

EVALUARE A PRINCIPIILOR DE OBTINERE ȘI UTILIZARE ALE PLASMEI ÎMBOGĂȚITE ÎN TROMBOCITE

EVALUATION OF THE PRINCIPLES FOR OBTAINING AND USING PLATELET-RICH PLASMA

ALEXANDRU GRIGORIU*, IRINEL NEDELCU*, DACIANA ELENA BRĂNIȘTEANU**,
ALIN-CODRUȚ NICOLESCU*

Rezumat

Plasma îmbogățită în trombocite (Platelet-rich Plasma – PRP) reprezintă prin definiție un produs de plasmă autologă cu o concentrație mai mare de trombocite decât cea a sângelui recoltat. Este un tratament modern, care și-a câștigat deja un loc între cele mai utilizate produse din categoria ortobiologice. Trombocitele reprezintă elemente cheie în procesele de reparare tisulară. Ele eliberează numeroși factori de creștere, stimulează fibroblastele și celulele endoteliale și pot declanșa faza anagen. Principiul care stă la baza obținerii PRP prin centrifugare este că aceasta determină trombocitele să se depună în stratul profund al plasmăi, separându-se astfel de stratul superficial. Concentrația optimă a trombocitelor în plasma separată nu a fost încă stabilită, în ciuda numeroaselor studii efectuate până în prezent și a varietății domeniilor în care PRP a fost utilizată. S-au stabilit, însă, factorii cei mai importanți care influențează proliferarea celulară, iar respectarea acestora permite utilizarea unor concentrații de trombocite apropiate de limita superioară a intervalului optim: 3.7×10^6 plt/ μ L. Din punct de vedere al deontologiei medicale, procedurile care folosesc PRP trebuie susținute de diagnosticul și mecanismul patogenic al afecțiunii de tratat, iar calitatea dispozitivelor folosite să fie susținută de dovezile clare asupra concentrației, purității și viabilității trombocitelor. Interesul manifestat de către pacienți pentru

Summary

Platelet-rich plasma (PRP) is by definition an autologous plasma product with a higher concentration of platelets than that of collected blood. It is a modern treatment, which has already earned a place among the most used products in the category of orthobiologics. Platelets are key elements in tissue repair processes. They release numerous growth factors, stimulate fibroblasts and endothelial cells, and can trigger the anagen phase. The principle behind obtaining PRP by centrifugation is that it causes the platelets to settle in the deep layer of the plasma, thus separating them from the superficial layer. The optimal concentration of platelets in separated plasma has not yet been established, despite the many studies performed to date and the variety of fields in which PRP has been used. However, the most important factors that influence cell proliferation have been established, and their observance allows the use of platelet concentrations close to the upper limit of the optimal range: 3.7×10^6 plt/ μ L. From the point of view of medical ethics, procedures using PRP must be supported by the diagnosis and pathogenic mechanism of the condition to be treated, and the quality of the devices used must be supported by clear evidence of platelet concentration, purity and viability. The interest shown by patients for this type of treatment has caused the global market for PRP to have a significant growth and, starting

* Egoclinic – București.

Egoclinic – Bucharest.

** U.M.F. „Grigore T. Popa” și Spitalul Clinic de Urgență „Sf. Spiridon”, Iași.

UMF “Grigore T. Popa” and “St. Spiridon” Clinical Hospital, Iași.

acest tip de tratament a făcut ca piața globală pentru PRP să aibă o creștere semnificativă și, plecând de la valoarea din anul 2017 (195,2 milioane de dolari), cu un spor procentual anual estimat la 11,6%, aceasta să ajungă la aproximativ 715,65 milioane de dolari în anul 2030.

Cuvinte cheie: PRP, Platelet-rich Plasma, Plasmă îmbogățită în trombocite, Plasmă, Trombocite, Ortobiologic, Reparare tisulară, Factori de creștere, Tratament, Proliferare celulară, Centrifugare, Dermatologie, Dermato-cosmetică, Citokine, Folicul pilos, Alopecie, Alopecie androgenetică, Alopecie areata, Gel tixotrop, Marca CE, Leucocite.

Intrat în redacție: 12.08.2024

Acceptat: 19.09.2024

from the value of 2017 (\$195.2 million), with an annual percentage increase estimated at 11.6%, this will reach approximately 715.65 million dollars in 2030.

KeyWords: PRP, Platelet-rich Plasma, Platelet-enriched Plasma, Plasma, Platelets, Orthobiologics, Tissue repair, Growth factors, Treatment, Cell proliferation, Centrifugation, Dermatology, Dermato-cosmetics, Cytokines, Hair follicle, Alopecia, Androgenetic alopecia, Alopecia areata, Thixotropic gel, CE mark, Leukocytes.

Received: 12.08.2024

Accepted: 19.09.2024

Definiție

PRP - Platelet-rich Plasma sau *Plasma îmbogățită în trombocite* reprezintă, prin definiție, un produs de plasmă autologă cu o concentrație mai mare de trombocite decât cea a sângelui recoltat [1].

Se urmărește, de asemenea, reducerea drastică a “contaminanților” – eritrocite și leucocite (limfocite și monocite, dar în special granulocitele), mai ales datorită rolului pro-inflamator al acestora.

Reprezintă un tratament modern, care și-a câștigat deja un loc între cele mai utilizate produse din categoria “ortobiologicele” (produse care se găsesc în natură, din surse 100% biologice, cu rol în creșterea capacității înnăscute a organismului de reparare și regenerare) în diferite sectoare: tratamente dermatologice și proceduri dermato-cosmetice, ortopedie, chirurgie generală, stomatologie, etc [1,2].

Fiziologia și rolul trombocitelor și al plasmelor

Trombocitele reprezintă aproximativ 6% din elementele figurate ale sângelui, alături de eritrocite (93%) și leucocite (1%). Sunt celule mici, discoidale, cu o durată de viață de 7-10 zile. În condiții fiziologice, activarea lor se produce în urma unui traumatism ce provoacă sângerare. Trombocitele reprezintă elemente cheie în procesele de reparare tisulară. Ele eliberează numeroși factori de creștere (FGF, PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, IGF, etc) și citokine implicate în

Definition

PRP - Platelet-rich Plasma or *Platelet-enriched plasma* is, by definition, an *autologous plasma* product with a higher concentration of platelets than that of collected blood [1].

The aim is also to drastically reduce “contaminants” - erythrocytes and leukocytes (lymphocytes and monocytes, but especially granulocytes), especially because of their pro-inflammatory role.

It is a modern treatment that has already earned a place among the most widely used products in the category of “orthobiologics” (products found in nature, from 100% biological sources, with a role in increasing the body’s innate capacity for repair and regeneration) in various sectors: dermatological treatments and dermato-cosmetic procedures, orthopaedics, general surgery, dentistry, etc [1,2].

Physiology and role of platelets and plasma

Platelets account for about 6% of the figurative elements of blood, together with erythrocytes (93%) and leukocytes (1%). They are small, discoid cells with a lifespan of 7-10 days. Under physiological conditions, they are activated following trauma causing bleeding. Platelets are key elements in tissue repair processes. They release numerous growth factors (FGF, PDGF, TGF- β , EGF, VEGF, IGF, etc.) and cytokines involved in stem cell migration,

migrarea, diferențierea și proliferarea celulelor stem. În plus, trombocitele stimulează fibroblastele și celulele endoteliale, inducând sinteza matricei extracelulare și respectiv formarea neovascularizației[2,3].

O listă parțială a diversilor factori de creștere și citokine din PRP, alături de efectele acestora se găsește în Tabelul 1 [1,3,4,5].

differentiation and proliferation. In addition, platelets stimulate fibroblasts and endothelial cells, inducing extracellular matrix synthesis and neovascularization formation, respectively [2,3].

A partial list of the various growth factors and cytokines in PRP, together with their effects, can be found in Table 1 [1,3,4,5].

