

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE**

Ciclo XXI

Settore Scientifico disciplinare di afferenza: MED22

Settore Concorsuale di afferenza : 06/E1

**DIABETE ED ISCHEMIA CRITICA DEGLI ARTI INFERIORI .
VALUTAZIONE DEGLI INDICATORI SIEROLOGICI
DI DANNO DI PARETE :
DETERMINAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI
CIRCOLANTI MATURE**

Coordinatore Dottorato

Prof . Andrea Stella

Presentata da

Dott.ssa Natascia Muccini

Relatore

Prof. Andrea Stella

| | |
|--|----|
| INTRODUZIONE | 3 |
| Epidemiologia | 3 |
| Arteriopatia ostruttiva cronica periferica nel paziente diabetico | 3 |
| La microangiopatia diabetica | 3 |
| Macroangiopatia diabetica | 4 |
| Neoangiogenesi..... | 6 |
| Marker nelle malattie vascolari (EPCs – EMPs – CECs) | 7 |
| Cellule endoteliali mature circolanti (CECs) | 8 |
| EPC..... | 9 |
| OBIETTIVO DELLA RICERCA | 11 |
| MATERIALI E METODI | 12 |
| Clinica dell’ AOCF | 12 |
| Classificazione di Fontaine | 12 |
| Classificazione delle lesioni trofiche..... | 14 |
| Identificazione delle cellule endoteliali mature circolanti mediante analisi | 15 |
| citofluorimetrica..... | 15 |
| Studio istologico della parete arteriosa | 16 |
| Analisi statistica..... | 16 |
| RISULTATI..... | 17 |
| Caratteristiche demografiche e fattori di rischio..... | 17 |
| Caratteristiche Cliniche dell’ AOCF..... | 18 |
| Tipo di rivascularizzazione | 18 |
| Determinazione in circolo delle cellule endoteliali circolanti mature | 19 |
| Diabetici vs non Diabetici..... | 23 |
| Valutazione istopatologica della parete arteriosa | 24 |
| DISCUSSIONE E CONCLUSIONI..... | 27 |
| BIBLIOGRAFIA | 29 |

INTRODUZIONE

Epidemiologia

Negli ultimi anni, soprattutto nei paesi industrializzati, si è osservato un incremento delle patologie vascolari sia primitive che associate a diversi disordini metabolici. Tra questi uno dei principali è il diabete che, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), interessa circa 177 milioni di persone in tutto il mondo. L'OMS lo riconosce come un'epidemia globale (1). I tassi di diabete registrati sono in aumento da 135 milioni nel 1995 a 217 milioni nel 2005 (2).

Nel 2000, i cinque paesi con il maggior numero di affetti da diabete erano l'India (31,7 milioni), la Cina (20,8 milioni), gli Stati Uniti d'America (17,7 milioni), l'Indonesia (8,4 milioni), e il Giappone (6,8 milioni) (3).

Nel 2010 è stato stimato che nel mondo vi fossero 285 milioni di persone affette da diabete di tipo 2.

L'arteriopatia ostruttiva cronica periferica (AOCP), patologia che colpisce prevalentemente le arterie degli arti inferiori, è una complicanza invalidante del diabete.

Arteriopatia ostruttiva cronica periferica nel paziente diabetico

Le lesioni ostruttive coinvolgono diversi distretti del letto vascolare ed il processo fisiopatologico si estrinseca a differenti livelli: si parla sia di microangiopatia che di macroangiopatia diabetica.

La microangiopatia diabetica

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 *iperglicemia cronica*, che s'instaura come condizione patogenetica nel diabete soprattutto di tipo 2.

Il glucosio che si accumula in circolo a concentrazioni elevate si lega ai gruppi amminici del DNA cellulare nonché dei proteoglicani e delle proteine della matrice extracellulare, collagene ed elastina, e delle LDL plasmatiche .

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 vasodilatatrici (ossido nitrico) e la compromissione dell'equilibrio tra fibrinolisi endogena e fattori procoagulanti a favore di uno spiccato stato trombofilico (4).

Macroangiopatia diabetica

La macroangiopatia diabetica presenta come lesione caratteristica la formazione di una *placca aterosclerotica* nella parete preferenzialmente delle arterie gli arti inferiori.

In conseguenza all'alterazione del flusso sanguigno nei distretti colpiti, come manifestazioni cliniche si sviluppano non solo le arteriopatie periferiche ma anche la cardiopatia ischemica, le malattie cerebrovascolari con una più alta incidenza (circa l'80%) di mortalità (5-6) rispetto alla popolazione non diabetica.

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 ateromastica 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 . L'esteso danno endoteliale che ne risulta, accomuna l'arteriopatia diabetica ad altri disordini vascolari quali le sindromi coronariche acute, le vasculiti, il lupus eritematoso sistemico (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.

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 endoteliali circolanti.

In condizioni di danno vascolare quali possono essere proprio l'AOCPC o la cardiopatia coronarica, tutte caratterizzate da ischemia tissutale, un ruolo chiave è giocato dalla neoangiogenesi.

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 (7).

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 (hhoommiinngg) 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 (8).

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 (MPs), 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 periendotheliali di supporto quali i periciti per i piccoli capillari, e cellule muscolari lisce per i vasi più grandi (7-8).

Marker nelle malattie vascolari (EPCs – EMPs – CECs)

Nelle arteriopatie croniche periferiche, per valutare il danno vasale e monitorare gli interventi terapeutici, è utile identificare dei marker sierologici rappresentativi del turnover delle cellule endoteliali. I marker attualmente noti in letteratura sono le “endothelial progenitor cells” (EPCs), le “endothelial derived microparticles” (EMPs) e le “circulating endothelial cells” (CECs).

Le EPC sono un sottotipo di progenitori derivati dal midollo osseo che esprimono sulla superficie antigeni sia emopoietici sia staminali e sia endoteliali.

