

Alma Mater Studiorum – Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Metodologie di Ricerca nelle Malattie Vascolari

XXI Ciclo

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED22

**DIABETE ED ISCHEMIA CRITICA DEGLI ARTI INFERIORI.
STUDIO DEL DANNO DELLA PARETE ARTERIOSA E DEL
RUOLO DELL'ENDOTELIO CIRCOLANTE NELLA
RIPARAZIONE TESSUTALE E NELLA NEOANGIOGENESI.**

Tesi di Dottorato

Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Andrea Stella

Presentata da
Dott.ssa Catia Orrico

Relatore
Chiar.mo Prof. Gianandrea Pasquinelli

Esame finale anno 2009

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. VASI SANGUIGNI	2
1.1 Endotelio	6
1.1.1 Cellule endoteliali mature circolanti (CECs)	8
1.2 Neoangiogenesi	9
1.2.1 Fattori di crescita ed enzimi coinvolti nell'angiogenesi	11
<i>VEGF</i>	11
<i>MMP-9</i>	12
2. DIABETE	14
2.1 Fisiopatologia	14
2.2 Classificazione	15
2.3 Epidemiologia	18
2.4 Complicanze	18
<i>Complicanze acute</i>	18
<i>Complicanze croniche</i>	20
3. AOCF	26
3.1 Fattori di rischio	28
3.2 Stadiazione	29
3.3 Epidemiologia	30
3.4 Diagnosi e terapia	30
4. SCOPO DELLA RICERCA	32
5. MATERIALI E METODI	34
5.1 Pazienti	34

5.2	Valutazione Istopatologica della parete arteriosa	35
5.3	Neoangiogenesi della parete arteriosa: Analisi Immunoistochimica	36
5.4	Espressione parietale di VEGF ed MMP-9: Analisi Quantitativa	38
5.4.1	Estrazione dell'RNA	39
5.4.2	Quantificazione dell'RNA estratto	41
5.4.3	RETROTRASCRIZIONE (RT)	42
5.4.4	REAL TIME PCR Quantificazione relativa	44 52
5.5	Human VEGF-A ELISA	52
5.6	Individuazione delle cellule endoteliali mature circolanti mediante analisi citofluorimetrica	54
5.7	Analisi Statistica	55
6.	RISULTATI	56
6.1	Valutazione Istopatologica della parete arteriosa	56
6.2	Neoangiogenesi della parete arteriosa: Analisi Immunoistochimica	59
6.3	Espressione parietale di VEGF ed MMP-9: Analisi Quantitativa	61
6.4	Human VEGF-A ELISA	63
6.5	Individuazione delle cellule endoteliali mature circolanti mediante analisi citofluorimetrica	64
7.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	66
	BIBLIOGRAFIA	

INTRODUZIONE

E' stimato che oltre 200 milioni di persone nel mondo sono affette da diabete, con una più alta incidenza della malattia in India, in Cina e negli Stati Uniti d'America. Più del 90% di questi soggetti soffre di diabete mellito di tipo 2 una sindrome che, seppur spesso asintomatica, rappresenta la quarta causa principale di morte nella maggior parte dei paesi industrializzati. La mortalità è correlata soprattutto alle complicanze macrovascolari che si sviluppano lentamente negli anni portando all'insorgenza di patologie quali infarto del miocardio, ictus ed arteriopatia ostruttiva cronica periferica (AOCP). L'arteriopatia periferica nei pazienti diabetici è caratterizzata da notevole morbosità: una delle conseguenze più drammatiche, infatti, è l'ischemia critica degli arti inferiori, condizione clinica estremamente invalidante spesso accompagnata da gangrena e successiva amputazione dell'arto stesso. La riduzione del lume arterioso che è responsabile del ridotto afflusso di sangue e quindi dell'ischemia dei tessuti a valle dell'ostruzione, è la diretta conseguenza dell'intenso rimodellamento cui va incontro la parete vasale nei soggetti affetti da AOCP. L'esteso danno endoteliale che ne risulta, accomuna l'arteriopatia diabetica ad altri disordini vascolari quali le sindromi coronariche acute, le vasculiti, il LES, la sclerosi sistemica, tutte patologie nelle quali peraltro è stata recentemente descritta la presenza in circolo di cellule endoteliali mature (CEC), considerate come la stretta evidenza e conseguenza dello stesso danno vascolare. In condizioni di ingiurie vascolari quali possono essere proprio l'AOCP o la cardiopatia coronarica, tutte caratterizzate da ischemia tissutale, un ruolo chiave è giocato dalla neoangiogenesi.

1. VASI SANGUIGNI

La morbilità e la mortalità dovute alle patologie vascolari, soprattutto arteriose, sono superiori a quelle di qualsiasi altra malattia umana, ciò perché il sistema vascolare è costituito da tessuti dinamici ed altamente specializzati che regolano il funzionamento di tutto l'organismo.

L'architettura generale e la composizione cellulare dei vasi ematici sono le stesse in tutto il sistema cardiovascolare. Tuttavia, alcune caratteristiche del sistema vascolare variano a seconda delle differenti localizzazioni riflettendo esigenze funzionali diverse. Così

- le *arterie* che trasportano il sangue dal cuore verso i distretti periferici dell'organismo, per poter far fronte alle sollecitazioni dovute al flusso pulsatile ed agli elevati livelli pressori, sono dotate di pareti generalmente più spesse ed elastiche rispetto a quelle dei vasi venosi
- le *vene* deputate a raccogliere il sangue refluo dai tessuti ed a riportarlo al cuore, sono sottoposte ad una pressione sanguigna più bassa ragion per cui esse presentano una parete collassata, più sottile e con meno elastina, rispetto ai vasi arteriosi
- man mano che i vasi diventano più piccoli (*arteriole, venule, capillari*) lo spessore parietale diminuisce mentre il rapporto tra spessore parietale e diametro luminale diviene maggiore.

Costituenti fondamentali delle pareti dei vasi sanguigni sono le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e la matrice extracellulare (ECM), comprendente l'elastina, il collagene ed i glicosaminoglicani. Questi elementi risultano variamente organizzati tra loro a formare tre strati connettivali concentrici o *tonache*, particolarmente distinguibili

nei vasi più grandi soprattutto quelli arteriosi: procedendo dal lume verso l'esterno del vaso, le tonache vengono denominate, *intima*, *media* ed *avventizia* (Fig.1).

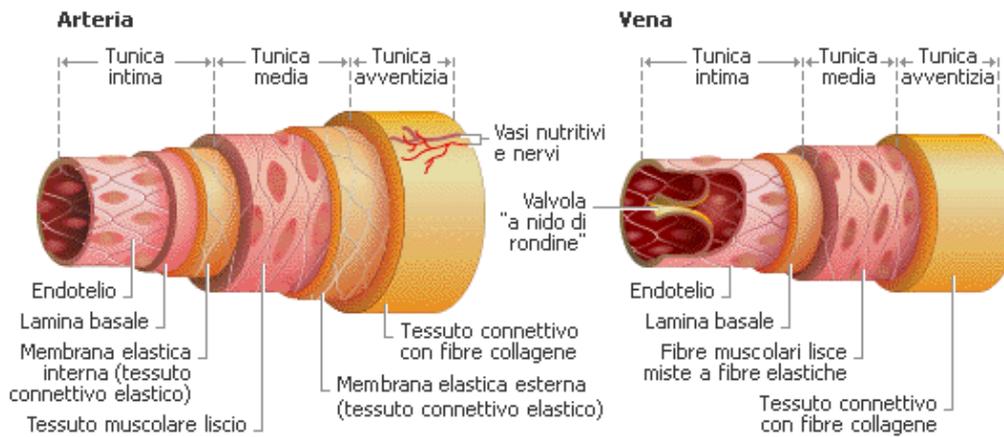


Fig.1: Parete dei vasi sanguigni arteriosi e venosi

Nelle arterie normali, la tonaca intima consiste di un singolo strato di cellule endoteliali a diretto contatto con il torrente circolatorio e a ridosso delle quali si trova uno strato subendoteliale, detto lamina basale, di tessuto connettivo lasso e scarse cellule muscolari lisce. Esternamente al subendotelio si trova la lamina elastica interna, una densa membrana composta da fibre elastiche che si dispongono a formare delle fenestrature per il passaggio delle sostanze nutritive dal lume vasale agli strati più profondi.

La tonaca media è lo strato più spesso delle arterie ed è responsabile del mantenimento della pressione sanguigna e della continuità del flusso. E' composta da cellule muscolari lisce disposte ad elica, fibre elastiche, collagene e proteoglicani. Le cellule degli strati della media prossimi al lume vasale ricevono ossigeno e nutrienti attraverso un processo di diffusione diretta dal lume, fenomeno facilitato dai fori presenti nella lamina elastica interna. La diffusione dal lume è tuttavia

inadeguata per le porzioni più esterne della tonaca media nei vasi di medio e grosso calibro, per cui queste zone sono irrorate da piccole arteriole, dette “vasa vasorum”, che originano dall'esterno del vaso e si spingono nella metà-due terzi della media. Una lamina elastica esterna definisce il limite esterno della media, nella maggior parte delle arterie.

La tonaca avventizia è lo strato più esterno del vaso, più sottile della tonaca media e più rigida, ed è composta principalmente da fibre collagene non compatte. Questo strato protegge il vaso e permette l'ancoraggio ad altre strutture generando una sorta di continuità tra vaso e altri tessuti del corpo. La tonaca avventizia è costituita inoltre da fibre nervose, vasi linfatici e, nel caso dei grossi vasi, dal sistema dei “vasa vasorum” deputati al trasporto di O₂ e sostanze nutrienti ai tessuti esterni della parete del vaso (*Schoen F.J, 2006*).

La quantità relativa e la disposizione dei costituenti fondamentali, all'interno della parete dei vasi, variano lungo il sistema arterioso in funzione degli adattamenti locali alle esigenze meccaniche o metaboliche: i cambiamenti strutturali, riscontrabili di distretto in distretto, riguardano soprattutto la tonaca media e la matrice extracellulare. Sulla base della componente tessutale predominante nella tonaca media, ad esempio, è possibile distinguere le arterie in elastiche e muscolari.

Le arterie elastiche sono i vasi di grosso calibro (3cm - 7mm) che conducono il sangue dai ventricoli alle arterie muscolari. Ne fanno parte l'aorta, il tronco polmonare e le loro collaterali primarie. Presentano parete relativamente sottile e lume ampio. La tonaca media è particolarmente ricca in fibre elastiche ad andamento circolare, che

sono disposte in strati piuttosto compatti separati tra loro da strati di cellule muscolari lisce alternati a strati di fibre collagene.

Le arterie muscolari ricevono il sangue dalle arterie elastiche e lo distribuiscono agli organi periferici. Sono arterie di medio e piccolo calibro (7mm e 1 mm), quali le arterie coronarie, le arterie femorali, le arterie renali, con uno spessore di parete che è circa un quarto del loro diametro. La tonaca media è spessa e costituita in prevalenza da cellule muscolari lisce ad andamento circolare o spirale. Le cellule sono circondate da fibre collagene e lamelle elastiche isolate e spiraliformi, che aumentano con lo spessore del vaso (*Paquinelli G., 1996*).

Le ramificazioni terminali del letto arterioso sono rappresentate dalle arteriole, piccoli vasi di 20-100 μm di diametro, che rappresentano il punto più importante di regolazione della resistenza al flusso ematico. Sono caratterizzate da una tonaca media quasi interamente costituita da cellule muscolari lisce, disposte in un massimo di sei strati concentrici, e dall'assenza della lamina elastica esterna. La tonaca intima è molto sottile e comprende il rivestimento endoteliale, scarso connettivo ed una sottile, ma distinta, lamina elastica interna. La tonaca avventizia può essere spessa quasi come la media (*Young B. et al., 2001*).

Esse alimentano i capillari, vasi dal lume molto ristretto (7-8 μm), che per le loro caratteristiche istologiche (Fig.2) sono il sito ideale di scambio rapido di sostanze diffusibili tra sangue e tessuti.



Fig.2: Parete di un capillare

Essi sono infatti costituiti da un singolo strato di cellule endoteliali su cui poggia una lamina basale, mentre sono sprovvisti di una tonaca media e dell'avventizia. Ad essi possono trovarsi associati i periciti, cellule appiattite che avvolgono le cellule endoteliali e sembrano avere funzione contrattile.

Dai letti capillari il sangue fluisce inizialmente nelle venule post-capillari e quindi, sequenzialmente, nelle venule collettrici e nelle vene di piccolo, medio e grosso calibro (*Schoen F.J, 2006*).

1.1 ENDOTELIO

Le cellule endoteliali, elementi essenziali della parete dei vasi sanguigni, sono cellule poligonali estremamente appiattite ed allungate. Sono caratterizzate dalla presenza nel loro citoplasma di numerose vescicole di pinocitosi e di organelli specializzati, i corpi di Weibel-Palade, rivestiti da membrana e contenenti il fattore von Willebrand (fattore VIII della coagulazione) (*Young B. et al., 2001*).

Le cellule sono strettamente connesse le une alle altre da complessi giunzionali a formare uno strato singolo e continuo, chiamato *endotelio*; esso riveste l'intero sistema vascolare e la sua integrità strutturale e funzionale è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi della parete vasale e della normale circolazione (*Schoen F.J, 2006*).

L'endotelio vascolare è un tessuto versatile e multifunzionale, considerato un vero e proprio "organo endocrino" con molte proprietà sintetiche e metaboliche e partecipa attivamente alle interazioni tra sangue e tessuti. In condizioni di integrità strutturale esso 1) rappresenta una barriera altamente selettiva rispetto al passaggio delle sostanze circolanti contenute nel torrente ematico, sia per la presenza

di giunzioni intercellulari normalmente impermeabili alle grandi molecole quali le proteine plasmatiche, sia perché le cellule endoteliali sintetizzano collagene e proteoglicani per il mantenimento della membrana basale; 2) mantiene l'equilibrio emostatico intravascolare grazie alle sue proprietà anticoagulanti e fibrinolitiche dovute all'elaborazione di molecole quali prostaciclina e trombomodulina; 3) contribuisce in modo determinante alla regolazione del tono vasale in quanto produce sostanze ad azione vasodilatante (come l'ossido nitrico) e sostanze ad azione vasocostrittrice (angiotensina II, endotelina), che in condizioni fisiologiche sono in equilibrio fra loro. L'ossido nitrico esercita anche un ruolo protettivo nei confronti della parete vasale, inibendo la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei monociti circolanti, la flogosi e l'ossidazione. Per contro, le sostanze ad azione vasocostrittrice, oltre a determinare lo spasmo vasale, sono in grado di promuovere infiammazione e danno vascolare; 4) produce molecole che mediano la reazione infiammatoria acuta, tra cui le IL-1, IL-6 e IL-8 e molecole di adesione cellulare quali VCAM-1, ICAM, E-selectina, P-selectina; 5) regola la crescita cellulare mediante la produzione di fattori stimolanti (PDGF, CSF, FGF) e di fattori inibenti (eparina, TGF- β). (Pozzati A. et al., 2004; Schoen F.J., 2006; Young B. et al., 2001)

In tutte le condizioni nelle quali le sostanze ad azione vasocostrittrice prevalgono con i propri effetti lesivi sulle sostanze ad azione vasodilatante, si verifica la “disfunzione endoteliale” definita come un fenotipo alterato delle cellule dell'endotelio vascolare, che determina compromissione della vasoreattività o induce la formazione di una

superficie trombogenica o anormalmente adesiva nei confronti delle cellule infiammatorie.

Tutto ciò è responsabile, almeno in parte, dell'innescò dei fenomeni di trombosi ed aterosclerosi e delle lesioni vascolari caratteristiche dell'ipertensione e di altre patologie quali ad esempio il diabete.

1.1.1 CELLULE ENDOTELIALI MATURE CIRCOLANTI (CECs)

In diversi disordini vascolari quali le sindromi coronariche acute, le vasculiti, il LES, la sclerosi sistemica, infezioni da Citomegalovirus, è stata descritta la presenza in circolo di cellule endoteliali (Circulating Endothelial Cells, CECs) le quali costituiscono verosimilmente un'evidenza diretta e conseguenza della lesione endoteliale che accomuna tutte queste patologie (*Del Papa N. et al., 2005*). Esse originano probabilmente dallo slaminamento della parete vasale, conseguente al profondo insulto vascolare che danneggia irreversibilmente l'endotelio; il loro fenotipo è pertanto definito dall'espressione di marcatori di endotelio maturo quali von Willebrand Factor, VE-cadherin, CD146, unitamente all'assenza di espressione di marcatori leucocitari come il CD45 e di endotelio immaturo quale il CD133 (*Blann A.D. et al., 2005*).

Lo stress dovuto a danno dell'endotelio vascolare, che è spesso seguito da morte cellulare programmata (apoptosi) delle cellule endoteliali, conduce alla perdita delle proprietà antitrombotiche della parete vasale, aumentando rapidamente il numero delle cellule rilasciate in circolo ed elevando pertanto il turnover dell'endotelio. Nei soggetti sani è presente un basso livello basale di turnover dell'endotelio e quindi una bassa quantità di cellule endoteliali circolanti (CECs) nel sangue periferico (*Hunting C.B. et al., 2005*).

1.2 NEOANGIOGENESI

I sistemi ematopoietico e vascolare originano nel periodo embrionale da un precursore comune, detto emangioblasto, che può generare cellule staminali emopoietiche e cellule, gli angioblasti, che daranno vita al sistema vascolare (*Kumar V. et al, 2006*).

Oltre che durante lo sviluppo embrionale, la formazione di nuovi vasi sanguigni avviene durante fasi normali e patologiche della crescita tissutale nella vita adulta. I due distinti processi attraverso cui può verificarsi la genesi di nuovi vasi sono la vasculogenesi e l'angiogenesi.

