

## BIOMIMETIC-PRP

*Maurizio Ceccarelli, Marco Metalla*

### Premessa

Recentemente, in Italia, si è acuito il controllo sull'uso del PRP nell'ambito medico. Numerosi controlli hanno portato a chiusura di centri medici, a multe e a denunce penali.

La legislazione italiana, a differenza di quella di altri paesi, richiede un'autorizzazione rilasciata dalla ASL e dal relativo centro trasfusionale ad un ambulatorio medico. Detta autorizzazione prevede l'uso di centrifughe certificate, kit certificati e di un registro pazienti, oltre al pagamento di una tassa annuale.

Tutto ciò ha portato alla limitazione dell'uso medico del PRP riservandolo solo a grandi centri medici e, visti i costi conseguenti, a pazienti con disponibilità economica.

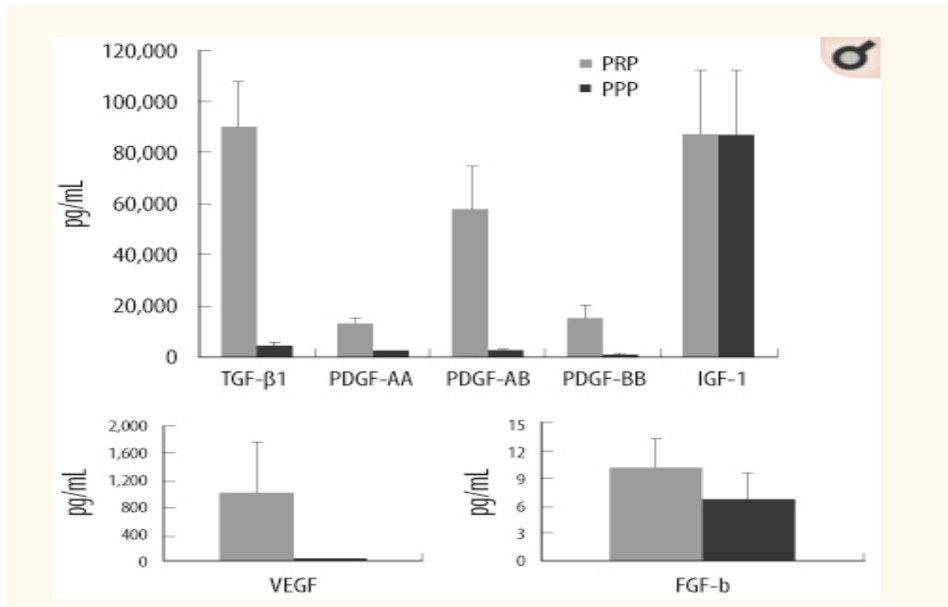
Contemporaneamente, lo studio della funzione e della struttura molecolare delle molecole attive (growth factor, citochine) ha avuto un notevole sviluppo e ha portato alla individuazione della porzione molecolare attiva di queste proteine, mettendo a punto delle preparazioni industriali costituite solo dalla sequenza aminoacidica capace di stimolare il recettore: i, così detti, peptidi attivi.

Sulle basi di quanto esposto, il nostro gruppo scientifico ha approfondito la possibilità di preparare un PRP sintetico, pronto per l'uso.

### II PRP

Con l'acronimo PRP si indica Platelets Rich Plasma (Plasma Ricco in Piastrine), cioè una preparazione di laboratorio che consente l'incremento del numero di piastrine del paziente, tramite centrifugazione, per ottenere, successivamente e tramite l'attivazione della degranolazione piastrinica, un'elevata concentrazione di fattori di crescita utili a stimolare corrette funzioni proliferative e metaboliche delle cellule (fibroblasti, condroblasti, etc.).

L'esame quantitativo dei fattori liberati ci evidenzia che il fattore a maggior concentrazione presente nel PRP (Plasma Ricco di Piastrine) è il TGF-beta 1, oltre all'IGF-1. Presente anche nel PPP (Plasma Povero di Piastrine).

