



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA
ROMAGNA
“BRUNO UBERTINI”
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)**

Sede Legale: Via Bianchi, 9
25124 Brescia
Tel 03022901 – Fax 0302425251 –
Email info@izsler.it

C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

RELAZIONE FINALE PROGETTO DI RICERCA CORRENTE PRC 2017010

TITOLO

**VALUTAZIONE DELL'UTILIZZO DEL LISATO PIASTRINICO (LP) IN
MEDICINA RIGENERATIVA VETERINARIA**

Responsabile scientifico del progetto: fino al 29.11.2018 Guerino Lombardi

in sostituzione Silvia Dotti

Telefono 030/2290248

E-mail: silvia.dotti@izsler.it

Ente di appartenenza dell'Unità Operativa Coordinatrice:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Data di inizio del progetto: 15/12/2017

Data di fine del progetto: 14/05/2021

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

Parole chiave: Lisato piastrinico, medicina rigenerativa, fattori di crescita

Data di stampa della relazione: 06 maggio 2021

Elenco dei collaboratori:

Nominativo	UO	Ruolo
Silvia Dotti Responsabile Scientifico	1	Responsabile scientifico del progetto
Annalisa Ghizzardi	1	Tecnico di laboratorio IZSLER, Attività di laboratorio legate alla preparazione del lisato piastrinico
Mara Fusi	1	Borsista assegnata al Progetto di Ricerca Attività di laboratorio legate alla preparazione del lisato piastrinico, test ELISA, test di proliferazione, analisi e interpretazione dei risultati

Sommario

1	Sintesi	4
2	Summary	4
3	Introduzione	5
4	Materiali e Metodi	7
4.1	<i>Cronoprogramma Progetto</i>	7
4.2	<i>Motivazioni</i>	7
4.3	<i>Metodologia</i>	8
5	Risultati	11
6	Discussione e Conclusioni	15
7	Bibliografia	16
8	Modalità di divulgazione dei risultati	17
9	Allegati	18

1 Sintesi

VALUTAZIONE DELL'UTILIZZO DEL LISATO PIASTRINICO (LP) IN MEDICINA RIGENERATIVA VETERINARIA

Il presente progetto aveva lo scopo principale di realizzare un protocollo per la preparazione del lisato piastrinico (LP) nella specie equina e lo studio delle sue caratteristiche con diverse metodiche di conservazione, in particolare il congelamento a -20°C e la liofilizzazione.

Nello specifico gli obiettivi erano i seguenti:

- 1 Messa a punto di un protocollo di preparazione del LP nella specie equina
- 2 Messa a punto dei parametri per la liofilizzazione del LP
- 3 Valutazione della concentrazione dei fattori di crescita tramite metodica ELISA e l'esecuzione del test di proliferazione cellulare nel LP congelato e liofilizzato
- 4 Potenziale impiego del lisato piastrinico nell'ambito della medicina rigenerativa

Lo sviluppo della metodica di preparazione del lisato piastrinico (LP) ha previsto l'impiego di sangue di origine equina al fine di allestire a partire da Plasma Ricco Piastrinico (PRP), previo congelamento *overnight*, di un Lisato Piastrinico (LP) idoneo a subire il successivo processo di liofilizzazione o congelamento a -20°C . A seguito dei due processi di conservazione, i preparati sono stati valutati per la verifica della quantificazione dei fattori di crescita: PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF-A, EGF e bFGF, mediante metodica immunoenzimatica (ELISA) e di proliferazione cellulare. Questi risultati hanno evidenziato come il LP congelato a -20°C abbia proprietà rigenerative superiori rispetto a quello liofilizzato, tuttavia il LP liofilizzato conserva un'alta concentrazione di fattori di crescita ed è in grado di supportare la crescita cellulare in vitro. Da ultimo è utile evidenziare che il LP congelato rappresenta, dal punto di vista clinico, un prodotto più efficiente rispetto alla preparazione liofilizzata; tali risultati preliminari, dovranno essere confermati dalle prove cliniche effettuate sul campo.

2 Summary

EVALUATION OF THE USE OF PLATELET LYSATE (LP) IN VETERINARY REGENERATIVE MEDICINE

The main goal of the present project was the development of a protocol for the preparation of platelet lysate (LP) derived by equine species and the study of its characteristics with different conservation methods, in particular freezing at -20°C and lyophilisation.

In particular, the objectives were the following:

- 1 Development of a protocol for the preparation of the LP derived by equine species
- 2 Set up of the parameters for the freeze-drying of the LP
- 3 Evaluation of the concentration of growth factors by ELISA method and the execution of the cell proliferation test in the frozen and lyophilized LP
- 4 Potential use of platelet lysate in the field of regenerative medicine

The development of the method for the preparation of platelet lysate (LP) involved the use of blood of equine origin in order to prepare, starting from Rich Platelet Plasma (PRP), after overnight freezing, a Platelet Lysate (LP) suitable for undergoing the subsequent freeze-drying or freezing process at -20°C . Following the two conservation processes, the preparations were evaluated for the verification of the quantification of the growth factors: PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF-A, EGF and bFGF, by immunoenzymatic method (ELISA) and cell proliferation assay. These results showed that LP frozen at -20°C has superior regenerative properties compared to freeze-dried LP, however freeze-dried LP retains a high concentration of growth factors and it is able to support in vitro cell growth. Finally, it is useful to point out that frozen LP represents, from the clinical point of view, a more efficient product than the lyophilized preparation; these preliminary results should be confirmed by clinical trials carried out during clinical trial.

