



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZE CHIRURGICHE E
MICROBIOLOGIA APPLICATA”

XXXII CICLO

Valutazione dell'efficacia di Plasma Ricco di Piastrine autologo associato a cellule multipotenti adulte mesenchimali autologhe isolate da lipoaspirato quali adiuvanti la guarigione di ulcere cutanee croniche

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Ceccarelli

Tutore:

Chiar.mo Prof. Edoardo Raposio

Dottorando: Dott. Marco Gardani

Sommario

Introduzione	2
Background	3
Razionale dello studio	6
Scopo dello studio.....	8
Disegno dello studio.....	9
Obiettivi.....	10
Obiettivo primario di safety	10
Obiettivo primario di clinical activity	10
Obiettivo primario di efficacy	11
Obiettivi secondari	11
Endpoint	11
End point primario di safety	11
End point primario di efficacy	11
End point secondari	12
Materiali e metodi	13
Intervento	13
Popolazione in studio.....	17
Criteri di inclusione	17
Criteri di esclusione.....	18
Statistica	21
Risultati	21
Casi clinici	23
Discussione.....	25
Conclusione	25
Bibliografia	27

Introduzione

Il problema delle ulcere cutanee ha assunto un'importanza sempre maggiore negli ultimi decenni a causa del progressivo incremento della popolazione anziana e delle patologie croniche correlate. Le ulcere cutanee sono un serio e crescente problema di salute, sono spesso disabilitanti e difficili da trattare. Secondo l'Associazione Italiana per le Ulcere Cutanee (AIUC) queste patologie costano al Servizio Sanitario nazionale più di un milione di euro ogni anno e la perdita di circa 500.000 ore di lavoro. Fra i diabetici lungo sopravvissuti il rischio di ulcere da piede diabetico raggiunge il 25% e circa il 20% delle spese sanitarie può essere attribuito a questo tipo di ulcere. Le più comuni cause di ulcere sono i disordini vascolari (arteriosi o venosi), i traumi, i decubiti e il piede diabetico. Le ulcere cutanee sono tutte caratterizzate da perdita di tessuto che coinvolge l'epidermide, il derma e alcune volte il tessuto adiposo e muscolare e da una mancanza di riparazione spontanea forse dovuta all'età della popolazione residente di cellule staminali mesenchimali o all'incapacità di reperire precursori cellulari circolanti. Si avverte un grande bisogno di approcci terapeutici innovativi nel trattamento delle ulcere e queste devono essere economicamente praticabili e applicabili su larga scala. Uno dei più interessanti approcci terapeutici si basa sull'utilizzo del "gel piastrinico", un emocomponente per uso topico ottenuto dalle piastrine concentrate attivate con una preparazione di trombina umana in presenza di calcio. Il gel piastrinico è stato utilizzato per numerosi anni nel trattamento di ulcere cutanee poiché è noto avere un effetto sulla promozione della rigenerazione del tessuto mesenchimale come il tessuto connettivo, tendineo, osseo e vascolare. A livello clinico sulle ulcere cutanee, in primo luogo si manifesta la comparsa di tessuto di granulazione e successivamente la riepitelizzazione della superficie cutanea. Negli ultimi anni si è affermato l'utilizzo del tessuto adiposo come sorgente di cellule stromali mesenchimali nella medicina rigenerativa in particolare per la rigenerazione del tessuto osseo, cartilagineo e dei tessuti molli. Queste cellule hanno la capacità di differenziarsi in linee cellulari mesodermiche come adipociti, osteociti e condrociti. Il midollo osseo è stato utilizzato come principale risorsa di cellule staminali mesenchimali per molti anni, attualmente si assiste ad un progressivo incremento delle MCS isolate da tessuto adiposo. Questa sorgente presenta numerosi vantaggi rispetto al midollo osseo, infatti il tessuto adiposo è più facilmente reperibile, è ampiamente disponibile e contiene un'altra concentrazione di MCS. Attualmente per la rigenerazione di ferite difficili che non rispondono ai trattamenti standard, viene utilizzato il PRP. Attraverso questa ricerca volevamo sperimentare qualcosa di più efficiente sfruttando la capacità del PRP di stimolare la proliferazione

delle cellule stromali mesenchimali. E quindi ottenere una maggior percentuale di guarigione delle ulcere cutanee degli arti inferiori in pazienti con piede diabetico o con vasculopatie arteriose o venose.

Background

Le ulcere cutanee croniche hanno un grande impatto in termini clinici, sociali ed economici, ed esigono un'organizzazione delle cure in grado sia di affrontarne adeguatamente la gestione sia di ridurre la morbilità conseguente, ovvero le recidive, le infezioni e le amputazioni. Nonostante i molti progressi riscontrati negli ultimi decenni riguardo al trattamento delle ulcere croniche degli arti inferiori, questa patologia (molto comune) continua a rappresentare una problematica rilevante per la comunità dei pazienti affetti da insufficienza vascolare o diabete. L'entità del fenomeno è importante, sia per il numero dei Pazienti coinvolti, che per i tempi e le risorse allocate e necessarie al trattamento di tale patologia. Le ulcere croniche sono debilitanti, dolorose, e riducono la qualità di vita dei Pazienti affetti. Le ulcere degli arti inferiori colpiscono ca. l'1% degli adulti ed il 3,6% delle persone di età superiore ai 65 anni. In un recente studio campione coinvolgente 1560 Pazienti affetti da ischemia cronica degli arti inferiori, il 61% di questi presentava almeno un'ulcera distale. L'incidenza annuale di ulcere del piede nella popolazione diabetica è pari al 2,5-10,7%. Si ritiene che in Italia ca. il 30% dei Pazienti affetti da diabete da almeno 10 anni presenti una forma di neuropatia diabetica, mentre il 15% dei Pazienti diabetici ospedalizzati sia affetto da ulcere distali. Sono circa 2 milioni le persone in Italia affette da ulcere cutanee, legate principalmente a malattie vascolari o a diabete, traumi, lesioni da pressione, etc. Le nuove frontiere nel trattamento delle ferite difficili e della medicina rigenerativa contemplano, sempre più frequentemente, il possibile utilizzo terapeutico sperimentale di fattori di crescita, citochine e cellule staminali autologhe. In questo contesto, nell'ultimo decennio si è assistito a un incremento dell'utilizzo di prodotti ematici autologhi per facilitare la rigenerazione e la guarigione di tessuti danneggiati. Il principale emocomponente utilizzato è il plasma ricco di piastrine (PRP) prodotto dal sangue intero mediante un processo di centrifugazione e separazione o attraverso procedure di aferesi che permettono di ottenere una concentrazione di piastrine di 3-4 volte superiore ai valori del paziente. Da alcune stime è emerso come la spesa relativa al trattamento delle ulcere cutanee a carico del SSN sia superiore a 1,5 miliardi di euro annui.

Si stima che, nel Regno Unito, i ricoveri annui per ulcerazioni distali in Pazienti diabetici siano ca.