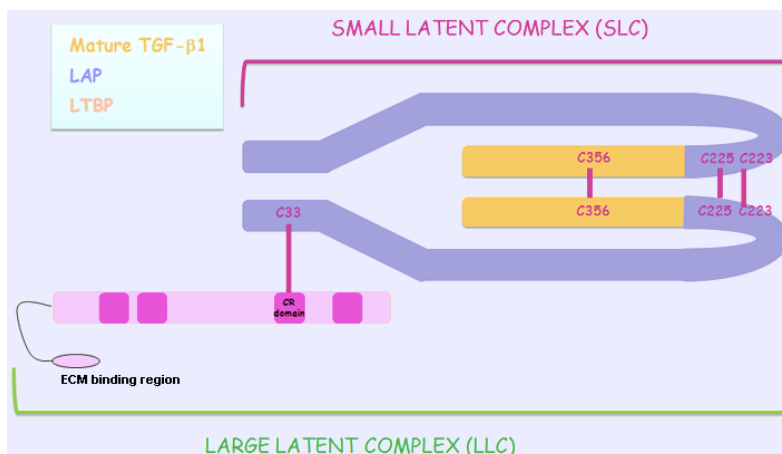


Questi due fattori raggiungono nel PRP una concentrazione di circa 90.000 pg/ml, ciascuno. Facendogli attribuire una notevole importanza nella risposta clinica del PRP.

## Il TGF beta-1

TGF-β1 è una citochina dimerica collegata insieme da legami di disolfuro intramolecolare di un nodo di cisteina.

È sintetizzato come una proteina precursore di 390 amminoacidi (piccolo complesso latente (SLC)) con un peso molecolare di 25 kDa. Questo è un monomero con tre parti distinte: il peptide segnale (SP: amminoacidi 1-29), il peptide associato alla latenza (LAP: amminoacidi 30-278) e il peptide maturo (TGF-β1 maturo: amminoacidi 279-390).

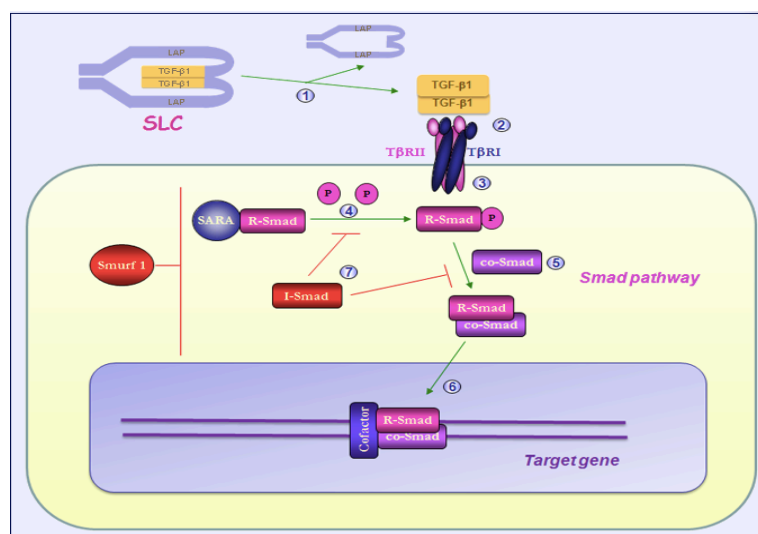


L'SLC si associa a una proteina legante che aiuta nella secrezione di SLC nella matrice extracellulare.

Il TGF- $\beta$ 1 è un fattore di crescita ubiquitariamente espresso. Viene secreto come precursore inattivo legato al Peptide Associato alla Latenza (LAP), formando il complesso chiamato Small Latent Complex (SLC). Il TGF- $\beta$ 1 attivo, liberato come SP, ha un'emivita di circa due minuti.

