

il Diabete

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023



– RASSEGNE

L'eterogeneità del diabete autoimmune

Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1

Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata

– EDITORIALI

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

– AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale

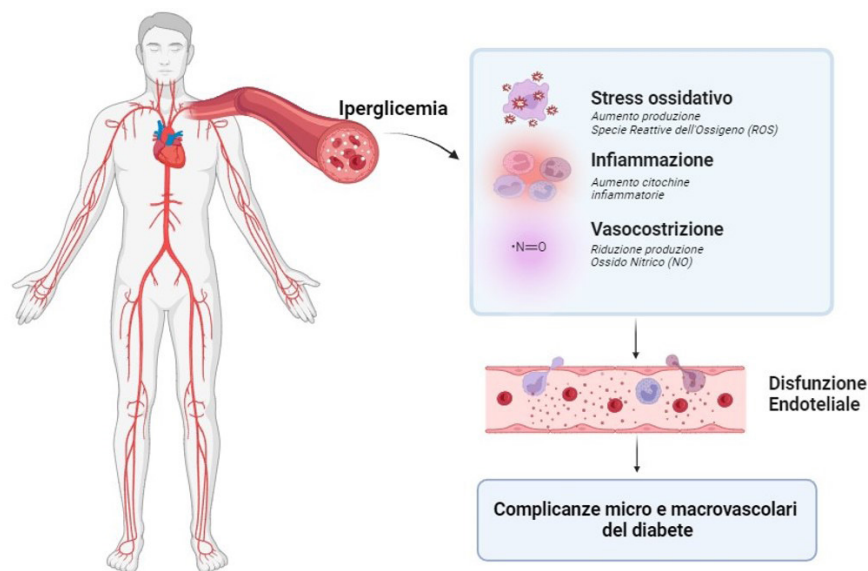
– JOURNAL CLUB

– MEDICINA TRASLAZIONALE

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

– AGGIORNAMENTO CLINICO

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva



il Diabete

Organo ufficiale della
Società Italiana di Diabetologia

Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

Co-direttori

Massimiliano Cavallo (Terni, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Simona Frontoni (Roma)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Comitato di Redazione

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

CONSIGLIO DIRETTIVO SID

Presidente

Angelo Avogaro (Padova)

Presidente Eletto

Raffaella Buzzetti (Roma)

Tesoriere

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

Segretario

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

Consiglieri

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

Sommario

Ricordando Simona

di Anna Solini

– **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO

153 **L'eterogeneità del diabete autoimmune**

Ernesto Maddaloni, Raffaella Buzzetti

162 **Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1**

Niccolò Pellegrini, Giulia Leanza e Paolo Pozzilli

173 **Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata**

Antonella Marucci, Rosa Di Paola, Claudia Menzaghi e Vincenzo Trischitta

184 – **EDITORIALI** A CURA DI SIMONA FRONTONI

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

Matteo Monami

191 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale

193 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

196 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**

A CURA DI CARLA GRECO E MASSIMILIANO CAVALLO

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

Miriam Longo, Antonietta Maio, Graziella Botta, Paola Caruso, Katherine Esposito

213 – **AGGIORNAMENTO CLINICO** A CURA DI GIUSEPPE DEFEUDIS

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva

Marco Grasso, Vera Frison, Nino Cristiano Chillelli, Alessio Filippi, Giorgia Costantini, Cristina Vilotti, Natalino Simioni

GOLDEN CIRCLE



il Diabete

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023

Direzione Scientifica

Sebastiano Squatrito, Catania

Direttore Responsabile

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2023 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-326-0

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2303

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

Fondazione Bologna University Press

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019

e-mail: info@buponline.com

www.buponline.com

Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

Avvertenza ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

a cura di Simona Frontoni

Ospedale Fatebenefratelli Isola Tiberina, Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

