

Analisi citomorfologica di fibrina ricca di piastrine liquida prodotta con centrifuga ad angolo fisso DUO (Process, Francia) per l'uso nella terapia rigenerativa delle ulcere cutanee

Michela Crisci,¹ Giovanni Lepore,² Federica Feleppa,² Alessandro Crisci,^{3,4} Fabiana Flagiello⁵

¹Dipartimento di Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Occidentale Vasile Goldis di Arad, Arad, Romania; ²Unità Operativa di Anatomia Patologica, A.O. San Pio, Benevento, Italia; ³Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria "Scuola Medica Salernitana", Università degli Studi di Salerno, Fisciano (SA), Italia; ⁴Unità di Dermo Chirurgia, Trapianti cutanei e Ferite Difficili, Casa di Cura "Villa Fiorita" Casa, Aversa (CE), Italia; ⁵Laboratorio Analisi Casa di Cura "Villa Fiorita", Aversa (CE), Italia

RIASSUNTO

La fibrina ricca di piastrine (PRF) liquida è un concentrato piastrinico di seconda generazione iniettabile ricco di piastrine, leucociti e fibrinogeno ottenuto per centrifugazione del sangue autologo. Lo scopo di questo studio è analizzare il contenuto cellulare e di fibrinogeno di vari tipi di PRF Liquido (C-PRF liquid, A-PRF liquid, i-PRF, fibrinogeno liquido) ottenuti con l'uso di centrifuga ad angolo fisso DUO (PRF DUO, Process per PRF, Nizza, Francia) con provette Fibrinogeno Liquido (FL) Vacumed (cod. 44909) e/o provetta originale S-PRF Sticky. È stato riscontrato un accumulo medio di Trombociti di quasi 1,5 volte rispetto al sangue intero. A causa dell'elevata concentrazione di Piastrine, i PRF-Liquid contengono importanti fattori di crescita per la rigenerazione tissutale. In questo studio preliminare abbiamo evidenziato che il tipo di PRF Liquido a maggiore contenuto di piastrine (126.3% vs. 109.5%), monociti

(127.6% vs. 84.6%), con un sufficiente contenuto di linfociti (192.9% vs. 242.1%) e granulociti neutrofili (64.6% vs. 64.8%) e di fibrinogeno (67.9% vs. 87.3%), è il i-PRF (700 rpm×5 min) ottenuto con provetta Vacumed FL (cod. 44909) con differenze statisticamente non significative rispetto al sangue intero, mentre è maggiore il contenuto di Linfociti e Fibrinogeno presente in i-PRF (700 rpm×5") ottenuto con provetta PRF-S-Sticky. Molto minore, nel confronto, risulta il contenuto di cellule e fibrinogeno ottenuto con i due metodi di preparazione del PRP. Ciò indica che il PRF liquido più adatto ad essere utilizzato in vari casi di rigenerazione dei tessuti come l'estetica del viso, l'iniezione intrarticolare, l'iniezione periulcerativa, etc. è il i-PRF (700 rpm×5 min) ottenuto con provetta Vacumed FL.

Corrispondenza: Alessandro Crisci, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria "Scuola Medica Salernitana", Università di Salerno, Fisciano (SA), Italia.
E-mail: alessandrocrisci@libero.it

Parole chiave: fibrina ricca di piastrine liquida; fibrinogeno liquido; leucociti; centrifugazione a bassa velocità; rigenerazione tissutale.

Contributi: gli autori hanno contribuito egualmente.

Conflitto di interessi: gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Approvazione etica e consenso alla partecipazione: lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e ogni paziente è stato incluso nello studio dopo aver ottenuto il consenso scritto e poi è stato informato sulle procedure.

Disponibilità di dati e materiali: tutti i dati analizzati in questo studio sono disponibili presso gli autori.

Ricevuto: 3 giugno 2023.
Accettato: 16 ottobre 2023.

Nota dell'editore: le affermazioni espresse in questo articolo sono esclusivamente quelle degli autori e non rappresentano necessariamente quelle delle loro organizzazioni affiliate, né quelle dell'editore, dei redattori e dei revisori. Tutti i prodotti valutati in questo articolo o le affermazioni fatte dal loro produttore non sono garantiti o approvati dall'editore.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright: the Author(s), 2023
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Wound Care 2023; 7(3):103
doi:10.4081/ijwc.2023.103

Introduzione

Una formulazione liquida di fibrina ricca di piastrine (PRF) può essere utilizzata da sola o in combinazione con vari biomateriali. Una formulazione liquida di fibrina ricca di piastrine, denominata iniettabile-PRF (i-PRF), è stata studiata da Shao *et al.* mediante centrifugazione a 700 rpm per 3 min (60 g) senza anticoagulanti.¹ I dati suggeriscono che i-PRF può accelerare la proliferazione dei fibroblasti. Nel frattempo, gli stessi autori hanno ottenuto uno scaffold di fibrina iniettabile (IFS) ricco di fattori di crescita mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 min. Questa impalcatura liquida contiene grandi quantità di fibrina, che intrappolano un gran numero di piastrine, globuli bianchi e fattori di crescita e possono promuovere la proliferazione, la migrazione cellulare e la secrezione della matrice. L'IFS può promuovere la secrezione di collagene di tipo I e di tipo III da parte dei fibroblasti cutanei per promuovere la riparazione tissutale *in vivo*.²

Inoltre, la rete di fibrina sparsa nell'impalcatura liquida favorisce il rilascio stabile e prolungato di fattori di crescita per più di due settimane (fino a 28 gg),³ oltre a trasportare le cellule staminali. Le piastrine contenute in essa regolano il reclutamento di cellule staminali adulte verso le cellule danneggiate; questo può quindi essere un meccanismo importante nelle risposte cellulari rigenerative.⁴ PRF stabilisce un ambiente locale favorevole alla migrazione delle MSC e può anche servire come fonte di cellule staminali.⁵ Pertanto, questo IFS può essere utilizzato nella medicina rigenerativa da solo o come coadiuvante di altri biomateriali.

Le piastrine concentrate presenti nel i-PRF sono responsabili della secrezione attiva dei fattori di crescita e dell'induzione del fabbisogno, della proliferazione e della differenziazione di varie cellule coinvolte nel processo di rigenerazione.⁴

L'attivazione piastrinica inizia immediatamente al contatto con la parete della provetta per la centrifugazione e porta alla formazione di una fitta rete di fibrina e di un coagulo di PRF utilizzabile. La lenta polimerizzazione della fibrina consente un maggiore intrappolamento delle citochine circolanti (intrinseche) nella matrice di fibrina. Uno studio recente ha dimostrato che la riduzione della forza centrifuga relativa porta ad un aumento significativo del numero totale di piastrine e leucociti e della quantità di fattori di crescita, indicando che il concetto di centrifugazione a bassa velocità si traduce in un aumento del potenziale di rigenerazione del PRF.⁶

È pertinente quindi conoscere la concentrazione e la quantità di piastrine che si possono ottenere e come i leucociti sono concentrati in una particolare preparazione liquida.