3 Introduzione

L'utilizzo dei fattori di crescita di origine piastrinica ai fini di rendere più rapida la rigenerazione e la riparazione di tessuti danneggiati è ampiamente diffusa e descritta in letteratura (1). Le piastrine sono in grado di secernere e rilasciare fattori di crescita e mediatori chimici che regolano i meccanismi cellulari della ricostituzione tissutale. A tale proposito, la medicina rigenerativa ha individuato un possibile impiego del PRP (*Platelet Rich Plasma* o plasma ricco di piastrine) e LP (Lisato Piastrinico). In ambito veterinario, il PRP viene considerato nel settore ippiatrico sia ai fini di favorire una rapida ripresa dell'attività agonistica, per applicazioni che riguardano lesioni teno-legamentose ed articolari, ma anche per favorire la guarigione tissutale a livello oftalmico e cutaneo. Studi *in vivo* hanno dimostrato che il PRP stimola la migrazione dei cheratociti attraverso processi calcio dipendenti e attiva la cascata anti-infiammatoria con proprietà antimicrobiche (2). Il PRP può essere impiegato tal quale per terapie autologhe, oppure utilizzato come terapia di tipo allogenico sotto forma di LP. Infatti, sottoponendo il PRP a diversi cicli di centrifugazione e ad un congelamento *overnight*, si ottiene la lisi delle piastrine con la conseguente liberazione dei fattori di crescita ed eliminazione di una fonte antigenica verso la quale potrebbe innescarsi una reazione avversa. L'azione combinata dei fattori di crescita porta alla stimolazione e proliferazione di fibroblasti, cellule endoteliali, condrociti, miociti, osteociti, cheratociti, alla sintesi di matrice extracellulare insieme alla chemiotassi di macrofagi e monociti. In particolare, si riconosce l'attività del PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) con azione mitogena e angiogenica; del TGF (*Transforming Growth Factor*) con azione chemiotattica, di stimolazione dei fibroblasti e degli osteoblasti ed inibente sugli osteoclasti; dell'IGF I/II (*Insulin Like Growth Factor*) con azione prevalente sugli osteoblasti; dell'EGF che stimola le cellule epiteliali e mesenchimali. Infine, il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e il FGF (*Fibroblast Growth Factor*) con proprietà angiogeniche e di stimolazione delle cellule endoteliali (2). Il trattamento delle lesioni tissutali mediante questi preparati permette una più rapida ed efficiente riparazione dei tessuti, con una *restitutio ad integrum* migliore rispetto all'esito cicatriziale che si verifica durante il processo riparativo fisiologico.

Sia le procedure utilizzate per la preparazione che le caratteristiche intrinseche del sangue del paziente da cui deriva il campione, determinano una notevole variabilità dei prodotti PRP e LP, dovuta sia alla quantità variabile di piastrine che alla concentrazione di fattori di crescita presenti (3). A questo riguardo, in medicina umana è stato dedicato un notevole impegno nella ricerca per l'ottimizzazione di protocolli riproducibili; al contrario, per le preparazioni derivanti da pazienti animali, sono stati effettuati relativamente meno studi rivolti alla caratterizzazione del prodotto. Inoltre, la mancanza della standardizzazione delle procedure di preparazione e dei controlli qualitativi rende difficile ottenere dati conclusivi, poiché l'utilizzo del PRP riguarda molteplici tipologie di applicazioni,

effettuate su specie differenti e i risultati conseguiti sono spesso discordanti (4). Anche la metodologia di conservazione è un fattore da considerare nella variabilità dei prodotti e nell'efficacia dell'applicazione clinica. Infatti, il LP viene generalmente congelato a -20°C o a -80°C , tuttavia, dato che la pratica clinica richiede una maggiore facilità di trasporto e conservazione, il processo di liofilizzazione potrebbe essere un'alternativa conveniente, in quanto permette lo stoccaggio a temperature di refrigerazione (5). La standardizzazione delle procedure di allestimento, la valutazione delle caratteristiche intrinseche delle differenti preparazioni e dell'efficacia nella specie equina di PRP, LP congelato e LP liofilizzato, sembra essere la migliore strategia per identificare il prodotto che permetta un migliore utilizzo in ambito clinico e un'efficace rigenerazione tissutale.

Nello specifico, tale progetto si prefigge di indagare i seguenti punti:

- 1 Messa a punto di un protocollo di preparazione del LP nella specie equina
- 2 Messa a punto dei parametri per la liofilizzazione del LP
- 3 Valutazione della concentrazione dei fattori di crescita tramite metodica ELISA e l'esecuzione del test di proliferazione cellulare nel LP congelato e liofilizzato
- 4 Potenziale impiego del lisato piastrinico nell'ambito della medicina rigenerativa.

4 Materiali e Metodi

4.1 Cronoprogramma Progetto

La parte sperimentale del progetto, che comprende la preparazione del lisato piastrinico e l'esecuzione dei test ELISA e dei test di proliferazione, è stata svolta presso il Laboratorio di Controllo di Prodotti Biologici, Farmaceutici e Convalida di Processi Produttivi, l'analisi statistica dei dati è stata condotta presso il Reparto di Sorveglianza Epidemiologica.

Fasi del progetto	Mesi				
	0	4	6	18	24
Fase I					
Ricerca bibliografica e valutazione dei protocolli e dei metodi	■	■			
Preparazione dei campioni di LP	■	■			
Liofilizzazione LP	■	■			
Fase II					
Esecuzione test di proliferazione cellulare e test ELISA		■	■	■	
Fase III					
Raccolta e elaborazione dei dati, stesura relazione finale					■

4.2 Motivazioni

Scopo del progetto era la realizzazione di un protocollo per la preparazione del lisato piastrinico (LP) nella specie equina e lo studio delle sue caratteristiche con diverse metodiche di conservazione, in particolare il congelamento a -20°C e la liofilizzazione. L'analisi dei fattori di crescita PDGF-BB, TGF- β 1, VEGF-A, EGF e bFGF nei diversi prodotti e la valutazione della loro capacità di indurre la proliferazione cellulare hanno permesso di indagare il potenziale rigenerativo dei diversi preparati e il loro possibile impiego in ambito clinico.

Inoltre, ultimo punto del progetto era l'applicazione terapeutica dei prodotti nella specie equina in collaborazione con veterinari ippatri, al fine di verificarne l'efficacia in medicina rigenerativa veterinaria grazie ai dati clinici.