Tabelul 1

Factori de creștere și citokine	Funcții și efecte
PDGF	Mitoza celulelor mezenchimale. Chemotactic și mitogen pentru fibroblaste. Reglează secreția de collagen. Chemotactic pentru neutrofile și macrofage.
TGF-β	Stimulează proliferarea celulelor mezenchimale nediferențiate. Mitoza celulelor endoteliale și a fibroblastelor. Reglează efectul mitogen al altor factori de creștere și angiogeneza. Inhibă proliferarea macrofagelor și a limfocitelor.
VEGF	Angiogenează și creșterea permeabilității vasculare. Mitoza celulelor endoteliale.
	Exprimat în papila dermică în anagen; crește diametrul vaselor perifoliculare.
EGF	Proliferarea keratinocitelor și a fibroblastelor. Mitoza celulelor endoteliale. Proliferarea și regenerarea foliculilor piloși.
FGF (a - b)	Mitoza celulelor mezenchimale. Inductor al fazei anagen.
IGF-1	Chemotactic pentru fibroblaste și stimulează sinteza proteică. Menține creșterea foliculilor piloși in vitro.
Ang-1	Angiogenează prin stimularea proliferării celulelor endoteliale. Stabilizarea structurii vaselor prin recrutarea de pericite.
PF-4	Chemotactic pentru leucocite și reglează activarea acestora. Efect antimicrobian pe numeroase bacterii patogene și fungi.
HGF	Reglează creșterea și motilitatea celulelor epiteliale și endoteliale. Susține repararea epitelială și neovascularizația în procesul de vindecare tisulară.

Legendă:

PDGF: Factorul de creștere derivat din plachete. **TGF:** Factor de creștere și transformare. **VEGF:** Factor de creștere vascular. **EGF:** Factor de creștere epidermal. **FGF:** Factor de creștere a fibroblastelor. **IGF:** Factor de creștere de tip insulenic. **Ang-1:** Angiopoietina 1. **PF-4:** Factorul plachetar 4. **HGF:** Factor de creștere a hepatocitelor.

Factorii de creștere acționează și la nivelul protuberanței foliculului pilos, unde se leagă de receptori de pe suprafața celulelor stem. În papila dermică se găsesc celulele germinative de origine mezenchimală. Interacțiunile dintre aceste două tipuri de celule și factorii de creștere duc la inițierea și menținerea fazei anagen (de creștere în cadrul ciclului de regenerare al părului). Principalii factori implicați în creșterea și diferențierea celulelor stem par a fi EGF și TGF, iar PDGF mediază interacțiunea acestora cu matricea extracelulară, declanșând morfogeneza foliculară[3,5].

Growth factors also act at the protrusion of the hair follicle, where they bind to receptors on the surface of stem cells. The dermal papilla contains germ cells of mesenchymal origin. Interactions between these two cell types and growth factors lead to the initiation and maintenance of the anagen phase (growth phase in the hair regeneration cycle). The main factors involved in the growth and differentiation of stem cells appear to be EGF and TGF, and PDGF mediates their interaction with the extracellular matrix, triggering follicular morphogenesis [3,5].

Table 1

Growth factors and cytokines	Functions and effects
PDGF	Mesenchymal cell mitosis. Chemotactic and mitogenic for fibroblasts. Regulates collagen secretion. Chemotactic for neutrophils and macrophages.
TGF- β	Stimulates proliferation of undifferentiated mesenchymal cells. Endothelial cell and fibroblast mitosis. Regulates the mitogenic effect of other growth factors and angiogenesis. Inhibits macrophage and lymphocyte proliferation.
VEGF	Angiogenesis and increased vascular permeability. Endothelial cell mitosis. Expressed in dermal papilla in anagen; increases diameter of perifollicular vessels.
EGF	Proliferation of keratinocytes and fibroblasts. Endothelial cell mitosis. Proliferation and regeneration of hair follicles.
FGF (a - b)	Mesenchymal cell mitosis. Anagen phase inducer.
IGF-1	Chemotactic for fibroblasts and stimulates protein synthesis. Maintains hair follicle growth in vitro.
Ang-1	Angiogenesis by stimulating endothelial cell proliferation. Stabilizes vessel structure by recruiting pericytes.
PF-4	Chemotactic for leukocytes and regulates their activation. Antimicrobial effect on numerous pathogenic bacteria and fungi.
HGF	Regulates epithelial and endothelial cell growth and motility. Supports epithelial repair and neovascularization in tissue healing.

Legend:

PDGF: Platelet-derived growth factor. **TGF:** Transforming growth factor. **VEGF:** Vascular endothelial growth factor **EGF:** Epidermal growth factor. **FGF:** Fibroblast growth factor. **IGF:** Insulin-like growth factor. **Ang-1:** Angiopoietin-1. **PF-4:** Platelet factor 4. **HGF:** Hepatocyte growth factor.

O altă cale prezintă la nivelul papilei dermice este activarea ERK (extracellular signal-regulated kinase) și a protein-kinazei B (Akt), care promovează supraviețuirea celulară și inhibă apoptoza. Numeroase studii recente au demonstrat că factorii de creștere din PRP determină foliculii piloși să intre și să se mențină în anagen prin stimularea acestei căi. Activarea Akt duce la inhibarea prin fosforilare a altor două căi de semnal – GSK-3 (glycogen synthase kinase-3 β) care este implicată în degradarea β -cateninei (proteină implicată în adeziunea celulară și transcripția genică) și respectiv calea Bcl-2 implicată în apoptoza celulară [3,6,7].

La rândul ei, plasma conține factori esențiali pentru supraviețuirea celulară – nutrienți, hormoni, electroliți, vitamine și proteine, pentru coagulare și formarea polimerilor de fibrină, care vor constitui suportul pentru migrarea celulară și repararea tisulară [2,6].

Condiții de preparare a PRP

Au fost studiate numeroase modalități de preparare în încercarea de a oferi o metodă cost-eficientă de obținere a PRP, incluzând filtrarea

Another pathway present in the dermal papilla is the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B (Akt), which promote cell survival and inhibit apoptosis. Numerous recent studies have demonstrated that growth factors in PRP induce hair follicles to enter and maintain the anagen phase by stimulating this pathway. Activation of Akt leads to phosphorylation inhibition of two other signalling pathways – GSK-3 (glycogen synthase kinase-3 β) which is involved in β -catenin degradation (protein involved in cell adhesion and gene transcription) and the Bcl-2 pathway involved in cell apoptosis [3,6,7].

In turn, plasma contains essential factors for cell survival – nutrients, hormones, electrolytes, vitamins and proteins, for coagulation and the formation of fibrin polymers, which will support cell migration and tissue repair [2,6].

PRP preparation conditions

Numerous preparation modalities have been studied in an attempt to provide a cost-effective method of obtaining PRP, including selective

selectivă a sângelui și diferite tehnici de centrifugare. Clasificarea acestor tehnici se face în funcție de contactul sângelui recoltat cu factorii de mediu:

- „Tehnicile închise” implică utilizarea de produse comerciale care poartă marca CE (inclusiv echipamentul folosit la recoltare și centrifugare) și care permit manipularea sângelui și a produsului derivat fără ca acestea să intre în contact cu aerul din cabinet.

- „Tehnicile deschise” expun sângele la contact cu aerul și diferite materiale necesare prelucrării, astfel încât apare pericolul contaminării. Majoritatea produselor disponibile comercial în acest moment se bazează pe tehnica închisă a centrifugării, datorită ușurinței de utilizare și costului mai redus[8,9].

Fiecare tub conține un gel *tixotropic* (un amestec special de polimeri care se poate lichefia reversibil în timpul unei acțiuni mecanice – agitare, ultrasunete, etc) pentru separarea elementelor figurate. Principiul care stă la baza obținerii PRP prin centrifugare este că aceasta determină trombocitele să se depună în stratul profund al plasmăi, separându-se astfel de stratul superficial (care a devenit cunoscut ca Plasmă săracă în trombocite, sau Platelet-Poor Plasma - PPP). În plus, eritrocitele și leucocitele precipită mai repede decât trombocitele, ceea ce a permis dezvoltarea tehnicii de separare din plasmă a diferitelor grupe de elemente. Acest fenomen este guvernat de *Legea lui Stokes* – care afirmă că rata de sedimentare a particulelor într-un mediu lichid se corelează proporțional cu masa acestora și cu forța de sedimentare la care particulele sunt supuse[8].

În prepararea PRP, o *forță de centrifugare* mai mare crește forța de sedimentare și dă naștere unor diferențe între ratele de sedimentare ale eritrocitelor, leucocitelor și trombocitelor, iar o *durată* mai mare a centrifugării garantează capturarea și separarea mai bună a elementelor datorită diferențelor între ratele de sedimentare. Cu toate acestea, în practică, s-a observat că o forță mare de centrifugare aplicată pe o durată mai lungă duce la separarea trombocitelor din plasmă dar și la formarea unui „strat tampon” împreună cu o parte din leucocite, făcând imposibilă separarea suplimentară a elementelor. Astfel, condițiile de centrifugare necesare

blood filtration and various centrifugation techniques. The classification of these techniques is based on the contact of the collected blood with environmental factors:

- “Closed techniques” involve the use of commercially available CE-marked products (including the equipment used for collection and centrifugation) which allow the blood and derived product to be handled without coming into contact with the air in the medical practice.

