

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biotecnologie

**Dipartimento di Scienze Ambientali
Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche**

Ciclo XXII

**NUMERO DI CELLULE PROGENITRICI
ENDOTELIALI E LUNGHEZZA DEI TELOMERI NEI
LEUCOCITI CIRCOLANTI: NUOVI MARCATORI
PRECOCI DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nelson Marmioli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Claudio Casoli

Chiar.ma Prof. Alessandra Dei Cas

Dottorando: Valentina Spigoni

Riassunto

Il numero di Cellule Progenitrici Endoteliali (EPCs) circolanti e la Lunghezza Telomerica Leucocitaria (LTL) sono considerati marcatori emergenti di rischio cardiovascolare (CV), in quanto ridotti in presenza di fattori di rischio e patologie CV. Non esistono, ad oggi, studi riguardanti il loro possibile ruolo quali marcatori di stratificazione precoce di rischio CV in una popolazione di soggetti giovani adulti sani.

Obiettivi: Il progetto di ricerca si divide in due parti.

STUDIO 1 Valutare il numero di EPCs in una popolazione di giovani adulti sani, in relazione alla presenza di fattori di rischio CV noti con particolare riferimento all'insulinoresistenza (IR).

STUDIO 2 Valutare la LTL in giovani adulti sani, in relazione alla presenza di fattori di rischio CV, di aterosclerosi subclinica e di indice cumulativo di rischio CV.

Materiali e metodi: E' stato valutato il numero di EPCs circolanti in 122 soggetti adulti sani (73M/49F; età 37 ± 8 anni), normotesi ed in assenza di alcuna terapia farmacologica. In tutti i soggetti sono state raccolte le principali variabili cliniche ed antropometriche. E' stato effettuato un prelievo a digiuno per la determinazione di glicemia, insulinemia (IRI), profilo lipidico, uricemia, inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) ed emocromo. L'IR è stata definita in base ai valori di IRI a digiuno. E' stato effettuato un esame ultrasonografico per la determinazione dello spessore medio intimale (IMT) che rileva l'ispessimento della parete dell'arteria carotidea, e quindi indice di aterosclerosi subclinica, e calcolato il Framingham Risk score (FRs), un indice cumulativo di rischio CV. Il numero di EPCs è stato valutato mediante tecnica citofluorimetrica misurando l'espressione di specifici antigeni di superficie (CD133, CD34, e KDR) nella popolazione linfomonocitaria. Si è proceduto dapprima alla ottimizzazione delle fasi del protocollo d'analisi (lisi dei globuli rossi, settaggio delle condizioni di analisi FACS). Per ogni soggetto

sono stati allestiti due campioni: il primo marcato con gli Abs specifici per la valutazione del numero di EPCs il secondo marcato con immunoglobuline IgG1 aspecifiche (controllo negativo).

All'interno della stessa popolazione, in un sottogruppo di 82 soggetti, è stata misurata anche la lunghezza dei telomeri in cellule mononucleate isolate da sangue periferico. E' stato dapprima estratto il DNA con metodi standard e quindi valutata la lunghezza dei telomeri tramite PCR quantitativa. Per normalizzare i campioni in contenuto di DNA è stato valutato in parallelo un gene presente in singola copia per ottenere una *T/S ratio* tra C_t telomerico e C_t del singolo gene ulteriormente normalizzato per la T/S ratio di un DNA controllo (standard interno).

Risultati: STUDIO 1 Il numero di EPCs è risultato inversamente correlato con l'indice di massa corporea ($\rho=-0.18;p<0.05$), circonferenza vita ($-0.2;p<0.05$), pressione sistolica ($-0.23;p<0.01$) e diastolica ($-0.21;p<0.05$), uricemia ($-0.24;p<0.005$), PAI-1 ($-0.19;p<0.05$) ed IRI ($-0.2;p<0.05$) e direttamente correlato con i valori di colesterolo-HDL ($0.18;p<0.05$). Il genere maschile è risultato indipendentemente associato ad un ridotto numero di EPCs rispetto alle altre covariate($p<0.05$). Dividendo la popolazione in sottogruppi in base al genere e alla presenza di IR, il numero di EPCs risultava minore nei maschi insulinoresistenti rispetto ai maschi insulinosensibili ($p<0.05$), questa differenza non si evidenziava nel genere femminile.

STUDIO 2 La LTL è risultata inversamente correlata con i valori di età ($\rho=-0.24; p<0.05$), circonferenza vita ($-0.29;p<0.01$), trigliceridi ($-0.25;p<0.05$), PAI-1 ($-0.28;p<0.01$), hsPCR ($-0.23;p<0.05$), IMT ($-0.24;p<0.05$) e FRs ($-0.28;p<0.01$) e direttamente correlata con colesterolo-HDL ($0.35;p<0.001$) ed EPCs ($0.26;p<0.05$). I valori di IMT, di colesterolo HDL ed il numero di EPCs, sono risultati indipendentemente correlati alla LTL ($p<0.05$).

Conclusioni: STUDIO 1 Il ridotto numero di EPCs nei maschi potrebbe contribuire a spiegare il maggiore rischio CV nel genere maschile rispetto a quello femminile in premenopausa di pari età. Inoltre, il ridotto numero di EPCs nei maschi insulinoresistenti potrebbe rappresentare uno dei possibili meccanismi tramite cui la IR si accompagna ad un aumentato rischio CV nel genere maschile.

STUDIO 2 I risultati suggeriscono che la LTL possa essere considerata un marcatore precoce di rischio CV e di aterosclerosi subclinica, anche in una popolazione di soggetti giovani adulti sani a basso rischio CV. La correlazione indipendente tra LTL e numero di EPCs e l'origine midollare comune di queste due popolazioni cellulari, suggerisce l'esistenza di un meccanismo fisiopatologico condiviso alla base di queste alterazioni implicate nello sviluppo e progressione della patologia CV.

Numero di EPCs e LTL si confermano possibili marcatori di stratificazione precoce di rischio CV anche in soggetti giovani adulti sani, seppure ulteriori studi siano necessari per confermarne un ruolo prognostico.

Sommario

Figure	7
Tabelle	11
1. Abbreviazioni	12
2. Introduzione	19
2.1 Le malattie cardiovascolari: le dimensioni del problema	19
2.2 Le malattie cardiovascolari: i fattori di rischio	22
2.2.1 Fattori di rischio classici o tradizionali.....	22
2.2.2 Fattori di rischio emergenti	25
2.3 Le malattie cardiovascolari: patogenesi	27
2.4 Intima media thickness (IMT)	34
2.5 Insulinoresistenza e rischio cardiovascolare	39
2.5.1 Definizione di insulinoresistenza.....	39
2.5.2 Metodi di valutazione dell'insulinoresistenza nella pratica clinica	41
2.5.3 Eziologia e fattori di rischio per insulinoresistenza	46
2.5.4 Basi molecolari dell'insulinoresistenza.....	47
2.5.5 Conseguenze metaboliche dell'insulinoresistenza	50
2.5.6 Insulinoresistenza: l'evoluzione della Sindrome	54
2.5.7 Alterazioni cliniche associate all' insulinoresistenza	59
2.5.8 Sindrome da insulinoresistenza e rischio cardiovascolare.....	61
2.6 Cellule progenitrici endoteliali (EPCs)	64
2.6.1 Equilibrio tra danno e riparazione endoteliale	64
2.6.2 Definizione di EPCs	65
2.6.3 Origine e differenziazione delle EPCs	65
2.6.4 Caratterizzazione ed identificazione delle EPCs	66
2.6.5 Mobilizzazione dal midollo osseo	71
2.6.6 Ruolo fisiopatologico.....	73
2.6.7 Turnover delle EPCs.....	74
2.7 Cellule progenitrici endoteliali e fattori di rischio cardiovascolare	75
2.7.1 Età	75
2.7.2 Dislipidemia	76
2.7.3 Ipertensione arteriosa	76
2.7.4 Obesità	78
2.7.5 Sedentarietà	78
2.7.6 Abitudine al fumo	78
2.7.7 Altri fattori di rischio	79
2.8 Le cellule progenitrici endoteliali negli stati di insulinoresistenza	80
2.8.1 Insulinoresistenza	80
2.8.2 Diabete Mellito	82
2.9 Le cellule progenitrici endoteliali nelle malattie cardiovascolari	84
2.9.1 Cardiopatia ischemica cronica	85
2.9.2 Angina instabile	85
2.9.3 Infarto del miocardio.....	85
2.9.4 Stroke	86
2.9.5 Scompenso cardiaco.....	87
2.9.6 Altre patologie cardiovascolari	87
2.10 Ruolo prognostico delle EPCs sul rischio cardiovascolare	88