Risultati di uno studio prospettico non controllato sul trattamento cellulare con cellule mononucleate da sangue periferico in pazienti affetti da piede diabetico ulcerato e malattia dei piccoli vasi: efficacia, sicurezza e valutazione economica

Ischemic diabetic foot ulcers: autologous cell therapy as a possible adjuvant treatment

Results from a prospective uncontrolled study on autologous peripheral blood mononuclear cells in patients with small artery disease and diabetic foot ulcers: efficacy, safety, and economic evaluation

Matteo Monami

SOD Diabetologia e Malattie metaboliche, AOU-Careggi; Firenze

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303d>

ABSTRACT

Background/aim: *this editorial is aimed at providing some insights on cell therapy in patients with diabetic foot ulcers and no-option critical limb-threatening ischemia (CLTI).*

Methods and results: *the present paper revised the available evidence on cell therapy in patients affected by diabetes and peripheral artery disease and reported the main results of a recently published uncontrolled study on the effects of peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) therapy in patients with diabetic foot ulcers, no-option CLTI, and small artery disease. All patients included in that study were allocated in a surgery waiting-list for major amputations. Patients treated with autologous PBMNC experienced a significant reduction of pain levels, an increase of oxygen tissue levels, a high rate of healing without the need of a major amputation.*

Conclusions: *the present paper illustrates the possible favorable effects of PBMNC cell therapy in patients with diabetes and peripheral artery disease even in presence of microangiopathy.*

KEYWORDS

PBMNC, diabetes, foot ulcers, no-option critical limb-threatening ischemia, small artery disease.

INTRODUZIONE

Le ulcere del piede diabetico rappresentano la principale causa di ospedalizzazione ed amputazione maggiore degli arti inferiori e nei pazienti diabetici con lesioni ulcerative in atto si stima che il rischio di amputazione maggiore sia di circa 15 volte superiore rispetto a quello dei soggetti non diabetici (1-2).

La causa principale dell'amputazione nei pazienti con piede diabetico è quasi sempre legata direttamente o indirettamente alla presenza dell'Arteriopatia Obliterante Periferica (AOP), che nei pazienti diabetici spesso si presenta con quadri ad evoluzione più rapida e più grave rispetto ai non diabetici (3). Si stima che la presenza di ischemia critica agli arti inferiori nei diabetici possa raggiungere prevalenze di quasi il 25% con prognosi *quod vitam* (4) e *quod functionem* (5) molto sfavorevole.

L'ulcera ischemica del piede diabetico è l'anello di congiunzione che lega l'ischemia distrettuale dell'AOP all'amputazione, che viene infatti quasi sempre preceduta da una lesione trofica degli arti inferiori (6).

Le sedi più frequenti dell'ulcera ischemica sono quelle marginali del piede (2) (Fig. 1), dove la circolazione terminale non permette un margine sufficiente di compenso emodinamico.

L'approccio terapeutico ai pazienti diabetici con AOP è fondamentalmente legato alle possibilità di rivascolarizzazione.

Figura 1 ◆



PROCEDURE DI RIVASCOLARIZZAZIONE

Per molto tempo, l'unica opzione terapeutica era quella chirurgica (by-pass) che è rimasta fino a pochi anni fa il "gold standard" del trattamento della AOP, nonostante l'introduzione negli anni Novanta di procedure endovascolari (PTA - Percutaneous Transluminal Angioplasty). Infatti, rispetto all'angioplastica, il by-pass si è sempre contraddistinto per una maggiore durata della pervietà dei vasi trattati, anche se con un rischio di eventi avversi periprocedurali più elevato (7).

Recentemente, tuttavia, l'approccio endoluminale ha compiuto notevoli progressi in termini di efficacia, durabilità e sicurezza (8) tali da, in alcuni sistemi sanitari, far prediligere questa modalità di rivascolarizzazione a quella chirurgica tradizionale (9).