- “Open techniques” expose the blood to contact with the air and the various materials required for its processing, so that there is a risk of contamination. The majority of currently commercially available products are based on the closed centrifugation technique due to its ease of use and lower cost [8,9].

Each tube contains a *thixotropic* gel (a special mixture of polymers that can be reversibly liquefied during mechanical action – shaking, ultrasound, etc.) for the separation of the figurative elements. The principle behind obtaining PRP by centrifugation is that it causes the platelets to settle in the deep layer of the plasma, thus separating them from the superficial layer (which has become known as Platelet-Poor Plasma - PPP). In addition, erythrocytes and leukocytes precipitate more rapidly than platelets, which allowed the development of the technique of separating different groups of elements from plasma. This phenomenon is governed by *Stokes’ Law* – which states that the sedimentation rate of particles in a liquid medium correlates proportionally to their mass and the sedimentation force to which the particles are subjected [8].

In the preparation of PRP, a higher *centrifugation force* increases the sedimentation force and gives rise to differences in the sedimentation rates of erythrocytes, leukocytes and platelets, while a longer centrifugation *time* ensures better capture and separation of elements due to differences in sedimentation rates. However, in practice, it has been observed that a high centrifugation force applied for a longer time leads to the separation of platelets from the plasma but also to the formation of a “buffer layer” together with part of the leukocytes, making further separation of the elements impossible. Thus, the centrifugation conditions

preparării PRP se află într-un continuu proces de optimizare, ceea ce impune respectarea condițiilor stabilite de fiecare producător în parte în vederea obținerii unui PRP eficient[8,9,10].

Înlăturarea cât mai completă a eritrocitelor din PRP reprezintă o preocupare permanentă, atât pentru producători, cât și pentru medici, datorită efectelor adverse importante pe care prezența acestora le poate determina la reinjectare. Distrugerea eritrocitelor se poate produce în momentul recoltării sângelui și/sau al centrifugării – datorită forțelor de forfecare, respectiv după reinjectare prin diverse procese mediate imun. Hemoliza duce la apariția în plasmă a hemoglobinei libere, unor porfirine și a fierului, cu posibilitatea inducerii stresului oxidativ și reacțiilor pro-inflamatorii. La rândul lor, aceste reacții pot declanșa *eriptoza* (apoptoza eritrocitelor datorită hiperosmolarității, stresului oxidativ, depleției energetice sau expunerii la xenobiotice), cu expunerea pe suprafața membranei a fosfatidilserinei și eliberarea din citoplasmă a Factorului Activator Plachetar (PAF) și a Factorului Inhibitor al migrării Macrofagelor (MIF). Eliberarea PAF poate duce la tulburări ale microcirculației locale, iar MIF a fost identificată ca o citokină pro-inflamatorie foarte potentă. În plus, acești produși de degradare nu pot fi cu ușurință înlăturați prin mecanismele naturale de protecție din matricea extracelulară[11]. Aceste observații fizio-patologice pot sta și la baza cazurilor de hiperpigmentare la nivelul tegumentului, apărute după utilizarea PRP pentru rejuvenare facială, sau în încercarea de a reduce hiperpigmentarea post-proceduri laser. Unii autori atrag atenția asupra acestor cazuri și subliniază că injectările de PRP nu ar trebui utilizate la nivelul feței ca tratament pentru hiperpigmentarea post-inflamatorie[12].

Concentrația trombocitelor în PRP

Concentrația optimă a trombocitelor în plasma separată nu a fost încă stabilită, în ciuda foarte numeroaselor studii efectuate până în prezent (atât in vitro, cât și in vivo) și a varietății domeniilor în care PRP a fost utilizată (dermatologie, chirurgie BMF, ortopedie, etc). Astfel, concentrațiile trombocitelor raportate drept "eficiente" variază, fiind de 2 până la 5 ori mai

necessary for the preparation of PRP are in a continuous process of optimization, which requires compliance with the conditions established by each individual manufacturer in order to obtain an effective PRP [8,9,10].

The complete removal of erythrocytes from PRP is an ongoing concern for both manufacturers and clinicians, due to the significant adverse effects that their presence can cause upon reinjection. Erythrocyte destruction can occur at the time of blood collection and/or centrifugation – due to shear forces, or after reinjection through various immune-mediated processes. Haemolysis leads to the appearance of free haemoglobin, some porphyrins and iron in the plasma, with the possibility of inducing oxidative stress and pro-inflammatory reactions. In turn, these reactions may trigger *erythroptosis* (apoptosis of erythrocytes due to hyperosmolarity, oxidative stress, energy depletion or exposure to xenobiotics), with exposure of phosphatidylserine to the membrane surface and release of Platelet-Activating Factor (PAF) and Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) from the cytoplasm. The release of PAF can lead to disruption of local microcirculation, and MIF has been identified as a very potent pro-inflammatory cytokine. Furthermore, these degradation products cannot be easily removed by natural protective mechanisms in the extracellular matrix [11]. These physio-pathologic observations may also underlie cases of skin hyperpigmentation after the use of PRP for facial rejuvenation, or in an attempt to reduce hyperpigmentation post laser procedures. Some authors draw attention to these cases and emphasize that PRP injections should not be used in the face as a treatment for post-inflammatory hyperpigmentation [12].

Platelet concentration in PRP

The optimal concentration of platelets in separated plasma has not yet been established, despite the very large number of studies performed to date (both in vitro and in vivo) and the variety of fields in which PRP has been used (dermatology, BMF surgery, orthopaedics, etc). Thus, platelet concentrations reported as 'effective' vary, being 2 to 5 times higher than that in collected blood. Most initial studies considered

mari față de cea din sângele recoltat. Majoritatea studiilor inițiale considerau că o concentrație a trombocitelor mai mică de 106/microlitru de plasmă nu este eficientă în declanșarea mecanismelor naturale de vindecare, iar o concentrație mai mare de atât nu pare a fi asociată cu un beneficiu semnificativ. În ultimii ani, pe măsură ce cunoștințele despre utilizarea acestui produs au sporit, au apărut observații în legătură cu cantitatea optimă de factori de creștere eliberată de trombocitele din PRP, ceea ce a deschis calea pentru noi studii, cu rezultate foarte variate, atât pozitive, cât și negative în ceea ce privește eficiența clinică[10,13]. Există corelații semnificative între caracteristicile personale ale pacienților (vârstă, concentrația plachetelor în sângele recoltat, etc) și cantitatea de factori de creștere obținută, ceea ce justifică în mare măsură variațiile observate, atât între diferite produse comerciale, cât și între utilizările consecutive ale aceluiași produs[5]. De asemenea, tehnica de obținere a PRP are un impact semnificativ asupra concentrațiilor de factori de creștere obținute, unele studii foarte recente susținând că tehnicile deschise (cu dublă centrifugare) au rezultate mai bune și mai consistente decât unele kituri comercializate[14].

O meta-analiză recentă cu privire la studiile despre concentrația optimă a trombocitelor (O.K. Straum, 2020) a identificat două principale cauze pentru diversitatea mare a rezultatelor raportate de aceste studii. Concentrația *prea mare* a trombocitelor în soluțiile utilizate (în cazul studiilor in vitro) a dus la o scădere proporțională a nutrienților disponibili pentru creșterea celulară, ceea ce a creat un mediu nefavorabil reparării tisulare. *Cantitatea de leucocite* din PRP a fost determinantă pentru rata de proliferare tisulară observată, datorită factorilor proinflamatori rezultați din degranularea acestora. Astfel, o concentrație mare de leucocite restante a scăzut semnificativ proliferarea, indiferent de cantitatea de trombocite din soluție. În schimb, o concentrație scăzută de leucocite a permis utilizarea PRP cu număr mai mare de trombocite, cu rate mai bune de proliferare tisulară. Concluziile acestei meta-analize sunt următoarele: deși o concentrație de trombocite optimă "universală" a PRP nu poate fi stabilită, există doi factori deosebit de importanți care influențează proliferarea celulară

that a platelet concentration of less than 106/microliter of plasma is not effective in triggering natural healing mechanisms, and a concentration higher than this does not appear to be associated with significant benefit. In recent years, as knowledge about the use of this product has increased, observations on the optimal amount of growth factors released by platelets from PRP have emerged, paving the way for new studies with widely varying results, both positive and negative in terms of clinical efficacy [10,13]. There are significant correlations between the personal characteristics of the patients (age, platelet concentration in the blood collected, etc.) and the amount of growth factors obtained, which largely account for the variations observed, both between different commercial products and between consecutive uses of the same product [5]. Also, the technique used to obtain PRP has a significant impact on the concentrations of growth factors obtained, with some very recent studies claiming that open techniques (double centrifugation) have better and more consistent results than some kits available on the market [14].