4.3 Metodologia

Al fine di svolgere l'attività del progetto è stata eseguita una ricerca bibliografica per la messa a punto dei protocolli più idonei per la preparazione del lisato piastrinico (LP).

Il LP equino è stato preparato a partire da sangue intero di cavalli di proprietà conservato con citrato fosfato destrosio. Il sangue è stato centrifugato una prima volta a 1400 rpm per 10 minuti con freno per permettere la separazione tra globuli rossi, *buffy coat* e plasma. Dopo aver raccolto il plasma e il *buffy coat* è stata eseguita una seconda centrifuga a 3500 rpm per 10 minuti senza freno. Il pellet è stato risospeso nel Plasma Povero di Piastrine (PPP) e le piastrine sono state contate per ottenere una concentrazione di un miliardo di piastrine/ml. Successivamente il Plasma Ricco di Piastrine (PRP) è stato congelato a -80°C per una notte e la mattina dopo è stato scongelato rapidamente a 37°C per indurre la lisi delle piastrine. Infine il LP è stato centrifugato tre volte per eliminare ogni residuo di membrana piastrinica ed è stato sottoposto a congelamento a -20° o a liofilizzazione. La procedura di liofilizzazione inizia con il congelamento a -80°C dei campioni over-night, il liofilizzatore viene portato alle seguenti temperature: il condensatore a -85°C , le piastre e la camera a -70°C over-night. La liofilizzazione avviene poi con le seguenti fasi:

FREEZE DRYING

Fasi di lavoro	1	2	3
SHELF SEPT: °C	-70	-70	-70
TIME: min	0	240	0

Fase primaria di congelamento del prodotto:

- a. Fase 1 temperatura raggiunta il più rapidamente possibile
- b. Fase 2 mantenimento della temperatura per 4 ore
- c. Fase 3 temperatura finale

FINAL FREEZE: °C	-70
EXTRA FREEZE: min	240
PRI VAC.START: MT	100

Fase finale di congelamento e start vuoto.

Mantenimento temperatura per 4 ore e start vuoto a 100 MT (milliTORR) pari a 0,08 milliBAR.

PRIMARY DRY

Fasi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SHELF SEPT: °C	-45	-40	-35	-30	-25	-20	-15	-10	-5	0	5	10	15	20
TIME: min	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	0
PRI VAC. START: MT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	10

FASE INIZIALE DI ESSICAZIONE DEL PRODOTTO

Durante le fasi (da 1 a 13) la temperatura delle piastre viene raggiunta in 3 ore, nella fase 14 la temperatura è raggiunta il più rapidamente possibile. Durante le fasi 12 e 14 il valore del vuoto viene abbassato a 10 MT (milliTorr) pari a 0,008 milliBAR

SECONDARY DRY

SHELF SEPT: °C	20
TIME: min	60
PRI VAC. START: MT	10
FINAL SEPT: °C	20

FASE FINALE DI ESSICAZIONE DEL PRODOTTO

Mantenimento della temperatura delle piastre a 20°C per 1 ora, vuoto a 10 MT, temperatura finale del prodotto 20°C. Il materiale finito viene poi conservato a +5°C fino alla scadenza.

Per l'utilizzo del LP liofilizzato è necessaria la ricostituzione al momento dell'uso con 4 ml di acqua sterile per preparazioni iniettabili e anche il prodotto ricostituito può essere conservato a temperatura di refrigerazione; in questo studio i campioni sono stati analizzati entro 6 mesi dalla produzione.

Sono stati ottenuti 23 campioni di LP sottoposti a congelamento a -20°C o a liofilizzazione, rispettivamente. Per quantificare i fattori di crescita PDGF-BB, TGF-β1, VEGF-A, EGF e bFGF nei LP diversamente conservati sono stati eseguiti saggi di tipo immunoenzimatico (ELISA). I test ELISA sono stati effettuati mediante l'utilizzo di kit commerciali CUSABIO per fattori di crescita equini (PDGF-BB, TGF-β1 e VEGF-A) e R&D System per fattori di crescita umani (EGF e bFGF), in base alle istruzioni previste dai rispettivi produttori.

I test sono stati eseguiti su campioni diluiti 1:20.

Per 18 campioni è stato possibile eseguire il test per la valutazione di PDGF-BB e TGF- β 1 e non per gli altri fattori, in quanto non si è riusciti ad avere un quantitativo sufficiente di materiale da analizzare. Altri 5 campioni, invece, sono stati valutati per tutti i fattori di crescita.

È stata svolta un'analisi statistica per valutare differenze nelle varie concentrazioni dei fattori di crescita tra il lisato congelato e liofilizzato. Inoltre, le concentrazioni calcolate nel progetto sono state confrontate con quelle presenti in letteratura (Giraldo 2013; Russell 2016; McClain 2019 e Sumner 2017), espresse come media o media \pm deviazione standard.

La differenza dei fattori di crescita tra le due modalità di conservazione di lisato piastrinico è stata valutata utilizzando un modello di regressione lineare: la variabile dipendente del modello è rappresentata da ciascun fattore di crescita, mentre tipologia del lisato piastrinico (congelato o liofilizzato) e concentrazioni sono state inserite come variabili indipendenti. È stato utilizzato il modello lineare in quanto le assunzioni statistiche per l'applicazione sono state verificate e accettate. Il confronto con i dati della letteratura (Allegato n.1) è stato effettuato rispetto all'articolo di Russell 2016 per il lisato fresco-liofilizzato e agli articoli di McClain 2019 e di Sumner 2017 per il lisato congelato.

Per i dati in *pool* è stato utilizzato il test T di Student del campione con dati aggregati rispetto al valore da confrontare; mentre, per i dati individuali è stato utilizzato il test T di Student di due campioni indipendenti con dati aggregati.