24000, mentre la stessa patologia risulta essere la causa più comune di ospedalizzazione per i Pazienti diabetici nord-americani. I primi studi clinici sicuri e documentati sull'applicazione del PRP furono eseguiti da D.H. Whitman et al nel 1997 e da Marx et al nel 2004 in chirurgia orale e maxillo-facciale, successivamente l'utilizzo del PRP si è esteso in altri campi. Studi clinici eseguiti in chirurgia plastica W. J. Welsh et al 2000 (17) e D. Man et al 2001(18) e nel trattamento delle ulcere cutanee croniche Crovetto G. et al. e Mazzucco L. et al nel 2004(19)(20) dimostrano la sua efficacia nel favorire la rigenerazione tissutale. Driver et al. (2006) (3) in un trial randomizzato, controllato, multicentrico riguardante l'utilizzo del PRP autologo nel trattamento delle ulcere diabetiche del piede osservava che il 68,4% dei pazienti trattati con gel di PRP guarivano dopo una media di 42,9 giorni, rispetto al 42,9% dei pazienti controllo non trattati con PRP. Nel 2010 un nostro studio (Bernuzzi et al.) (13) sull'utilizzo del gel piastrinico nel trattamento delle ulcere cutanee degli arti inferiori osservava una riduzione delle dimensioni dell'ulcera dopo 8-12 settimane e una riepitelizzazione completa nel 60% dei casi trattati. Marissa J. Carter et al. nel 2011 (2) dimostrano che sulla base degli ultimi 10 anni di ricerca i risultati di una review sistematica e metanalisi suggeriscono che la terapia con PRP può avere un impatto positivo sulla guarigione dell'ulcera sul dolore e sull'infezione nelle ulcere cutanee sia acute che croniche. Nel 2015 Frederic Picard et al. (1) in un'altra Review ottenuta da una ricerca su PubMed e Cochrane (1978-2015) concludono che 87,5% degli studi controllati dimostrano un significativo beneficio nel trattamento delle ulcere croniche diabetiche con gel di PRP e suggeriscono l'utilizzo del PRP nelle ulcere diabetiche non guarite dopo trattamenti standard. A partire dal 2003 compaiono i primi studi che utilizzano il PRF (piastrine ricche di fibrina), emocomponente autologo biologicamente simile al PRP con elevato potere sigillante, nel trattamento delle ulcere cutanee difficili. Yazawa et al, nel 2003 (33) mostrarono che incorporando piastrine nella fibrina la concentrazione di fattori di crescita rilasciati dalle piastrine era di almeno tre volte superiore a quella osservata con il PRP convenzionale. Rasmus Lundquist, et al (34), in uno studio del 2007 dimostrarono che il PRF, prodotto con il sistema Vivostat® e utilizzato per stimolare la guarigione delle ulcere, aveva un effetto di protezione contro la degradazione proteolitica dei fattori di crescita tissutale rilasciati dalle piastrine attivate.

Nel 2008, P. Steenvoorde et al. (35) osservarono che trattando 12 pazienti con ulcere cutanee croniche difficili di varia eziologia con Vivostat® PRF si otteneva una percentuale di guarigione del 62% senza registrazione di reazioni avverse e senza rilevazione di dolore da parte dei pazienti. Il trattamento delle ulcere croniche con gel di PRP, o PRF in particolare nelle ulcere di origine vascolare arteriosa non evidenzia spesso risultati soddisfacenti. Il processo di mancata guarigione delle ferite

difficili è mediato da un complesso di fattori extracellulari e intracellulari di natura complessa che non è stato ancora ben chiarito. Un difetto dell'intero spessore del tessuto cutaneo senza esposizione di importanti strutture come vasi, nervi tendini e ossa viene tradizionalmente trattato con un trapianto di cute che interessa epidermide e derma. In ogni modo, ulcere con scarsa formazione di tessuto di granulazione sono resistenti al trapianto di cute. In queste situazioni altre opzioni terapeutiche possono essere utilizzate e la medicina rigenerativa rappresenta una nuova frontiera nel trattamento delle ferite difficili. In quest'ottica, Williams et al hanno descritto l'isolamento di cellule endoteliali differenziate da tessuto adiposo umano: tali linee cellulari, utilizzate nel contesto di innesti vascolari in vivo, hanno contribuito a migliorare significativamente la pervietà degli stessi dopo l'intervento chirurgico. Studi successivi hanno documentato la capacità delle cellule SVF a sviluppare differenziazione endoteliale in vitro: Planat-Benard et al hanno osservato come le cellule CD13-CD34-SVF coltivate in Matrigel esprimano CD31 e fattore di von Willebrand. Tali cellule, nelle opportune condizioni di coltura, davano luogo a reti di diramazioni tridimensionali, coerenti con la formazione di strutture vascolari. Miranville et al hanno riferito conclusioni simili, analizzando una popolazione di cellule CD31-CD34-SVF; l'aggiunta di VEGF migliorava la loro differenziazione, valutata in base all'espressione di CD31 e lo sviluppo di strutture vascolari in Matrigel. In lavori correlati, Cho et al. (10) hanno dimostrato come una popolazione cellulare CD31-CD34-CD106-flk-1 isolata da tessuto adiposo possa esprimere marcatori endoteliali in presenza di VEGF. Similmente, Martinez-Estrada et al. (12) hanno descritto come cellule flk-1 isolate da cellule SVF in coltura esprimano un fenotipo endoteliale in presenza di VEGF. Successivi studi in vivo hanno evidenziato ulteriormente il potenziale endoteliale-differenziativo delle cellule SVF. In un modello di ischemia tissutale nel ratto, l'innesto di una popolazione cellulare CD31 ha migliorato significativamente l'angiogenesi e il successivo recupero dell'omeostasi perfusoria dei tessuti interessati. Questa constatazione è stata confermata da almeno 5 gruppi indipendenti, e risultati simili sono stati ottenuti, sempre in modelli animali, sia somministrando tali linee cellulari per via endovenosa, sia tramite iniezione intra-muscolare in prossimità della lesione ischemica.

Razionale dello studio

Il razionale biologico dell'utilizzo del PRP e in particolare del prodotto attivato "gel piastrinico" nel trattamento delle ulcere cutanee croniche è basato sull'importante ruolo che le piastrine giocano nei processi di guarigione delle lesioni. Una volta attivate, durante il processo di emostasi, le piastrine rilasciano numerosi fattori di crescita ad attività chemotattica e mitogena. Gli alfa-granuli piastrinici contengono infatti Platelet-Derived Growth Factor (isomeri PDGF-AA, BB, e AB), Transforming Growth Factor- Beta (TGF-Beta), Platelet Factor 4 (PF4), Interleuchina-1 (IL-1), Platelet-Derived Angiogenesis Factor (PDAF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet-Derived Endothelial Growth Factor (PD-EGF), Epithelial Cell Growth Factor (ECGF), Insulinlike Growth Factor (IGF), Osteocalcina (Oc), Osteonectina (On), Fibrinogeno (Ff), Vitronectina (Vn), Fibronectina (Fn), e Trombospondina-1 (TSP-1). Questi fattori possono intervenire favorevolmente nei processi di guarigione attirando cellule indifferenziate dalla matrice e favorendo la replicazione cellulare. Il PRP può sopprimere inoltre il rilascio di citochine correlate alla flogosi cronica, interagendo con i macrofagi per migliorare il tessuto di guarigione e di rigenerazione, promuovendo altresì il processo di neo-angiogenesi capillare e la riepitelizzazione di ulcere croniche. Le piastrine contenute nel PRP possono anche svolgere un ruolo nei meccanismi locali di difesa attraverso la produzione di proteine di segnalazione chemotattiche verso i macrofagi; il PRP infine può contenere anche una frazione leucocitaria, che sintetizza interleuchine nel contesto di un sistema immunitario non specifico. Studi precedenti sull'utilizzo del PRP hanno dimostrato attività antimicrobica contro *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. La scelta di utilizzare in questo studio il PRF (Plasma ricco di piastrine arricchito di fibrina), ottenuto con il Device Vivostat®, è razionalmente legato all'effetto di protezione che ha la fibrina contro la degradazione proteolitica dei fattori di crescita tissutale rilasciati dalle piastrine attivate (34) e alla sua capacità di concentrazione di fattori di crescita di almeno tre volte superiore a quella osservata con il PRP convenzionale (33). Il Sistema Vivostat® consente inoltre la produzione e l'applicazione del PRF a circuito chiuso e in completa asepsi, una migliore distribuzione locale e una minore dispersione del PRF arricchito di cellule stromali adipose sfruttando la capacità sigillante della fibrina in esso contenuta. Il razionale dell'utilizzo di cellule stromali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo per la terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori si basa sulla capacità di queste cellule di

differenziarsi in cellule e tessuti di origine mesodermica, ugualmente alle cellule staminali emopoietiche (4-11, 21-32).