Sono coinvolte nella vasculogenesi negli adulti e nel mantenimento dell'integrità vascolare. Risultano alterate in condizioni patologiche caratterizzate da rischi cardiovascolari che includono il diabete di tipo I e II. Infatti il loro numero risulta diminuito in soggetti con AOCF associata a

diabete. Il numero di queste cellule è risultato alterato anche in pazienti con malattia coronarica. Queste osservazioni suggeriscono che le EPCs possono costituire un valido marker cardiovascolare.

Le EMPs sono microparticelle che derivano dalla frammentazione della membrana plasmatica delle cellule endoteliali presenti a livello vascolare e la loro formazione dipende da fenomeni di attivazione, danno cellulare e apoptosi. La formazione di EMPs è stata dimostrata in vitro con l'attivazione di cellule endoteliali (EC) mediata da citochine come Tumor Necrosis Factor-alfa e interleuchina (IL) come l'IL1. EMPs potrebbe funzionare come mediatore di citochine e fattori di adesione e promuovere il "signaling" cellulare e l'attivazione della neoangiogenesi. EMPs possiede inoltre un'attività procoagulante. EMPs quindi viene considerato un mediatore di danno vascolare e infiammazione, nonché marker di disfunzione endoteliale.

Le CECs riscontrate nel sangue dei pazienti vasculopatici rappresentano un marker di disfunzione vascolare severa, infatti il loro distacco dalla parete vasale è proporzionale alla gravità del danno (23 -25).

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 (9).

Esse originano probabilmente dallo slaminamento della parete vasale, conseguente a:

- danno meccanico
- fattori di rischio per l' aterosclerosi
- alterazione delle molecole di adesione endoteliale
- difetto di ancoraggio delle proteine della matrice
- apoptosi cellulare con diminuzione della sopravvivenza delle proteine del citoscheletro.

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 (10).

Le CECs sono di particolare importanza per la rigenerazione dell'endotelio vascolare. Questa può avvenire grazie alla migrazione e alla proliferazione delle CECs, anche se, a questo stadio, sono già

differenziate in modo terminale e il loro potenziale proliferativo è basso come la loro capacità di sostituire l'endotelio danneggiato.

Il valore normale del numero di CECs è di 188 ± 122 cell/ml.

Come già riportato l'aumento del numero delle CECs corrisponde ad un danno vascolare quasi sempre correlato ad una patologia vascolare o cardiovascolare. Inoltre il valore può essere correlato alla gravità della malattia.

Un aumento delle CECs si è riscontrato anche in pazienti con ictus e in pazienti con ipertensione. Analoga condizione si rileva nei pazienti diabetici. Il dosaggio immunologico delle CEC e delle EPCs nel sangue rappresenta un nuovo modo per definire il danno endoteliale e monitorare gli effetti positivi della terapia.

Le CECs identificano il danno vascolare, mentre le EPCs rappresentano un indice di riparazione endoteliale e di neovascolarizzazione.

La perdita di adeguate funzioni vascolari e danno endoteliale sono importanti nella patogenesi di aterosclerosi e arteriopatia periferica.

Questa è associata con morbilità e mortalità specialmente quando le condizioni progrediscono all'ischemia critica che è caratterizzata da gangrena.

L'interruzione dell'endotelio e l'esposizione della superficie trombogena ai costituenti del sangue può in parte spiegare l'andamento protrombotico e l'ipercoagulabilità.

Questo incremento nei pazienti con arteriopatia periferica ostruttiva comparato a pazienti con malattia arteriosa stabile mostra livelli aumentati nei primi e una certa stabilità in quelli con malattia non progressiva (21).

EPC

Il riparo dell'endotelio danneggiato ha bisogno del supporto di un altro tipo di cellule.

Gli studi hanno messo in evidenza che nel sangue periferico degli adulti c'è un unico tipo di cellule circolanti, che derivano dal midollo osseo con proprietà simili a quelle degli angioblasti embrionali, queste cellule hanno la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature.

Sono quindi definite precursori endoteliali circolanti (EPC). Alcune ricerche suggeriscono l'abilità delle EPC di migliorare la funzione degli organi ischemici grazie all'induzione e modulazione della vasculogenesi e angiogenesi in aree a ridotto apporto di ossigeno o della stimolazione della ricostruzione endoteliale delle lesioni vascolari.

Altre ricerche hanno mostrato che sono tre i marker che caratterizzano le funzioni delle EPC precoci: CD133, CD34 e VEGFR-2.

Il CD133, chiamato in origine AC133, è un marker precoce delle cellule staminali del sangue ed è un polipeptide transmembrana di 120 KDa espresso nelle cellule staminali e nei progenitori del midollo osseo umano, fegato fetale e sangue periferico.

Le cellule con queste caratteristiche sono localizzate principalmente nel midollo osseo. Le cellule EPC mature che si possono trovare in circolo hanno perso il CD133, ma sono ancora positive al CD34 e VEGFR-2.

Le CEC mature mostrano una alta espressione di VEGFR-2, VE caderina e fattore di Von Willebrand (vWf). Sembra comunque che la perdita del CD133 rifletta la trasformazione delle EPC circolanti in cellule endoteliali mature, anche se non è ancora chiaro in che momento avvenga la perdita, se durante la tras migrazione dal midollo alla circolazione sistemica o durante quest'ultima.

Inoltre le EPC circolanti esprimono con diversa intensità una varietà di marker che sono tipici della linea endoteliale.

Questi includono il CD31 molecola di adesione delle piastrine, CD146, VE caderina, fattore di Von Willebrand, NO sintetasi e sotto stimolazione e-selectin.

Dati recenti mostrano che il sangue periferico umano contiene cellule staminali pluripotenti di derivazione dal midollo osseo.

Il rilascio delle EPC dal midollo osseo è regolato da una varietà di fattori di crescita, enzimi e recettori (26).

Il primo passo di questo processo è l'attivazione della metalloproteinasi-9 che promuove la trasformazione del ligando di membrana in un ligando solubile permettendo il movimento delle cellule staminali progenitrici al microambiente midollare.