In questa sperimentazione ci siamo posti le seguenti domande: i) quale concentrazione di trombociti e leucociti potrebbe essere raccolta all'interno del supernatante nei diversi protocolli di produzione di PRF liquido?; ii) quale protocollo dà risultati migliori in termini di piastrine e di fibrinogeno raccolti?

In generale, dopo la centrifugazione, è stata ottenuta una media di circa 3 ml di PRF da una provetta contenente 9 ml di sangue pari a 9.1 gr.

Materiali e Metodi

Lo scopo di questo studio è quello di scoprire e confermare il migliore tipo di provetta e la migliore velocità di centrifugazione con centrifuga ad angolo fisso DUO (PRF DUO, Process per PRF, Nizza, Francia) per ottenere PRF liquido con il maggiore contenuto di cellule e fibrina. L'obiettivo principale è indagare se l'adattamento della forza g per le suddette modifiche su PRF liquid (PRF concentrato [C-PRF] liquid, PRF avanzato [A-PRF] liquid e

i-PRF), utilizzando una centrifuga ad angolo fisso 41,3°C e con diversi tipi di provetta, ha qualche influenza sulle loro caratteristiche in termini di morfologia e contenuto cellulare, nonché sul contenuto di fibrinogeno precursore del reticolo di fibrina. È stato eseguito anche un confronto con il plasma ricco di piastrine (PRP) prodotto a 2200 rpm×20 min con PRP BioReb Gel (Centrifuga Hettich EBA 200 angolazione di 33°C) con centrifugazione singola e con doppia centrifugazione secondo la procedura consigliata da Rattanasuwan *et al.*⁷

La centrifugazione del PRF nel tubo di raccolta sottovuoto a pressione negativa in Plastica (PET) Fibrinogeno Liquido (FL) Vacumed (cod. 44909) e con Provetta originale S-PRF Sticky (consigliata dall'azienda produttrice Process, Francia) consente di preparare il PRF in forma liquida e di utilizzarlo in modo iniettabile. Il PRF liquido può essere utilizzato in vari casi di rigenerazione dei tessuti come l'estetica del viso, l'iniezione intrarticolare, l'iniezione periulcerativa, ecc.

C-PRF liquid ($RCF_{\text{coagulo}}=525$ g; $RCF_{\text{max}}=700$ g; $RCF_{\text{min}}=280$ g) sec. miron o altri tipi di PRF liquido sono risultati dopo il prelievo post-centrifugazione del liquido derivante, con siringa sterile ed ago da 18 g, che può essere iniettato o anche solidificato in coaguli e membrane.^{8,9} È stato valutato in questo studio il contenuto di fibrina e di cellule (granulociti neutrofili, monociti, linfociti e piastrine) sia con un esame emocromocitometrico che al microscopio ottico a Ingr.10-100×con colorazione. Le colorazioni Blu di Metilene e May-Grünwald sono state eseguite per colorare gli strisci di PRF liquid per confermare il contenuto cellulare determinato all'esame emocitometrico.

Alcuni ricercatori si preoccupano di un possibile pericolo per la salute quando vengono usate provette per la raccolta del sangue sottovuoto in vetro con attivatori in silice. O'Connell,¹⁰ infatti, ha descritto l'inevitabile contatto con la silice. Per questo abbiamo utilizzato solo provette senza silice.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e ogni paziente è stato incluso nello studio dopo aver ottenuto il consenso scritto e poi è stato informato sulle procedure.

Sono stati esaminati i prelievi ematologici di 45 soggetti in apparente benessere di età compresa tra 35 e 101 anni, di cui 23 maschi e 22 femmine.

Criteri di inclusione

Nessuna assunzione di anticoagulanti o farmaci funzionali equivalenti per un mese prima dell'arruolamento e numero di piastrine nell'intervallo da 150.000 a 450.000/mL e indice di coagulazione determinato come normale (tempo di protrombina compreso tra 11 e 16 secondi). Concentrazione di emoglobina >9 mg/dl, concentrazione di proteine nel siero >6 grammi/dl e albumina nel siero >3 grammi/dl.

Le controindicazioni assolute per la PRF comprendono la S. da disfunzione piastrinica, la trombocitopenia critica, l'instabilità emodinamica, la sepsi. Le controindicazioni relative includono forti fumatori, consumatori di droghe ed alcool, pazienti con patologia epatica cronica, gravi disordini metabolici o sistemici, pazienti con cancro di origine ematopoietica, con bassa emoglobina ($<10\text{g/mL}$) o conta piastrinica ($<1.2 \leftrightarrow 10^5/\text{mL}$). Inoltre, sono stati evitati pazienti che assumono FANS, prednisolone $>20\text{ mg/die}$, e terapia anticoagulante.

Procedure ematochimiche

Il PRF liquido risulta un concentrato piastrinico di seconda generazione, che comprende vari fattori di crescita, trombociti, leucociti, cellule staminali CD34⁺ e matrice fibrinosa.¹¹

Una quantità di 1,5 ml di PRF liquido è stata posta in provetta con EDTA K3E 5,4 mg per eseguire un emocromo e, utilizzando un analizzatore ematologico HECO 5 (Seac Radim Company), ed è stata valutata la concentrazione di monociti, granulociti neutrofili, linfociti e piastrine (i valori medi ottenuti per ogni tipo di PRF liquido prodotto sono stati riportati).

Il fibrinogeno è stato misurato mediante test immunoturbidimetrico con ACL 3000 (Beckman Instrumentation Laboratory).

Abbiamo voluto quindi valutare il contenuto di fibrinogeno, piastrine, monociti, granulociti neutrofili, linfociti, nel sangue periferico e, sempre attraverso l'esecuzione di un esame emocromocitometrico, nel PRF liquido di vari tipi [A-PRF liquid (1300 rpm \times 5 min); i-PRF (700 rpm \times 5 min); i-PRF (3300 \times 3 min); C-PRF (2500 rpm \times 8 min);⁷ Fibrinogeno liquido (2700 rpm \times 3 min)]^{11-13,16} ottenuti usando due tipi diversi di provette per centrifugazione del sangue prelevato dai pazienti (provette Vacumed FL e Verdi S-PRF Sticky) riscaldate in incubatore a 37°C (Figura 1) per simulare il più possibile la temperatura corporea.



Figura 1. Incubatore utilizzato per mantenere le provette ad una temperatura costante di 37°C.