Il TGF- $\beta$ 1 ha un ruolo importante nel controllo dello sviluppo e della riparazione dei tessuti.

Il TGF- $\beta$ 1 attivo viene rilasciato come dimero e si lega al recettore TGF- $\beta$  di tipo I della serina-treonina chinasi (T $\beta$ RI). Questo complesso attiva i percorsi SMAD. I complessi R-SMAD/coSMAD si accumulano nel nucleo dove interagiscono con il DNA e altri fattori di trascrizione e partecipano alla regolazione dell'espressione dei geni bersaglio.



TGF- $\beta$  regola un'ampia gamma di funzioni biologiche tra cui lo sviluppo embrionale, la guarigione delle ferite, l'organogenesi, la modulazione immunitaria e la progressione del cancro. È interessante notare che il TGF- $\beta$  è noto per inibire la crescita cellulare nelle cellule benigne ma promuovere la progressione nelle cellule tumorali; questo fenomeno è noto come il paradosso del TGF- $\beta$ .

È necessario approfondire questo per escludere rischi nell'uso del TGF-beta 1.

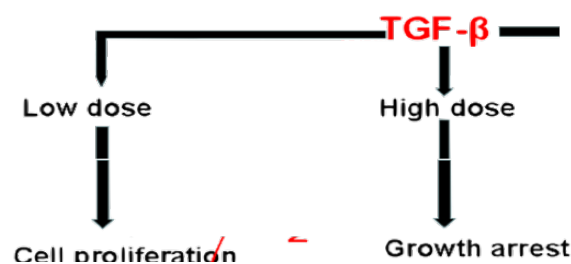
### il paradosso del TGF- $\beta$

La descrizione del concetto convenzionale di "TGF- $\beta$  Paradox", cioè che il TGF- $\beta$  inibisca la proliferazione delle cellule benigne e stimoli la proliferazione delle cellule neoplastiche, deve essere modificata.

Le cellule benigne sono stimulate dal TGF- $\beta$  a subire proliferazione, se la dose di TGF- $\beta$  è bassa. Inoltre, le cellule tumorali sono inibite dal TGF- $\beta$ , specialmente nelle prime fasi della carcinogenesi. Pertanto, l'interpretazione più appropriata del paradosso del TGF- $\beta$  dovrebbe essere che il TGF- $\beta$  media l'omeostasi cellulare in cellule benigne, ma promuova la progressione del tumore e le metastasi nelle cellule tumorali avanzate.

In secondo luogo, i cambiamenti nelle cellule bersaglio nel livello di attivazione di Erk1/2 o d'inattivazione di Smad2/3, mediata dal TGF- $\beta$ , sono gradualmente a seconda dei livelli relativi di TGF- $\beta$  disponibili per cellula nel microambiente locale. Inoltre, i cambiamenti mediati dal TGF- $\beta$  nella proliferazione cellulare o nell'arresto della crescita avvengono in modo graduale a seconda del dosaggio del TGF- $\beta$  impiegato. Dosaggi bassi stimolano la proliferazione, dosaggi alti la inibiscono.

Infine, le cellule tumorali determinano un'autoinduzione continua del TGF- $\beta$ . Questa produzione continua di TGF- $\beta$  nel microambiente tumorale stimolerà ulteriormente la progressione e la metastasi del tumore con conseguente manifestazione dello sviluppo di una progressione tumorale più aggressiva. Cioè, sono le cellule tumorali che stimolando la produzione di TGF- $\beta$  si auto potenziano nella loro proliferazione.



Quindi, da quanto esposto il TGF- $\beta$ , in concentrazione corretta, stimola la proliferazione ed il metabolismo cellulare. Oligopeptide-2

## TGF- $\beta$ e fibroblasto

Sono stati valutati gli effetti della trasformazione del fattore di crescita beta (TGF beta) sulla sintesi di collagene e sulla proliferazione in vitro dei fibroblasti umani. Gli effetti sulla proliferazione sono stati valutati mediante incorporazione di 3H-timidina. La sintesi del collagene è dipendente dalla dose del TGF beta dimostrando che lo stimolo fibroblastico alla sintesi di collagene avviene in concentrazione migliore usando basse concentrazioni.