I segnali che promuovono l'allontanamento degli emangioblasti dagli altri precursori ematopoietici è ancora sconosciuto ma includono probabilmente fattori di crescita angiogenetici provenienti dalla periferia. (22)

Ad esempio un danno della parete vascolare, un' ischemia o un bypass chirurgico fanno crescere rapidamente il numero delle EPC circolanti.

Questi eventi sono anche associati ad un aumento della produzione di VEGF endogeno, che stimola il rilascio delle EPC dal midollo osseo.

Il numero di EPC nei soggetti sani è generalmente basso e diminuisce ulteriormente nei pazienti con malattie cardiovascolari.

Le EPC di pazienti con diabete mellito di tipo II sono caratterizzate da una diminuita capacità di proliferazione e da una riduzione della capacità di formare capillari in vitro.

La diminuzione delle EPC in queste condizioni patologiche è da imputare a tre concause:

1-diminuita mobilizzazione dal midollo osseo

2-incremento del consumo di EPC nelle zone di danno

3-riduzione della vita delle EPC circolanti.

Al contrario si è osservato un aumento delle EPC circolanti in pazienti con ischemia e danno al miocardio.

Le EPC potrebbero essere utilizzate per la riparazione delle lesioni endoteliali sia a carico dei vasi arteriosi che del miocardio.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Obiettivo della ricerca è di valutare

- il numero delle cellule endoteliali circolanti mature nei pazienti affetti da ischemia critica degli arti inferiori diabetici e non diabetici.
- se le CECs possano essere utilizzate, considerando il numero delle CECs che si distaccano dalle parete vasale, come identificatore di danno di parete e di marker di disfunzione vascolare severa.
- se esistano variazioni nel numero delle cellule endoteliali circolanti mature, in relazione al danno endoteliale vasale e ai differenti fattori di rischio.
- 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.

MATERIALI E METODI

Da Maggio 2006 – Aprile 2008, presso l' UO. di Chirurgia Vascolare del S.Orsola – Malpighi diretta dal Prof. Andrea Stella, in modo prospettico si sono reclutati pazienti affetti da AOCP e sottoposti a rivascolarizzazione chirurgica convenzionale.

In modo prospettico è stato creato un database contenente i dati anagrafici, fattori di rischio, le caratteristiche cliniche storia dell' arteriopatia ostruttiva periferica (classificazione di Leriche - Fontaine), il tipo di lesione trofica descritta secondo la classificazione della Texas University Wound Classification (TUWC), valutazione emodinamica e topografica dell' AOCP dopo valutazione ecografica, il tipo di intervento chirurgico.

Clinica dell' AOCP

Esistono corollari sintomatologici molto diversi , a seconda che le lesioni siano focali o più estese.

Troveremo pazienti affetti da claudicatio intermittens fino a pazienti con presenza di vere e proprie lesioni trofiche poiché effetti di una patologia plurisegmentaria (Tipo III).

La classificazione più utilizzata è quella di Fontaine integrata, sulla base delle più recenti acquisizioni in tema di fisiopatologia, epidemiologia, clinica e possibilità terapeutiche, dalla classificazione di Rutherford .

La classificazione di Rutherford è adoperata dai Paesi anglosassoni, mentre i restanti Paesi europei si avvalgono di quella di Fontaine. Le varie classi sono così suddivise nella classificazione di Fontaine.

Classificazione di Fontaine

• **Stadio 1:** arteriopatia silente.

È la fase asintomatica; va sospettata in tutti i soggetti di età > 70 anni, in tutti i diabetici di età > 50 anni, in caso di riscontro occasionale di calcificazioni o placche aterosclerotiche in sede aorto-iliaca, nei soggetti con indice di massa corporea > 25 kg/m² (rapporto circonferenza vita/circonferenza fianchi > 1 negli uomini e > 0.9 nelle donne).

Fisiopatologia. In questa fase la fisiopatologia predominante è quella generale dell'aterosclerosi, con il rischio aterotrombotico legato all'attivazione infiammatoria della placca.

Epidemiologia. La prevalenza varia, a seconda degli studi e degli strumenti utilizzati, tra il 12 e il 20%. Nella popolazione tra 50 e 60 anni varia tra il 3 e il 5% e supera il 20% in quella ultrasettantacinquenne .

L'incidenza annuale è di circa lo 0.6% nei pazienti di età compresa tra 45-54 anni, il 2.5% in quelli tra 55-64 anni, arrivando all'8.8% negli uomini tra 65-74 anni , .

Prognosi. Rischio di evoluzione verso stadi più avanzati 25% in 2-5 anni; rischio di eventi cardiovascolari non fatali 5% in 5 anni; mortalità cardiovascolare 30% in 5 anni .

• **Stadio 2:** claudicatio. La claudicazione è il sintomo principale dell'AOCF, caratterizzata da dolore ad un arto inferiore (polpaccio, coscia, natica) che insorge durante il cammino e scompare rapidamente alla cessazione dell'esercizio muscolare. Questo stadio si divide in due parti:

- stadio 2A: prevede l'insorgenza del dolore quando il soggetto cammina per più di 200 m o sale più di due piani di scale.

Fisiopatologia. Discrepanza tra apporto ematico di ossigeno e richiesta del muscolo in attività.

Epidemiologia e prognosi. Sono sovrapponibili a quelle indicate per l'arteriopatia silente.

- stadio 2B: la diagnosi va posta quando il dolore insorge camminando per meno di 200 m o salendo meno di due piani di scale.

Fisiopatologia. Elevata discrepanza tra apporto ematico di ossigeno e richiesta del muscolo in attività.

Epidemiologia. Analoga a quella dell'arteriopatia silente e dello stadio 2A.

Prognosi. Rischio di peggioramento verso stadi più avanzati 25% in 5 anni, 6-10% in 12-18 mesi. Rischio di eventi cardiovascolari fatali e non fatali sovrapponibile a quelli dell'arteriopatia silente e dello stadio 2A.