Poiché il tessuto adiposo umano è pressoché onnipresente e facilmente ottenibile, in quantità di rilievo, mediante procedure chirurgiche effettuate in anestesia locale e con disagio limitato per il Paziente, esso si configura quale fonte alternativa ottimale di cellule staminali adulte autologhe per la rigenerazione di tessuti mesenchimali. Cellule ottenute da lipoaspirato possono differenziarsi infatti in linee adipogeniche, osteogeniche, condrogeniche e miogeniche. Mentre nozioni precise circa l'identità e le caratteristiche biologiche dei progenitori degli adipociti risultano essere ancora lacunose, si ritiene attualmente che queste cellule risiedano verosimilmente nella frazione stroma-vascolare (SVF) del tessuto adiposo. La porzione SVF isolata da lipoaspirato recentemente ha destato molta attenzione a causa della sua capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature e partecipare ai processi di neoangiogenesi (4,11); come tali, queste cellule potrebbero quindi essere proficuamente utilizzate in un approccio strategico volto al trattamento/terapia locale preventiva di lesioni e tessuti ischemici, promuovendo la proliferazione di neovasi. I preadipociti SVF e le cellule endoteliali presentano infatti stretti rapporti in vivo: le cellule SVF esprimono marcatori coerenti con un fenotipo endoteliale, tra cui CD31, CD144 (VE-caderina) e il fattore di von Willebrand (23).

Sebbene le cellule SVF possano integrarsi compiutamente nel tessuto ricevente e differenziarsi verso cellule endoteliali, le stesse potrebbero inoltre influire positivamente nei processi di guarigione tissutale attraverso meccanismi paracrini: le cellule SVF derivate da tessuto adiposo secernono infatti citochine angiogeniche, quali il VEGF e l'Hepatocyte Growth Factor (HGF). I livelli di VEGF e/o HGF secreti dalle cellule SVF possono essere inoltre stimolati da esposizione delle cellule ad ipossia e fattori di crescita e differenziazione (Tumor Necrosis Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, Epidermal Growth Factor, Ascorbato, etc.). Studi in vivo, utilizzando un modello murino di preadipociti 3T3-F442A, suggeriscono come una relazione reciproca possa esistere tra angiogenesi e adipogenesi; questo fenomeno coinvolge direttamente il VEGF, in quanto la somministrazione di anticorpi anti-recettore VEGF interferisce con la neo-adipogenesi in vivo, coerentemente con un percorso paracrino affine tra cellule endoteliali e preadipocitarie(30). Un ulteriore supporto alla valorizzazione di un comune percorso paracrino tra queste linee cellulari proviene dall'osservazione di un accresciuto tasso proliferativo osservato in colture bi- e tri-dimensionali di preadipociti e cellule endoteliali (9). Diversi altri meccanismi non-specifici sono stati inoltre ipotizzati per un coinvolgimento proficuo di cellule adipocitarie SVF (aSVFc) nei processi di guarigione tissutale (31-32): in primis, aSVFc innestate in un tessuto ischemico o necrotico possono secernere citochine e fattori di crescita che stimolano la rigenerazione tissutale in modo paracrino. Le aSVFc infatti stimolerebbero il reservoir di cellule staminali "di nicchia" presenti nel tessuto ricevente, stimolando il recruitment di cellule staminali endogene promuovendone la differenziazione lungo i lignaggi richiesti. In maniera analoga e correlata, le aSVFc potrebbero secernere molecole antiossidanti, scavenger di radicali liberi e proteine chaperone/heat shock in un sito ischemico; conseguentemente, si assisterebbe ad un incremento nell'eliminazione delle molecole tossiche rilasciate nell'ambiente locale, favorendo così i meccanismi di recupero delle cellule superstiti.

Scopo dello studio

Non essendoci in letteratura sperimentazioni analoghe allo studio proposto in questo progetto, si ha per la prima volta la possibilità di registrare informazioni relative alla sicurezza, tollerabilità ed attività clinica del composito PRP arricchito da cellule staminali nella terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori. Tuttavia, lo scopo principale di questo studio è quello di misurare l'efficacia del trattamento sperimentale rispetto alla sola applicazione di gel piastrinico. Le cellule stromali potrebbero influire positivamente sui tassi di guarigione sia grazie alle proprietà rigenerative delle

cellule stesse, sia per la neoangiogenesi e l'aumento perfusorio locale ad esse correlato, mentre il PRF, oltre ai noti effetti locali, potrebbe aumentare sinergicamente la sopravvivenza e la funzione di tali cellule (Gentile et al) (4). Il procedimento in questione, se confermato e validato, potrebbe essere adottato con relativa semplicità ed economicità nelle varie sedi idonee del SSR (Servizio Sanitario Regionale).

Se il trattamento in oggetto si rivelerà essere di una qualche utilità nel trattamento complesso e multimodale di tale patologia, sarà a breve termine possibile, data la semplicità di utilizzo, un suo impiego clinico-terapeutico a larga scala. L'efficacia di tale metodologia potrebbe inoltre essere valutata quale adiuvante i processi di guarigione di altre condizioni morbose correlate all'ipoperfusione cutanea, quali, ad esempio, le radiodermiti. E' speranza infine dei ricercatori coinvolti nello studio il poter ottenere informazioni e dati utili ai fini di ampliare il background conoscitivo in merito ai processi di guarigione in lesioni cutanee ischemiche. Essendo ancora non estremamente diffusa questa tipologia di terapia sarà altresì interesse di questo studio saggiare l'ipotesi di assenza di manifestazioni, tra i pazienti partecipanti allo studio, di eventi avversi seri imputabili causalmente al trattamento.

Le molteplici visite nel post operatorio (1 visita ogni 2 settimane per 3 mesi), garantiranno un monitoraggio assiduo del paziente fornendo una solida visione dell'andamento temporale del processo di guarigione dei singoli pazienti.

I risultati di questo studio puntano a rappresentare gli elementi base per l'attuazione di studi confermativi architettonicamente più complessi dal punto di vista metodologico e supportati da numerosità più consistenti.

Disegno dello studio

Studio sperimentale interventistico prospettico aperto controllato e randomizzato con rapporto 1:1, adattativo, monocentrico, condotto su pazienti affetti da ulcere croniche su arti inferiori. Come già evidenziato nel paragrafo precedente, l'assenza in letteratura di sperimentazioni analoghe all'oggetto e la domanda di studio, questo progetto, al fine di tutelare la sicurezza del paziente, si articola in tre *fasi* (adattativo) una susseguente all'altra. È infatti prevista, per i soggetti randomizzati al gruppo sperimentale, una fase preliminare utile a garantire la sicurezza e tollerabilità del composito applicato. Il disegno più idoneo per questa sotto fase, che preservi la dinamicità dell'arruolamento, è il *Best of 5*.

In assenza di manifestazioni avverse al trattamento, ai soggetti reclutati in questa prima fase, ne verranno affiancati altri utili a registrare le prime valutazioni in termini di trattamento clinicamente attivo mediante un disegno MiniMax di Simon a due stage, fase II. Il “MiniMax”, in questo caso, risulta preferibile all’ “Ottimale” per due motivi: il primo legato ad un consistente eterogeneità in popolazione, il secondo è legato ad una probabilità di “early stopping” minore a quella che si avrebbe ottenuta con il disegno Ottimale, condizionalmente ai parametri prefissati. Parallelamente al braccio sperimentale, nel braccio di controllo si procederà all’ arruolamento dei pazienti registrando in maniera non così stringente come per il gruppo sperimentale, informazioni inerenti alla sicurezza, tollerabilità e clinical activity del trattamento. Il gruppo di controllo è costituito da soggetti che saranno sottoposti al trattamento standard ad oggi adoperato nella pratica clinica per la cura delle ulcere cutanee, ovvero la sola sovrapposizione di gel piastrinico PRP.

Se nessun evento o risultato che conducesse ad una interruzione precoce dello studio si manifestasse in una delle due fasi sopradescritte, l’arruolamento dei pazienti continuerebbe fino all’raggiungimento della numerosità globale prefissata per il confronto di efficacia tra i due gruppi, fase III. (Attenzione le fasi descritte in questo paragrafo, non devono essere confuse con quelle adoperate negli studi di tipo farmacologico. La suddivisione in fasi risponde all’esigenza di esplicitare l’evoluzione intrinseca di uno studio di tipo adattativo)

Obiettivi

Obiettivo primario di safety

Validare l’ipotesi di assenza di manifestazioni avverse imputabili al trattamento sperimentale, PRF arricchito da cellule stromali mesenchimali per la terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori.

Obiettivo primario di clinical activity

Valutare a 3 mesi dal trattamento, l’attività clinica espressa in termini di miglioramento clinicamente significativo, del trattamento sperimentale ovvero utilizzo del composito PRF arricchito da cellule stromali mesenchimali, per la terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori.