Abbiamo anche provveduto alla produzione di PRF prodotto a 2200 rpm \times 20 min con Kit PRP BioReb Gel (C.O. Biotechnology S.r.l., Na, Italy) secondo le indicazioni della casa produttrice su 25 pazienti e alla valutazione anche in esso dei monociti, granulociti neutrofili, linfociti, piastrine con esame emocromocitometrico e del fibrinogeno.^{7,12} Il PRF è stato preparato anche come descritto da Rattanasuwan *et al.*,⁷ con piccole modifiche. In breve, il sangue è stato centrifugato in un separatore cellulare (Hettich EBA 200) a 1.300 giri/min (rpm) per 10 min dopo averlo posto in una provetta Kit PRP BioReb Gel. Il sangue è stato quindi separato in una regione inferiore dei globuli rossi e una regione superiore del plasma di colore paglierino. Il plasma di colore paglierino è stato prelevato e nuovamente centrifugato a 2000 rpm per 10 min in provetta Vacumed FL. Il risultato della seconda centrifugazione consisteva in una porzione superiore di siero supernatante giallo chiaro e nella porzione inferiore sfumata di rosso. La parte superiore del siero è stata scartata e nella provetta sono rimasti circa 1,5 mL di siero e piastrine concentrate. Il PRP risultante avrebbe dovuto avere secondo Rattanasuwan *et al.*⁷ un incremento del 331% rispetto alla concentrazione basale di piastrine e comunque non inferiore al 200%.¹²

Procedure citologiche per microscopia ottica

La colorazione del PRF-Liquid mostra strutture reticolari fibrose sparse e sono presenti globuli bianchi e piastrine (Figura 2). Sono stati infatti preparati strisci di PRF liquido su vetrini da microscopia e colorati con Blu di Metilene (30'), May-Grünwald (3') o Blu di Toluidina (30').

Tutti i vetrini strisciati sono stati lavati con acqua demineralizzata dopo la colorazione ed immediatamente analizzati al microscopio ottico.

Analisi istomorfometrica

L'analisi citometrica è stata eseguita dall'esaminatore in cieco rispetto alla tecnica di centrifugazione utilizzata. I vetrini colorati sono stati esaminati e le immagini di tre diverse aree di ciascuna sezione (0,348 mm²) sono state scattate attraverso un microscopio ottico con fotocamera integrata, in gruppi con un ingrandimento originale di 10, 20, 40, 60, 100 \times ad immersione (Optika, B-150D-BRPL, Optika S.r.l. Italia). Le immagini digitali sono state salvate su un computer. Per l'analisi istomorfometrica è stato utilizzato il software AmScope MD 500-CK 5.0 mp (United Scope, LLC, NNL), Vers. 2022.

Misure e analisi statistiche

I dati delle variabili continue che obbediscono alla distribuzione normale sono stati espressi come "Media \pm Deviazione Standard" ($\bar{x}\pm ds$), "Errore standard" e "Mediana". Per quanto riguarda la significatività statistica

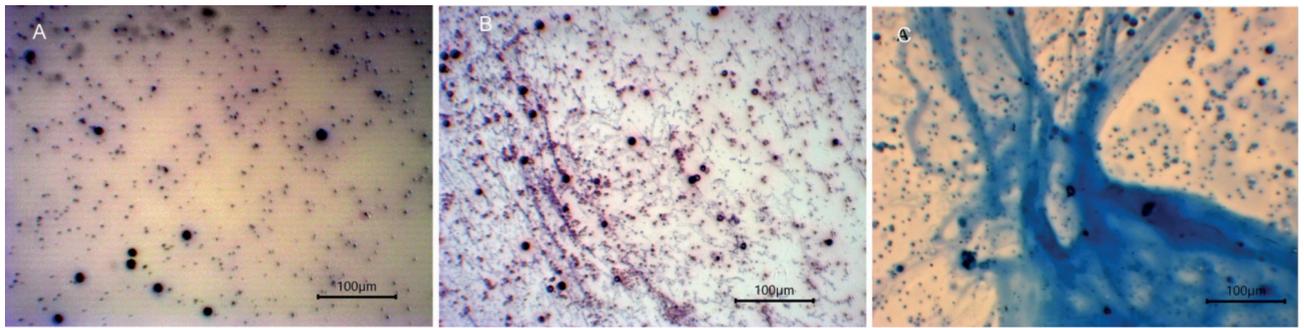


Figura 2. Fibrina ricca di piastrine iniettabile 700 rpm×5' con colorazione Blu di Toluidina, May-Grünwald e Blu di Metilene rispettivamente. Sono evidenti moltissime piastrine e molti leucociti (linfociti). Ingr. 10× (barra di scala 100 micron).

della misurazione dei valori citologici e di fibrinogeno rilevati nel PRF-Liquid, per le differenze tra i gruppi, è stata calcolata con il test-T di Student per misure ripetute per variabili parametriche e con il U-test firmato Mann-Whitney per i dati distribuiti in modo non normale. Ogni valore di $P \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo, $P \leq 0.005$ è stato altamente significativo, mentre $P \geq 0.05$ è stato considerato non significativo.

I dati sono stati analizzati utilizzando la versione 6.0 del pacchetto di Statistica per Discipline Biomediche di Santon-Glantz 2007.

Risultati

La procedura è stata ben tollerata in tutti i soggetti esaminati. L'età media è stata di 65.07 ± 14.24 aa, E.S.: 2.12; Mediana 66 aa.

Non sono state rilevate differenze significative nel confronto ematologico di base dei soggetti esaminati, che avevano una concentrazione media di RBC di $4.6 \times 10^6/\text{mL}$ (± 1.1 ; I.C.95%) ($P=0.34$) (range: $4-5.5 \times 10^6/\text{mL}$), di WBC di $5.1 \times 10^3/\text{mL}$ (± 0.37 ; I.C.95%) ($P=0.24$) (range: $4.5-8.5 \times 10^3/\text{mL}$) ed una conta piastrinica media di $296.8 \times 10^3/\text{mL}$ (± 15.3 ; I.C.95%) ($P=0.15$) (range: $150-400 \times 10^3/\text{mL}$). L'emocromo eseguito sui vari tipi di PRF-Liquid mostra in generale che l'IFS comprende un contenuto di globuli bianchi > del 25% e di piastrine > del 50% rispetto al sangue intero. Nello specifico, i globuli bianchi contenuti negli scaffolds liquidi erano quasi tutti linfociti, pochi erano i granulociti neutrofilici e pochi i monociti. La quantità di PRF liquido ottenuto da tutti i PRF-Liquid sia con provetta S-PRF Sticky che Vacumed FL, è di circa 2-3 ml. Abbiamo provato, inoltre, a riscaldare le provette utilizzate per la centrifugazione prima del prelievo e, dopo, per ottenere più facilmente PRF-Liquid ed anche un coagulo da esso, utilizzando un incubatore a 37°C (Figura 1) e favorire in questo modo la formazione del coagulo di fibrina per polimerizzazione dal fibrinogeno sotto l'influenza della trombina fisiologicamente disponibile.

