedirne l'attivazione. A livello della membrana plasmatica (nella regione periferica, sottostante al glicocalice) si trovano le aperture del sistema canalicolare oltre che il sistema tubolare denso. Il sistema canalicolare si estende internamente alla piastrina a formare delle strutture tubulari, attraverso le quali si ha il rilascio dei granuli piastrinici. Le aperture di questo sistema di tubuli inoltre, possono essere evaginate, ampliando così i punti di adesione della piastrina attivata, ai vasi danneggiati. Il sistema tubolare denso è un residuo del reticolo endoplasmatico liscio dei megacariociti ed ha l'importantissima funzione di rilascio, sequestro e riserva di calcio per la piastrina. Per alcuni autori, anche i mitocondri sembrano avere un ruolo come fonte di calcio per l'attivazione piastrinica (Statland et al., 1969).

1.3 I granuli piastrinici

La formazione dei granuli piastrinici inizia nei megacariociti. Gli α -granuli contengono proteine di membrana e proteine solubili, che sono coinvolte in un gran numero di processi, quali: adesione cellulare, coagulazione, infiammazione, crescita e difesa dell'ospite. In seguito all'attivazione piastrinica le proteine di membrana sono espresse sulla superficie piastrinica e le proteine solubili vengono rilasciate a livello extracellulare. Analisi proteomiche nell'uomo hanno identificato più di 300 proteine solubili rilasciate dagli α -granuli (Maynard et al., 2007). Le proteine contenute nei granuli sono il frutto di processi di sintesi ed endocitosi che avviene nei megacariociti. I megacariociti, infatti sintetizzano proteine nel reticolo endoplasmatico, stoccate poi dal Golgi in granuli immaturi ed attingono dal plasma altre proteine per endocitosi. Sembra che anche le piastrine mature siano in parte in grado di endocitare proteine dal plasma (Flaumenhaft, 2003). I granuli densi contengono un'alta concentrazione di ADP ed ATP, basi azotate, ioni come calcio e potassio e amine bioattive quali serotonina ed istamina. La loro azione

sembra sempre essere legata all'emostasi (Michelson, 2013). I lisosomi, come per altri tipi cellulari, hanno un ruolo catabolico, contenendo enzimi per la degradazione di proteine e carboidrati. I granuli densi originano dall'endosoma che, come i lisosomi, vengono prodotti dall'apparato di Golgi.

1.4 Azione biologica piastrine

La funzionalità piastrinica è strettamente legata al contenuto dei granuli ed alla loro esocitosi (Blair e Flaumenhaft, 2009).

Oltre al rinomato ruolo nella trombosi e nell'emostasi, le piastrine sono importanti anche per altri numerosi processi fisiopatologici quali: infiammazione, genesi dell'aterosclerosi, fonti di fattori di crescita, difesa antimicrobica dell'ospite, crescita tumorale e metastasi.

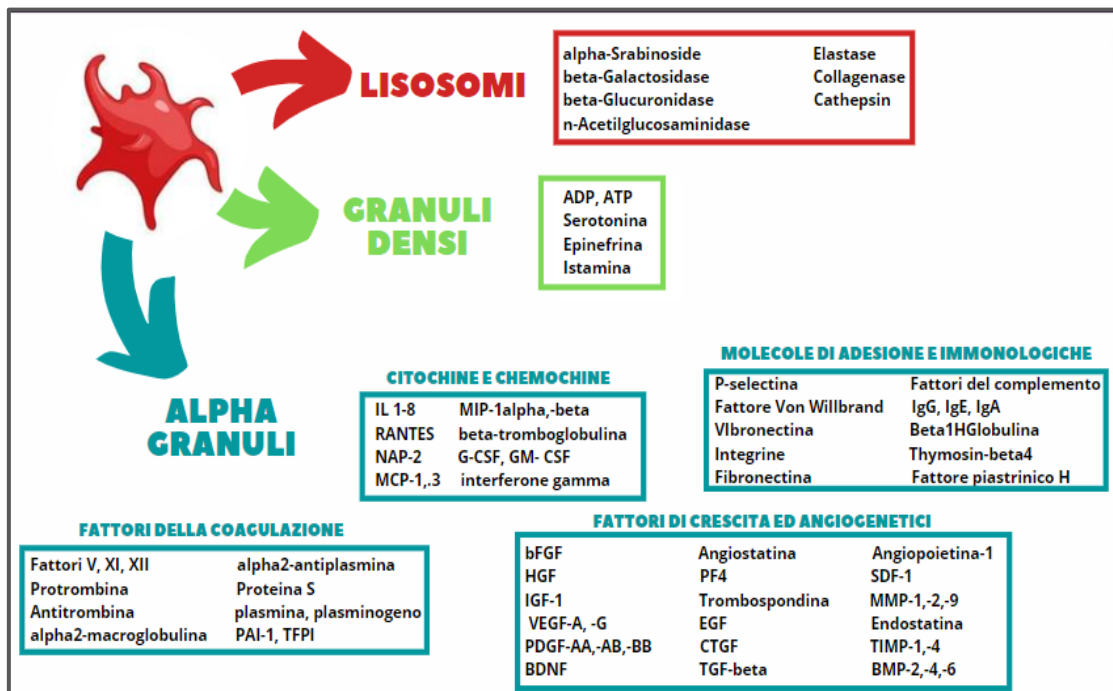


Figura 1. Principali fattori contenuti nei granuli piastrinici. Modificata da (Burnouf et al., 2016).

I fattori degli α -granuli piastrinici sono diversi, ma possono essere divisi a seconda della loro azione in: fattori di crescita ed angiogenici, molecole di adesione ed immunologiche e fattori della coagulazione.

- Fattori di crescita ed angiogenici: in questa categoria ritroviamo i principali fattori studiati per la produzione di derivati piastrinici. Tra questi **VEGF** (vascular endothelium growth factor), **EGF** (epidermal growth factor), **FGF** (fibroblast growth factors), **IGF** (insulin-like growth factor), **PDGF** (platelet-derived growth factor), **HGF** (hepatocyte growth factor), **TGF- β** (transforming growth factor). Queste molecole stimolano la permeabilità delle pareti dei vasi, nonché il reclutamento, la crescita e la proliferazione delle cellule endoteliali, di fibroblasti e di cellule immunitarie. Queste molecole regolano anche la produzione e la degradazione ossea (TGF- β , IGF) e la rigenerazione mesenchimale (IGF, EGF, PDGF). La produzione ed il rilascio di questi fattori viene stimolata dalle neoplasie, in particolare quelle maligne, per supportare la loro crescita espansiva o metastatica. VEGF è stato correlato positivamente con la densità dei capillari nel mastocitoma cutaneo del cane (Blair e Flaumenhaft, 2009). In questa categoria sono contenute anche le **MMP** (metalloproteinasi), enzimi dotato di un'azione catabolica nei processi fisiologici, che regolano così il normale rimodellamento della matrice extracellulare. Un loro eccesso però porta a processi patologici, come artriti e lo sviluppo di metastasi.
- Molecole di adesione ed immunologiche: le piastrine sembrano avere un ruolo nell'iniziazione e nella propagazione iniziale di processi infiammatori. Queste azioni sembrano essere legate sia dal rilascio di citochine e chemochine (IL-1, RANTES...), sia dall'aumento dell'adesione piastrinica e delle cellule immunitarie alle strutture vascolari (P-selectina, vibronectina, integrine...). L'attivazione cronica di questi meccanismi di regolazione infiammatoria sembra essere collegata al potenziale ruolo aterosclerotico delle piastrine. L'azione antimicrobica sembra essere proprio associata alla chemiotassi di cellule infiammatorie indotta da questi fattori.

- Fattori della coagulazione: ampiamente studiati e descritti. Hanno un'azione primaria e secondaria nell'emostasi.

1.5 Emoderivati

Negli anni, i progressi tecnologici di analisi, purificazione e separazione di molecole hanno portato allo sviluppo di numerosi prodotti, tra questi gli emoderivati.

Secondo la WHO un emoderivato è una *“qualsiasi sostanza con azione terapeutica che deriva dal sangue, compreso sangue intero o suoi componenti, per la trasfusione o come derivati plasmatici”* (Blood Products, n.d.).

Il sangue è un insieme di cellule, colloidali e cristalloidi e può essere separato in diverse componenti, con indicazioni diverse a seconda della necessità. Tra questi emocomponenti, negli ultimi anni particolare interesse è stato destinato ai derivati piastrinici.

Gli emoderivati, così come i derivati piastrinici, possono avere tre diverse origini:

- **Autologhi**: donatore e ricevente sono lo stesso individuo;
- **Allogeni**: donatore e ricevente sono due individui diversi, internamente alla stessa specie;
- **Eterologhi**: donatore e ricevente sono individui di specie diverse.

Come riportato da Burnouf et al., 2016 i primi studi sugli effetti delle piastrine risalgono già al 1969, quando Folkman ed il suo gruppo hanno mostrato come, internamente alle cellule ematiche, fossero proprio le piastrine le responsabili dell'emostasi e del mantenimento dell'integrità vascolare. Successivamente, nel 1980, il primo test sul lisato piastrinico umano (human platelet lysate-HPL) ha rilevato un'importante azione di questo derivato nel supporto della proliferazione cellulare. Visti i promettenti risultati, con gli anni numerosi studi sono stati effettuati per cercare di sfruttare l'azione dei fattori piastrinici nella medicina di rigenerazione.

1.6 Principali derivati piastrinici e loro produzione

Gli emoderivati possono essere divisi a seconda del loro contenuto di piastrine in prodotti ricchi di piastrine **PRP (platelet-rich plasma)** o **PPP (platelet-poor plasma)**. Il processo di produttivo è unico, difatti il PPP si ottiene dalla produzione di PRP. Per essere considerato un concentrato piastrinico (PC) il contenuto delle piastrine deve essere di almeno 2×10^{11} in Europa (EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE., 2020) e di 3×10^{11} negli Stati Uniti (*Blood & Blood Products / FDA*, n.d.).

Le principali differenze tra PRP e PPP, oltre al contenuto di piastrine è il contenuto di fibrinogeno, solitamente leggermente maggiore nel secondo (Hatakeyama et al., 2014). Un'indagine proteomica sui due diversi emoderivati (Miroshnychenko et al., 2020) ha mostrato come su 600 proteine identificate, il 50% di queste erano presenti sia nel plasma, che in PRP e PPP. In quest'ultimo, la deplezione di piastrine od il processo produttivo sembra porti alla riduzione di alcune proteine regolatorie, quali: PEDF (pigment-epithelium derived factor) ad azione anti-angiogenica, antitumorale e neurotrofica; platelet basic protein, una chemochina tra le cui funzioni c'è la difesa dalle infezioni batteriche; il fattore piastrinico 4 (PF4) ad azione coagulativa; alcune delle multifunzionali Heat shock protein ed alcune proteine leganti il Ca^{2+} . I principali processi che quindi vengono colpiti dall'assenza di questi elementi riguardano la guarigione tissutale, la proliferazione, la regolazione dell'infiammazione e la differenziazione cellulare. Nello stesso studio è stato invece riscontrato un aumento delle proteine di fase acuta nel PPP, tra cui la transferrina, la fibronectina, la proteina C reattiva. Questo aumento di proteine di fase acuta a livello del PPP può essere dato dal fatto che in esso è raccolto maggior parte del plasma sanguigno e quindi è normale che in confronto al PRP abbia un maggior numero di proteine plasmatiche. Alcuni studi hanno dimostrato, in realtà, un effetto benefico del PPP. Woo et al., 2013 lo ha utilizzato in seguito ad un trattamento termico (riscaldato a 100° per 12 min) per formare un gel,

successivamente iniettato a livello di laringe in soggetti con paralisi laringea, ottenendo risultati positivi.

Come vengono preparati però questi due emoderivati? I metodi principali sono: il metodo PRP (Dhurat e Suesh, 2014), il metodo buffy-coat (BC-PC) (Dijkstra-Tiestra et al, 2008) e l'aferesi piastrinica. Il primo è più comune in America (Burnouf et al., 2016) ed Asia, mentre il secondo in Europa.

Per il **metodo PRP o della doppia centrifugazione**, il sangue intero raccolto in una provetta o sacca con anticoagulante è centrifugato a bassi giri. Questo processo porta alla formazione di tre strati: uno superiore ricco di piastrine e globuli bianchi, uno intermedio (buffy coat) ed uno inferiore formato principalmente da globuli rossi. A questo punto, la porzione ricca di piastrine viene trasferita in un altro contenitore e centrifugata ad alte velocità. Questa seconda centrifugazione, porta ad ottenere due strati: 1/3 è PRP sotto forma di pellet di piastrine, mentre i restanti 2/3 sono PPP. Il PRP in alcuni casi viene risospeso in una minima parte di plasma per l'utilizzo clinico.

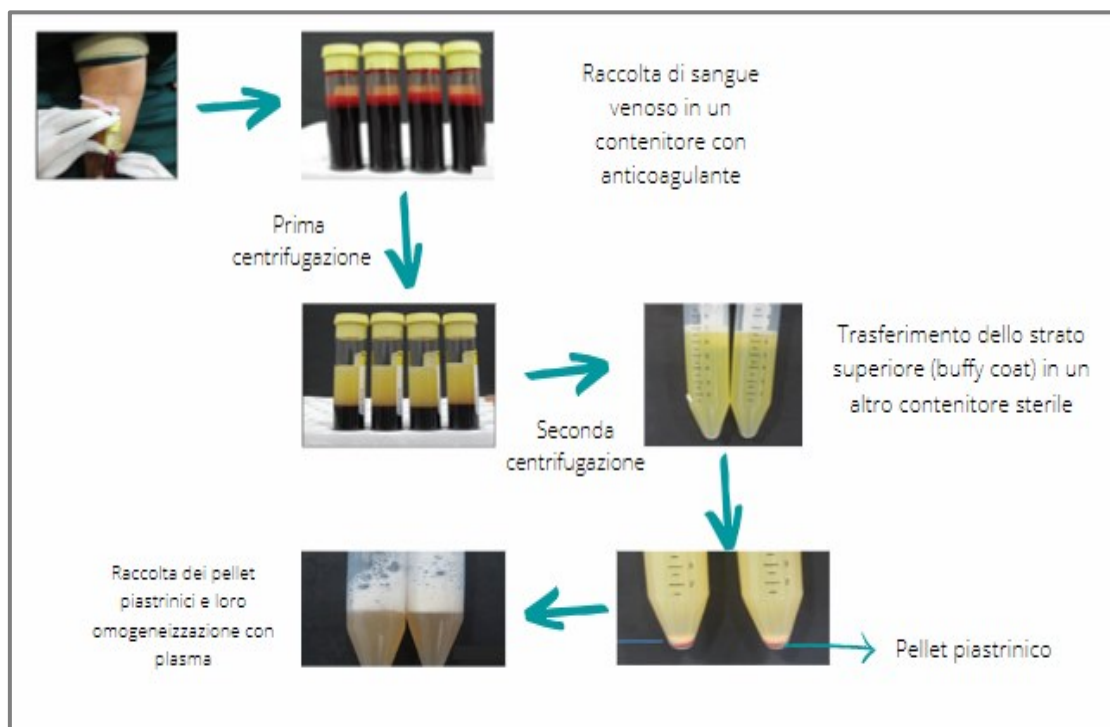


Figura 2. Tradotto. Principali step del metodo della doppia centrifugazione. Modificato da (Dhurat & Sukes, 2014).

Durante la preparazione con il metodo PRP possiamo decidere se includere o meno i globuli bianchi all'interno del concentrato piastrinico che vado ad ottenere. Se voglio avere solo piastrine, dopo la prima centrifugazione prelevo solo il primo strato e la porzione più superficiale del buffy coat, se invece voglio avere un concentrato ricco di globuli bianchi, andrò a prelevare anche il secondo strato insieme al primo. I globuli bianchi sembrano rilasciare fattori angiogenici (PDGF, VEGF) e catabolici (MMP), influenzando così la composizione del derivato piastrinico (Kobayashi et al., 2016). La loro azione nel complesso non è chiara; secondo alcuni autori portano ad un aumento di infiammazione e danni locali (Kaux et al., 2011)(Dragoo et al., 2012), mentre per altri questa azione pro-infiammatoria agisce riducendo infezioni secondarie (Khalafi et al., 2008).

Il metodo BC-PC prevede la raccolta di sangue con anticoagulante, che può essere stoccato una notte prima dell'utilizzo (Dijkstra-Tiekstra et al., 2008). A questo punto il sangue viene centrifugato ad alte velocità e si formeranno così tre strati, divisi per densità. Lo strato inferiore è formato dai globuli rossi, lo strato intermedio (buffy coat) da piastrine e globuli bianchi, mentre lo strato superiore dal PPP. Una volta rimosso quest'ultimo si aspira il buffy coat.

Nel caso del BC-PC, internamente al buffy coat troviamo anche i globuli bianchi, per questo molti centri adottano tecniche per la loro rimozione, tramite filtraggio del sangue prima dell'impiego per la produzione di PRP (Gulliksson, 2012), oppure con una centrifugazione a bassa velocità o una filtrazione del buffy coat (Dhurat & Sukesh, 2014).

Il metodo dell'aferesi prevede l'estrazione esclusiva dal sangue o dal plasma delle piastrine (piastrinoaferesi). È una tecnica che usa dei separatori cellulari che, collegati ad un computer, permettono di scegliere e separare un tipo cellulare dal sangue. Il metodo, quindi, richiede strumentazione e personale altamente specializzato ed è pertanto molto costoso, anche se permette di

ottenere dei concentrati di piastrine meno contaminati da leucociti o altre cellule.

Nel caso di uso allogenico del derivato, possono essere effettuati dei pool di concentrati piastrinici, ottenuti mescolando i derivati di più soggetti durante il processo produttivo. Questo permette sicuramente di ottenere maggiori quantità di derivato, pronto per lo stoccaggio ma deve prevedere un critico controllo dei donatori e delle condizioni di conservazione, per evitare la trasmissione di patogeni ematici o ambientali.

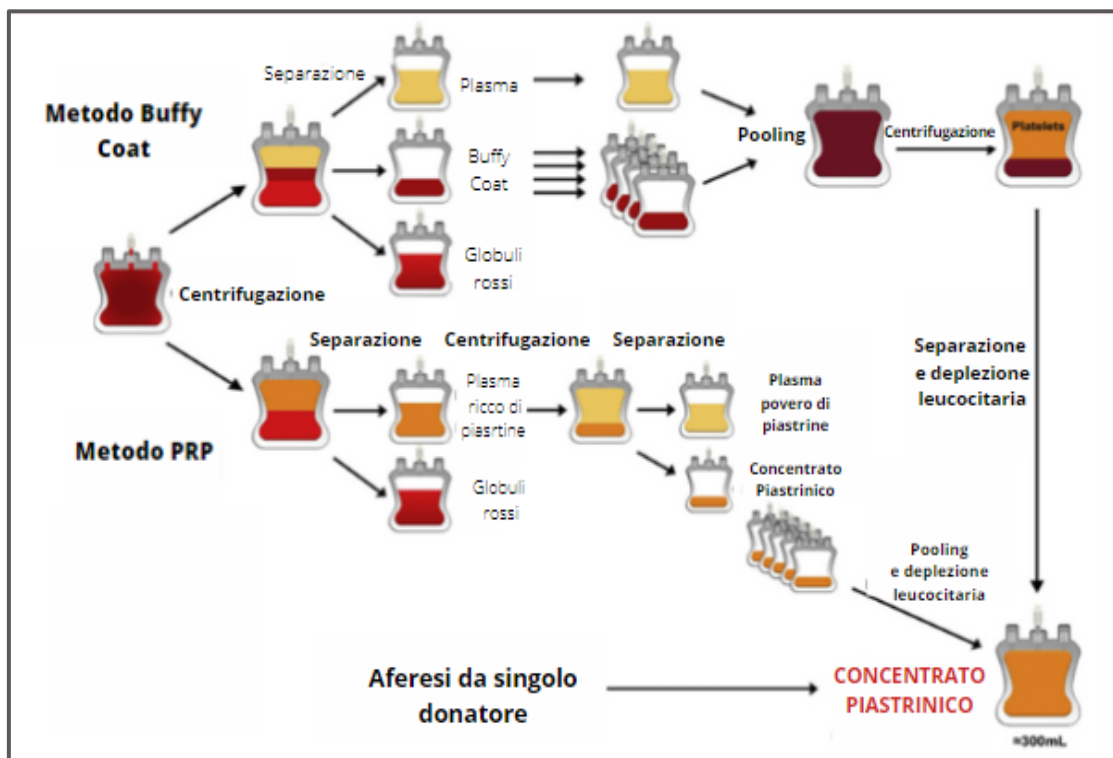


Figura 3. Schema rappresentante le principali differenze tra PRP e BC-PC. Modificato da (Burnouf et al., 2016).

Oltre al PPP, tra gli emoderivati a basso contenuto piastrinico abbiamo il **gel di fibrina (FG-fibrin glue)**, ed il **siero autologo (AS)**.

Il **FG** è ottenuto a partire da due componenti plasmatici: un concentrato di fibrinogeno/fattore XIII e fibronectina ed un concentrato di trombina. L'unione dei due composti, in presenza di Ca^{2+} , simula ciò che avviene nell'ultima fase

della coagulazione: la polimerizzazione del fibrinogeno porta alla formazione di un gel stabile, insolubile e non friabile di fibrina. La preparazione può avvenire in due modi: per crioprecipitazione del plasma, oppure tramite il processo di frazionamento di Cohn. Nel primo caso il plasma viene prima congelato e poi scongelato a 2/4°C, producendo una pasta che viene in seguito centrifugata. Questo crioprecipitato così ottenuto è ricco di fibronectina, fibrinogeno ma povero in fattore XIII. Nel caso invece del metodo del frazionamento di Cohn, il plasma è fatto precipitare ad una temperatura di -3/-5°C insieme ad etanolo al 10%, ad un pH naturale. Questo secondo processo porta ad avere un quantitativo maggiore di fibrinogeno, fibronectina e fattore XIII. In veterinaria ed umana FG è stato utilizzato a scopo chirurgico in oftalmologia, ortopedia e cardiocirurgia (Radosevich et al., 1997).

Anche il **siero autologo (AS)** è un emoderivato a basso contenuto piastrinico. Questo è stato testato per vari utilizzi: il trattamento della cheratocongiuntivite secca, di difetti epiteliali o di ulcere neurotrofiche. Il siero autologo viene prodotto a partire dal sangue intero, che viene centrifugato e filtrato, per impedire che coaguli di sangue o fibrina finiscano nel prodotto. Il siero viene poi diluito con una soluzione salina (Fox et al., 1984)(Matsumoto et al., 2004).

Tra i derivati ricchi di piastrine, oltre al PRP, troviamo: la **fibrina ricca di piastrine (PRF- platelet-rich fibrin)** ed il **gel piastrinico (PG-platelet gel)**.