The screenshot shows a PubMed search result. At the top, there is a search bar with 'PubMed' entered and a search button. Below the search bar, the text 'Format: Abstract' and 'Send to' are visible. The main text of the search result reads: 'Curr Eye Res. 1993 Aug;12(8):703-9. Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. Ohji M<sup>1</sup>, SundarRaj N, Thoft RA.'

## IGF-1

Fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), detto anche somatomedina C, è un ormone simile nella struttura molecolare all'insulina che svolge un ruolo importante nella crescita dell'infanzia ed ha effetti anabolizzanti negli adulti.

IGF-1 è un mediatore primario degli effetti dell'ormone della crescita (GH). L'IGF-1 stimola quindi la crescita sistemica del corpo e ha effetti favorevoli alla crescita su quasi tutte le cellule del corpo. L'IGF-1 può anche regolare la sintesi del DNA cellulare.

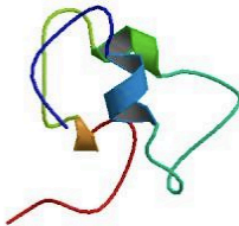
L'IGF-1 si lega a due recettori della tirosin-chinasi della superficie. Il legame con l'IGF1R avvia la segnalazione intracellulare della via di segnalazione AKT (protein-chinasi B) mediata, uno stimolatore della crescita e della proliferazione cellulare e un potente inibitore della morte cellulare programmata.

L'IGF-1 viene liberato legato a delle proteine leganti, raggiungendo un peso molecolare di 21.841 Da.

Protein Information	Site Table	PTM Effects	Cancer	Conservation
<p><b>IGF1</b> The insulin-like growth factors, isolated from plasma, are structurally and functionally related to insulin but have a much higher growth-promoting activity. May be a physiological regulator of [1-14C]-2-deoxy-D-glucose (2DG) transport and glycogen synthesis in osteoblasts. Stimulates glucose transport in rat bone-derived osteoblastic (PyMS) cells and is effective at much lower concentrations than insulin, not only regarding glycogen and DNA synthesis but also with regard to enhancing glucose uptake. Defects in IGF1 are the cause of insulin-like growth factor I deficiency (IGF1 deficiency). IGF1 deficiency is an autosomal recessive disorder characterized by growth retardation, sensorineural deafness and mental retardation. Belongs to the insulin family. 3 isoforms of the human protein are produced by alternative splicing. Note: This description may include information from UniProtKB.</p> <p><b>Protein type:</b> Motility/polarity/chemotaxis; Secreted; Secreted, signal peptide</p> <p><b>Chromosomal Location of Human Ortholog:</b> 12q23.2</p> <p><b>Cellular Component:</b> alphav-beta3 integrin-IGF-1-IGF1R complex; exocytic vesicle; extracellular region; extracellular spa... <a href="#">view more &gt;</a></p> <p><b>Molecular Function:</b> growth factor activity; hormone activity; insulin receptor binding; insulin-like growth factor recep... <a href="#">view more &gt;</a></p> <p><b>Biological Process:</b> activation of MAPK activity; activation of protein kinase B activity; bone mineralization involved i... <a href="#">view more &gt;</a></p> <p><b>Disease:</b> <b>Insulin-like Growth Factor I Deficiency</b></p> <p><b>Reference #:</b> P05019 (UniProtKB)</p> <p><b>Alt. Names/Synonyms:</b> IBP1; IGF-IA; IGF-IB; IGF1; IGF1A; IGFI; insulin-like growth factor 1 (somatomedin C); Insulin-like growth factor I; Insulin-like growth factor IA; insulin-like growth factor IB; Mechano growth factor; MGF; Somatomedin-C</p> <p><b>Gene Symbols:</b> IGF1</p> <p><b>Molecular weight:</b> 21,841 Da</p> <p><b>Basal Isoelectric point:</b> 9.78 <a href="#">Predict pI for various phosphorylation states</a></p>				