Fattore di crescita epidermico e fattore di crescita vaso-endoteliale

Zwittnig *et al.* hanno valutato i fattori di crescita (in particolare di nostro interesse sono EGF e VEGF) con un processo di centrifugazione durato 8 min, con 1200 rpm e una forza centrifuga relativa (RCF) di 177 g. I PRFs liquido e solido prodotti sono stati utilizzati per analizzare il rilascio di cinque fattori di crescita per 10 giorni.¹³

Particolarmente interessante per i nostri studi è risultata la evoluzione del rilascio di EGF ed VEGF nel confronto tra PRF Solido e Liquido riportate in *Figura Supplementare 1*.

Dopo 1 ora, è stata misurata una concentrazione di fattore di crescita epidermico (EGF) di 71 pg/mL nel PRF-Liquid. Il valore più alto di 218 pg/mL è stato evidenziato dopo 7 h. Dopo un forte aumento durante le prime 24 ore, dal giorno 2, i valori di EGF sono diminuiti da 154 a 72 pg/mL e infine a 13 pg/mL il giorno 10. Il rilascio di fattore di crescita vaso-endoteliale (VEGF) è stato costantemente di circa 90-100 pg/mL nei primi 2 giorni. Il più alto rilascio di VEGF in PRF liquido è stato osservato il giorno 7 (142 pg/mL). Fino a quando al giorno 10, il valore è sceso a 45 pg/mL (*Figura Supplementare 1*).

Il PRF solido ha rilasciato 39 pg/mL di EGF dopo 1 ora, ma è aumentato ad un plateau di 203 pg/mL dalla 7^a ora al giorno 7. Il giorno 10, è diminuito a 40 pg/mL. I valori di VEGF sono partiti da 110 pg/mL dopo 1 ora e 110 pg/mL dopo 7 ore. Sono aumentati a 194 pg/ml il giorno 1 e 215 pg/ml il giorno 2. Il loro valore massimo è stato di 380 pg/ml il giorno 7. Il giorno 10, il VEGF era di 105 pg/ml (*Figura Supplementare 1*).

Studio citologico in microscopia ottica

Sia C-PRF liquid 2500 rpm×8 min ottenuto in provetta Vacumed FL che quello in provetta S-PRF Sticky ($RCF_{\text{coagulo}}=525$ g; $RCF_{\text{max}}=700$ g; $RCF_{\text{min}}=280$ g) aveva una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr.

10×, 20×) (Figura Supplementare 2 [A, B, E, F] e [C, D, G, H] rispettivamente). Una struttura a rete di fibrina conformata non è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati.

Sono stati individuati elementi cellulari di derivazione ematica presenti in varie concentrazioni a seconda della provetta da centrifugazione utilizzata (Figura Supplementare 2).

Concentrazioni maggiori di linfociti (97.85% vs.

66.17%) e fibrinogeno (88.17% vs. 42.8%) rispetto al sangue intero sono state riscontrate in C-PRF liquid ottenuto con provetta Vacumed FL rispetto a quelle con originali S-PRF Sticky (Tabelle Supplementari 1, 2) mentre le piastrine (20.98% vs. 35.21%) risultano maggiori con l'uso di provette S-PRF Sticky e sono riportate in modo specifico nelle didascalie della Figura Supplementare 2 e nei grafici contenuti in Figura 3.