Il **gel piastrinico (PG)** o anche **PRP attivato** viene prodotto dall'aggiunta al PRP di Sali di Calcio (CaCl_2), trombina, CaCl_2 + trombina o collagene di tipo I. L'attivazione porta al rilascio delle molecole contenute negli α -granuli che vanno ad integrarsi e concentrarsi nel gel. Uno studio svolto da Cavallo et al., 2016 ha mostrato come i diversi sistemi di produzione possano andare ad influenzare la formazione del gel piastrinico in termini di quantità e cinetica. Tutte le modalità di attivazione, ad eccezione del collagene, portano alla formazione di un coagulo del PG in 15-30 minuti. Il collagene invece non porta alla formazione del coagulo, ma secondo l'autore può essere legato alle

condizioni di produzione ed al tipo di collagene utilizzato. Se questa ipotesi venisse confermata, il collagene potrebbe non essere adatto alla produzione di PG. L'attivazione del PRP porta ad un aumento di rilascio dei fattori di crescita (GF), in comparazione al PRP non attivato. CaCl₂, CaCl₂/trombina o trombina portano ad un rilascio di fattori maggiore rispetto al collagene. CaCl₂ porta ad un rilascio progressivo di GF, raggiungendo un picco intorno alle 24h, in confronto alle altre tre modalità di attivazione che invece determinano un rilascio immediato della maggior parte dei GF. La rapida attivazione e rilascio di fattori di crescita, porta la necessità di utilizzare rapidamente il derivato una volta ottenuto. Con il passare del tempo, infatti, i GF vanno incontro rapidamente a degradazione, data la loro breve emivita. Questo può essere correlato al fallimento nell'utilizzo di alcuni derivati piastrinici attivati nella pratica, se usati troppo tardi rispetto all'attivazione delle piastrine o in tessuti che richiedono una guarigione prolungata nel tempo (Cavallo et al., 2016). Altro punto importante è il tempo di formazione del coagulo e la sua forma fisica. In seguito all'attivazione si può infatti ottenere un composto solido, così come può restare liquido. Chiaramente questo va ad influire sulla loro efficacia nella sede in cui vengono utilizzati: la forma liquida può essere efficacemente usata a livello intra-articolare, mentre un suo utilizzo a livello di una tomia chirurgica porterebbe ad una eccessiva dispersione di PRP e quindi di GF.

Il **PRF** differisce dagli altri derivati piastrinici per l'attivazione piastrinica pretrattamento. Nella raccolta del sangue per il PRF, infatti, non si fa utilizzo di anticoagulanti, permettendo così un'attivazione delle piastrine durante il processo. Con l'attivazione vengono rilasciati i granuli piastrinici, liberando così i fattori in essi contenuti ed attivando la cascata della coagulazione. Il processo inizia con la raccolta del sangue intero, che viene immediatamente centrifugato ad alte velocità. In seguito a questa centrifugazione si otterranno tre strati: uno inferiore ricco di eritrociti, uno superiore (PPP) acellulare ed uno intermedio

che contiene piastrine, leucociti e fattori di crescita. È questo ultimo strato che, in seguito ad un'attesa di dieci minuti diventa una matrice fibrosa, il PGF.

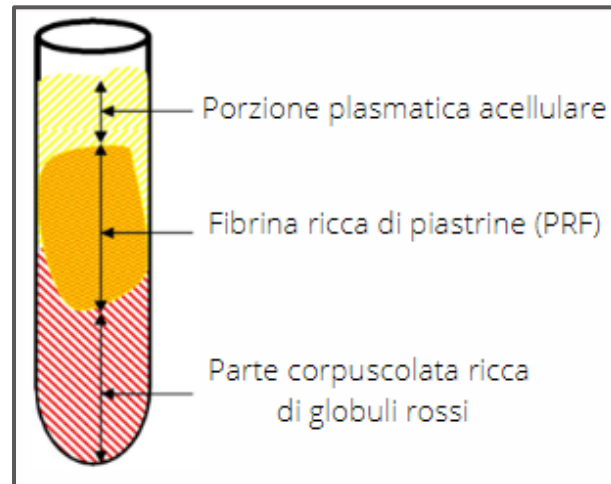


Figura 4. Suddivisione dei tre strati durante la preparazione del PRF. Modificata da (Dohan et al., 2006).

Essendo sangue raccolto senza anticoagulante, è necessario che tra la raccolta e l'inizio della processazione non passino più di 2 min, altrimenti andrà incontro a coagulazione (Pavlovic et al., 2021). (Dohan et al., 2006) La lenta polimerizzazione data dalla formazione della matrice di fibrina con questo metodo permette l'intrappolamento di abbondanti citochine e fattori di crescita. Tra i principali elementi contenuti nel PRF ci sono: TGF- β ; PDGF, IGF1, VEGF, EGF, IL-6, IL-4, TNF- α . La struttura e la composizione del PRF, permette il rilascio di questi fattori nel lungo tempo nel punto in cui viene utilizzato (Pavlovic et al., 2021). In un test sulla proliferazione e differenziazione di osteoblasti di ratto, uno studio ha mostrato come il massimo rilascio di TGF- β e PDGF dal PRF si ha tra il giorno 7 e 14 dall'applicazione, mentre nel caso del PRP attivato, i livelli a 7 e 14 giorni erano significativamente minori rispetto al primo giorno di applicazione (Toffler et al., 2009). Comparando, a parità di tempo, il livello di PDGF e TGF- β nel PRP attivato sono molto maggiori nel primo giorno, mentre raggiungono livelli significativamente minori rispetto al PRF al giorno 7 e 14, come mostrato nei grafici 1 e 2. Queste caratteristiche del PRF sicuramente vanno ad influenzarne l'utilizzo, il lento rilascio si può

efficacemente sfruttare per lesioni a lenta guarigione, che possono giovare quindi di un lento, costante e prolungato rilascio di fattori di crescita.

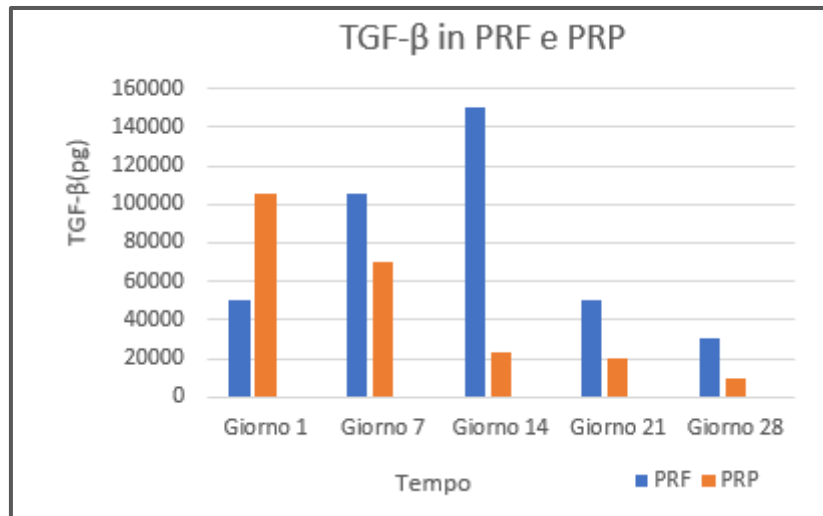


Grafico 1. Comparazione nell'andamento di TGF-β tra PRF e PRP a 1-7-14-21 e 28 giorni. Modificato da (Toffler et al., 2009).

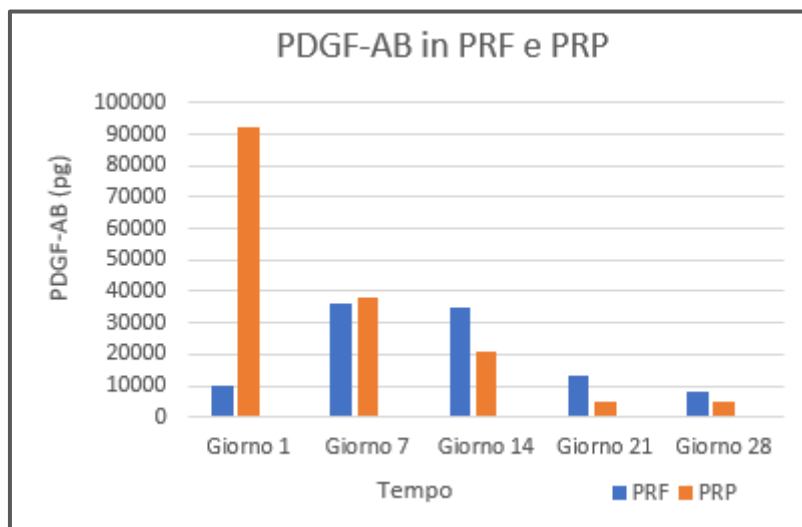


Grafico 2. Comparazione nell'andamento di PDGF-AB tra PRF e PRP a 1-7-14-21 e 28 giorni. Modificato da (Toffler et al., 2009).

Negli anni il PRF è stato considerato come il 'nuovo PRP' e da questo sono nati altri due derivati: il PRF 'avanzato' (A-PRF advanced PRF), con un protocollo che prevede la riduzione del tempo e gravità relativa di centrifugazione (200g per 8

min) che sembra avere un aumentato rilascio di fattori; ed il i-PRF, cioè il PRF liquido, prodotto a 60 g per 3 min (Miron et al., 2019a).

Oltre a questi però esiste un derivato piastrinico che invece è acellulare. Si tratta del **lisato piastrinico (LP)** (Oeller et al., 2021). Studiata inizialmente come sostituto al siero fetale bovino per la crescita cellulare di cellule mesenchimali (Burnouf et al., 2016), ha rapidamente acquisito interesse grazie all'evidenza di un importante rilascio di fattori. Il siero fetale bovino è ampiamente usato come supplemento ai terreni di coltura cellulare, ma il rischio legato a possibili reazioni anafilattiche, così come l'eticità del suo prelievo, hanno portato alla ricerca di un'alternativa. Grazie al contenuto dei granuli, ricchi di fattori di crescita, LP è stato utilizzato efficacemente per l'espansione cellulare in vitro (Burnouf et al., 2016).

Il punto chiave della produzione del lisato è, come suggerisce il nome stesso, la rottura delle piastrine, seguita la quale avviene il rilascio dei fattori in esse contenuti. Tra i principali metodi abbiamo il congelamento/scongelo, i trattamenti con ultrasuoni o il trattamento con solventi e detergenti. Alcuni autori riportano anche l'utilizzo di CaCl_2 tra le metodiche ma l'utilizzo di questo sale porta all'attivazione del sistema della coagulazione e quindi alla formazione di un gel piastrinico, anche se prima c'è stato un processo di congelamento e scongelamento del concentrato piastrinico (Copland et al., 2013).

Il lisato si produce a partire da un concentrato di piastrine, prodotto col metodo PRP o con il metodo del buffy coat e poi trattato per lisare le cellule.

Nel caso del **congelamento/scongelo**, le piastrine raccolte vengono congelate per più di 24h ad una temperatura di $-20/-80^\circ\text{C}$ per poi essere scongelate ad una temperatura di 37°C . Successivi cicli di congelamento/scongelo sembrano andare ad aumentare la quantità di fattori rilasciati dalle piastrine. In un questionario specifico sul tema (Strunk et

al., 2018) 7 centri di produzione hanno dichiarato di utilizzare diversi cicli congelamento/scongelo per determinare la rottura piastrinica. Il Working Party da come indicazioni dai 3 ai 5 cicli per ottimizzare il rilascio di fattori di crescita (Schallmoser et al., 2020).

La **sonificazione** va invece a prevedere il rilascio dei fattori di crescita in seguito al trattamento delle piastrine per 30 min con onde acustiche alla frequenza di 20kHz. L'effetto è basato sull'emissione di onde ad ultrasuoni in un liquido, generando in questo modo conseguenze sulle cellule. L'energia fornita agisce destabilizzando i microtubuli, portandoli al collasso per un processo definito "cavitazione" (Bernardi et al., 2013). La cavitazione porta alla formazione di bolle con conseguente aumento di pressione e temperatura internamente ai microtubuli, compromettendone la struttura e quindi determinando la lisi piastrinica (Izadifar et al., 2019). Alcuni autori riportano l'utilizzo della sonificazione con cicli congelamento/scongelo. In questo caso però non ci sono studi che vadano a valutare quanto il rilascio di fattori sia attribuibile ad uno o all'altro metodo.

L'ultima modalità di preparazione del lisato riportata in letteratura è il sistema **solvente/detergente (S/D)**. Questo sistema viene solitamente utilizzato in umana in seguito all'attivazione piastrinica con CaCl_2 o la produzione di PRP per l'inattivazione delle principali specie virali (Burnouf et al., 2016). Burnouf et al., 2008 ha studiato l'effetto del trattamento con S/D sul rilascio di fattori, comparandolo all'attivazione con CaCl_2 e alla combinazione dei due sistemi. Il processo di trattamento con S/D prevede: mescolamento costante del concentrato piastrinico per 15 minuti con una mistura di tributilfosfato (TnBP) e Triton X-45, scuotimento vigoroso per 1 minuto, immersione in acqua a 25°C per 1h con continuo movimento, aggiunta di olio di soia, scuotimento vigoroso per 1 minuto ed infine 15 minuti in uno scuotitore rotante. Per decantazione viene poi rimosso l'olio che si accumula in superficie, per ridurre i livelli di TnBP e Triton X-45. Lo studio ha mostrato come il trattamento con S/D porta ad un

significativo rilascio di fattori di crescita, associabile all'attivazione semplice o alla doppia attivazione (S/D + CaCl₂).

Anche per il lisato, così come per il PRP, è possibile andare a fare dei pool per la produzione (Burnouf et al., 2016). Chiaramente diventa molto importante la selezione dei donatori e le buone pratiche di laboratorio (GLP) per evitare la trasmissione di patogeni.

Alcuni autori (Altaie et al., 2016)(Hemeda et al., 2013) riportano l'aggiunta di eparina al LP al termine della sua produzione, nel caso di un suo utilizzo in terreni di coltura cellulare in alternativa al siero fetale bovino (FBS). Questi terreni sono infatti ricchi di Ca²⁺ che porterebbe alla formazione di gel piastrinico, in quanto il lisato contiene comunque fibrinogeno e altri fattori della coagulazione. Un eccesso di eparina, però ha un effetto negativo sulla riduzione della differenziazione in vitro delle linee cellulari (Hemeda et al., 2013).

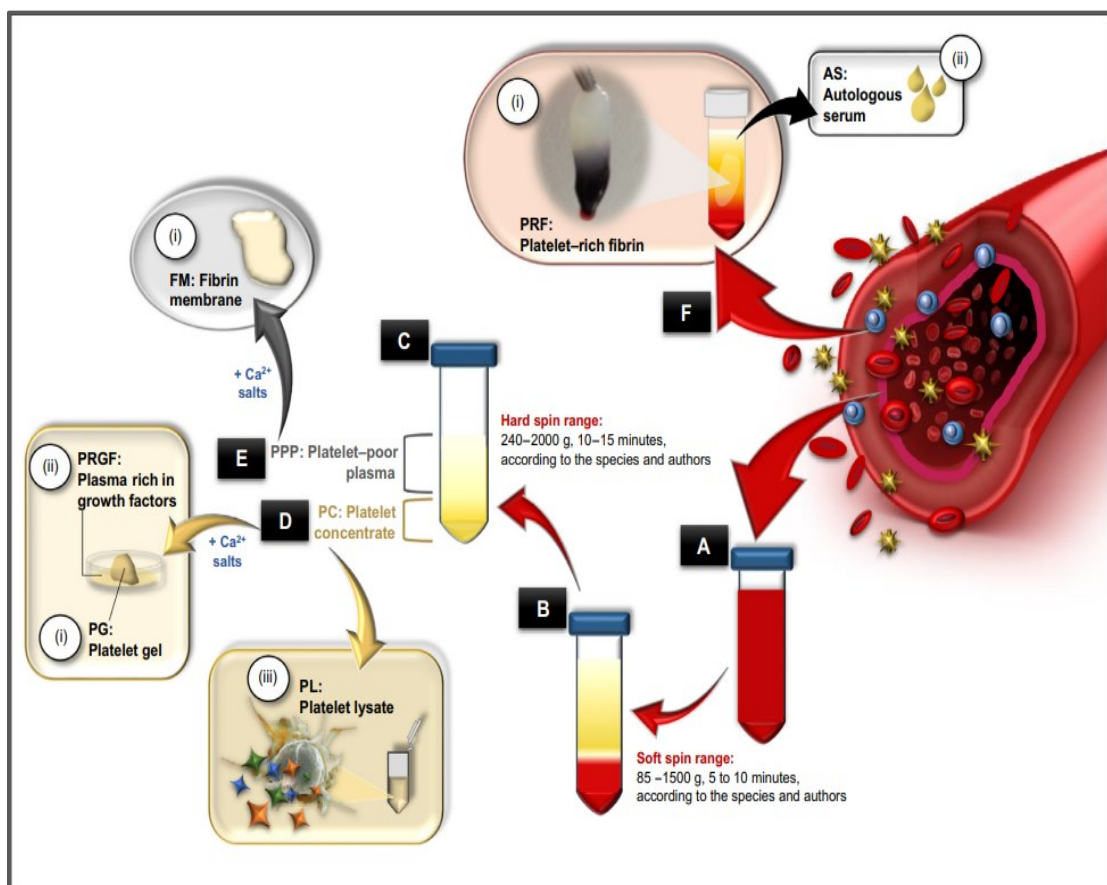


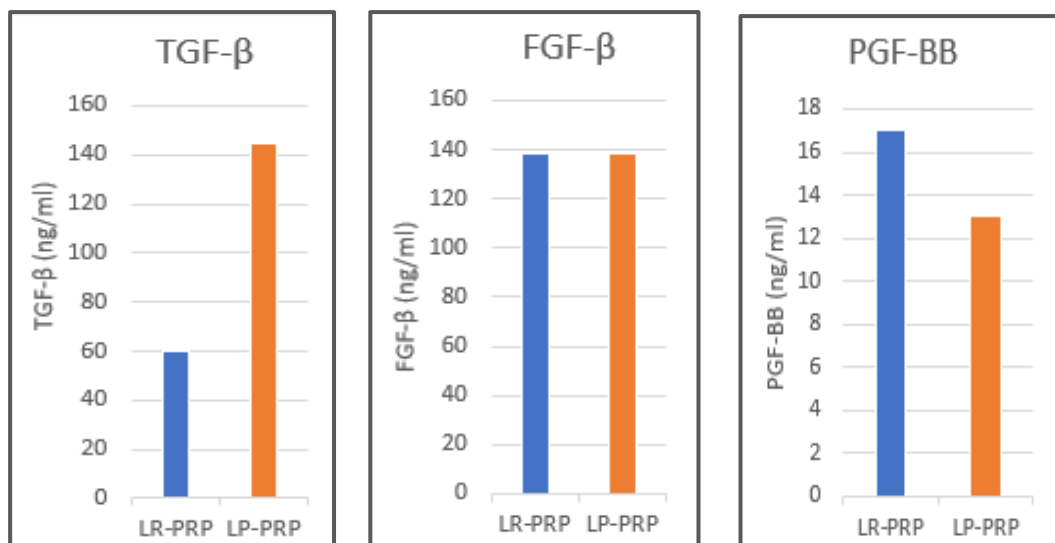
Figura 5. Breve schema riassuntivo dei principali derivati in uso in MV (Soares et al., 2021).

1.7 Effetto dei globuli bianchi nei derivati

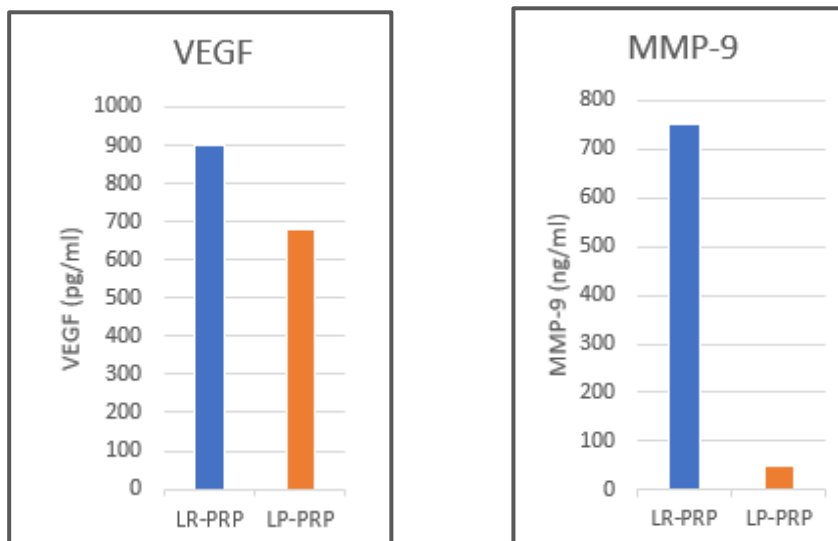
La domanda che molti autori si pongono è l'effetto che i globuli bianchi (GB) hanno all'interno degli emoderivati.

Alcuni ipotizzano che la presenza di GB o di globuli rossi porti al rilascio di metalloproteinasi (MMPS) e radicali liberi, portando quindi ad infiammazione e danni locali (Kaux et al., 2011b).

Questo sembra essere confermato da uno studio condotto da (Kobayashi et al., 2016), che ha comparato l'effetto del PRP ricco di globuli bianchi (LR-PRP leucocyte rich PRP) rispetto a quello invece povero (LP-PRP leucocyte poor PRP). L'inclusione o meno di GB sembra essere legata al numero e all'intensità delle centrifugazioni. Per la produzione di LR-PRP, infatti, viene utilizzato il metodo della doppia centrifugazione: una prima centrifugazione a bassa intensità (400g per 10min) porta alla formazione del buffy coat che viene trasferito in un altro tubo e sottoposto ad una seconda centrifugazione a 2000g per 3 min, ottenendo così PPP e LR-PRP. Nel caso di LP-PRP viene effettuata una sola centrifugazione ad 800g per 10 min in modo da ottenere così il buffy coat, che ci va a dare il LP-PRP. L'analisi dei due emoderivati, come ci si aspettava, ha evidenziato una concentrazione piastrinica non statisticamente diversa tra i due ed una concentrazione di molto ridotta di leucociti in LP-PRP. La principale componente si è rilevata poi essere di granulociti neutrofili, mentre tracce di linfociti sono state riscontrate nel LP-PRP. Questo studio ha poi valutato la concentrazione di alcuni fattori piastrinici, tra i quali TGF- β 1 (Grafico 3), FGF- β (Grafico 4), PGF-BB (Grafico 5), VEGF (Grafico 6), MMP-9 (Grafico 7).



Grafici 3, 4, 5. Concentrazioni di TGF-β, FGF-β e PGF-BB in LR-PRP e LP-PRP. Modificato da (Kobayashi et al., 2016)



Grafici 6, 7. Concentrazioni di VEGF e MMP-9 in LR-PRP e LP-PRP. Modificato da (Kobayashi et al., 2016).

Come si può vedere dai grafici, si nota una significativa differenza nelle concentrazioni di VEGF (6) ed MMP-9 (7) a favore di LR-PRP, solo una lieve differenza in caso di PGF-BB (5), nessuna differenza per FGF-β (4), mentre nel caso di TGF-β1 (3) è maggiore nel caso di LP-PRP. Per poter considerare questi dati significativi, cioè che le diverse concentrazioni siano effettivamente legate alla presenza di GB e non al processo produttivo, sono state studiate le correlazioni tra questi fattori ed i leucociti: una moderata correlazione positiva

è risultata per PDGF-BB e VEGF, mentre MMP-9 ha dimostrato una forte correlazione. Contrariamente FGF- β e TGF- β 1, sono risultati correlati negativamente. Questo mostra come PDGF e VEGF siano di origine sia piastrinica che leucocitaria, MMP-9 sia sostanzialmente di origine neutrofilica (data la forte correlazione e l'abbondanza di neutrofili), mentre TGF- β di origine piastrinica.