2.11 I telomeri	90
2.11.1. Struttura e funzione dei telomeri.....	90
2.11.2. L'accorciamento telomerico e i meccanismi di signalling cellulare.....	91
2.11.3. The end replication problem e il limite di Hayflick.....	93
2.11.4. La telomerasi.....	95
2.11.5. Stress ossidativo e lunghezza dei telomeri.....	97
2.11.6. Lunghezza telomerica leucocitaria e fattori di rischio CV.....	97
2.11.7. Lunghezza telomerica leucocitaria nelle patologie cardiovascolari.....	102
3. Scopo dello studio.....	105
3.1 Scopo dello studio 1.....	105
3.2 Scopo dello studio 2.....	106
4. Disegno dello studio.....	107
4.1. Popolazione in studio.....	107
4.2 Valutazione clinica dei soggetti in studio.....	109
4.2.1 Visita di screening.....	109
4.2.2 Visita metabolica.....	109
4.2.3 Visita vascolare.....	111
5. Materiali e metodi.....	113
5.1 Valutazione del numero di EPCs.....	113
5.1.1 Principi di citofluorimetria a flusso.....	113
5.1.2 Caratterizzazione delle EPCs.....	117
5.1.3 Quantificazione del numero di EPCs.....	119
5.2 Determinazione della Lunghezza telomerica leucocitaria.....	122
5.2.1 Metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica.....	122
5.2.2 Protocollo di valutazione della LTL.....	123
5.3 Dosaggi citochine.....	132
5.4 Analisi statistica.....	133
6. Risultati dello studio.....	135
6.1 Caratteristiche della popolazione studiata.....	135
6.2 Studio 1: valutazione del numero di EPCs in relazione alla IR.....	136
6.3 Studio 2: valutazione della lunghezza telomerica leucocitaria in relazione al rischio CV.....	139
6.3.1 Controllo qualità dei saggi di PCR real time.....	139
6.3.2 Valutazione della LTL in relazione al rischio CV.....	142
7. Discussione.....	146
7.1 Variazioni nei livelli di EPCs circolanti in relazione all'insulinoreistenza.....	146
7.2 Ruolo della LTL come marcatore di stratificazione precoce di rischio CV.....	149
8. Ricerche in corso.....	153
8.1 Caratterizzazione morfologica di EPCs coltivate <i>ex vivo</i>	155
8.2 Caratterizzazione fenotipica di EPCs coltivate <i>ex vivo</i>	156
8.3 Caratterizzazione funzionale di EPCs coltivate <i>ex vivo</i>	158
9. Conclusioni.....	161
10. Bibliografia.....	163

Figure

- Figura 1 Esempio rappresentativo del rischio CV a 10 anni relativo al genere maschile in paziente diabetico secondo le carte del rischio dell'Istituto Superiore di Sanità.
- Figura 2 Disfunzione endoteliale nell'aterosclerosi.
- Figura 3 Schematizzazione del processo di reclutamento di monociti fino alla formazione delle cellule schiumose nella formazione della placca aterosclerotica.
- Figura 4 Illustrazione dei meccanismi di formazione della stria lipidica durante il processo aterosclerotico.
- Figura 5 Immagine della placca aterosclerotica avanzata e complicata.
- Figura 6 Storia naturale di formazione della placca aterosclerotica.
- Figura 7 Immagine ultrasonografica della misurazione del complesso intima-media dell'arteria carotidea.
- Figura 8 Immagine rappresentativa dello studio ultrasonografico carotideo.
- Figura 9 Curva dose-risposta durante clamp effettuati con diverse concentrazioni di insulina.
- Figura 10 Curva di distribuzione della sensibilità insulinica in soggetti normali nello studio EGIR.
- Figura 11 Principali vie di trasduzione del segnale del recettore insulinico a livello cellulare.
- Figura 12 Interrelazione tra tessuto adiposo, tessuto muscolare, fegato e pancreas nel mantenimento dello stato di insulinoresistenza e nella genesi del Diabete Mellito di tipo 2.
- Figura 13 Circoli viziosi fisiopatologici comuni, iniziali ed avanzati, che conducono alla malattia diabetica conclamata.
- Figura 14 Incidenza di varie patologie nello studio Barilla.
- Figura 15 Prevalenza della sindrome metabolica in base all'età (criteri ATP III).
- Figura 16 Prevalenza della sindrome metabolica nelle diverse razze (criteri ATP III).

-
- Figura 17 Origine e differenziazione delle EPCs dalle cellule staminali ematopoietiche.
- Figura 18 Immagine in microscopia a fluorescenza che mostra la capacità delle EPCs di assorbire le LDL acetilate e di legare la Lectina.
- Figura 19 Metodi comunemente utilizzati per la coltura *ex vivo* di EPCs.
- Figura 20 Rappresentazione schematica del processo di mobilitazione delle EPCs in corso di ischemia.
- Figura 21 Mobilitazione delle EPCs dal midollo osseo.
- Figura 22 Variazioni nei livelli di EPCs circolanti nel processo di formazione della placca aterosclerotica.
- Figura 23 Raffigurazione del ripiegamento a T-loop dell'estremità telomerica.
- Figura 24 Pathways cellulari di trasduzione del segnale in risposta alla disfunzione telomerica.
- Figura 25 Rappresentazione schematica della replicazione del DNA.
- Figura 26 Il limite di Hayflick.
- Figura 27 Meccanismo di allungamento dei telomeri da parte della telomerasi.
- Figura 28 Diversa attività telomerasica nelle linee germinali e nelle cellule somatiche.
- Figura 29 Schema delle componenti di un citofluorimetro
- Figura 30 Esempio di citogramma.
- Figura 31 Esempio di dot-plot e countour-plot.
- Figura 32 Dot-plots rappresentanti l'analisi citofluorimetrica per la valutazione del numero di EPCs.
- Figura 33 Metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica.
- Figura 34 Sequenze dei primers utilizzati per amplificare le estremità telomeriche.
- Figura 35 Stratificazione del sangue in seguito a centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep.
- Figura 36 Camera di conta Neubauer.

-
- Figura 37 Esempio rappresentativo di allestimento di una piastra di PCR real-time relativo al DNA di due soggetti e controlli.
- Figura 38 Distribuzione dei valori di CD133⁺/KDR⁺ EPCs e CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs.
- Figura 39 Correlazione tra i livelli di EPCs circolanti ed il genere
- Figura 40 Box plots rappresentanti la relazione tra i livelli di EPCs, insulinosensibilità e genere.
- Figura 41 PCR real-time telomerica di DNA da cellule HEK 293 .
- Figura 42 Esempio di rappresentazione della curva standard di una reazione di qPCR per la misurazione dei telomeri.
- Figura 43 Curve di melting dei campioni analizzati in real-time PCR per il gene 36B4
- Figura 44 Curve di melting dei campioni analizzati in real-time PCR per l'amplificazione dei telomeri
- Figura 45 Grafici a dispersione rappresentanti la correlazione tra LTL e alcune variabili in studio.
- Figura 46 Box plots rappresentanti la distribuzione dei valori di colesterolo HDL, IMT, FRs e PAI-1 in soggetti HR e LR.
- Figura 47 Possibile meccanismo fisiopatologico in grado di spiegare la relazione tra livelli di EPCs e LTL.
- Figura 48 Illustrazione schematica di due delle principali metodiche ad oggi utilizzate per l'isolamento *ex vivo* delle EPCs.
- Figura 49 Morfologia delle cellule seminate al giorno 0, e delle popolazioni cellulari osservabili al giorno +6 e +21.
- Figura 50 Morfologia di una colonia di cellule endoteliali visibile in coltura al giorno +20.
- Figura 51 Istogrammi rappresentanti l'espressione di marcatori di superficie in *early EPCs* mediante analisi FACS.
- Figura 52 Esperimenti di immunofluorescenze sulle *early EPCs* per valutare l'espressione di Ve-Cad, vWF e CD34.
- Figura 53 Esperimenti di immunofluorescenze sulle *late EPCs* per valutare l'espressione di Ve-Cad, e CD34