A recent meta-analysis on optimal platelet concentration studies (O.K. Straum, 2020) identified two main causes for the large diversity of results reported by these studies. *Too high* a concentration of platelets in the solutions used (in the case of in vitro studies) resulted in a commensurate decrease in nutrients available for cell growth, which created an environment that was unfavourable for tissue repair. The *number of leukocytes* in the PRP was determinant for the observed rate of tissue proliferation, due to proinflammatory factors resulting from their degranulation. Thus, a high concentration of remaining leukocytes significantly decreased proliferation, irrespective of the number of platelets in solution. Conversely, a low leukocyte concentration allowed the use of PRP with higher platelet counts with better tissue proliferation rates. The conclusions of this meta-analysis are as follows: although an optimal "universal" platelet concentration of PRP cannot be established, there are two particularly important factors that influence cell proliferation – 1) the volume of PRP used should be $\leq 10\%$ of the volume of the medium into which it is injected and 2) the

– 1) volumul de PRP utilizat să fie $\leq 10\%$ din volumul mediului în care se injectează și 2) cantitatea de leucocite din PRP ar trebui menținută cât mai scăzută cu putință, preferabil $< 0.1/\mu\text{L}$. Respectarea acestor două condiții ar permite utilizarea unor concentrații de trombocite în PRP spre limita superioară a intervalului considerat optim: $3.7 \times 10^6 \text{ plt}/\mu\text{L}$ (cu o valoare medie în studiile cele mai reprezentative calculată la $2.94 \mu 10^6 \text{ plt}/\text{mL}$) [15].

Factori care influențează viabilitatea plachetară

În literatură există numeroase protocoale referitoare la prepararea PRP. Acestea privesc forța și durata centrifugării, precum și numărul de centrifugări. Modificarea acestor parametri poate duce la obținerea unor concentrații diferite de trombocite. Foarte puține studii, însă, au căutat să ofere o imagine clară asupra proceselor și transformărilor prin care trec plachetele după recoltarea sângelui, până la reutilizare.

Recoltarea sângelui – Procesul de coagulare poate fi declanșat chiar din momentul recoltării sângelui. Pentru a evita activarea neintenționată a plachetelor, este indicată utilizarea unor ace cu calibru mare (de la 22 G în sus - 0,71 mm) [16]. De asemenea, s-a demonstrat că supraviețuirea plachetelor scade pe măsură ce durata recoltării crește [17], ceea ce a dus la formularea recomandării universal acceptate ca obținerea volumului de sânge necesar să se facă în cel mai scurt timp posibil.

Centrifugarea – Forța gravitațională a Pământului este suficientă pentru a separa elementele figurate de plasmă. Sângele anticoagulat păstrat într-un tub vertical se va separa în mod natural în plasmă, leucocite și eritrocite. Cu toate acestea, timpul necesar pentru separare face imposibilă utilizarea în practică a tehnicii. Ținând cont și de degradarea în timp a compușilor biologici, devine evidentă necesitatea unor tehnici de separare mai rapidă [16]. Au apărut astfel numeroase încercări de optimizare a tehnicii, respectiv numeroase protocoale pentru prepararea PRP. Așa cum menționăm anterior, tehnica utilizată poate fi una deschisă, cu una sau două centrifugări succesive ale sângelui recoltat, sau

amount of leukocytes in the PRP should be kept as low as possible, preferably $< 0.1/\mu\text{L}$. Compliance with these two conditions would allow the use of platelet concentrations in PRP towards the upper limit of the range considered optimal: $3.7 \times 10^6 \text{ plt}/\mu\text{L}$ (with a mean value in the most representative studies calculated to be $2.94 \mu 10^6 \text{ plt}/\mu\text{L}$) [15].

Factors Affecting platelet viability

There are numerous protocols for PRP preparation in the literature. These relate to the force and duration of centrifugation, as well as the number of centrifugations. Changing these parameters may result in different platelet concentrations. Very few studies, however, have sought to provide a clear picture of the processes and transformations that platelets undergo after blood collection until reuse.

Blood collection – The clotting process can be triggered at the time of blood collection. To avoid unintentional platelet activation, the use of large gauge needles (from 22 G upwards - 0.71 mm) [16] is indicated. It has also been shown that platelet survival decreases as the duration of blood collection increases [17], leading to the universally accepted recommendation that the required blood volume should be obtained as quickly as possible.

Centrifugation – The Earth's gravitational force is sufficient to separate the figurative elements from plasma. Anticoagulated blood stored in a vertical tube will naturally separate into plasma, leukocytes and erythrocytes. However, the time required for separation makes it impossible to use this technique in practice. Taking also into account the degradation of biological compounds over time, the need for faster separation techniques becomes evident [16]. This has led to numerous attempts to optimize the technique, i.e. numerous protocols for the preparation of PRP. As mentioned above, the technique used may be an open technique, with one or two successive centrifugations of the collected blood, or a closed technique, usually with a single centrifugation – due to the use of thixotropic gels in the collection tubes.

una închisă, de regulă cu o singură centrifugare – datorită utilizării gelurilor tixotropice în tuburile de recoltare.

O meta-analiză a protocoalelor utilizate în perioada 2007-2018 scoate în evidență dificultatea comparării rezultatelor în absența unui protocol comun. Toate tehnicile de centrifugare simplă par să obțină o concentrație de trombocite eficientă clinic. De asemenea, evaluarea eficienței strict prin prisma concentrației factorilor de creștere din PRP poate fi înșelătoare. Concentrația VEGF crește cu creșterea timpului de centrifugare. Dar plachetele sunt foarte fragile, iar o forță de centrifugare prea mare poate duce la alterarea lor, cu degranulare. În concluzie, o tehnică închisă, cu centrifugare simplă pare a fi un compromis bun [18].

Temperatura – Temperatura este unul dintre factorii critici în procesul de obținere a PRP. Pentru a evita activarea plachetelor, ghidul alcătuit de către Asociația Americană a Băncilor de Sânge (American Association of Blood Banks – AABB) recomandă ca sângele să fie centrifugat și manipulat la o temperatură cuprinsă între 22 și 24°C [16].

Anticoagulantul folosit – Utilizarea unui anticoagulant care să nu afecteze morfologia, integritatea și, în final, funcția plachetară este deosebit de importantă. În plus, anticoagulantul trebuie să fie sigur pentru utilizarea in vivo, deci să nu aibă reacții adverse asupra țesuturilor în care se produce administrarea PRP [16,19]. Principalele molecule utilizate sunt EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ACD-A (acid-citrate-dextrose formă A), CTAD (citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole). În studii mai sunt menționate heparina și citratul de sodiu, dar acestea sunt mai rar utilizate în practică [20].

Deși la utilizarea EDTA s-a observat o supraviețuire mai lungă a trombocitelor, morfologia acestora a fost modificată în urma centrifugării (balonizare), ceea ce a ridicat problema păstrării funcției lor după reinjectare [19,21].

Majoritatea autorilor sunt de acord că soluțiile pe bază de *citrat* sunt cele mai indicate pentru obținerea PRP, în special datorită observării unei proliferări mai bune a culturilor de celule stromale mezenchimale (CSM) (comparativ cu EDTA), dar și eliberării unei cantități mai

A meta-analysis of protocols used between 2007-2018 highlights the difficulty in comparing results in the absence of a common protocol. All single centrifugation techniques appear to achieve a clinically effective platelet concentration. Also, assessing efficiency strictly by the concentration of growth factors in PRP can be misleading. VEGF concentration increases with increasing centrifugation time. But the platelets are very fragile, and too high a centrifugation force can lead to their disruption with degranulation. In conclusion, a closed technique with simple centrifugation seems to be a good compromise [18].