La vasculogenesi consiste nel differenziamento di cellule dei vasi a partire da precursori indifferenziati, gli *angioblasti*, e conduce alla formazione del network vascolare iniziale durante lo sviluppo embrionale precoce. Esso può verificarsi, però, anche nell'organismo adulto ad es. in condizioni patologiche che implicano ischemia, nel qual caso consiste nel reclutamento (*homing*) di cellule mononucleate, le c.d. cellule progenitrici delle cellule endoteliali (EPCs), dal midollo osseo in cui hanno origine nei siti di rivascolarizzazione dei territori ischemici, dove partecipano attivamente ai processi di angiogenesi e poi a quelli di arteriogenesi.

L'angiogenesi è la formazione di nuovi vasi sanguigni da un letto vascolare pre-esistente, che si verifica nell'adulto come processo fisiologico ad esempio in corso di riparazione delle ferite o durante i cicli ovarico ed uterino nel sistema riproduttivo della donna. Può verificarsi, però, anche un'angiogenesi patologica: in questo caso, una vascolarizzazione insufficiente dei tessuti irrorati determina ischemia con conseguente cronicizzazione di ferite ed insorgenza di malattie coronariche, vasculopatie periferiche, ictus; un'eccessiva formazione

di vasi contribuisce in maniera determinante alla crescita tumorale ed alla diffusione metastatica nonché all'insorgenza di patologie quali artrite reumatoide ed altre malattie infiammatorie, retinopatia diabetica, psoriasi (*Goodwin A.M., 2007*).

Durante l'angiogenesi le cellule endoteliali della parete dei vasi esistenti, in risposta a vari stimoli fisiopatologici, vengono attivate ed iniziano a rilasciare diversi fattori di crescita tra i quali assumono un ruolo di fondamentale importanza in questo processo, le angiopoietine ed il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Le angiopoietine 1 e 2 (Ang1 e Ang2) partecipano, con il PDGF e ed il TGF- β , alla "stabilizzazione" dei vasi di nuova formazione.

Il VEGF esercita la sua funzione proangiogenetica legandosi ad uno dei suoi recettori, specificamente al VEGFR-2 o KDR strettamente circoscritto alle cellule endoteliali ed ai loro precursori. Questo legame scatena una cascata di eventi che conduce alla formazione di nuovi vasi sanguigni:

- aumento della permeabilità vasale e perdita delle connessioni tra le diverse cellule endoteliali, il che produce "destabilizzazione" dei vasi preesistenti
- degradazione, ad opera di proteasi, della membrana basale ricca in laminina (lamina basale) che circonda le cellule endoteliali
- stimolazione del rilascio di metallo-proteinasi (MMPs), enzimi proteolitici che digerendo le componenti della matrice extracellulare, quali collagene, fibrina, laminina e fibronectina, ne alterano la densità; ciò favorisce
- la migrazione delle cellule endoteliali nel tessuto circostante in risposta a chemochine angiogeniche; fattori di crescita possono

contribuire alla mobilità delle cellule endoteliali inducendo o un loro movimento casuale (chemochinesi) o la migrazione diretta verso un fattore di stimolazione angiogenica (chemiotassi)

- proliferazione delle cellule endoteliali
- differenziazione delle cellule endoteliali caratterizzata da arresto della proliferazione, riorganizzazione delle interazioni cellulari e formazione del lume e quindi dei vasi primitivi, nonché dal reclutamento di cellule periendoteliali di supporto quali i periciti per i piccoli capillari, e cellule muscolari lisce per i vasi più grandi.

(Kumar V. et al, 2006; Goodwin A.M., 2007; Liekens S. et al., 2001)

1.2.1 FATTORI DI CRESCITA ED ENZIMI COINVOLTI NELL'ANGIOGENESI

VEGF

Il VEGF appartiene alla famiglia dei fattori di crescita dell'endotelio vascolare, che consiste di 6 membri: VEGF-A (o VEGF), PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. La perdita di un solo allele nel gene per il VEGF porta a mortalità embrionale, dimostrando che questo fattore gioca un ruolo unico nello sviluppo del sistema vascolare.

E' espresso in differenti tessuti quali cervello, rene, fegato e milza e da diversi tipi cellulari. "In vitro" il VEGF stimola la degradazione della matrice extracellulare, la proliferazione, la migrazione delle cellule endoteliali e la formazione di strutture tubulari ed induce in queste cellule l'espressione di MMP-1. "In vivo" è stato mostrato che esso regola la permeabilità vascolare, importante per l'innescamento dell'angiogenesi.

La trascrizione dell'mRNA per il VEGF è indotta da differenti fattori di crescita e citochine, inclusi PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β ed IL-1 β ; i livelli di VEGF sono inoltre regolati dalla tensione tissutale di ossigeno: l'esposizione all'ipossia induce infatti l'espressione di VEGF rapidamente ed irreversibilmente, mediante aumento della trascrizione e della stabilizzazione dell'mRNA.

Sull'endotelio vascolare sono stati identificati 2 recettori ad alta affinità per il VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1 o KDR), la cui espressione genica è regolata come per il VEGF dall'ipossia. Il VEGFR-3(Flt-4) non è un recettore per il VEGF ma lega VEGF-C e VEGF-D.

Il VEGF gioca un ruolo cruciale nell'angiogenesi dell'adulto: è stato individuato nell'ovaio durante la formazione del corpo luteo e nell'utero durante la crescita dei vasi endometriali ed al sito d'impianto dell'embrione; alti livelli di VEGF sono stati ritrovati durante la fase proliferativa della riparazione delle ferite; il VEGF è rintracciabile in aree dove le cellule endoteliali sono quiescenti, come il cuore, il polmone ed il cervello, indicando il VEGF come fattore di sopravvivenza. Infine, si pensa che il VEGF eserciti un ruolo in diversi tumori umani, nella retinopatia diabetica, nell'artrite reumatoide, nell'aterosclerosi. (*Liekens S. et al., 2001; Ferrara N. et al., 1997*)

MMP-9

Le metalloproteinasi (MMPs) sono enzimi proteolitici appartenenti ad una famiglia di almeno 16 membri, che vengono espressi come enzimi latenti. Sono tutti costituiti da: un pre-dominio che è un peptide segnale per la secrezione, un pro-dominio che viene rimosso quando

l'enzima è attivato proteoliticamente, un dominio catalitico contenente uno ione zinco ed un dominio "hemopexin" che contiene un recettore per TIMPs; una specifica classe di MMPs, le gelatinasi, contengono anche un dominio "fibronectin" inserito nel dominio catalitico. Le MMPs si trovano generalmente secrete nell'ambiente extracellulare, in una forma inattiva solubile; fanno eccezione gli enzimi del gruppo delle MT-MMPs (Membrane-tethered MMPs), che sono invece localizzati sulla superficie delle cellule, mediante un dominio trans-membrana. Dopo la loro attivazione ad opera di proteasi, digeriscono i componenti della matrice extracellulare quali collagene, fibrina, laminina e fibronectina, fase questa essenziale per lo svolgimento del processo di neoangiogenesi. Una metalloproteinasi specifica per il collagene di tipo IV è la MMP-9, un enzima di 92 kDa appartenente alla classe delle gelatinasi (è anche detta gelatinasi B). Le MMPs non risultano espresse in situazioni normali o lo sono a concentrazioni molto basse; le concentrazioni e l'attività delle MMPs aumentano drammaticamente in situazioni patologiche, come nell'infiammazione, nella riparazione tissutale, nella riepitelizzazione delle ferite cutanee ed eccessivi livelli di attività delle MMPs sono stati rilevati in tumori del colon-retto, del polmone, della mammella, della prostata e nel glioblastoma maligno. (*Liekens S. et al., 2001; Coussens LM et al., 2002*).

2. DIABETE

2.1. FISIOPATOLOGIA

Il diabete mellito è un disordine metabolico ad eziologia multipla, caratterizzato da iperglicemia cronica e da un alterato metabolismo di carboidrati, grassi e proteine come conseguenza della mancata secrezione d'insulina o della ridotta azione dell'ormone a livello degli organi bersaglio quali il fegato, i muscoli ed il tessuto adiposo. In condizioni fisiologiche l'insulina, prodotta dalle cellule β del pancreas in risposta ad un aumento post-prandiale di glucosio ematico, svolge la sua azione ipoglicemizzante attivando a livello epatico e muscolare i processi di glicolisi o di glicogenosintesi, per la produzione immediata di energia o per l'immagazzinamento dello zucchero sotto forma di glicogeno. Contemporaneamente a ciò essa esplica la sua azione lipogenetica a livello del tessuto adiposo attivando la conversione in lipidi sia del glucosio in eccesso che dei grassi eventualmente assunti con il pasto. L'insulina svolge poi un'azione di stimolo anche sull'utilizzazione delle proteine introdotte nell'organismo con la dieta: gli amminoacidi derivanti dalla digestione degli alimenti proteici, vengono assorbiti nel circolo sanguigno e, sotto l'influenza dell'ormone pancreatico, captati da parte del fegato e del muscolo scheletrico dove servono per la sintesi di nuove proteine. In caso di diabete mellito, la mancata attività o la riduzione dell'efficacia biologica dell'insulina determinano un blocco di quelle vie metaboliche che l'ormone regola, con conseguente danneggiamento delle cellule dell'organismo. Così, l'instaurarsi di una condizione cronica di iperglicemia fa sì che il glucosio, non venendo utilizzato nelle sedi dove sarebbe necessario ma permanendo a lungo in circolo, da "fornitore di energia" diventi un fattore tossico

per tutte le cellule. Venendo meno l'effetto lipogenetico dell'insulina, si verifica sia una maggiore permanenza di acidi grassi nel sangue dopo i pasti, sia una loro anomala liberazione dal tessuto adiposo, andando poi a depositarsi in organi quali il fegato, dove provocano la steatosi e nelle arterie, dove generano l'arteriosclerosi. La ridotta sintesi proteica a livello epatico e muscolare, conseguente al deficit insulinico, giustifica la perdita di peso corporeo ed il senso di astenia spesso denunciati dal paziente quale sintomatologia di esordio della patologia diabetica, soprattutto nella tipologia insulino-dipendente.

2.2 CLASSIFICAZIONE

Il diabete mellito comprende varie forme cliniche:

- *Diabete di tipo 1* (in passato definito *diabete giovanile* o *diabete mellito insulino-dipendente*, *IDDM*) → anche se esistono forme “idiopatiche”, è una malattia tipicamente autoimmune che interessa essenzialmente bambini, adolescenti e giovani adulti. La patologia è caratterizzata dalla produzione di una risposta immunitaria sia di tipo cellulare che di tipo anticorpale contro le cellule β pancreatiche, come evidenziato dalla presenza di infiltrati linfocitari nelle isole di Langerhans o dalla produzione di anticorpi specifici contro vari elementi in causa nella malattia diabetica, quali le cellule insulari pancreatiche (anti-ICA) o l'insulina (anti-IAA). Tutto ciò determina la progressiva distruzione delle cellule β pancreatiche e la profonda carenza o assenza di produzione insulinica, ragion per cui i soggetti affetti da questa tipologia di diabete necessitano della somministrazione “ad vitam” dell'ormone pancreatico. Sembra che l'attivazione impropria della risposta immunitaria sia scatenata da un agente infettivo o tossico in soggetti

geneticamente predisposti. Gli agenti invasivi più incriminati sono i virus, come quelli della parotite, il citomegalovirus, i virus Coxackie B, i virus dell'encefalomiocardite. E' possibile che una malattia infettiva virale, anche a livello subclinico (cioè senza manifestazioni evidenti) determini una "sensibilizzazione" delle cellule β del pancreas, che vengono poi aggredite dal sistema immunitario.

- *LADA, Latent Autoimmune Diabetes of the Adult* (o *NIRAD, Non-Insulin Requiring Autoimmune Diabetes*) → come indica la stessa denominazione, è una patologia autoimmune che insorge nell'adulto inizialmente in maniera insulino-indipendente, analogamente al diabete di tipo 2. Nella maggior parte dei pazienti, però, la somministrazione dell'ormone diviene in seguito indispensabile. I soggetti interessati sono per lo più magri o normopeso, di età superiore ai 40 anni ed esprimenti familiarità per il diabete.
- *Diabete di tipo 2* (precedentemente conosciuto come *diabete mellito non insulino-dipendente, NIDDM, o diabete dell'adulto*) → è una patologia spesso considerata una conseguenza del benessere, in quanto concorrono in maniera decisiva alla sua comparsa l'alimentazione eccessiva e la sedentarietà. Pertanto, pur avendo rispetto al diabete di tipo 1, un esordio più tardivo in quanto interessa tipicamente soggetti di oltre 40 anni di età, insorge in pazienti sempre più giovani (*MODY, Maturity Onset Diabetes of the Young*). E' determinato dal verificarsi di due eventi patogenetici:
 - resistenza periferica all'azione dell'insulina per down regulation dei recettori, la qual cosa porta ad un'inadeguata

utilizzo del glucosio da parte delle cellule e all'instaurarsi di una condizione di iperglicemia e di iperinsulinemia;

- difetto di secrezione dell'insulina per desensibilizzazione delle cellule β pancreatiche, il che determina uno stato di iperglicemia.
- *Diabete secondario* → è una forma di patologia diabetica che si manifesta secondariamente ad alterazioni del pancreas sia esocrino che endocrino. Le cause possono essere molteplici:
 - pancreasectomie chirurgiche
 - malattie quali pancreatiti, tumori pancreatici, fibrosi cistica, emocromatosi
 - assunzione di farmaci quali steroidi, ormoni tiroidei, diazossido
 - endocrinopatie quali acromegalia, sindrome di Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, ipertiroidismo, somatostatina, tutte patologie che aumentano l'insulino-resistenza periferica
 - infezioni virali quali rosolia congenita o da citomegalovirus
 - associazione ad altre sindromi genetiche quali sindrome di Down, sindrome di Klinefelter, sindrome di Turner, porfiria, atassia di Friedreich.
- *Diabete gestazionale* → si definisce tale ogni situazione in cui si misura un elevato livello di glucosio circolante per la prima volta in gravidanza. E' dovuto ad insulino-resistenza conseguente al quadro ormonale che s'instaura durante la gestazione e l'iperglicemia che ne consegue può, dopo il parto, tornare ad essere latente oppure concludersi in diabete mellito

di tipo 2 (>30% dei casi). Compare tipicamente in soggetti a rischio, colpendo il 4-5% delle donne in gravidanza.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

Il diabete mellito è uno dei disordini endocrini più comuni interessando quasi il 6% della popolazione mondiale. La sua prevalenza è in costante aumento, se si considera che nel 1997 erano 124 milioni nel mondo le persone colpite, mentre stime per il futuro parlano di oltre 300 milioni di persone che saranno affette dalla patologia nel 2025 (*Adeghate E. et al., 2006*). Tra le varie tipologie di diabete riconosciute, la forma più frequente è quella di tipo 2 che interessa il 90-95% di tutti i casi di malattia (*Dong Cheng, 2005; ADA, 2005*), una percentuale che è andata progredendo nel corso degli anni in seguito all'allungamento della vita e a causa delle cattive abitudini alimentari e di uno stile di vita sedentario (*Vinik A. et al., 2002*). Il 5-10% dei diabetici soffre di diabete di tipo 1, meno dell'1% è interessato da diabete secondario (*National Diabetes Fact sheet, 2005*).

2.4. COMPLICANZE

I soggetti diabetici possono andare incontro a problemi clinici (*complicanze*) sia *di tipo acuto* cioè a rapida insorgenza, sia di *tipo cronico* cioè dopo molti anni dall'inizio della malattia.

COMPLICANZE ACUTE

Utilizzando come riferimento il parametro della glicemia, è possibile distinguere

- *Complicanze iperglicemiche*, dovute ad elevato aumento della glicemia (> 500-600 mg/dl) per carenza insulinica

→ *chetoacidosi diabetica*, colpisce i diabetici di tipo 1 e si manifesta ad es. in pazienti non ancora diagnosticati, o per interruzione volontaria della terapia, o in seguito a malattie intercorrenti che aumentino il fabbisogno insulinico soprattutto episodi infettivi acuti (cistiti, polmoniti). In condizioni di deficit insulinico la mancata utilizzazione, da parte delle cellule, del glucosio circolante attiva il processo di ossidazione degli acidi grassi; questi però proprio per la scarsa disponibilità intracellulare dello zucchero, non vengono metabolizzati completamente. I prodotti di questo errato metabolismo vengono a "condensarsi" formando prodotti tossici per l'organismo, i cosiddetti corpi chetonici (acido acetacetico, acido beta-idrossibutirrico, acetone), che provocano il quadro di acidosi (diminuzione del pH).

→ *coma iperosmolare*, complicanza più rara che insorge prevalentemente in diabetici di tipo 2 in età avanzata. E' di solito scatenata da una malattia infettiva intercorrente, dalla sospensione della terapia, dall'uso incontrollato di farmaci che aggravano l'iperglicemia (diuretici o cortisonici).

- *Complicanze ipoglicemiche*, conseguenti a gravi riduzioni della glicemia (< 60 mg/dl)

→ *ipoglicemia acuta*, complicanza del diabete trattato (con insulina o farmaci antidiabetici orali) che insorge a seguito di un'alterazione del bilancio tra glucosio circolante ed insulina disponibile. L'organismo ha infatti bisogno di mantenere un livello di glucosio circolante adeguato, specialmente per il fatto che alcuni organi, come il cervello, utilizzano questo zucchero come carburante "esclusivo". Situazioni quali lo stress,

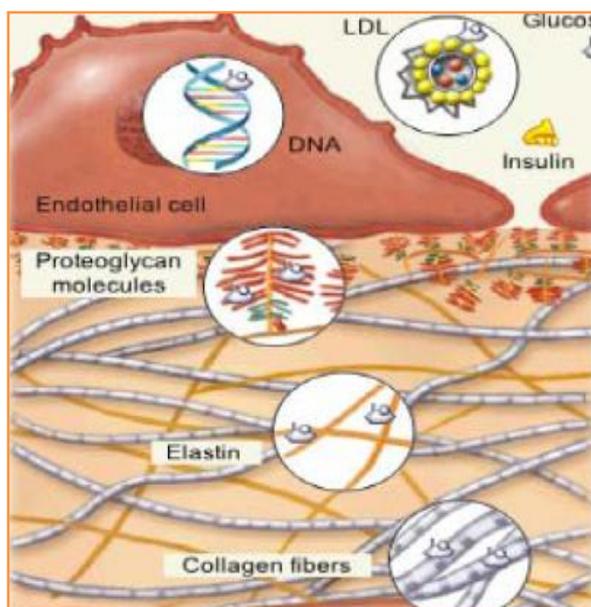
un'attività fisica inconsueta, la mancanza di alimentazione (ritardo dell'ora del pasto) possono indurre un repentino e pesante abbassamento dei livelli di glucosio ematico. Possono altresì contribuire all'instaurarsi di una condizione di ipoglicemia, l'assunzione eccessiva (per errore di somministrazione) di insulina o di ipoglicemizzanti orali, o la presenza di malattie epatiche o renali, che alterano il processo di "smaltimento" del farmaco orale e ne prolungano l'azione ipoglicemizzante.