- Figura 54 Saggio di immunofluorescenza per la valutazione nelle *early EPCs* di legame con la Lectina e assorbimento delle Ac-LDL.
- Figura 55 Tubular formation assay: visualizzazione delle EPCs incorporate nei tubuli formati dalle HUVECs su matrice extracellulare.
- Figura 56 Tubular formation assay relativo alle *late EPCs*

Tabelle

Tabella 1	Principali definizioni di Sindrome Metabolica.
Tabella 2	Studi nell'uomo che hanno mostrato una associazione tra ridotta LTL e malattie vascolari e metaboliche.
Tabella 3	Sequenza dei primers utilizzati e concentrazioni di utilizzo.
Tabella 4	Ciclo di PCR real-time relativo all'amplificazione delle estremità telomeriche.
Tabella 5	Ciclo di PCR real time relativo all'amplificazione del gene 36B4.
Tabella 6	Caratteristiche dei soggetti in studio.
Tabella 7	Analisi univariata e multivariata relativa al numero di CD133+/KDR+ e CD34+/CD133+/KDR+ EPCs e le altre variabili considerate nello studio.
Tabella 8	Correlazioni di Spearman tra numero di EPCs e le variabili considerate nello studio
Tabella 9	Correlazioni tra la lunghezza telomerica ($\log_{10}T/S$ ratio) e variabili considerate nello studio.
Tabella 10	Analisi di regressione multipla considerando la T/S ratio come variabile dipendente.

1. Abbreviazioni

ADMA	Dimetil arginina asimmetrica
AclDL	Acetylated-Low Density Lipoprotein
ALP	Fosfatasi Alcalina
ALT	Alanina Amino Transferasi
APC	Allofococianina
APO A	Apolipoproteina A
APO B	Apolipoproteina B
ARIC	Atherosclerosis Risk in Communities
AST	Aspartato Amino Transferasi
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP III	National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III
ATR	Ataxia-telangiectasia- e Rad3-related
BMI	Body Mass Index
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CAC	Cellule Angiogeniche Circolanti
Cdc25	Cell division cycle 25
CDK	Chinasi ciclina-dipendente
CECs	Circulating Endothelial Cells
CFM	Citofluorimetria a flusso

CFU-Ecs	Colony Forming Unit-Endothelial Cells
Chk	Checkpoint Kinase
CPCs	Cellule progenitrici cardiache
CHS	Cardiovascular Health Study
cKit	Kit citoplasmatico
Ct	Threshold-cycle
CV	Cardiovascolare
CVD	Cardiocascular Disease
DAG	Diacilglicerolo
DBP	Diastolic Blood Pressure
DM	Diabete Mellito
ECs	Endothelial cells
ECFCs	Endothelial Colony-Forming Cells
EGIR	European Group for the study of Insulin Resistance
EPCs	Endothelial Progenitor Cells
ESC-ESH	Società Europee di Cardiologia e dell'Ipertensione
EXO1	Esonucleasi 1
FFA	Free Fatty Acids
FITC	Fluorescina Iso TioCianato
FRs	Framingham Risk score
γGT	Gamma Glutamil Transpeptidasi
GH	Growth hormone

GLUT1	Glucose Transporter-1
GLUT4	Glucose Transporter-4
GPIIb/IIIa	Glicoproteina IIb/IIIa
HbA1C	Emoglobina Glicata
HDL	High Density Lipoprotein
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1 α
HLA-DR	human leukocyte antigens-DR
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HR	Ricombinazione omologa
HSCs	Hematopoietic stem cells
hsPCR	Proteina C reattiva ad alta sensibilità
hTERC	human Telomerase RNA
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
IC	Insufficienza Cardiaca
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IDF	International Diabetes Federation
IFG	Impaired Fasting Glucose
IFN-γ	Interferone gamma
IGT	Impaired glucose tolerance
IL-1	Interleuchina 1
IL-6	Interleuchina 6
IKK	IkappaB kinase

IMA	Infarto Miocardico Acuto
IMT	Intima Media Thickness
IP3-Kinasi	Fosfoinositolo 3 fosfato kinasi
IQR	Interquartile range
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1
IR	Insulinorestenza
ISIO'	Insulin sensivity index
ISS	Istituto Superiore di Sanità
ITT	Insulin Tolerance Test
IVGTT	Intravenous Glucose Tolerance Test
KDR	Kinase insert Domain Receptor
KITT	Costante di Insulin Tolerance Test
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen 1
log₁₀	trasformazione logaritmica in base 10
Lp(a)	Lipoproteina a piccola
LPL	Lipoproteina Lipasi
LT	Lunghezza Telomerica
LTL	Lunghezza Telomerica Leucocitaria
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mKIT	Kit di membrana
MNCs	Mononuclear cells

MMP-9	Metalloproteinasi-9 della matrice
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NF-kB	Fattore Nucleare kB
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NHEJ	Giunzione non-omologa delle estremità
NNA	Neural Network Analysis
NO	Nitric Oxide
NYHA	New York Heart Association
OGTT	Oral glucose tolerance test
oxLDL	Lipoproteine ossidate a bassa densità
PA	Pressione Arteriosa
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome
PCR	Reazione a Catena della Polimerasi
PDGF	Platelet-Derived Growth factor
PE	Ficoeritrina
PET	Positron Emission Tomography
PKC	Protein Kinasi C
POT1	Protection of Telomere 1
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check

q-FISH	Quantitative Fluorescence In Situ Hybridisation
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Rap 1	Raf-associated protein 1
RAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone
RB	Proteina del Retinoblastoma
SBP	Systolic Blood Pressure
SD	Deviazione Standard
SDF-1	Stromal-Derived Growth Factor-1
SG	Glucose Effectiveness
SMC	Smooth Muscle Cells
TF	Fattore Tissutale
TG	Trigliceridi
TG/HDL	Rapporto trigliceridi/colesterolo HDL
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TIA	Attacco Ischemico Transitorio
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TRF	Telomere restriction fragment
TRF1	Telomere Repeat binding Factors 1
TRF2	Telomere Repeat binding Factors 2
TSA	Tronchi Sovra Aortici
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecole 1
VE-Cad	Caderina Vascolare Endoteliale

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R2	Vascular endothelial growth factor receptor-2
VLA-4	Very Late Antigen 4
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VWF	Von Willebrand Factor
WHO	World Health Organization

2. Introduzione

2.1 Le malattie cardiovascolari: le dimensioni del problema

La Classificazione Internazionale delle malattie raggruppa tra le malattie cardiovascolari (CV) una serie di patologie tra le quali, le più rilevanti sono la cardiopatia ischemica, l'ipertensione arteriosa, le malattie cerebrovascolari e l'aterosclerosi nei vari distretti vascolari. Le malattie CV sono la prima causa di morte nei Paesi Industrializzati in quanto rappresentano il 44% della mortalità totale ¹. Esse costituiscono uno dei principali problemi di salute pubblica, non solo nel mondo industrializzato, ma anche nei paesi in via di sviluppo ². Le malattie CV colpiscono pazienti in età lavorativa, nella loro fase maggiormente produttiva e comportano conseguenze psicosociali ed economiche particolarmente deleterie. Si prevede che entro il 2020 le malattie cardiovascolari, in particolare l'aterosclerosi, diventeranno a livello mondiale, l'elemento primario di tutto il carico di malattia, definito come anni di lavoro sottratti dalla disabilità o da un decesso prematuro alla vita in buona salute. In anni recenti, sono stati ottenuti successi consistenti nella riduzione di morbidità e mortalità dovute ad eventi coronarici acuti. Nondimeno, il trattamento del processo patologico di base, l'aterosclerosi, e la prevenzione delle sue complicanze acute, rappresenta nello stesso tempo un'enorme sfida e un obiettivo da conseguire ³.