Il contenuto di Monociti per noi particolarmente inte-

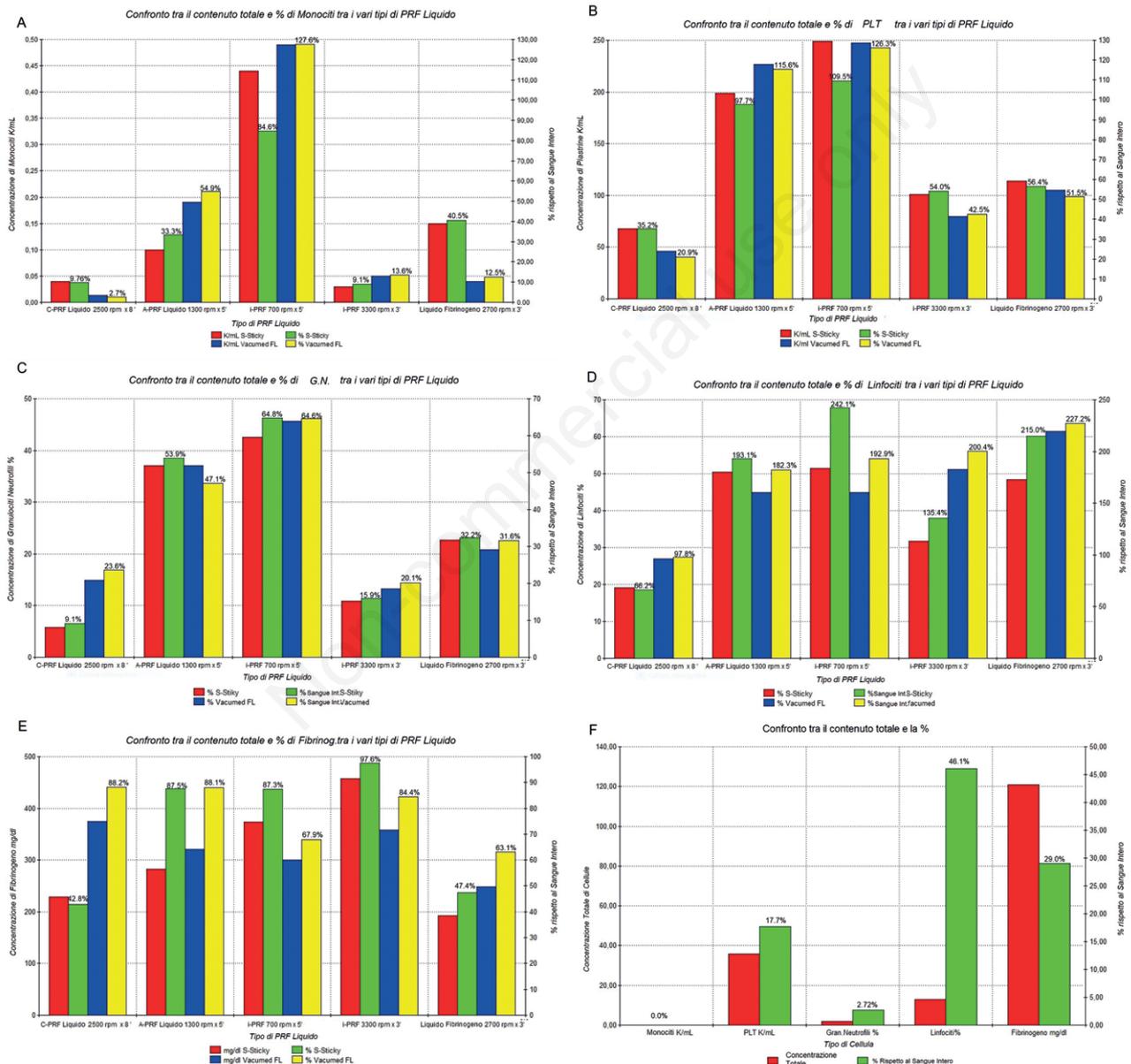


Figura 3. Confronto grafico tra il contenuto di monociti (A), piastrine (B), granulociti neutrofilici (C), linfociti (D) e fibrinogeno (E) nei vari tipi di fibrina ricca di piastrine liquida prodotti con provetta S-PRF Sticky originale e Vacumed FL in valori assoluti (mg/dl) e in percentuale relativa in relazione all'iniziale contenuto nel sangue intero. In F il contenuto cellulare riscontrato nel plasma ricco di piastrine.

ressante per l'uso nella angiogenesi risulta molto contenuto in questo particolare tipo di PRF liquido, qualunque sia il tipo di provetta da centrifugazione usata (9.76% vs. 2.7%).

In particolare, le cellule mononucleate (monociti e linfociti): i) modulano il processo infiammatorio attraverso la produzione a livello locale di un ampio numero di citochine e di altre sostanze specifiche che danno inizio al processo di guarigione del tessuto; ii) stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni mediante il rilascio di citochine angiogeniche e di fattori di crescita nel microambiente del danno tissutale (effetto paracrino), contribuendo al rimodellamento vascolare del tessuto da rigenerare; iii) stimolano le cellule staminali e le cellule progenitrici locali per promuovere i processi riparativi.¹⁴

È stato dimostrato che l'infiammazione cronica di basso grado all'interno della parete vascolare è associata all'infiltrazione di Monociti. La maturazione dei monociti in macrofagi è accompagnata dalla produzione di citochine e fattori di crescita. Un'ampia percentuale di cellule progenitrici endoteliali (EPC) circolanti risulta essere di origine monocitica. I monociti, quindi, risultano ampiamente coinvolti nella formazione dei vasa vasorum mediata dal VEGF.¹⁵

Advanced-PRF liquid 1300 rpm×5 min è stato ottenuto in provetta Vacumed FL e in provetta S-PRF Sticky ($RCF_{\text{coagulo}}=142$ g; $RCF_{\text{max}}=189$ g; $RCF_{\text{min}}=66$ g) ed è stata riscontrata una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr. 10×, 20×, 40× e 100× ad immersione) in *Figura Supplementare 3* (A, B, C, D), (E, F, G, H) rispettivamente, con l'uso della provetta S-PRF Sticky. Una struttura di rete di fibrina conformata non è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati. Nella stessa *Figura Supplementare 3* in E', F' e G' vengono riportati i contenuti cellulari presenti nel liquido di spremitura di A-PRF liquid coagulato in provetta Vacumed FL a 37°C e compresso in PRF Box per 2 minuti, colorati con Blu di Metilene e May-Grünwald, e si riscontrano scarsi elementi cellulari fatta eccezione per le poche piastrine presenti.

Anche con l'uso della provetta Vacumed FL e con una colorazione mista Blu di Toluidina/May-Grünwald (*Figura Supplementare 4*) non è stata osservata una rete di fibrina conformata, mentre sono stati individuati elementi cellulari di derivazione ematica presenti in varie concentrazioni.

Concentrazioni maggiori di piastrine (115.58% vs. 97.74%), Monociti (54.9% vs. 33.3%) e fibrinogeno (88.01% vs. 87.54%) rispetto al sangue intero sono state riscontrate in A-PRF liquid ottenuto con provetta Vacumed FL nel confronto con quelle con originali S-PRF Sticky (*Tabelle Supplementari 3, 4*) mentre i linfociti (193.10% vs. 182.32%) risultano maggiori con l'uso di provette S-PRF Sticky e sono riportate in modo esteso nelle didascalie della *Figura Supplementare 3*, mentre

quelle con la provetta Vacumed FL sono riportate nelle didascalie della *Figura Supplementare 4* e nei grafici in *Figura 3*.

Nel i-PRF 700 rpm×5 min ottenuto in provetta Vacumed FL e in provetta S-PRF Sticky ($RCF_{\text{coagulo}}=38$ g; $RCF_{\text{max}}=55$ g; $RCF_{\text{min}}=22$ g) ed è stata riscontrata una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr. 10×, 20×, 40× e 60×) e riportata in *Figura Supplementare 5* (A, C, E, G), (B, D, F, H) rispettivamente, con l'uso di una provetta Vacumed FL. Neanche in questo caso una struttura di rete di fibrina ben conformata è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati, fatta eccezione per alcuni filamenti sottili.

Anche con l'uso della provetta S-PRF Sticky con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald (*Figura Supplementare 6* [A, C, E, G], [B, D, F, H] rispettivamente) (ingr. 10, 20, 40, 60×) non è stata osservata una rete di fibrina conformata, mentre sono stati individuati elementi cellulari di derivazione ematica presenti in diverse concentrazioni riportate in *Tabella Supplementare 6*.

Concentrazioni maggiori di piastrine (126.27% vs. 109.49%), Monociti (127.59% vs. 84.62%) rispetto al sangue intero sono state riscontrate in i-PRF liquid ottenuto con provetta Vacumed FL rispetto a quelle con originali S-PRF Sticky (*Tabelle Supplementari 5, 6*) mentre i linfociti (242.12% vs. 192.99%) e fibrinogeno (87.3% vs. 67.97%) risultano maggiori con l'uso di provette S-PRF Sticky e sono riportate in modo specifico nelle didascalie della *Figura Supplementare 6*, mentre quelle con la provetta Vacumed FL sono illustrate nelle didascalie della *Figura Supplementare 5* e nei grafici in *Figura 3*.