COMPLICANZE CRONICHE

I problemi a lungo termine della patologia diabetica si sviluppano, non primariamente a causa del deficit di insulina, ma piuttosto per il protrarsi delle condizioni di *iperglicemia* e di *iperinsulinemia*. Questi stati dismetabolici provocano alterazioni delle strutture tessutali, principalmente a carico del sistema vascolare (angiopatia) e del sistema nervoso (neuropatia). Ne conseguono danni d'organo specifici che si manifestano come cardiopatia, insufficienza circolatoria agli arti inferiori, alterazioni della funzionalità renale, complicanze oculari, disturbi ai nervi periferici ed impotenza sessuale. Poiché non tutti i diabetici sviluppano complicanze croniche con la stessa gravità, è stato ipotizzato e poi dimostrato, da numerosi studi, il coinvolgimento di altre cause predisponenti quali una suscettibilità genetica su cui interagiscono fattori ambientali. A proposito di questi ultimi, vi è da ricordare la comprovata importanza del fumo di sigaretta, dell'ipertensione arteriosa e di un'alimentazione eccessiva e ricca di grassi, che sono già di per sé stessi, a prescindere dalla presenza o meno della malattia diabetica, fattori di rischio cardiovascolare. In un paziente diabetico la loro importanza è ancora superiore, in quanto gli

effetti negativi concorrono assieme allo sviluppo delle complicanze e tutto ciò contribuisce significativamente all'elevata morbilità e mortalità cardiovascolare del paziente stesso (Pozzati A. et al., 2004; Adeghate E. et al., 2006). Le lesioni angiopatiche coinvolgono diversi distretti del letto vascolare: si parla di *complicanze microvascolari* o di *microangiopatia diabetica*, quando i vasi compromessi sono quelli di piccolo calibro (arteriole e capillari); si parla di *complicanze macrovascolari* o di *macroangiopatia diabetica*, quando i vasi compromessi sono l'aorta e le arterie di grosso e medio calibro.

La microangiopatia diabetica ha come alterazione anatomopatologica essenziale l'ispessimento della membrana basale dei capillari che irrorano la retina ed il glomerulo renale e dei piccoli vasi che portano il sangue ai nervi: a livello clinico si manifesta pertanto con retinopatia, nefropatia e neuropatia. E' una conseguenza dello stato di *iperghlicemia cronica* che s'instaura come condizione patogenetica nel diabete soprattutto di tipo 2 e che è responsabile di tutta una serie di modificazioni strutturali e funzionali delle componenti della parete dei



vasi.

Il glucosio che si accumula in circolo a concentrazioni elevate, va ad attaccarsi (Fig.3) ai gruppi amminici del DNA cellulare nonché dei proteoglicani e delle proteine della matrice extracellulare, collagene ed elastina, e delle LDL plasmatiche: in queste

Fig.3: Glucosio nella matrice extracellulare

reazioni di *glicosilazione* ha luogo la formazione di prodotti tossici (*Advanced Glycosylation End Products, AGE*) che sono in grado di promuovere alterazioni funzionali dell'endotelio e morfologiche della parete in toto. Come risultato finale si ha la perdita della selettività endoteliale nella permeabilità vascolare con successiva migrazione incontrollata di cellule nel subendotelio, la netta riduzione della produzione di sostanze vasodilatanti (ossido nitrico) e la compromissione dell'equilibrio tra fibrinolisi endogena e fattori procoagulanti a favore di uno spiccato stato trombofilico (*Pozzati A. et al., 2004*).

Gli AGE inoltre favoriscono l'accumulo nella matrice delle LDL alterate (Fig.4), il che contribuisce a rendere più stabile il collagene, e stimolano il rilascio da parte delle cellule endoteliali, di citochine e fattori di crescita (ad es. il TGF β) i quali determinano accumulo

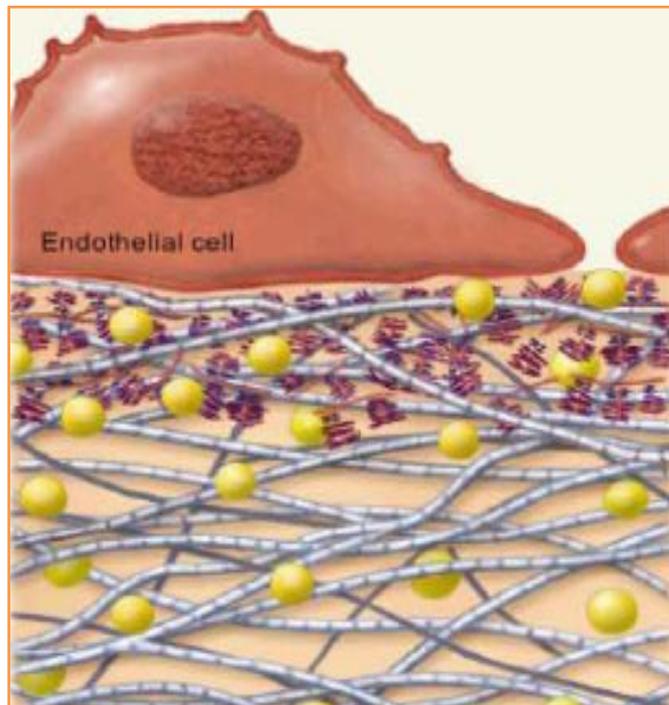


Fig.4: Accumulo di LDL alterate nella ECM

di matrice extracellulare: tutto ciò porta ad un ispessimento della membrana basale.

La macroangiopatia diabetica presenta come lesione caratteristica la formazione di una *placca aterosclerotica* (Fig.5) nella parete preferenzialmente delle arterie iliache e femorali lungo gli arti



Fig.5: Placca aterosclerotica in parete arteriosa

inferiori, delle arterie coronariche che irrorano il cuore e dei vasi carotidei che trasportano il sangue al cervello. In conseguenza all'alterazione del flusso sanguigno nei distretti colpiti, come manifestazioni

cliniche si sviluppano arteriopatie periferiche, cardiopatia ischemica e malattie cerebrovascolari, con un rischio 2-4 volte maggiore nei pazienti con diabete di tipo 2 rispetto ai non diabetici ed una più alta incidenza (circa l'80%) di mortalità per cause cardiovascolari (*American Diabetes Association, ADA, 2004*). Ciò perché l'aterosclerosi vascolare insorge più precocemente e diffusamente nella popolazione diabetica rispetto a quella generale, per il contributo di molteplici fattori e meccanismi fisiopatologici strettamente legati alle alterazioni metaboliche determinate dalla malattia. L'elemento scatenante l'insorgenza della lesione ateromasica è rappresentato dalla "disfunzione endoteliale" indotta dall'iperglicemia cronica e responsabile della rottura di quell'equilibrio vascolare che in condizioni fisiologiche l'endotelio assicura. La parete vasale diviene pertanto meno selettiva rispetto al passaggio delle sostanze circolanti presenti nel torrente ematico, quali i prodotti tossici della glicosilazione e le LDL modificate, che vanno ad accumularsi in seno alla parete stessa; diviene poi intrinsecamente più permeabile alla migrazione nel subendotelio sia di cellule muscolari lisce della tonaca media sia di cellule endoteliali danneggiate sia di cellule

infiammatorie, le quali insieme contribuiscono costantemente alla crescita della placca (Pozzati A. et al., 2004).

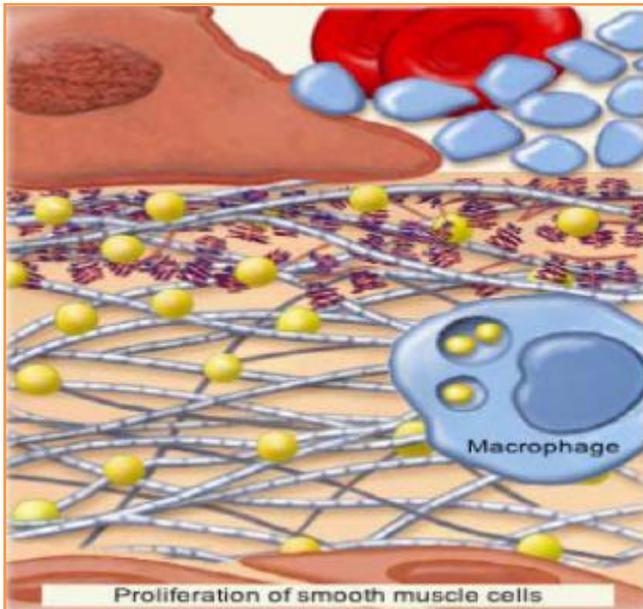


Fig.6 Sviluppo della placca aterosclerotica: fagocitosi dei lipidi ossidati, ipertrofia delle SMC, attivazione piastrinica

I macrofagi che entrano nella parete fagocitano i lipidi ossidati e rilasciano fattori di crescita (IL-1, IGF-1, TNF- α) che causano ipertrofia delle cellule muscolari lisce, SMC (Fig.6-7).

Le cellule endoteliali, dal canto loro, in quanto funzionalmente alterate determinano un aumento

della produzione di fattori procoagulanti ed una spiccata riduzione della fibrinolisi endogena che, associati ad una maggiore attivazione piastrinica, favoriscono l'instaurarsi di uno stato protrombotico (Fig.6); esse, inoltre, mostrando una scarsa

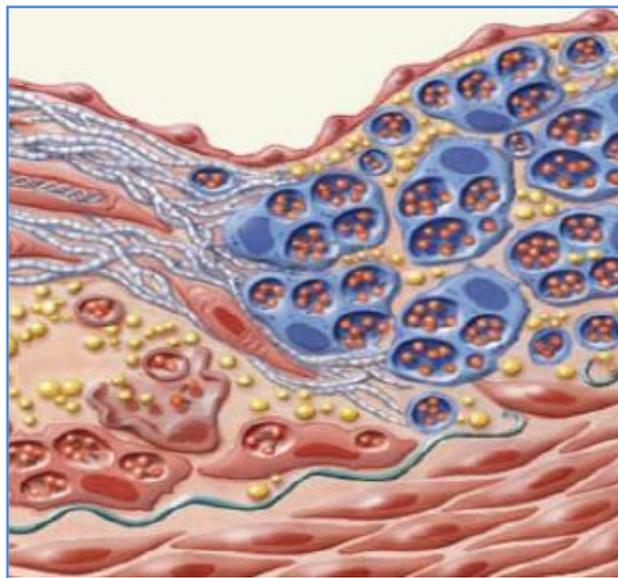


Fig.7: Lesione aterosclerotica finale

produzione di ossido nitrico, non inibiscono anzi stimolano la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce che, a loro volta, sono coinvolte nella

fagocitosi dei lipidi ossidati e nella costituzione del rivestimento fibroso della lesione aterosclerotica finale (Fig.6-7).

Un contributo rilevante alla progressione della placca ateromasica è dato dalle drastiche modificazioni indotte dall'*iperinsulinemia* sul metabolismo lipidico, che viene convertito in senso altamente aterogenico: l'insulino-resistenza altera la fisiologica soppressione del rilascio di acidi grassi dal tessuto adiposo nella fase post-prandiale. A ciò segue un aumento dell'afflusso degli acidi grassi al fegato e una maggiore produzione di lipoproteine ricche in trigliceridi (VLDL), il cui rilascio epatico, non subisce alcuna riduzione con conseguente ampia disponibilità di VLDL nel torrente circolatorio e sviluppo di ipertrigliceridemia. Si verifica inoltre una riduzione della frazione HDL del colesterolo, mentre i livelli di colesterolo totale e di LDL non subiscono significative modificazioni rispetto ai soggetti non diabetici. Peraltro, la frazione LDL del colesterolo risulta costituita da particelle più piccole e dense, con un'augmentata componente lipidica, e dotate di un maggiore potenziale aterogeno; in questa forma, esse sono più facilmente ossidabili e contribuiscono in maniera rilevante alla progressione ed all'instabilizzazione della placca ateromasica.

(Pozzati A. et al., 2004)

3. AOCP

L'Arteriopatia Ostruttiva Cronica Periferica (AOCP) è una patologia vascolare caratterizzata dalla diminuzione della portata ematica distrettuale agli arti inferiori con conseguenti disturbi di deambulazione e lesioni cutanee. Essa insorge come complicanza a lungo termine nei soggetti affetti da diabete di tipo 2 e si distingue per una progressiva occlusione dei vasi arteriosi periferici, prevalentemente in sede popliteo-tibiale, ma anche a livello dell'aorta addominale inferiore e dell'arteria iliaca (*Cary N.R.B., 1996; Ruckley C.V., 1991*); la stenosi è dovuta a formazioni aterosclerotiche che conducono ad una graduale diminuzione del flusso ematico nei distretti da essi perfusi. Quando l'apporto di sangue all'arto a riposo diviene inferiore a quello necessario per mantenere la vitalità dei tessuti, s'instaura un quadro clinico di ischemia critica responsabile della comparsa di una sintomatologia estremamente invalidante. Il sintomo più precoce della malattia è infatti rappresentato dalla cosiddetta "claudicatio intermittens", un dolore ad uno o ad entrambi gli arti, derivante dall'ischemia di un gruppo di muscoli funzionalmente correlati, che aumenta durante la marcia e si attenua con il riposo. Oltre al dolore si hanno scarsa sensibilità, raffreddamento e modificazione di colore della cute, debolezza delle gambe. Con l'aggravarsi della patologia la cute si secca, scompaiono i peli e si manifestano lesioni cutanee che possono evolvere spesso fino alla gangrena e successiva amputazione dell'arto stesso. A parte la sua notevole morbosità, l'arteriopatia periferica nei diabetici è anche predittiva di una vasculopatia generalizzata: le malattie coronariche e delle arterie cerebrali, infatti, seguono strettamente le manifestazioni

dell'AOCP (*Vinik A. et al., 2002*) la cui forma sintomatica più precoce, la “claudicatio intermittens”, è associata ad un incremento della mortalità per problemi cardiovascolari (*Makin A.J. et al., 2004*), con un rischio di morte del 30% entro 5 anni e di circa il 50% entro 10 anni (*Vinik A. et al., 2002*).

La riduzione del lume arterioso che è responsabile del ridotto afflusso di sangue e quindi dell'ischemia dei tessuti a valle dell'ostruzione, è la diretta conseguenza dell'intenso rimodellamento cui va incontro la parete vasale nei soggetti affetti da AOCP, per effetto di una rapida progressione dell'aterosclerosi:

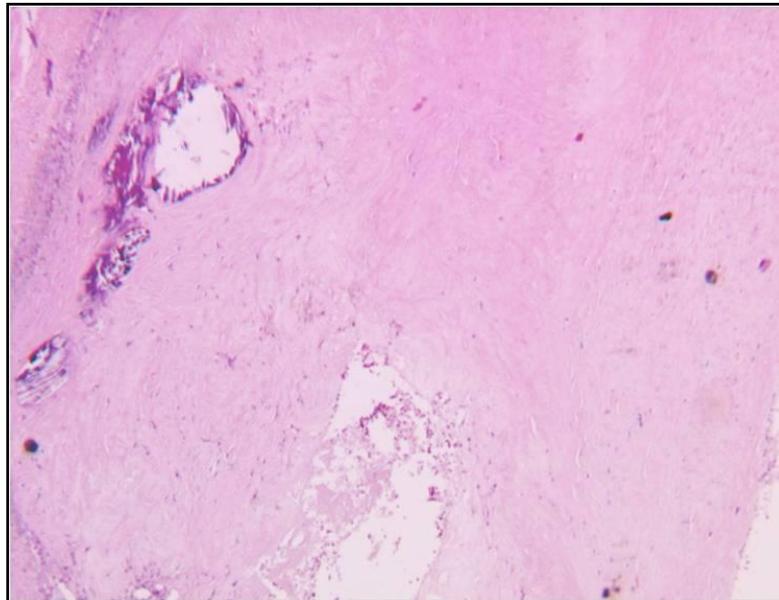


Fig.8: Calcificazione in parete vasale decellularizzata di soggetto affetto da AOCP

la deplezione delle cellule endoteliali intimali e delle cellule muscolari lisce della tonaca media è accompagnata dalla formazione di calcificazioni mediali (Fig.8) e/o dalla comparsa di focolai di infiammazione e/o di aree emorragiche. In aggiunta ai cambiamenti così marcati delle componenti della parete arteriosa, nei pazienti diabetici con AOCP è stata osservata una riduzione numerica dei

progenitori endoteliali circolanti (EPCs) nonché un loro impoverimento funzionale con ridotta proliferazione, adesione, migrazione ed incorporazione in strutture vascolari (*Tepper O.M. et al., 2002; Fadini G.P. et al., 2005; Fadini G.P. et al., 2007*).

3.1 FATTORI DI RISCHIO

Nel 90% dei casi la causa principale di AOCP è l'aterosclerosi ed i fattori di rischio sono pertanto simili:

- fumo
- diabete mellito
- ipertensione
- aumento del colesterolo
- aumento dei trigliceridi
- alterati livelli plasmatici di fibrinogeno
- iperomocisteinemia
- obesità
- una dieta ipercalorica
- mancanza di esercizio fisico.