• **Ischemia cronica critica degli arti inferiori.**

Con questa definizione sin dal 1989 vengono raggruppati tutti gli stadi di AOCF ad elevato rischio di amputazione e di morte, per richiamare l'attenzione dei sanitari sulla necessità di pronti ed aggressivi provvedimenti terapeutici.

La diagnosi va articolata come segue:

- Stadio 3: dolore ischemico a riposo che richiede un trattamento analgesico;
- Stadio 4: dolore a riposo associato a lesioni cutanee ischemiche

Fisiopatologia. Severa ipossia cutanea, elevata acidosi ed infezione.

Epidemiologia. Incidenza di 450 nuovi casi per milione di abitanti.

Prognosi. Rischio di amputazione 50% nei pazienti non rivascolarizzati, 26% nei rivascolarizzati. Rischio di morte 50% nei pazienti non rivascolarizzati, 18% nei rivascolarizzati. Un terzo degli amputati raggiunge una completa autosufficienza, un terzo raggiunge un'autosufficienza parziale, un terzo muore entro 1 anno (11-20).

Classificazione delle lesioni trofiche

Le lesioni trofiche evolvono prevalentemente in gangrena e, una volta instauratasi quest'ultima, non vi è alternativa alla terapia demolitiva, in quanto i tessuti in gangrena sono irrecuperabili. Questi, anzi, se rimangono in sede, costituiscono un pabulum per le infezioni batteriche: mancando l'apporto vascolare e con esso il trasporto dei fattori immunitari, il processo di necrosi si estende in senso prossimale e se è presente un'infezione, il paziente è esposto a rischio di sepsi.

La Texas University Wound Classification System (*tab.1*) è un utile strumento per classificare le lesioni ischemiche, considerando la profondità ed estensione della lesione trofica e la contemporanea presenza di infezione, di ischemia o di entrambi, quali fattori aggravanti la condizione ulcerativa.

| | O | I | II | III |
|----------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| A | Lesioni pre- o post- ulcerative | Ulcera superficiale | Ulcera profonda | Ulcera profonda fino all'articolazione o all'osso |
| B | + infezione | + infezione | + infezione | + infezione |
| C | + ischemia | + ischemia | + ischemia | + ischemia |
| D | + infezione ed ischemia | + infezione ed ischemia | + infezione ed ischemia | + infezione ed ischemia |

Tab.1: Classificazione Texas University Wound Classification (TUWC) delle lesioni ulcerative.

L'utilizzo di questa suddivisione viene preferito al metodo di catalogazione proposto dalla Classificazione di Wagner, che non tiene conto della presenza o meno di infezione nella sede della lesione.

Lo studio ha previsto :

- Quantificare il numero delle CECs separate con una metodica quantitativa immunomagnetica. La raccolta di campioni di sangue effettuata prima dell'intervento chirurgico, avendo cura di scartare i primi 2 ml di sangue che potrebbero essere contaminati da cellule endoteliali derivate dal contatto dell'ago con la cute. Il campione è stato raccolto in provette con anticoagulante EDTA. Le provette devono essere tenute a temperatura ambiente tra i 18 e i 25 °C prima del test. Questo test è standardizzato su sangue con EDTA ed è importante che l'analisi venga effettuata entro la prima ora dalla raccolta. Per tale dosaggio è stato utilizzato un kit standardizzato per la conta delle cellule positive al CD146, antigene espresso dalle cellule endoteliali mature.
- prelievo di parete arteriosa, comprendente tutte le tonache vasali, in sede di anastomosi prossimale o distale del bypass in corso di intervento chirurgico per valutare le differenze quantitative di endotelizzazione .

Identificazione delle cellule endoteliali mature circolanti mediante analisi citofluorimetrica

Lo studio delle CECs per individuarne il numero, è stato effettuato dal equipo del Prof. Pasquinelli e Dott.ssa Catia Orrico

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 affetti da 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. 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-.

Studio istologico della parete arteriosa

Dopo rimozione chirurgica, lo studio della componente istologica è stato effettuato presso l'Anatomia Patologica dell' Università di Bologna, dai Prof. Pasquinelli e Dott.ssa Catia Orrico.

Ogni singolo campione di parete arteriosa ($6 \times 3 \text{mm}^2$) 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.

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 di Mann – Whitney

I risultati dell'analisi citofluorimetrica sono stati espressi come il numero di CECs 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-quadro (χ^2).

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

RISULTATI

Da Maggio 2006 – Aprile 2008, presso l' UO. Chirurgia Vascolare diretta dal Prof. Andrea Stella, sono stati reclutati 33 pazienti, 25 maschi (75.8%), affetti da ischemia critica degli arti inferiori e sottoposti a rivascolarizzazione chirurgica.

Caratteristiche demografiche e fattori di rischio

La tabella successiva (tab. 2) mette in evidenza le caratteristiche demografiche e i fattori di rischio con le relative incidenze.

L' età media è stata di 71 aa (range 34-91), la maggior parte della popolazione era affetta da cardiopatia ischemica cronica (60.6%), da ipertensione arteriosa (72.7%), da diabete mellito di II tipo (66.6%).

| | N | (%) |
|--------------|------------|------|
| Tot | 33 | |
| Maschi | 25 | 78.8 |
| Età media | 71 (31-91) | |
| CAD | 20 | 60.6 |
| HTN | 24 | 72.7 |
| Diabete | 22 | 66.6 |
| - I tipo | 1 | |
| - II tipo | 21 | |
| Dislipidemia | 16 | 33.3 |
| BPCO | 9 | 27.2 |
| ICV | 10 | 30.3 |
| IRC | 10 | 30.3 |

Tab. 2 : Caratteristiche demografiche e fattori di rischio

(CAD) :cardiopatia ischemica

(HTN): ipertensione essenziale

(BPCO) :bronco-pneumo-patia-ostruttiva-cronica

(ICV): insufficienza cerebro-vascolare

(IRC) : insufficienza renale cronica

Caratteristiche Cliniche dell' AOC

Tutti i pazienti erano affetti da ischemia critica degli arti inferiori, 28 pazienti (84.8%) presentavano un arteriopatia ostruttiva cronica periferica (AOC) al IV stadio di Leriche-Fontaine caratterizzata da lesioni trofiche, 5 pazienti (15.2%) erano affetti da AOC III stadio.