Qualunque sia l'approccio utilizzato per rivascolarizzare l'arto inferiore, tuttavia, circa il 25% dei pazienti affetti da ischemia critica non risultano essere rivascolarizzabili per vari motivi, quali la presenza di numerose comorbidità (es. insufficienza renale grave), estese calcificazioni dell'intima-media, assenza di vene adatte a confezionare un by-pass, numerosi tentativi pregressi, ecc. (10). In queste situazioni, si parla di ischemia critica 'no-option' con quadri ischemici molto eterogenei che possono arrivare fino alla completa assenza o quasi di circolazione a livello del piede ("desert foot") (2).

I pazienti diabetici con una ischemia critica non rivascolarizzabile (o non ulteriormente rivascolarizzabile) rispetto ai soggetti che vengono rivascolarizzati, sono quelli a maggior rischio di amputazione maggiore (30% vs 4.5%) e di eventi fatali (50% vs 8.9%) (11). Tale rischio di eventi avversi maggiori aumenta ulteriormente in presenza della cosiddetta malattia dei piccoli vasi (Small Artery Disease - SAD), spesso poco conosciuta e quindi poco diagnosticata; tale condizione si trova più frequentemente proprio nei soggetti diabetici, specie se affetti anche da insufficienza renale o in trattamento dialitico (12-13). La SAD è una condizione vascolare, non ancora bene definita e studiata, che colpisce i piccoli vasi dell'arco plantare (12-13) con vari gradi di estensione che possono arrivare fino al cosiddetto "desert foot".

Nonostante la sua prevalenza (circa il 20-25% dei pazienti con piede diabetico ischemico) e il suo impatto prognostico, le opzioni terapeutiche per la SAD, così come per l'ischemia critica non rivascolarizzabile, sono limitate e spesso poco efficaci aumentando considerevolmente il rischio di amputazione, mortalità e spese dirette ed indirette per i sistemi sanitari di tutto il mondo.

TERAPIA CELLULARE AUTOLOGA

Negli ultimi anni, la terapia cellulare (cellule staminali mesenchimali, cellule mononucleate del midollo sanguigno con o senza stimolazione midollare) è risultata essere un approccio promettente per affrontare l'ischemia critica non rivascolarizzabile, promuovendo l'angiogenesi, la vasculogenesi e la riparazione dei tessuti. La terapia cellulare autologa, infatti, ha mostrato effetti favorevoli su diversi esiti, come il dolore, la tensione transcutanea di ossigeno, la guarigione dell'ulcera, l'amputazione maggiore e la mortalità (14).

Esistono numerosi meccanismi di azione in grado di fornire una plausibilità biologica a queste azioni favorevoli. In particolare, le cellule mononucleate da sangue periferico (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMNC) che comprendono monociti/macrofagi e linfociti, aumentano la circolazione periferica stimolando la neo-angiogenesi attraverso attività paracrine di molteplici fattori di crescita (15-16). Come noto da tempo, infatti, il reclutamento para fisiologico dei monociti (ma anche dei linfociti [17-18]) nelle aree ischemiche favorisce la formazione di circoli vascolari collaterali (19), in grado di produrre e rilasciare nell'ambiente fattori pro-angiogenici, citochine e molecole messaggere che agiscono con effetto paracrino (15). Tale capacità angiogenica aumenta nel tessuto ischemico (16, 20-21) ed è mantenuta anche nei pazienti diabetici (22). Un'altra azione fondamentale dei monociti/macrofagi è quella stimolativa dei processi di rigenerazione tissutale (23-24). Queste cellule, infatti, vengono reclutate a livello di aree cutanee lesionate (19) ed esercitano la propria azione riparativa mediante la produzione di fattori di crescita (25), dimostrata anche nelle lesioni ulcerative del piede diabetico (26, 29, 34, 36). I monociti, inoltre, sono in grado di attivare la conversione dei macrofagi infiammatori M1, presenti in alte concentrazioni in tutte le lesioni croniche (in particolare nel piede diabetico [27]), in macrofagi M2. Questi ultimi sono dotati di proprietà antinfiammatorie e rigenerative, pertanto capaci di creare un microambiente altamente favorevole alla rigenerazione tissutale. Il rilascio, infine, di oppioidi naturali da parte dei macrofagi M2 (28) determina una importante azione antalgica, riducendo sensibilmente il dolore percepito dal paziente.