I progressi della Medicina, soprattutto per quanto riguarda la terapia e la prevenzione delle malattie CV, hanno consentito di allungare notevolmente l'aspettativa di vita alla nascita, che in Italia è di 77 anni per gli uomini e di 83 per le donne ⁴, dato questo che ha reso il nostro Paese il secondo al mondo per longevità dopo il Giappone. La suscettibilità alle malattie CV, tuttavia, aumenta con l'età ed è rilevante da un punto di vista epidemiologico dopo la

quinta-sesta decade di vita, quindi l'invecchiamento della popolazione è il fattore che contribuisce in maniera massimale all'aumentata incidenza di queste patologie.

Dai dati sull'aspettativa di vita si evince, inoltre, un altro importante dato epidemiologico: la maggiore longevità del genere femminile. Questo dato è imputabile principalmente al fatto che la donna in età fertile è protetta dalle malattie CV grazie agli estrogeni, mentre dopo la menopausa l'incidenza di queste patologie tende ad eguagliare quella degli uomini ed addirittura a superarla dopo l'ottava decade di vita. L'ipotesi che questo ruolo protettivo sia svolto dagli estrogeni è stata formulata per la prima volta da Kaplan studiando un modello animale: il *Macaco fascicularis*. Queste scimmie presentano un modello riproduttivo basato sul maschio dominante in cui le femmine si suddividono in due categorie: dominanti, che producono molti estrogeni, e subordinate che ne producono meno. Kaplan notò che i maschi e le femmine subordinate sviluppavano placche aterosclerotiche simili a quelle umane mentre ciò non avveniva nelle femmine dominanti^{5,6}. Gli estrogeni mediano diverse azioni protettive sul sistema cardiovascolare: aumentano i livelli di colesterolo "protettivo", contenuto nelle lipoproteine ad alta densità "High density lipoprotein" (HDL) e abbassano i livelli del colesterolo pro-aterogeno, contenuto nelle lipoproteine a bassa densità "Low density lipoprotein" (LDL), riducono l'ossidazione delle lipoproteine, i livelli di fibrinogeno e dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo I (PAI-1) e migliorano la funzione endoteliale. In tempi più recenti, il ruolo protettivo degli estrogeni è stato dimostrato essere in parte mediato dalle cellule progenitrici endoteliali (EPCs), deputate alla riparazione delle lesioni vascolari, le quali sono sensibili a questi ormoni⁷. La terapia ormonale sostitutiva in menopausa si prefiggeva tra i vari obiettivi quello di proteggere la donna dagli accidenti cardiovascolari, tuttavia, l'incidenza di quest'ultimi aumentava nelle donne trattate rispetto a quelle non trattate. Gli estrogeni esercitano, infatti, anche azioni dannose sul sistema CV in

quanto aumentano i livelli di trigliceridi, hanno attività pro-coagulante (aumento dei livelli di fattore VII, protrombina e fibrinopeptide A) e pro-infiammatoria, aumentando i livelli di proteina C reattiva ad alta sensibilità (hsPCR) ⁸. Il “gap” tra il genere maschile e femminile tende, tuttavia, a ridursi a causa dell’esposizione da parte delle donne a fattori di rischio, il fumo *in primis*, un tempo appannaggio principalmente del genere maschile.

Le innovazioni terapeutiche nel campo CV hanno inciso notevolmente sulla mortalità di queste patologie, ma occorre non dimenticarne l’elevata morbilità che le rende la prima causa di disabilità nei Paesi Occidentali.

La terapia farmacologica, in queste patologie, va assunta *ad vitam* e ciò fa intuire l’enorme spesa che essa rappresenta per il Servizio Sanitario Nazionale. Il costo sociale di queste patologie, tuttavia, è elevato anche in termini di costi indiretti, come le giornate di lavoro perse dal paziente e da chi lo assiste.

A causa dell’elevato impatto epidemiologico, sociale ed economico della patologia cardiovascolare è intuibile come l’intervento sanitario debba avere come cardine la prevenzione, al fine di ridurre l’incidenza e quindi la morbilità e mortalità legate alla patologia CV.

2.2 Le malattie cardiovascolari: i fattori di rischio

Per impostare una campagna di prevenzione primaria di una patologia è necessario conoscerne approfonditamente i fattori che aumentano il rischio di svilupparla. Per quanto riguarda le malattie CV, già nella prima metà del ventesimo secolo, ricerche di laboratorio ed osservazioni cliniche hanno messo in relazione alcune variabili al rischio di sviluppo di aterosclerosi. Lo studio sistematico dei fattori di rischio nell'uomo, tuttavia, è iniziato circa alla metà del secolo scorso. Il Framingham Heart Study⁹ fu lo studio prospettico di comunità che, per la prima volta, offrì sostegno al concetto che ipercolesterolemia, ipertensione ed altri fattori sono correlati al rischio cardiovascolare; seguirono molti altri studi eseguiti in diversi Paesi che avvallarono il concetto stesso di "fattori di rischio" e dai quali emerse la complessità del rischio CV, caratterizzato da una genesi multifattoriale. Oggigiorno i fattori di rischio CV vengono divisi in classici (o tradizionali) ed emergenti.

2.2.1 Fattori di rischio classici o tradizionali

Le linee guida dell'Adult Treatment Panel del National Cholesterol Education Program (NCEP ATP III)¹⁰, dividono i fattori di rischio CV classici in non modificabili e modificabili da parte di cambiamenti di stile di vita e/o farmacoterapia.

I primi (non modificabili) sono rappresentati da:

- età (≥ 45 anni per l'uomo e ≥ 55 per la donna)
- genere maschile
- familiarità per precoci eventi CV.

Tra i secondi (modificabili) troviamo:

- valori di colesterolo LDL: ≥ 160 mg/dl in presenza di al massimo altri 2 fattori di rischio tra quelli elencati successivamente, ≥ 130 in presenza di più di due fattori di rischio (rischio stimato a 10 anni $< 20\%$), ≥ 100 mg/dl in condizioni di pregressa cardiopatia coronarica o diabete (rischio a 10 anni $> 20\%$)
- livelli di colesterolo HDL (nell'uomo ≤ 40 mg/dl e nella donna ≤ 50 mg/dl)
- ipertensione ($\geq 140/90$ mmHg o necessità di terapia antiipertensiva)
- fumo di sigaretta
- diabete
- obesità
- inattività fisica
- dieta aterogena
- fattori protrombotici

Nonostante l'importanza di ognuno di questi fattori di rischio, è ormai stata abbandonata l'idea di identificare le persone a rischio sulla base dei fattori considerati singolarmente, ma viene presa in considerazione la loro valutazione globale. Nasce quindi il concetto di "Rischio globale assoluto", basato sul fatto che, in presenza di più fattori di rischio, il rischio globale non è la somma bensì il prodotto del rischio associato ad ogni fattore ¹¹.

L'uso del rischio globale assoluto rispetta l'eziologia multifattoriale della malattia cardiovascolare: il suo valore viene stimato per ogni individuo a partire dai principali fattori di rischio presenti. Inoltre, offre opzioni multiple al trattamento delle persone con rischio aumentato: la modificazione di ciascuno dei singoli fattori può infatti influenzare in maniera chiaramente prevedibile il rischio assoluto ¹².

Fondamentale è stato quindi trovare un algoritmo capace di valutare più fattori di rischio in associazione fra loro, fra questi il Framingham Risk score (FRs) è un indice ampiamente

utilizzato nel predire il rischio CV cumulativo nella popolazione generale ¹³. Esso comprende l'età, il genere, il fumo, la pressione sanguigna e le concentrazioni di colesterolo e stima il rischio di eventi CV stratificando la popolazione in tre categorie di rischio: basso (rischio di un evento a 10 anni <10%), intermedio (dal 10% al 20%) ed alto (> del 20%) ¹⁴.