Particolarmente importante è risultata la concentrazione di Monociti presenti in i-PRF 700 rpm×5' per l'uso possibile nella rigenerazione vascolare ottenuto con la provetta Vacumed FL (127.59%) rispetto alla S-PRF Sticky (84.62%).¹⁴ *In vivo*, infatti, i monociti si differenziano in cellule endoteliali e vengono incorporati nei vasi sanguigni.¹⁶

Anche nel i-PRF 3300 rpm×3 min ottenuto in provetta Vacumed FL e in provetta S-PRF Sticky ($RCF_{\text{coagulo}}=765$ g; $RCF_{\text{max}}=1008$ g; $RCF_{\text{min}}=403$ g) ed è stata riscontrata una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr. 10×, 20×) in *Figura Supplementare 7* (A, C) e (B, D) rispettivamente, per la provetta Vacumed FL. Neanche in questo caso una struttura di rete di fibrina ben conformata non è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati, eccetto per alcuni filamenti sottili. Anche con l'uso della provetta S-PRF Sticky con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald (*Figura Supplementare 7* [A', C'], [B', D'] rispettivamente) (ingr. 10, 20×) non è stata osservata una rete di fibrina neanche solo accennata, mentre sono stati individuati elementi cellulari di derivazione

ematica presenti in diverse concentrazioni e riportati nelle *Tabelle Supplementari 7, 8*.

Concentrazioni maggiori di piastrine (54.02% vs. 42.52%), e fibrinogeno (97.6% vs. 84.44%) rispetto al sangue intero sono state riscontrate in i-PRF liquid 3300 rpm×3' ottenuto con provetta originale S-PRF Sticky rispetto a quelle Vacumed FL (*Tabelle Supplementari 7, 8*) mentre i linfociti (200.37% vs. 135.43%), granulociti neutrofili (20.10% vs. 15.87%) e monociti (13.56% vs. 9.09%) risultano maggiori con l'uso di provette Vacumed FL e sono riportate in modo specifico nelle didascalie della *Figura Supplementare 7* e nei grafici in *Figura 3*.

È stato esaminato anche il concentrato piastrinico definito fibrinogeno liquido 2700 rpm×3 min ottenuto in provetta Vacumed FL e in provetta S-PRF Sticky (RCF_{coagulo}=408 g; RCF_{max}=653 g; RCF_{min}=326 g) ed è stata riscontrata una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr. 10×, 20×) in *Figura Supplementare 8* (A, C) e (B, D) rispettivamente, per la provetta Vacumed FL.¹⁶ Neanche in questo caso una struttura di rete di fibrina ben conformata è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati, fatta eccezione per alcuni filamenti sottili evidenziati alla colorazione May-Grünwald. Anche con l'uso della provetta S-PRF Sticky e con una colorazione con Blu di Metilene ed May-Grünwald (*Figura Supplementare 8* [A', C'], [B', D'] rispettivamente) (ingr. 10, 20×) non è stata osservata alcuna rete di fibrina conformata, mentre sono stati individuati elementi cellulari di derivazione ematica presenti in diverse concentrazioni, che sono riportati nelle *Tabelle Supplementari 9, 10*.

Concentrazioni maggiori di piastrine (56.43% vs. 51.47%), monociti (40.54% vs. 12.55%) e granulociti neutrofili (32.25% vs. 31.61%) rispetto al sangue intero sono state riscontrate in fibrinogeno liquido ottenuto con provetta originale S-PRF Sticky rispetto a quelle Vacumed FL (*Tabelle Supplementari 9, 10*), mentre fibrinogeno (63.1% vs. 47.36%) e Linfociti (227.19% vs. 215.02%) risultano maggiori con l'uso di provette Vacumed FL e sono riportate in modo specifico nelle didascalie della *Figura Supplementare 8* e nei grafici seguenti in *Figura 3*.

Nel PRP estratto in 21 pazienti (2200 rpm, 1147 g×20 min) con provetta da 15 ml BioReb Base (Biodevice & Advanced Materials S.r.l. Napoli, Italy) con gel separatore e anticoagulante (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution, Solution A, USP) con centrifuga HETTICH EBA200 ad angolo fisso di 33°C), ma anche in quello prodotto con doppia centrifugazione è stata riscontrata una presenza cellulare evidenziata con la colorazione Blu di Metilene ed May-Grünwald in campo a bassa potenza (ingr. 10×, 20×, 40×) in *Figura Supplementare 9* (A, B, C) e (A', B', C') rispettivamente.^{7,17} Anche in questo caso una struttura di rete di fibrina ben costituita non è stata osservata in nessuno dei campioni esaminati. È stata riscontrata una bassa

concentrazione di piastrine rispetto al sangue intero (11.54%) (*Tabella Supplementare 11*), assenza di Monociti, una ridotta quantità di granulociti neutrofili (1.99%) e di linfociti al 28.7% e il fibrinogeno al 36.9% rispetto al sangue intero *Tabella Supplementare 11*, *Figura 3* e *Figura Supplementare 9*.

Da notare che il PRP prodotto non si solidifica poiché la concentrazione di fibrinogeno è bassa.

Il PRP in letteratura risulta essere un concentrato piastrinico con una concentrazione di trombociti da alta a molto alta, ma con una minore quantità di fibrinogeno naturale.¹⁸

Discussione

È stata analizzata l'efficienza di diversi protocolli nella preparazione della PRF liquida, ma è stata confrontata utilizzando un solo tipo di centrifuga ed è stato utilizzato un ridotto numero di campioni per ciascun protocollo.

La generazione di PRF è un processo dipendente dalla centrifugazione.¹⁸⁻²⁰ Le centrifughe funzionano mettendo i supernatanti in rotazione attorno a un asse fisso, applicando così una forza di accelerazione perpendicolare all'asse. La forza centrifuga relativa (RCF; forza g) è la forza di accelerazione applicata a un campione in una centrifuga, che è direttamente proporzionale ai giri al minuto (RPM) a cui è sottoposto un campione in una provetta. Questa forza risultante provoca la separazione di vari elementi nel campione in base al peso individuale dei suoi elementi ed è la base per le tecniche di separazione del sangue effettuate dalle centrifughe da laboratorio. RCF (g) è misurato in multipli dell'accelerazione standard dovuta alla gravità sulla superficie terrestre e si basa su due variabili specifiche che includono la larghezza/raggio del rotore e la velocità di rotazione (RPM). Il raggio della centrifuga o il rotore è fondamentale quanto l'RPM nel processo di produzione di uno specifico RCF. RPM e RCF sono correlati dalla formula $RCF=1,12 \times r \times (RPM/1000)^2$ dove r è il centro della distanza tra l'estremità della provetta e la centrifuga in millimetri. RCF è un parametro importante nella produzione di PRF e deve essere calcolato per ogni tipo di centrifuga, specialmente se questo parametro non è preimpostato sulla macchina.

Le piastrine, in quanto componente dominante della PRF (IFS), rappresentano le principali cellule responsabili dell'attività biologica della PRF. I PRF contengono varie molecole proteiche derivate dalle piastrine che sono coinvolte nella cascata di segnalazione della guarigione delle ferite.²¹ Tutte queste sostanze sono immagazzinate da tre tipi di granuli (α , δ e λ) situati all'interno delle piastrine. L'IFS, con la sua struttura a rete di fibrina lassa, può intrappolare un gran numero di globuli bianchi e piastrine e può

produrre e secernere continuamente fattori di crescita. L'IFS può promuovere la migrazione, la proliferazione e la secrezione nella matrice delle cellule staminali e dei fibroblasti cutanei situati intorno al difetto, grazie al suo rilascio stabile e prolungato di fattori di crescita.