Select Structure to View Below

**IGF1**



1B9G - A=49-118 (human) ▾

[Get PyMOL Script](#)

[Get ChimeraX Script](#)

L'IGF-1, liberato in fase attiva, svolge un'azione diretta sulla proliferazione dei fibroblasti.

NCBI Resources How To

PubMed.gov  
US National Library of Medicine  
National Institutes of Health

PubMed Advanced

Format: Abstract

Send t

J Neurosci. 1997 Jan 1;17(1):216-26.

**Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures.**

Zheng JL<sup>1</sup>, Helbig C, Gao WQ.

## **Peptidi biomimetici**

Su *International Journal of Cosmetic Science*, 22 207-218 (2000), K. Lintner\* And O. Peschard in *Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product*, evidenziano gli effetti dei peptidi biomimetici nella proliferazione fibroblastica e nella sintesi del collagene.

Piccoli peptidi biologicamente attivi (sequenze brevi di aminoacidi) sono stati descritti per la prima volta circa 40 anni fa: TRH, angiotensina, vasopressina, ossitocina, bradichinina. Da allora, molti altri peptidi sono stati isolati dai tessuti e dagli organi dei mammiferi e la loro attività è stata investigata. Essenzialmente, queste molecole svolgono un ruolo ormonale (messaggero): rilasciato in un punto del corpo, agiscono in specifici siti recettori in diverse posizioni nell'organismo. Principalmente i peptidi vengono trasportati dal sito di rilascio al sito di attività biologica attraverso il sangue o il fluido linfatico.

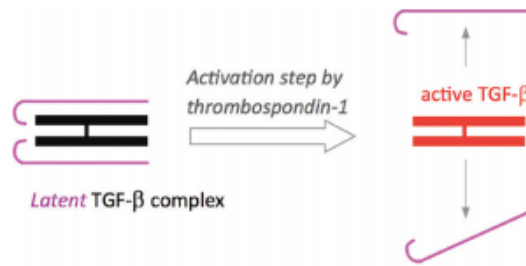
Studi recenti hanno approfondito lo studio delle molecole delle citochine e dei fattori di crescita evidenziando le diverse porzioni delle molecole e, in particolare, codificando la sequenza aminoacidica della parte attiva.

Sappiamo da tempo che i fattori di crescita sono delle molecole complesse che vengono secrete collegate ad un trasportatore. In prossimità del sito di azione, delle metalloproteinasi liberano la parte attiva che si lega allo specifico recettore determinando le risposte biologiche (proliferazione, attività metabolica) della cellula. La conoscenza della sequenza aminoacidica ha permesso la sintesi industriale del peptide attivo e la sua utilizzazione per stimolare direttamente le cellule.

Molti processi fisiologici sono influenzati dalle interazioni di questi peptidi, tra cui la proliferazione e migrazione cellulare, la melanogenesi, l'angiogenesi e il metabolismo proteico della cellula. Pertanto, i peptidi biologicamente attivi offrono un grande potenziale medico e terapeutico. Inoltre, la capacità di generare peptidi sintetici con l'attenzione a modulare in modo specifico la loro farmacocinetica e proprietà per aumentare la potenza, la consegna e la stabilità ha stimolato molto interesse in questo campo di ricerca in rapida crescita.

## **TGF- $\beta$ peptide biomimetico**

Abbiamo già descritto la capacità del TGF- $\beta$  1 nell'attivazione del fibroblasto e nello stimolo alla neosintesi di collagene. Sappiamo che la molecola di TGF- $\beta$  1 è presente in forma inattiva e, mediante la trombospondina, viene liberata la porzione attiva che si lega ai recettori SMAD.