Nella pratica clinica, quindi, ci si trova di fronte a soggetti che possono presentare diversi fattori di rischio in varie combinazioni. Per standardizzare l'approccio clinico ci si avvale di precise linee-guida stigmatizzate nelle "carte del rischio cardiovascolare" ¹⁵ che stimano la probabilità di andare incontro a un primo evento cardiovascolare maggiore (infarto del miocardio o ictus) nei 10 anni successivi, conoscendo il valore di sei fattori di rischio: genere, presenza di diabete, abitudine al fumo, età, pressione arteriosa sistolica e colesterolemia. L'algoritmo e il calcolatore che consentono di stimare il rischio a 10 anni sono disponibili "on-line" sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ¹⁶.

Con questi mezzi il medico può individuare i soggetti più a rischio e per un follow-up in grado di verificare nel tempo l'efficacia delle strategie terapeutiche farmacologiche e non farmacologiche messe in atto. Nella figura 1 è riportato un esempio rappresentativo del rischio CV a 10 anni relativo al genere maschile in paziente diabetico secondo le carte del rischio dell'ISS.

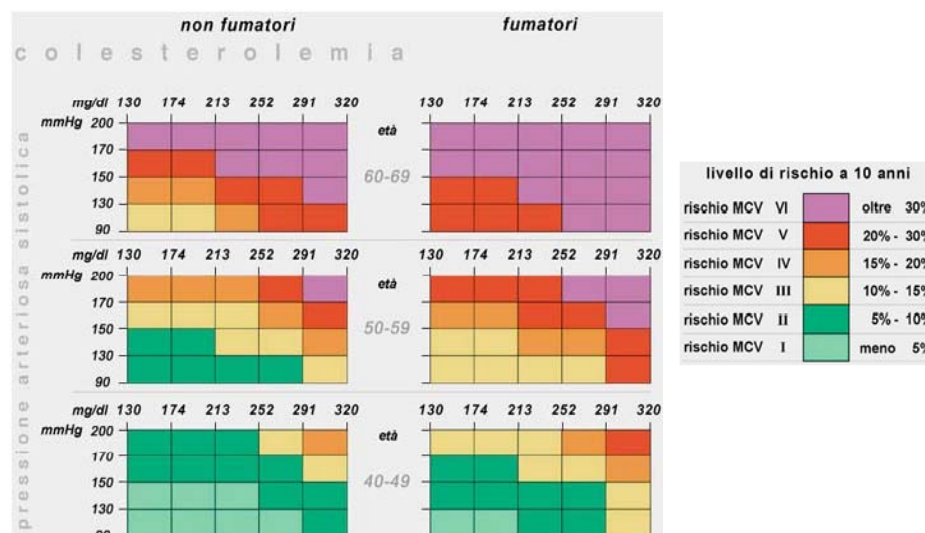


Figura 1. Esempio rappresentativo del rischio CV a 10 anni relativo al genere maschile in paziente diabetico secondo le carte del rischio dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.cuore.iss.it/valutazione/uomini-dia.asp>).

2.2.2 Fattori di rischio emergenti

Non sempre, tuttavia, la presenza di fattori di rischio CV classici spiega la totalità degli eventi CV. Numerosi studi epidemiologici suggeriscono che i fattori di rischio classici spieghino almeno il 75% dei nuovi casi di cardiopatia ischemica, mentre altri fanno ritenere che solo nel 50% dei casi la causa della malattia sia attribuibile ad essi ¹⁷. Recentemente, lo studio INTERHEART, che ha preso in considerazione i maggiori fattori di rischio CV modificabili classici, ha evidenziato che quest'ultimi sono in grado di spiegare per il 90% gli eventi CV (infarto miocardico) in entrambi i generi ¹⁸. Si deduce quindi che la stima dei fattori tradizionali non sia ancora sufficiente per la valutazione del rischio globale, che negli ultimi anni si è imposto come il principale parametro su cui basare la decisione di attivare un trattamento preventivo. Altri studi hanno dimostrato, infatti, che alcuni pazienti con malattia coronarica non presentano i fattori di rischio tradizionali e nel contempo è stato osservato che circa un quinto dei soggetti trattati con terapia ipocolesterolemizzante è andato comunque soggetto ad eventi CV. In questo contesto sono stati esaminati nuovi fattori,

chiamati “emergenti”, che possono essere causalmente correlati al rischio CV ¹⁷. Lo stesso NCEP ATP III divide questi ultimi convenzionalmente in tre categorie: fattori di rischio emergenti lipidici, non lipidici e aterosclerosi subclinica ¹⁰.

I fattori di rischio lipidici emergenti sono:

- ✓ trigliceridi
- ✓ lipoproteine remnants
- ✓ lipoproteina (a) piccola Lp(a)
- ✓ sottofrazioni delle HDL
- ✓ apolipoproteine B e A (APO B, APO A)
- ✓ rapporto colesterolo totale/colesterolo HDL.

I fattori di rischio emergenti non lipidici sono:

- ✓ omocisteina
- ✓ fattori protrombogeni (quali il fibrinogeno e l’attivatore tissutale del plasminogeno)
- ✓ fattori proinfiammatori (come la hsPCR e l’interleuchina-6).

I biomarcatori sierici di infiammazione rivestono un ruolo chiave nella revisione della stratificazione del rischio CV ¹⁹, in quanto sono strettamente correlati alla teoria patogenetica dell’aterosclerosi più accreditata, cioè per l’appunto quella infiammatoria.

2.3 Le malattie cardiovascolari: patogenesi

Numerose e controverse sono le ipotesi formulate nel tentativo di identificare meccanismi responsabili di comparsa e progressione della malattia aterosclerotica. La presenza nella placca di elementi caratteristici dell'infiammazione con associata elevazione del titolo anticorpale per alcuni germi patogeni ha perfino contribuito a far ipotizzare una genesi infettiva dell'aterosclerosi. Al momento, comunque, la teoria più accreditata rimane quella infiammatoria di Russell Ross ²⁰, "the response to injury", che ipotizza nell'infiammazione il meccanismo mediante il quale i fattori di rischio cardiovascolare evocano una risposta riparativa da parte della parete vascolare, risposta che inizia con la disfunzione endoteliale, alterazione meramente funzionale, per poi progredire e stabilizzarsi con la formazione della placca aterosclerotica, una vera e propria alterazione morfologica.

Numerosi studi hanno messo in evidenza che il primo passo nella comparsa dell'aterosclerosi è costituito da un danno a carico dell' endotelio. (Figura 2)

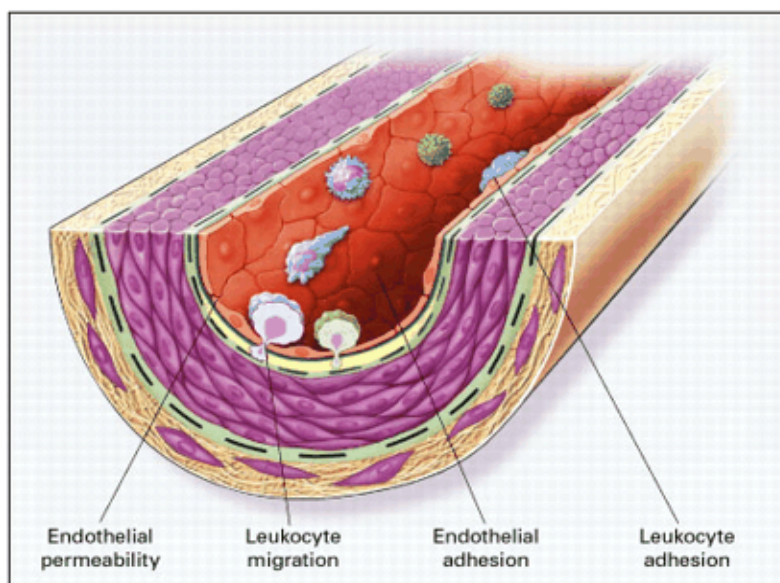


Figura 2. Disfunzione endoteliale nell'aterosclerosi. (*Atherosclerosis--an inflammatory disease. Ross R. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26*).