Le singole situazioni cliniche richiedono diversi tipi di applicazione. Pertanto, questo prodotto derivato dal sangue può essere regolato individualmente e preparato secondo specifici requisiti clinici come matrici liquide e solide di PRF. Il PRF liquido può essere utilizzato per biologizzare biomateriali, come sostituti ossei e membrane di collagene xeno genico o infiltrato in sede periulcerosa.

Poiché questo studio è stato avviato come pilota, privo di finanziamenti, esso è stato limitato a un numero piccolo di partecipanti. Al fine di ridurre al minimo il rischio di imparzialità dovuto a generi diversi in questo basso numero di volontari, in questo primo studio pilota sono stati inclusi soggetti di ambo i sessi con vasculopatia periferica e senza. 9 mL di sangue intero sono stati centrifugati in provette di plastica (provette per i-PRF S-PRF Sticky, process per PRF™, Nizza, Francia) per ottenere PRF liquid e provette Vacumed FL in PET. La centrifuga (Duo centrifuge, Process for PRF™, Nizza, Francia) utilizzata aveva un angolo fisso, nessun freno e una dimensione del rotore di 110 mm secondo il protocollo (angolazione del rotore di 43,1°C, raggio di 75 mm al centro del tubo, 100 mm al massimo e 35 mm al minimo). L'importanza di determinare la quantità di fibrinogeno presente in ciascuna frazione e la resa dei componenti coagulabili presenti serve a prevedere la capacità del PRF liquido di generare membrane PRF. Molti fattori come il fibrinogeno possono essere rilasciati dai granuli α delle piastrine per formare un coagulo.⁷ L'incorporazione del fibrinogeno negli α -granuli avviene attraverso un meccanismo di endocitosi mediata dal recettore integrina $\alpha_{IIb} \beta_3$.²²

La conversione del fibrinogeno in fibrina è mediata dalla trombina che scinde i fibrinopeptidi A e B rispettivamente dalle catene A α e B β formando un monomero di fibrina che poi polimerizza per formare una rete ramificata di fibre.

È stato riscontrato un accumulo medio di piastrine di quasi 1,5 volte nel fibrinogeno liquido rispetto ai campioni di sangue intero. Questi risultati hanno un significato importante poiché un raccolto piastrinico più elevato con un volume plasmatico più elevato ha un valore clinico maggiore e una concentrazione piastrinica più elevata da sola non ha alcun significato.^{23,24}

Questo concetto ci ha indotto ad usare un termostato per provette che ci ha permesso in numerosi casi di ottenere una maggiore quantità di PRF liquido (>3,5 ml).

La membrana L-PRF ed i vari tipi di PRF Liquido, tra cui il Fibrinogeno liquido presentano una elevata concentrazione di leucociti e piastrine.²⁵ La combinazione di piastrine attivate nel PRF e il Fibrinogeno si traduce in una

produzione di massa di fibrina. Più dell'80% delle Piastrine ed il 72% dei Leucociti del campione di sangue iniziale sono presenti nel PRF. Lo stesso vale per il Fibrinogeno liquido con l'88% ed il 70% rispettivamente. L'essudato ha mostrato un basso contenuto cellulare con il 2,5% di Piastrine e lo 0,9% di leucociti.²⁵⁻²⁸

In questo studio preliminare abbiamo evidenziato che il tipo di PRF Liquido a maggiore contenuto di piastrine, monociti, linfociti e granulociti neutrofili, con un contenuto sufficiente di fibrinogeno, è il i-PRF (700 rpm×5 min). In particolare, è risultato notevole il contenuto di piastrine, monociti e granulociti neutrofili nell'i-PRF (700 rpm×5') ottenuto con provetta Vacumed FL (cod. 44909) con differenze statisticamente non significative rispetto al sangue intero (Figura 3), mentre è maggiore il contenuto di linfociti e fibrinogeno ottenuto con i-PRF (700 rpm×5') estratto con provetta PRF-S-Sticky.

Molto minore, nel confronto, risulta il contenuto di cellule e Fibrinogeno ottenuto con i due metodi di preparazione del PRP (Figura 3E), contrariamente a quanto sostenuto da Rattanasuwan e Pietruszka.^{7,12}

Conclusioni

Il nostro studio ha cercato di standardizzare la procedura di preparazione del PRF Liquido, la quale, pur rimanendo una tecnica di facile esecuzione e a basso costo, non richiede attrezzature specializzate ed ha una certa costanza nella produzione in termini di caratteristiche macroscopiche, microscopiche e citologiche.

A conoscenza degli autori, nessuno studio fino ad oggi ha indagato il contenuto cellulare e di fibrinogeno confrontandoli nei vari tipi di PRF Liquido fino ad oggi prodotti con l'uso di una centrifuga Duo ad angolo fisso (PROCESS, Francia). In sintesi, un IFS (iniectabile fibrin scaffold) è stato estratto mediante centrifugazione one-step. Questo metodo è relativamente semplice da applicare e produce un concentrato piastrinico facile da usare in una formulazione liquida. L'impalcatura liquida contiene globuli bianchi e piastrine che possono sostenere il rilascio di fattori di crescita. Pertanto, l'IFS può essere utilizzato come agente terapeutico da solo o in combinazione con altri biomateriali per promuovere la rigenerazione dei tessuti. Nei dispositivi ad angolo fisso, le cellule vengono spinte contro la parete della provetta e in questo processo i globuli rossi più grandi intrappolano le piastrine e le trascinano nella zona rossa. Nelle centrifughe orizzontali non esiste tale fenomeno; quindi, c'è una netta separazione delle cellule in base alla loro massa, per cui si vuole riportare, in prossimi studi, il contenuto cellulare con quello della centrifuga oscillante.