La terapia cellulare può essere somministrata attraverso vie e metodologie diverse a seconda delle linee cellulari utilizzate, dello stadio della malattia e dell'obiettivo del trattamento. Le vie di somministrazione più comuni includono

l'iniezione intramuscolare, l'infusione endovenosa, l'iniezione diretta nel tessuto o nel muscolo bersaglio e la somministrazione attraverso specifici supporti bioattivi (29).

Cellule autologhe mononucleate da sangue periferico prelevate senza stimolazione con fattore di mobilitazione

Negli ultimi anni, alcuni autori hanno proposto l'iniezione intramuscolare di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMNCs) senza stimolazione midollare (mobilitazione), che ha dimostrato un'efficacia simile rispetto alle cellule staminali "tradizionali". Studi recenti hanno, infatti, mostrato come anche le popolazioni monocitarie e linfocitarie da sangue periferico hanno, similmente a quelle progenitrici midollari, ottime proprietà neo-angiogeniche (16, 20) e rigenerative (15) a livello tissutale.

Inoltre, questo nuovo approccio presenta diversi vantaggi, come l'impiego di tecniche di estrazione meno invasive, procedure più brevi e meno dolorose e ripetibili (19, 29).

Sulla base di queste considerazioni, sono state sviluppate nuove tecnologie che hanno reso possibile la produzione di concentrati di cellule autologhe mononucleate provenienti da sangue periferico (senza necessità di stimolazione con fattori di crescita nei giorni precedenti il prelievo), spostando l'attenzione della comunità scientifica, impegnata nel campo della medicina rigenerativa, dalle "tradizionali" cellule staminali midollari o da tessuto adiposo, a quelle immunitarie (in particolare monociti/macrofagi e linfociti) (30).

Qualunque sia la linea cellulare utilizzata e la via di somministrazione impiegata, infatti, la terapia cellulare in pazienti affetti da lesioni ulcerative ischemiche si è dimostrata una valida opzione soprattutto nel caso di soggetti affetti da arteriopatia obliterante periferica giudicata non rivascolarizzabile (o non ulteriormente rivascolarizzabile) (14, 31).

Numerose metanalisi di studi randomizzati e osservazionali (14, 31) hanno, infatti, mostrato un miglior outcome clinico nei pazienti con CLI non option trattati con terapia cellulare autologa, con riduzione dei livelli di dolore percepito maggiore probabilità di guarigione delle lesioni ulcerative e degli indici di perfusione periferica, quali ABI e TcPO₂. In particolare, Rigato et al. hanno dimostrato in analisi estensiva per tipologia di terapia cellulare, comparando mononucleate da midollo (BM-MNC), mesenchimali da midollo (BM-MSC) e PBMNC che solo queste ultime riducevano in modo significativo l'amputazione di pazienti con ischemia critica non-option (14).

Nonostante vi possano essere dei dubbi sull'efficacia di tali terapie nel paziente diabetico, in quanto la presenza di diabete può alterare in maniera significativa le proprietà angiogeniche e rigenerative delle popolazioni cellulari midollari utilizzate (14, 31-33), la maggior parte delle evidenze sembra non mostrare differenti profili di azione della terapia cellulare con PBMNC nella popolazione diabetica (34-37).