L'endotelio può essere considerato un vero e proprio organo che risponde in modo autocrino e paracrino ad una serie di stimoli nocivi che ne causano l'alterazione dell'omeostasi. L'omeostasi vascolare è definita come la capacità del sistema vascolare di preservare condizioni emoreologiche normali mantenendo l'equilibrio tra il rilascio di potenti vasodilatatori, come l'ossido nitrico (NO), e vasocostrittori, come l'endotelina-1, mediatori che regolano il tono e la struttura vascolare. La disfunzione endoteliale provoca risposte di tipo compensatorio che si estrinsecano nella diminuzione della biodisponibilità di NO, nell'aumentata produzione di endotelina-1 e nell'attivazione delle vie di trasduzione che convergono nella regolazione del fattore nucleare kB (NF-kB), responsabile della modulazione di un gran numero di geni ad azione pro-infiammatoria, come quelli che codificano per chemochine, enzimi e molecole di adesione. Tra queste ultime, precocemente espresse nell'endotelio attivato, troviamo: ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) che si lega alle integrine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) e VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) che si lega alle integrine VLA-4 (Very Late Antigen-4); le stesse integrine (nonché ligandi delle molecole di adesione) sono anch'esse espresse nelle fasi precoci dell'aterogenesi. La disfunzione endoteliale esita in una maggiore permeabilità ed adesività leucocitaria. Come conseguenza, le lipoproteine circolanti, in particolare le LDL, si depositano nella parete del vaso maggiormente permeabile e subiscono processi enzimatici di ossidazione; i leucociti circolanti aderiscono alle molecole di adesione, dopodiché migrano per diapedesi nello spazio subendoteliale sotto la guida dei segnali di trasduzione prodotti dalle chemochine. I monociti, raggiunta l'intima, acquisiscono le caratteristiche dei macrofagi tissutali. Il processo di differenziazione include la sovraregolazione di vari recettori, tra i quali il recettore CD36 ed i recettori scavenger per le lipoproteine modificate. Attraverso questi ultimi, i macrofagi internalizzano le LDL ossidate (oxLDL) per trasformarsi in "foam cells",

ovvero cellule schiumose (Figura 3).

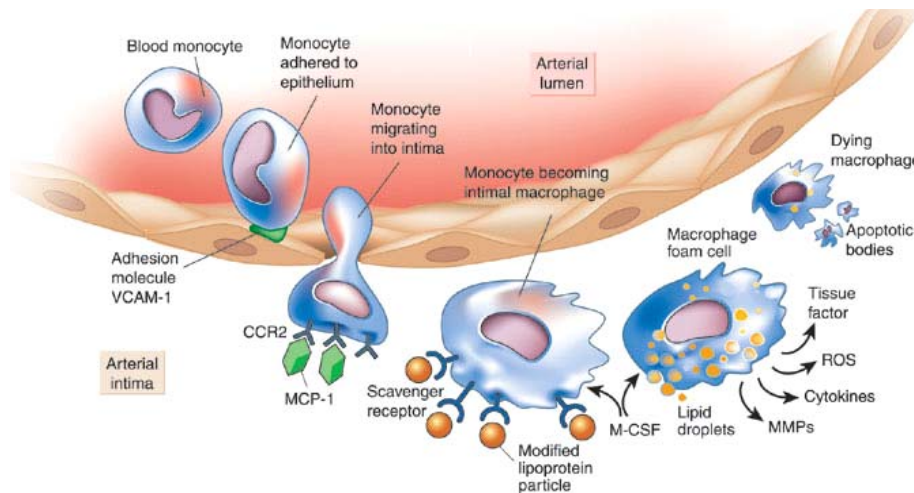


Figura 3. Schematizzazione del processo di reclutamento di monociti fino alla formazione delle cellule schiumose nella formazione della placca aterosclerotica. (*Peter Libby Nature 420, 868-874(19 Dec 2002)*).

Contestualmente avviene anche l'adesione delle piastrine all'endotelio, il quale è denudato dall'insulto infiammatorio, con conseguente attivazione delle stesse. Piastrine attivate, monociti e linfociti sono responsabili della produzione di citochine, molecole pro-infiammatorie e fattori di crescita che inducono la migrazione delle cellule muscolari lisce "smooth muscle cells" (SMC) dalla media all'intima, acquisendo anch'esse la capacità di fagocitare cellule lipidiche. Piastrine e leucociti attivati, cellule schiumose e cellule muscolari lisce migrate, costituiscono le strie lipidiche "fatty streaks", considerate lesioni precoci ma anche reversibili, eliminando i fattori di rischio (Figura 4).

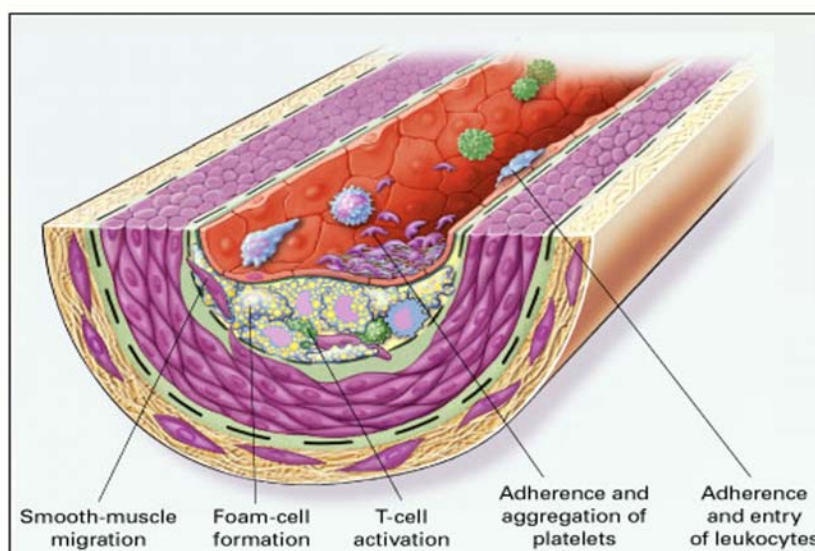


Figura 4. Illustrazione dei meccanismi di formazione della stria lipidica durante il processo aterosclerotico. (*Atherosclerosis--an inflammatory disease. Ross R. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.*)

Se, al contrario, il processo infiammatorio non si arresta, le cellule muscolari lisce passano dallo stato di riposo a quello proliferativo sotto l'azione di alcuni fattori di crescita, tra cui il PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), rilasciato dalle piastrine, interagenti con le pareti vasali già nelle fasi iniziali dell'aterogenesi. Inoltre, le cellule muscolari lisce, sotto l'azione del Transforming Growth Factor β (TGF- β), si differenziano nel fenotipo "sintetico", in grado di sintetizzare matrice extracellulare (collagene, elastina, proteoglicani) portando allo sviluppo di un "cappuccio fibroso" che circonda le lesioni in una fase ormai irreversibile. Il processo continua verso la formazione di lesioni sempre più complesse; l'evoluzione è verso la formazione del *core* lipidico, al cui interno si verificano fenomeni necrotici ed apoptotici che portano alla deposizione del fattore tissutale (TF), componente altamente trombogenica della placca, di cui i macrofagi sembrano rappresentare la fonte principale; oltre a ciò, nel contesto del *core* sono stati ritrovati anche calcio e lipidi a localizzazione extracellulare, i quali potrebbero contribuire ai processi di morte cellulare. Le lipoproteine presenti nello spazio extracellulare dell'intima interagiscono con essa andando incontro ad alterazioni

chimiche quali l'ossidazione e la glicazione non enzimatica che ne coinvolgono sia la porzione lipidica sia quella proteica. E' stato dimostrato come queste reazioni accelerino l'evoluzione dell'ateroma^{21,22,23,24}. Nei soggetti diabetici, la glicemia elevata favorisce i processi di glicazione non enzimatica delle apoproteine ma anche delle proteine costituenti il vaso, accelerando l'evoluzione della placca complicata (Figura 5).