Noi prospettiamo, inoltre, nei prossimi studi clinici, di utilizzare il PRF Liquido da noi valutato contenere la mag-

giore concentrazione di piastrine e monociti (i-PRF 700 rpm×5 min prodotto con provetta Vacumed FL) (cod. 44909) (126.27% e 127.59%)¹⁴ in modo da iniettarlo ai bordi di una ferita ulcerata nella quantità di 1 ml ogni 2 cm in sede sottocutanea per stimolare la rigenerazione tissutale e la neoangiogenesi.²⁹ La terapia cellulare autologa rappresenta infatti, una terapia innovativa per l'ischemia critica degli arti non rivascolarizzabili. I principali benefici della terapia cellulare sono l'induzione dell'angiogenesi terapeutica con formazione di collaterali che portano all'aumento del flusso sanguigno nell'arto ischemico e alla rigenerazione dei tessuti nelle lesioni trofiche cutanee non *healing*. La terapia con cellule autologhe è più efficace del trattamento convenzionale per la CLI non rivascolarizzabile (NO-CLI)³⁰. Le *Peripheral Blood Mononuclear Cells* utilizzate nella terapia cellulare autologa, sono una popolazione eterogenea composta da cellule CD34⁺, linfociti e monociti, e da cellule staminali ematopoietiche CD34⁺ e EPC, sebbene presenti in bassa concentrazione.³¹ Tuttavia, non possiamo trascurare il fatto che, se ottenuta da un campione di sangue autologo, la PRF liquida prodotta è scarsa (~2 ml per 9 ml di sangue prelevato) e può essere utilizzata solo in un volume limitato.

Bibliografia

- Shao Z, Lyu C, Teng L, et al. An Injectable Fibrin Scaffold Rich in Growth Factors for Skin Repair. *Biomed Res Int* 2021;8094932.
- Singh D, Rai V, Agrawal DK. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med* 2023;7:5-16.
- Crisci A, Crisci M. Second-Generation Platelet Concentrates (PRFs): Estimation of Cellular Content. *Biointerface Res Appl Chem* 2022;12:4747-54.
- Crisci A, De Crescenzo U, Crisci M. Platelet-Rich Concentrates (L-PRF, PRP) in Tissue Regeneration: Control of Apoptosis and Interactions with Regenerative Cells. *J Clin Mol Med* 2018;1:5-2.
- Karimi K, Rockwell H. The Benefits of Platelet-Rich Fibrin. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2019;27:331-40.
- Castro AB, Andrade C, Li X, et al. Impact of g force and timing on the characteristics of platelet-rich fibrin matrices. *Sci Rep* 2021;11:6038.
- Rattanasuwan K, Rassameemasmaung S, Kiattavorncharoen S, et al. Platelet-rich plasma stimulated proliferation, migration, and attachment of cultured periodontal ligament cells. *Eur J Dent* 2018;11:192-5.
- Miron R, Chai J, Zhang P, et al. A novel method for harvesting concentrated platelet-rich fibrin (C-PRF) with a 10-fold increase in platelet and leukocyte yields. *Clin Oral Investig* 2020;24:2819-28.
- Kargarpour Z, Panahipour L, Miron RJ, Gruber R. Fibrinogen Concentrations in Liquid PRF Using Various Centrifugation Protocols. *Molecules* 2022;27:2043.
- O'Connell SM. Safety issues associated with platelet-rich fibrin method. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:587-93.
- Crisci A, Barillaro MC, Lepore G, Cardillo F. L-PRF Membrane (Fibrin Rich in Platelets and Leukocytes) and Its Derivatives (A-PRF, i-PRF) are Helpful as a Basis of Stem Cells in Regenerative Injury Treatment: Trial Work on the Horse. *Int Blood Res Rev* 2020;10:1-14.
- Pietruszka P, Chruścicka I, Duś-Ilnicka I, Paradowska-Stolarz A. PRP and PRF-Subgroups and Divisions When Used in Dentistry. *J Pers Med* 2021;11:944.
- Zwittnig K, Kirnbauer B, Jakse N, et al. Growth Factor Release within Liquid and Solid PRF. *J. Clin. Med* 2022;11:5070.
- Bucalossi M, Mariani F. Mononucleate da sangue periferico autologhe da filtrazione selettiva per il trattamento delle lesioni croniche dell'arto inferiore. Risultati a 4 anni. *Ital J Wound Care* 2021;5.
- Jaipersad A, Lip G, Silverman S, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1-11.
- Lopes-Coelho F, Silva F, Gouveia-Fernandes S, et al. Monocytes as Endothelial Progenitor Cells (EPCs), Another Brick in the Wall to Disentangle Tumor Angiogenesis. *Cells* 2020;9:107.
- Serafini G, Lopreiato M, Lollobrigida M, et al. Platelet rich fibrin (PRF) and its related products: biomolecular characterization of the liquid fibrinogen. *J Clin Med* 2020;9:1099.
- Przadka P, Kielbowicz Z, Skrzypczak P. Autogenne osocze bogatoplytkowe—Rodzaje, sposoby aktywacji i zastosowanie. *Med Weter* 2016;72:403-7.
- De Almeida Barros Mourao CF, Valiense H, Melo ER, et al. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir* 2015;42:421-3.
- Sneha K, Rani AJ, Chandra RV, et al. The G-force conundrum in platelet-rich fibrin generation: Management of a problem hidden in plain sight. *Contemp Clin Dent* 2022;13:150-5.
- Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, et al. Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Med (Wars)* 2021;16:446-54.
- Handagama P, Scarborough RM, Shuman MA, Bainton DF. Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* 1993;82:135-8.
- Ragunathan N, Anchana Devi C, Hemavani V. A novel approach of harvesting concentrated plasma-rich fibrin (PRF) with increased platelet count. *J Med Res Innov* 2022;6:1-8.
- Castro AB, Cortellini S, Temmerman A, et al. Characterization of the Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Block: Release of Growth Factors, Cellular Content, and Structure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2019;34:855-64.
- Crisci A, Benincasa G, Crisci M, Crisci F. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new biomembrane useful in tissue repair: basic science and literature review. *Biointerface Res Appl Chem* 2018;8:3635-43.
- Crisci A, Kawase T, D'Adamo R, Crisci M. Experimental research on a technique for quantification of platelets and leukocytes in second-generation platelet concentrates. *Int J Curr Med Pharma Res* 2019;5:4792-9.

27. Crisci A, Crisci M, Flagiello F. Second generation solid platelet concentrates (L-PRF, A-PRF): morphometric characteristics. *Experimental research on the horse. Am J Eng Res (AJER)* 2022;11:107-17.
28. Crisci M, Crisci A. Estimation of Cellular Content in Second-Generation Solid Fibrin Concentrates (PRFs). *Cutting Edge Res Biol* 2023;4:52-64.
29. Husakova J, Bem R, Fejfarova V, et al. Factors Influencing the Risk of Major Amputation in Patients with Diabetic Foot Ulcers Treated by Autologous Cell Therapy. *J Diabetes Res.* 2022;3954740.
30. Rehak L, Giurato L, Meloni M, et al. The Immune-Centric Revolution in the Diabetic Foot: Monocytes and Lymphocytes Role in Wound Healing and Tissue Regeneration — A Narrative Review. *J Clin Med* 2022;11:889.
31. Ragghianti B, Berardi BM, Mannucci E, Monami M. Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Small Artery Disease and Diabetic Foot Ulcers: efficacy, safety and economic evaluation. *J Clin Med* 2023;12.

Non-commercial use only