DESCRIZIONE DELLO STUDIO PROSPETTICO

Recentemente abbiamo pubblicato uno studio non controllato su una serie consecutiva di pazienti con lesioni ulcerative del piede diabetico ed affetti da AOP giudicata non operabile e malattia dei piccoli vasi (SAD - Small Artery Disease) (37). Tutti i pazienti inclusi nell'analisi erano allocati in una lista di attesa per un intervento di amputazione maggiore. Lo scopo dello studio, oltre a valutare l'effetto di un ciclo di terapia cellulare sulla guarigione delle lesioni ulcerative (tutte di grado Texas 3) senza un atto demolitivo maggiore e/o sulla possibilità di distalizzare l'amputazione, è stato anche quello di valutare la sostenibilità economica dell'intervento proposto.

La scelta di questa particolare tipologia di pazienti è stata fatta in quanto non esiste, come detto, alcun trattamento codificato per la SAD e le poche opzioni terapeutiche esistenti, come la modifica dello stile di vita, l'impiego di farmaci vasoattivi (es. anticoagulanti, prostaglandine ecc.) e le procedure di rivascolarizzazione hanno un'efficacia limitata e in alcuni casi significativi effetti collaterali (12).

Il concentrato cellulare di PBMNC è stato prodotto con sistema a filtrazione selettiva Hematrate Procedure Pack (Athena Cell Therapy Technologies) (Fig. 2), con indicazione d'uso per terapia cellulare umana e caratterizzazione pubblicata su rivista scientifica indicizzata (38).

Figura 2 ◆



I risultati di questo studio (37) seppur incoraggianti (miglioramento significativo dei valori ossimetrici, aumento dei tassi di guarigione mediante atti chirurgici minori, amputazione maggiore necessaria solo nel 20% dei pazienti inclusi, riduzione dei livelli di dolore percepito (Fig. 1) e apparentemente costo-efficaci, devono tener conto di alcuni limiti importanti, quali la natura osservazionale dello studio (non controllato), dell'esigua numerosità della casistica arruolata ed il breve follow-up (1 anno).

Tuttavia, nonostante i limiti sopra descritti, i dati ottenuti sono, come detto, promettenti e rendono la terapia cellulare con PBMNC una possibile arma terapeutica nei pazienti con arteriopatía obliterante agli arti inferiori non rivascolarizzabile, anche in presenza di microangiopatía.

CONCLUSIONI

La terapia cellulare con PBMNC è entrata nella pratica clinica per il trattamento di CLI non option, nei fallimenti della rivascolarizzazione, e anche come terapia adiuvante alla rivascolarizzazione nei pazienti diabetici e nel trattamento del piede diabetico e delle lesioni non healing. Considerando l'elevato numero di studi clinici e di meta-analisi pubblicati, dal 2002 al 2020, e l'alto numero di pazienti trattati in Italia, forse dovremmo ritenere la terapia cellulare autologa con PBMNC una arma potenzialmente in grado di modificare la storia naturale dell'ischemia critica nei pazienti con ischemia critica "no-option". È, a questo proposito, importante ricordare che queste terapie possono essere utilizzate al di fuori di qualsiasi sperimentazione, a condizione che i dati scientifici, che descrivono specificamente i metodi, la preparazione e l'uso, siano disponibili e pubblicati su riviste internazionali peer-reviewed.

Va inoltre sottolineato che la normativa europea con la nuova revisione della legislazione sulle cellule e i tessuti del sangue, adottata nell'ultimo trimestre del 2021, mira ad aggiornare la legislazione nella direzione di un allineamento

più flessibile con gli sviluppi scientifici e tecnologici. In linea con questo obiettivo, sembra muoversi nella direzione di una semplificazione, basata sull'analisi del rischio, per la produzione di prodotti di terapia cellulare autologa con cellule minimamente manipolate, prodotte con sistemi point-of-care, all'interno di una singola procedura chirurgica, per facilitarne l'uso ed evitare inutili e sproporzionati ostacoli burocratici, soprattutto per malattie critiche come la CLI che rappresentano un bisogno medico insoddisfatto (39).