Le lesioni trofiche che caratterizzano una AOC IV Stadio, sono state classificate secondo la Texas University Wound Classification (TUWC).

Tale classificazione prende in considerazione la presenza o meno di infezione e la profondità di tale lesione, dai tessuti più superficiali come cute e sottocute a quelli più profondi, fino al coinvolgimento delle strutture osse.

I 28 pazienti affetti da AOC IV stadio presentavano differenti tipologie di lesioni (TUWC) come evidenziato successivamente :

- lesione TUWC I C : 3 pazienti (10.7%)
- lesione TUWC II C : 2 pazienti (7.2%)
- lesione TUWC III C: 6 pazienti (21,4%)
- lesione TUWC II D : 1 paziente (3.5%)
- lesioni TUWC IID : 16 pazienti (57.2%)

La maggior parte delle AOC IV stadio erano caratterizzate da lesioni trofiche infette (D) coinvolgenti i piani ossei (III) quindi dalla stadio più severo dell AOC.

Tipo di rivascolarizzazione

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a studio Eco-Color-Doppler pre-operatorio, sulla base del quale si è successivamente pianificato il tipo di trattamento chirurgico.

Terminato l'iter diagnostico tutti i pazienti sono stati sottoposti a rivascolarizzazione dell'arto inferiore mediante trattamento chirurgico o mediante trattamento ibrido che prevede l' utilizzo della metodica chirurgica convenzionale ed trattamento endovascolare, come mostrato nella sottostante tabella (tab 3.)

| Tipo di Rivascularizzazione | N | % |
|--------------------------------------|-----------|-------------|
| Chirurgica | 29 | 87.7 |
| By-pass aorto-femorale | 1 | |
| By-pass iliaco femorale | 1 | |
| By-pass femoro popliteo | 18 | |
| By-pass femoro-tibiale | 5 | |
| By-pass femoro-arterie del piede | 4 | |
| Ibrido | 4 | 12.3 |
| PTA iliaca + By-pass femoro-popliteo | 2 | |
| PTA iliaca + By-pass femoro-tibiale | 2 | |

Tab.3: Tipologia di rivascularizzazione

NB: in un paziente sono stati effettuati nella stessa seduta bypass iliaco-femorale e femoro popliteo

Determinazione in circolo delle cellule endoteliali circolanti mature

Prima della rivascularizzazione, in sala operatoria, si è effettuato un prelievo di circa 40 cc di sangue venoso finalizzato alla determinazione delle cellule endoteliali circolanti mature.

La valutazione delle CECs è stata effettuata nei sieri dei pazienti affetti da ischemia critica e in pazienti donatori in modo randomizzato utilizzati come controllo.

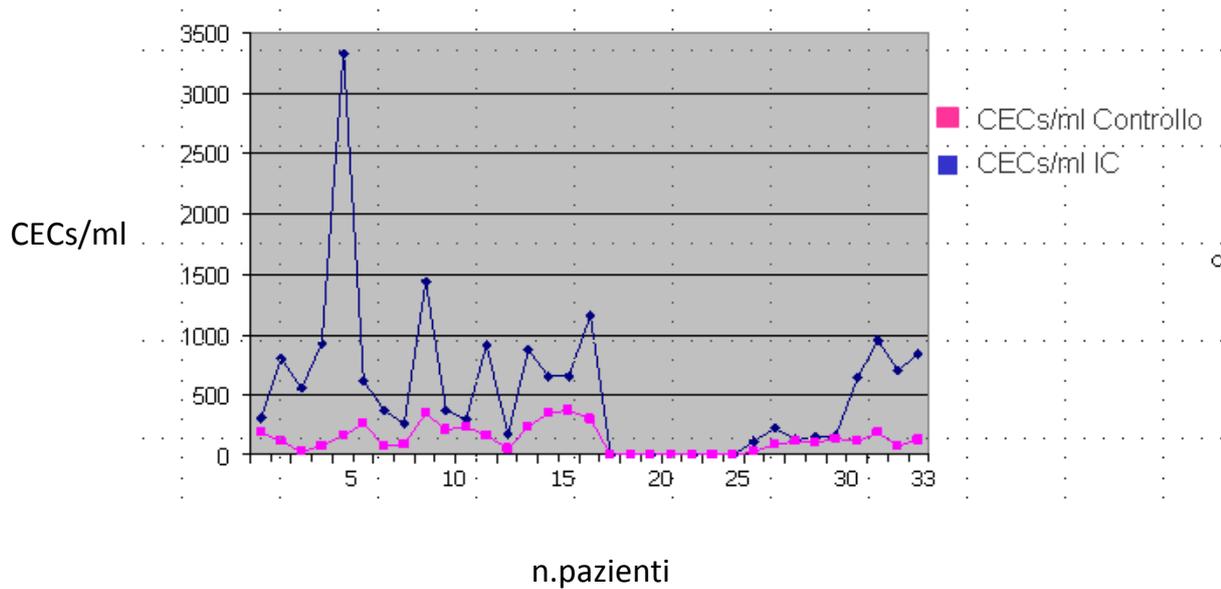
In 7 pazienti non è stato possibile dosare le cellule endoteliali circolanti per indisponibilità del kit.