Il miglioramento clinicamente significativo o guarigione a 3 mesi dall’intervento è da intendersi raggiunto nel caso in cui contemporaneamente:

- Entro la 4 settimana dal trattamento è presente formazione di tessuto di granulazione
- E' registrata, dopo 12 settimane dal trattamento con analisi planimetrica digitale, una riduzione pari ad almeno l'80% della dimensione della lesione (misurata in cm², lunghezza*larghezza)

Obiettivo primario di efficacy

Valutare/Confrontare a 3 mesi dal trattamento, l'efficacia del trattamento composito PRF arricchito da cellule stromali mesenchimali rispetto alla sola applicazione di PRF, per la terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori.

Obiettivi secondari

- Valutazione dell'andamento temporale della riduzione delle dimensioni dell'ulcera, misurata con analisi planimetrica digitale
- Valutazione dell'andamento dei valori di percezione del dolore mediante scala VAS
- Confronto dei valori ossimetrici e perfusionali locali, misurati rispettivamente con ossimetria transcutanea con laser-doppler, raccolti al basale, a 1 e 3 mesi dall'intervento.
- Monitorare i singoli pazienti con assiduità (6 visite ripartite nell'arco dei 3 mesi di follow up) per il manifestarsi di eventi avversi imputabili al trattamento.

Endpoint

End point primario di safety

Registrare a un mese l'assenza di eventi avversi

End point primario di efficacy

Valutare se, a 3 mesi dal trattamento, la percentuale di soggetti in guarigione sia significativamente maggiore ($\delta = 0.25$) di quella che si ha registrato nel gruppo di controllo costituita da soggetti trattati con solo PRP ($p0=0.55$) come descritto negli studi di Mazzucco et al. 2004 (20), Driver et al. 2006 (3), Bernuzzi et al. 2010 (13)

End point secondari

- A. Per ogni soggetto saranno misurate le variazioni della riduzione delle dimensioni dell'ulcera misurate in termini di AUC (area sotto la curva).
- B. Per ogni soggetto saranno misurate le variazioni della riduzione del punteggio riportato dalla scheda VAS misurate in termini di AUC (area sotto la curva).
- C. Confronto pre-post intervento dei valori ossimetrici e perfusionali rilevati al basale e nei diversi follow-up ad 1 e 3 mesi post trattamento

Materiali e metodi

Intervento

Il disegno dello studio prevedeva l'arruolamento di 62 pazienti affetti da ulcere croniche degli arti inferiori (venose, diabetiche, ischemiche), numerosità campionaria raggiungibile, essendo pari a 60 l'afferenza annua media, di nuovi accessi, all'Ambulatorio dedicato a tale patologia della SSD Chirurgia della Cute ed Annessi, Mininvasiva, Rigenerativa e Plastica.

I pazienti selezionati secondo i criteri di inclusione/esclusione sono stati randomizzati e quindi allocati o al trattamento sperimentale cioè, trattati con PRF autologo + cellule stromali mesenchimali autologhe isolate da lipoaspirato, o al trattamento standard, con la sola applicazione di PRF autologo.

A tutti i Pazienti è stato sottoposto un consenso informato dedicato, dettagliante la procedura. Ogni Paziente del Gruppo Sperimentale è stato sottoposto, in regime di Day Surgery, alla seguente procedura terapeutica: 120 ml di sangue sono stati prelevati da ogni Paziente e frazionati mediante centrifugazione (1500 rpm per 26 minuti), utilizzando il Vivostat System. Mediante tale operazione si è ottenuto una siringa contenente 5-6 ml di Plasma ricco di Piastrine arricchito di fibrina (PRF), con una concentrazione piastrinica media di ca. 4 volte i valori basali del paziente pari ad una concentrazione piastrinica in 5-6 ml di PRF di $1 \times 10^6 / \mu\text{L} \pm 20\%$ che rappresenta la dose terapeutica efficace del PRP e in studi preclinici la concentrazione ottimale per stimolare la proliferazione di cellule endoteliali umane e la neoangiogenesi (39)(40)(41)(14). Tale manovra è stata effettuata presso il Servizio Trasfusionale da un Dirigente Medico seguendo la Normative Regionali e Nazionali relative alla gestione dei pazienti sottoposti ad autotrasfusioni.

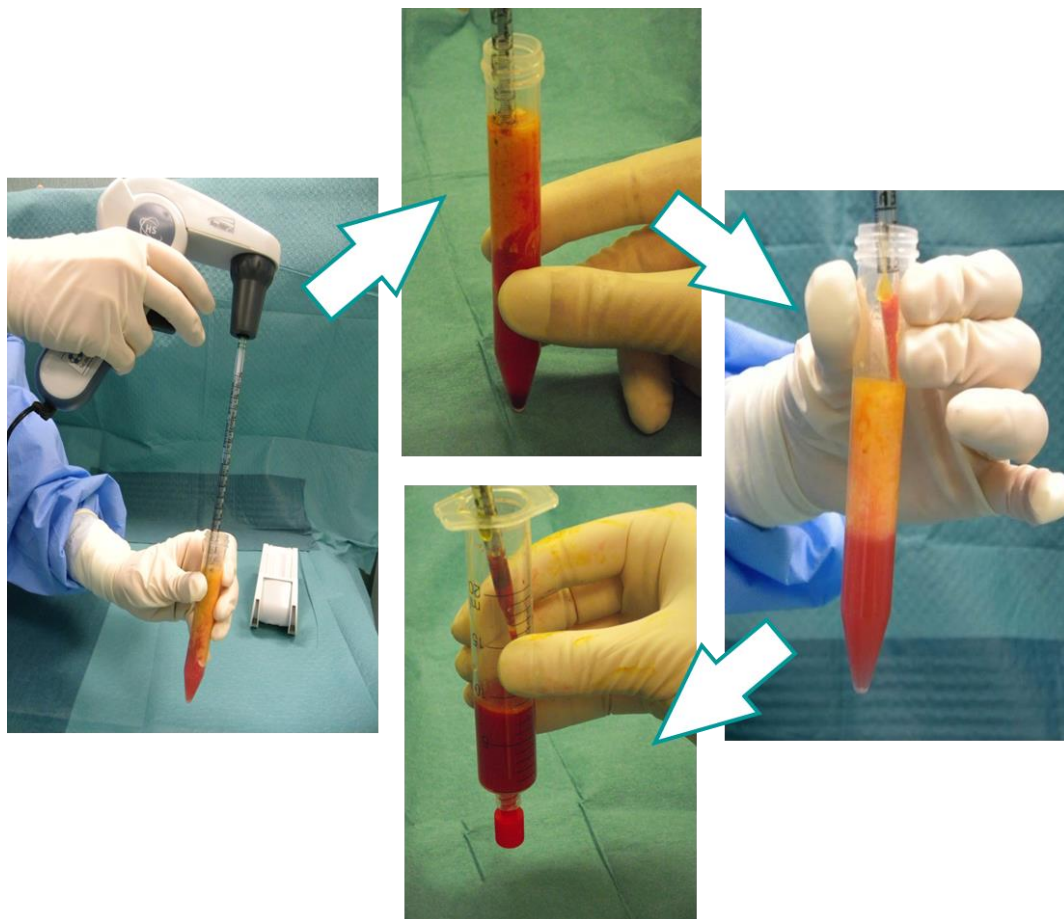
La siringa contenente il PRF è stata conservata sterilmente a temperatura ambiente ed utilizzata entro otto ore dalla preparazione. Immediatamente dopo è stato effettuato il processo di estrazione di cellule stromali mesenchimali (MSC) autologhe da lipoaspirato. Il prelievo di SVF (Stromal vascular Fraction) offre diversi vantaggi: tessuto del donatore abbondante, numero abbondante di cellule, la compliance del paziente, la facilità di procedura, il minimo tasso di complicanze post-operatorie, e la non necessità di cultura e l'amplificazione delle cellule. Con il nostro protocollo, è possibile ottenere, entro circa 2 ore, una media di $1,75 \times 10^6$ cellule SVF vitali, altamente purificate, pronte

per essere utilizzato nella stessa seduta operatoria (Raposio et al) (15-24); tale protocollo è stato pubblicato nel 2014 dalla più importante rivista internazionale del settore (Plastic and Reconstructive Surgery) (Raposio et al) (15).