BIBLIOGRAFIA

1. Ebskov B, Josephsen P. Incidence of reamputation and death after gangrene of the lower extremity. *Prosthet Orthot Int* 4(2): 77-80, 1980. doi: 10.3109/03093648009164567.
2. Meloni M, Izzo V, Giurato L, Lázaro-Martínez JL, Uccioli L. Prevalence, Clinical Aspects and Outcomes in a Large Cohort of Persons with Diabetic Foot Disease: Comparison between Neuropathic and Ischemic Ulcers. *J Clin Med* 9(6), 2020. doi: 10.3390/jcm9061780.
3. Thiruvoipati T, Kielhorn CE, Armstrong EJ. Peripheral artery disease in patients with diabetes: Epidemiology, mechanisms, and outcomes. *World J Diabetes* 6(7): 961-969, 2015. doi: 10.4239/wjd.v6.i7.961.
4. Elsayed S, Clavijo LC. Critical limb ischemia. *Cardiol Clin* 33(1): 37-47, 2015. doi: 10.1016/j.ccl.2014.09.008.
5. Reinecke H, Unrath M, Freisinger E, et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. *Eur Heart J* 36(15): 932-938, 2015. doi: 10.1093/eurheartj/ehv006.
6. Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM. Pathways to diabetic limb amputation. Basis for prevention. *Diabetes Care* 13(5): 513-521, 1990. doi: 10.2337/diacare.13.5.513.
7. Romiti M, Albers M, Brochado-Neto FC, Durazzo AE, Pereira CA, De Luccia N. Meta-analysis of infrapopliteal angioplasty for chronic critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 47(5): 975-981, 2008. doi: 10.1016/j.jvs.2008.01.005.
8. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 58(1s): S1-S109.e33, 2019. doi: 10.1016/j.ejvs.2019.05.006.
9. Setacci C, Sirignano P, Galzerano G, et al. Endovascular first as "preliminary approach" for critical limb ischemia and diabetic foot. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 54(6): 679-84, 2013.
10. Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Makar RR, Smout JD, Torella F. Bypass surgery for chronic lower limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev* 4(4): Cd002000, 2017. doi: 10.1002/14651858.CD002000.pub3.
11. Antonopoulos CN, Mylonas SN, Moulakakis KG, et al. A network meta-analysis of randomized controlled trials comparing treatment modalities for de novo superficial femoral artery occlusive lesions. *J Vasc Surg* 65(1): 234-245.e11, 2017. doi: 10.1016/j.jvs.2016.08.095.
12. Ferraresi R, Mauri G, Losurdo F, et al. BAD transmission and SAD distribution: a new scenario for critical limb ischemia. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 59(5): 655-664, 2018. doi: 10.23736/s0021-9509.18.10572-6.
13. Ferraresi R, Ucci A, Pizzuto A, et al. A Novel Scoring System for Small Artery Disease and Medial Arterial Calcification Is Strongly Associated With Major Adverse Limb Events in Patients With Chronic Limb-Threatening Ischemia. *J Endovasc Ther* 28(2): 194-207, 2021. doi: 10.1177/1526602820966309.
14. Rigato M, Monami M, Fadini GP. Autologous Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Nonrandomized, and Noncontrolled Studies. *Circ Res* 120(8): 1326-1340, 2017. doi: 10.1161/circresaha.116.309045.
15. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis* 21(12): 1336-1353, 2016. doi: 10.1007/s10495-016-1292-8.
16. Gurevich DB, Severn CE, Twomey C, et al. Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *Embo j* 37(13), 2018. doi: 10.15252/embj.201797786.
17. Kwee BJ, Seo BR, Najibi AJ, et al. Treating ischemia via recruitment of antigen-specific T cells. *Sci Adv* 5(7): eaav6313, 2019. doi: 10.1126/sciadv.aav6313.
18. Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol* 9: 585, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00585.