In tutti i prelievi le CECs dei pazienti affetti da ischemia critica sono state superiori rispetto ai pazienti sani (tabella 4).

| N. | PAZIENTE | CEC/ml | CEC /ml controllo |
|-----------|-----------------|---------------|------------------------------|
| 1 | O. P. | 305 | 190 |
| 2 | D. L. | 800 | 110 |
| 3 | S. M. | 548 | 19 |
| 4 | P. L. | 919 | 76 |
| 5 | M. M. | 3330 | 161 |
| 6 | I. R. | 611 | 260 |
| 7 | M. A. | 369 | 73 |
| 8 | M. S. | 258 | 88 |
| 9 | M. M. | 1437 | 346 |
| 10 | R. M. | 366 | 208 |
| 11 | S. A. | 289 | 238 |
| 12 | B. D. | 914 | 158 |
| 13 | S. R. | 178 | 43 |
| 14 | B. E. | 870 | 329 |
| 15 | M. G. | 647 | 350 |
| 16 | G. G. | 651 | 369 |
| 17 | B. A. | 1155 | 300 |
| 18 | M. A. | / | / |
| 19 | M. M. | / | / |
| 20 | C. R. | / | / |
| 21 | R. G. | / | / |
| 22 | B. O. | / | / |
| 23 | B. T. | / | / |
| 24 | B. L. | / | / |
| 25 | P. F. | 107 | 20 |
| 26 | S.G. | 221 | 82 |
| 27 | F. A. | 125 | 109 |
| 28 | V. G. | 153 | 97 |
| 29 | V. A. | 158 | 140 |
| 30 | MA | 254 | 75 |
| 31 | T.S | 222 | 75 |
| 32 | G.S | 571 | 96 |
| 33 | M.E | / | / |

Tab. (4) CECs totali determinate nei 33 pazienti affetti da AOCP.

Nel grafico sottostante sono riportati i valori di CECs (CECs /ml) circolanti nei casi controllo e nei pazienti affetti da AOCP. Mediante test del χ^2 è emerso che il valore medio di CEC/ml è significativamente più elevato ($p= 0.001$) nei soggetti affetti da AOCP rispetto ai casi controllo (Tab. 5)



| | IC | Controlli | <i>P</i> |
|------------------------|------------------------|-----------------------|----------|
| CECs/ml (media) | 531.24(range 3330-107) | 125.8 (range 19-346) | < 0.05 |

Tab. 5 : CECs nel pazienti con IC vs CECs dei casi controllo.

Per quanto riguarda il confronto tra il numero medio di CEC/ml e comorbidità all'AOCP, al Mann-Whitney U test è risultata statisticamente significativa soltanto la correlazione tra il numero di cellule circolanti l'ipertensione (p=0.0032) e il diabete (p= 0.001)

| Comorbidità | P |
|-------------------------------|----------|
| Età | n.s |
| Sesso | n.s |
| Cardiopatìa ischemica cronica | n.s |
| Iipertensione arteriosa | < 0.001 |
| Dislipidemia | n.s |
| Diabete mellito | < 0.001 |
| BPCO | n.s |
| IRC | n.s |
| ICV | n.s |
| Stadio AOCP | n.s |
| Tuci | n.s |
| Tuce | n.s |

Tab.6 : Correlazione tra CECs , età , sesso, fattori di rischio, lesione trofica e topografia AOCP *Test parametrico di Mann- Whitney*

TucI (lesione trofica infetta = TUC D)

Tuc E (lesione trofica estesa ai piani ossei = TUC III)

Diabetici vs non Diabetici

Abbiamo suddiviso la popolazione in due gruppi, i diabetici e i non diabetici e sono emersi i dati riportati in tabella successiva (tab. 4).

Dal punto di vista statistico, non sono emersi dati statisticamente significativi eccetto la quantità di CECs, i pazienti diabetici hanno in circolo più CECs rispetto ai non diabetici (665.5 mm vs 456.2 mm – $p < 0.05$).

| | DIABETICI N: 22 (66.6%) | NON DIABETICI N: 11 (27,5%) | P |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|
| Maschi | 15 pz (68.1%) | 10 pz (90.9%) | n.s |
| Età media (range 39-91) | 68.2(range 34-28) | 78.4 (range 91-68) | n.s |
| Ipertensione | 15 pz (68.1%) | 9 pz (81.1%) | n.s |
| Cardiopatìa Ischemica | 14 pz (63.6%) | 6 pz (54.5%) | n.s |
| Dislipidemia | 11 pz (50 %) | 5 pz (45,4%) | n.s |
| IRC | 4 pz (18.1%) | 6 pz (54.5%) | n.s |
| Fumatori | 7 pz (33,3%) | 2 pz (25%) | n.s |
| BPCO | 6 pz (27.2%) | 3 pz (27.2%) | n.s |
| ICV | 7 pz (31.8%) | 3 pz (27.2%) | n.s |
| STADIO AOCP | | | n.s |
| III | 2 pz (9.1%) | 3 pz (27.2%) | n.s |
| IV | 20pz (90.9%) | 8 pz (72.8%) | n.s |
| Cl. TUWC | | | n.s |
| III D | 11 pz (55%) | 5 pz (62,5%) | n.s |
| II D | 1 pz (5%) | | n.s |
| III C | 5 pz (25%) | 1 (12,5%) | n.s |
| II C | 2 pz (10%) | | n.s |
| I C | 1 pz (5%) | 2 pz (25%) | n.s |
| CEC/ ml media | 325,5/ml (range 291-914) | 726,7/ml (range 107 – 3330) | < 0.05 |

Tab. 7: Fattori di rischio, stadio AOCP, cl.TUWC, CEC/ ml media

Valutazione istopatologica della parete arteriosa

Durante la rivascularizzazione è stato effettuato un prelievo di parete coinvolgente tutte le tonache arteriose (1x1 cm) ; in tutti casi, eccetto uno, il prelievo è stato effettuato in sede femorale.

In un unico caso si è eseguito un prelievo in sede poplitea in quanto l'arteria femorale superficiale, sede di anastomosi prossimale del bypass era interessata da un processo ateromasico tale da doversi rendere necessaria una endoarterectomia (EA) della stessa quindi da non poter permettere il prelievo di parete.