Nel presente studio sono state usate cellule SVF autologhe ottenute da liposuzione addominale (eseguita in anestesia locale), separate mediante isolamento meccanico tramite centrifuga e shaker cellulare (effettuato in circuito chiuso, senza ausili enzimatici o di altro tipo). Per l'innesto, immediatamente conseguente all'isolamento, è stato utilizzato un semplice approccio: le cellule SVF, veicolate dal PRF autologo, sono state iniettate in corrispondenza (fondo+margini) del tessuto adiposo sottocutaneo esposto dalla lesione in questione.

In dettaglio, previa sottoscrizione di specifico consenso informato, le procedure sono state eseguite in sedo-analgesia con la tecnica tumescente, infiltrando il tessuto sottocutaneo della regione addominale con soluzione di Klein: 0.9% NaCl 1000 mL, lidocaina 1000 mg (0.1%), 8.4% sodio bicarbonato 15 mL, e adrenalina 0.5 mg (concentrazione 1:2000000), come da consolidata pratica internazionale in tal ambito. Il volume di liquido iniettato è proporzionale al volume stimato da estrarre con liposuzione (100-200 cc). Successivamente, viene effettuata una liposuzione addominale tradizionale utilizzando cannule smusse da 2 mm.

Il lipoaspirato è poi elaborato secondo la seguente procedura: 100-200 cc di tessuto adiposo vengono prima shakerati (sempre a circuito chiuso, nella medesima sala operatoria dell'intervento) a 600 vib/min per sei minuti, quindi centrifugati a 1600 rpm per sei minuti. Queste manovre, seppur a circuito chiuso, sono effettuate all'interno di specifica cappa a flusso laminare dedicata, al fine di garantire ulteriormente l'asepsi della procedura. Queste procedure di minima manipolazione hanno il fine di separare, per densità, le cellule SVF dagli adipociti (meno densi), al fine poi di raccogliere le cellule SVF (depositate al fondo di ogni siringa) con pipetta dedicata.



Al termine della procedura, il campione cellulare, veicolato in 5 ml di soluzione salina, è pronto per essere miscelato con il PRF autologo ed applicato sull'ulcera, così come iniettato nel contesto del tessuto adiposo sottocutaneo corrispondente e delimitante la lesione stessa, sempre ovviamente nel contesto della medesima seduta operatoria. L'intera procedura (prelievo, separazione, iniezione) dura circa 120 min.



Cappa a flusso laminare, shaker cellulare e centrifuga, in uso presso la ssd Day Surgery dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma

Le procedure di purificazione ed innesto di cellule autologhe isolate da lipoaspirato sono in uso corrente, da più di un decennio e con ottimo risultato terapeutico, nell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma così come su scala internazionale, ed anzi rappresentano il golden standard per quanto concerne, ad es., la terapia degli esiti di mastectomia o delle menomazioni facciali conseguenti a terapia per HIV. Essendo il numero di cellule SVF ($1,75 \times 10^6$) altamente sufficiente per possibili ed auspicabili effetti terapeutici (Marino et al (43), Cervelli et al (45)), non è stato necessario ampliare il numero di tali cellule con metodi quali la coltivazione, escludendo quindi completamente da tutto il processo l'utilizzo di laboratori GMP (e le problematiche legislative, burocratiche ed economiche conseguenti).

Le frazioni di SVF in tal modo isolate sono state quindi delicatamente miscelate, sempre sterilmente, con il PRF precedentemente prodotto, al fine di ottenere un enhanced-MSC-SVF-PRF

(e-PRF), ora pronto per l'innesto. Immediatamente dopo la miscelazione l'e-PRF autologo è stato distribuito sulla superficie del tessuto adiposo sottocutaneo della lesione (preventivamente sottoposta ad adeguato curettage/debridement chirurgico), utilizzando l'Applicator Unit del VIVOSTAT®SYSTEM costituito di un Kit di applicazione monouso così come iniettato nel contesto del tessuto adiposo sottocutaneo corrispondente e delimitante la lesione stessa. Infine sulla lesione è stata applicata una garza grassa ed eseguito un bendaggio sterile che il paziente ha mantenuto per una settimana fino alla prima visita post intervento. Parametri valutativi in relazione all'analisi quantitativa di risultato sono stati la misurazione delle variazioni di superficie delle aree affette, così come la presenza o meno di eventi locali avversi. Immagini digitali delle ulcere trattate sono state acquisite ai tempi: immediatamente pre-intervento 1 settimana dall'intervento e successivamente a 4, 6, 10, 12 settimane dall'intervento. Pre-operatoriamente e ad ogni controllo è stato richiesto a tutti i Pazienti di compilare un'apposita scheda di valutazione del dolore (Visual analogue scale-VAS) percepito in correlazione alla lesione trattata, mentre la perfusione ematica locale (ossimetria transcutanea con laser-doppler) è stata valutata al tempo 0 (pre-intervento) alla 4^a settimana e alla 12^a settimana. Ai Pazienti del Gruppo di Controllo è stato solamente applicato il PRF come da consolidata pratica aziendale.

Dal 01 Gennaio 2017 al 31 Dicembre 2018, sono stati reclutati 34 pazienti, per un totale di 34 ulcere.

Popolazione in studio

Criteri di inclusione

- Età dei pazienti 18-80 anni
- Ulcera cutanea cronica: presente da almeno 3 mesi non rispondenti ai trattamenti convenzionali
- Ulcera cutanea cronica, classificata in un qualsiasi stadio sulla base della NPUAP (National Pressure Ulcer Advisory Panel) e della classificazione CEAP (36) (37), con eziologia: Venosa o Diabetica o Arteriosa
- Emoglobina $\geq 10,5$ g/dL
- Piastrine $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$

- Negatività ai marcatori sierologici di Epatite B (HBsAg), Epatite C (HCVAb), HIV1-2 (HIV1-2Ab) e Lue
- firma del consenso informato

Criteri di esclusione

- Pazienti sottoposti a chemioterapia;
- Pazienti con almeno uno dei seguenti parametri ematologici:
 - emoglobina <10.5 g/dL
 - piastrine <100 x 10³/μL
 - albumina sierica < 2.5 g/dL
- Ulcere neoplastiche;
- Ulcere infette
- Donne in gravidanza o in allattamento
- Età dei pazienti < di 18 anni o sprovvisti di autonomia giuridica
- Patologie immunodepressive
- Pazienti che necessitano di Trattamento a Pressione Negativa (TNP)
- Sierologia positiva ad una delle seguenti patologie
 - HIV-1 o HIV-2, Epatite B (HbsAg), Epatite C (HCV-Ab), Lue
- Tossicodipendenti

Le caratteristiche della popolazione in termini anagrafici e di comorbidità sono riportate di seguito:

DATO	VALORE
SESSO	
M	20
F	14
ETA' MEDIA [ANNI]	64
COMORBILITA'	
IPERTENSIONE	20
CARDIOPATIA ISCHEMICA	11
DIABETE	13

15 ulteriori pazienti non sono stati sottoposti al trattamento per limiti di età, mentre altri 2 pazienti non soddisfacevano il valore target di Hb $\geq 10,5$. In più, 2 pazienti hanno rifiutato l'intervento chirurgico e 1 è guarito spontaneamente.

L'eziologia delle ulcere è così suddivisa:

Eziologia	Frequenza eziologia
Arteriosa	6
Diabetica	7
Mista	14
Venosa	7
Totale complessivo	34

Gli esami strumentali di LDF e $TcpO_2$ sono stati effettuati il giorno dell'intervento (T0), alla 4° settimana post intervento (T1) e alla 12° settimana dopo l'intervento (T2).

Di queste 34 ulcere, 16 sono state sottoposte a trattamento sperimentale con PRF + cellule multipotenti adulte mesenchimali, mentre le restanti 18 sono state trattate solo con PRF. L'analisi dell'LDF e della $TcpO_2$ è stata effettuata valutando i valori medi fra tutti i pazienti nei differenti momenti d'osservazione.