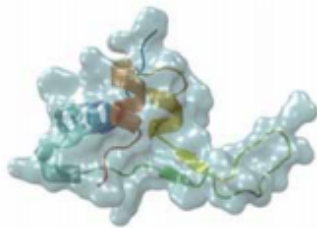
La conoscenza della sequenza aminoacidica di legame agli SMAD ha permesso di sintetizzare un peptide biomimetico capace di attivare direttamente questi recettori e, conseguentemente, la proliferazione e l'attività metabolica del fibroblasto.

### IGF-1 peptide biomimetico

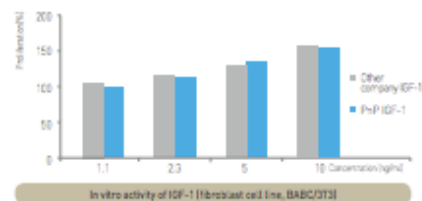
La conoscenza della sequenza aminoacidica della porzione libera (scissa dalla proteina carrier) che agisce sui recettori della tirosin-chinasi, ha permesso di sintetizzare un peptide biomimetico, chiamato Sh-Oligopeptide-2, con un Peso molecolare di 6800 Da.

#### •• IGF-1 (Insulin-like Growth Factor1)

- Application : Skin Care, Body Care, Hair care
- Effect : Hair growth, Prevent wrinkles, Degradation of fat
- Function : Prevent wrinkle formation by creating new epidermal cells Stimulate hair follicles for stronger hair formation.



Characteristics	
INCI name	sh-Oligopeptide-2
Trade name	PhP-IGF-1
Source	<i>E.coli</i>
Molecular weight	6.8 Kda
Appearance	White powder
Purity	> 95% (HPLC)

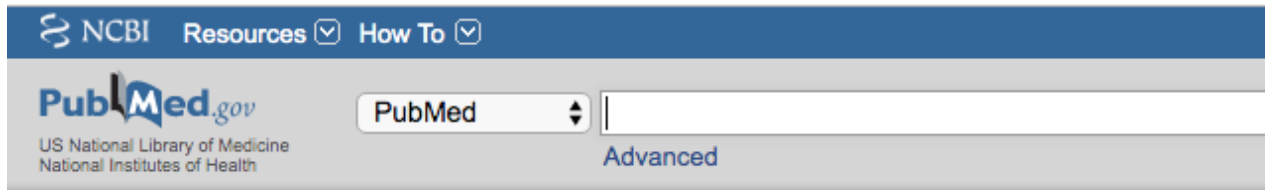


### GABA

Il glutammato decarbossilasi (GAD) catalizza la sintesi dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), un neurotrasmettitore inibitorio, dal glutammato. Un'espressione della proteina GAD è stata riportata per il cervello, e, recentemente, evidenziata nei fibroblasti dermici umani. Si è osservato che il GABA stimola la sintesi dell'acido ialuronico (HA), del collagene e aumenta il tasso di sopravvivenza dei fibroblasti dermici quando i fibroblasti sono esposti ad un agente di stress ossidativo. In



conclusione, attraverso studi in vivo e in vitro, è stato confermato che il GABA ha effettivamente migliorato la guarigione delle ferite promuovendo la proliferazione cellulare di fibroblasti e stimolando l'espressione di alcuni Fattori di crescita.



Format: Abstract ▾

J Microbiol Biotechnol. 2007 Oct;17(10):1661-9.

### **Wound healing activity of gamma-aminobutyric Acid (GABA) in rats.**

Han D<sup>1</sup>, Kim HY, Lee HJ, Shim I, Hahm DH.

## **ACIDO IALURONICO**

Nel derma abbiamo un continuo rimaneggiamento dei componenti biologici. Le metalloproteinasi idrolizzano le macromolecole che compongono la cute ed il fibroblasto le riforma.