Le analisi statistiche sono state effettuate assumendo un livello di significatività pari a 5% e utilizzando il *software* statistico R versione 3.5.1.

Infine, il test di proliferazione cellulare è stato eseguito con la linea MRC-5. Tali cellule, opportunamente diluite, formano dei cloni, il cui numero, forma e dimensioni sono indicativi dell'efficienza proliferativa del siero o del LP in esame. I LP congelati e liofilizzati sono stati addizionati con 10 UI/ml di eparina e sono stati aggiunti al terreno di coltura delle cellule (MEM) in ragione del 5%, già al primo passaggio, mentre come controllo positivo è stato impiegato il MEM addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS). Sulle cellule coltivate con i diversi prodotti viene effettuata una diluizione logaritmica, possibilmente a partire da 10^7 cellule/ml fino ad arrivare a 10^1 , e le sospensioni cellulari vengono inoculate in una piastra da 24 pozzetti, usando 3 pozzetti per ogni diluizione; dopo 14 giorni di incubazione a 37°C e 5% CO₂, si esegue la fissazione con formalina e la colorazione con Giemsa, dopodiché si valuta la presenza di cloni alle varie diluizioni.

5 Risultati

La messa a punto del processo di liofilizzazione del prodotto ha permesso di ottenere una procedura utile per la conservazione ad una temperatura di refrigerazione.

I fattori di crescita quantificati sono stati PDGF-BB, TGF- β 1 e bFGF mentre VEGF-A e EGF non sono stati rilevati.

I valori di PDGF-BB espressi in **pg/ml** nei 23 campioni sono stati:

PDGF-BB

LP CONGELATI	LP LIOFILIZZATI
4074,32	3813,4
8613,58	6757,16
5534,32	5312,38
6350,54	4918,24
3556,84	3479,62
7772,76	6204,88
6377,68	5712,44
6477,96	4949,12
1480	1416,2
482,2	1106,6
1498	1480,8
2436,6	2200,8
3501,33	2831,2
1747	1756,2
2598,8	2295,2
3079,38	1870,4
3820	2960
1515,98	1822
7551,06	8011,4
10059,06	8270,8
8735,16	9183,7
8047,95	7689,81
7414,81	8195,84

La distribuzione dei valori di PDGF-BB è rappresentata nel boxplot dell'Allegato n.3.

La concentrazione di TGF- β 1 espressa in **pg/ml** nei 23 LP congelati e liofilizzati è stata:

TGF- β 1

LP CONGELATI	LP LIOFILIZZATI
5210,36	6827,24
11889,28	10581,04
9972,4	11359,56
6448,48	7587,32
2999,4	3023,32
7785,16	7511,96
5862,4	9166,72
6140,56	7408,68
5140	2297,8
3400	1788,4
4220	2756,8
7300	3497,6
8000	4181,2
4758,8	3260,2
5415	434,16
9047,4	3883,2
6800	2873,6
9340	3416,6
5532,24	5507,33
5125,22	5636,07
5399,85	5470,68
5194,56	5583,3
5930,35	6175,04

Il boxplot della distribuzione del TGF- β 1 è raffigurato nell'Allegato n.4.

I valori di bFGF espressi in **pg/ml** nei 5 campioni analizzati sono risultati:

bFGF

LP CONGELATI	LP LIOFILIZZATI
134,9036	149,9162
107,3805	82,3595
89,8658	112,3847
99,8742	92,3679
72,3511	119,891

La distribuzione del fattore di crescita bFGF nel LP congelato e liofilizzato è mostrata nell'Allegato N.5

La concentrazione media dei fattori di crescita per tipologia di lisato piastrinico (\pm errore standard) per tipologia di LP, numero di campioni, differenza e relativo p-value sono espressi nella tabella seguente:

LISATO PIASTRINICO	FATTORI DI CRESCITA		
	PDGF-BB (pg/ml)	TGF-β1 (pg/ml)	bFGF (pg/ml)
CONGELATO	4901 \pm 116	6387 \pm 366	101 \pm 8.84
LIOFILIZZATO	4445 \pm 116	5227 \pm 366	111 \pm 8.84
Numero campioni	23	23	5
Differenza	456 \pm 165	1160 \pm 518	-10.5 \pm 12.5
P-value	0.011	0.036	0.448

*in **arancione** sono stati evidenziati i p-value statisticamente significativi

I risultati indicano che la concentrazione media dei fattori di crescita PDGF-BB e TGF- β 1 è maggiore nel LP congelato rispetto a quello liofilizzato. In particolare, per il fattore di crescita PDGF-BB, in media è 4901 pg/ml per il LP congelato e 4445 pg/ml per il LP liofilizzato. Per il fattore di crescita TGF- β 1, in media è 6387 pg/ml per il LP congelato e 5227 pg/ml per il LP liofilizzato. Queste differenze sono statisticamente significative (p-value = 0.011 e 0.036, rispettivamente).

Per quanto riguarda il fattore di crescita bFGF, la differenza non è statisticamente significativa.

In merito al confronto con i dati della letteratura, il fattore di crescita VEGF-A non è stato valutato in quanto non è stato rilevato, mentre il fattore di crescita bFGF non è stato confrontato essendo mancante il dato in letteratura. I dati utilizzati nel calcolo dei test T di Student sono riportati nell'Allegato n.2.

I p-value dei test T di Student, per valutare se la differenza tra le medie calcolate con i campioni analizzati rispetto alle medie riportate in letteratura è statisticamente significativa, sono stati:

	FATTORI DI CRESCITA	
	PDGF-BB	TGF-β1
LP LIOFILIZZATO vs Russell 2016	<0.0001	<0.0001
LP CONGELATO vs McClain 2019	0.659	<0.001
LP CONGELATO vs Sumner 2017	0.006	0.025
LP CONGELATO vs Sumner 2017	<0.0001	0.001

*in verde è stato evidenziato il p-value NON statisticamente significativo

I p-value indicano che le medie calcolate con i dati di questo studio sono statisticamente differenti rispetto alle medie pubblicate negli articoli; tranne per il fattore di crescita PDGF-BB nel LP congelato in quanto non risulta statisticamente differente rispetto a quanto riportato nell'articolo di McClain 2019.