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 rappresentata. (Fig.1);

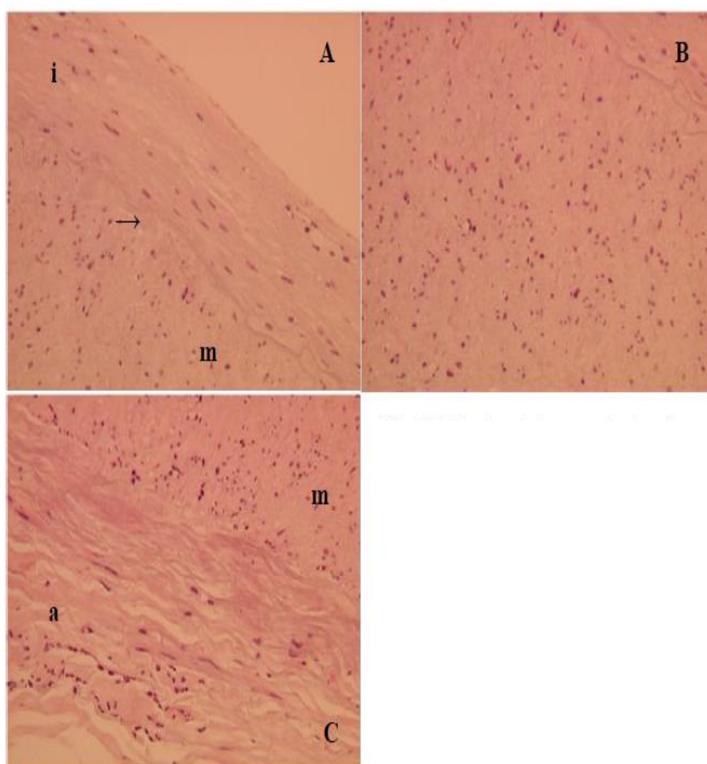


Figura 1: Parete arteriosa con struttura ben preservata in cui si riconoscono perfettamente tonaca intima (i), tonaca media (m), tonaca avventizia (a), lamina elastica interna (→), lamina elastica esterna (*) (LM, 10X)

- campioni di parete arteriosa interessati da lesioni complesse (ispessimento fibroso dell' intima , calcificazioni e/o infiltrati infiammatori e/o aree emorragiche. (Fig 2)

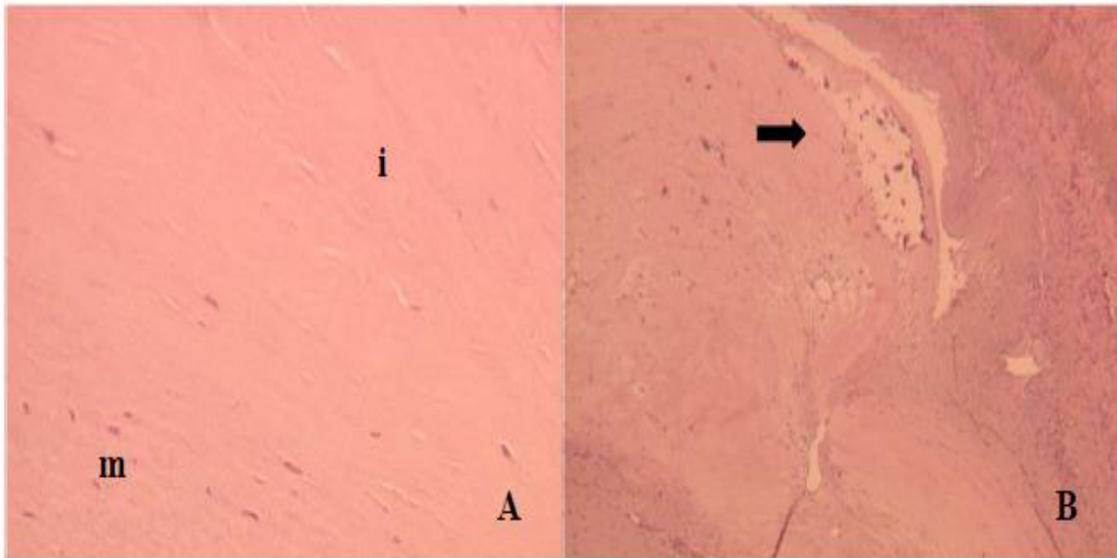


Fig. 2 : Parete arteriosa severamente danneggiata interessata da lesioni complesse (LM, 25X). **A)** Ispessimento fibroso dell'intima associato a depauperamento cellulare della tonaca media; **B)** Calcificazione ().

La parete arteriosa da pazienti diabetici, confrontata con quella dei soggetti non diabetici, ha rivelato una più alta incidenza (66% vs 47%) di lesioni complesse, pur mostrando una minore tendenza a dare calcificazioni (55% 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 diabetici vs non diabetici è caratterizzata da una più bassa densità di vasi capillari (65% vs 87%) quindi una minor capacità neo-angiogenetica.

| | Diabetici | Non diabetici | p |
|-----------------------|-----------|---------------|-----|
| Lesioni Complesse (%) | 60 | 45 | n.s |
| Densità capillare (%) | 65 | 87 | n.s |

Tab 8. Valutazione istopatologica nel Diabetici vs non Diabetici.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, soprattutto nei paesi industrializzati, si è osservato un incremento delle patologie vascolari sia primitive che associate a diversi disordini metabolici.

Tra questi uno dei principali è il diabete che, secondo l'Oms, interessa circa 177 milioni di persone in tutto il mondo. Questo numero sembra destinato a raddoppiare entro il 2025, 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.

Dopo il diabete la patologia maggiormente coinvolta nella malattia arteriosa cronica periferica è l'ipertensione. L'ipertensione arteriosa è infatti una delle condizioni patologiche più diffuse nei paesi industrializzati, tant'è che si riscontra nel 20% della popolazione adulta ed è considerata uno dei maggiori problemi clinici del ventunesimo secolo. (1-3) .

Come conseguenza dell'aumento nella popolazione dell'incidenza di diabete ed ipertensione è aumentata anche l'arteriopatia ostruttiva cronica periferica (AOCP). Questa può essere trattata farmacologicamente nelle forme più lievi, ma nei casi più gravi necessita di un intervento chirurgico per rivascularizzare l'arto affetto.