Essi sono correlati non solo all'insorgenza della patologia, ma anche alla sua progressione.

Il fumo è il fattore di rischio maggiore, ancora più strettamente correlato a tale patologia che alla coronaropatia (*Gordon T. et al., 1972*) infatti, nei fumatori il rischio di sviluppare AOCP è 2-3 volte maggiore rispetto ai non fumatori. Esiste anche una probabilità 4 volte maggiore di progressione della malattia e la possibilità di perdita d'arto nei soggetti che non smettono di fumare.

Per quanto riguarda la correlazione tra diabete mellito ed AOCP, il diabete eleva la frequenza di claudicatio intermittens di origine vascolare, di 3 volte nel sesso maschile e di 8 in quello femminile (*Kannel W.B. et al., 1985*). Nella popolazione diabetica si ha una prevalenza di AOCP del 21.1% e di AOCP sintomatica (claudicatio intermittens) del 7.3% (*Faglia E. et al., 2005*), nei soggetti di età compresa tra i 50 e i 70 anni. Le persone affette da diabete hanno, in più, una probabilità 7 volte superiore rispetto al resto della popolazione di sviluppare un quadro di ischemia critica degli arti inferiori e di andare incontro ad amputazione (*Jonason T. et al., 1985; Hughson W.G. et al., 1978*); infine, la presenza di ulcere e gangrena è stata rilevata in circa il 10% di diabetici anziani associata a “ piede diabetico”, condizione clinica data dalla coesistenza di complicanze neuropatiche e vascolari.

Altri fattori di rischio importanti sono: l'ipertensione arteriosa, con una prevalenza del 35% - 55%, e le dislipidemie che si riscontrano nel 50% dei soggetti con AOCP (*Kannel W.B. et al., 1970*).

3.2 STADIAZIONE

L'AOCP è tradizionalmente caratterizzata da 4 stadi secondo la classificazione di Leriche e Fontaine:

- 1° stadio, preclinico o asintomatico: sono presenti parestesie da sforzo o da mantenimento prolungato della stazione eretta, sensazione di freddo alle estremità, ipotrofia di un arto;
- 2° stadio, “ claudicatio intermittens”: distinto in stadio 2°A e 2°B con distanza assoluta di claudicazione rispettivamente > 150-200

m e < 150 m. L'intervallo di marcia libera può clinicamente variare tra pazienti allo stesso stadio di malattia;

- 3° stadio: dolore a riposo al quale si possono associare alterazioni del trofismo cutaneo e del colorito, edema e cianosi;
- 4° stadio: lesioni trofiche, ulcera e gangrena.

3.3 EPIDEMIOLOGIA

L'AACP mostra un'incidenza annua che varia dal 3% al 6% negli uomini intorno ai 60 anni ed è di circa lo 0.12% nelle donne (*Carlton R. et al., 2006*). In realtà si tratta di una sottostima, sia per il fatto che la malattia è asintomatica negli stadi 1°A e 2°A, sia perché i soggetti anziani, che spesso considerano il dolore della “claudicatio intermittens” come un normale fenomeno dovuto all'invecchiamento, non riferiscono questo dato al proprio medico. Esiste una correlazione tra prevalenza dell'AACP (determinata con tecniche non invasive) ed età: c'è una prevalenza del 2,5% nei soggetti tra i 40 e 59 anni, dell'8,3% nei soggetti tra i 60 e 69 anni e del 18,8% nei soggetti tra i 70 e 79 anni (*Andreozzi G.M., 1999*).

3.4 DIAGNOSI E TERAPIA

La diagnosi di AACP nasce da una valutazione anamnestica del paziente, da una valutazione clinica degli arti e, quando necessario, da esami strumentali. L'anamnesi non deve essere limitata alla semplice valutazione della sospetta patologia vascolare, ma deve anche considerare i fattori di rischio quali il tabagismo, il diabete mellito, il sesso, l'età, l'ipertensione e l'iperlipidemia, e patologie correlate quali l'insufficienza renale cronica, la cardiopatia ischemica, l'insufficienza cerebrovascolare e respiratoria (*Rutherford R.B., 1995*). L'esame

clinico è generalmente sufficiente per confermare la diagnosi di AOCP (*Stoffers H.E. et al., 1997*). L'esame obiettivo comporta la palpazione dell'aorta e dei polsi femorale, popliteo, tibiale posteriore ed anteriore; devono essere anche valutati il trofismo cutaneo e muscolare, la presenza di edema, la presenza, la sede e l'estensione di eventuali lesioni trofiche o di esiti delle stesse. Le metodiche strumentali di cui ci si avvale per la diagnosi, utilizzate non di routine, sono: l'eco(color)doppler e l'angiografia, soprattutto se il paziente deve essere sottoposto a interventi di rivascolarizzazione.

Il trattamento dell'AOCP si pone complessivamente un triplice obiettivo: 1) riduzione della progressione della malattia aterosclerotica generalizzata e, di conseguenza, della morbilità e mortalità cardiovascolare; 2) trattamento di sintomi specifici al fine di migliorare la capacità funzionale e la qualità di vita del paziente; 3) prevenzione delle complicazioni agli arti inferiori (ulcere, gangrena, amputazioni). Anche se non vi sono dimostrazioni forti a sostegno della correlazione fra trattamento dei fattori di rischio della malattia (fumo, diabete, ipertensione, dislipidemia, ecc.) e miglioramento di esiti cardiovascolari in soggetti AOCP, la prevenzione e la modificazione dei suddetti fattori svolgono un ruolo determinante nel trattamento ottimale di questa patologia (*Regensteiner J.G. et al., 2002*). A questo va associato il trattamento farmacologico con antiaggreganti piastrinici e terapia anticoagulante orale. Nei casi con lesioni ostruttive più gravi, che possono minacciare anche la perdita dell'arto, si deve ricorrere ad interventi di rivascolarizzazione quali: P.T.A. (angioplastica transluminale percutanea o intraoperatoria), bypass periferico e T.E.A. (tromboendarterioectomia).

4. SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni del secolo scorso, l'aumento della durata media della vita, le nuove frontiere chirurgiche, le nuove conoscenze sulla regolazione del flusso microcircolatorio, l'epidemiologia clinica ed i progressi della terapia farmacologica hanno modificato radicalmente la storia naturale della patologia aterosclerotica, profondamente condizionata da una serie di eventi ed interventi che si realizzano nel corso degli anni. L'aumento della durata media della vita e la profilassi secondaria dell'aterosclerosi hanno ridotto significativamente la mortalità e le complicanze della cardiopatia ischemica pur non modificandone la morbilità. Il paziente che va incontro ad infarto miocardico muore con molta meno frequenza, lo scompenso cardiaco che ne consegue è trattato in modo più efficace, ed è molto più probabile che il paziente sviluppi nel corso degli anni un' AOCIP sintomatica che in passato non si sarebbe manifestata (*Andreozzi G.M., 2002*).

Nonostante il progresso delle tecniche di rivascolarizzazione chirurgica, le procedure endovascolari nonché alcune terapie mediche con prostanoidei abbiano aumentato la percentuale di salvataggio degli arti affetti da ischemia critica, l'amputazione resta sempre l'evento più probabile e più temibile, basti pensare alle oltre 50 000 amputazioni attuate ogni anno solo negli USA (*Gruppo di Studio Internazionale Piede Diabetico, 2000*). Da qui l'importanza di introdurre nella pratica clinica fattori, chimici o cellulari, che favoriscano una ripresa della vascolarizzazione dei territori ischemici. In quest'ottica è stato messo a punto un progetto di ricerca volto a stabilire se in soggetti diabetici e non diabetici affetti da AOCIP ed ischemia critica degli arti inferiori,

esiste una relazione tra danno della parete arteriosa, endotelio circolante maturo e neoangiogenesi parietale.

A tal fine si è pensato di:

- ✚ Valutare i cambiamenti strutturali cui va incontro la parete vasale nei soggetti affetti da AOCP e determinare la condizione angiogenica “in situ” della parete stessa.
- ✚ Determinare il numero delle cellule endoteliali mature circolanti (CECs) per valutare se esso possa essere un buon indice di danno parietale nell’AOCP associata a diabete.
- ✚ Valutare i meccanismi molecolari che regolano la formazione di nuovi vasi sanguigni nella regione tissutale ischemica, andando a determinare l’espressione “in situ” delle due molecole proangiogeniche VEGF ed MMP-9, mediante quantificazione dei loro trascritti.
- ✚ Determinare la concentrazione di VEGF in circolo.

5. MATERIALI E METODI

5.1 PAZIENTI

Nel programma di studio sono stati reclutati 38 pazienti affetti da AOCP ed ischemia critica, 22 dei quali diabetici e 16 non diabetici. Il 76% erano maschi con un'età media di 71 anni. Di questi pazienti, 5 (non diabetici) provenivano dalla U.O. di Chirurgia Vascolare dell'Ospedale S. Salvatore di L'Aquila, tutti gli altri afferivano all'U.O. di Chirurgia Vascolare del Policlinico S. Orsola di Bologna. Sono stati considerati come controlli, 30 soggetti sani e 2 donatori multiorgano sani, selezionati rispettivamente dal Centro Trasfusionale e dalla Banca Regionale dei Tessuti Cardiovascolari del Policlinico S.Orsola di Bologna.

La diagnosi di arteriopatia periferica è stata fatta considerando non soltanto le condizioni di salute vascolare ma anche i fattori di rischio a cui ciascun paziente era esposto quali il fumo di sigaretta, il diabete mellito, l'ipertensione e l'iperlipidemia, e patologie correlate quali l'insufficienza renale cronica (IRC), la cardiopatia ischemica, l'insufficienza cerebrovascolare (ICV) e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO); lo stadio clinico dell'AOCP è stato stabilito in accordo alla classificazione di Fontaine-Leriche. La topografia delle lesioni vascolari è stata valutata per mezzo dell'eco-Doppler e/o dell'angiografia. Una volta confermata la severità della patologia ed appurato il concreto rischio di amputazione dell'arto inferiore ischemico, i pazienti sono stati sottoposti a procedure endovascolari di angioplastica transluminale percutanea (PTA) e/o ad interventi chirurgici di rivascularizzazione mediante by-pass. Nel contesto operatorio, dopo sottoscrizione del consenso informato, a

ciascun paziente sono stati prelevati frammenti parietali di arterie femoro-poplitee, nella zona prossimale all'anastomosi del by-pass ritenuta macroscopicamente indenne. Il tessuto raccolto è stato campionato e destinato ad indagini istopatologica, immunoistochimica e molecolare. Prima dell'intervento chirurgico, campioni di 40 ml di sangue periferico sono stati prelevati a ciascun paziente ed utilizzati per analisi di tipo citofluorimetrico ed immunoenzimatico.

5.2 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLA PARETE ARTERIOSA

Dopo rimozione chirurgica, un singolo campione di parete arteriosa ($6 \times 3 \text{ mm}^2$) per ciascun paziente è stato fissato in formalina tamponata al 10%. Dopo la fissazione i campioni sono stati sottoposti, all'interno di un processatore automatico, a lavaggi, disidratazione in una serie ascendente di alcoli, chiarificazione in xilolo; dopodiché sono stati inclusi in paraffina. Le sezioni di $5 \mu\text{m}$ di spessore ottenute dai blocchetti d'inclusione mediante un microtomo, dopo semplice contrastazione con Ematossilina/Eosina, sono state osservate al Microscopio Ottico (LM, Olympus CX42) per valutare i cambiamenti strutturali della parete arteriosa, indotti dall'arteriopatia periferica e pertanto stabilire l'estensione del danno parietale, e per valutare la densità capillare nello spessore della parete stessa.

5.3 NEOANGIOGENESI DELLA PARETE ARTERIOSA: ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Per valutare la condizione angiogenica “in situ” della parete vascolare nei pazienti AOCP diabetici e non, è stata effettuata un’indagine immunohistochemica per i due antigeni d’interesse

- **CD34**: proteina transmembrana che definisce circa l’1% delle cellule mononucleari del midollo osseo, compresi precursori/cellule staminali del lineage ematopoietico, cellule endoteliali dei capillari, fibroblasti embrionali e rare cellule gliali nel tessuto nervoso; sembra sia espresso maggiormente nei progenitori più precoci, andando progressivamente a decrescere, nei suoi livelli di espressione, con la maturazione degli elementi cellulari che lo presentano.
- **vWF (von Willebrand Factor)**: glicoproteina citoplasmatica presente nei corpi di Weibel-Palade delle cellule endoteliali, negli α -granuli dei megacariociti e delle piastrine da essi derivate, nonché nella matrice subendoteliale della parete vasale.

A tal scopo, sezioni di 3 μ m di spessore di tessuto arterioso fissato in formalina ed incluso in paraffina, dopo disposizione su vetrini portaoggetti, sono state deparaffinate in xilolo e reidratate attraverso concentrazioni decrescenti di etanolo. Per recuperare l’antigenicità tissutale probabilmente modificata dalla procedura di fissazione, è stato fatto lo smascheramento antigenico indotto dal calore, esponendo le sezioni immerse in jar contenenti tampone citrato (pH 6), ad un ciclo di autoclave (120°C, 1 atm, 20 min). Dopo averle lasciate raffreddare a temperatura ambiente (rt) per 20 minuti e

successivamente sottoposte a lavaggi in acqua distillata, le sezioni sono state incubate (10 min, rt) con metanolo assoluto al 3% di perossido d'idrogeno (H₂O₂) per bloccare le perossidasi endogene. In seguito a lavaggi in TBS (Trizma Buffer Slution) 1X (pH 7.6), le sezioni sono state incubate per 5 minuti in una "protein block solution" fornita dal NovoLink Polymer Detection Kit (Novocastra, New Castle, UK), utilizzato come sistema di rivelazione. Dopo alcuni lavaggi in TBS 1X, le sezioni sono state incubate over night a +4°C all'interno di una camera umida, con gli anticorpi monoclonali diretti contro i due antigeni delle cellule endoteliali CD34 (clone QBEnd-10; dilution 1:80; Dako, Copenhagen, Denmark) e vWF (clone F8/86; dilution 1:50; Dako, Copenhagen, Denmark). Gli anticorpi primari sono stati omessi dalle sezioni considerate come controlli negativi. In seguito a lavaggi in TBS 1X e ad un'incubazione di 30 min a temperatura ambiente con una "post primary block solution" contenuta nel Kit Novolink, le sezioni dopo ulteriori lavaggi in TBS 1X sono state incubate con il NovoLinkTM Polymer, all'interno di una camera umida (30 min, rt). Per sviluppare l'attività perossidasi, le sezioni sono state successivamente trattate per 2-3 min con diaminobenzidina (NovoLinkTM DAB Substrate Buffer) e dopo di ciò immerse in acqua distillata per stoppare la reazione. Conseguentemente, le sezioni sono state contrastate con ematossilina, deidratate attraverso concentrazioni crescenti di etanolo, chiarificate in xilolo, montate con il Balsamo del Canada (Sigma, Milano, Italy) e lasciate asciugare in stufa a +37°C. Le reazioni antigene-anticorpo sono state osservate mediante il Microscopio Ottico (Olympus CX42) con il software *Image proPlus*, collegato ad una CCD camera.

5.4 ESPRESSIONE PARIETALE DI VEGF ED MMP-9: ANALISI QUANTITATIVA

Nei nostri pazienti AOCP, diabetici e non, affetti da ischemia critica è stata determinata l'espressione in parete arteriosa delle due molecole proangiogeniche VEGF ed MMP-9, mediante quantificazione dei trascritti del loro RNA. Ciò per valutare i meccanismi molecolari che regolano la formazione di nuovi vasi sanguigni nella regione tissutale ischemica degli arti inferiori, interessati dalla lesione vascolare. L'analisi quantitativa è stata eseguita su campioni di tessuto parietale arterioso prelevati in corso di rivascolarizzazione chirurgica, dalla zona prossimale all'anastomosi del by-pass femoro-popliteo. Un metodo largamente impiegato di quantificazione dell'RNA è l'RT-PCR (o Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), che sfrutta la reazione di amplificazione enzimatica catalizzata dalla DNA polimerasi DNA dipendente. Poiché l'RNA non può servire come stampo per la PCR, il primo step in un saggio di RT-PCR è la trascrizione inversa dell'RNA in cDNA, il quale viene di seguito amplificato in maniera esponenziale (*Bustin S.A., 2000*). Il prodotto di PCR così ottenuto può essere analizzato o secondo modalità standard mediante elettroforesi su gel di agarosio e lettura allo spettrofotometro della fluorescenza emessa, il che si traduce in una quantificazione semi-quantitativa o qualitativa dell'RNA (Conventional RT-PCR); oppure monitorando in tempo reale, mediante sistema computerizzato, l'andamento della reazione (Real Time RT-PCR) mentre è ancora in svolgimento, il che permette di fare una valutazione quantitativa dei risultati della reazione stessa (Fig.9).

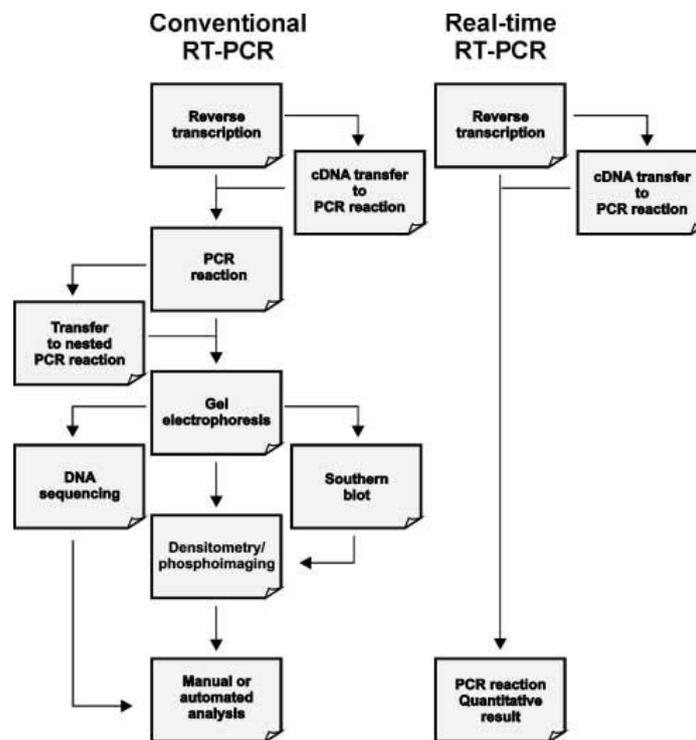


Fig.9: RT-PCR quantification (Bustin SA, 2000)

La procedura di Real Time RT-PCR consta di una serie di passaggi cui l'RNA d'interesse va incontro per poter essere analizzato quantitativamente: estrazione dell'mRNA da cellule isolate o campioni di tessuto; quantificazione dell'RNA estratto; RetroTrascrizione; Real Time PCR.