Di seguito si riportano i dati osservati nel gruppo sperimentale e nel gruppo controllo che mostrano un aumento dei valori alla fine del controllo rispetto a quanto osservato nella seduta pre-operatoria.

SPERIMENTALE

	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
<i>LDF</i>	24,5	28,57	29,9
<i>TcpO₂</i>	29,43	35,35	50,2

CONTROLLO

	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
<i>LDF</i>	29,58	33,73	27,08
<i>TcpO₂</i>	18,11	38,73	29,33

La media dimensione dell'ulcera prima del trattamento chirurgico è di 31,14 cm² nel gruppo sperimentale, mentre è di 59,87 cm² nel gruppo controllo.

A 4 settimane post intervento si vede una netta riduzione della media dimensione dell'ulcera nel gruppo sperimentale con 13 cm², a differenza del gruppo controllo che evidenzia una media dimensione di 33,57 cm²

Nessuna infezione è stata rilevata in fase di monitoraggio post trattamento.

Statistica

L'efficacia del trattamento sperimentale sarà valutata mediante confronto tra bracci, attraverso l'utilizzo del test Z ad una coda di proporzioni indipendenti. Le variazioni delle aree delle ulcere nei diversi time-point di rilevazione saranno rappresentate graficamente per supportare l'eventuale ipotesi di differenza tra i due gruppi. Ai pazienti arruolati nello studio ma non complianti al trattamento o semplicemente non osservati ai time-point di follow-up previsto, verranno analizzati secondo il criterio ITT. A tal proposito, per fornire delle analisi statisticamente più robuste, verrà adottato il metodo statistico di imputazione dati "Nearest neighbor hot deck imputation" la cui matrice di dissimilarità verrà determinata con la distanza euclidea.

Risultati

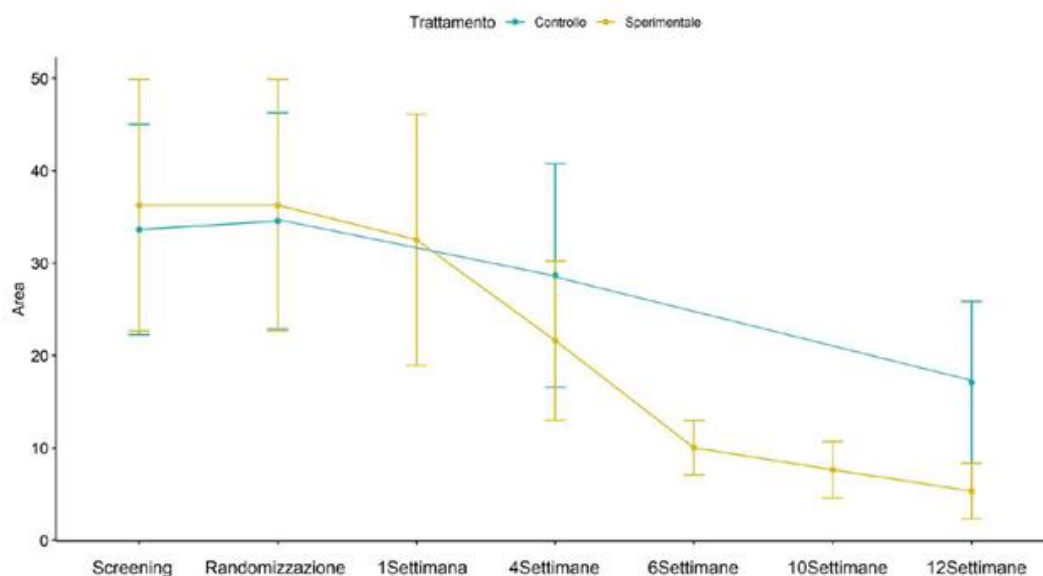
Nel presente studio sono stati arruolati e randomizzati 34 pazienti di cui 16 e 18 allocati rispettivamente al braccio sperimentale e a quello standard. Tuttavia, solo 13 pazienti del gruppo sperimentale e 16 pazienti del gruppo controllo hanno completato il FU consentendo una valutazione dell'end-point primario di studio.

Nelle Tabella 1, sono riportati i rate di guarigione attesi ed osservati nei 2 gruppi.

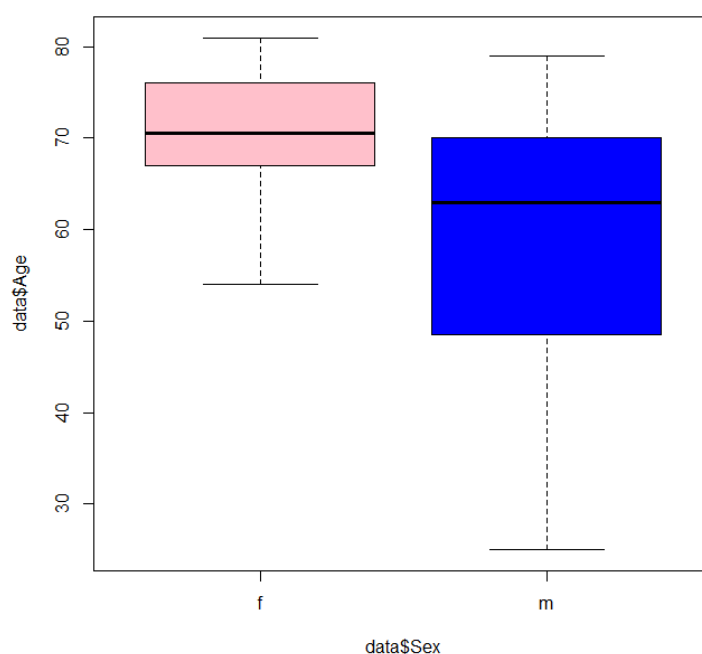
Guariti	Attesi	Osservati
Controllo	55%	$\frac{5}{16}$ (31,5%)
Sperimentale	80%	$\frac{8}{13}$ (61,5%))
DELTA	25%	30%

Sebbene, vi sia una differenza in termini percentuali, questa non risulta essere statisticamente significativa ($p=0.2$).

Nella figura sottostante viene illustrato l'andamento medio delle variazioni delle dimensioni delle ulcere nei due gruppi per i diversi time-point di FUP.



Come previsto nel protocollo, si è proceduto all'imputazione statistica delle dimensioni delle ulcere per i pazienti arruolati ma non osservati a 12 settimane dall'intervento. A tal fine, le variabili utilizzate per l'imputazione erano costituite oltre che dalle misure ai tempi precedenti, anche dal trattamento e dall'età. La variabile sesso non è stata utilizzata nella determinazione delle dissimilarità tra i pazienti in quanto fortemente correlata con l'età, così come riportato in Figura sottostante:



A seguito delle imputazioni le differenze tra i due gruppi risulta esaltata come riportato in Tabella 2, oltre che statisticamente significativa ($p=0.08$).

Guariti	Attesi	Osservati	IMPUTATI
Controllo	55%	$\frac{5}{16}$ (31,5%)	$\frac{5}{18}$ (27,8%)
Sperimentale	80%	$\frac{8}{13}$ (61,5%)	$\frac{10}{16}$ (62,5%)
DELTA	25%	30%	~ 35%

Casi clinici

1) CASO 1:

- a. Paziente di sesso femminile
- b. Età: 69 anni
- c. Tipo ulcera: MISTA
- d. Trattamento: PRF+ADSC