Questi studi mostrano come non solo le piastrine, ma anche i GB hanno influenza sulla quantità di GF contenuti internamente ai derivati piastrinici.

L'effetto dei GB in ogni caso non è ancora dimostrato. (Dragoo et al., 2012) ha riscontrato come l'uso di un derivato ricco di leucociti ha inizialmente portato ad una risposta infiammatoria importante tra i 5 ed i 14 giorni post iniezione del derivato. Anche (Anitua et al., 2013) ha riportato un aumento di fattori pro-infiammatori nel caso di LR-PRP. Se questo fosse vero, l'abbondanza di molecole infiammatorie potrebbe portare ad avere un effetto contrario a quello che ricerco: il richiamo di leucociti porterebbe infatti un'azione catabolica sui tessuti in cui vado ad utilizzarlo. Questa azione sembra essere particolarmente marcata nel caso di abbondanza di neutrofili, mentre l'effetto di monociti e linfociti rimane sconosciuto (Carr et al., 2015).

Nonostante ciò, uno studio retrospettivo su 1128 pazienti ha evidenziato come l'utilizzo di LR-PRP ha ridotto il verificarsi di infezioni secondarie all'operazione chirurgica (Khalafi et al., 2008).

Questo può far ipotizzare che la diversa concentrazione di GB, può avere diversi significati a seconda del tessuto sul quale vengono applicati. Un emoderivato ricco di neutrofili può essere utile a ridurre la probabilità di infezione in zone potenzialmente esposte alla contaminazione; mentre lo stesso derivato può accentuare o causare un processo infiammatorio a livello sinoviale o tendineo. Come riporta (Carr et al., 2015) un aumento di neutrofili è infatti correlato positivamente ad un aumento della sintesi di MMP, portando ad una riduzione nell'espressione di geni anabolizzanti a livello cartilagineo.

Esistono dei metodi di filtrazione per eliminare i globuli bianchi. Questi sistemi non sembrano avere effetto sulla concentrazione di piastrine ottenuta (Dijkstra-Tiekstra et al., 2008).

Anche i globuli rossi sono stati associati al rilascio di fattori dell'inflammatione, specificatamente IL-1 e TGF- α (Carr et al., 2015) e quindi si dovrebbe cerca di ridurre il più possibile la contaminazione eritrocitaria dei derivati piastrinici, in particolare se i processi produttivi sono effettuati manualmente.

1.8 Principali punti che influenzano la produzione di derivati

Esiste una grande variabilità nella concentrazione e nella composizione dei derivati piastrinici, a seconda dei protocolli produttivi adottati diversi fattori possono influire sulla produzione.

Sicuramente uno dei punti cardine è la **forza ed il tempo di centrifugazione**. Miron et al., 2019 compara protocolli diversi, che utilizzano forze e strumentazione diversa, dimostrando come questi influiscono sul risultato. La novità di questo studio è l'analisi fatta sul derivato ottenuto che viene aspirato in dieci diverse frazioni, ciascuna analizzata citologicamente in maniera distinta.

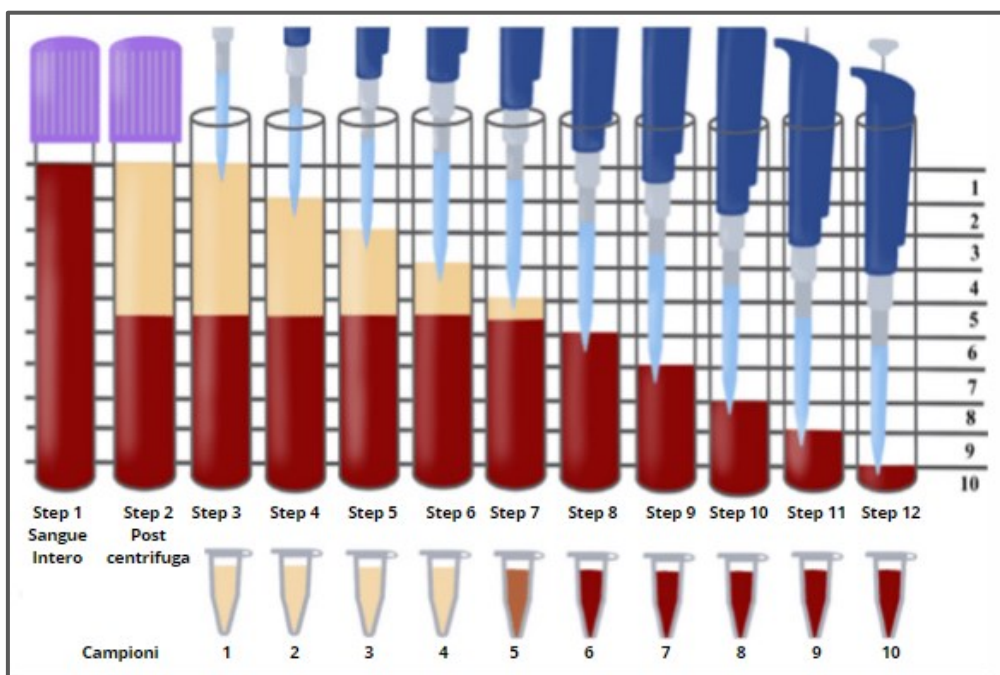
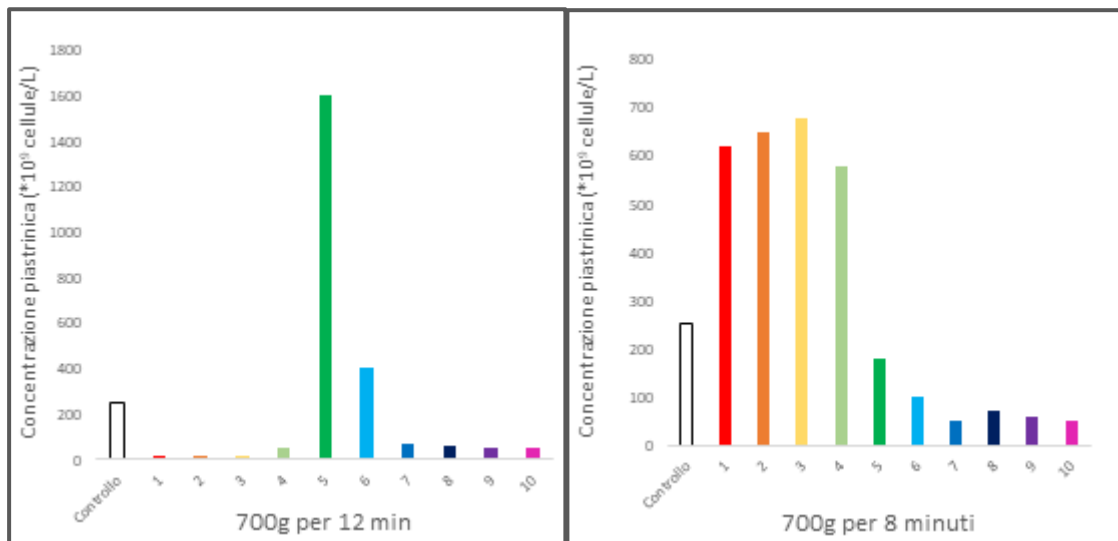


Figura 6. Schema di raccolta dei campioni per analisi citologica. Modificato da (Miron et al., 2019)

Per quanto riguarda il protocollo di centrifugazione, i tempi di centrifugazione, a parità di fattore g (o forza centrifuga relativa) utilizzato possono portare a risultati diversi. Per esempio, mantenendo il fattore g costante a 700 e variando solo il tempo, varia consistentemente la concentrazione piastrinica nei vari strati (grafico 8, grafico 9). Lo stesso si può notare mantenendo costante il tempo e variando la forza g come si può vedere comparando la distribuzione delle piastrine nei grafici 9 e 10.



Grafici 8 e 9. Distribuzione delle piastrine in seguito a centrifugazione a 700g per 12 minuti e a 700g per 8 minuti. Modificato da (Miron et al., 2019b).

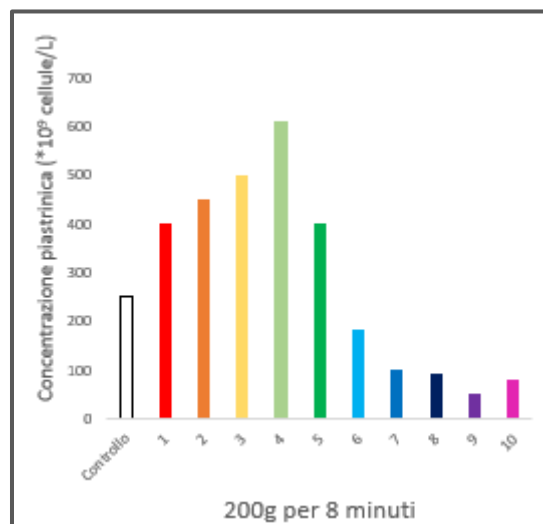


Grafico 10. Distribuzione delle piastrine in seguito a centrifugazione a 200g per 8 minuti. Modificato da (Miron et al., 2019b).

La diversa forza di centrifugazione influenza anche in maniera rilevante la distribuzione di leucociti nel derivato: a 200g i leucociti vanno a distribuirsi negli strati inferiori al buffy coat (Grafico 11), contrariamente a 700g abbiamo un significativo accumulo di leucociti negli strati superiori (Grafico 12). Questo di fatto mi permette di ottenere un derivato ricco di leucociti ed uno povero.

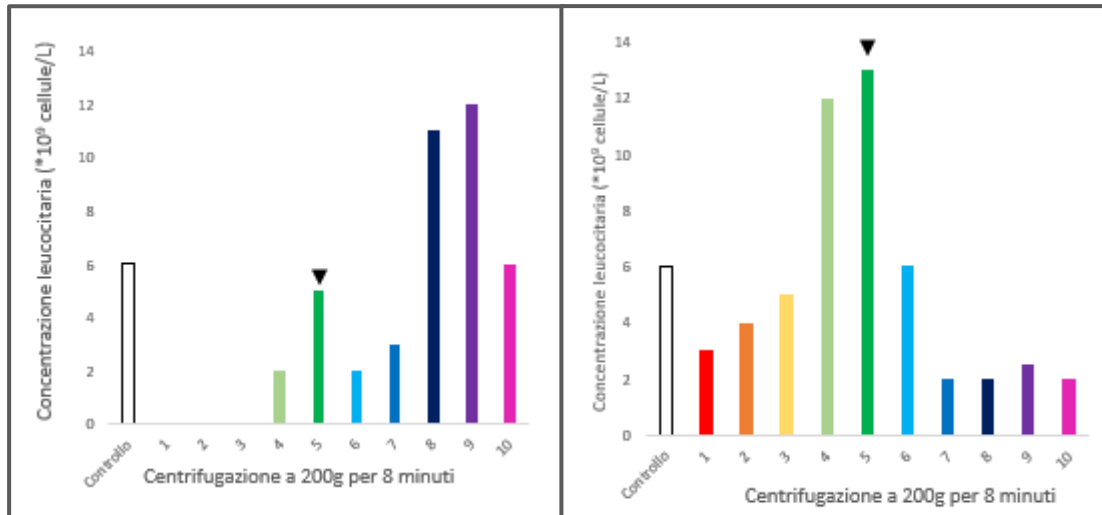


Grafico 11 e 12. Variazioni nella distribuzione leucocitaria a diverse forze e tempi di centrifugazione. Con la testa di freccia si indica lo strato del buffy coat. Modificato da (Miron et al., 2019b).

Oltre alla forza ed al tempo di centrifugazione, possono avere un effetto sulla concentrazione piastrinica:

- Il **tipo di centrifuga utilizzata**: la centrifuga orizzontale, rispetto a quella ad angolo fisso, sembra andare a favorire la separazione delle diverse componenti cellulari e ad essere meno traumatica sulle cellule (Miron et al., 2019b).
- Il **numero di centrifugazioni**: una singola centrifugazione porta ad una maggiore attivazione, e quindi consumo, di piastrine, probabilmente associato ad un maggior numero di globuli rossi presenti nel PRP ottenuto che stimolano le piastrine al rilascio di fattori di coagulazione (Argüelles et al., 2006).
- Il **protocollo utilizzato**: il metodo della doppia centrifugazione sembra portare ad una maggiore attivazione piastrinica nei primi due giorni

postproduzione rispetto al metodo BC-PC, differenza che sembra appianarsi in seguito (R. N. Pietersz et al., 1990).

- Non sembrano esserci particolari effetti legati agli anticoagulanti (Aizawa et al., 2020).

Un altro importante fattore da valutare è la distanza tra il prelievo del sangue ed il **tempo di preparazione** del derivato. Questo può essere particolarmente importante in veterinaria, dove spesso i laboratori o i centri di produzioni si trovano lontani dalla sede di raccolta del sangue.

La vita normale delle piastrine nel circolo sanguigno è di circa 9-10 giorni, ma è stato dimostrato come uno stoccaggio a 22°C per 5 giorni equivalga ad un invecchiamento delle piastrine per 2.1 giorni a 37°C. Ciò significa che a temperature inferiori la self-life delle piastrine aumenta. A 22°C infatti il metabolismo piastrinico sembra essere rallentato, come dimostra il minor utilizzo di ATP (Gulliksson, 2003a).

(Thibault et al., 2006) ha dimostrato che è possibile ritardare fino alle 24h la preparazione del derivato senza avere perdita di efficacia, purché il sangue intero sia rapidamente raffreddato a 20-24°C e poi mantenuto a temperatura fino alla processazione (R. N. I. Pietersz et al., 1989) .

(Dumont et al., 2002) hanno studiato l'azione di uno stoccaggio in plasma delle piastrine a temperatura ambiente fino a 7 giorni. Quello che è stato osservato è che la concentrazione piastrinica sostanzialmente si è mantenuta costante, non compromettendo l'efficacia del derivato. Lo stoccaggio prolungato rappresenta però un potenziale rischio di sviluppo e crescita batterica, è necessario implementare sistemi di controllo per evitare la sovra crescita batterica.

(Dessels et al., 2019) hanno prodotto lisato piastrinico a partire da PRP di 5 giorni che, secondo le linee guida della FDA, sarebbe da considerare come

‘scaduto’. I risultati ottenuti sono stati promettenti e, nonostante sicuramente ci sia bisogno di altri studi, può essere un buon punto di partenza per il riutilizzo di derivati che altrimenti dovrebbero essere gettati via.

Un ruolo lo ha anche la variabilità individuale. La **selezione dei donatori** può essere un punto chiave per ottenere un derivato ricco di piastrine, è stata infatti osservata una correlazione positiva tra la quantità di piastrine nel sangue intero e quello nei derivati (Argüelles et al., 2006).

Per il lisato piastrinico, di particolare importanza lo sembrano avere il numero di **processi di congelamento e scongelamento** eseguiti. Sembra infatti che il massimo rilascio si abbia tra i tre ed i cinque cicli di congelamento-scongelamento, mentre un numero maggiore non sembra avere un particolare significato, non portando a significativi aumenti di fattori contenuti nei granuli piastrinici (Strandberg et al., 2017).

1.9 Stoccaggio degli emoderivati

Lo stoccaggio rappresenta sicuramente un punto molto importante per la praticità di utilizzo dei derivati, influenzando la quantità di derivato che si può produrre anticipatamente e la possibilità di detenerlo non solo in strutture ospedaliere, ma anche in allevamento.

Uno dei punti da valutare durante lo stoccaggio di un derivato è la sua **durata**, che può essere indicata come il mantenimento della sua efficacia di azione dopo un determinato periodo di conservazione.

È abitudine nei centri di produzione stoccare il derivato piastrinico con il plasma dello stesso donatore da cui è stato ottenuto (Zhang et al., 2008a).

Tra i **parametri** che vengono valutati durante lo stoccaggio di piastrine o emoderivati ci sono: il **pH**, la **CO₂**, il **glucosio**, **pO₂**, i **lattati** e la **morfologia** delle piastrine. Per questo vengono ricercati soluzioni additive o contenitori che

garantiscono al massimo la durabilità del prodotto, riducendone la degradazione.

Il normale range di pH per la conservazione piastrinica è ritenuto essere tra i 6.4 ed i 7.4 a 22°C (Dekkers et al., 2007). Un abbassamento del pH sotto il 6 è associato ad una riduzione della vitalità piastrinica (Gulliksson, 2003b).

Tra i principali fattori acidificanti c'è il metabolismo piastrinico, che porta al consumo di glucosio e ad un'acidificazione del mezzo in cui sono contenute le piastrine. Le soluzioni additive permettono di allungare la durata delle piastrine in quanto, a differenza del plasma, contengono una concentrazione minore di glucosio, riducendo così l'abbassamento del pH. Una ridotta concentrazione di glucosio porta però ad un aumento della produzione di acido lattico che porterebbe comunque ad un abbassamento del pH. Per questo i diversi sistemi additivi sono addizionati con acetato di sodio, che va a contrastare l'acidificazione dovuta alla produzione di acido lattico.

(Gulliksson, 2003b) evidenzia anche l'effetto del citrato: questo aumenta il metabolismo piastrinico, determinando di fatto un aumento di produzione di lattato ed un abbassamento del pH, che viene però neutralizzata dal sopra citato acetato. Un minimo di citrato solitamente nei mezzi sintetici in cui vengono stoccate le piastrine viene comunque messo, perché riduce l'aggregazione piastrinica.

Nonostante questo, per (Zhang et al., 2008b) il miglior mezzo di stoccaggio per le piastrine resta il plasma, nonostante tutti i sistemi additivi riuscissero a mantenere un pH superiore a 7 fino a 7 giorni di stoccaggio a 22-24°C. Il vantaggio dei mezzi di mezzi sintetici per lo stoccaggio di piastrine è che sicuramente permettono di avere un controllo dei sistemi metabolici piastrinici (Gulliksson, 2003b).

I nuovi sistemi di stoccaggio però sembrano in realtà portare ad un aumento del metabolismo piastrinico e al consumo quindi di O₂, per l'azione delle pompe protoniche della cellula piastrinica nel tentativo di mantenere la pressione

osmotica, portando quindi ad un rapido consumo di glucosio e ad un'alterazione più rapida della morfologia cellulare (Zhang et al., 2008b). Infatti, per il plasma, a differenza dei sistemi additivi, sono più deboli le correlazioni tra l'attività piastrinica e il glucosio, il lattato e la morfologia cellulare, suggerendo che un aumento del metabolismo è maggiore nei mezzi sintetici ed è associato a degranulazione ed alterazioni osmotiche che portano a destabilizzazione delle membrane piastriniche.

Un altro fattore che influenza il metabolismo piastrinico durante lo stoccaggio è il **contenitore utilizzato** (Turner et al., 1995). Un rivestimento diverso può infatti andare ad influenzare gli scambi gassosi, che sono correlati con il pH e la vitalità piastrinica. (Zhang et al., 2008b) dimostra infatti come ci sia una correlazione negativa tra pO_2 e pCO_2 , come è logico immaginare, allo stesso tempo però pCO_2 è correlato negativamente con la morfologia piastrinica e con il pH. Un accumulo di questo gas porta quindi ad una riduzione del pH, che a sua volta è responsabile di alterazione della vitalità piastrinica. Un diverso tipo di contenitore può allontanare maggiormente la CO_2 , riducendo l'abbassamento del pH ed i danni piastrinici.

Come per le piastrine, anche i loro derivati hanno una self life di cinque giorni se conservati a 22°-24°C, poi il rischio di contaminazione batterica è alto e porta allo scarto del derivato. Per questo motivo si stanno studiando diversi metodi per lo stoccaggio dei derivati, tra cui il **congelamento** e la **liofilizzazione**.

DeMello et al., 2022 hanno valutato la concentrazione di fattori di crescita dopo il **congelamento** a -20°C per sei mesi senza agenti di preservazione del PRP di cane. Lo studio ha ricercato la presenza di PDGF, TGF- β 1 e VEGF nel PRP congelato. I primi due sono stati ritrovati in maniera significativa ed è stata trovata una correlazione positiva modesta tra la loro concentrazione e la concentrazione piastrinica finale di PRP. Questo implica che maggiore è il contenuto piastrinico nel PRP, maggiore tendenzialmente saranno le

concentrazioni di questi fattori nel derivato scongelato. Per VEGF invece, in questo studio è stato rilevato a basse concentrazioni, mentre Franklin et al. hanno misurato valori significativi nel PRP congelato.

(McClain & McCarrel, 2019) hanno paragonato i risultati di diversi sistemi di congelamento del PRP: a -20°C , a -80°C e congelato in azoto liquido (AL), rapportandoli al quantitativo di fattori rilasciati dal PRP fresco attivato.

Viene evidenziato che, rispetto all'attivazione del PRP, un processo di rapido congelamento e scongelamento in AL non porta a variazioni nelle concentrazioni dei principali fattori di crescita, mentre aumentano i livelli di metalloproteinasi (MMP-9). Questo è probabilmente dovuto al fatto che in questo studio il PRP in realtà è un LR-PRP, quindi con una concentrazione non solo di piastrine ma anche di leucociti che determinano un aumentato rilascio di MMP-9 nel derivato piastrinico (Kobayashi et al., 2016).

Vengono poi valutati i fattori rilasciati durante 1, 3 e 6 mesi a -20°C , -80°C e in AL. Ciò che viene evidenziato è un'importante riduzione dei livelli di IGF-1 in tutti e tre i sistemi di congelamento, probabilmente legato al fatto che questo fattore si riscontra principalmente nel plasma, mentre gli altri fattori valutati (PDGF e TGF- β) si trovano nei granuli piastrinici o nei GB (MMP-9). Questo importante decremento di IGF-1 indica che, se si intende preservare questo fattore di crescita, è meglio non procedere con il congelamento del derivato.

La degradazione proteica durante al congelamento sembra essere associata a: denaturazione dal freddo o congelamento dei soluti, con alterazioni di pH, viscosità e cambiamenti di interfaccia.

Per quanto riguarda gli altri fattori, gli autori giungono alla conclusione che il PRP è stoccato al meglio a -80°C per 1 mese, mentre fino ai 6 mesi è meglio l'azoto liquido per una miglior preservazione di PDGF e TGF- β 1. Nonostante questo, è importante considerare che nello studio i valori assoluti dei fattori di crescita vanno a ridursi in tutti i sistemi di congelamento, rispetto al PRP fresco attivato.

Il congelamento in sé aumenta i livelli di MMP-9, ma questo può essere abbastanza atteso vista la concentrazione di GB nel PRP utilizzato.

Un limite di questo studio però riguarda il processo di congelamento e scongelamento previa valutazione della concentrazione dei vari fattori. Questo, come visto per la preparazione del lisato piastrinico, porta probabilmente alla rottura di parte delle piastrine, con rilascio dei fattori in esse contenute. Quindi nella realtà si sta valutando un lisato piastrinico e non un PRP congelato. Sarebbe perciò opportuno valutare l'integrità piastrinica in seguito a questo processo di congelamento e scongelamento, benché singolo.