Tutti i componenti della matrice vengono idrolizzati in piccole molecole, ma sono i frammenti di acido ialuronico, che stimolando i CD 44, attivano i fibroblasti.

Quanto esposto avviene per la breve vita dell'acido ialuronico nella cute (24 ore) che informa il fibroblasto della diminuzione della matrice dermica. La rapida idrolisi dell'acido ialuronico libera dei piccoli frammenti che raggiungono il fibroblasto, si legano ai suoi CD 44 e lo informano della frammentazione della matrice e della necessità di ricostruirne di nuova. Questi frammenti devono essere molto piccoli e compresi tra i 20 e i 38 monomeri. Cioè con un peso molecolare di 7-14 Kdalton.

La frammentazione dell'acido ialuronico in pezzi di maggior dimensioni dà una diversa informazione biologica.

J Biol Chem. 2000 Sep 1;275(35):26967-75.

### **Hyaluronan binding by cell surface CD44.**

Lesley J<sup>1</sup>, Hascall VC, Tammi M, Hyman R.

L'acido ialuronico macromolecolare introdotto nel derma viene frammentato, inizialmente, dalla ialuronidasi in frammenti di grandi dimensioni dando l'informazione di un'aggressione biologica (grandi frammenti di acido ialuronico si liberano quando un batterio o una cellula neoplastica invadono la nostra matrice).



Frammenti di acido ialuronico superiori ai 15 Kdalton si legano ai tool-like receptors dei macrofagi trasformandoli da macrofagi M2 (antinfiammatori, producono interleuchina 10) in macrofagi M1 (infiammatori, producono ROS e citochine infiammatorie). Otteniamo così non una risposta rigenerativa ma infiammatoria.

Eur J Cell Biol. 2004 Aug;83(7):317-25.

### **Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway.**

Stern R<sup>1</sup>.

È possibile reperire industrialmente un acido ialuronico in frammenti di 7 Kdalton. L'inserimento di questi nel derma stimola i CD 44 dei fibroblasti con nuova formazione di matrice funzionale.

## **II BIOMIMETIC-PRP**

Da quanto esposto e in rapporto alla difficoltà di utilizzo di PRP autologo in alcune nazioni, abbiamo pensato di creare un PRP sintetico.

Abbiamo visto che il componente principale, liberato dal PRP con la degranolazione piastrinica in alta concentrazione, è il TGF- $\beta$  1. La letteratura ci ha confermato che questo fattore induce la proliferazione e l'attività metabolica del fibroblasto con neocollagenogenesi e formazione di nuova ECM. Sempre in letteratura abbiamo verificato la giusta concentrazione di TGF- $\beta$  1 necessaria ad una risposta biologica anabolica.

Tutto questo ci consente di affermare che il TGF- $\beta$  1 è alla base della risposta biologica che abbiamo con l'uso del PRP.

Da ciò, vista la possibilità di reperire detto fattore, nella sua frazione attiva, come peptide biomimetico sintetizzato industrialmente (**TGF beta-1, Tripeptide-28**), possiamo preparare un prodotto da utilizzare in sostituzione del PRP autologo.

Dovendo mettere a punto un preparato che abbia funzione di stimolo proliferativo e metabolico utilizzando un peptide biomimetico, abbiamo pensato di aggiungere altri peptidi e principi attivi in grado di ottimizzare la risposta biologica ottenibile.