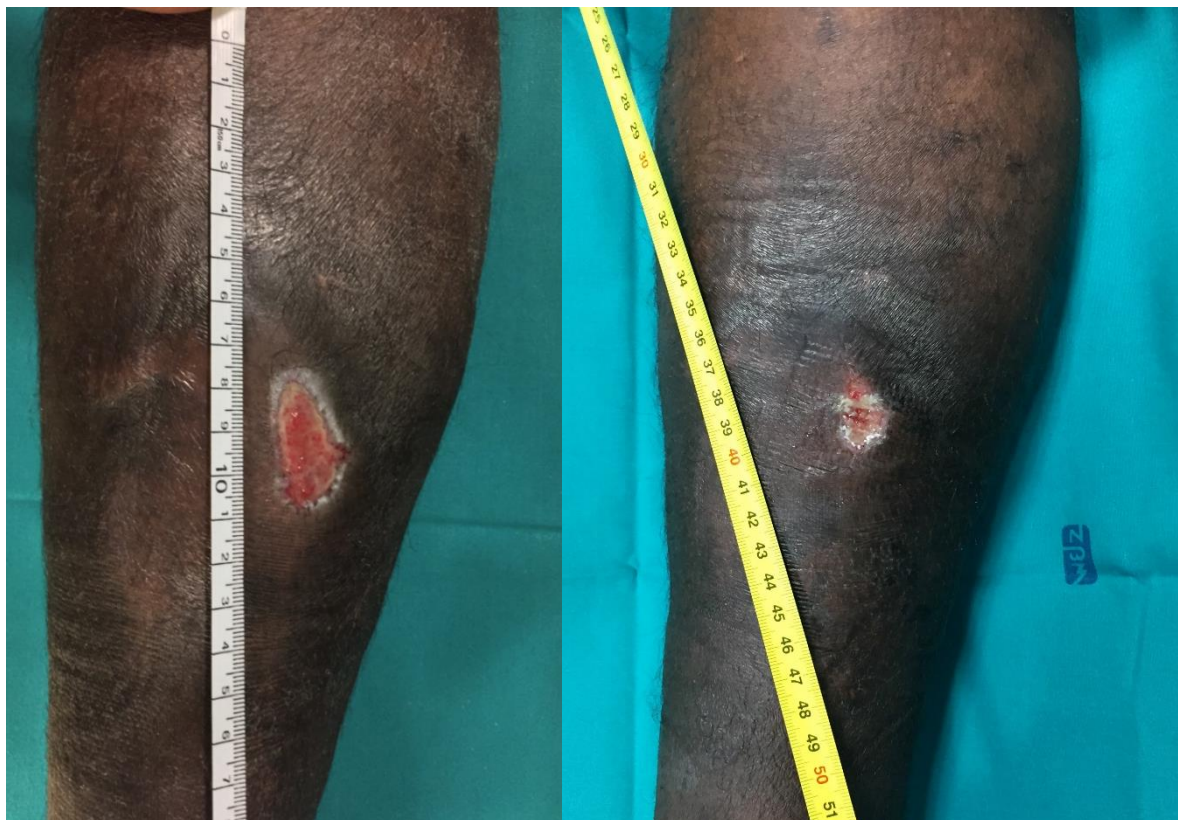
Sotto, da sinistra, le foto scattate prima del trattamento e a 12 settimane di distanza.



2) CASO 2:

- a. Paziente di sesso maschile
- b. Età: 38 anni
- c. Tipo ulcera: arteriosa
- d. Trattamento: PRF

Sotto, da sinistra, le foto scattate prima del trattamento e a 12 settimane di distanza.



3) CASO 3:

- a. Paziente di sesso femminile
- b. Età: 75 anni
- c. Tipo ulcera: venosa
- d. Trattamento: PRF + ADSC

Sotto, da sinistra, le foto scattate prima del trattamento e a 12 settimane di distanza.



Discussione

L'ipotesi di superiore efficacia del trattamento sperimentale sembra esser supportata dal presente studio; infatti, a seguito dell'analisi di imputazione statistica delle dimensioni delle ulcere dei soggetti non complianti è stato osservato un delta di miglioramento di circa il 35%[>] di quello atteso del 25%. In media, i soggetti allocati al trattamento sperimentale, manifestano un distinto segnale di guarigione che si consolida nei 2 mesi successivi.

Sebbene le percentuali di guariti siano inferiori a quelli attesi, lo studio non può considerarsi fallimentare in quanto uno dei principali limiti risulta essere di natura epidemiologica. Infatti, nella circoscritta realtà di Parma ed in considerazione dei pazienti arruolati nel presente studio secondo i criteri di eleggibilità predefiniti non vi è confrontabilità da quelli valutati nei lavori presenti in letteratura e citati dal presente trial per il dimensionamento campionario (Mazzucco et al, 2004(20), Driver et al. 2006(3), Bernuzzi et al. 2010(13), tasso non dissimile da quello che si avrebbe se la terapia fosse costituita da solo PRF (62%), Steenvoorde et al, 2008(35)).

Il presente trail risulta essere rappresentativo di una popolazione caratterizzata da una maggiore fragilità, per patologie croniche invalidanti e con problematiche sociali.

Tale aspetto tende a sostenere l'efficacia del trattamento, infatti, se lo studio fosse stato dimensionato sui rate osservati, sarebbe risultata necessaria una numerosità statistica più contenuta ed un numero di guariti minore per braccio.

Conclusione

Sebbene le percentuali di guariti siano inferiori a quelli attesi, lo studio non può considerarsi fallimentare in quanto uno dei principali limiti sembra esser di natura epidemiologica.

La sicurezza e la tollerabilità del composito PRF arricchito da cellule staminali prelevate da tessuto adiposo umano, evidenziate dal nostro studio, e l'efficacia del trattamento sperimentale sostenuta dall'analisi statistica, sembrano supportare l'ipotesi di superiorità del trattamento rispetto al solo utilizzo di PRF.

Il trattamento con PRF+ADSC potrebbe essere adottato con relativa semplicità ed economicità nelle varie sedi idonee del SSR per la rigenerazione di tessuti mesenchimali nella terapia locale di ulcere croniche degli arti inferiori.

I risultati presentati in questo studio derivano dall'analisi di una piccola popolazione e sono pertanto da ritenere preliminari.

Sono auspicabili nuovi studi (randomizzati controllati) con campioni di popolazione più rappresentativi al fine di confermare i risultati da noi ottenuti.

Bibliografia

- 1) Frédéric Picard, Barbara Hersant, Romain Bosc, Jea-Paul Meningaud Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Henri Mondor Hospital, Creteil France; “The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care”. Woun Repair And Regeneration, Vol 23 (5) , 638-643 Sept/Oct 2015
- 2) Marissa J. Carter, PhD, MA,a Carelyn P. Fylling, MSN, RN, CWS, CLNC,band Laura K. S. Parnell,MSc, “Use of Platelet Rich Plasma Gel onWound Healing:A Systematic Review and Meta-Analysis” CWSc : Journal of Plastic Surgery: Vol 11, 382-410 Sept. 2011
- 3) Driver VR, Hanft J, Filling CP, “A prospective, randomized controlled trial of autologous platelet rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers”. Ostomy Wound Manage 2006; 52(6): 68-87
- 4) Gentile P, De Angelis B, Pasin M, Cervelli G, Curcio CB, Floris M, Di Pasquali C, Bocchini I, Balzani A, Nicoli F, Insalaco C, Tati E, Lucarini L, Palla L, Pascali M, De Logu P, Di Segni C, Bottini DJ, Cervelli V. “Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and clinical Evaluation for Cell-Based Therapies in Patients With Scars on the Face”. J Craniofac Surg. 2014 Jan; 25(1):267-72.
- 5) Gimble JM1, Katz AJ, Bunnell BA. “Adipose-derived stem cells for regenerative medicine”. Circ Res. 2007 May 11;100(9):1249-60
- 6) Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. “Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers”. Aesthetic Plast Surg. 2009 May;33(3):3405.
- 7) O'Connell SM, Impeduglia T, Hessler K, Wang XJ, Carroll RJ, Dardik H. “Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers”. Wound Repair Regen. 2008 Nov-Dec;16(6):749-56
- 8) Salemi S, Rinaldi C, Manna F, Guarneri GF, Parodi PC. “Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma”. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008 Dec;61(12):1565-7.
- 9) Kakudo N1, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. “Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal

- fibroblasts". *Plast Reconstr Surg*. 2008 Nov;122(5):1352-60
- 10) Cho YB1, Lee WY, Park KJ, Kim M, Yoo HW, Yu CS . "Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: a phase I clinical study". *Cell Transplant*. 2013;22(2):279-85
 - 11) Jo CH1, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, Kim JE, Shim H, Shin JS, Shin IS, Ra JC, Oh S, Yoon KS. "Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial Stem Cells". 2014 May;32(5):1254-66
 - 12) Martinez-Zapata MJ Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L.GarcíaJ."Review Article Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds" *The Cochrane Library* 2012, Issue 10
 - 13) G Bernuzzi, S. Tardio, O. Bussolati, D. Adorni,S. Cantarelli, F. fagnoni, A. Rossetti, M. Azzarone,E. Ficarelli, E. Caleffi. G. Gazzola, M. Franchini. "Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma" *Blood Transf* 2010;8: 237-47
 - 14) Giuseppe Aprili, Giorgio Gandini, Roberto Guaschino, Laura Mazzucco, Laura Salvaneschi, Stefania Vaglio - Raccomandazioni SIMTI sugli emocomponenti per uso non trasfusionale 1^a Edizione Maggio 2012
 - 15) Raposio E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. "A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy" - *Plast Reconstr Surg*. 2014 Jun;133(6):1406-9.
 - 16) D. H. Whitman, R. L. Berry, and D.M. Green- "Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 55, no. 11, pp. 1294–1299, 1997.
 - 17) W. J.Welsh – "Autologous platelet gel: clinical function and usage in plastic surgery". *Cosmetic Dermatology*, vol. 11, article 13, 2000.
 - 18) D. Man, H. Plosker, and J. E. Winland-Brown. "The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery". - *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 107, no. 1, pp. 229–236, 2001.