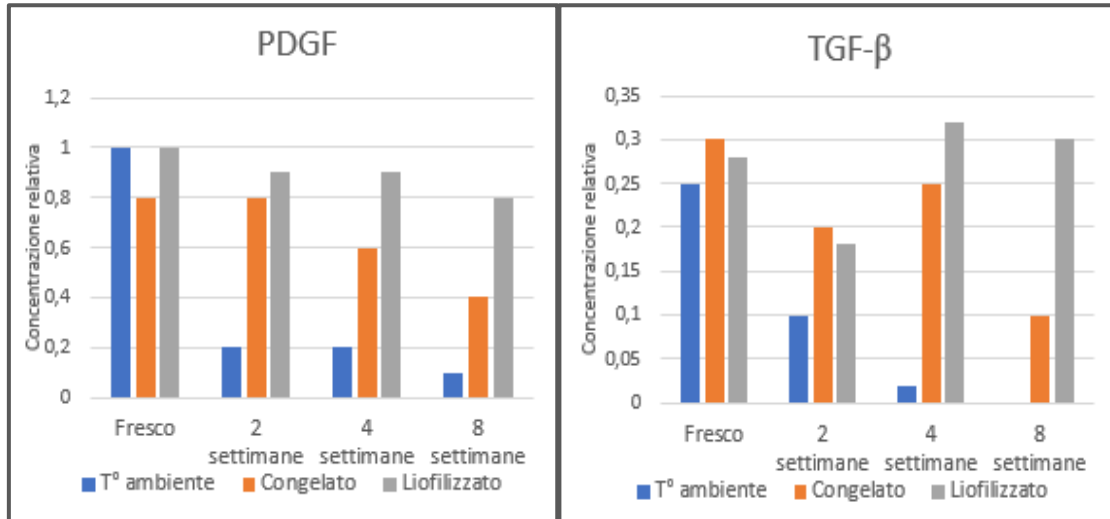
In ogni caso lo studio potrebbe essere una buona base per dimostrare che, una volta prodotto il PRP, è possibile congelarlo fino a sei mesi ed ottenere comunque un lisato con una buona concentrazione di fattori di crescita, eccezion fatta per IGF-1 che comunque può essere addizionato poi con del plasma.

Anche (Hosnuter et al., 2017) mostrano una significativa diminuzione dei GF nei derivati congelati a -20°C e scongelati dopo 7 e 14 giorni.

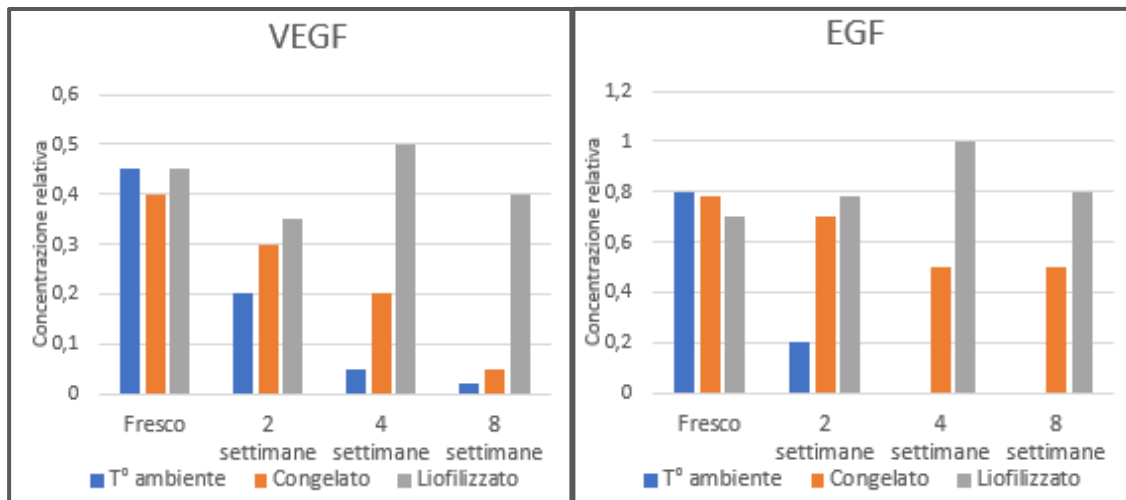
Entrambi gli studi (Hosnuter et al., 2017; McClain & McCarrel, 2019) vanno quindi a rilevare delle differenze significative nelle concentrazioni dei fattori di crescita in seguito al congelamento del PRP per tempi e temperature variabili, nessuno dei due però va a verificarne l'efficacia in vivo o in vitro. I fattori, anche se ridotti, possono comunque avere un effetto biologico sufficiente a spiegarne un possibile stoccaggio fino a sei mesi.

L'altro sistema di conservazione studiato è la **liofilizzazione**. (Shiga et al., 2017) comparano per 8 settimane il PRP congelato rispetto al PRP congelato e poi liofilizzato, prendendo come controllo PRP fresco. Il processo di liofilizzazione va a vedere un primo bagno in etanolo a -60°C e poi un congelamento a -30°C per 4 ore per poi procedere in un liofilizzatore. Per i campioni così ottenuti, non viene però specificato come vengono conservati, se a T° ambiente o congelati. Il PRP, previo utilizzo, viene risospeso in acqua distillata. Il risultato interessante

di questo studio è che mentre il PRP congelato mantiene la concentrazione piastrinica per 8 settimane (grafici 13-14-15-16), ma va a ridurre la concentrazione di fattori di crescita; la liofilizzazione permette di mantenere per la stessa durata di tempo sia la concentrazione piastrinica che quella di GF e quindi la sua efficacia terapeutica.



Grafici 13 e 14. Concentrazioni relative di PDGF e TGF-β nei diversi preparati. Modificato da (Shiga et al., 2017).



Grafici 15 e 16. Concentrazioni relative di VEGF e EGF nei diversi preparati. Modificato da (Shiga et al., 2017).

La comparazione dei livelli dei fattori di crescita tra il PRP fresco e liofilizzato, fa supporre che la liofilizzazione sia un metodo di conservazione migliore rispetto al congelamento per lo stoccaggio. Sarebbe interessante provare ad estendere anche per diversi mesi o anni il periodo di conservazione del liofilizzato prima della risospensione per valutarne i livelli di fattori di crescita e di efficacia terapeutica, oltre che la possibilità di utilizzo di PRP liofilizzato per la produzione di altri derivati, come il lisato piastrinico.

In questi studi, sia nel caso di congelamento che di liofilizzazione, il PRP viene attivato con calcio o trombina. Potrebbe essere utile valutare anche il livello di attivazione e di fattori piastrinici rilasciati senza l'utilizzo di questi attivatori, in modo da poter valutare l'effetto di un singolo congelamento/scongelo o del processo di liofilizzazione sul rilascio di fattori e sull'integrità piastrinica.

Notodihardjo et al., 2018 hanno studiato l'effetto del congelamento e della liofilizzazione direttamente sul lisato piastrinico. In particolare, hanno valutato l'azione di tre sistemi di conservazione: C-hPL (cryopreservation human platelet lysate), cioè uno stoccaggio del lisato a -80°C per 9 mesi; CL-hPL, uno stoccaggio per 9 mesi a -80°C a cui segue una liofilizzazione ed una risospensione con fisiologica e L-hPL, dove il lisato viene congelato rapidamente nell'azoto liquido, liofilizzato e poi conservato a 4°C per 9 mesi, ricostituendolo con della soluzione salina prima dell'utilizzo.

L'analisi dei principali fattori di crescita (PDGF, VEGF e TGF- β 1) in questo caso ha mostrato una concentrazione maggiore nel gruppo C-hPL, rispetto agli altri due. Il risultato viene però in parte giustificato dagli autori dicendo che una volta che il lisato è stato liofilizzato è più difficile da raccogliere completamente. In ogni caso l'effetto biologico, in questo caso la proliferazione di fibroblasti, è risultato sufficiente in tutti i tre tipi di produzione. Questo indica che la liofilizzazione anche in questo caso si dimostra un efficace modalità di stoccaggio, ma anche che il processo di rapido congelamento in azoto, liofilizzazione e refrigerazione a 4°C permette di ottenere pari risultati rispetto

al congelamento a -80°C e alla successiva liofilizzazione. Questo è particolarmente importante dal momento in cui il lisato liofilizzato prodotto può comodamente essere stoccato in qualunque contesto, ambulatoriale o di allevamento, senza la necessità di avere sistemi di crioconservazione e congelamento a -80°C . Da liofilizzato poi, sicuramente il trasporto e lo stoccaggio risulta più agevole.

L'utilizzo di concentrati piastrinici liofilizzati può rappresentare quindi un'ottima modalità di stoccaggio rispetto al congelamento, permettendone l'agevole stoccaggio fino ai nove mesi. Successivi studi devono poi essere fatti su un ulteriore prolungamento dei tempi di conservazione, in particolare in un'ottica di una produzione su larga scala.

1.10 Standardizzazione dei processi produttivi

Su molti aspetti legati al protocollo di produzione, alla nomenclatura, all'effetto dei GB, allo stoccaggio ed alla modalità di produzione ci sono spesso risultati contrastanti sull'efficacia o meno dei derivati piastrinici. I derivati sono un'ottima fonte di fattori di crescita e sono relativamente facili da ottenere ed utilizzare, ma non esiste una concordanza sul protocollo di produzione e sulla loro effettiva efficacia. Numerosi sono gli studi che ne dimostrano un'efficacia terapeutica, ma altrettanti non arrivano agli stessi risultati. Per questo cresce sempre di più la consapevolezza e la necessità di andare a standardizzare i processi produttivi e in questo modo andare a dimostrare l'effettiva efficacia di questi derivati.

Come è stato rilevato in questo lavoro, sono numerosi i fattori che possono influire sul derivato finale che vado ad ottenere. Il protocollo che vado ad utilizzare mi permette di ottenere diversi tipi di derivati, ognuno con caratteristiche diverse e possibili utilizzi diversi, le modalità di stoccaggio dei derivati, le modalità produttive, la variabilità individuale dei donatori, la presenza o meno di globuli bianchi ed altri.

Quello che manca davvero è andare ad uniformare la nomenclatura e tutti gli aspetti essenziali che influiscono sulla produzione di emoderivati.

Più che dimostrare l'efficacia di singoli protocolli, sarebbe importante quindi andare a stabilire dei livelli terapeutici nella concentrazione dei fattori di crescita, legata alla numerosità di piastrine e leucociti contenuti nel derivato; standardizzare le produzioni (utilizzo o meno di attivatori) e l'utilizzo dei derivati (tessuto e modalità di applicazione).

(Delong et al., 2012) suggerisce un sistema di classificazione del PRP basato su:

- Concentrazione piastrinica: superiore od inferiore ad un livello basale di 750,000 piastrine/ μ l. Sarebbe sempre opportuno, una volta ottenuto il derivato, andare ad effettuare una stima del contenuto piastrinico.
- La presenza o meno di un metodo di attivazione, che può essere calcio, collagene o trombina.
- La concentrazione di leucociti: se superiore o inferiore rispetto al sangue intero.

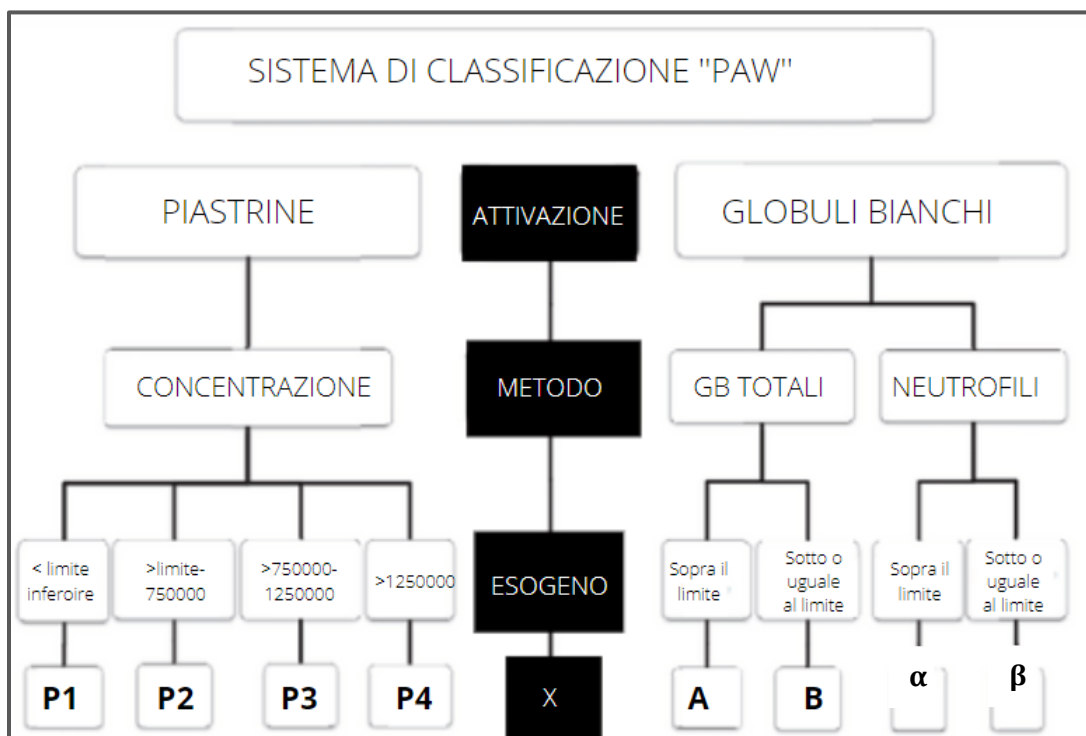


Figura 7. Schema della classificazione PAW. Modificato da (Delong et al., 2012).

Per esempio: P2-B β indicherebbe un derivato con concentrazioni pari a 750000 e con livelli di globuli bianchi e neutrofili superiori a quella che è la normale concentrazione ematica.

L'utilizzo di questo metodo permetterebbe a chi utilizza un derivato di conoscere il tipo di derivato che si sta utilizzando, rappresentando già un buon punto di partenza per una standardizzazione almeno del prodotto utilizzato.

Più genericamente M. Dohan Ehrenfest et al., 2012 hanno suggerito una classificazione basata sul metodo di produzione e sul derivato che si va ad ottenere. Si propone di classificare tutti i derivati ottenuti da una concentrazione di piastrine come **concentrati piastrinici (PC)**, andandoli poi a dividere secondo il tipo derivato, la sua attivazione e la presenza o meno di leucociti. Indicare un derivato come 'PC' non dà, infatti, idea di quale possa essere la sua preparazione, per questo è importante trovare una nomenclatura che possa dare un'idea della tipologia di derivato utilizzato e della sua composizione. L'attivazione porta alla polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina, per formare un gel che può essere applicato nella regione desiderata, con rilascio progressivo dei fattori.

P-PRP	PRP povero di leucociti
P-PRP gel	PRP povero di leucociti, attivato
L-PRP	PRP ricco di leucociti
L-PRP gel	PRP ricco di leucociti, attivato
P-PRF	PRF povero di leucociti
L-PRF	PRF ricco di leucociti

Tabella 1. Schema dei metodi produttivi dei derivati piastrinici. Modificato da (M. Dohan Ehrenfest et al., 2012).

Per PRP in questo caso si considera una concentrazione di cinque volte quella del sangue intero, mentre ricco di leucociti se è superiore ai livelli basali.

Un altro esempio di classificazione è la classificazione DEPA (Magalon et al., 2016), acronimo di: dose di iniezione, efficienza della produzione, purezza del PRP ed attivazione del PRP. Sono proprio questi i quattro punti principali presi in considerazione per questa classificazione. A differenza delle altre due, questo sistema tiene conto anche della contaminazione da globuli rossi e dell'efficienza del processo produttivo. I quattro componenti sono così descritti:

- La dose di iniezione viene calcolata moltiplicando la concentrazione piastrinica del PRP con il volume totale ottenuto del PRP. Si riconoscono così 4 gradi: A, "molto alta" con dose superiore a 5 miliardi di piastrine; B, "alta" con dose tra i 3 ed i 5 miliardi; C, "media" con dose tra 1 e 3 miliardi; D, dose bassa con piastrine inferiori al miliardo.
- L'efficienza della produzione: viene calcolata rapportando la percentuale di piastrine recuperate nel PRP dal sangue. Viene così categorizzata: A, con un'efficienza superiore al 90%; B, tra il 70 ed il 90%; C tra il 30% ed il 70%; D inferiore al 30%.
- Purezza del PRP: A se la percentuale di piastrine, comparata con GR e BG è superiore al 90%; B se è tra il 70% ed il 90%; C se è tra il 30% ed il 70%; D se è inferiore al 30%.
- Attivazione: se e quale fattore è stato utilizzato.

Si va così ad ottenere una classificazione basata dall'unione dei punteggi delle quattro voci (Tabella 2).

Dose di piastrine iniettate (miliardi)			Efficienza del processo (% di piastrine recuperate)			Purezza del PRP (% relativa di piastrine)		
A	>5	Molto alta	A	>90	Alta	A	>90	Molto puro
B	3-5	Alta	B	70-90	Media	B	70-90	Puro
C	1-3	Media	C	30-70	Bassa	C	30-70	Eterogeneo
D	<1	Bassa	D	<30	Povera	D	<30	PRP intero

Tabella 2. Sistema di classificazione DEPA. Modificato da (Magalon et al., 2016)

Seguendo questo schema, se per esempio ottengo un derivato AAA attivato vuol dire che ho una concentrazione piastrinica molto alta nella mia dose (>5miliardi di piastrine), il concentrato è fatto per più del 90% di piastrine quindi, bassi globuli bianchi e rossi, ho separato dal sangue più del 90% delle piastrine e formerà un gel perché è attivato.

Questi erano dei sistemi di classificazione proposti in umana che però possono dare spunti utili. Un buon sistema di classificazione dovrebbe tener conto di tutti questi sistemi, valutando il tipo di derivato, la concentrazione di piastrine in esso contenute e la contaminazione da parte di altre cellule, se è attivato o meno (quindi se formerà un gel), la conservazione dello stesso, nonché il grado di integrità piastrinica. Questo per andare a standardizzare le produzioni, riuscire in modo più chiaro a valutare l'efficacia di questi derivati e confermarne l'utilizzo.

1.11 Esempi di utilizzo in umana e veterinaria

I derivati piastrinici sono stati testati ed utilizzati per le loro caratteristiche rigenerative, antiinfiammatorie ed antimicrobiche su numerosi tessuti, specialmente ad uso ortopedico (riparazione tendini di Achille o menischi, ricostruzioni legamentose, patologie muscolari...), ma anche a livello odontostomatologico, oftalmologico, neurologico, come mezzo colturale per la

proliferazione cellulare, sull'apparato riproduttore e sui tessuti molli (Meftahpour et al., 2021).

Tra i vari test effettuati, sicuramente di particolare interesse è l'attività antimicrobica che questi derivati sembrano avere. Farghali et al., 2019 hanno testato l'utilizzo del PRP attivato in cani con infezioni da *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA). In questo studio, l'effetto del PRP attivato è stato testato sia in vitro, valutando la minima concentrazione inibente (MIC), che in vivo valutando la guarigione di ferite cutanee nei cani. In entrambi i casi il concentrato piastrinico ha ottenuto risultati positivi, andando ad inibire la proliferazione batterica ed andando a favorire la rigenerazione tissutale. La composizione esatta del PRP utilizzato nello studio non è nota, in particolare non è conosciuta la presenza o meno di globuli bianchi. Sembrano infatti essere questi i principali responsabili dell'attività antimicrobica nel caso del PRP-attivato (Moojen et al., 2008). Nella realtà dei fatti quindi, quello che probabilmente viene utilizzato è un PRP ricco di leucociti, che viene poi attivato, sostanzialmente un LR-PRP gel. La presenza di leucociti sembra infatti portare ad un blocco della crescita batterica (Moojen et al., 2008), con un massimo tra le 4h e le 8h post applicazione. Non si assiste ad una totale eliminazione batterica, ma il LR-PRP gel utilizzato sembra avere un'azione batteriostatica.

Anche il lisato è stato testato ad azione antimicrobica su *A. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* (Gordon et al., 2021), in uno studio che ha portato a molteplici risultati. Il primo è che il lisato, dopo essere stato prodotto con cicli di congelamento e scongelamento, viene stoccato a -80°C , dimostrando comunque un'azione antimicrobica nel suo successivo utilizzo in seguito al congelamento post-produzione. In secondo luogo, lo studio oltre che a testare la sua efficacia come antimicrobico, va a valutare come differenti variazioni nella concentrazione di lisato possano o meno influenzare la crescita batterica e questo viene fatto esponendo le colture batteriche a concentrazioni di 20%, 40%, 60%, 80% e 100% di lisato piastrinico.

Quello che è stato dimostrato è che la crescita di *S. aureus* non è diversa tra le diverse percentuali e quindi, l'azione antimicrobica non è dipendente dalla concentrazione di lisato. Il tasso di crescita batterico, infatti, non va a mostrare grosse variazioni nelle diverse colture trattate. Lo stesso vale per *E. faecalis*. Contrariamente per *E. Coli* e *P. aeruginosa* l'azione del lisato ha un'azione dipendente dalla concentrazione, a percentuali maggiori di lisato, si va a bloccare maggiormente la crescita batterica, aumentando il lag time, il periodo cioè in cui non si assiste ad alcuna divisione cellulare, prima della fase di crescita esponenziale. Nonostante, quindi, differenze tra le specie batteriche, tutte e quattro hanno mostrato un rallentamento nella crescita, curioso è come per i gram + (*S. aureus*, *E. faecalis*) ci fosse un'azione non concentrazione dipendente, mentre per i gram - (*P. aeruginosa*, *E. coli*) l'azione fosse concentrazione dipendente.

L'analisi dei vari utilizzi in letteratura, in umana e veterinaria mostra come ci sia una totale mancanza di concordanza e di definizione sul tipo di derivato utilizzato. Nella tabella 3 si analizzano alcuni studi, indicando il tipo di derivato utilizzato, il suo uso, se in veterinaria o in umana ed il risultato. Nel momento in cui non ci sarà concordanza tra il derivato dichiarato e quello realmente usato, verrà specificato nella voce "uso reale".