Il test di proliferazione con la linea cellulare MRC-5, eseguito su 4 campioni congelati e liofilizzati di LP e usando la coltura con MEM e 10% FBS come controllo positivo, è stato effettuato a partire da 10^5 cellule/ml, in quanto non è stata raggiunta una concentrazione di partenza superiore, e ha permesso la propagazione cellulare fino alle seguenti diluizioni:

5% LP CONGELATO	5% LP LIOFILIZZATO	MEM + 10% FBS
10^2	10^3	10^1
10^1	10^2	
10^1	10^5	
10^1	10^2	

Le piastre del test di proliferazione sono incluse nell'Allegato n.6.

I risultati mostrano come i LP congelati determinino una proliferazione cellulare più efficiente in confronto ai LP liofilizzati, in quanto riescono a supportare la crescita cellulare fino a diluizioni inferiori (10^1 rispetto a 10^2 , rispettivamente). Inoltre il 5% di LP congelato ha permesso il raggiungimento di risultati comparabili al 10% di FBS.

A causa dell'emergenza sanitaria Covid19, non è stato possibile eseguire le prove in campo per la valutazione dei dati clinici, in quanto non si è avuta disponibilità da parte di medici veterinari per lo svolgimento delle operazioni necessarie a garantire un *follow-up* utile per la verifica dell'intervento terapeutico.

Pertanto, i risultati ottenuti si possono considerare come prodromici per una valutazione di prova clinica da eseguirsi con una futura sperimentazione.

6 Discussione e Conclusioni

L'uso di derivati piastrinici rappresenta un importante strumento in medicina rigenerativa sia umana che veterinaria. Le proprietà rigenerative del lisato piastrinico (LP) sono dovute ad un'alta concentrazione di fattori di crescita e chemiotattici, i quali promuovono la riparazione tissutale grazie a un effetto proliferativo, angiogenico e anti-infiammatorio.

In questo progetto è stato possibile mettere a punto una metodica di liofilizzazione del lisato piastrinico, al fine di confrontare le caratteristiche dello stesso dopo tale procedura e dopo congelamento a -20°C . In base all'analisi dei fattori di crescita è stato rilevato come la concentrazione di PDGF-BB e TGF- β 1 sia significativamente maggiore nel LP congelato a -20°C rispetto al LP liofilizzato e conservato a temperatura di refrigerazione, mentre non è stata identificata una differenza nella concentrazione di bFGF. Inoltre, il test di proliferazione cellulare ha evidenziato come il 5% di LP congelato determini una più efficiente crescita cellulare rispetto a quello liofilizzato, con risultati paragonabili a quanto si può riscontrare con il supplemento del 10% di FBS.

Questi risultati hanno evidenziato come il LP congelato a -20°C abbia proprietà rigenerative superiori rispetto a quello liofilizzato, tuttavia il LP liofilizzato conserva un'alta concentrazione di fattori di crescita ed è in grado di supportare la crescita cellulare *in vitro*. In questo progetto sono anche state confrontate le concentrazioni dei fattori di crescita dei LP analizzati rispetto a quelle presenti in letteratura: le medie dei fattori di crescita calcolate sono risultate statisticamente differenti rispetto alle medie presenti in letteratura, eccetto il PDGF-BB nel LP congelato, che non è risultato differente rispetto ai dati di McClain 2019.

La diversa concentrazione dei fattori di crescita nei prodotti può essere dovuta a una variabilità intrinseca del sangue equino e della concentrazione piastrinica oltre che ad un differente protocollo di preparazione e conservazione del LP. Il protocollo applicato in IZSLER e in questo studio per la preparazione del LP ha permesso lo sviluppo di un prodotto adeguato all'utilizzo in medicina rigenerativa veterinaria; inoltre, la messa a punto del protocollo di liofilizzazione, come sopra evidenziato, ha permesso la conservazione del LP per periodi di tempo e a temperature che consentono una sua applicazione terapeutica con una facilità di manipolazione superiore rispetto allo stesso non liofilizzato, ma congelato.

Tuttavia, quest'ultimo rappresenta, dal punto di vista clinico, un prodotto più efficiente rispetto alla preparazione liofilizzata; tali risultati preliminari, dovranno essere confermati dalle prove cliniche effettuate sul campo.

A tale proposito, è importante sottolineare che, per motivi legati all'emergenza sanitaria Covid19, in questo progetto non è stato possibile valutare i dati clinici di impiego del LP congelato e liofilizzato per mancanza di veterinari ippiatristi disponibili ad eseguire il *follow-up* terapeutico.

Per questo motivo, saranno necessari ulteriori considerazioni di ordine pratico al fine di verificare l'efficacia terapeutica dei prodotti nei cavalli sportivi.

Il LP possiede proprietà riparative grazie all'elevata concentrazione di fattori di crescita e alle capacità proliferative ed è quindi un promettente strumento in medicina rigenerativa veterinaria.

Saranno necessari ulteriori studi *in vitro* per valutare l'influenza della durata di conservazione oltre alla metodologia e studi clinici per verificare le applicazioni terapeutiche dei diversi prodotti.

7 Bibliografia

- 1 Amable PR, Bizon Vieira Carias R, Telles Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Farias Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res.* 2013;4: 67.
- 2 El Backly R, Ulivi V, Tonachini L, Cancedda R, Descalzi F, Mastrogiacomo M. Platelet lysate induces in vitro wound healing of human keratinocytes associated with a strong proinflammatory response. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(13-14):1787-800.
- 3 De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev* 2015;29:52-61.
- 4 Rinnovati R, Romagnoli N, Gentilini F, Lambertini C, Spadari A. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma. *Acta Vet Scand* 2016;58:45.
- 5 Camargo Garbin L, McIlwraith CW, Frisbie DD. Evaluation of allogeneic freeze-dried platelet lysate in cartilage exposed to interleukin 1- β in vitro. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):386.
- 6 Sumner SM, Naskou MC, Thoresen M, Copland I, Peroni JF. Platelet lysate obtained via plateletpheresis performed in standing and awake equine donors. *Transfusion.* 2017;57(7):1755-1762.
- 7 Russell KA, Koch TG. Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Vet J.* 2016;48(2):261-4.