5.4.1 ESTRAZIONE DELL'RNA

Prevede un susseguirsi di fasi postume al campionamento del materiale biologico da cui prelevare l'RNA. Nel caso specifico della nostra esperienza, i pezzi operatori, uno per ciascun paziente, sono stati ridotti ognuno in due frammenti di circa $3 \times 3 \text{mm}^2$, dopodiché i campioni sono stati sottoposti a:

- stoccaggio, per cui ciascun frammento è stato trasferito in una eppendorf (RNA free) contenente 500 μl di un'opportuna soluzione di lisi e purificazione degli acidi nucleici (Lysis

Solution 2X, solfato di sodio e dodecile e idrossido di sodio) e così mantenuto a -80°C fino al momento del suo utilizzo

- polverizzazione in azoto liquido, mediante l'ausilio di un pestello pre-raffreddato
- macerazione, cioè risospensione del materiale polverizzato in un tampone di lisi preparato aggiungendo di $500\ \mu\text{l}$ di PBS ($\text{Ca}^{++} / \text{Mg}^{++}$ free) la soluzione utilizzata per lo stoccaggio
- omogeneizzazione mediante centrifugazione a velocità piena per circa 30 secondi; l'omogenato può quindi essere stoccato a -20°C per tempi di conservazione lunghi, a $+4^{\circ}\text{C}$ per tempi brevi (fino ad un massimo di 24 ore)
- digestione enzimatica dell'omogenato con Proteinasi K ($200\ \mu\text{g}$ per ml di Lysis Solution), over night a temperatura ambiente
- estrazione dell'RNA totale per separazione dal DNA genomico, dalle proteine e da altre molecole cellulari presenti nel lisato omogeneizzato; a tal scopo il lisato viene passato attraverso un compartimento di purificazione contenente una membrana specificamente applicata, sulla quale vengono versate soluzioni di lavaggio e l'RNA così purificato viene eluito in una piastra multiwell da 96 pozzetti per PCR. Nella nostra esperienza, le fasi di purificazione ed estrazione dell'RNA sono state condotte mediante l'utilizzo di un estrattore semi-automatico (ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation dell'Applied Biosystems, Fig. 10) e della relativa chimica (Nuc Prep genomic DNA chemistry).



Fig.10: ABI PRISM 6100

I campioni digeriti pertanto sono stati centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti, dopo di che si è provveduto a recuperare la parte acquosa superiore contenente l'RNA e quindi destinata alla processazione automatizzata.

La rapidità di esecuzione e l'applicazione contemporanea della metodica su numerosi campioni, che l'utilizzo dell'estrattore permette, si realizzano purtroppo a scapito di una minor resa finale. Per aumentare, pertanto, la quantità di estratto, si è provveduto alla sua essiccazione, mediante uno strumento, l'essiccatore UNIVAPO 100H dell'UNIEQUIP, che combina la forza centrifuga e il vuoto in modo da ottenere evaporazione, asciugatura e concentrazione dei liquidi biologici.

5.4.2 QUANTIFICAZIONE DELL'RNA ESTRATTO

In seguito all'essiccazione, l'RNA di ciascun campione è stato quantificato misurando l'assorbanza, a 260 nm, tramite lo spettrofotometro Nanodrop (es. Nanodrop ND-420 della Nanodrop Technology, Fig.11) che permette di utilizzare per la lettura solo 1µl

di campione essiccato, risospeso in H₂O DEPC, dispensato direttamente sul basametro di misura.

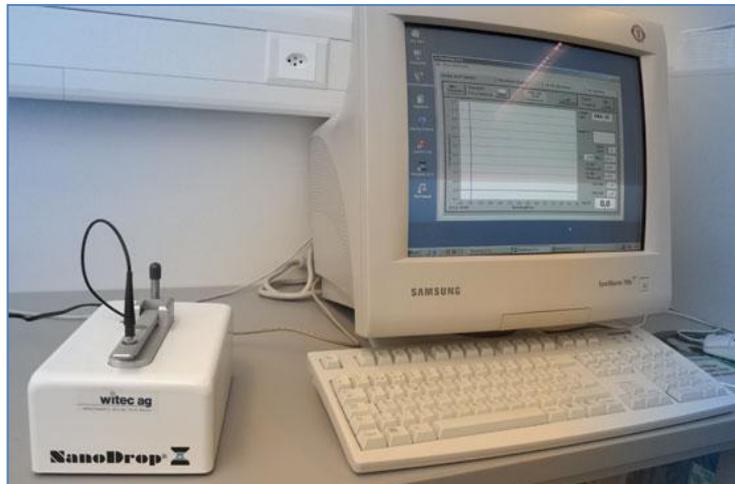


Fig.11: NANODROP ND-420

La quantità media di RNA ottenuto è stata di 9,13 ng/μl con un rapporto 260/280 (indice di presenza di contaminazione da proteine) di circa 2,42.

5.4.3 RETROTRASCRIZIONE (RT)

Una volta quantificato l'RNA è stato retrotrascritto ed amplificato mediante RT-PCR, un metodo molto sensibile e specifico utilizzato per l'analisi di campioni disponibili in quantità limitata. L'RNA non è infatti un substrato efficiente per la *Taq* DNA polimerasi, quindi è necessario effettuare prima la trascrizione inversa (o retrotrascrizione). Questa crea una copia del filamento di RNA sotto forma di filamento di DNA complementare (cDNA) che sarà utilizzato come substrato per l'amplificazione in PCR.

La miscela di una reazione di RT deve contenere:

- 1) stampo per l'azione dell'enzima, rappresentato dal filamento singolo di mRNA;

- 2) primers d'innescio della reazione, complementari alle sequenze di RNA che si vogliono retrotrascrivere; nell'attenta scelta dei primers da utilizzare, bisogna tener presente che l'impiego di random o di oligo-dT primers massimizza, rispetto all'utilizzo di primers specifici, il numero di molecole di mRNA che può essere analizzato da un piccolo campione di RNA (*Bustin S.A., 2000*);
- 3) deossiribonucleotidi trifosfati (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), in una miscela equimolare;
- 4) tampone, contenente specie ioniche essenziali per il funzionamento dell'enzima;
- 5) enzima trascrittasi inversa (reverse transcriptase, RT), che è una DNA polimerasi RNA-dipendente.

La miscela (Master Mix) della reazione di RT è stata preparata utilizzando il kit commerciale dell'Applied Biosystem (High capacity cDNA Archive kit) il cui protocollo suggeriva per i reagenti le seguenti quantità, riferite ad un singolo campione:

Reagenti	Quantità [µl]
buffer 10X	10
dNTPs 25X	4
Random primer 10X	10
RT(50 u/µl)	5
H ₂ O DEPC	21
<hr/>	<hr/>
TOTALE	50

a cui aggiungere 50µl dell'RNA estratto, per un volume finale di 100µl. Si è però ipotizzato che si sarebbero potuti ottenere risultati più soddisfacenti retrotrascrivendo, per ciascun campione, un volume finale di 20 µl (10µl di RNA + 10 µl di Master Mix).

Le quantità dei componenti della Master Mix sono state pertanto ridotte di un fattore 5:

Reagenti	Quantità [µl]
buffer 10X	2
dNTPs 25X	0,8
Random primer 10X	2
RT(50 u/µl)	1
H ₂ O DEPC	4,2
<hr/>	
TOTALE	10

La miscela di reazione, preparata mantenendo le provette in ghiaccio, è stata dispensata in microAmp da 0.2 ml anch'esse disposte in ghiaccio le quali, dopo l'aggiunta dell'RNA estratto, sono state rapidamente sistemate in un "termociclatore" (biometria UNO-thermoblock thermocycler).

Il termociclatore prevede i seguenti cicli della reazione di retrotrascrizione:

25°C per 10 minuti → **annealing** (appaiamento) dei primers alle sequenze complementari di RNA

37°C per 120 minuti → catalizzazione dell'**estensione dei primers** ad opera della DNA polimerasi RNA-dipendente transcriptasi inversa

85°C per 5 minuti → **sintesi di cDNA**.

Il cDNA così prodotto è stato stoccato a -20°C in attesa di essere amplificato con il metodo della Real Time PCR.

5.4.4 REAL TIME PCR

Tecnica di analisi quantitativa dell'espressione genica che permette di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale, questo perché l'amplificazione viene misurata in tempo reale durante

la fase esponenziale della PCR. La metodica di Real Time PCR sfrutta l'attività 5'-3' esonucleasica della *Taq* DNA polimerasi nel tagliare, durante la fase di estensione della PCR, una sonda fluorescente il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR (Bustin S.A., 2000; Bianchi G.L., 2002). Pertanto, la miscela di una reazione di Real Time PCR deve contenere:

- stampo per l'attività enzimatica, rappresentato dal DNA (cDNA) a doppio filamento;
- primers specifici, in forma di due oligonucleotidi (15-25 pb) complementari a regioni dei filamenti opposti di cDNA che fiancheggiano la sequenza bersaglio;
- deossiribonucleotidi trifosfati (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) , riuniti in una miscela equimolare;
- tampone, contenente cloruro di magnesio le cui specie ioniche (Mg^{2+}) sono essenziali per il funzionamento dell'enzima;
- enzima, DNA polimerasi DNA-dipendente, estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* (da cui *Taq* polimerasi) e per questo termostabile;
- sonde, costituite da oligonucleotidi complementari a determinate sequenze di DNA interne alle sequenze amplificate dai primer, specifiche quindi per i geni d'interesse e marcate con molecole fluorescenti per il rilevamento in tempo reale.

La reazione di PCR in Real Time si esplica attraverso una serie di fasi che sono:

- **denaturazione** → la miscela viene riscaldata a 95°C per 10 minuti il che permette, oltre alla separazione dei due filamenti complementari di cDNA, l'attivazione delle sonde e della polimerasi

- **annealing** → i campioni vengono raffreddati per 15 secondi fino a 50°-60°C, temperatura che garantisce la specifica ibridazione di primers e sonde alle regioni complementari su ciascun filamento del cDNA bersaglio

- **estensione** → la temperatura della miscela viene portata per 10 minuti a 72°C, consentendo alla Taq DNA polimerasi che è termostabile, di allungare le sequenze di innesco dei primers e di sintetizzare il filamento complementare a ciascun filamento stampo di cDNA; al termine di questa fase sono presenti nella miscela di reazione 4 filamenti (2 copie) di cDNA

- **amplificazione** → le 2 copie di cDNA formate al termine del 1° ciclo di reazione, vanno a loro volta incontro a denaturazione, annealing ed estensione e, alla fine del 2° ciclo così svoltosi, nella miscela di reazione sono presenti 4 copie (8 filamenti) di cDNA; un nuovo ciclo (il 3°) raddoppia a 16 il numero dei filamenti singoli di cDNA e così via per un totale di 40-50 cicli di reazione al termine dei quali, il numero teorico di molecole a doppia elica, prodotte in maniera esponenziale, è 2^{40} - 2^{50} .

La reazione di PCR in Real Time viene svolta in maniera automatizzata mediante l'impiego di uno strumento capace di combinare amplificazione, fluorescenza e quantificazione e dotato di un software, collegato ad un sistema computerizzato, per l'analisi dei dati: lo strumento da noi utilizzato è ABI PRISM 7000 Sequence Detection System dell'Applied Biosystems (Fig.12).



Fig.12: ABI PRISM 7000

In tal modo, l'andamento della reazione può essere seguito in tempo reale mentre è ancora in pieno svolgimento e, i dati che si ottengono, possono essere utilizzati per effettuare una quantificazione relativa della sequenza di DNA amplificata durante la fase esponenziale della PCR: tutto ciò è possibile per la presenza nella miscela di reazione, di molecole capaci di emettere fluorescenza (*Bianchi G.L., 2002*). Questi marcatori appartengono sostanzialmente a due categorie: coloranti intercalanti (es. SYBR green) che si legano in maniera aspecifica a qualsiasi frammento di DNA a doppia elica, con il rischio pertanto di dare falsi positivi e quindi prodotti di PCR aspecifici; sonde ad ibridizzazione, specifiche per il frammento da amplificare del gene ricercato, marcate con molecole fluorescenti (es. TaqMan, FRET, Molecular beacons, Scorpion).

La sonda da noi utilizzata è quella di tipo *TaqMan*, un oligonucleotide di 25-28 pb che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene da amplificare (*Bianchi G.L., 2002*). Consiste di due tipi di fluorofori: un **Reporter (R)** legato all'estremità 5', che è generalmente una molecola fluorescente a breve lunghezza d'onda (emette nel verde); un **Quencher (Q)** legato all'estremità 3', usualmente un colorante ad elevata lunghezza d'onda (emette nel rosso).

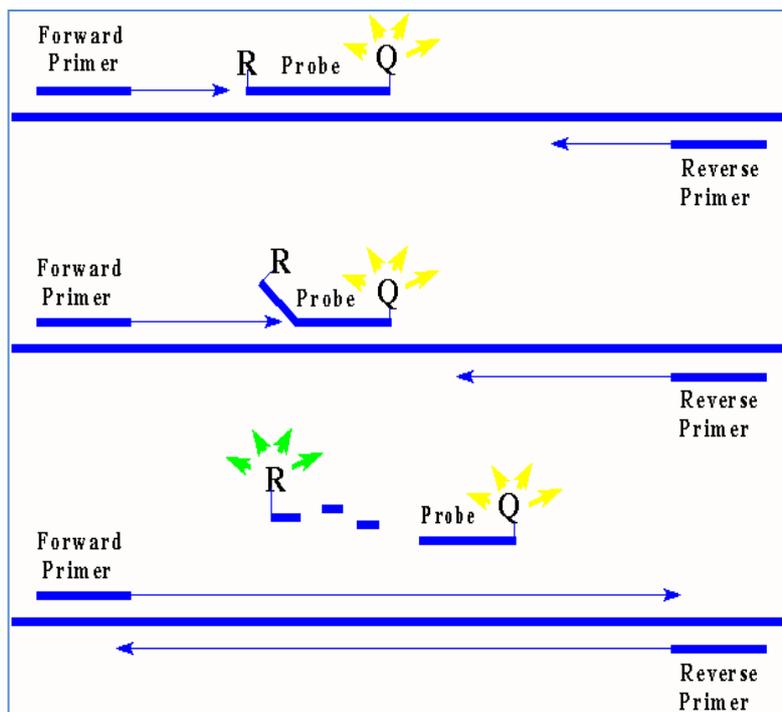


Fig.13: Modalita' di azione della sonda TaqMan

Quando la sonda è intatta, essendo i due fluorofori ravvicinati, la molecola Quencher impedisce l'emissione di fluorescenza da parte del Reporter. Nel corso di ogni ciclo di PCR, nella fase di estensione del filamento di DNA complementare alla sequenza bersaglio, quando l'enzima Taq Polimerasi incontra l'estremità 5' della sonda effettua il distacco del Reporter. In questo modo il fluoroforo va in soluzione e, non subendo più l'inibizione del Quencher, emette fluorescenza (Fig.13). In base a questo meccanismo l'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dell'amplificato specifico della reazione (Bianchi G.L., 2002). La fluorescenza viene letta alla fine di ogni fase di annealing: i valori della fluorescenza vengono registrati e direttamente correlati alla quantità di prodotto amplificato fino a quel momento.

L'andamento della reazione viene quindi visualizzato in forma di grafico (Fig.14), dove sull'asse delle ordinate troviamo la fluorescenza

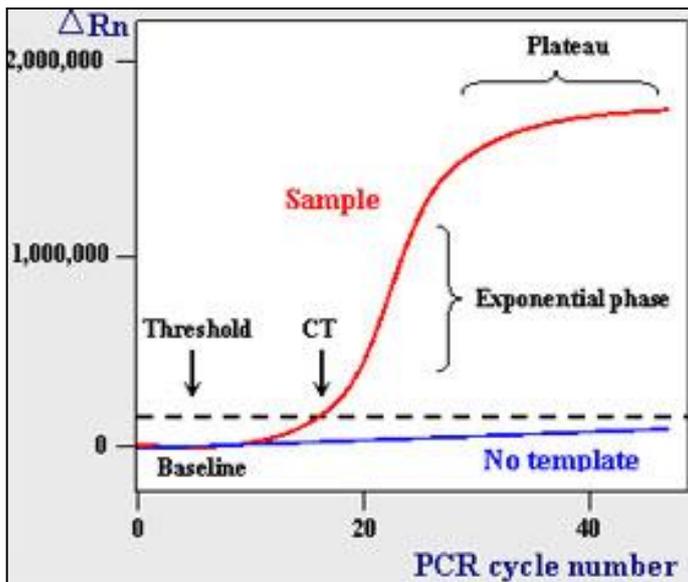


Fig.14: Esempio di una curva di amplificazione

rappresenta l'emissione di fluorescenza di background ed indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di un amplificato;

- la linea soglia (treshold line), parallela alla linea base, scelta dall'operatore in maniera da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale;

- Il ciclo soglia (treshold Cycle o Ct), specifico per ogni campione, identifica il valore del ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia. (Bianchi G.L., 2002)

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA iniziale: esiste, infatti, una relazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA.