Studio	Derivato riportato	Protocollo di preparazione	Applicazione	Veterinaria-umana	Risultati	Derivato usato
(1)	PRP	Metodo doppia centrifugazione, forza g e tempo non specificati	Ferite cutanee cane	Veterinaria	Effetto antibatterico, favorente riepitelizzazione e formazione tessuto di granulazione	In realtà il PRP utilizzato viene attivato con calcio che porta alla coagulazione del derivato. Quindi in realtà si utilizza un gel piastrinico (PG)

(2)	PL	Metodo doppia centrifugazione. La prima a 535g per 20 min e la seconda a 2275 per 15 min. Un solo ciclo di congelamento-scongelo a -80°C.	Utilizzo per ridurre l'endometrite postcoitale nella cavalla.	Veterinaria	Riduzione significativa dell'accumulo di fluido, di cellule infiammatorie e dell'edema nelle cavalle. Nessuna differenza nel tasso di gravidanza.	-
(3)	PC	Metodo doppia centrifugazione. Prima a 100g per 30min. Seconda a 1500g per 10 min. Il derivato viene poi sottoposto ad un ciclo di congelamento-scongelo.	Terapia infezioni mammarie nella vacca da latte, in associazione ad un antibiotico.	Veterinaria	Sia in associazione con antibiotico che per uso singolo, il concentrato ottenuto ha mostrato buoni risultati nella risoluzione delle infezioni mammarie	PC è troppo generico. Il processo di congelamento e scongelamento porta alla produzione di lisato piastrinico.
(4)	PRP	Metodo con doppia centrifugazione. La prima a 250g min e la seconda a 2000g per 10 min. Viene poi attivato con calcio e centrifugato una volta ottenuto il gel	Riparazione ferite cutanee e sottocutanee cane	Veterinaria	L'azione del PRP sottocutaneo porta ad un aumento della epitelizzazione, favorendo la guarigione per prima intenzione.	In realtà il PRP viene poi attivato con calcio, portando alla formazione di gel piastrinico che viene poi centrifugato. La composizione finale probabilmente è molto più vicina ad un lisato piastrinico, data l'attivazione piastrinica ed il rilascio di fattori di crescita.
(5)	LP	Doppia centrifugazione, la prima a 3800 rpm per 6-8min, la seconda a 3500 per 15min. Singolo ciclo di congelamento-scongelo a -80°C	Terapia ulcere digitali che non guariscono in pazienti diabetici	Umana	Il lisato ha un'azione favorente la riparazione delle ulcere.	-
(6)	PRP	Doppia centrifugazione, la prima a 300g per 5 min, la seconda a 700g per 15 min.	Trattamento di ulcere peptiche sanguinanti	Umana	Il PRP ha mostrato una riduzione nel sanguinamento delle ulcere e favorente la guarigione	L'utilizzo di calcio per attivare il PRP porta alla coagulazione del derivato, formando di fatto un gel piastrinico (PG).

		Attivazione con calcio.				
(7)	PRP	Doppia centrifugazione. La prima a 100g per 30minuti, la seconda a 1500g per 10min. Le siringhe vengono poi congelate a -80°C e scongelate per tre volte.	Terapia endometrite nella bovina	Veterinaria	È stato dimostrato un potenziale utilizzo in vivo.	Il processo di congelamento e scongelamento di fatto porta alla produzione di lisato piastrinico.

Tabella 3. Analisi di alcuni studi fatti sui derivati piastrinici.

Sono numerosi gli studi sulle possibili applicazioni dei derivati piastrinici, ma non c'è una concordanza sui protocolli o sulla terminologia da utilizzare, il che può impattare sull'efficacia degli stessi. È importante cercare una standardizzazione degli studi, aumentare la numerosità dei campioni ed accordare una nomenclatura comune per i derivati, in funzione della loro produzione e del loro contenuto.

I potenziali effetti dei derivati hanno a studi anche sul loro utilizzo in buiatria. Marini et al., 2016 hanno mostrato l'effetto del lisato nell'endometrite. Il primo risultato ottenuto si basa su uno studio in animali in vivo dove si dimostra l'effetto del lisato piastrinico nell'aumento dei numeri di recettori per il progesterone a livello di muscolatura e ghiandole uterine, rispetto al gruppo non trattato. I recettori per il progesterone vengono presi come indicatore della ripresa della funzionalità uterina. In vitro il lisato ha mostrato inoltre due effetti: quello di favorire la proliferazione delle cellule endometriali e di andare a ridurre l'espressione di geni e citochine pro-infiammatorie.

Un altro utilizzo per cui è stato testato il lisato piastrinico è l'ipofunzionalità ovarica (Cremonesi et al., 2020), in alternativa al classico protocollo Ovsynch. Un campione, seppur ridotto, di vacche con ridotta fertilità sono state trattate in vivo con il lisato. La ridotta funzionalità è identificata come la presenza di

follicoli con un diametro tra 8-15mm, per due controlli consecutivi, senza la presenza di corpi lutei, di cisti o senza segni di estro. L'iniezione di lisato piastrinico, in questo studio, ha portato alla formazione di un corpo luteo, con un aumento di progesterone ed una gravidanza negli animali. L'effetto non sembra essere totalmente chiaro, ma è probabilmente legato ai fattori di crescita presenti nel lisato.

Sempre riguardo alla sfera riproduttiva il lisato è stato testato nelle repeat breeder (RBC) (Lange-Consiglio et al., 2015). Vengono definite repeat breeder quegli animali che, in seguito a tre o più inseminazioni, non restano gravide per scarsa fertilità. Quello che è stato fatto in questo studio è stato prelevare degli oociti da altri animali, fecondarli in vitro in un terreno di coltura con 5% di lisato e 5% di siero fetale (FCS) per poi fecondare le RBC pretrattate con lisato per stimolare la proliferazione endometriale. Infine, LP viene utilizzato anche 48h dopo l'inseminazione artificiale nelle bovine fecondate. Il lisato ha mostrato in questo studio un miglior sviluppo delle blastocisti in vitro, un aumento della proliferazione delle cellule endometriali nel corno trattato ed un aumento dei tassi di gravidanza nelle RBC (70%) rispetto al gruppo di controllo (33.33%).

I limiti legati a questi studi sono sempre legati alla numerosità dei campioni selezionati. Successivi studi su grandi coorti di animali sono quindi necessari per confermare questi effetti del lisato piastrinico.

1.12 Selezione dei donatori e controllo trasmissione dei patogeni

La selezione dei donatori è un punto chiave, sia per il rischio di diffusione di patogeni, ma anche perché esiste una variabilità individuale nella concentrazione di piastrine ematiche, così come di tolleranza al prelievo. Come visto precedentemente esiste infatti una correlazione tra la concentrazione di piastrine nel PRP e nel sangue intero (Argüelles et al., 2006).

La selezione dei donatori deve tenere presente di alcuni fattori, come il gruppo sanguigno, la trasmissione di patogeni e la variabilità individuale. Nell'uomo ormai i rischi associati alla trasfusione sono ben conosciuti (Armstrong, 2020), in questa sede si cercheranno di approfondire gli aspetti legati alla medicina veterinaria.

La selezione dei donatori sta iniziando ad ottenere un importante ruolo anche in veterinaria. Per cane, gatto e cavallo esiste una "linea guida relativa all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario" (GU n.25 del 1-2-2016) , che fornisce indicazioni sull'arruolamento dei donatori, sulle caratteristiche dei locali e strumentazione, sui controlli sanitari e sulla conservazione del sangue. Le principali caratteristiche da considerare son riassunte in Tabella 4.

Gli animali devono inoltre avere un carattere docile ed essere regolarmente iscritti all'anagrafe. All'arruolamento degli animali va fatto un esame ematologico e biochimico, nonché un profilo coagulativo ed urinario. Si eseguono poi controlli periodici. Vanno valutati i gruppi sanguigni ed i principali patogeni.

I gruppi sanguigni nel cane sono sei: DEA 1, 3, 4, 5, 6, 7. DEA 1 è il gruppo maggiormente immunogeno, ma i cani non possiedono anticorpi preformati. DEA 1+ può donare solo a DEA 1+, mentre DEA 1- può donare a DEA 1-, solo in casi di emergenza DEA 1- può donare a DEA 1+, ma non deve essere fatto di routine, perché così facendo stimolo lo sviluppo di anticorpi, rendo inefficiente la trasfusione. È importante testare il gruppo, sono ormai disponibili in commercio test rapidi. I principali agenti da ricercare con la sierologia sono: *Leishmania Infantum*, *Ehrlichia Canis*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp*, *Anaplasma Phagocytophili* e *Dirofilaria Immitis*.

	<i>Peso(kg)</i>	<i>Età(anni)</i>	<i>Vaccinazioni</i>	<i>Quantità</i>	<i>Profilassi</i>
<i>Cane</i>	>25	2-8	Cimurro, leptospira, epatite, parvovirosi, rabbia	1,5-2% del volume ematico corporeo al massimo ogni 3 mesi, non superando i 18 ml/kg	Filariosi cardiopolmo nare
<i>Gatto</i>	>5	2-8	Calicivirosi, herpesvirosi, panleucopenia felina, clamidiosi leucemia virale	1,5-2% del volume ematico corporeo al massimo ogni 3 mesi, non superando i 10 ml/kg	
<i>Cavallo</i>	>400	3-10	tetano	1,5-2% del volume ematico corporeo al massimo ogni 3 mesi, non superando i 20 ml/kg	

Tabella 4. Principali caratteristiche per la selezione dei donatori. GU n.25 del 1-2-2016

Nel gatto il sistema sanguigno è simile a quello umano, con gruppi A, B ed AB. Il gatto ha, a differenza del cane, anticorpi preformati. Gatti con gruppo A hanno anticorpi a basso titolo contro il gruppo B, mentre B presenta anticorpi anti-A molto elevati. AB invece non ha anticorpi preformati. È quindi molto importante nel gatto andare a fare un controllo dei gruppi sanguigni, A deve donare ad A, B a B e AB ad AB. Per quanto riguarda le malattie infettive, nel gatto vanno testati: FeLV, FIV, micoplasma haemofelis, Cytauxzoon felis e Babesia spp.

Il cavallo presenta sette diversi gruppi sanguigni: A, C, D, K, P, Q, U. I principali antigeni sono A (a,b,c), Ca, Ka, P (a,b), Q (a,b,c) e Ua. Normalmente nella trasfusione di sangue o plasma del cavallo viene ricercata positività per Aa e Ca, che sono i più comuni ed una negatività agli anticorpi per gli altri gruppi. Cavalli negativi per Aa o Ca solitamente hanno anticorpi naturali contro questi gruppi. Nei cavalli, oltre alla ricerca per Anemia infettiva, Anaplasma spp, Babesia

caballi, T. equi, EHV1-4, West Nile, arterite virale, morbo coitale maligno, morva e Leptospira, è importante andare a fare un esame parassitologico delle feci.

Per quanto riguarda i bovini, quello che si sa è che il rischio di reazione da una singola trasfusione è molto basso (Balcomb & Foster, 2014), nonostante questo se possibile sarebbe opportuno andare a testare precedentemente l'animale. Sono conosciuti 11 gruppi sanguigni: A, B, C, F, J, L, M, S, Z, R' e T' con più di 70 fattori riconosciuti. Il donatore ideale dovrebbe essere un animale adulto, J'-negativo e testato negativamente per patologie virali (leucosi bovina enzootica, BVD), batteriche (anaplasma, Rickettsia ed altri batteri ad elevata prevalenza a seconda della zona). Gli animali dovrebbero essere esenti da endo o ectoparassiti, non essere vaccinati per anaplasma, provenire da allevamenti indenni per la paratubercolosi e la brucellosi (Balcomb & Foster, 2014).

Chiaramente nel caso di trasfusione autologa di elementi ematici, si va a ridurre il rischio di reazioni avverse e di diffusione di patogeni.

Esistono dei fattori legati all'individuo che possono andare ad influire sulla concentrazione piastrinica nel sangue del soggetto.

Uno studio sulla popolazione italiana (Biino et al., 2013) ha infatti mostrato una forte differenza nella concentrazione di piastrine, legata a:

- età: con l'aumentare dell'età, la concentrazione piastrinica può ridursi del 25%-35%. Questo può essere legato ai livelli di trombopoietina, che sembra diminuire con il passare del tempo, oltre che nella riduzione delle cellule staminali totipotenti midollari.
- sesso: le donne hanno un maggior quantitativo di piastrine rispetto agli uomini. Questo sembra però avere significato solo dopo la pubertà, quindi non si notano forti variazioni nei bambini.
- genetica: sembra che la conta piastrinica abbia una componente genetica (almeno per il 54%).

Valutazioni analoghe sono state effettuate anche nel cavallo, dimostrando come caratteristiche intrinseche degli animali legate a sesso, razza ed età influenzano le concentrazioni ematiche di piastrine (Giraldo et al., 2013).

Attenzione anche alla modalità di prelievo del sangue, aghi troppo piccoli possono portare a rottura delle piastrine con liberazione di fattori (Fadadu et al., 2019).

Per quanto riguarda la sterilità del sangue, la farmacopea europea consiglia di testare le tossine e di utilizzare tecnologie per la riduzione dei patogeni.

La tossiemia può essere testata utilizzando il lisato di amebociti di *Limulus* che, tramite sistemi diversi, può identificare e quantificare la concentrazione di endotossine (Oeller et al., 2021).

Esistono delle tecnologie per la riduzione della concentrazione dei patogeni, principalmente basate sull'utilizzo di UV (Levy et al., 2018) o di sistemi solvente/detergente (Burnouf et al., 2016) per inattivare l'involucro lipidico di alcuni virus. Questo ultimo processo (S/D) può portare alla lisi piastrinica (Burnouf et al., 2008), quindi può essere utilizzato per la produzione di lisato piastrinico, ma non per altri derivati.

Per quanto riguarda gli UV, la differenza di lunghezza d'onda utilizzata è relazionata all'energia che si va a dare: a lunghezza d'onda minore, aumenta l'energia e quindi i possibili danni piastrinici. Questi sistemi possono quindi andare a nuocere alle piastrine, modificando i sistemi proteici internamente alle piastrine e creando stress ossidativo (Osman et al., 2016). È quindi importante andare ad agire a livello preventivo sulla selezione dei donatori e sul loro periodico controllo.

2. OBIETTIVO

L'aumento dei fenomeni di antimicrobico resistenza (AMR) è ormai riconosciuto come un problema globale, sia in medicina veterinaria che in medicina umana ed è sicuramente influenzato dalla quantità di antimicrobici impiegata (OIE, 2014), anche nella zootecnia. Per questo, negli ultimi anni, si è giunti alla consapevolezza che è necessario cambiare il nostro approccio all'utilizzo del farmaco antimicrobico veterinario e di migliorare la gestione nelle nostre realtà zootecniche. Il trattamento durante la fase di asciutta è da tempo una delle principali motivazioni di utilizzo di antibiotico nell'allevamento della bovina da latte, considerando anche il fatto che fino all'anno scorso era ancora consentito il trattamento a tappeto di tutta la mandria. Il vantaggio è chiaramente sia terapeutico, in quanto punta a risolvere i problemi di mastiti sviluppate in corso di lattazione, sia profilattico dato che è utile anche nel prevenire le infezioni intramammarie (IMI) durante il periodo dell'asciutta. Durante questo periodo abbiamo infatti due momenti chiave che possono favorire le infezioni batteriche: il primo è l'inizio dell'asciutta, perché abbiamo la pervietà del capezzolo dalla lattazione appena terminata; il secondo è invece il periparto, in cui lo sfintere comincia a riaprirsi per la successiva lattazione ed è una fase in generale delicata per l'animale. L'obiettivo di questo studio riguarda l'utilizzo di un trattamento alternativo alla messa in asciutta: il lisato piastrinico. Adottando un protocollo di trattamento del tutto simile a quello del normale utilizzo di antibiotico (3 trattamenti a distanza di 24h per 3 giorni consecutivi), il progetto ha cercato di dimostrare un effetto curativo e protettivo del lisato nei confronti delle IMI quindi più in generale di una sua efficacia nei confronti delle mastiti legate alla fase di asciutta. In aggiunta a questo, si sono svolte analisi per cercare i fattori che influiscono sulla produzione e resa in lisato, nell'ottica di selezionare i migliori animali per una futura produzione su vasta scala. L'obiettivo è quindi quello di individuare strategie alternative per la gestione della sanità della mammella che portino ad

una riduzione nell'uso di antibiotico nelle stalle, come richiesto dalla normativa europea sul farmaco e dai consumatori.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto con la collaborazione tra la Direzione Agroalimentare della Regione del Veneto, il Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) e l'Associazione Regionale Allevatori del Veneto (ARAV). In totale sono stati coinvolti 15 allevamenti di bovine da latte, così distribuiti nel territorio della Regione Veneto: 7 in Provincia di Vicenza, 1 in Provincia di Padova, 2 in Provincia di Treviso, 2 in Provincia di Belluno, 1 in Provincia di Venezia e 2 in Provincia di Verona. La scelta della numerosità degli allevamenti è legata alla volontà di dimostrare l'efficacia in condizioni di campo del lisato e non solamente in una stalla sperimentale con condizioni ideali. L'adesione al progetto da parte degli allevatori è stata volontaria ed è avvenuta in seguito ad un colloquio tra le parti coinvolte, dove è stato illustrato il progetto, il tipo di impegno richiesto dai diversi partecipanti e gli obiettivi.

La selezione di animali e aziende è avvenuta basandosi principalmente sui dati relativi ai controlli funzionali che vengono effettuati periodicamente nelle aziende. Utilizzando il programma gestionale SiAlleva e in particolar modo il report denominato "Analisi cellule dei gruppi produttivi", si possono infatti ottenere informazioni sull'andamento delle cellule somatiche totali e differenziali della lattazione attuale e di quelle precedente per ogni capo in produzione.

Per quanto riguarda gli allevamenti si sono osservate le cellule somatiche nel latte di massa nei 5 mesi precedenti, cercando di selezionare aziende con storia di rialzi cellulari o mastiti. Questa scelta è legata alla logica di trattamento autologo, che prevede l'uso di lisato sullo stesso animale da cui è stato prelevato il sangue per ottenere il derivato, e quindi la necessità di avere una casistica significativa dal punto di vista statistico per verificare l'efficacia del trattamento. Per ogni allevamento si è poi valutata la situazione sanitaria, con particolare riferimento ai principali contagiosi (*S. aureus*, *S. agalactiae*) e a *S.*

uberis. In aziende con queste positività sono stati identificati e trattati con lisato solo gli animali negativi, quelli positivi sono invece stati esclusi dalla prova. Sono stati inoltre scartati animali con mastiti croniche. Un altro importante punto di valutazione riguardava la motivazione degli allevatori perché il progetto richiedeva da loro un impegno non indifferente per quanto riguarda il monitoraggio degli animali, la raccolta dei campioni ed i differenti trattamenti da eseguire.

Per individuare gli animali più idonei al prelievo di sangue, sono stati adottati i seguenti criteri:

- Primipare e pluripare;
- Bovine con rialzi cellulare nella lattazione in corso o con episodi pregressi di mastite, ma non con casi ripetuti di mastite clinica o positività a contagiosi;
- Negli ultimi mesi di lattazione (oltre i 200 giorni di lattazione), quindi a ridosso dell'asciutta.

Questi criteri sono validi per animali da testare per la produzione di lisato da utilizzare come terapia alla messa in asciutta. In realtà sono stati eseguiti anche dei prelievi in animali ad inizio lattazione, con lo scopo di ottenere LP da utilizzare come trattamento nei casi di mastite clinica. I dati su questi trattamenti non sono riportati in questo lavoro, ma le analisi sulle sacche prelevate da questi animali sono state valutate per la selezione degli animali per la resa in concentrato piastrinico e per la sua conservabilità.

Num	St.	LTZ N° Gg	PRD * UIL. Pen.	Analisi Ultimo CF							Andamento Cellule x 1000 / Linear Score Latt. in corso							
				% Gra	% Pro	% Lat	% Cas	Ure	% DSCC	Cell. Som.	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
95	G	4	16,5	4,03	3,84	4,61	3,12	12,10	83,30	757	61	44	57	10000	202	3756	630	
		298								5,92	2,29	1,82	2,19	9,64	4,01	8,23	5,66	
109	G	3	43,4	3,46	3,09	4,87	2,48	18,00	77,50	125	135	587	201	10000	533	412	124	
		251	53,9							3,32	3,43	5,55	4,01	9,64	5,41	5,04	3,31	

Figura 8. Esempio di selezione di due animali per la produzione in lisato a partire dai tabulati dei controlli funzionali ARAV. Sono animali al 298° e 251° giorno di lattazione, con storia di rialzi di cellule somatiche o mastite (cerchiati) in uno degli ultimi 8 controlli funzionali eseguiti nella seguente lattazione.

3.1 Produzione delle sacche

La metodologia di preparazione del lisato piastrinico si è svolta nelle seguenti fasi:

1. Prelievo della sacca di sangue: la strumentazione utilizzata era composta da pinza (o spago) per compressione giugulare, betadine, rasoio monolama monouso, alcool, garze, sacche per la raccolta del sangue (massimo 450 ml; con anticoagulante citrato-fosfato- destrosio-adenina 1, CPDA1), bilancia portatile e capezza. Il prelievo è stato effettuato catturando le bovine selezionate in mangiatoia e contenendole ulteriormente con una capezza che aveva la funzione di tenere piegata la testa di lato per permettere il prelievo giugulare. Dopo un'attenta rasatura del pelo e un'accurata disinfezione chirurgica tramite tre passaggi ripetuti con garze sterili imbevute nel betadine, veniva effettuato un prelievo sterile con una sacca apposita di circa 400 mL di sangue. La sacca veniva inoltre miscelata e pesata continuamente durante il prelievo per prevenire la formazione di coaguli di sangue che se presenti in grosse quantità compromettono il successivo procedimento produttivo in laboratorio. Le sacche venivano chiuse ermeticamente tramite un doppio clippaggio, refrigerate a una temperatura di +4°C e trasportate in laboratorio entro il giorno successivo per la lavorazione. La principale problematica durante questa fase è stata il prelievo di sangue da animali particolarmente nervosi ed agitati, con conseguente prolungamento delle tempistiche di prelievo e aumento delle probabilità di coagulazione del sangue o di una sua contaminazione.



Foto 1. Strumentazione in campo per la raccolta del sangue.



Foto 2. Contenimento e prelievo dall'animale.



Foto 3. Sacca di sangue.

2. Processazione della sacca di sangue: la lavorazione di ogni sacca è stata fatta presso il laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, sotto una cappa a flusso laminare in modo da lavorare in ambiente sterile. I tecnici di laboratorio che si sono occupati per diverse settimane della preparazione del lisato piastrinico seguivano sempre la seguente procedura operativa:

- a. disinfezione delle sacche di sangue con Virkon,
- b. raccolta del sangue intero per gravità in provette sterili da 50 mL,
- c. centrifugazione delle provette mediante una centrifuga refrigerata per permettere la separazione del sangue in tre frazioni: globuli rossi

(ultimo strato in fondo), buffy coat (strato intermedio) e PRP o plasma ricco di piastrine (strato più superficiale o surnatante),

- d. raccolta del surnatante mediante pipettatura (operazione che richiede una manualità e precisione ottima) per trasferirlo in provette falcon sterili da 50 mL,
- e. svolgimento di fasi di aspirazione e ri-centrifugazione fino ad ottenere il concentrato piastrinico (CP), che sarà poi diluito a $1,5 \times 10^9$ piastrine/ml con plasma povero di piastrine, in modo da andare a standardizzare il quantitativo di lisato per ogni candeletta,
- f. processazione del CP con 3 cicli di congelamento a -80°C e scongelamento a 37°C (2h) in modo da “rompere” le piastrine e favorire il rilascio dei loro fattori ottenendo così il lisato piastrinico.

Il lisato è stato poi inserito in siringhe di plastica da 5ml con beccuccio per la somministrazione intramammaria e stoccate a -20°C fino al loro utilizzo. A fine produzione, prima della consegna è stata effettuata una prova di sterilità con i criteri di esclusione più stringenti possibili; le siringhe provenienti da sacche risultate positive alla prova microbiologica sono di fatto state scartate dalla prova sperimentale.



Foto 4 e 5. Fasi di produzione in laboratorio del lisato piastrinico.