Temperature – Temperature is one of the critical factors in the process of obtaining PRP. To avoid platelet activation, the American Association of Blood Banks (AABB) guidelines recommend that blood should be centrifuged and handled at a temperature between 22 and 24°C [16].

Anticoagulant used – The use of an anticoagulant that does not affect platelet morphology, integrity and ultimately platelet function is particularly important. In addition, the anticoagulant must be safe for in vivo use, i.e., not have adverse effects on the tissues in which the PRP is administered [16,19]. The main molecules used are EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ACD-A (acid citrate dextrose solution A), CTAD (citrate theophylline adenosine dipyridamole). Studies also mention heparin and sodium citrate, but these are less commonly used in practice [20].

Although a longer survival of platelets was observed when EDTA was used, their morphology was altered after centrifugation (ballooning), which raised the question of whether their function could be maintained after reinjection [19,21].

The majority of authors agree that *citrate*-based solutions are the most suitable for PRP production, in particular due to the observed better proliferation of mesenchymal stromal cell (MSC) cultures (compared to EDTA) and the release of more growth factors. CTAD appears to be superior to other anticoagulants in terms

mari de factori de creștere. CTAD pare a fi superior celorlalți anticoagulanți din punct de vedere al păstrării integrității structurale a plachetelor, prevenirii activării spontane a acestora și eliberării de TGF- β 1 [19,20,21].

De menționat că morfologia CSM din culturi nu a fost modificată de anticoagulanții utilizați și că rata de proliferare a CSM a fost proporțională doar cu concentrația în trombocite a plasmei adăugate[21].

Activarea PRP – Activarea PRP înainte de reinjectare este un alt parametru aflat permanent în discuție. Exogen, PRP poate fi activată prin adăugarea de trombină, clorură de calciu (CaCl₂), sau expunerea la forțe mecanice. Pe de altă parte, collagenul este un activator natural al PRP, ceea ce i-a făcut pe unii autori să susțină că este inutilă activarea PRP înainte de injectarea în țesuturi[22].

Termenul de „activare” se referă la două procese cheie care sunt inițiate în momentul preparării PRP: (1) degranularea plachetelor, cu eliberarea factorilor de creștere din granulele α și (2) ruperea fibrinogenului cu inițierea coagulării, un proces care contribuie la reținerea acestor factori la locul injectării[23]. S-a demonstrat că modalitatea de activare influențează net formarea rețelei de fibrină, ceea ce duce la diferențe atât din punct de vedere al cantităților de factori de creștere eliberați, cât și al cineticii eliberării lor. Collagenul (de tip I) s-a dovedit *in vitro* a fi un activator mai slab al plachetelor în comparație cu trombina și CaCl₂. Trombina și collagenul de tip I au produs descărcări imediate de PDGF și TGF- β 1 – care au rămas constante timp de 24 de ore. În același interval, VEGF a avut un trend crescător, începând de la 15 minute după injectare. CaCl₂ a indus o eliberare progresivă a tuturor factorilor de creștere începând la 15 minute după injectare[24]. Cum factorii de creștere sunt molecule cu timp de înjumătățire scurt (minute sau ore), dacă nu sunt utilizați imediat după eliberarea din plachete, aceștia pot fi degradați înainte ca noi receptori tisulari să devină disponibili[25]. Unii autori atrag atenția și asupra faptului că o cantitate prea mare de factori de creștere, eliberați prea rapid în țesut pot avea un efect inhibitor asupra funcțiilor celulare și proceselor de vindecare, cu accentuarea răspunsului inflamator și a fibrozei. Se pune astfel

of maintaining platelet structural integrity, preventing spontaneous platelet activation and TGF- β 1 release [19,20,21].

Of note, the morphology of MSCs in culture was not altered by the anticoagulants used and the rate of MSC proliferation was proportional only to the platelet concentration of the added plasma [21].

PRP activation – PRP activation prior to reinjection is another parameter that is constantly under discussion. Exogenously, PRP can be activated by the addition of thrombin, calcium chloride (CaCl₂), or exposure to mechanical forces. Collagen, on the other hand, is a natural activator of PRP, which has led some authors to argue that it is unnecessary to activate PRP prior to tissue injection [22].

The term “activation” refers to two key processes that are initiated at the time of PRP preparation: (1) degranulation of platelets, with the release of growth factors from α -granules, and (2) fibrinogen breakdown with the initiation of coagulation, a process that contributes to the retention of these factors at the injection site[23]. The mode of activation has been shown to have a net influence on fibrin network formation, leading to differences in both the amounts of growth factors released and the kinetics of their release. Collagen (type I) was shown *in vitro* to be a weaker activator of platelets compared to thrombin and CaCl₂. Thrombin and type I collagen produced immediate PDGF and TGF- β 1 release – which remained constant for 24 hours. During the same interval, VEGF showed an increasing trend, starting 15 minutes after injection. CaCl₂ induced a progressive release of all growth factors starting 15 minutes after injection [24]. As growth factors are molecules with short half-lives (minutes or hours), if they are not utilized immediately after release from platelets, they may be degraded before new tissue receptors become available [25]. Some authors also draw attention to the fact that too much growth factor released too quickly into the tissue may have an inhibitory effect on cellular functions and healing processes, with increased inflammatory response and fibrosis. This raises

problema alegerii activatorului care să ofere posibilitatea eliberării moleculelor bioactive în concordanță cu nevoile țesutului țintă[24,25].

Selectarea pacienților

Utilizarea PRP este o tehnică invazivă, iar discuțiile asupra siguranței, eficienței, eticității și chiar legalității acesteia sunt întâlnite atât în sectoarele medicale din al căror arsenal terapeutic face parte, cât și în medicina legală, respectiv comisii de etică și bioetică[26,27].

Fiind produse autologe, incluse în categoria ortobiologicelor, PRP și produsele derivate sunt mult mai sigure în utilizare decât oricare alte produse omologe sau allogenice și nu prezintă riscul transmiterii unor boli precum hepatită, HIV, febra West Nile, etc. De asemenea, sunt excluse problema formării de anticorpi și riscul de apariție a bolii grefă contra gazdă. Acest profil de siguranță deosebit face din PRP un produs ușor de acceptat și chiar cerut de pacienți, numărul cazurilor raportate cu reacții adverse fiind foarte scăzut[26]. Cu toate acestea, nu pot fi ignorate posibilele reacții adverse legate fie de calitatea produsului în sine (inflamația post-injectare în cazul unui număr mare de leucocite rămase în plasmă, hiperpigmentarea dată de degradarea în țesut a eritrocitelor restante, reacțiile de corp străin posibile în cazul în care micro-particule din gelul de separare sunt prinse în stratul tampon alături de trombocite), fie de siguranța în administrare (infecțiile, în cazul kiturilor neconforme). Deși foarte rare, au fost descrise reacții alergice declanșate de anticoagulantul utilizat de producători în kiturile de PRP[27,28]. Nu în ultimul rând, trebuie menționate reacțiile locale datorate injectării propriu-zise, cum ar fi sângerările punctiforme (*pinpoint bleeding*), echimozele, edemul tranzitor, durerea la locul injectării – care poate dura până la trei zile, eritemul, pruritul moderat și senzația de tensiune în scalp[29].

Numeroase studii clinice au evaluat eficacitatea utilizării PRP în diferite sectoare, de la medicina sportivă la dermatologie, rezultatele fiind atât pozitive, cât și negative. Încă nu au fost efectuate studii prospective mari, controlate placebo, însă părerea majorității practicienilor este că utilizarea PRP le poate aduce beneficii pacienților. În acest context s-a pus inclusiv

the question of choosing an activator that offers the possibility of releasing bioactive molecules according to the needs of the target tissue [24,25].

Patient selection

The use of PRP is an invasive technique, and discussions on its safety, efficacy, ethicality and even legality are common both in the medical sectors of which it is part of the therapeutic arsenal, and in forensic medicine, i.e. ethics and bioethics committees [26,27].