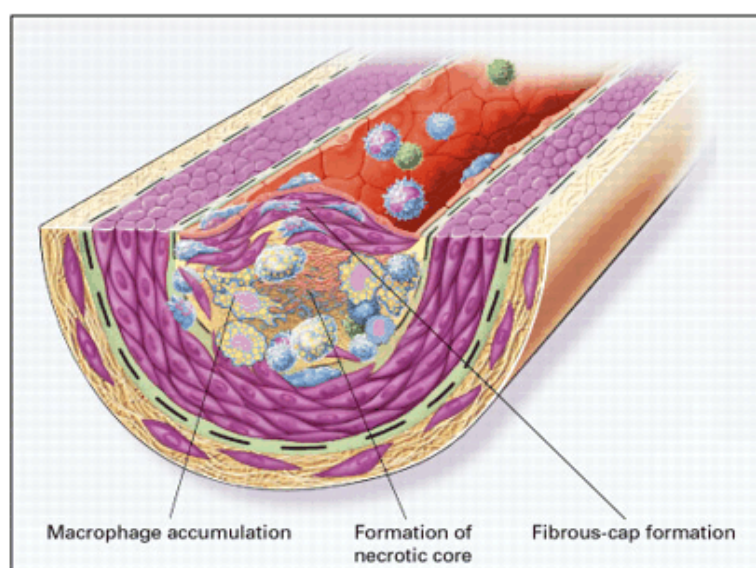


Figura 5. Immagine della placca aterosclerotica avanzata e complicata. (*Atherosclerosis--an inflammatory disease. Ross R. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26*).

L'accrescimento della lesione può provocare l'ispessimento della parete arteriosa, determinando un'ulteriore riduzione del lume del vaso. Man mano che altri leucociti vengono reclutati attraverso un meccanismo di amplificazione della risposta infiammatoria di basso grado, la lesione va incontro ad una progressione. E' stata evidenziata, inoltre, un'elevata neoangiogenesi all'interno della lesione, sotto lo stimolo di fattori di crescita prodotti localmente. La neo-vascularizzazione dell'intima e dell'avventizia contribuisce ad incrementare la vulnerabilità della placca aterosclerotica permettendo l'ulteriore reclutamento di cellule infiammatorie. Oltre a ciò, poiché i capillari neoformati sono molto

fragili, possono andare facilmente incontro alla rottura: la conseguente emorragia favorisce la rapida progressione della placca e l'evoluzione verso le sue complicanze (Figura 6).

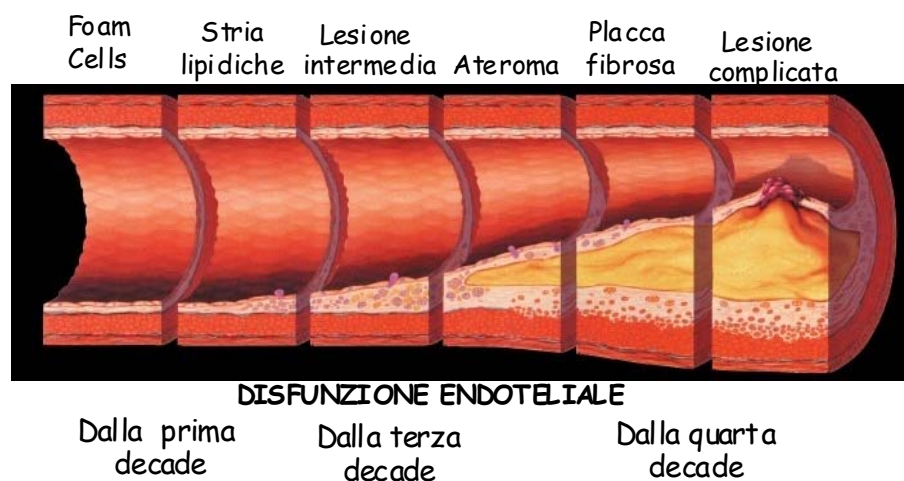


Figura 6. Storia naturale della formazione della placca aterosclerotica (Modificata da Pepine CJ. *Am J Cardiol.* 1998;82(suppl 104).

La principale complicanza dell'ateroma è la trombosi. L'erosione superficiale dell'endotelio e la rottura o fissurazione dell'involucro della placca sono i fattori scatenanti la formazione di trombi. La rottura della lamina fibromuscolare della placca consente il contatto tra i fattori della coagulazione ed il fattore tissutale espresso dalle cellule schiumose, innescando il processo coagulativo.

Dal punto di vista clinico, a livello coronarico, il trombo può essere occlusivo e relativamente persistente, scatenando un infarto acuto in assenza di sufficienti circoli collaterali, oppure può occludere solo parzialmente il lume del vaso come nell'angina instabile.

A livello carotideo trombi piastrinici possono embolizzare causando un attacco ischemico transitorio (TIA).

Episodi ripetuti di rottura e cicatrizzazione della placca contribuiscono all'evoluzione della lesione. Non tutti gli ateromi hanno la stessa predisposizione alla rottura. Quelli

maggiormente a rischio sono quelli con una sottile lamina fibromuscolare e un nucleo lipidico relativamente ampio ad elevato contenuto di macrofagi, le cosiddette “placche soft”. Il sito di rottura della placca è una zona in cui prevalgono i macrofagi e i linfociti T mentre scarseggiano le cellule muscolari lisce. I leucociti presenti nel sito di rottura esprimono marcatori dell’attivazione infiammatoria, come il complesso maggiore di istocompatibilità HLA-DR (human leukocyte antigens-DR) la cui espressione è un marker attendibile di infiammazione in quanto non viene espresso nelle arterie normali ma solo in corrispondenza dei siti di rottura della placca. Anche nel processo di rottura della placca intervengono diverse citochine prodotte dai linfociti T, come l’interferon gamma (IFN- γ), e dai macrofagi, quali il “tumor necrosis factor alfa” (TNF- α) e l’interleuchina 1 (IL-1); esse, da un lato, riducono la sintesi di collagene richiesta per la riparazione della lamina fibromuscolare e, dall’altro, innescano la degradazione di macromolecole della matrice extracellulare. Ciò favorisce notevolmente la rottura della placca.

Al contrario si è visto come placche con una densa matrice fibromuscolare e prive di un nucleo lipidico siano resistenti alla rottura e raramente siano complicate dalla trombosi. Da ciò si evince che per determinare le manifestazioni cliniche non è importante solo il grado di protrusione della placca nel lume del vaso ma anche le caratteristiche biologiche della placca stessa.

Proprio nelle differenze qualitative tra i vari tipi di placca si cela, infatti, la spiegazione del perché alcune placche rimangano silenti per tutta la vita mentre altre vadano incontro a complicazioni acute con conseguenze cliniche gravissime.

2.4 Intima media thickness (IMT)

L'evidenza autoptica che l'aterosclerosi inizia numerosi anni prima dello sviluppo di eventi clinici e progredisce in maniera silente, ha condotto alla ricerca di indicatori preclinici di malattia aterosclerotica. L'intima media thickness (IMT) é un indicatore precoce di formazione della placca ateromasica nello stadio non ostruttivo, clinicamente silente della stria lipidica. Esso è un indicatore di aterosclerosi subclinica di particolare importanza, in quanto è strettamente correlato agli stadi precoci del meccanismo patogenetico dell'aterosclerosi ¹⁹. Ne consegue che, l'utilizzo dell'indicatore IMT nella pratica clinica, permette un'identificazione precoce dello stadio clinico della malattia aterosclerotica, rendendo possibile la messa in atto di strategie preventive farmacologiche e di stile di vita ²⁵. Il test per determinare l'IMT si avvale dell'esame ultrasonografico B-mode ad alta risoluzione dei tronchi sovra-aortici (TSA) ²⁶. Questa è una metodica non invasiva, sicura, poco costosa che può essere utilizzata per visualizzare il lume e le pareti di arterie superficiali quali le carotidi extracraniche e le femorali. Una tipica immagine ultrasonografica della parete arteriosa è caratterizzata dalla presenza di una coppia di linee ecogene parallele che delimitano uno spazio anecogeno. La distanza tra le due linee ecogene rappresenta lo spessore del complesso intima-media (IMT) dell'arteria (Figura 7).