3. Consegna delle siringhe: tutte le siringhe di lisato, una volta superato il test microbiologico, sono state etichettate con il numero corrispondente all'animale dal quale erano state prelevate e sono state confezionate a triplete in sacchetti di plastica che a loro volta avevano un riferimento con il numero dell'animale e con l'azienda di appartenenza. Questo per evitare il più possibile che ci fossero errori durante il trattamento da parte dell'allevatore preservando così l'integrità della terapia autologa. Il materiale è stato quindi trasportato mantenendolo a temperatura costante di -20°C e poi stoccato nuovamente in un freezer in allevamento fino al suo eventuale utilizzo.

Durante il processo produttivo del lisato è stata eseguita un'analisi citometrica (Sysmex XN mille vet) per quantificare la concentrazione piastrinica nel sangue intero, nel PRP e nel CP, con lo scopo di valutare quali possono essere i fattori che influenzano la resa in concentrato piastrinico.

3.2 Trattamento in asciutta

Il trattamento in asciutta è stato eseguito con un protocollo sovrapponibile a quello della mastite clinica. L'allevatore (in seguito a formazione da parte dei veterinari responsabili del progetto) scongela la candeletta di lisato e a fine mungitura, in seguito al completo svuotamento del quarto e alla disinfezione dell'orifizio del capezzolo, la somministra per via intramammaria cercando di mantenere la migliore igiene possibile (Foto 6). Questo procedimento viene ripetuto per 3 trattamenti a distanza di 24h l'uno dall'altro, quindi 3 giorni in totale.

La selezione dei quarti sui quali effettuare il trattamento è iniziata circa 10 giorni prima della messa in asciutta con la raccolta campioni di latte dal singolo quarto per analizzare le cellule somatiche totali e il microbiologico.

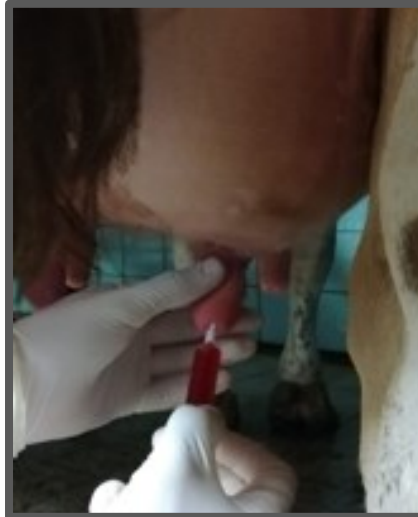


Foto 6. Trattamento di un quarto con lisato piastrinico.

Per lo studio sono stati creati **tre gruppi**:

1. **Gruppo Sigillante (S)**: sono stati trattati con solo sigillante i quarti con <math><200.000</math> cellule somatiche per ml, microbiologico negativo per patogeni primari e nessun rialzo cellulare o casi di mastite durante la lattazione. Nel caso di assenza di quarti con queste caratteristiche si sono comunque utilizzati quarti con positività ad agenti secondari in presenza di SCC molto basse. In totale sono stati trattati in questo gruppo 75 quarti.
2. **Gruppo Lisato Piastrinico (LP)**: quarti con cellule alte o basse di animali con almeno un rialzo cellulare durante la lattazione o casi di mastite, negativi ai principali contagiosi (*S. aureus*, *S. agalactiae*) e a *S. uberis*. Si è data la precedenza a quarti che presentavano $SCC >200.000$ u/ml. In caso di assenza sono stati trattati quarti con cellule somatiche inferiori o con positività a contagiosi ma in condizioni di incidenza a livello aziendale molto bassa. Sono stati trattati in questo gruppo 101 quarti.
3. **Gruppo Antibiotico (A)**: trattamento seguito secondo la prassi aziendale anche in animali con quarti con $SCC < 200.000$. Principale gruppo di controllo. Sono stati trattati in questo gruppo 152 quarti.

Per la verifica dell'effetto protettivo da IMI del lisato in asciutta, sono stati raccolti campioni di latte da singolo quarto a circa 15 e 30 giorni dal parto ed analizzati per cellule somatiche e microbiologico. Sono stati anche registrati i casi di rialzi di cellule somatiche o di mastite nei primi 30 giorni di lattazione.

Le siringhe di lisato non utilizzate in allevamento per il trattamento sono state utilizzate per la valutazione della conservabilità dei fattori piastrinici in esse contenute, comparandole a delle siringhe campione stoccate in laboratorio dopo la produzione. In particolare, si sono valutati: **EGF** (epidermal growth factor), **VEGF** (vascular endothelium growth factor), **PDGF-B** (platelet-derived growth factor) ed **FGF** (fibroblast growth factors) considerati i principali fattori, insieme a citochine e chemochine, responsabili degli effetti biologici del lisato piastrinico. Questi fattori vengono rilasciati dagli α -granuli in seguito al processo di lisi delle piastrine e vengono misurati grazie a dei kit ELISA diretti per quanto riguarda VEGF (RayBio® Bovine VEGF ELISA kit), EGF (MyBioSource EGF ELISA kit) e bFGF (RayBio® Bovine bFGF ELISA kit), o ELISA competitivo per PDGF-B (NordicBioSite Bovine PDGF ELISA kit).

3.3 Analisi statistica

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati:

- Test for two proportions (k-proporzioni) per il confronto tra i trattamenti effettuati in asciutta.
- Linear regression model per l'analisi dei fattori nelle sacche di sangue e la resa piastrinica.

Per identificare i capi ed i quarti da trattare è stato creato un database che riportava per ogni bovina informazioni aziendali, ordine di parto, numero lattazione, giorni di lattazione, stato di gravidanza, giorni di gravidanza e le principali informazioni ricavate dai controlli funzionali (cellule somatiche totali, cellule somatiche differenziali...). Venivano inoltre registrati per ogni animale il numero di sacche di sangue lavorate, le siringhe di lisato prodotte e quelle

utilizzate, il tipo di trattamento eseguito (LP o antibiotico), i parametri ematici delle sacche e di resa del processo produttivo.

4. RISULTATI

4.1 Dati sulla produzione delle sacche

In totale sono state raccolte 251 sacche di sangue. Di queste 26 sono state scartate dalla produzione perché risultate inidonee, 8 per la presenza di coaguli pre-processazione e 18 perché positive all'esame batteriologico.

Dalle sacche restanti, 104 sono state destinate all'utilizzo in asciutta e sono state prodotte un numero di siringhe sufficienti per 132 possibili trattamenti in asciutta (Tabella 5).

AZIENDA	ASCIUTTA	N. POSSIBILI TRATTAMENTI
<i>AZIENDA 1</i>	7	12
<i>AZIENDA 2</i>	6	8
<i>AZIENDA 3</i>	3	4
<i>AZIENDA 4</i>	6	6
<i>AZIENDA 5</i>	9	7
<i>AZIENDA 6</i>	10	11
<i>AZIENDA 7</i>	16	24
<i>AZIENDA 8</i>	9	12
<i>AZIENDA 9</i>	7	9
<i>AZIENDA 10</i>	0	2
<i>AZIENDA 11</i>	8	15
<i>AZIENDA 12</i>	14	18
<i>AZIENDA 13</i>	4	4
<i>AZIENDA 14</i>	2	-
<i>AZIENDA 15</i>	1	-
Totale complessivo	104	132

Tabella 5. Risultati del campionamento.

La resa media per ogni sacca è stata di 6,2 siringhe di lisato piastrinico, con un minimo di 2 siringhe per sacca ed un massimo di 20 siringhe per sacca. Mediamente, quindi, si sono ottenuti due possibili trattamenti in asciutta (6 siringhe) e le siringhe non appartenenti a triplete, quindi non destinabili per

un ciclo completo di trattamento in asciutta, sono state utilizzate per valutare le caratteristiche proprie del lisato e la sua conservabilità.

4.2 Effetto protettivo del lisato

I casi controllo sono stati in totale 227, divisi in 152 casi trattati con antibiotico e 75 casi trattati con sigillante. Per il lisato sono stati trattati secondo protocollo 101 quarti.

Durante la sperimentazione dodici vacche sono state eliminate dallo studio per positività ad agenti contagiosi. Sette animali invece, a trattamento avvenuto, sono stati riformati dagli allevatori per problematiche non legate alla salute della mammella; quindi, non è stato possibile il monitoraggio nel postparto.

Nel grafico 17 è possibile vedere l'andamento medio delle cellule somatiche a T0 (campione preparto), T15 (15 giorni post-parto) e T30 (30 giorni dopo il parto) sui singoli quarti. I trattamenti con antibiotico e lisato hanno mostrato un andamento analogo, andando ad abbassare di 2 punti il linear score (LS) a T30, nonostante l'azione dell'antibiotico porti ad un abbassamento più repentino. L'analisi dei quarti trattati con sigillante mostra mediamente una riduzione nel LS di oltre mezzo punto.

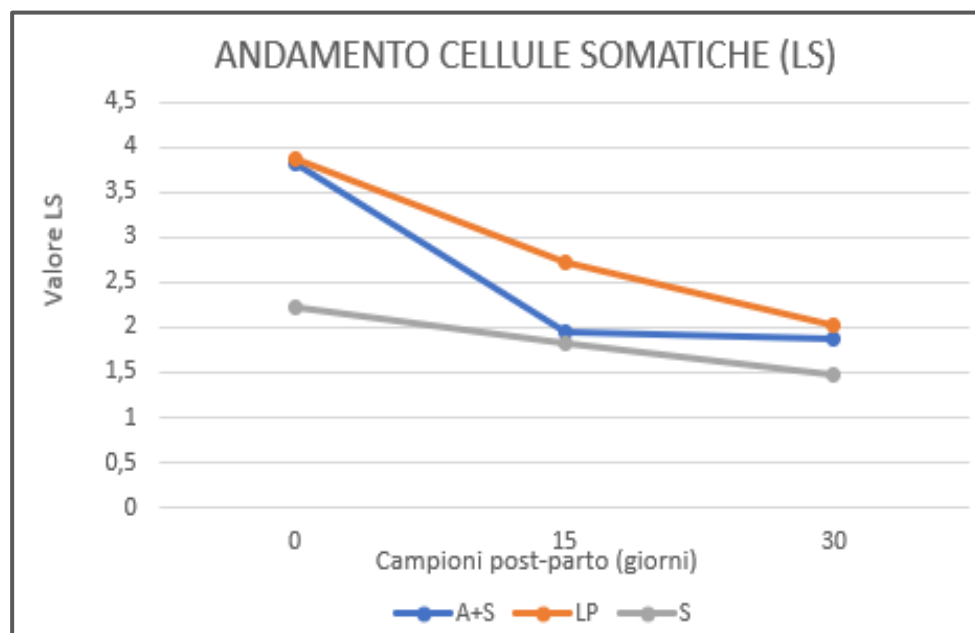


Grafico 17. Rappresentazione dell'andamento delle cellule somatiche, espresse come linear score, per i tre trattamenti analizzati.

La casistica è stata successivamente divisa a seconda del numero di cellule somatiche presenti a T0 e divisa in tre classi. La prima ha raggruppato i quarti con cellule somatiche totali di partenza inferiori a 200.000 u/ml; la seconda animali con cellule comprese tra i 200.000 u/ml ed i 400.000 u/ml; la terza animali con cellule superiori a 400.000 u/ml. Per ogni classe è stato poi comparato l'effetto del lisato piastrinico e quello dell'antibiotico.

Per quanto riguarda la prima classe (<200.000 SCC), il tasso di successo nel post-parto risulta nel complesso equiparabile tra antibiotico e lisato piastrinico. Nella maggior parte dei casi trattati sia per il lisato (82%) che per l'antibiotico (86%), le cellule somatiche totali all'inizio della lattazione successiva rimangono sottosoglia (200.000 u/ml). Nel resto della casistica si osserva un rialzo cellulare rispetto al preparto (>200.000 u/ml) evidenziando in modo aspecifico un aumento dell'infiammazione del tessuto mammario. Questo peggioramento è particolarmente evidente in un numero ridotto di casi sia per LP (6,67%) che per antibiotico (7%) nei quali le SCC superano le 400.000 u/ml (valore soglia considerato legalmente per la commercializzazione del latte di massa aziendale).

	LISATO	ANTIBIOTICO
<i><200.000 cell/ml</i>	82.22%	86.44%
<i>200.000-400.000 cell/ml</i>	11.11%	6.78%
<i>>400.000 cell/ml</i>	6.67%	6.78%

Tabella 6. Andamento delle cellule nel post-parto in quarti con cellule somatiche di partenza <200.000 u/ml in seguito ai trattamenti con lisato ed antibiotico.

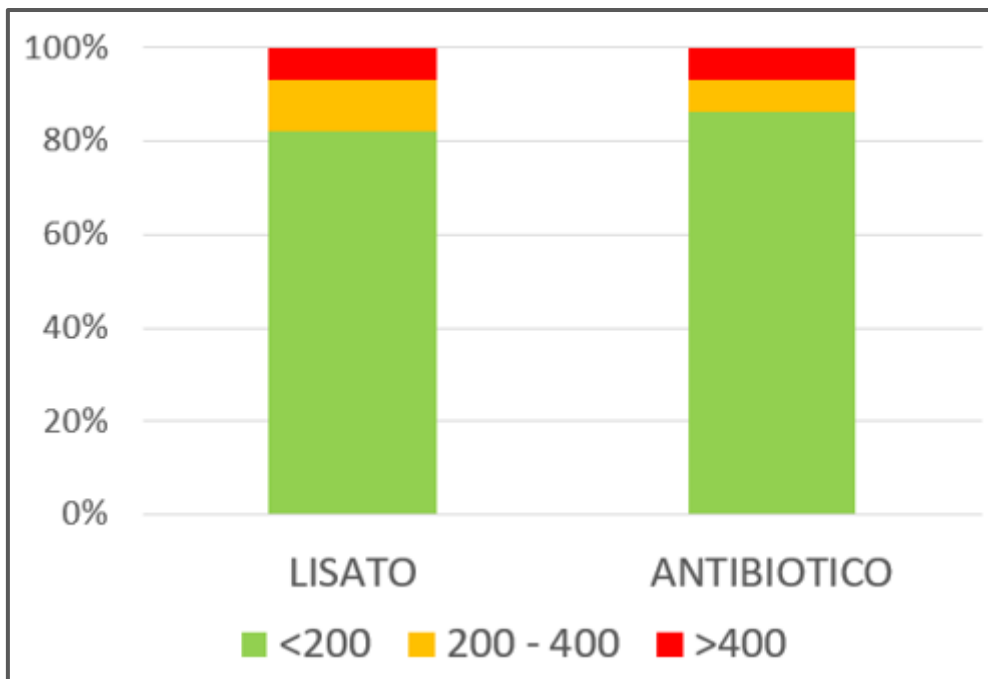


Grafico 18. Rappresentazione grafica dei dati in tabella 6. Nessuna differenza statistica è stata osservata tra il test lisato ed il controllo con antibiotico.

Nella seconda classe (200.000-400.000 cell/ml) le percentuali si discostano leggermente tra loro. Nel complesso sia il lisato (80%) che l'antibiotico (85,71%) mostrano un abbassamento delle cellule somatiche (<200.000 u/ml) alla lattazione successiva nel più dei quarti trattati, anche se con un successo lievemente maggiore nel caso dell'antibiotico. Circa il 7% dei casi, per entrambi i trattamenti, non mostrano variazioni, mantenendosi tra le 200.000 e le 400.000 cell/ml. Nei restanti quarti trattati invece si assiste ad un aumento (>400.000 u/ml) del SCC, sia nel gruppo lisato (13,33%) che nel caso di terapia antibiotica (7.14%).

Nonostante queste differenze, dal punto di vista statistico possiamo affermare che non c'è nessuna differenza tra i due gruppi ($P > 0,05$).

	LISATO	ANTIBIOTICO
<200.000 cell/ml	80%	85.71%
200.000-400.000 cell/ml	6.67%	7.14%
>400.000 cell/ml	13.33%	7.14%

Tabella 7. Andamento delle cellule nel post-parto in quarti con cellule somatiche di partenza 200.000.-400.000 u/ml in seguito ai trattamenti con lisato ed antibiotico.

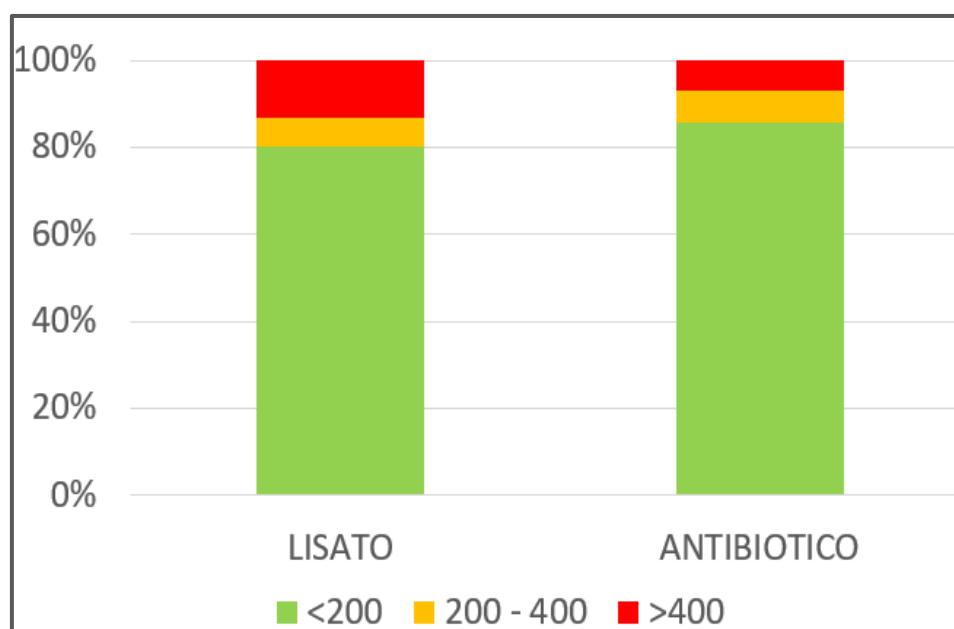


Grafico 19. Rappresentazione grafica dei dati in tabella 7. Nessuna differenza statistica è stata osservata tra il test lisato ed il controllo con antibiotico.

Nella terza classe (>400.000 cell/ml) invece la differenza appare marcata. La percentuale di quarti che raggiungono valori di cellule somatiche sottosoglia (<200.000 cell/ml) nella lattazione successiva è decisamente maggiore per l'antibiotico (95,22%) rispetto al lisato (57,69%). Un modesto miglioramento (200.000-400.000 cell/ml) rispetto al preparato si osserva con l'uso di LP (15,38%); mentre nei restanti casi non si osservano differenze nella conta delle cellule somatiche nella lattazione successiva, con percentuali decisamente superiori nel caso del lisato piastrinico (26,92%) rispetto all'antibiotico (5%).

Il valore maggiore delle cellule somatiche post parto non è correlato a positività microbiologiche (CNS, Corynebacterium).

	<i>LISATO</i>	<i>ANTIBIOTICO</i>
<200.000 cell/ml	57.69%	95.00%
200.000-400.000 cell/ml	15.38%	0.00%
>400.000 cell/ml	26.92%	5.00%

Tabella 8. Andamento delle cellule nel post-parto in quarti con cellule somatiche di partenza >400.000 u/ml in seguito ai trattamenti con lisato ed antibiotico.

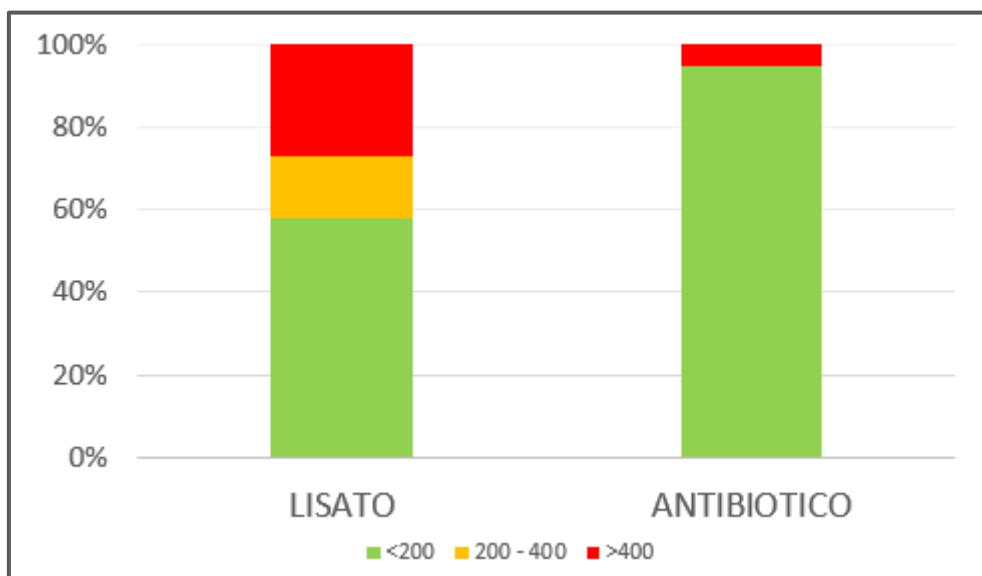


Grafico 20. Rappresentazione grafica dei dati in tabella 8. In questo caso si nota una marcata differenza tra il trattamento con lisato e quello con antibiotico.

4.3 Selezione degli animali per la resa in concentrato piastrinico

Il parametro di maggior interesse per la valutazione del processo produttivo e per la selezione degli animali donatori è la **resa**. Questa viene ottenuta andando a calcolare il quoziente tra il volume di concentrato piastrinico (PC) ed il volume

di sangue espresso il mL prelevato all'animale. La ricerca di caratteristiche tipiche della bovina da latte che possano influenzare questo parametro ha portato ad evidenziare che la resa piastrinica è correlata alla concentrazione di piastrine nel sangue totale e ai giorni in lattazione.

La concentrazione piastrinica media nel sangue intero rilevata dalle analisi è stata di 350.000 u/ μ l, con un minimo di 110.000 u/ μ l fino ad un massimo di 682.000 u/ μ l.

In particolare, la concentrazione di piastrine nel sangue intero è correlata positivamente alla resa piastrinica (fig. 9). All'aumento quindi nel numero di piastrine nel sangue intero, ho una maggiore una resa piastrinica.

Contrariamente i giorni in lattazione sono correlati negativamente con la resa (fig. 10). Quindi più avanti sarà l'animale con la lattazione, minore sarà la resa del suo sangue.