As autologous products, included in the category of orthobiologics, PRP and derived products are much safer to use than any other homologous or allogeneic products and do not carry the risk of transmitting diseases such as hepatitis, HIV, West Nile fever, etc. They also exclude the problem of antibody formation and the risk of graft-versus-host disease. This particular safety profile makes PRP a product that is easily accepted and even requested by patients, with very few reported cases of adverse reactions [26]. However, possible adverse reactions related either to the quality of the product itself (post-injection inflammation in case of a large number of leukocytes remaining in the plasma, hyperpigmentation due to tissue degradation of the remaining erythrocytes, possible foreign body reactions if micro-particles of the separating gel are trapped in the buffer layer together with platelets) or to the safety of administration (infections in case of non-compliant kits) cannot be ignored. Although very rare, allergic reactions triggered by the anticoagulant used by manufacturers in PRP kits have been described [27,28]. Last but not least, local reactions due to the injection itself should be mentioned, such as pinpoint bleeding, ecchymosis, transient oedema, pain at the injection site – which may last up to three days, erythema, moderate pruritus and a feeling of tension in the scalp [29].

Numerous clinical trials have evaluated the effectiveness of PRP use in various sectors, from sports medicine to dermatology, with both positive and negative results. Large prospective placebo-controlled studies have not yet been conducted, but most practitioners do consider that the use of PRP can benefit patients. In this

problema *eticității și legalității* utilizării PRP în condițiile în care nu le putem garanta pacienților că tratamentul va da rezultate. Codorean și colaboratorii susțin ideea că pentru un pacient corect și complet informat în legătură cu tehnologia folosită, modul în care decurge procedura, rezultatele posibile ale tratamentului și informațiile disponibile în literatură, reacțiile adverse posibile și contraindicațiile pentru procedură, utilizarea PRP este legală și etică[27].

Contraindicațiile utilizării PRP sunt următoarele:

Contraindicații *absolute*: sindrom de disfuncție plachetară, trombocitopenie critică, instabilitate hemodinamică, septicemia și infecțiile la locul injectării, terapia cu anticoagulate (warfarină, dabigatran, heparină).

Contraindicații *relative*: HGB < 10 g/dl, Trombocite < 105 / μ l, utilizarea AINS în ultimele 48 de ore înainte de procedură, utilizarea corticosteroizilor sistemici în ultimele 2 săptămâni, sau a injectării locale de corticosteroizi în ultima lună înainte de procedură, neoplazii – în special cele hematologice, hipofibrinogenemia, boli hepatice cronice, sarcina și alăptarea[26,27,30].

Multe studii, atât clinice, cât și de laborator, au încercat să clarifice rolul medicamentelor cu efecte directe sau indirecte asupra funcțiilor plachetare în situația recurgerii la PRP. Dintre acestea, AINS și antihistaminicele au prezentat un interes deosebit.

Aspirina, ca exponent al clasei sale, este foarte frecvent utilizată în populație tocmai datorită efectului de inhibare a agregării plachetare. Ea blochează conversia acidului arahidonic în prostaglandine proinflamatorii prin inhibarea ireversibilă a ciclooxigenazei 1 (COX-1). Este demonstrat că eliberarea de factori de creștere din PRP depinde de agregarea trombocitelor[31]. S-a pus astfel problema dacă utilizarea aspirinei poate influența cantitatea de factori de creștere din PRP proaspăt preparată[31,32]. Conform observațiilor făcute de Jayaram și colaboratorii, utilizarea aspirinei în doză mică (81 mg) timp de 14 zile înainte de PRP nu a modificat numărul de trombocite sau leucocite din sângele integral sau din plasmă. A apărut, însă, o scădere semnificativă a factorilor de creștere urmăriți (VEGF, PDGF și TGF- β 1), scădere corelată și cu modalitatea aleasă de

context, the question of the *ethicality and legality* of PRP use has also been raised, as patients cannot be guaranteed that the treatment will work. Codorean et al. argue that the use of PRP is legal and ethical for a patient who is correctly and fully informed about the technology used and the performed procedure, the possible outcomes of the treatment and the information available in the literature, possible side effects and contraindications to the procedure [27].

Contraindications for PRP use are as follows:

Absolute contraindications: platelet dysfunction syndrome, critical thrombocytopenia, hemodynamic instability, sepsis and injection site infections, anticoagulant therapy (warfarin, dabigatran, heparin).

Relative contraindications: HGB < 10 g/dl, Platelets < 105 / μ l, use of NSAIDs in the last 48 hours before the procedure, use of systemic corticosteroids in the last 2 weeks, or local corticosteroid injection in the last month before the procedure, neoplasms – especially haematologic, hypofibrinogenemia, chronic liver disease, pregnancy and breastfeeding [26,27,30].

Many studies, both clinical and laboratory, have attempted to clarify the role of drugs with direct or indirect effects on platelet function in the PRP setting. Of these, NSAIDs and antihistamines have been of particular interest.

Aspirin, as an exponent of its class, is very commonly used in the general population precisely due to its effect of inhibiting platelet aggregation. It blocks the conversion of arachidonic acid to proinflammatory prostaglandins by irreversible inhibition of cyclooxygenase 1 (COX-1). The release of growth factors from PRP has been shown to be dependent on platelet aggregation[31]. This raised the question of whether the use of aspirin can influence the amount of growth factors in freshly prepared PRP [31,32]. As observed by Jayaram et al., the use of low-dose aspirin (81mg) for 14 days prior to PRP preparation did not alter the number of platelets or leukocytes in whole blood or plasma. There was, however, a significant decrease in the growth factors that were expressed (VEGF, PDGF and TGF- β 1), which was also correlated with the chosen mode of PRP activation. The authors

activare a PRP. Autorii subliniază necesitatea efectuării de studii clinice pentru a determina semnificația acestor observații *in vivo* [32].

Spre deosebire de AINS, antihistaminicele H1, în special cele de generația I, inhibă *in vitro* agregarea plachetară prin inhibarea unor sisteme din interiorul trombocitelor (probabil fosfolipaza A2). Efectul este mult mai scăzut pentru moleculele din generația a II-a (având ca reprezentant Loratadina), iar când acest efect este studiat în plasmă sau sânge integral, adică atunci când mediul extra-plachetar conține proteine, acesta devine aproape nesemnificativ la dozele terapeutice uzuale. Observația a fost pusă pe seama legării Loratadinei de proteinele plasmatică [33,34].

Discuții

Din dorința de a oferi produse cât mai eficiente clinic la un preț cât mai atractiv, numeroși producători au dezvoltat și patentat sisteme complete de preparare a PRP. Astfel, ne confruntăm cu o mare variabilitate a echipamentelor necesare, parametri de centrifugare diferiți de la un producător la altul, toate acestea având o influență directă asupra degranulării trombocitelor și implicit asupra rezultatelor clinice obținute.

Lipsa de standardizare a produselor de PRP face ca succesul observat pentru un anumit produs într-o patologie specifică să nu poată fi extins automat la toată gama.

În același timp, continuă să existe diferențe de opinie între specialiști în legătură cu indicațiile de utilizare a PRP în diferite afecțiuni. Un exemplu grăitor ar fi utilizarea PRP în alopecia areata (AA). Aceasta aparține grupului de alopecii mediate imun și continuă să reprezinte o provocare terapeutică, deoarece numeroase tratamente dau rezultate sub așteptări, în timp ce reacțiile adverse pot fi importante [35]. În plus, prezintă rate mari de recădere și respectiv de remisiune spontană, ceea ce a făcut și mai dificilă tentativa de a evalua obiectiv eficacitatea tratamentului. Majoritatea publicațiilor care susțin utilizarea PRP în AA reprezintă studii de caz, sau studii pe grupuri mici de pacienți, fără grupuri de control, ceea ce ridică probleme și în efectuarea meta-analizelor. Cele mai recente dintre acestea nu au reușit să dovedească eficacitatea

emphasize the need for clinical studies to determine the significance of these observations *in vivo* [32].

In contrast to NSAIDs, H1 antihistamines, in particular generation I antihistamines, inhibit *in vitro* platelet aggregation by inhibiting systems within platelets (probably phospholipase A2). The effect is much lower for second-generation molecules (with Loratadine as representative), and when this effect is studied in plasma or whole blood, i.e., when the extra-platelet medium contains proteins, it becomes almost insignificant at usual therapeutic doses. The observation has been attributed to the binding of loratadine to plasma proteins [33,34].

Discussions

Out of a desire to offer the most clinically-effective products at the most attractive price, many manufacturers have developed and patented complete PRP preparation systems. Thus, we are faced with a great variability in the equipment required, different centrifugation parameters from one manufacturer to another, all of which have a direct influence on platelet degranulation and therefore on the clinical results obtained.

The lack of standardization of PRP products means that the success observed for a particular product in a specific pathology cannot be automatically extended to the whole range.