Abbiamo aggiunto:

- il peptide biomimetico dell'IGF-1, l'Sh-**Oligopeptide-2**, calcolando anche per questo la concentrazione capace di attivare i fibroblasti;
- il GABA, **acido  $\gamma$ -aminobutirrico**, che stimola la sintesi dell'acido ialuronico (HA), del collagene e aumenta il tasso di sopravvivenza dei fibroblasti dermici quando i fibroblasti sono esposti ad un agente di stress ossidativo. Attraverso studi in vivo e in vitro, è stato confermato che il GABA migliora, effettivamente, la guarigione delle ferite promuovendo la proliferazione cellulare di fibroblasti e stimolando l'espressione di alcuni Fattori di crescita;

- frammenti di **acido ialuronico** con peso molecolare di **7 KDa**, capaci di legarsi ai CD 44 del fibroblasto, attivandone la proliferazione e l'attività metabolica.

## **RIGENERAZIONE CUTANEA**

Il protocollo attuale di rigenerazione cutanea prevede:

- L'attivazione delle cellule staminali quiescenti utilizzando una soluzione capace di liberare 0,34 mMol di ROS. Questo consente, dopo 21 giorni, la neoformazione di giovani fibroblasti (il fibroblasto giovane produce collagene reticolare che ringiovanisce il derma).
- La stimolazione proliferativa e metabolica dei giovani fibroblasti neoformati con i fattori di crescita di derivazione piastrinica liberati da una concentrazione di piastrine soggettivizzata al paziente.

Oggi, se necessario, possiamo sostituire il PRP con Il SINTETIC-PRP, bypassando il prelievo e la separazione delle piastrine da iniettare.

Il **SINTETIC-PRP** è così formulato:

- **TGF- $\beta$  1** sotto forma di peptide biomimetico attivo, in concentrazione adeguata allo stimolo proliferativo e metabolico del fibroblasto.
- **GABA** sintetico capace di attivare la rigenerazione fibroblastica con formazione di nuova matrice e neocollagenogenesi.
- Frammenti di **Acido ialuronico** di **7 KDa** capaci di legarsi ai CD 44 del fibroblasto attivandone la proliferazione e l'attività metabolica.
- **Aminoacidi** precursori dei componenti del derma per facilitare l'anabolismo del fibroblasto.
- **Tampone Bicarbonato** per regolare il valore del pH della matrice e consentire l'assemblamento fisiologico del collagene reticolare.

## **Bibliografia**

*Hee Soon Cho, M.D., In Hwan Song, M.D., So-Young Park, M.D., Min Cheol Sung, M.D., Myun-Whan Ahn, M.D., Kyung Eun Song, M.D. Individual Variation in Growth Factor Concentrations in Platelet-rich Plasma and Its Influence on Human Mesenchymal Stem Cells, Korean J Lab Med. 2011 Jul; 31(3): 212–218*

*Isabel Fuentes-Calvo, Carlos Martínez-Salgado, TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor, beta 1), Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*

Tian M, Schiemann WP *The TGF-beta paradox in human cancer: an update. Future Oncol.* 2009 Mar;5(2):259-71.

Xia Chen, M.D., Ph.D. and Susan L. Thibeault, Ph.D., *Response of Fibroblasts to Transforming Growth Factor-β1 on Two-Dimensional and in Three-Dimensional Hyaluronan Hydrogels, Tissue Eng Part A.* 2012 Dec; 18(23-24): 2528–2538.

Ohji M, SundarRaj N, Thoft RA., *Transforming growth factor-beta stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro, Curr Eye Res.* 1993 Aug;12(8):703-9.

Zheng JL, Helbig C, Gao WQ., *Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. J Neurosci.* 1997 Jan 1;17(1):216-26.

K. Lintner\* And O. Peschard, *Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product, International Journal of Cosmetic Science,* 22 207-218 (2000)

Han D1, Kim HY, Lee HJ, Shim I, Hahm DH, *Wound healing activity of gamma-aminobutyric Acid (GABA) in rats,. J Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;17(10):1661-9.

Lesley J1, Hascall VC, Tammi M, Hyman R., *Hyaluronan binding by cell surface CD44., J Biol Chem.* 2000 Sep 1;275(35):26967-75.

Stern R., *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway., Eur J Cell Biol.* 2004 Aug;83(7):317-25.