Per portare a termine una corretta quantificazione, i livelli di espressione dei geni d'interesse (geni *target*) devono essere normalizzati con quelli di un gene di controllo endogeno o *housekeeping*; poiché questo gene è costitutivamente espresso, esso viene amplificato in tutti i campioni e ad esso vengono pertanto riferite tutte le misure. Per poter riferire, però, l'espressione di un gene

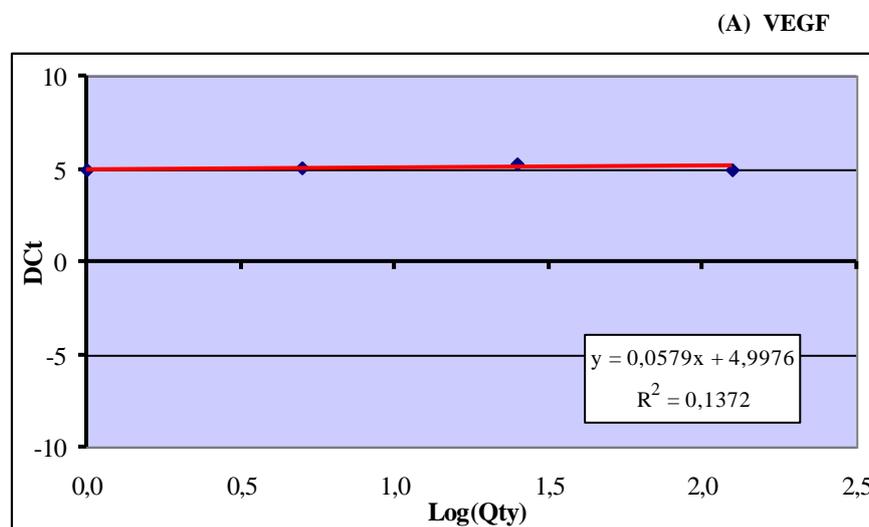
emessa e sull'asse delle ascisse il numero di cicli. Nello studio di un grafico di Real Time PCR vengono definiti tre parametri:

- la linea base o baseline della curva, definita dai primi cicli (10-15) della reazione,

target a quella di un gene housekeeping, è necessario che le rispettive efficienze di amplificazione siano simili. A tale scopo, prima di iniziare ad analizzare i nostri campioni, abbiamo costruito una curva standard di validazione utilizzando come calibratore il cDNA a concentrazione nota, derivante dalla linea cellulare MCF-7 già standardizzata (*controllo positivo*). Di questo campione di cDNA sono state fatte delle diluizioni seriali (in base 5), saggiando ogni diluizione in triplicato. Ciascuna diluizione è stata analizzata usando sia i primer per il gene housekeeping, sia quelli per i geni target (VEGF, MMP-9) e, per ogni set di primer ad ogni diluizione, è stato determinato il Ct. E' stato costruito un grafico mettendo sull'asse delle ordinate il Ct e sull'asse delle ascisse il log del cDNA diluito: le efficienze del gene housekeeping e dei geni target possono essere considerate comparabili se la pendenza della curva è minore di 0.1.

In prima battuta si era deciso di usare come gene referente il gene GUS (β -D Glucuronidasi), ma i valori di Ct ottenuti erano più bassi di quelli del VEGF e della MMP-9: ciò significa che i geni target non sono stati amplificati con la stessa efficienza del gene housekeeping.

Si è pertanto deciso di provare con la β -actina. La validazione ha avuto esito positivo (Fig.15 A-B), il che vuol dire che il gene housekeeping ed i geni target amplificano con la stessa efficienza.



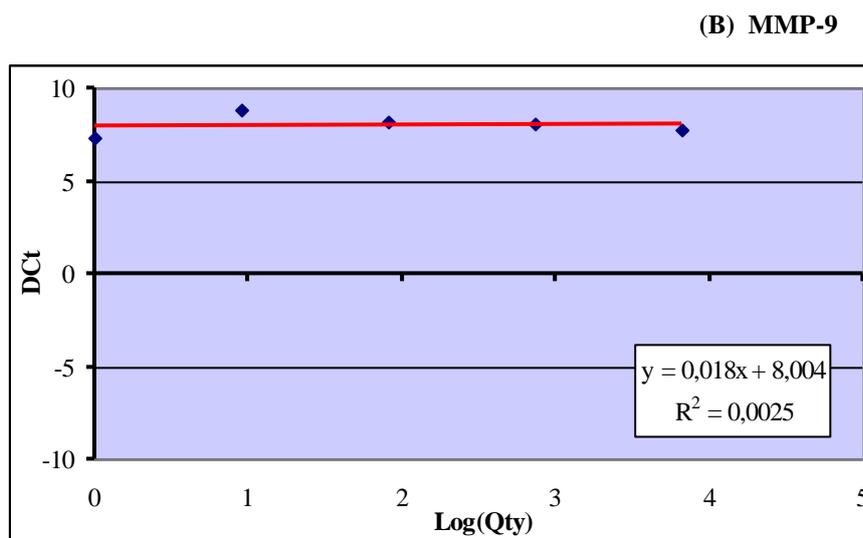


Fig.15: Test di validazione per VEGF (A) ed MMP-9 (B)

Ciò ci ha permesso di procedere con l'analisi quantitativa dei nostri campioni. La miscela della reazione di Real Time PCR è stata preparata utilizzando i seguenti reagenti dell'Applied Biosystem:

- TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X
- Sonde (VEGF, MMP-9, β -actina) + Primer 20X
- H₂O DEPC

A questi componenti è stato aggiunto, per ciascun campione, il cDNA ottenuto dalla reazione di retrotrascrizione.

Le quantità dei reagenti sono state calcolate per un volume finale di miscela di reazione di 20 μ l per campione per ciascun gene (come suggerito dal protocollo fornito dalla ditta di distribuzione dei prodotti):

Reagenti	Quantità [μl]
TaqMan® Universal PCR Master mix 2X	10
Sonde + Primer 20X	1
H ₂ O DEPC	1
cDNA	8
TOTALE	20

Il protocollo suggeriva di considerare come quantità fissa di cDNA 4 μ l, ma per aumentare la resa abbiamo deciso di concentrarlo.

Ciascun campione è stato testato in triplicato, pertanto per avere materiale sufficiente per l'analisi dei due geni, i campioni sono stati diluiti 1:5 (20 μ l di cDNA + 80 μ l di H₂O DEPC).

QUANTIFICAZIONE RELATIVA

Una volta concluso il processo di Real Time PCR, il valore dei diversi Ct è stato calcolato tramite il software dello strumento dopo aver posizionato, sul grafico di amplificazione, la threshold il più in basso possibile all'interno della fase esponenziale.

Per la quantificazione di ciascuna molecola target, è stata utilizzata la media dei valori di Ct del gene housekeeping (β -actina) e dei geni target (VEGF, MMP-9), secondo le seguenti formule matematiche:

- $\Delta Ct = \text{media dei Ct target} - \text{media dei Ct housekeeping}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ campione} - \Delta Ct \text{ calibratore}$

Il livello di espressione del gene target = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

E' stata quantificata l'espressione dei geni di VEGF ed MMP-9 anche in campioni vascolari (controlli sani) riferibili a 2 donatori giovani multiorgano, fornitici dalla Banca Regionale dei Tessuti Cardiovascolari del Policlinico S.Orsola di Bologna, e ad un intervento di safenectomia.

5.5 HUMAN VEGF-A ELISA

La concentrazione del VEGF in circolo è stata determinata nei nostri pazienti AOCP, mediante un saggio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), effettuato utilizzando il Quantikine kit (R&D Systems, Minneapolis, USA): il saggio si basa su una tecnica quantitativa immunoenzimatica "a sandwich". Campioni di siero di donatori sani, forniti dal Centro Trasmfusionale del Policlinico S.Orsola

di Bologna, sono stati considerati come controlli. Seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice del kit, standard e campioni di siero sono stati dispensati in una piastra da microtitolazione di polistirene da 96 pozzetti precedentemente ricoperti con un anticorpo monoclonale specifico per il VEGF: ciascuna molecola di antigene è stata in tal modo captata dall'anticorpo immobilizzato. Dopo aver lavato via le molecole rimaste libere nei pozzetti, è stato aggiunto un complesso enzima-anticorpo policlonale, specifico per il VEGF. In seguito ad un lavaggio fatto per rimuovere tutti i reagenti anticorpo-enzima non legati, è stata dispensata in ciascun pozzetto una soluzione del substrato specifico dell'enzima, sviluppando così una reazione colorimetrica. L'intensità del colore prodotto, proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo formati e quindi alla concentrazione di VEGF (captato nel passaggio iniziale) in ciascun campione analizzato, è stata misurata per mezzo di uno spettrofotometro (lettore multipiastra) ad una densità ottica di 450nm. Al fine di valutare i nostri risultati, abbiamo costruito una curva standard (Fig.16).

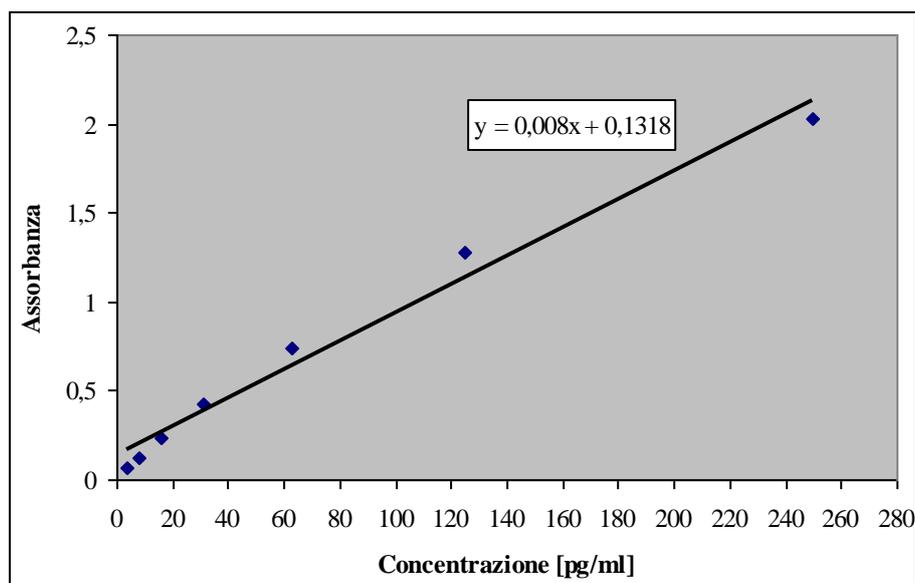


Fig.16: Curva standard

5.6 INDIVIDUAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI MATURE CIRCOLANTI MEDIANTE ANALISI CITOFUORIMETRICA

Al fine di specificare il ruolo delle CECs nei pazienti diabetici che soffrono di AOCP ed ischemia critica, su campioni di sangue periferico è stata effettuata un'indagine in citofluorimetria per determinare il numero di cellule endoteliali mature in circolo e valutare le possibili differenze quantitative tra i soggetti in questione e controlli sani. Il saggio è stato condotto su campioni di sangue periferico dei nostri pazienti AOCP, utilizzando il CELLQUANT FF-CD146 Kit (BioCytex, France); per ciascun paziente è stato testato un campione di sangue di un soggetto sano, fornito dal Centro Trasfusionale del Policlinico S.Orsola di Bologna dopo sottoscrizione del consenso informato. Brevemente, il sangue intero è stato arricchito di nanoparticelle magnetiche rivestite con l'anticorpo monoclonale anti CD146, marker specifico delle cellule endoteliali mature circolanti; dopodiché le cellule rosse sono state lisate e le cellule CD146 negative eliminate. I campioni arricchiti sono stati marcati con i due anticorpi monoclonali anti CD45-FITC ed anti CD146-PE (complementare a quello utilizzato per l'immuno-separazione). L'aggiunta di un colorante nucleare e di biglie fluorescenti forniti dal kit, ha permesso mediante l'utilizzo di un citometro FC500 (Beckman Coulter Miami FL) , di isolare e contare le CECs definite come cellule nucleate con un fenotipo CD146+/CD45-.

5.7 ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti da ciascun tipo di analisi condotta, sono stati validati mediante elaborazione statistica.

Per quanto riguarda la caratterizzazione istopatologica della parete arteriosa, la valutazione è stata espressa come percentuale di campioni aventi struttura parietale ben preservata o di campioni con lesioni complesse: il confronto tra i due gruppi di campioni è stato effettuato mediante il test “t” di Student.

Il medesimo test statistico è stato utilizzato per comparare le percentuali di presenza dei vasi capillari tra pazienti AOCP diabetici e pazienti AOCP non diabetici.

I dati derivanti dall’analisi quantitativa in Real Time-PCR e dal saggio ELISA, sono stati esaminati con il test non parametrico Mann-Whitney U test.

I risultati dell’analisi citofluorimetrica sono stati espressi come il numero di CEC per ml di sangue periferico; i valori medi delle cellule riferiti ai pazienti diabetici sono stati confrontati con quelli dei pazienti non diabetici e con quelli dei controlli sani, applicando il test del Chi-quadrato (χ^2).

In ciascuna analisi sono stati considerati statisticamente significativi tutti i valori di $P \leq 0.05$.

6. RISULTATI

6.1 VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DELLA PARETE ARTERIOSA

L'indagine morfologica è stata condotta sulle sezioni istologiche, semplicemente contrastate con E&E, riferibili a tutti i pazienti AOCP. Senza tenere conto della distinzione tra diabetici e non diabetici, sono stati osservati:

- campioni che mostravano modificazioni strutturali poco importanti in una parete arteriosa ben preservata (Fig.17-17.1);

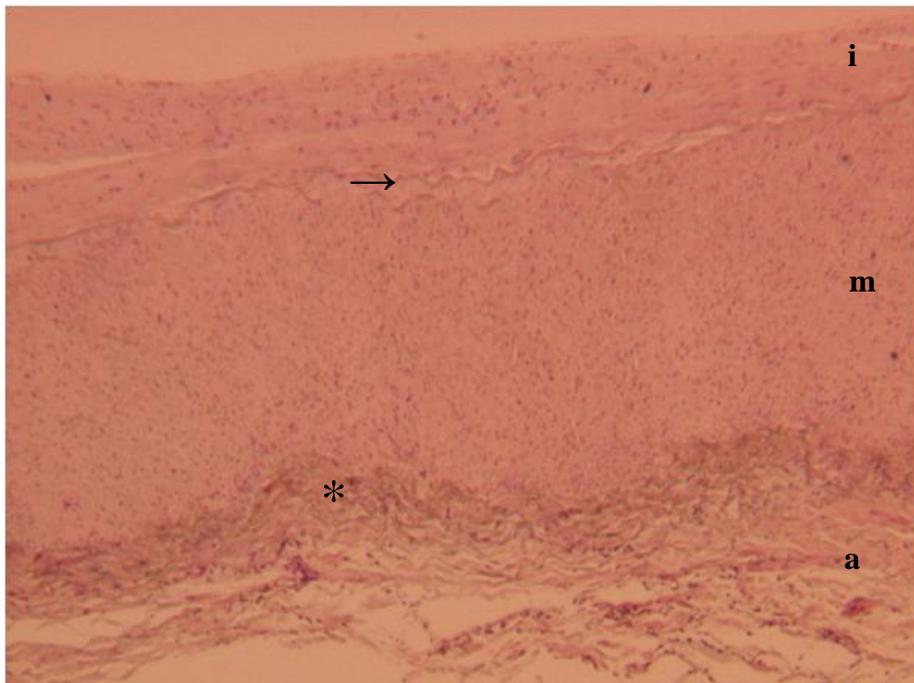


Fig.17: Parete arteriosa con struttura ben preservata in cui si riconoscono perfettamente tonaca intima (**i**), tonaca media (**m**), tonaca avventizia (**a**), lamina elastica interna (→), lamina elastica esterna (*) (LM, 10X)

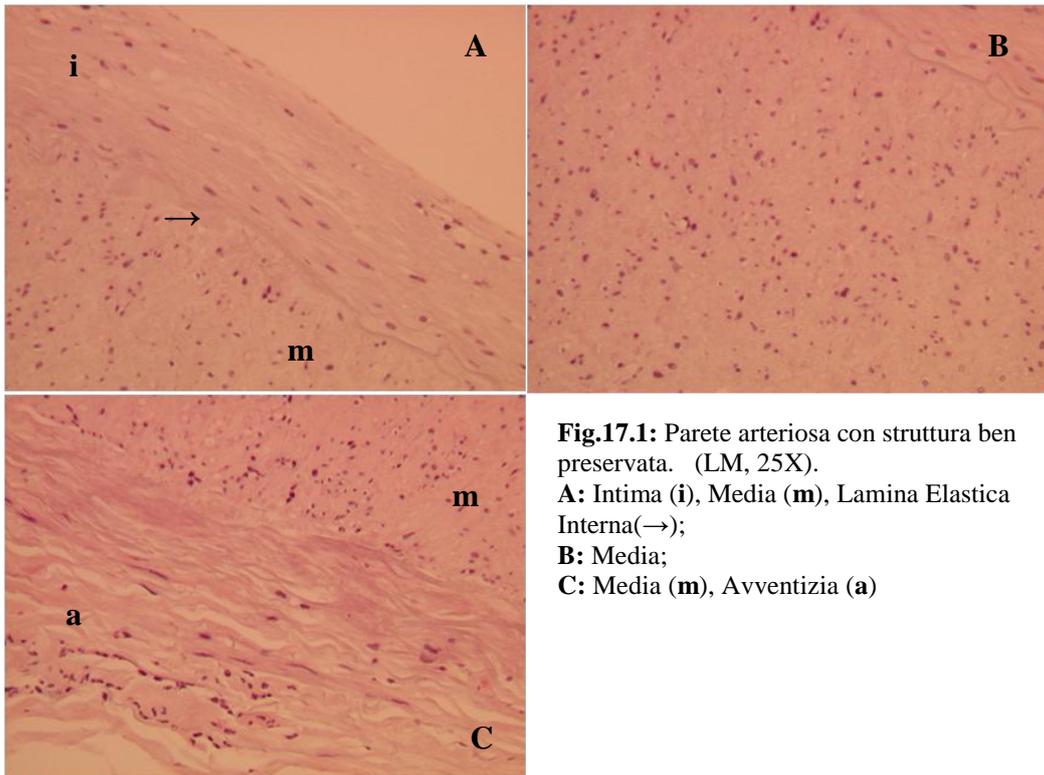


Fig.17.1: Parete arteriosa con struttura ben preservata. (LM, 25X).