At the same time, there continue to be differences of opinion among specialists about the indications for using PRP in different conditions. A striking example is the use of PRP in alopecia areata (AA). This belongs to the group of immune-mediated alopecias and continues to represent a therapeutic challenge, as many treatments underperform, while side effects can be significant [35]. In addition, they have high rates of relapse and spontaneous remission respectively, which has made it even more difficult to objectively assess the efficacy of treatment. The majority of publications supporting the use of PRP in AA represent case studies, or studies in small groups of patients without control groups, which also raises problems in performing meta-analyses. The most recent of these have failed to prove the efficacy of PRP in this condition and emphasize the need for

PRP în această afecțiune și subliniază necesitatea standardizării protocoalelor ca o condiție pentru stabilirea unor recomandări[35,36,37].

Ținând cont și de mecanismele fiziopatologice, de rolul dovedit prin numeroase studii al IL-6 în AA - nivelul seric al acesteia fiind corelat inclusiv cu durata bolii[38,39], respectiv de faptul că administrarea PRP crește semnificativ nivelul IL-6 și al altor molecule pro-inflamatorii[40], este opinia autorilor acestui articol că PRP ar trebui utilizată cu reținere ca mijloc terapeutic pentru alopecia areata, eventual după remiterea fazei inflamatorii.

Nu în ultimul rând, preocuparea pentru acest domeniu derivă direct și din interesul manifestat la nivel global de către pacienți din ce în ce mai informați. În diseminarea informațiilor au jucat un rol foarte important atât producătorii, prin intermediul mass-media și al platformelor de socializare, cât și medicii care oferă astfel de proceduri. Drept dovadă, dacă piața globală pentru PRP în anul 2009 a fost evaluată la 45 milioane de dolari, în 2017 valoarea acesteia a ajuns la 195,2 milioane, cu mult peste estimările făcute în etapele inițiale ale lansării acestui tip de produse. Iar, plecând de la bilanțul anului 2019 (211,96 milioane de dolari) și luând în considerare sporirea interesului pentru mijloacele medicale cât mai avansate din punct de vedere tehnologic, este estimată o *rată de creștere anuală compusă* (CAGR) de 11,6%, astfel încât în anul 2026 piața globală pentru PRP să ajungă la aproximativ 543,5 milioane de dolari, iar în anul 2030 la 715,65 milioane de dolari[41,42].

Din punct de vedere al deontologiei medicale, procedurile care folosesc PRP trebuie susținute de diagnosticul și mecanismul patogen al afecțiunii de tratat, iar calitatea dispozitivelor folosite pentru obținerea PRP să fie susținută de dovezi clare asupra concentrației, purității și viabilității trombocitelor obținute.

standardization of protocols as a precondition for establishing recommendations [35,36,37]

Taking into account the pathophysiological mechanisms, the role of IL-6 in AA proven by numerous studies - its serum level being correlated with disease duration(38,39), and the fact that PRP administration significantly increases the level of IL-6 and other pro-inflammatory molecules, respectively[40], the authors of this article are of the opinion that PRP should be used with restraint as a therapeutic agent for alopecia areata, possibly after the inflammatory phase has subsided.

Last but not least, the concern in this area also derives directly from the global interest shown by increasingly informed patients. Both manufacturers, through the media and social media platforms, and doctors who offer such procedures have played a very important role in disseminating information. As proof of this, if the global PRP market in 2009 was valued at 45 million dollars, in 2017 its value reached 195.2 million dollars, well above the estimates made in the initial stages of the launch of this type of products. Starting from the balance of 2019 (211.96 million dollars) and considering the growing interest in the most technologically advanced medical means, a *compound annual growth rate* (CAGR) of 11.6% is evaluated, so that in 2026 the global market for PRP is estimated to reach approximately 543.5 million dollars, and in 2030 715.65 million dollars [41,42].

In terms of medical ethics, procedures using PRP must be supported by the diagnosis and pathogenic mechanism of the condition to be treated, and the quality of the devices used to obtain PRP must be sustained by clear evidence of the concentration, purity, and viability of the platelets obtained.

Bibliografie / Bibliography

1. M.A Gkini, A.E Kouskoukis, G. Tripsianis et al. Study of Platelet-Rich Plasma Injections in the Treatment of Androgenetic Alopecia Through an One-Year Period. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 Oct-Dec; 7(4): 213–219.
2. R. Dhillon, E. Schwarz, M. Maloney - Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther.* 2012; 14(4): 219.
3. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord.* 2018 Jan;4(1):18-24.

4. Everts P, Onishi K et al. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 21;21(20):7794.
5. Taniguchi, Y., Yoshioka, T., Sugaya, H. et al. Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *J Exp Ortop* 2019; 6, 4.
6. Tsai FM, Li CH, et al. Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediates Ebastine-Induced Human Follicle Dermal Papilla Cell Proliferation. *Biomed Res Int.* 2019 Feb 11: 6360503.
7. Gupta AK, Carviel J. A Mechanistic Model of Platelet-Rich Plasma Treatment for Androgenetic Alopecia. *Dermatol Surg.* 2016 Dec;42(12):1335-1339.
8. Wenjing Yin, Haitao Xu, Jiagen Sheng et al. Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med.* 2017 Sep; 14(3): 2060–2070.
9. Gentile P, Calabrese C, et al. Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Autologous Non-Activated Platelet-Rich Plasma (A-PRP) and Activated Platelet-Rich Plasma (AA-PRP) in Plastic Surgery: Wound Healing and Hair Regrowth Evaluation. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 9;21(2):431.
10. B. Dernek, F.N. Kesiktas, T.M. Duymus et al. Effect of platelet concentration on clinical improvement in treatment of early stage-knee osteoarthritis with platelet-rich plasma concentrations. *J Phys Ther Sci.* 2017 May; 29(5): 896–901.
11. Everts PA, Malanga GA, Paul RV, et al. Assessing clinical implications and perspectives of the pathophysiological effects of erythrocytes and plasma free hemoglobin in autologous biologics for use in musculoskeletal regenerative medicine therapies. A review. *Regen Ther.* 2019 May 10;11:56-64.
12. Uysal CA, Ertas NM. Platelet-Rich Plasma Increases Pigmentation. *J Craniofac Surg.* 2017 Nov;28(8):e793.
13. Graziani F, Ivanovski S, Cei S. et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Apr;17(2):212-9.
14. Gupta V, Parihar AS, et al. Comparison of Platelet-Rich Plasma Prepared Using Two Methods: Manual Double Spin Method versus a Commercially Available Automated Device. *Indian Dermatol Online J.* 2020 Jul 13;11(4):575-579.
15. Straum O.K. The optimal platelet concentration in platelet – rich plasma for proliferation of human cells in vitro – diversity, biases, and possible basic experimental principles for further research in the field: A review. *PeerJ* 8:e10303.
16. 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.
17. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J Extra Corpor Technol.* 2004 Sep;36(3):250-4. PMID: 15559743.
18. B. Croisé, A. Paré, et al. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review, *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 2020;121,2:150-4.
19. Aizawa H, Kawabata H, et al. Comparative Study of The Effects of Anticoagulants on Pure Platelet-Rich Plasma Quality and Potency. *Biomedicine.* 2020 Feb 25;8(3):42.
20. Hua L, Lai G, et al. The study of anticoagulants selection in platelet-rich plasma preparation. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2015. Jul;31(4):295-300.
21. do Amaral RJ, da Silva NP, et al. Platelet-Rich Plasma Obtained with Different Anticoagulants and Their Effect on Platelet Numbers and Mesenchymal Stromal Cells Behavior In Vitro. *Stem Cells Int.*; 2016:7414036.
22. Marlovits S, Mousavi M, Gabler C, Erdös J, Vécsei V, et al. A newsimplified technique for producing platelet-rich plasma: A short technical note. *Eur Spine J.* 13:102–06.
23. Wasterlain A. S., Braun H. J., Dragoo J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 2012;22(1):33–42.
24. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6591717.
25. Harrison S., Vavken P., Kevy S., et al. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *The American Journal of Sports Medicine.* 2011;39(4):729–734.
26. A. Ranaweera et al. Platelet-rich plasma (Internet) <https://dermnetnz.org/topics/platelet-rich-plasma-dermatological-applications/> Accesat: iun.2021
27. I.B. Codorean, E. Cernat, D. Popescu et al. Legal and ethical aspects of Platelet-Rich Plasma. *Rom J Leg Med* 2017; (25) 405-408
28. Latalski M, Walczyk A, et al. Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP): Case report. *Medicine (Baltimore).* 2019 Mar;98(10)