- 8 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;9:29.
- 9 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;15(1):292.
- 10 Mocchi M, Dotti S, Bue MD, Villa R, Bari E, Perteghella S, Torre ML, Grolli S. Veterinary Regenerative Medicine for Musculoskeletal Disorders: Can Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Be the New Frontier? *Cells.* 2020 Jun 11;9(6):1453.

8 Modalità di divulgazione dei risultati

A causa dell'emergenza sanitaria Covid19 non è stato possibile partecipare ad eventi scientifici a seguito dell'annullamento degli stessi; tuttavia, era stato sottomesso un abstract dal titolo "*In vitro evaluation of frozen and freeze-died platelet lysate prior to the use in regenerative medicine*" all'evento "*First International StemNet meeting*" programmato a Padova dal 6 all'8 maggio 2020, rinviato al 22-24 Settembre 2021.

Ringraziamenti: si ringrazia per la gentile collaborazione nella rielaborazione statistica dei risultati ottenuti la dr.ssa Alessandra Scaburri, afferente alla struttura Sorveglianza Epidemiologica di IZSLER, dirigente responsabile dr.ssa Silvia Bellini.

9 Allegati

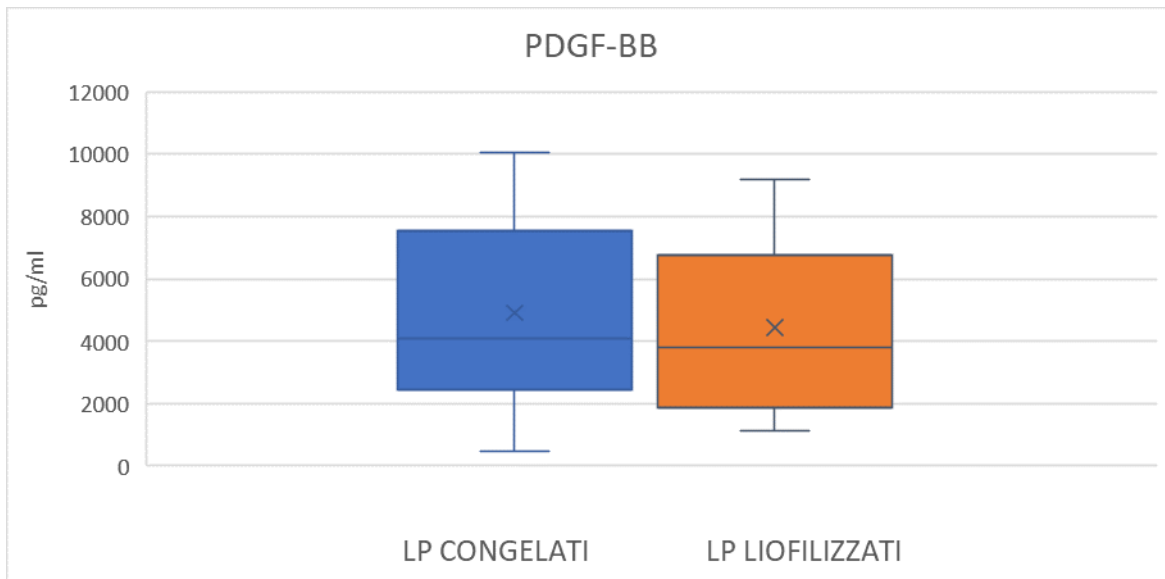
Allegato n.1: Dati presenti in letteratura.

PARAMETRI CAVALLO	PDGF-BB (pg/ml)	TGF-β1 (pg/ml)	VEGF-A (pg/ml)	Referenza
PLASMA	158,1 \pm 281	1114 \pm 457,7	NP	Giraldo 2013
PRP FRESCO	1259,7 \pm 418,6	3192,7 \pm 1395,3	NP	Giraldo 2013
LISATO FRESCO	5200	24500	NP	Russell 2016
PRP FRESCO	6058 \pm 696	4671 \pm 896	NP	McClain 2019
LISATO CONGELATO AZOTO LIQUIDO	4942 \pm 397	4329 \pm 911	NP	McClain 2019
LISATO CONGELATO -80 SINGOLO	3600 \pm 2200	7300 \pm 1800	11200 \pm 16000	Sumner 2017
LISATO CONGELATO -80 POOL	3500	6100	13800	Sumner 2017