A: Intima (i), Media (m), Lamina Elastica Interna(→);

B: Media;

C: Media (m), Avventizia (a)

- campioni di parete arteriosa interessati da lesioni complesse, intese come ispessimento fibroso dell'intima accompagnato dalla presenza di calcificazioni, e/o massivi infiltrati infiammatori, e/o aree emorragiche (Fig.18).

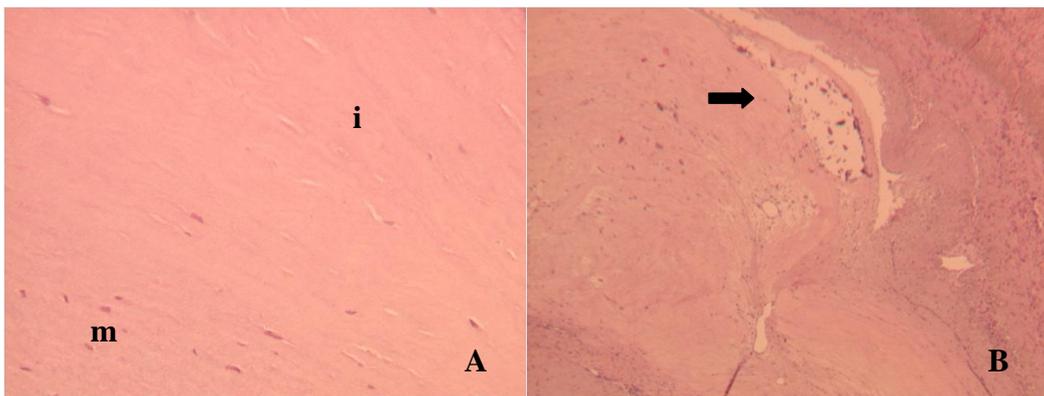


Fig.18: Parete arteriosa severamente danneggiata interessata da lesioni complesse (LM, 25X). **A)** Ispessimento fibroso dell'intima associato a depauperamento cellulare della tonaca media; **B)** Calcificazione (**➡**).

La parete arteriosa da pazienti diabetici, confrontata con quella dei soggetti non diabetici, ha rivelato una più alta incidenza (**60% vs 47%**) di lesioni complesse, pur mostrando una minore tendenza a dare calcificazioni (**50% vs 60%**).

Per quanto riguarda la densità capillare parietale, la presenza di vasi è stata definita dall'osservazione di più di tre capillari per sezione, l'assenza è stata specificata dall'osservazione di meno di tre capillari per sezione. Sulla base di queste valutazioni è emerso che la parete arteriosa dei pazienti diabetici (Fig.19 A-B), confrontata con quella dei pazienti non diabetici (Fig.19 C-D), è caratterizzata da una più bassa densità (**65% vs 87%**) di vasi capillari.

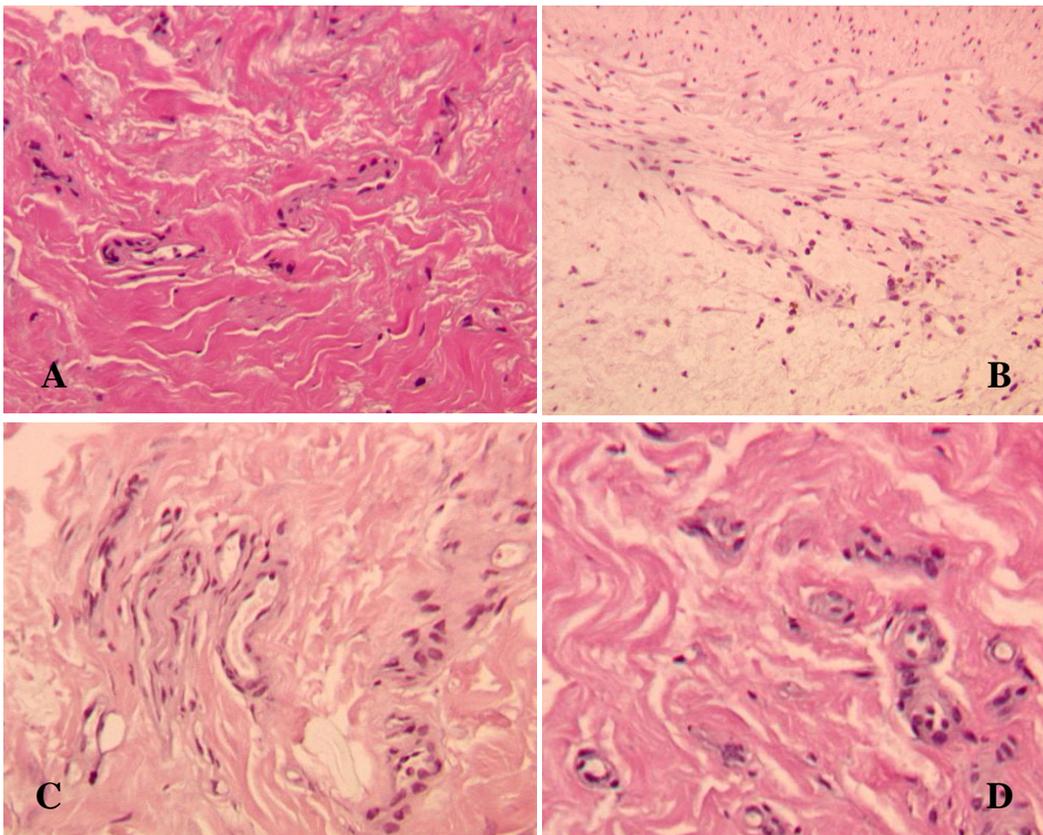


Fig.19: Vasi nella parete arteriosa di pazienti AOCB diabetici (A-B) e non diabetici (C-D) (LM, 25X)

6.2 NEOANGIOGENESI DELLA PARETE ARTERIOSA: ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

La formazione di nuovi vasi capillari in seno alla parete arteriosa, eventualmente indotta dallo stimolo ischemico, è stata investigata studiando l'espressione di CD34 e vWF, marcatori rispettivamente dei progenitori più precoci delle cellule endoteliali e di endotelio maturo. Nella parete arteriosa dei pazienti AOCP non diabetici è stato osservato un sottile strato di cellule e strutture simil-capillari CD34+, al confine tra la media e l'avventizia (Fig.20 A) in accordo con quanto riportato precedentemente (*Pasquinelli G. et al., 2007*). Lo stesso risultato non è stato ritrovato nei pazienti diabetici.

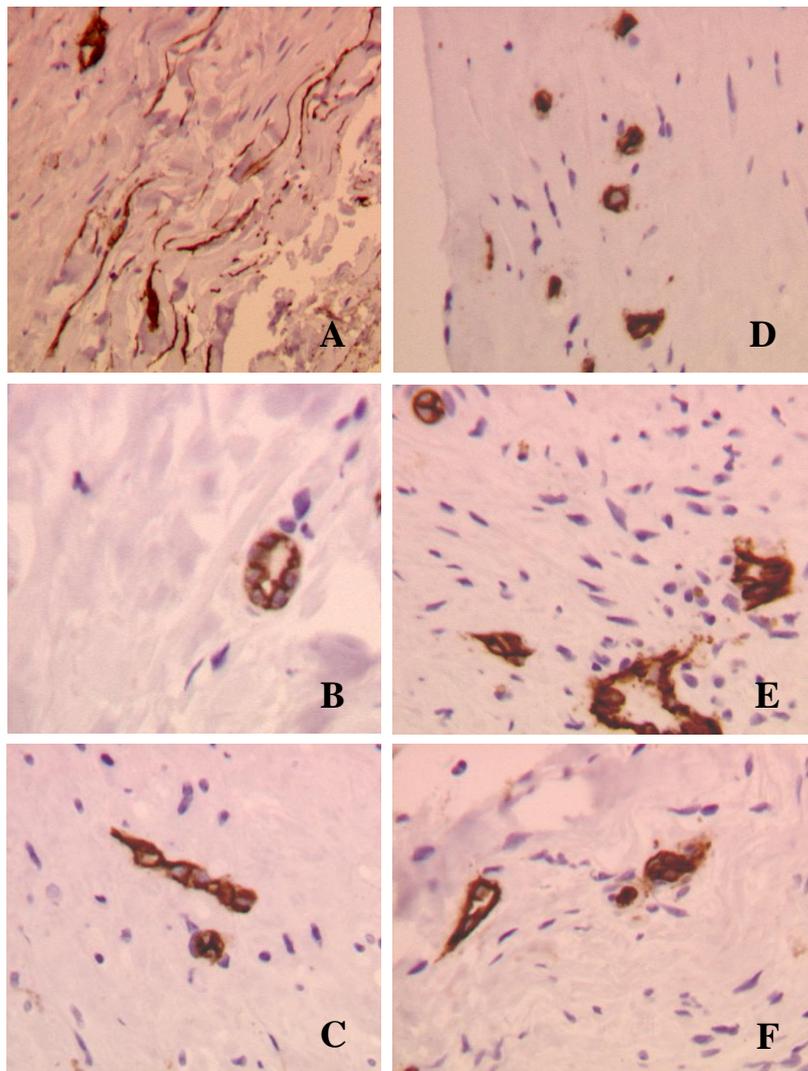


Fig.20: Capillari CD34+ nella parete arteriosa di pazienti AOCP non diabetici (A-C) e diabetici (D-F) LM, 10X (A); 25X (B-F)

Capillari CD34+ sono stati ritrovati nell'avventizia (Fig.20B), al confine medio-avventiziale (Fig.20C) e nella media dei pazienti AOCP non diabetici; capillari CD34+ sono stati osservati, ancora più numerosi, nell' avventizia (Fig.20F), nella media (Fig.20E) ed anche nell'intima (Fig.20D) dei pazienti AOCP diabetici.

Vasi positivi al vWF sono stati osservati nella parete arteriosa dei pazienti AOCP sia diabetici (Fig.21A-B) che non diabetici (Fig.21 C-D).

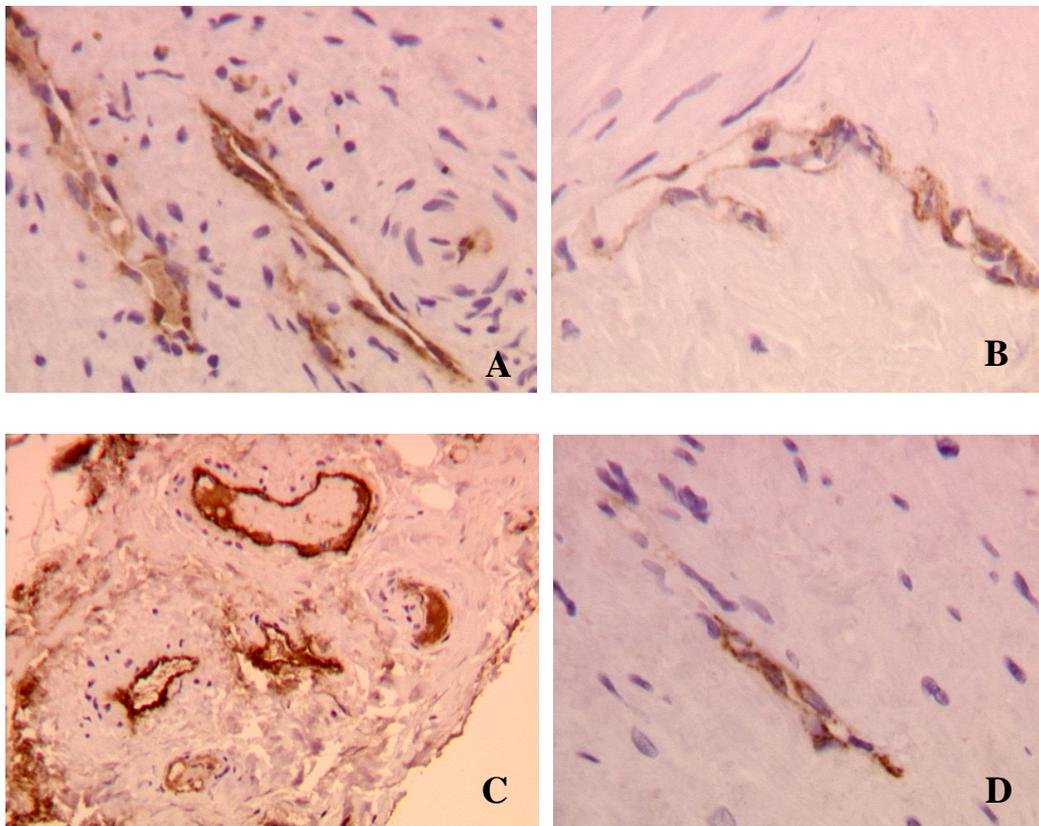


Fig.21 A-D: Vasi vWF+ nella parete arteriosa di pazienti AOCP diabetici (A-B) e non diabetici (C-D) LM, 10X (C); 25X (A,B,D)

In alcune zone è ben evidente la contemporanea negatività al CD34 (Fig.21E-F).

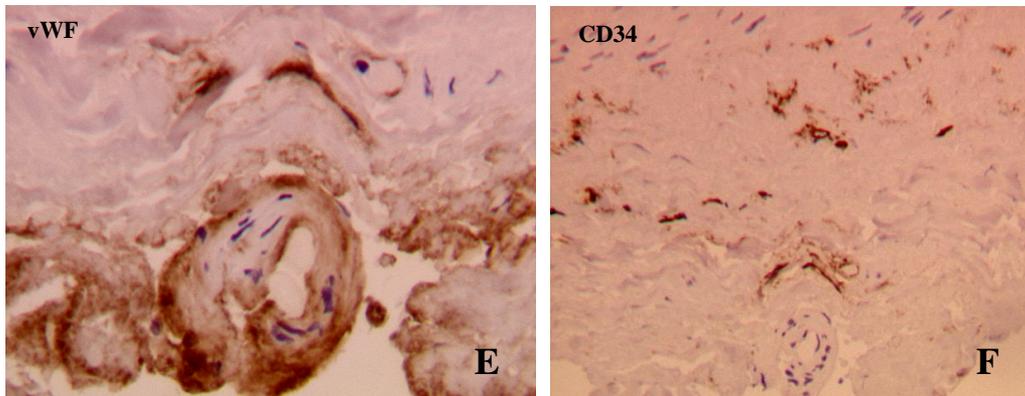


Fig.21 E-F: Vaso vWF+ (E) e CD34- (F)
LM, 10X (E); 25X (F)

6.3 ESPRESSIONE PARIETALE DI VEGF ED MMP-9: ANALISI QUANTITATIVA

L'espressione "in situ" dei trascritti di VEGF ed MMP-9 è stata quantificata, mediante Real Time RT-PCR, in campioni di parete arteriosa di 31 pazienti AOCP, 21 diabetici e 10 non diabetici, e di 3 controlli sani. Dall'analisi dei dati è emerso che tutti i pazienti presentano una maggiore espressione del trascritto per VEGF rispetto ai valori medi di espressione nei controlli.

Elaborando questi dati mediante il Mann-Whitney U test, sono risultate significative (Fig.22) le differenze tra:

- l'espressione di VEGF nei pazienti diabetici rispetto a quella nei controlli sani ($p^* = 0.0146$)
- l'espressione di VEGF in tutti i pazienti AOCP rispetto a quella nei controlli sani ($p^* = 0.0179$)

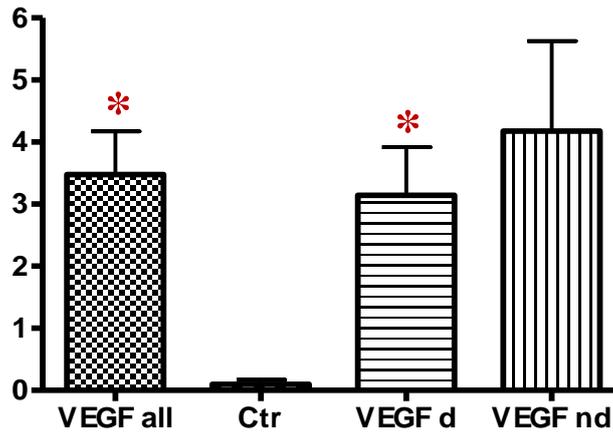


Fig.22: Espressione “in situ” dei trascritti di VEGF nei pazienti AOC

Per quanto riguarda la MMP-9 è emerso, innanzitutto, che i suoi trascritti sono presenti nel 70% dei pazienti (16 su 21 dei diabetici e 6 su 10 dei non diabetici), mentre risultano non espressi nei controlli sani.

Facendo l’elaborazione statistica mediante il Mann-Whitney U test, sono risultate significative (Fig.23) le differenze tra:

- l’espressione della MMP9 nei pazienti diabetici rispetto ai controlli sani ($p^* = 0.0233$)
- l’espressione della MMP9 in tutti i pazienti AOC rispetto ai controlli sani ($p^* = 0.0288$).