29. Mercuri S.R, Paolino G, Di Nicola M.R et al. Investigating the Safety and Efficacy of Platelet-Rich Plasma (PRP) Treatment for Female Androgenetic Alopecia: Review of the Literature. *Medicina* 2021, 57, 311.
30. Quan Dang Le What are contraindications for platelet-rich plasma (PRP) knee injections? (Internet) Aug, 2018 <https://www.medscape.com/answers/1997643-101173/what-are-contraindications-for-platelet-rich-plasma-prp-knee-injections> Accesat: iun.2021
31. Jayaram P, Yeh P, Cianca J. Platelet-rich plasma protocols can potentiate vascular emboli: Contraindications to platelet-rich plasma. *J Int Soc Phys Rehabil Med* 2019;2:104-6.
32. Jayaram P, Yeh P, Patel S et al. Effects of Aspirin on Growth Factor Release From Freshly Isolated Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma in Healthy Men: A Prospective Fixed-Sequence Controlled Laboratory Study. *Am J Sports Med*. 2019 Apr;47(5):1223-1229.
33. Nosál R, Jancinová V, Petříková M. Ovplyvnenie stimulovaných funkcií krvných doštičiek antihistaminikami [The effect of antihistamines on stimulated blood platelet functions]. *Cesk Fysiol*. 1995 Mar; 44(1):21-3. Slovak. PMID: 7758143.
34. Petříková, M & Jancinová, Viera & Nosál, et al. (2006). H-1-antihistamines and activated blood platelets. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society* ... [et al.]. 55 Suppl 1. S51-2. 10.1007/s00011-005-0038-9.
35. Tejapira K, Yongpisarn T, Sakpuwadol N, Suchonwanit P. Platelet-rich plasma in alopecia areata and primary cicatricial alopecias: A systematic review. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Nov 24;9:1058431. doi: 10.3389/fmed.2022.1058431. PMID: 36507528; PMCID: PMC9731377.
36. Todorova LN, Abadjieva TI. Platelet-Rich Plasma in Alopecia areata: A Case Report With a Mini Review of Literature. *Cureus*. 2023 May 9;15(5):e38751. doi: 10.7759/cureus.38751. PMID: 37303356; PMCID: PMC10248741.
37. Hind M. Almohanna, Azhar A. Ahmed, Jacob W. Griggs, Antonella Tosti, Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Alopecia Areata: A Review, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Volume 20, Issue 1, 2020, S45-S49, ISSN 1087-0024.
38. Waškiel-Burnat A, Osińska M, Salińska A et al. The Role of Serum Th1, Th2, and Th17 Cytokines in Patients with Alopecia Areata: Clinical Implications. *Cells*. 2021; 10(12):3397. <https://doi.org/10.3390/cells10123397>
39. Wali, Sobia & Pirzadeh, Muhammad. (2024). To evaluate the role of interleukin-6 in alopecia areata. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 74. 930-933. 10.47391/JPMA.10284.
40. de Melo Viveiros, M.E., Viveiros, M.M.H., da Silva, M.G. et al. In vitro effect of triamcinolone and platelet-rich plasma on cytokine levels of elbow lateral epicondylitis-derived cells. *J Orthop Surg Res* 17, 94 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13018-022-02990-0>
41. Platelet-rich Plasma Market - "Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2018 – 2026" (Internet) t.ly/r8JO Accesat: sept.2019
42. Precedence Research - "Platelet Rich Plasma Market Size, Share, Growth, Trends, Segmentation, Regional Outlook and Forecasts 2021 - 2030" (Internet) t.ly/udMG Accesat: mar.2021.

Conflict de interese
NEDECLARATE

Conflict of interest
NONE DECLARED

Adresa de corespondență: Egoclinic – Calea Plevnei nr. 82, București
office@egoclinic.ro

Correspondance address: Egoclinic – Calea Plevnei nr. 82, Bucharest
office@egoclinic.ro

ERATĂ / AN ERRATUM

REZULTATE ȘI CARACTERISTICI ALE CANCERELOR DE PIELE NON-MELANONCITARE ȘI ALE KERATOZEI ACTINICE LA UN PACIENT CU MIELOFIBROZĂ ÎN TRATAMENT CU FEDRATINIB

RESULTS AND CHARACTERISTICS OF NON-MELANOCYTIC SKIN CANCERS AND OF ACTINIC KERATOSIS IN A PATIENT WITH MYELOFIBROSIS UNDER TREATMENT WITH FEDRATINIB

1. Pagina (page) 16

- and basal cell carcinoma on the left shoulder.
- și carcinom bazocelular la nivelul umărului stâng.

2. Pagina (page) 18

- On histopathological examination were identified lesions of actinic keratosis surrounding the SCC (Figure 10 and Figure 11), and on the left infraorbital region of ulcerated Bowenoid actinic keratosis was diagnosed (Figure 12).
- La examinarea histopatologică s-au identificat leziuni de keratoză actinică asociate leziunilor de carcinom scuamos (Figurile 10 și 11), iar la nivelul regiunii infraorbitale stângi s-a evidențiat keratoză actinică ulcerată bowenoidă, aspect prezentat în (Figura 12).

Skin lesion location	Biopsy	Excision	TNM staging
Right preauricular	Well differentiated squamous cell carcinoma, with superficial invasion	Well differentiated squamous cell carcinoma, keratoacantoma-like, with in situ lesion and multifocal, bowenoid and proliferative actinie keratosis	pT1
Nasolabial fold - superior	benign	Intradermal nevus	benign
Nasolabial fold - inferior	Basal cell carcinoma	Multifocal nodular basal cell carcinoma	pT1
Presternal	Well differentiated squamous cell carcinoma	Well differentiated squamous cell carcinoma with in situ lesion and proliferative actinie keratosis. Lympho-vascular invasion + (LVI 1) Perineural invasion + (Pnl)	pT1
Left shoulder	Basal cell carcinoma	Ulcerated nodular basal cell carcinoma	pT1
Left infraorbital	Actinie keratosis with plasmocytosis	Ulcerated bowenoid actinie keratosis	pre malignant

Regiune anatomică	Biopsie	Excizie	Stadializarea TNM
Preauriculară dreaptă	Carcinom scuamos bine diferențiat, invaziv superficial	Carcinom scuamos bine diferențiat, keratoacantoma-like, cu leziuni asociate de carcinom in situ (intraepitelial), keratoză actinică bowenoidă și proliferativă, cu caracter multifocal	pT1
Șanț nazolabial superior	Benign	Nev intradermic	Benign
Șanț nazolabial inferior	Carcinom bazocelular	Carcinom bazocelular nodular, multifocal	pT1
Presternal	Carcinom scuamos bine diferențiat	Carcinom scuamos bine diferențiat, cu leziuni asociate de carcinom în situ, keratoză actinică proliferativă; invazie limfo-vasculară prezentă (LVI 1), invazie perineurală prezentă (Pnl)	pT1
Umărul stâng	Carcinom bazocelular	Carcinom bazocelular, nodular, ulcerat	pT1
Infraorbital stâng	Keratoză actinică cu plasmocitoză	Keratoză actinică bowenoidă ulcerată	pre malignă

Pagina (page) 19

- Fig 6. Well differentiated squamous cell carcinoma, H.E x 20.
Fig 6. Carcinom scuamos bine diferențiat, col H.E x 20.
- Fig 7. Well differentiated squamous cell carcinoma, H.E x 10.
Fig 7. Carcinom scuamos bine diferențiat, col H.E x 10.
- Fig. 8. Adipose tissue invasion of squamous cell carcinoma.
Fig 8. Carcinom scuamos cu invazie în țesutul adipos.
- Fig. 9. Small nerve bundle with perineural invasion of squamous cell carcinoma (nerve bundle diameter < 0.1 mm)
Fig 9. Invazie perineurală de carcinom scuamos (filet nervos < 0.1 mm)
- Fig. 11. Proliferative actinic keratosis, H.E x 10.
Fig 11. Keratoză actinică proliferativă, col. H.E x 10.

Pagina (page) 20

- Fig. 12. Ulcerated bowenoid actinic keratosis, H.E x 10.
Fig. 12. Keratoză actinică bowenoidă ulcerată, H.E x 10.