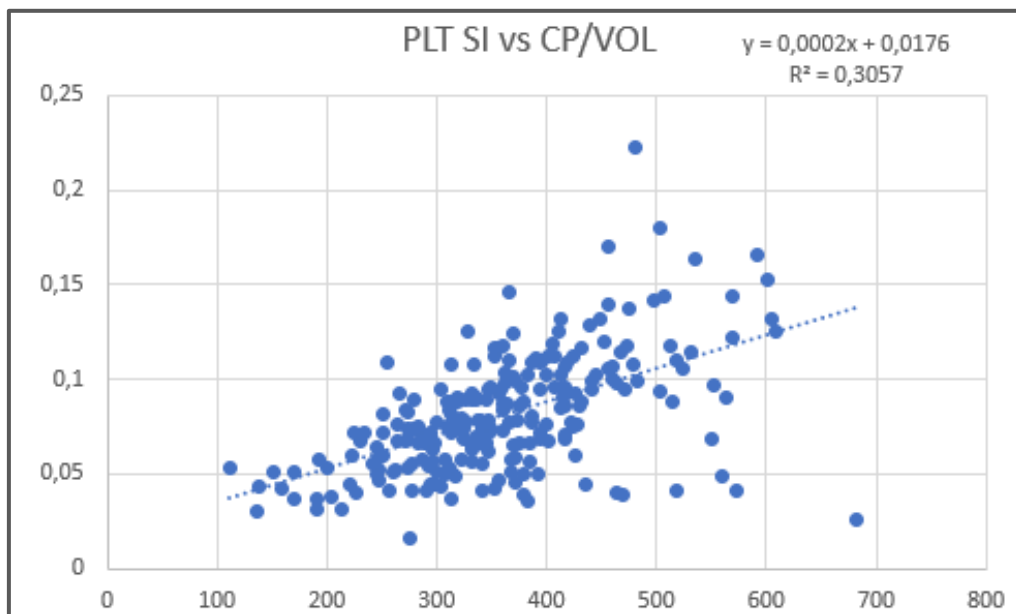


Figura 9. Correlazione positiva tra la concentrazione di piastrine nel sangue intero e la resa in concentrato piastrinico.

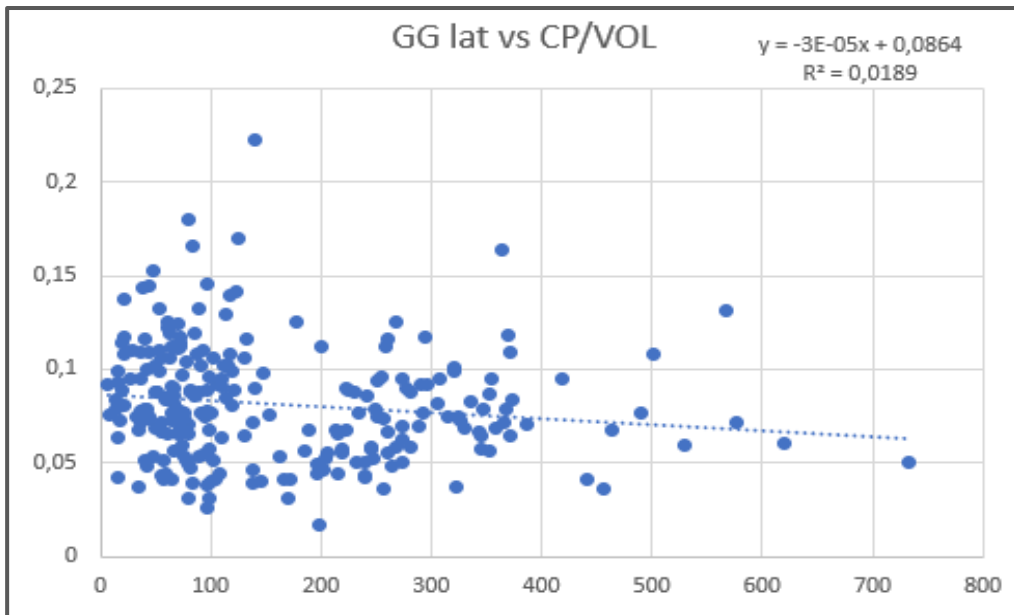


Figura 10. Correlazione negativa tra la concentrazione di piastrine nel sangue intero e la resa in concentrato piastrinico

I giorni in lattazione, inoltre, sono correlati negativamente anche con la concentrazione di piastrine nel sangue intero (fig. 11). Quindi con il progredire della lattazione, la concentrazione ematica di piastrine si riduce. La quantità di lisato piastrinico ottenuto in animali avanti con la lattazione risulta quindi minore rispetto a quelli ad inizio lattazione.

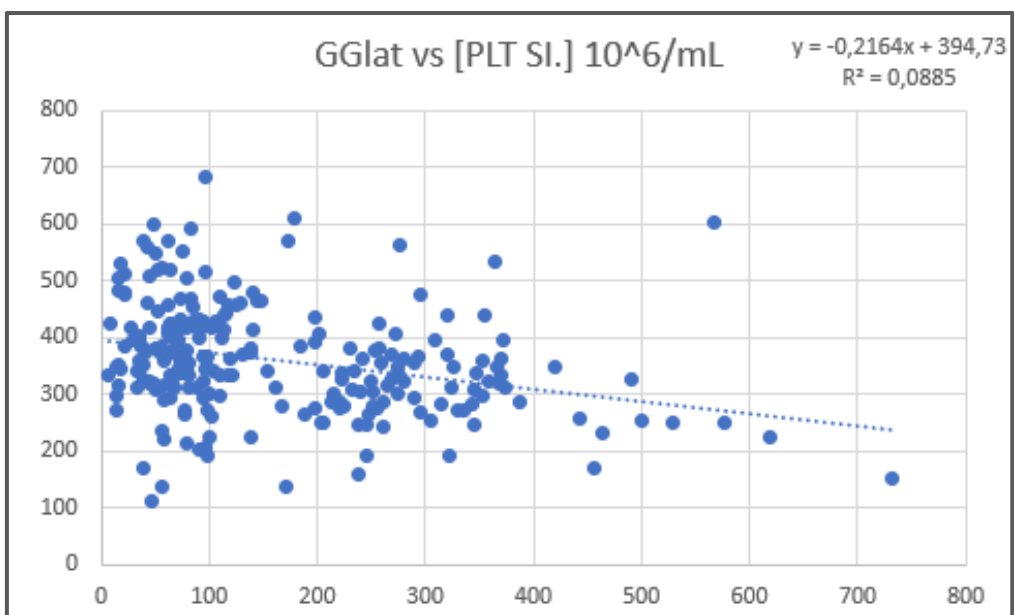


Figura 11. Correlazione negativa tra i giorni in lattazione dell'animale e la concentrazione di piastrine nel sangue intero.

Altri parametri analizzati, che non hanno però mostrato correlazione con la resa in lisato sono stati: il numero di parto, la produzione di latte, lo stadio riproduttivo dell'animale per quanto riguarda i parametri zootecnici; i globuli rossi e bianchi nel sangue intero come parametri ematici.

4.4 Conservabilità dei fattori di crescita

Per la valutazione della conservabilità, le concentrazioni dei principali fattori di crescita (bFGF, VEGF, PDGF-B, EGF) sono state classificate secondo tre categorie, divise in base al tempo e alla temperatura di stoccaggio:

- A tempo 0: in candelette subito dopo la produzione stoccate a -80°C in laboratorio.
- Candelette raccolte dagli allevamenti stoccate a -20°C entro i 79 giorni dalla consegna;
- Candelette raccolte dagli allevamenti stoccate a -20°C dopo gli 80 giorni dalla consegna.

Il risultato sulle concentrazioni dei fattori sono riportati nelle Tabelle 9, 10, 11 e 12.

	bFGF (pg/ml)		
	Media	Min	Max
T0 -80°C	20.3	4.43	64.21
<80 GIORNI -20°C	19	6.98	69.81
≥80 GIORNI -20 °C	56.2	4.1	233.79

Tabella 9. Concentrazioni di bFGF al variare di tempo e temperatura.

VEGF (pg/ml)

	Media	Min	Max
T0 -80°C	1.05	0.1	8.2
<80 GIORNI -20°C	0.39	0.1	1.4
≥80 GIORNI -20 °C	4.57	0.1	26

Tabella 10. Concentrazioni di VEGF al variare di tempo e temperatura.

PDGFB (ng/ml)

	Media	Min	Max
T0 -80°C	1.43	0.855	2.5
<80 GIORNI -20°C	0.94	0.67	1.68
≥80 GIORNI -20 °C	1.32	0.9	3.22

Tabella 11. Concentrazioni di PDGF-B al variare di tempo e temperatura.

EGF (pg/ml)

	Media	Min	Max
T0 -80°C	356	305.4	479
<80 GIORNI -20°C	364.6	332.6	509.9
≥80 GIORNI -20 °C	428	329	1000

Tabella 12. Concentrazioni di EGF al variare di tempo e temperatura.

L'analisi dei principali fattori nelle sacche mostra una certa variabilità nelle concentrazioni sia per quanto riguarda i tempi di conservazione, sia per le temperature di stoccaggio. In generale, si osservano ampi range tra i minimi ed

i massimi nei fattori analizzati ma con medie che, salvo nel caso di outlier (es valore Max in Tabella 9, >80gg a -20°C) sono tendenzialmente comparabili tra loro. Non sembrano esserci, ai dati attuali, differenze riguardanti lo stoccaggio nel tempo tra le condizioni di campo (-20°C) e quelle ideali di laboratorio (-80°C), indicando che i fattori piastrinici non si degradano maggiormente se stoccati a -20°C, rispetto a -80°C.

5. DISCUSSIONE

Dal 28 gennaio 2022 è entrato in pieno regime il nuovo Regolamento Europeo sul farmaco veterinario (Reg UE 2019/6) che, vietando l'uso profilattico di antimicrobici, ha portato di fatto all'obbligo per tutte le aziende di bovine da latte di adottare la pratica dell'asciutta selettiva. Questa prevede la suddivisione della mandria in due gruppi, a seconda del rischio di sviluppare infezioni intramammarie in asciutta. Il primo gruppo sarà formato da bovine a rischio, cioè quelle con storia di mastiti cliniche (in particolare da contagiosi o *S. uberis*) in lattazione o aumenti importanti delle cellule somatiche alla messa in asciutta e verrà trattato con antibiotico; mentre il secondo, di animali a rischio ridotto, verrà asciugato senza. La restrizione nell'utilizzo di antimicrobico sta portando alla ricerca di nuove e valide alternative da adottare alla messa asciutta. Queste si devono cercare nella gestione attenta degli animali, nelle corrette pratiche di mungitura e nell'analisi dei dati ottenuti dai gestionali aziendali e dai controlli funzionali, ma anche nell'utilizzo ragionato di prodotti già presenti in commercio, come i sigillanti intramammari o nello sperimentare nuove alternative, come i derivati piastrinici. Negli ultimi anni la ricerca su questi emoderivati ha portato all'evidenza di un'azione antimicrobica (Gordon et al., 2021) e rigenerativa (Lykov et al., 2021) in varie applicazioni, sia in medicina umana che in medicina veterinaria. Seguendo i risultati promettenti di questi preparati, l'Università di Milano (Lange-Consiglio et al., 2014) ha intrapreso una sperimentazione applicata alla medicina veterinaria delle vacche da latte, andando ad utilizzarlo in uno dei punti più critici negli allevamenti per consumo di antibiotico: la salute della mammella (Ferroni et al., 2020). Lo studio di (Lange-Consiglio et al., 2014) si è basato sulla terapia per le mastiti cliniche ed ha mostrato come il lisato piastrinico abbia un effetto statisticamente associabile all'utilizzo di antibiotico addizionato al lisato per la terapia delle mastiti acute. È stato inoltre dimostrato come il lisato sembra avere un effetto migliore del solo antibiotico per le mastiti croniche, questo

probabilmente legato ai numerosi fattori modulatori dell'infiammazione e rigenerativi contenuti nel derivato che, regolando la risposta infiammatoria e riparativa, favoriscono l'eliminazione di agenti patogeni e favoriscono la ricostruzione tissutale.

Visto l'effetto positivo ottenuto sulle mastiti cliniche e croniche, l'Università di Padova (Dipartimento MAPS), in collaborazione con IZSve e ARAV, ha svolto una sperimentazione inedita per valutare l'azione protettiva del lisato, provando ad applicarlo alla messa in asciutta. I risultati ottenuti hanno dimostrato come il lisato porti alla riduzione di 2 punti di linear score (LS) a T30, con un andamento però più lento rispetto all'antibiotico, che già a T15 porta ad una significativa riduzione del LS. Questo è probabilmente legato alle modalità di azione dei due diversi prodotti. L'antibiotico va ad agire direttamente sul patogeno, eliminandolo o bloccandone la crescita, in modo da favorire l'eliminazione da parte di macrofagi e neutrofili. Il lisato invece non va ad agire direttamente sugli agenti patogeni, ma va a modulare la risposta infiammatoria, favorendo la chemiotassi leucocitaria ed il rilascio di fattori che portano all'eliminazione dei batteri (Blair & Flaumenhaft, 2009). In ogni caso, il lisato a T15 porta ad una riduzione di quasi 1,5 punti di LS e quindi la maggior parte della sua azione viene comunque espressa in questo periodo.

È interessante notare come nel caso della classe <200.000 SCC a T0, sia nel trattamento con antibiotico che con lisato piastrinico la percentuale di rialzo cellulare si aggira tra il 13% (A) ed il 18% (LP), senza differenza dal punto di vista statistico. Questo può essere spiegato dal fatto che la sanità della mammella e l'incidenza di mastiti non sono da associare solo al prodotto o al protocollo utilizzato per l'asciutta, ma sono multifattoriali e dipendono anche dalla gestione (soprattutto del periodo di transizione), dall'igiene dell'ambiente di stabulazione, dalla stagionalità, dalla genetica e dallo stato immunitario dell'animale (Kabera et al., 2021).

Nel caso del gruppo intermedio, 200.000-400.000 SCC, l'antibiotico è risultato più efficace, con un 85% di animali con cellule inferiori a 200.000 u/ml rispetto all'80% del lisato. Anche in questo caso non vi è alcuna differenza statisticamente significativa tra i due casi studio e questo rende i due trattamenti equiparabili in questa categoria. Questo gruppo rappresenta sicuramente la prospettiva più interessante per l'impiego del lisato. Le attuali Linee guida sull'asciutta (SIVAR, 2019), consigliano infatti il trattamento con antibiotico all'asciutta per gli animali con SCC >200.000 se pluripare e >150.000 se primipare. La possibilità di utilizzo di lisato piastrinico in questi animali, entro le 400.000 SCC, permetterebbe di limitare ulteriormente l'utilizzo di antibiotico e quindi l'AMR.

L'ultimo gruppo (>400.000) è stato quello in cui il lisato ha mostrato il minor effetto in comparazione all'antibiotico, che è risultato maggiormente efficace. La percentuale di animali con un miglioramento nel numero di cellule somatiche in seguito alla terapia con lisato raggiunge il 73%, di cui più della metà (circa il 58%) con SCC <200.000. Il lisato quindi su molti animali ha comunque avuto un effetto positivo, andando a ridurre di molto il numero di cellule. Un approfondimento su animali con cellule di partenza >400.000 potrebbe portare al comprendere quali sono i fattori che influenzano l'azione del lisato. Sarebbe interessante anche andare a valutare un protocollo diverso a seconda del numero di cellule. Una quantità di lisato maggiore magari avrebbe portato, in animali con cellule somatiche ≥ 400.000 , ad un effetto statisticamente simile alla percentuale di successo dell'antibiotico.

Un'indicazione aggiuntiva che può avere il lisato, visti i risultati ottenuti, è la terapia di prima scelta in animali con importanti rialzi cellulari senza positività a contagiosi, in attesa di un esame batteriologico e di un antibiogramma o come alternativa all'antibiotico nel caso di trattamenti ripetuti risultati inefficaci. Vista la difficoltà di trattamento dei casi di mastite cronica, potrebbe essere curioso valutare l'azione del lisato da solo, o in associazione all'antimicrobico,

su questa categoria di animali, visti gli effetti rigenerativi del LP e i risultati positivi ottenuti da (Lange-Consiglio et al., 2014).

Un'altra possibile applicazione è negli allevamenti biologici che non fanno uso di antibiotico, viste le buone percentuali di successo, anche nel caso di rialzi cellulari >400.000 u/ml.

Un altro risultato importante è stato confermare l'azione protettiva del sigillante intramammario, che mediamente ha abbassato di oltre mezzo punto il linear score delle bovine trattate. Questo è in linea con quanto mostrato da altri studi effettuati sull'utilizzo del sigillante alla messa in asciutta (Kabera et al., 2021). L'utilizzo di questo prodotto prevede però una gestione ed una selezione accurata degli animali. Ha sicuramente un effetto protettivo in animali con SCC <200.000, riducendo la probabilità di IMI e di mastite nella lattazione successiva (Kabera et al., 2021), ma è importante che i quarti degli animali da asciugare vengano svuotati bene e disinfettati accuratamente. La selezione dei quarti da trattare con solo sigillante va fatta il più precisamente possibile, basandosi su controlli funzionali, record di mastiti, eventuali batteriologici od on farm culture. Il rischio è di bloccare agenti batterici internamente la mammella e di ottenere l'effetto opposto, favorente lo sviluppo di infezioni mammarie.

I risultati sulla resa in PC per la produzione di lisato evidenziano come il periodo ideale per selezionare gli animali per la produzione di derivato sia nell'immediato postparto, quando la concentrazione piastrinica ematica è maggiore e quindi maggiore risulta essere di conseguenza la resa. Il numero di piastrine nel sangue intero è infatti correlato positivamente con la resa e negativamente con i giorni di lattazione. Attualmente questo dato ci indica il momento migliore per il prelievo in animali che verranno trattati alla successiva asciutta, data l'ottica dell'uso autologo del lisato. La riduzione nella concentrazione piastrinica ematica con l'aumentare dei giorni di lattazione

porta ad una riduzione della resa nel processo produttivo, spiegando la correlazione negativa tra i giorni di lattazione e la resa in lisato.

Anche (Lange-Consiglio et al., 2021) mostrano una correlazione positiva tra la concentrazione ematica di piastrine e la quantità di PRP prodotto. Questa correlazione è abbastanza prevedibile: un aumento della densità di piastrine nel sangue porta ad una più facile raccolta con la centrifugazione, con un aumento di quelle che sono le piastrine nel CP e quindi una migliore resa. (Lange-Consiglio et al., 2021) concordano inoltre sul fatto che gli animali nella prima fase di lattazione sono candidati ideali per diventare donatori, vista la maggiore resa di PRP. Un aumento delle piastrine in questa fase può essere legato al grande stress che porta all'animale il parto e di conseguenza l'inizio della lattazione, visto che coincide con un cambiamento più o meno drastico della razione e con un cambiamento di gruppo con una gerarchia diversa.

(Tsiamadis et al., 2022) evidenziano come dall'immediato post parto al picco di lattazione ci sia un progressivo aumento nella concentrazione piastrinica ematica e quindi una resa ancor più significativa in questo periodo. Lo scopo primario del nostro studio non era valutare i parametri ematici durante la lattazione negli animali, quindi ulteriori test si rendono necessari.

(Lange-Consiglio et al., 2021) riscontrano inoltre correlazione positiva tra la resa ed il sito di prelievo, migliore dalla vena mammaria rispetto alla giugulare e la stagionalità, in estate la resa è più elevata.

Nel nostro studio non è stata rilevata correlazione con lo stadio di gravidanza, mentre per (Lange-Consiglio et al., 2021) la resa è maggiore in bovine vuote rispetto a quelle gravide.

Per quanto riguarda la conservabilità dei fattori, la variabilità esistente nei risultati dimostra che, dai campioni da noi analizzati, non ci sia differenza sulla temperatura o sul tempo di stoccaggio del derivato. Questo è importante perché evidenzia come non sia necessario consumare subito il lisato in quanto possiede una certa durata nel tempo anche in condizioni di campo (-20°C), non

rendendo quindi necessario l'acquisto di strumentazione che permetta uno stoccaggio a -80°C. Questi dati vanno sicuramente integrati con futuri studi, in quanto derivano da analisi effettuate su campioni in surplus non utilizzati per il progetto ed è importante quindi incrementare la quantità di casistica disponibile per vedere se questa tendenza si conferma o meno.

Uno dei principali limiti di questo progetto è stato sicuramente l'impegno autologo del lisato piastrinico che ha portato alla necessità di produrre un gran numero di candelette e alla ricerca accurata degli animali a seconda della probabilità di potenziali rialzi cellulari post gravidanza. Il nuovo regolamento comunitario (Reg UE 2019/06 relativo ai medicinali veterinari), probabilmente aprirà alla possibilità di testare per via allogenica (somministrazione su un animale diverso ma della stessa specie) il lisato piastrinico, aumentando di molto la casistica e permettendo anche di modificare i processi produttivi, andando a produrre lisato da pool di sangue in modo da aumentare la resa, ridurre i costi di produzione ed il numero di animali da prelevare. Nella produzione di lisato da pool di sangue però va considerata la condizione sanitaria dell'azienda per contagiosi, effettuando dei test periodici di screening o eventuali trattamenti di disattivazione dei patogeni dal sangue.

Un altro limite è legato al processo produttivo, che richiede professionalità, manualità, notevole impegno (in termini di tempo rispetto alla produzione effettiva) ed è caratterizzato da una limitata capacità di processazione giornaliera di sacche. È necessario cercare una standardizzazione basata sull'automatizzazione del processo, permettendo così di incrementare la resa e di ridurre i costi.

Per quanto riguarda il protocollo utilizzato per i trattamenti, si è riscontrata in alcuni casi qualche difficoltà da parte dell'allevatore. Lo schema previsto, con somministrazione a distanza di 24h per 3 giorni di fila, è stato adottato per mancanza di precedenti esperienze in questo specifico campo di applicazione,

ma può rappresentare un forte limite rispetto all'antibiotico (1 sola somministrazione in asciutta), soprattutto in aziende che effettuano una transizione brusca dalla lattazione all'asciutta. Inoltre, viene moltiplicata l'eventualità (soprattutto con un'igiene non ottimale) di trascinare dei batteri esterni entrando con la siringa per più volte. Per questo bisogna cercare di migliorare il protocollo, aumentando per esempio la concentrazione di fattori nel lisato o aumentando la quantità di derivato somministrato alla bovina, in modo da permettere una singola somministrazione. Inoltre, attualmente l'impiego della candeletta viene fatta in base al risultato di un'analisi sui singoli quarti, non facilmente fattibile ed economicamente sostenibile su tutti gli animali da asciugare. Per questo bisognerebbe integrare al protocollo la valutazione delle bovine da trattare in base ai controlli funzionali, molto più facili e veloci da analizzare.

I controlli funzionali sono un ottimo strumento per la valutazione degli animali nelle aziende in cui si decide di utilizzare il lisato. Permettono di selezionare gli animali con maggiore resa (nell'ottica di un uso allogenico) o di organizzare i prelievi di sangue (nel caso di uso autologo) valutando annualmente la necessità ipotetica di siringhe di lisato piastrinico. La strategia di asciutta selettiva ed i criteri utilizzati sono sicuramente fondamentali da questo punto di vista ed è compito del veterinario formare l'allevatore e fornirgli consulenza in materia.

Il lisato si è rivelato ad ora un ottimo strumento per l'asciutta selettiva degli animali che permette di ridurre l'utilizzo di antimicrobico. Va sempre valutata però la situazione aziendale, soprattutto la gestione dell'asciutta e degli ambienti. Il suo utilizzo pratico si inserisce sicuramente molto bene in contesti in cui ci sia attenzione all'igiene nella mungitura, alla corretta asciugatura dei quarti e alla loro pulizia, ad un ambiente di stabulazione pulito e con bassi livelli di umidità che favoriscono patogeni ambientali ed assenza o bassa prevalenza di contagiosi. L'ipotesi di questo studio è che il lisato potenzi e migliori la

risposta immunitaria dell'organismo e la successiva rigenerazione tissutale, ma che non possieda effetti di tipo battericida o batteriostatici su un'eventuale infezione locale. In condizioni di contagiosi o alti livelli di incidenza di mastiti cliniche da contagiosi, probabilmente non è lo strumento più adatto, se usato in maniera singola, per andare a trattare l'animale. Va sempre applicata in contemporanea una corretta gestione sanitaria degli animali.