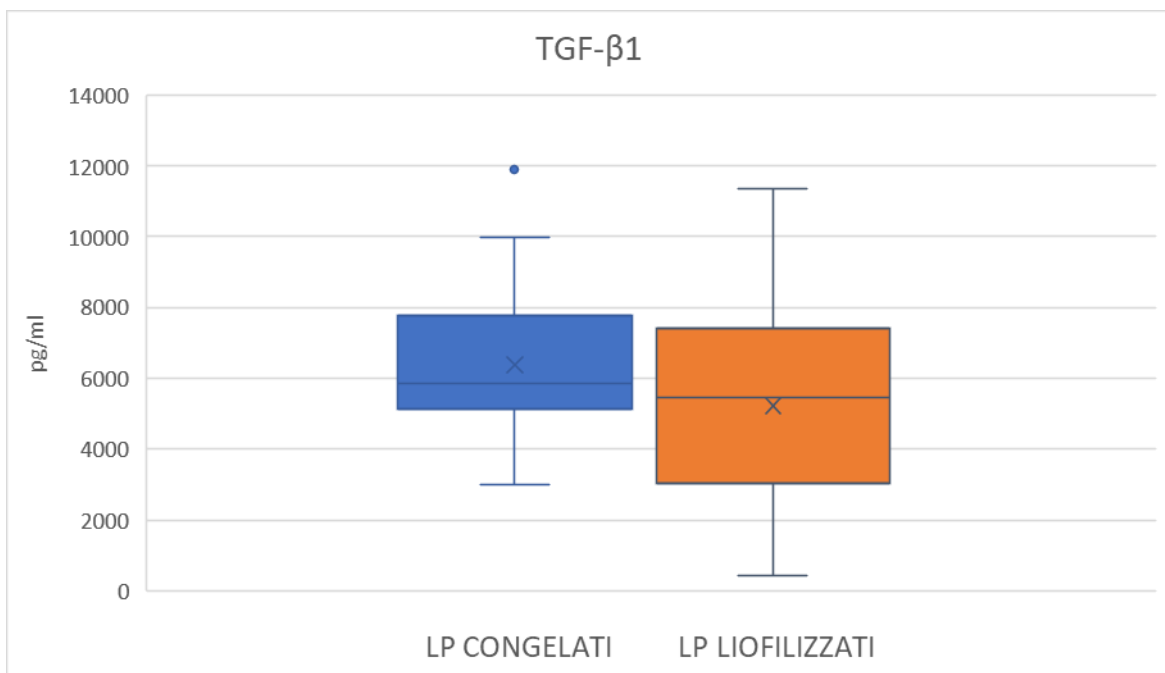
Allegato n.2: Dati della letteratura utilizzati.

PARAMETRI CAVALLO	PDGF-BB (pg/ml)	TGF-β (pg/ml)	N. campioni	Referenza
LISATO FRESCO	5200	24500	1	Russell 2016
LISATO CONGELATO AZOTO LIQUIDO	4942 \pm 397	4329 \pm 911	6	McClain 2019
LISATO CONGELATO -80 INDIVIDUALE	3600 \pm 2200	7300 \pm 1800	6	Sumner 2017
LISATO CONGELATO -80 POOL	3500	6100	1	Sumner 2017

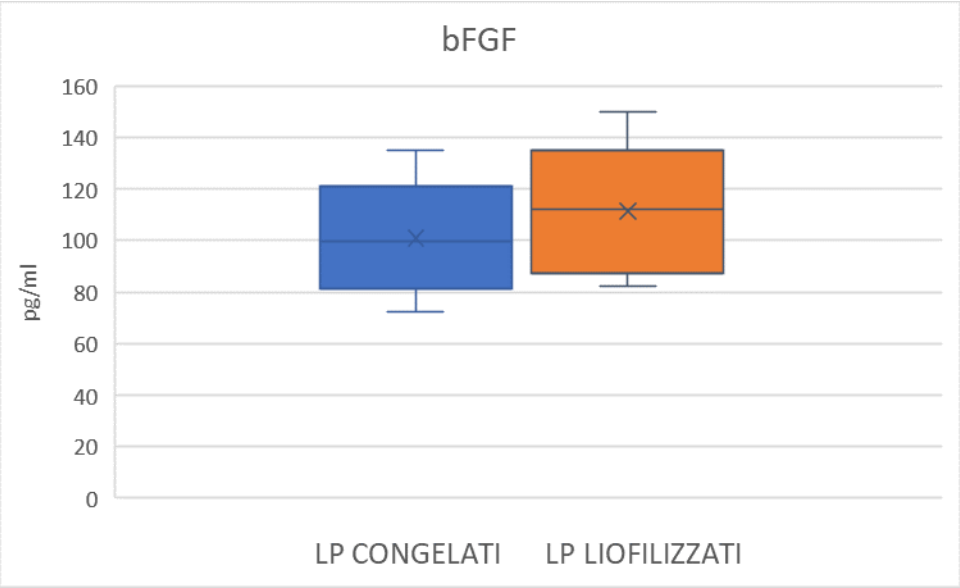
Allegato N.3: Boxplot della distribuzione del fattore di crescita PDGF-BB nel LP congelato e liofilizzato.