- 19) Giovanni Crovetti, Giovanna Martinelli, Marwan Issi, Marilde Barone, Marco Guizzardi, Barbara Campanati, Marco Moroni, Angelo Carabelli. "Platelet gel for healing cutaneous chronic wound". - Transfusion and Apheresis Science 30, pp. 145–151, 2004.
- 20) Laura Mazzucco, Dante Medici, Massimo Serra, Renzo Panizza, Giorgio Rivara, Sara Orecchia, Roberta Libener, Elena Cattana, Alessandro Levis, Pier Giacomo Betta, and Piero Borzini. "The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study". - Transfusion, vol. 44, July 2004.
- 21) Hassan WU, Greiser U, Wang W. "Role of adipose-derived stem cells in wound healing". Wound Repair Regen. 2014 May;22(3):313-25.
- 22) Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Ohtsuru A, Hayashida K, Hirano A, Suzuki K, Yamashita S. "Early experiences with stem cells in treating chronic wounds". - Clin Plast Surg. 2012 Jul;39(3):281-92.
- 23) Di Rocco G, Gentile A, Antonini A, Ceradini F, Wu JC, Capogrossi MC, Toietta G. "Enhanced healing of diabetic wounds by topical administration of adipose tissue-derived stromal cells overexpressing stromal-derived factor-1: biodistribution and engraftment analysis by bioluminescent imaging". Stem Cells Int. 2010 Dec 26;2011:304562.
- 24) Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. "Adipose-derived stem cells for wound healing applications". Ann Plast Surg. 2011 Feb;66(2):210-5.
- 25) Cervelli V, Gentile P, De Angelis B, Calabrese C, Di Stefani A, Scioli MG, Curcio BC, Felici M, Orlandi A. "Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers". Stem Cell Res. 2011 Mar;6(2):103-11.
- 26) . Cervelli V, Bocchini I, Di Pasquali C., De Angelis B., Cervelli G., Curcio C. B., Orlandi A., Scioli G., Tati E., Delogu P., Gentile P.. "Review Article P.R.L. Platelet Rich Lipotransfert: Our Experience and Current State of Art in the Combined Use of Fat and PRP". BioMed Research International Volume 2013, Article ID 434191, 9 pages.
- 27) Ali Modarressi. "Review Article Platelet Rich Plasma (PRP) Improves Fat Grafting Outcomes". [www.wjps.ir/Vol.2/No.1/January 2013](http://www.wjps.ir/Vol.2/No.1/January%202013)

- 28) Fatemeh Atashi, Marisa E.E. Jaconi, Brigitte Pittet-Cue', Ali Modarressi. "Autologous Platelet-Rich Plasma:A Biological Supplement to Enhance Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Expansion" *TISSUE ENGINEERING: Part C* Volume 21, Number 3, 2015
- 29) Cervelli V, De Angelis B, Lucarini L, Spallone D, Balzani A, Palla L, Gentile P, Cerulli P. "Tissue regeneration in loss of substance on the lower limbs through use of platelet-rich plasma, stem cells from adipose tissue, and hyaluronic acid". *Adv Skin Wound Care*. 2010 Jun;23(6):262-72.
- 30) Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. "Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF". *Wound Repair Regen*. 2009 Jul-Aug;17(4):540-7.
- 31) Zou JP, Huang S, Peng Y, Liu HW, Cheng B, Fu XB, Xiang XF. "Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds". - *Int J Low Extrem Wounds*. 2012 Dec;11(4):244-53.
- 32) Balaji S, Keswani SG, Crombleholme TM. "The Role of Mesenchymal Stem Cells in the Regenerative Wound Healing Phenotype" - *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012 Aug;1(4):159-165. Review
- 33) Yazawa M., Ogata H., Nakajima T. et al. "Basic studies on the clinical applications of platelet rich plasma". *Cell Transplantation* 2003; 12: 509-518.
- 34) Lundquist Rasmus, Dziegiel Morten H., Ågren Magnus S.; "Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin" *Wound Rep Reg* (2007) 1–8
- 35) Steenvoord P.; Van Doorn L.P., Naves C., Oskam J.; "Use of autologous platelet-rich fibrin on hard-to-heal wounds". *Journal of wound care* vol 17 , no 2 , February 2008
- 36) National Pressure Advisory Panel, European Pressure Advisory Panel and Pan-Pacific Pressure Injury Alliance. *Prevention and Treatment of pressure ulcers: Quick Reference Guide*. Emily Haesler(Ed). Cambridge Media: Osborn Park Australia 2014
- 37) Kepa MS, Lobato I., Hernandez I., Burgos-Alonso N., Gomez Fernandez M.C., Lopez J Rodriguez B. March AG, Grandes G. Andia I; " Efficacy and safety of autologous platelet rich plasma for treatment of vascular ulcers in primary care: Phase III study. Sn Sebastian Et *BMC Family Practice* (2014) 15:211

- 38) Biemans A.A.M., Van Der Velden S.K., Bruijnicks C.M.A., Buth J, Nijsten T.; “Validation of the Chronic Venous Insufficiency Quality of Life Questionnaire in Dutch Patients treated for varicose veins”: *European J Vasc Endovasc Surgery* (2011) 42, 246-253
- 39) . Dhurat R, Sukesh MS, “ Principles and Methods of preparation of platelet rich plasma: a review and author’s perspective”; *Cutaneous Aesthetic Surgery*. 2014 Oct-Dec; 7(4): 189-197
- 40) Giusti I, Ruggetti A, D’Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan, A, Dell’Orso L, Dolo V, “Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cell”, *Transfusion* 2009; 49: 771-778
- 41) Mazzucco L, Balbo V, Guaschino R “ Reasonable compromise” to define the quality standard of platelet concentrate for non-transfusion use (CPunT), [Transfusion and Apheresis Science](#) 47 (2012) 207–211
- 42) Robert G. Frykberg, Thomas Zgonis, David G. Armstrong, Vickie R. Driver, John M. Giurini, Steven R. Kravitz, Adam S. Landsman, Lawrence A. Lavery, J. Christopher Moore, John M. Schuberth, Dane K. Wukich, Charles Andersen, John V. Vanore. “Diabetic Foot Disorders: A Clinical Practice Guideline”. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*. September–October, 2006 Volume 45, Issue 5, Supplement, Pages S1–S66
- 43) Marino G, Moraci M, Armenia E, Orabona C, Sergio R, De Sena G, Capuozzo V, Barbarisi M, Rosso F, Giordano G, Iovino F, Barbarisi A. Therapy with autologous adipose-derived regenerative cells for the care of chronic ulcer of lower limbs in patients with peripheral arterial disease. *J Surg Res*. 2013;185(1):36-44.
- 44) Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Curcio CB, Floris M, Fiaschetti V, Floris R, Cervell V. A comparative translational study: the combined use of enhanced stromal vascular fraction and platelet-rich plasma improves fat grafting maintenance in breast reconstruction. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:341-51.
- 45) Cervelli V, Gentile P, De Angelis B, Calabrese C, Di Stefani A, Scioli MG, Curcio BC, Felici M, Orlandi A. Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers. *Stem Cell Res*. 2011;6:103-11.