Un'applicazione futura del lisato può essere anche sulla terapia rigenerativa dei quarti successivamente alla comparsa di mastite, per ridurre i processi infiammatori e stimolare la rigenerazione tissutale riducendo la fibrosi e quindi la perdita di tessuto mammario funzionale.

6. CONCLUSIONI

Il lisato piastrinico si è rivelato un trattamento efficace per il trattamento degli animali alla messa in asciutta, dimostrando una percentuale di successo totalmente sovrapponibile a quella dell'antibiotico sia nella classe di animali con <200.000 cell/ml all'asciutta, sia in quella in animali con cellule somatiche tra le 200.000 e le 400.000. In particolare, in questa seconda classe il lisato può essere un'ottima alternativa all'impiego di antimicrobico, consigliata dalle linee guida nazionali in bovine pluripare con SCC >200.000 all'asciutta.

Per quanto riguarda la classe con SCC >400.000 u/ml il lisato si è dimostrato meno efficace della terapia antibiotica, ma con una percentuale di successo del 73% nella riduzione delle cellule somatiche nel postparto rispetto alla messa in asciutta. Anche in questo caso quindi l'utilizzo del lisato potrebbe portare ad una buona percentuale di successo come prima terapia in quarti con rialzi cellulari non associati ad una positività da contagiosi o da *S. uberis*, o in animali refrattari ai trattamenti antibiotici.

Nel complesso il lisato ha portato ad una diminuzione del linear score (SC) di 2 punti, lo stesso risultato che si ottiene con l'utilizzo di antibiotico. Quest'ultimo però porta ad una riduzione più repentina nel numero di cellule somatiche.

L'utilizzo dei sigillanti intramammari in animali selezionati accuratamente (<200.000 u/ml, in buone condizioni igieniche) ha confermato il suo effetto protettivo sul quarto alla messa in asciutta.

Lo studio ha inoltre cercato quali possono essere i fattori che vanno ad influire sulla resa in concentrato piastrinico e quindi in lisato. È stata dimostrata una correlazione positiva tra la concentrazione piastrinica nel sangue intero e la resa in lisato, mentre quest'ultima è correlata negativamente con i giorni di lattazione. Contrariamente la concentrazione piastrinica nel sangue intero è positivamente correlata ai giorni in lattazione. Quindi, nell'ottica di selezione

degli animali per la produzione di lisato, porteranno ad una resa migliore gli animali nell'immediato postparto, rispetto ad animali a fine lattazione.

Le valutazioni sulla conservabilità dei fattori di crescita ed il loro stoccaggio non hanno invece portato ad evidenziare differenze tra lo stoccaggio nel tempo in condizioni di laboratorio (-80°C) o di campo (-20°C). Il lisato, quindi, non sembra essere un prodotto che serve consumare subito dopo la produzione, ma ha una certa durata nel tempo ed è conservabile anche nei normali freezer. Per confermare questi risultati sono però necessari ulteriori studi.

7. BIBLIOGRAFIA

Gremmel T, Frelinger AL 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016 Apr;42(3):191-204. doi: 10.1055/s-0035-1564835. Epub 2016 Feb 29. PMID: 26926581.

SJAASTAD O.V. *Fisiologia Degli Animali Domestici*. Luogo di pubblicazione: s.l. Editore: CEA. Pagine: 816. Data pubblicazione: Gennaio 2018. Quarta edizione

Statland BE, Heagan BM, White JG. Uptake of calcium by platelet relaxing factor. *Nature* 1969;223(5205):521-522

Maynard, D.M., Heijnen, H.F., Horne, M.K., White, J.G., & Gahl, W.A. (2007). Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 5 9, 1945-55 .

Flaumenhaft R. Platelet secretion. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013: 343-366

Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* 2016 Jan; 76:371-87. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26561934.

A. Michelson. *Platelets (Third Edition)*, 2013. Editore: Academic Press. Pagine 1400.

Blair, Price, and Robert Flaumenhaft. "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." *Blood reviews* vol. 23,4 (2009): 177-89. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: *Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components*, 20th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2020; Chapter 5; pp. 223-245

Hatakeyama I, Marukawa E, Takahashi Y, Omura K. Effects of platelet-poor plasma, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin on healing of extraction sockets with buccal dehiscence in dogs. *Tissue Eng Part A.* 2014 Feb;20(3-4):874-82. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0058. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24098948; PMCID: PMC3926147.

Miroshnychenko O, Chalkley RJ, Leib RD, Everts PA, Dragoo JL. Proteomic analysis of platelet-rich and platelet-poor plasma. *Regen Ther.* 2020 Nov 1; 15:226-235. doi: 10.1016/j.reth.2020.09.004. PMID: 33426223; PMCID: PMC7770407.

Woo SH, Kim JP, Park JJ, Chung PS, Lee SH, Jeong HS. Autologous platelet-poor plasma gel for injection laryngoplasty. *Yonsei Med J.* 2013 Nov;54(6):1516-23. doi: 10.3349/ymj.2013.54.6.1516. PMID: 24142660; PMCID: PMC3809861

Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 Oct-Dec;7(4):189-97. doi: 10.4103/0974-2077.150734. PMID: 25722595; PMCID: PMC4338460.

Dijkstra-Tiekstra MJ, Kuipers W, Setroikromo AC, de Wildt-Eggen J. Overnight or fresh buffy coat-derived platelet concentrates prepared with various platelet pooling systems. *Transfusion.* 2008 Apr;48(4):723-30. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01611.x. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18208415.

Gulliksson H. Platelets from platelet-rich-plasma versus buffy-coat-derived platelets: what is the difference? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(2):76-7. doi: 10.5581/1516-8484.20120024. PMID: 23049394; PMCID: PMC3459400.

Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* 1997;72(3):133-43. doi: 10.1046/j.1423-0410.1997.7230133.x. PMID: 9145483.

Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 1984 Apr;27(4):459-61. doi: 10.1002/art.1780270415. PMID: 6712760.

Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology.* 2004 Jun;111(6):1115-20. doi: 10.1016/j.ophtha.2003.10.019. PMID: 15177961

Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:6591717. doi: 10.1155/2016/6591717. Epub 2016 Sep 8. PMID: 27672658; PMCID: PMC5031826.

Dohan, D., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 101 3, e45-50.

Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Trandafilovic M, Stojanovic P. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med (Wars).* 2021 Mar 22;16(1):446-454. doi: 10.1515/med-2021-0259. PMID: 33778163; PMCID: PMC7985567.

Toffler, Michael & Toscano, N. & Holtzclaw, Dan & Corso, Marco & Ehrenfest, D.M. (2009). Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. 1. 21-32.

Oeller, Michaela & Laner-Plamberger, Sandra & Krisch, Linda & Rohde, Eva & Strunk, Dirk & Schallmoser, Katharina. (2021). Human Platelet Lysate for Good Manufacturing Practice-Compliant Cell Production. *International Journal of Molecular Sciences*. 22. 5178. 10.3390/ijms22105178.

Ian B. Copland, Marco A. Garcia, Edmund K. Waller, John D. Roback, Jacques Galipeau, The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy, *Biomaterials*, Volume 34, Issue 32, 2013, Pages 7840-7850, ISSN 0142-9612, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.050>.

Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A*. 2019 Oct;107(10):2257-2271. doi: 10.1002/jbm.a.36734. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31148358.

Strunk, Dirk & Lozano, Miquel & Marks, Denese & Loh, Y. & Gstraunthaler, Gerhard & Schennach, Harald & Rohde, Eva & Laner-Plamberger, Sandra & Oeller, Michaela & Nystedt, Johanna & Lotfi, R. & Rojewski, M. & Schrezenmeier, Hubert & Bieback, Karen & Schäfer, Richard & Bakchoul, Tamam & Waidmann, M. & Jonsdottir-Buch, Sandra & Montazeri, H. & Schallmoser, Katharina. (2017). International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation. *Vox Sanguinis*. 113. 10.1111/vox.12594.

Schallmoser, Katharina & Henschler, Reinhard & Gabriel, Christian & Koh, Mickey & Burnouf, Thierry. (2020). Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate - A position statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion -. *Trends in Biotechnology*. 38. 13-23. 10.1016/j.tibtech.2019.06.002.

Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chierigato K, Lievore C, Madeo D, Rodeghiero F, Astori G. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013 Aug;15(8):920-9. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.01.219. Epub 2013 Apr 24. PMID: 23623274.

Izadifar, Zahra & Babyn, Paul & Chapman, Dean. (2018). Ultrasound Cavitation/Microbubble Detection and Medical Applications. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 39. 10.1007/s40846-018-0391-0.

Burnouf, Thierry & Tseng, Yu & Kuo, Yapo & Su, Chen-Yao. (2008). Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the growth factor release. *Transfusion*. 48. 1090-8. 10.1111/j.1537-2995.2008.01691. x.

Altaie A, Owston H, Jones E. Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? *World J Stem Cells*. 2016 Feb 26;8(2):47-55. doi: 10.4252/wjsc.v8.i2.47. PMID: 26981170; PMCID: PMC4766250.

Hemeda H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2013 Sep;15(9):1174-81. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.006. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23845186.

Soares CS, Babo PS, Reis RL, Carvalho PP, Gomes ME. Platelet-Derived Products in Veterinary Medicine: A New Trend or an Effective Therapy? *Trends Biotechnol*. 2021 Mar;39(3):225-243. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.07.011. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32868100.

Kaux, Jean-François & Le Goff, Caroline & Renouf, J & Peters, P & Lutteri, Laurence & Gothot, André & Crielaard, J.-M. (2010). Comparison of the platelet concentrations obtained in platelet-rich plasma (PRP) between the GPS (TM) II and GPS (TM) III systems. *Pathologie-biologie*. 59. 275-7. 10.1016/j.patbio.2010.11.002.

Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, Takaku T, Komatsu N, Kaneko K. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci*. 2016 Sep;21(5):683-9. doi: 10.1016/j.jos.2016.07.009. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27503185.

Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat*. 2013 Oct;195(5):461-6. doi: 10.1016/j.aanat.2013.04.004. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23722041.

Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med*. 2012 Jun;40(6):1274-81. doi: 10.1177/0363546512442334. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22495144.

Carr BJ, Canapp SO Jr, Mason DR, Cox C, Hess T. Canine Platelet-Rich Plasma Systems: A Prospective Analysis. *Front Vet Sci*. 2016 Jan 5; 2:73. doi: 10.3389/fvets.2015.00073. PMID: 26779493; PMCID: PMC4700921.

Miron RJ, Chai J, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Zhang Y. Evaluation of 24 protocols for the production of platelet-rich fibrin. *BMC Oral Health*. 2020 Nov 7;20(1):310. doi: 10.1186/s12903-020-01299-w. PMID: 33160335; PMCID: PMC7648315.

Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, Bach E, Prades M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci*. 2006 Oct;81(2):237-45. doi: 10.1016/j.rvsc.2005.12.008. PMID: 16969921.

Fijnheer, R., Pietersz, R., de Korte, D., Gouwerok, C., Dekker, W., Reesink, H. and Roos, D. (1990), Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*, 30: 634-638. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1990.30790385523>.

Aizawa H, Kawabata H, Sato A, Masuki H, Watanabe T, Tsujino T, Isobe K, Nakamura M, Nakata K, Kawase T. A Comparative Study of The Effects of Anticoagulants on Pure Platelet-Rich Plasma Quality and Potency. *Biomedicines*. 2020 Feb 25;8(3):42. doi: 10.3390/biomedicines8030042. PMID: 32106422; PMCID: PMC7148468.

Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev*. 2003 Jul;17(3):209-15. doi: 10.1016/s0887-7963(03)00020-8. PMID: 12881781.

Thibault L, Beauséjour A, de Grandmont MJ, Lemieux R, Leblanc JF. Characterization of blood components prepared from whole-blood donations after a 24-hour hold with the platelet-rich plasma method. *Transfusion*. 2006 Aug;46(8):1292-9. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00894.x. PMID: 16934062.

Pietersz RN, de Korte D, Reesink HW, Dekker WJ, van den Ende A, Loos JA. Storage of whole blood for up to 24 hours at ambient temperature prior to component preparation. *Vox Sang*. 1989;56(3):145-50. doi: 10.1111/j.1423-0410.1989.tb02017.x. PMID: 2499118.

Dumont LJ, AuBuchon JP, Whitley P, Herschel LH, Johnson A, McNeil D, Sawyer S, Roger JC. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*. 2002 Jul;42(7):847-54. doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00147.x. PMID: 12375656.

Dessels C, Durandt C, Pepper MS. Comparison of human platelet lysate alternatives using expired and freshly isolated platelet concentrates for adipose-derived stromal cell expansion. *Platelets*. 2019;30(3):356-367. doi: 10.1080/09537104.2018.1445840. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29553865.

Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, Berglund D. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion*. 2017 Apr;57(4):1058-1065. doi: 10.1111/trf.13998. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28182293.

Zhang JG, Carter CJ, Culibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, Weiss S, Gyongyossy-Issa MI. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion*. 2008 May;48(5):847-56. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01645.x. Epub 2008 Feb 21. PMID: 18298601.

Dekkers, David & Cuyper, Iris & Van der Meer, Pieter & Verhoeven, Arthur & Korte, Dirk. (2007). Influence of pH on stored human platelets. *Transfusion*. 47. 1889-95. 10.1111/j.1537-2995.2007.01412.

Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev.* 2003 Jul;17(3):209-15. doi: 10.1016/s0887-7963(03)00020-8. PMID: 12881781.

Zhang JG, Carter CJ, Culibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, Weiss S, Gyongyossy-Issa MI. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion.* 2008 May;48(5):847-56. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01645.x. Epub 2008 Feb 21. PMID: 18298601.

Turner, V.S., Mitchell, S.G., Kang, S.K., & Hawker, R.J. (1995). A Comparative Study of Platelets Stored in Polyvinyl Chloride Containers Plasticised with Butyryl Trihexyl Citrate or Triethylhexyl Trimellitate. *Vox Sanguinis*, 69.

DeMello V, Chen G, Wakshlag J, Mason D. Evaluation of Platelet and Leukocyte Counts in Canine Platelet-Rich Plasma Obtained After Successive Blood Collections From the Same Patient and the Effects of Freezing on the Concentration of Growth Factors Present in It. *Front Vet Sci.* 2022 Apr 5; 9:838481. doi: 10.3389/fvets.2022.838481. PMID: 35464390; PMCID: PMC9020877.

McClain AK, McCarrel TM. The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months. *BMC Vet Res.* 2019 Aug 14;15(1):292. doi: 10.1186/s12917-019-2040-4. PMID: 31412868; PMCID: PMC6694589.

Hosnuter M, Aslan C, Isik D, Caliskan G, Arslan B, Durgun M. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at -20 °C without any preservation agent. *J Plast Surg Hand Surg.* 2017 Aug;51(4):235-239. doi: 10.1080/2000656X.2016.1237956. Epub 2016 Oct 7. PMID: 27712135.

Shiga Y, Kubota G, Orita S, Inage K, Kamoda H, Yamashita M, Iseki T, Ito M, Yamauchi K, Eguchi Y, Sainoh T, Sato J, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Inoue M, Kinoshita H, Furuya T, Koda M, Aoki Y, Toyone T, Takahashi K, Ohtori S. Freeze-Dried Human Platelet-Rich Plasma Retains Activation and Growth Factor Expression after an Eight-Week Preservation Period. *Asian Spine J.* 2017 Jun;11(3):329-336. doi: 10.4184/asj.2017.11.3.329. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28670400; PMCID: PMC5481587.

Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, Kusumoto K. Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. *Regen Ther.* 2018 Nov 20; 10:1-9. doi: 10.1016/j.reth.2018.10.003. PMID: 30525065; PMCID: PMC6260428.

DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012 Jul;28(7):998-1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148. PMID: 22738751.

Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, Rasmusson L, Everts PA. 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.* 2012 Jun;13(7):1131-7. doi: 10.2174/138920112800624328. PMID: 21740379.

Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraudo L, Veran J, Sabatier F. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016 Feb 4;2(1): e000060. doi: 10.1136/bmjsem-2015-000060. PMID: 27900152; PMCID: PMC5117023.

Meftahpour, Vafa & Malekghasemi, Somaiyeh & Baghbanzadeh, Amir & Aghebati-Maleki, Ali & Pourakbari, Ramin & Fotouhi, Ali & Aghebati-Maleki, Leili. (2021). Platelet lysate: A promising candidate in regenerative medicine. *Regenerative medicine.* 16. 10.2217/rme-2020-0065.

Farghali HA, AbdElKader NA, AbuBakr HO, Aljuaydi SH, Khattab MS, Elhelw R, Elhariri M. Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. *Sci Rep.* 2019 Sep 3;9(1):12722. doi: 10.1038/s41598-019-48657-5. PMID: 31481694; PMCID: PMC6722138.

Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdeest EP, van Zundert A, Knape JT, Castelein RM, Creemers LB, Dhert WJ. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008 Mar;26(3):404-10. doi: 10.1002/jor.20519. PMID: 17960651.

Gordon J, Álvarez-Narváez S, Peroni JF. Antimicrobial Effects of Equine Platelet Lysate. *Front Vet Sci.* 2021 Aug 19; 8:703414. doi: 10.3389/fvets.2021.703414. PMID: 34490395; PMCID: PMC8416987.

Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P, Fantinato E, Urbani G, Gelati G, Cremonesi F, Lange-Consiglio A. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016 Sep 13;14(1):58. doi: 10.1186/s12958-016-0195-4. PMID: 27619959; PMCID: PMC5020481.

Cremonesi F, Bonfanti S, Idda A, Lange-Consiglio A. Platelet Rich Plasma for Regenerative Medicine Treatment of Bovine Ovarian Hypofunction. *Front Vet Sci.* 2020 Aug 13; 7:517. doi: 10.3389/fvets.2020.00517. PMID: 32903508; PMCID: PMC7438405.

Lange-Consiglio, Anna & Cazzaniga, Nadia & Garlappi, Rosangela & Spelta, Chiara & Pollera, Claudia & Perrini, Claudia & Cremonesi, Fausto. (2015). Platelet concentrate in bovine reproduction: Effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 13. 65. 10.1186/s12958-015-0064-6.

Colombo I, Mislei B, Mari G, Iacono E, Merlo B. Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Theriogenology*. 2022 Feb; 179:204-210. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.12.001. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34894489.

Lange-Consiglio A, Spelta C, Garlappi R, Luini M, Cremonesi F. Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: first clinical application. *J Dairy Sci*. 2014 Oct;97(10):6223-30. doi: 10.3168/jds.2014-7999. Epub 2014 Aug 6. PMID: 25108856.

Farghali HA, AbdElKader NA, Khattab MS, AbuBakr HO. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs. *Biosci Rep*. 2017 Apr 10;37(2):BSR20160503. doi: 10.1042/BSR20160503. PMID: 28246352; PMCID: PMC5469334.

Lykov, Alexander & Surovtseva, M. & Bondarenko, N. & Kim, Irina & Smagin, M. & Poveschenko, Olga. (2021). Platelet Lysate and Non-Healing Ulcers. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 11. 12267-12274. 10.33263/BRIAC114.1226712274.

Seleem WM, Hanafy AS. The Additive Effect of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Actively Bleeding Peptic Ulcer. *Clin Endosc*. 2021 Nov;54(6):864-871. doi: 10.5946/ce.2021.004. Epub 2021 May 25. PMID: 34030430; PMCID: PMC8652155.

Armstrong, B. and (2020), Transfusion risks and haemovigilance. *VOXS*, 15: 277-291. <https://doi.org/10.1111/voxs.12601>

GU n.25 del 1-2-2016

Balcomb C, Foster D. Update on the use of blood and blood products in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2014 Jul;30(2):455-74, vii. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.04.001. Epub 2014 May 28. PMID: 24980732.

Levy JH, Neal MD, Herman JH. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Crit Care*. 2018 Oct 27;22(1):271. doi: 10.1186/s13054-018-2212-9. PMID: 30367640; PMCID: PMC6204059.

Osman A, Hitzler WE, Provost P. Peculiarities of studying the effects of pathogen reduction technologies on platelets. *Proteomics Clin Appl*. 2016 Aug;10(8):805-15. doi: 10.1002/prca.201500124. Epub 2016 May 17. PMID: 27095411.

Biino G, Santimone I, Minelli C, Sorice R, Frongia B, Traglia M, Ulivi S, Di Castelnuovo A, Gögele M, Nutile T, Francavilla M, Sala C, Pirastu N, Cerletti C, Iacoviello L, Gasparini P, Toniolo D, Ciullo M, Pramstaller P, Pirastu M, de Gaetano G, Balduini CL. Age- and sex-related variations in platelet count in Italy: a proposal of reference ranges based on 40987 subjects' data. *PLoS One*. 2013;8(1):e54289. doi: 10.1371/journal.pone.0054289. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23382888; PMCID: PMC3561305.

Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, Davis TT. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. *Reg Anesth Pain Med*. 2019 Apr 16: rapm-2018-100356. doi: 10.1136/rapm-2018-100356. Epub ahead of print. PMID: 30992411.

Giraldo CE, López C, Álvarez ME, Samudio IJ, Prades M, Carmona JU. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res*. 2013 Feb 12; 9:29. doi: 10.1186/1746-6148-9-29. PMID: 23402541; PMCID: PMC3577464.

Ferroni L, Lovito C, Scoccia E, Dalmonte G, Sargenti M, Pezzotti G, Maresca C, Forte C, Magistrali CF. Antibiotic Consumption on Dairy and Beef Cattle Farms of Central Italy Based on Paper Registers. *Antibiotics (Basel)*. 2020 May 25;9(5):273. doi: 10.3390/antibiotics9050273. PMID: 32466135; PMCID: PMC7277698.

Kabera F, Roy JP, Afifi M, Godden S, Stryhn H, Sanchez J, Dufour S. Comparing Blanket vs. Selective Dry Cow Treatment Approaches for Elimination and Prevention of Intramammary Infections During the Dry Period: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Vet Sci*. 2021 Jun 15; 8:688450. doi: 10.3389/fvets.2021.688450. PMID: 34212023; PMCID: PMC8240810.

Lange-Consiglio A, Garlappi R, Spelta C, Idda A, Comazzi S, Rizzi R, Cremonesi F. Physiological Parameters to Identify Suitable Blood Donor Cows for Preparation of Platelet Rich Plasma. *Animals (Basel)*. 2021 Aug 4;11(8):2296. doi: 10.3390/ani11082296. PMID: 34438754; PMCID: PMC8388386.

Tsiamadis, Vangelis & Kougioumtzis, Alexandros & Siachos, Nektarios & Panousis, Nikolaos & Kritsepi-Konstantinou, Maria & Valergakis, Georgios. (2022). Hematology reference intervals during the prepartum period, first week after calving, and peak lactation in clinically healthy Holstein cows. *Veterinary Clinical Pathology*. 51. 10.1111/vcp.13069.

Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG. Topical application of autologous blood products during surgical closure following a coronary artery bypass graft. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Aug;34(2):360-4. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.04.026. Epub 2008 Jun 26. PMID: 18585051.

8. SITOGRAFIA

[Blood products \(who.int\)](#)

[Blood & Blood Products | FDA](#)