19. Magenta A, Florio MC, Ruggeri M, Furgiuele S. Autologous cell therapy in diabetes-associated critical limb ischemia: From basic studies to clinical outcomes (Review). *Int J Mol Med* 48(3), 2021 doi: 10.3892/ijmm.2021.5006.
20. Krishnasamy K, Limbourg A, Kapanadze T, et al. Blood vessel control of macrophage maturation promotes arteriogenesis in ischemia. *Nat Commun* 8(1): 952, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-00953-2.
21. Patel AS, Smith A, Nucera S, et al. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO Mol Med* 5(6): 858-869, 2013. doi: 10.1002/emmm.201302752.
22. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schatteman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(4): 758-764, 2006. doi: 10.1161/01.ATV.0000203513.29227.6f.
23. Ogle ME, Segar CE, Sridhar S, Botchwey EA. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp Biol Med (Maywood)* 241(10):1084-1097, 2016. doi: 10.1177/1535370216650293.
24. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44(3): 450-462, 2016. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
25. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol* 61: 3-11, 2017. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.006.
26. Kimball A, Schaller M, Joshi A, et al. Ly6C(Hi) Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(5): 1102-1114, 2018. doi: 10.1161/atvbaha.118.310703.
27. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, et al. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(12): E715-24, 2012. doi: 10.1073/pnas.1111600109.
28. Pannell M, Labuz D, Celik M, et al. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *J Neuroinflammation* 13(1): 262, 2016. doi: 10.1186/s12974-016-0735-z.
29. Persiani F, Paolini A, Camilli D, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Therapy for Treatment of Lower Limb Ischemia in Diabetic Patients: A Single-Center Experience. *Ann Vasc Surg* 53: 190-196, 2018. doi: 10.1016/j.avsg.2018.05.036.
30. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 22(3): 545-562, 2013. doi: 10.3727/096368912x636777.
31. Ai M, Yan CF, Xia FC, Zhou SL, He J, Li CP. Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: A meta-analysis. *Cytotherapy* 18(6): 712-724, 2016. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.02.009.
32. Bitar MS. Diabetes Impairs Angiogenesis and Induces Endothelial Cell Senescence by Up-Regulating Thrombospondin-CD47-Dependent Signaling. *Int J Mol Sci* 20(3), 2019. doi: 10.3390/ijms20030673.
33. Fadini GP, Albiero M, Bonora BM, Avogaro A. Angiogenic Abnormalities in Diabetes Mellitus: Mechanistic and Clinical Aspects. *J Clin Endocrinol Metab* 104(11): 5431-5444, 2019. doi: 10.1210/jc.2019-00980.
34. Panunzi A, Madotto F, Sangalli E, et al. Results of a prospective observational study of autologous peripheral blood mononuclear cell therapy for no-option critical limb-threatening ischemia and severe diabetic foot ulcers. *Cardiovasc Diabetol* 21(1): 196, 2022. doi: 10.1186/s12933-022-01629-y.
35. Raghianti B, Piaggese A, Mannucci E, Monami M. Effects of local antibiotics in calcium-sulphate granules for the treatment of diabetic forefoot osteomyelitis: a propensity-matched observational study. *Journal of Wound Management* 24(2), 2023. epub-ahead of print.
36. Scatena A, Petruzzi P, Maioli F, et al. Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells for Limb Salvage in Diabetic Foot Patients with No-Option Critical Limb Ischemia. *J Clin Med* 10(10), 2021. doi: 10.3390/jcm10102213.
37. Raghianti 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* 12(12), 2023. doi: 10.3390/jcm12124148.
38. Spaltro G, Straino S, Gambini E, Bassetti B, Persico L, Zoli S, Zanobini M, Capogrossi MC, Spirito R, Quarti C, Pompilio G. Characterization of the Pall Celeris system as a point-of-care device for therapeutic angiogenesis. *Cytotherapy* 17(9): 1302-1313. 2015. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.04.006. Epub 2015 May 30.
39. European Commission Evaluation of the Union legislation on blood, tissues and cells- COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. SWD, 376, 2019.