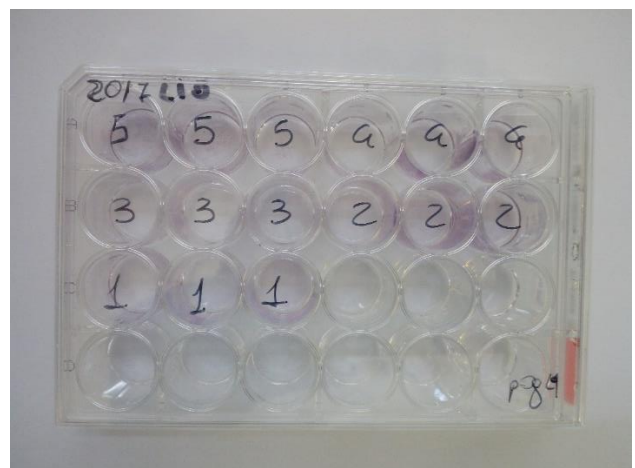
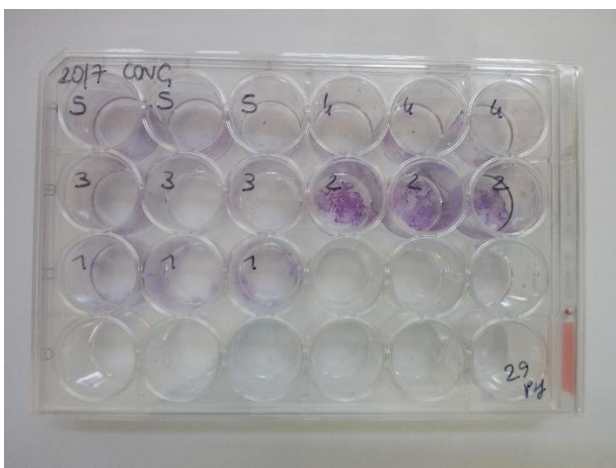
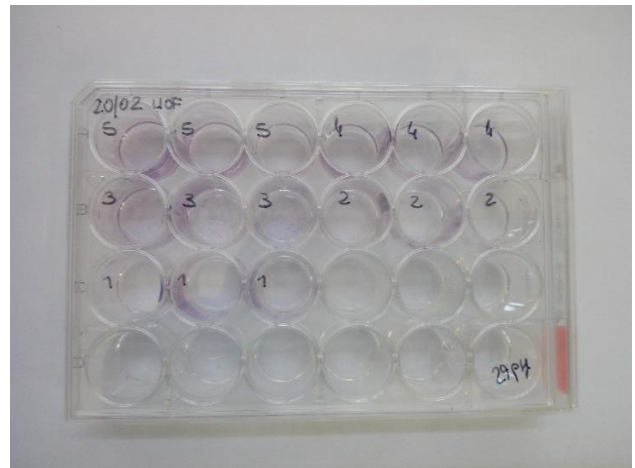
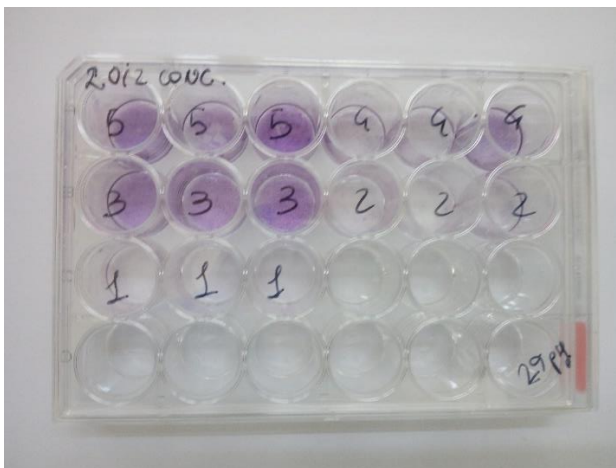
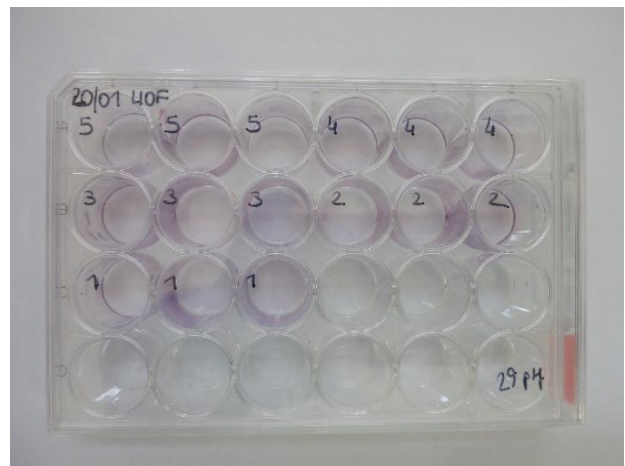
Allegato N.4: Boxplot della distribuzione del fattore di crescita TGF- β 1 nel LP congelato e liofilizzato.

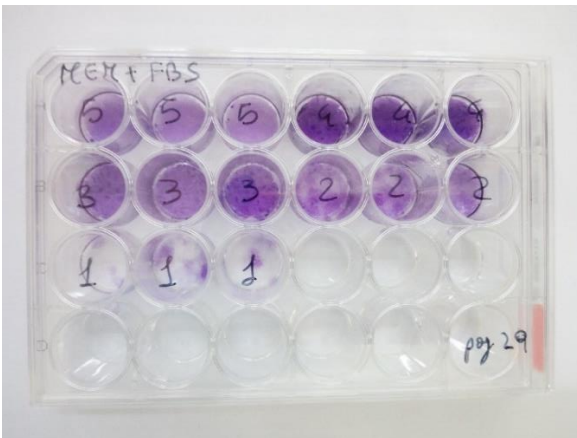
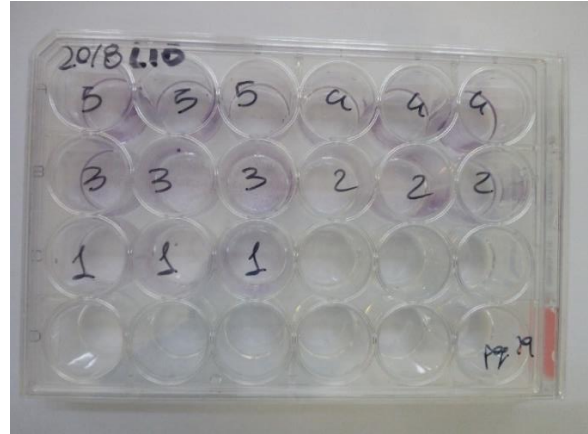
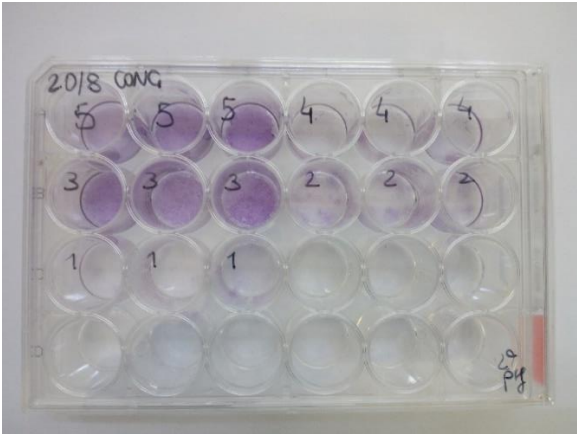


Allegato N.5: Boxplot della distribuzione del fattore di crescita bFGF nel LP congelato e liofilizzato.



Allegato N.6: Piastre del test di proliferazione con linea cellulare MRC-5.





Il Responsabile Scientifico del Progetto

Dr.ssa Silvia Dotti