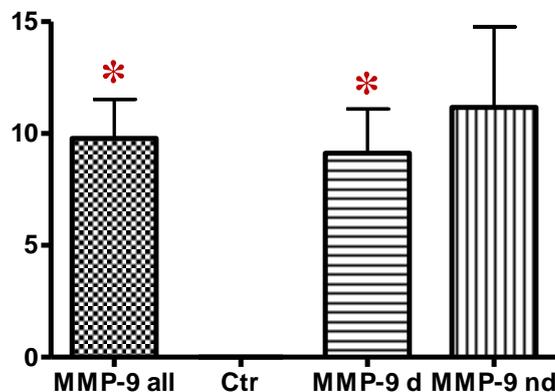


Fig.23: Espressione “in situ” dei trascritti di MMP-9 nei pazienti AOC

6.4 HUMAN VEGF-A ELISA

Il saggio immunoenzimatico è stato condotto su campioni di sangue periferico riferibili a 28 dei nostri pazienti AOCP (17 diabetici e 11 non diabetici) ed a 5 controlli sani. La concentrazione sierica di VEGF di ciascun paziente e' stata ricavata interpolando i valori di densità ottica ottenuti dalla lettura allo spettrofotometro con i valori della nostra curva di calibrazione (Fig.24).

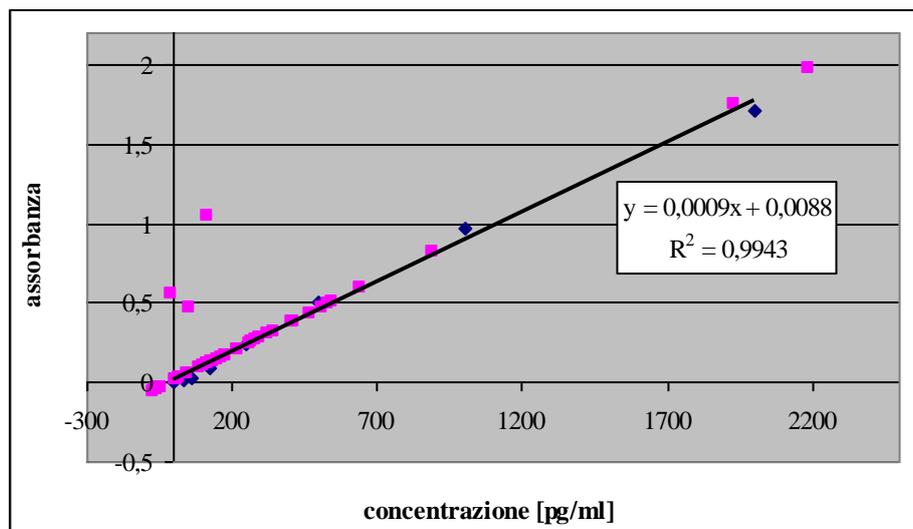


Fig.24: Interpolazione dei dati

In tutti i pazienti AOCP considerati i valori medi di concentrazione di VEGF circolante sono risultati aumentati rispetto ai controlli e questa differenza è risultata statisticamente significativa ($p^* = 0.0431$) al Mann-Whitney U test.

E' inoltre risultata significativa ($p^* = 0.0431$) la differenza di concentrazione di VEGF in circolo tra pazienti non diabetici e controlli sani (Fig.25).

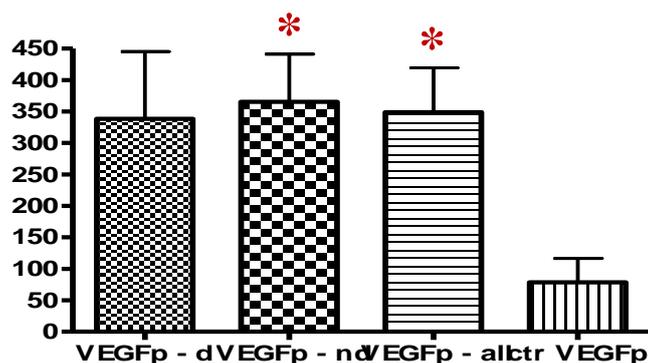


Fig.25: Concentrazione di VEGF circolante nei pazienti AACP

6.5 ANALISI CITOFLUORIMETRICA PER L'INDIVIDUAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI MATURE CIRCOLANTI

Campioni di sangue periferico di 25 pazienti AACP (17 diabetici, 8 non diabetici) e di altrettanti controlli sani, sono stati sottoposti ad analisi citofluorimetrica per valutare se la presenza in circolo di cellule endoteliali mature possa essere messa in relazione con l'arteriopatia periferica e con i fattori di rischio e/o le patologie ad essa correlati (Tab.1).

FATTORI DI RISCHIO	PATOLOGIE
FUMO DI SIGARETTA	INSUFFICIENZA RENALE CRONICA (IRC)
DIABETE MELLITO	CARDIOPATIA ISCHEMICA
IPERTENSIONE (HTN)	INSUFFICIENZA CEREBROVASCOLARE (ICV)
IPERLIPIDEMIA	BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO)
STADIO AACP	
SESSO	
ETA'	

Tab.1: Fattori di rischio e patologie correlati all'AACP

I risultati dell'analisi sono stati espressi come numero di CEC per ml di sangue periferico andando poi a confrontare statisticamente, mediante test del χ^2 , il numero medio di cellule nei pazienti con il numero medio di cellule nei soggetti sani: è emerso che il valore medio di CEC/ml è significativamente più elevato ($p^* = 0.001$) in tutti i soggetti affetti da AOCPC rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda il confronto tra il numero medio di CEC/ml ed i fattori di rischio e/o le patologie associate all'AOCPC (Tab.1), al Mann-Whitney U test è risultata statisticamente significativa ($p^*=0,0032$) soltanto la correlazione tra il numero di cellule circolanti e l'ipertensione.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella maggior parte dei paesi industrializzati si è verificato, negli ultimi decenni, un incremento delle patologie vascolari sia primitive che associate a diversi disordini metabolici. Uno dei disordini endocrini a maggior impatto sociale su cui, a causa della sua prevalenza in continuo aumento, si sta focalizzando l'attenzione degli studiosi di tutto il mondo, è il diabete una patologia cronica potenzialmente debilitante e spesso mortale. Si calcola infatti che nel 2007 il diabete abbia causato 3,8 milioni di morti in tutto il mondo e stime per il futuro prevedono che tra 15-20 anni saranno più di 300 milioni le persone colpite dalla malattia in tutto il mondo. Ciò soprattutto nei Paesi in via di sviluppo, a causa non solo della crescita di popolazione e dell'invecchiamento, ma anche di diete poco idonee, obesità e sedentarietà. Tra le varie forme di diabete riconosciute, l'incidenza maggiore spetta a quella di tipo 2: essa interessa più del 90% dei casi di malattia, una percentuale che è andata progredendo nel corso degli anni per cause legate per lo più agli stili di vita prevalenti. E' una sindrome spesso asintomatica e per questo non sempre tempestivamente diagnosticata o adeguatamente trattata; ciò porta all'insorgenza di complicanze sia a breve che a lungo termine che colpiscono organi vitali come cuore, vasi sanguigni, occhi, reni e nervi periferici. Le complicanze macrovascolari, che si sviluppano lentamente nel corso degli anni, sono responsabili della patogenesi di malattie coronariche e cerebrovascolari e di vasculopatie periferiche, tutte patologie ad elevata morbilità e mortalità. Una di queste è l'arteriopatia ostruttiva cronica periferica (AOCP), patologia estremamente invalidante: essa è infatti caratterizzata dall'instaurarsi di un quadro di ischemia critica, responsabile della comparsa di una

sintomatologia degli arti inferiori che può evolvere fino alla gangrena e successiva amputazione dell'arto stesso. L'arteriopatia periferica è anche predittiva di una vasculopatia generalizzata: le malattie coronariche e delle arterie cerebrali, infatti, seguono strettamente le manifestazioni dell'AACP. Per i pazienti diabetici affetti da AACP ed ischemia critica, si potrebbe pertanto auspicare un potenziamento della vascolarizzazione degli arti ischemici e quindi una significativa riduzione della percentuale di amputazioni. Da qui la necessità per questi pazienti di poter disporre nella pratica clinica di terapie, farmacologiche o cellulari, che favoriscano la formazione di nuovi vasi sanguigni nei territori interessati da ischemia.

I dati raccolti in questo studio consentono di approfondire, in pazienti diabetici con AACP ed ischemia critica, la relazione tra danno della parete arteriosa, endotelio maturo circolante e fattori di crescita o enzimi coinvolti nella neoangiogenesi parietale.

La valutazione istopatologica ha consentito di stabilire che, nella popolazione studiata, la parete vascolare del distretto arterioso periferico è interessata da un danno severo ed esteso anche in sedi arteriograficamente e macroscopicamente indenni o poco compromesse. Le pareti analizzate, infatti, derivano dalle zone utilizzate per confezionare le anastomosi durante l'allestimento del bypass.

L'esteso danno endoteliale che emerge da questa valutazione morfologica, accomuna l'arteriopatia diabetica ad altri disordini vascolari quali le sindromi coronariche acute, le vasculiti, il LES, la sclerosi sistemica, tutte patologie nelle quali peraltro è stata descritta la presenza in circolo di cellule endoteliali mature (CECs), considerate come la stretta evidenza e conseguenza dello stesso danno vascolare.

Abbiamo voluto pertanto specificare il significato delle CECs anche nell'AACP associata a diabete. Lo studio in citofluorimetria sulle cellule endoteliali circolanti ha evidenziato come il numero medio di CEC/ml risulti significativamente elevato nei pazienti con AACP severa, indipendentemente dallo stadio della malattia e dalla presenza o assenza di diabete. Tali dati sembrano confermare che nel corso di un danno vascolare importante ed esteso, come quello presente nella popolazione oggetto dello studio, il numero di cellule endoteliali rimosse dalla parete vascolare aumenti in maniera significativa, costituendo un buon indice per monitorare lo stato lesionale della parete vascolare, qui evidenziato mediante analisi istologica.

A ulteriore sostegno della severa compromissione della parete vascolare, in questo studio abbiamo osservato nella parete del 70% dei nostri pazienti la presenza del trascritto della MMP-9; questo enzima non è comunemente espresso in condizioni di normalità mentre l'espressione del trascritto è stata osservata in placche ateromatiche complicate ed instabili del distretto carotideo e nella patologia aneurismatica dell'aorta addominale; l'espressione del trascritto della MMP-9 enfatizza, in accordo con i dati istopatologici, la severità e la progressione del danno parietale, anche nelle zone di arteria macroscopicamente indenni.

In questi pazienti è probabile che i fenomeni regressivi prevalgano su quelli riparativi, determinando un'inesorabile e progressiva degenerazione della parete verosimilmente aggravata dal fattore diabete.

In condizioni di ingiurie vascolari quali possono essere l'AACP o la cardiopatia coronarica, tutte caratterizzate da ischemia tissutale, un ruolo chiave è giocato dalla neoangiogenesi. In questo processo di

formazione di nuovi vasi sanguigni da un letto vascolare preesistente, le cellule endoteliali della parete del vaso sclerotico vengono attivate: in conseguenza della deficienza o completa assenza di ossigeno queste cellule iniziano a rilasciare diversi fattori di crescita, tra i quali il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Esso è determinante nei processi di neoangiogenesi: il suo legame al recettore VEGFR-2 (o KDR) scatena una cascata di eventi che conduce alla formazione dei nuovi vasi. L' aumentata espressione "in situ" del VEGF trovata nei nostri pazienti potrebbe essere manifestazione di un tentativo delle cellule parietali di promuovere localmente processi di riparazione basati su un meccanismo di angiogenesi, come mostra anche la positività al vWF riscontrata nello spessore della parete arteriosa di tutti i pazienti. Questo meccanismo di compenso potrebbe anche implicare il tentativo di mobilitazione dei progenitori di origine midollare tramite il rilascio di VEGF dalla parete nel circolo sanguigno. Questa ipotesi trova supporto dai dati da noi ottenuti mediante test ELISA che hanno mostrato un significativo incremento sierico di questo fattore di crescita rispetto ai controlli sani.

Tuttavia questo tentativo di riparazione, nel contesto clinico da noi studiato, sembra essere inefficace. Infatti, come osservato in studi precedenti i progenitori endoteliali circolanti (EPCs) nei pazienti con AOCP e diabete sono ridotti numericamente e mostrano alterazioni funzionali importanti. La disfunzione delle EPCs potrebbe essere una delle spiegazioni del ridotto numero di vasi di calibro capillare osservato all'esame istologico nei nostri campioni diabetici rispetto ai non diabetici, nonostante comunque quei vasi siano CD34+.

BIBLIOGRAFIA

Adeghate E., Schattner P., Dunn E., An Update on the Etiology and Epidemiology of Diabetes Mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1084: 1–29 (2006).

American Diabetes Association, Therapy for diabetes mellitus and related disorders. ADA eds, 2004, 241-246.

Andreozzi G.M., Arteriopatie Periferiche: da Leriche-Fontaine all'Ischemia Critica (Fisiopatologia, Clinica, Epidemiologia e Management). Mediserve ed, Milano-Napoli-Firenze 1999.

Andreozzi G.M., Le arteriopatie obliteranti periferiche: management attuale e prospettive future. In: *Mal. Card. Mosby IV*, 2002; pp. 73-92.

Bianchi G.L., Ferrari E., Fior S. et al., Prime applicazioni dell'analisi PCR quantitativa nel controllo degli Organismi Geneticamente Modificati. *Notiziario Ersa* 5, 2002; pp. 55-58.

Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F. et al., Circulating endothelial cells: Biomarker of vascular disease; Review Article. *Thromb Haemost* 2005; 93: 228-35.

Bustin S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* (2000) 25, 169–193.

Carlson R., Zanchetta M., Why cardiovascular rehabilitation services should include patients with intermittent claudication?. *Monaldi Arch Chest Dis* X 2006; 66: 241-246.

Cary N.R.B., Pathology of peripheral arterial disease. In: Tooke J.E., Lowe G.D.O. (Eds). *Textbook of vascular medicine*. London: Arnold, 1996:143-8.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. (2002), Matrix metalloproteinases and cancer: Trials and tribulations. *Science* 295:2387-2392.

Del Papa N., Cortiana M., Maglione W. et al., Raised levels of circulating endothelial cells in systemic sclerosis. *Reumatismo*, 2005; 57(1): 29-35.

Dong Cheng, Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutrition & Metabolism* 2005, 2:29; pp. 1-12.

Fadini G.P., Miorin M., Facco M. et al., Circulating Endothelial Progenitor Cells Are Reduced in Peripheral Vascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol* 45:1449-1457, (2005).

Fadini G.P., Sartore S., Agostini C. et al., Significance of Endothelial Progenitor Cells in Subjects with Diabetes. *Diabetes Care* 30:1305-1313, (2007).

Faglia E., Caravaggi C., Marchetti R. et al., Screening for peripheral arterial disease by means of the anklebrachial index in newly diagnosed Type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 2005; 22: 1310-1314.

Ferrara N., Davis Smyth T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997;18: 4-25.

Goodwin A.M., In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research* 74 (2007) 172–183.

Gordon T., Kannel W.B., Predisposition to atherosclerosis in the head, heart and legs. The Framingham study. *JAMA* 1972;221:661-6.

Gruppo di Studio Internazionale Piede Diabetico, Il piede diabetico, una sfida per operatori e amministratori sanitari. Documento di Consenso internazionale sul Piede Diabetico, 2000; pp.1-4.

Hughson W.G. et al., Intermittent claudication: prevalence and risk factors. *BMJ* 1978;1:1379-1381.

Hunting C.B., Noort W.A., Zwaginga J.J., Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularisation. *Vox sanguinis* 2005; 88:1-9.

Jonason T., Ringqvist I., Factors of prognostic importance for subsequent rest pain in patients with intermittent claudication. *Acta Med Scand* 1985;218:27-33.

Kannel W.B., McGee D.L., Update on a some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham study. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33:13-18.

Kannel W.B., Skinner J.J. Jr, Schwartz M.J. et al., Intermittent Claudication: incidence in the Framingham-Study. *Circulation* 1970; 41:875-883.

Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. et al., Rinnovamento e riparazione tissutale: rigenerazione, guarigione e fibrosi. In: *Le basi patologiche delle malattie, Robbins e Cotran; Elsevier Masson, 7^a edizione, 2006; pp. 87-118.*

Liekens S., De Clercq E., Neyts J., Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 61 (2001) 253-270.

Makin A.J., Blann A.D., Chung N.A.Y. et al., Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. *Eur Heart J* (2004) 25, 371-376.

Pasquinelli G., Lo studio morfologico ed immunocitochimico della parete vascolare. In: *Metodologie di ricerca in chirurgia vascolare, Faggioli G. (ed.) Minerva Medica, Torino, 1996; pp. 7-22.*

Pasquinelli G., Tazzari P.L., Vaselli C. et al., Thoracic Aortas from Multiorgan Donors Are Suitable for Obtaining Resident Angiogenic Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells* 2007;25:1627–1634.

Pozzati A., Abrignani M.G., Patogenesi dell'aterosclerosi nel diabete mellito. *Ital Heart J* 2004; 5 (Suppl 4): 7S-11S.

Regensteiner J.G., Hiatt W.R., Current medical therapies for patients with peripheral arterial disease: a critical review. *Am J Med* 2002; 112:49-57.

Ruckley C.V., Symptomatic and asymptomatic disease. In: Fowkes F.G.R. (Ed). *Epidemiology of peripheral vascular disease*. London: Springer, 1991:97-108.

Rutherford R.B., The vascular consultation. In: Rutherford RB, ed *Vascular Surgery* (ed 4). Philadelphia: Saunders, 1995:1-10.

Schoen F.J., Vasi sanguigni. In: *Le basi patologiche delle malattie*, Robbins e Cotran; Elsevier Masson, 7^a edizione, 2006; pp. 511-554.

Stoffers H.E., Kester A.D. et al., The diagnostic value of sign and symptoms associated with peripheral arterial occlusive disease in general practice. A multivariate approach. *Med Decis Making* 1997; 17: 61-70.

Tepper O.M., Galiano R.D., Capla J.M. et al., Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106:2781-2786, (2002).

Vinik A., Flemmer M., Diabetes and macrovascular disease. *Journal of Diabetes and Its Complications* 16 (2002) 235-245.

Young B., Heath J.W., Il sistema circolatorio. In: *Istologia e Anatomia Microscopica*, testo atlante, Wheather; CEA, terza edizione, 2001; pp. 144-156.