La malattia arteriosa cronica periferica è considerata una fonte di morbilità e disabilità nei pazienti ed è una delle maggiori cause di amputazione degli arti inferiori. Negli Stati Uniti circa il 50% delle amputazioni d'arto è dovuta a AOCP e Diabete. L'amputazione maggiore d'arto rappresenta una grave problematica socio-economica determinando una disabilità permanente dei pazienti.

E' importante quindi, per monitorare la condizione del paziente affetto da AOCP e seguirne il follow up, avere a disposizione dei marcatori del danno vascolare facilmente dosabili nel sangue, che possano aiutare il clinico a valutare l'efficacia dei trattamenti atti al recupero della funzionalità del circolo arterioso.

Attualmente sono stati considerati, come possibili marcatori presenti in circolo, le "endothelial progenitor cells" (EPCs), le "endothelial microparticles" (EMPs) e le "circulating endothelial cells" (CECs). Tutti questi elementi sono caratterizzati dall'importante ruolo che rivestono nel turnover delle cellule endoteliali (27)

Lo studio in citofluorimetria sulle cellule endoteliali circolanti ha evidenziato come il numero medio di CEC/ml risulti significativamente elevato nei pazienti con AOCP 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 (27)

I nostri risultati hanno evidenziato la presenza di un numero maggiore di CECs nei pazienti diabetici e in quelli con ipertensione.

L'analisi statistica ha dimostrato che la correlazione tra questi dati è statisticamente significativa. Questo dato potrebbe significare che il danno endoteliale vascolare è maggiore in quei pazienti in cui all'ischemia critica dell'arto si associa la patologia diabetica e ipertensiva, indipendentemente dallo stadio dell'AOCP.

Per meglio definire l'assetto vascolare di questi pazienti è necessario aumentare il numero di pazienti per evidenziare eventuali altre correlazioni significative e analizzare nel siero il numero di EPCs circolanti e i livelli di fattori di crescita vascolari. Per valutare il danno parietale delle arterie interessate dall'ischemia critica, potranno essere inoltre analizzati su sezioni di vaso, fattori di modulazione del differenziamento delle cellule.

Per capire se le CECs mature possano anche fungere da fattore prognostico per il successo della rivascolarizzazione nel tempo, sarà anche opportuno rivalutare, mediante un controllo clinico ed esame Eco-Color-Doppler, i pazienti reclutati e su di questi effettuare un prelievo ematico per dosare le CEC, da confrontare con il dosaggio basale effettuato prima dell'intervento chirurgico.

BIBLIOGRAFIA

1. Smyth, S; Heron, A (2006 Jan). *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nature Medicine (1): 75–80.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (maggio 2004). *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care 27 (5): 1047–53.
3. Diabetes Fact sheet N°312 in «World Health Organization», agosto 2011. URL consultato il 9 gennaio 2012.
4. Pozzati A., Abrignani M.G., Patogenesi dell'aterosclerosi nel diabete mellito. Ital Heart J 2004; 5 (Suppl 4): 7S-11S.
5. 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).
6. American Diabetes Association, Therapy for diabetes mellitus and related disorders. ADA eds, 2004, 241-246.
7. Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. et al., Rinnovo e riparazione tissutale: rigenerazione, guarigione e fibrosi. In: Le basi patologiche delle malattie, Robbins e Cotran; Elsevier Masson, 7a edizione, 2006; pp. 87-118.
8. Goodwin A.M., In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. Microvascular Research 74 (2007) 172–183.
9. Del Papa N., Cortiana M., Maglione W. et al., Raised levels of circulating endothelial cells in systemic sclerosis. Reumatismo, 2005; 57(1): 29-35.

10. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F. et al., Circulating endothelial cells: Biomarker of vascular disease; Review Article. *Thromb Haemost* 2005; 93: 228-35. AOCPP
11. Jonason T., Ringqvist I., Factors of prognostic importance for subsequent rest pain in patients with intermittent claudication. *Acta Med Scand* 1985;218:27-33. *MEDICINE* 2005; 22 1310-1314
12. 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.
13. 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.
14. Ruckley C.V., Symptomatic and asymptomatic disease. In: Fowkes F.G.R. (Ed). *Epidemiology of peripheral vascular disease*. London: Springer, 1991:97-108.
15. Rutherford R.B., The vascular consultation. In: Rutherford RB, ed *Vascular Surgery* (ed 4). Philadelphia: Saunders, 1995:1-10.
16. Schoen F.J., Vasi sanguigni. In: *Le basi patologiche delle malattie*, Robbins e Cotran; Elsevier Masson, 7a edizione, 2006; pp. 511-554.
17. 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.
18. Andreozzi G.M., *Arteriopatie Periferiche: da Leriche-Fontaine all'Ischemia Critica (Fisiopatologia, Clinica, Epidemiologia e Management)*. Mediserve ed, Milano-Napoli-Firenze 1999.
19. Andreozzi G.M., *Le arteriopatie obliteranti periferiche: management attuale e prospettive future*. In: *Mal. Card. Mosby IV*, 2002; pp. 73-92.
20. 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.
21. Del Papa N., Cortiana M., Maglione W. et al., Raised levels of circulating endothelial cells in systemic sclerosis. *Reumatismo*, 2005; 57(1): 29-35.

22. 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).
23. Fadini G.P., Sartore S., Agostini C. et al., Significance of Endothelial Progenitor Cells in Subjects with Diabetes. *Diabetes Care* 30:1305-1313
24. 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.
25. 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).
26. Dianetic Ferrara N., Davis Smyth T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997;18: 4-25.
27. Orrico C, Pasquinelli G, Foroni L, Muscarà D, Tazzari PL, Ricci F, Buzzi M, Baldi E, Muccini N, Gargiulo M, Stella A. Dysfunctional vasa vasorum in diabetic peripheral artery obstructive disease with critical lower limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 Sep;40(3):365-74.