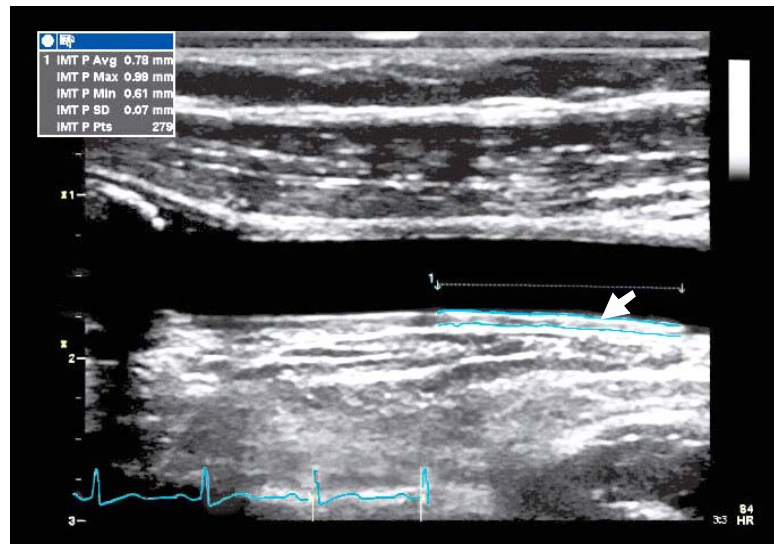


Figura 7. Immagine ultrasonografica della misurazione del complesso intima-media (indicato dalla freccia) dell'arteria carotidea. (http://www.gehealthcare.com/usen/ultrasound/products/vivid7_dim.html).

Nonostante le lesioni aterosclerotiche si localizzino principalmente alla biforcazione carotidea e nella porzione prossimale della carotide interna, è stato osservato che l'IMT misurato a livello della comune è un buon marker di aterosclerosi generalizzata^{27,28}. La predilezione della valutazione dell'IMT a livello della carotide comune nasce dalla possibilità di visualizzarla in un'altissima percentuale di casi, ottenendo misurazioni di IMT più riproducibili rispetto alla biforcazione carotidea o alla carotide interna. D'altra parte, una misura combinata di IMT che includa tutti e tre i segmenti carotidei: carotide comune (1.5 cm prossimali al bulbo), biforcazione della carotide comune e carotide interna (i primi 1.5 cm dalla origine), rappresenta un indicatore riproducibile e certamente più potente di malattia aterosclerotica rispetto alla sola carotide comune^{29,30} (Figura 8).

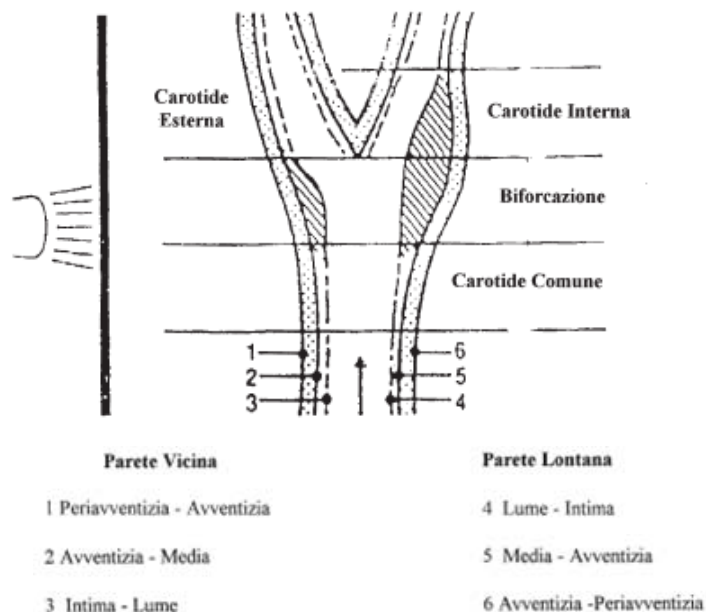


Figura 8. Immagine rappresentativa dello studio ultrasonografico carotideo. (Mario De Michele et al. *Ital Heart J Suppl* 2001; 2 (10): 1074-1077).

Il migliore approccio per valutare la gravità della malattia aterosclerotica è quindi quello che prevede la misurazione dell'IMT tramite l'utilizzo di angoli multipli di scansione, ovvero, l'approccio circonferenziale. In questo modo, è possibile ottenere più risultati, dai quali è possibile estrapolare differenti "end-point" ultrasonografici: IMT massimi, media dei massimi IMT, IMT medio.

- IMT massimi: viene calcolato il valore di IMT massimo per ogni segmento di carotide comune, biforcazione, carotide interna, parete prossimale e distale di entrambi i lati.
- Media dei massimi IMT: dai 12 IMT massimi risultanti, viene calcolata la media totale.
- IMT carotideo medio: viene calcolata la media di 36 misurazioni: tre punti per ogni segmento di carotide comune, biforcazione, carotide interna, parete prossimale e distale di entrambi i lati.

La validità dell'esame è influenzato anche dalla porzione di parete scelta per la misurazione dell'IMT, rispetto alla posizione dell'ecografo, ovvero, se misurare l'IMT nella parete vasale

lontana “far wall” o in quella vicina “near wall”. Studi di confronto tra ultrasuoni ed anatomia patologica hanno evidenziato differenze nella misurazione dell’IMT della parete vicina, evidenziando come la metodica ultrasonografica sottostimi il risultato rispetto all’istologia³¹. Tuttavia le misurazioni della parete vicina sono correlate in maniera eccellente con quelle della parete lontana, sia *in vitro* sia *in vivo*, e sono un indicatore di malattia ugualmente potente³².

Tre importanti studi prospettici, il Cardiovascular Health Study (CHS)³³, il Rotterdam Study^{34,35} e l’Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)^{36,37}, hanno dimostrato un’associazione tra l’incremento dell’IMT carotideo e la comparsa di eventi cerebro e cardiovascolari, soprattutto nei soggetti ipertesi. Nello studio CHS lo spessore intimale a livello della carotide interna, rappresentava un fattore predittivo di cardiopatia ischemica o di malattia aterosclerotica in soggetti apparentemente sani con età superiore a 65 anni.

Nello Studio Rotterdam, condotto in un’ampia coorte di 7983 soggetti di età superiore a 55 anni, l’aumento dell’IMT, valutato a livello della carotide comune, era associato ad un aumento di rischio di ictus e di infarto acuto del miocardio. Nello studio ARIC, in cui sono stati arruolati 7865 donne e 6349 uomini di età compresa tra i 45 e i 65 anni, l’aumento di spessore medio-intimale, era associato ad una aumentata incidenza di ictus³⁶.

Pertanto, lo spessore medio-intimale, è considerato un valido “marker” in grado di predire l’incidenza di ictus ed infarto miocardico. Sulla base anche di dati emersi da numerosi altri studi, le società europee di cardiologia e dell’ipertensione (ESC-ESH), hanno inserito nelle linee guida la valutazione dello spessore medio-intimale come marker di danno d’organo³⁸. Il valore soglia di questo spessore è stato identificato <0,9 mm, limite oltre il quale si definisce patologico. La valutazione ultrasonografica del danno vascolare viene ormai limitata, per semplicità, allo studio della sola carotide comune. Tuttavia, nell’esecuzione di un esame dei

tronchi sovraortici, deve essere comunque effettuata una valutazione completa non solo della carotide comune, ma soprattutto della sua biforcazione e di entrambe le carotidi, in particolare dell'interna, perché spesso si evidenziano placche ateromasiche in questi distretti, pur in presenza di un IMT che può risultare normale.

Si può, quindi, concludere che, il grado di spessore medio-intimale correla indipendentemente con il rischio per i maggiori eventi CV ^{10,39}, rendendo l'IMT un valido marcatore di aterosclerosi subclinica.

2.5 Insulinoresistenza e rischio cardiovascolare

2.5.1 Definizione di insulinoresistenza

La prima definizione di insulinoresistenza (IR) risale al 1922 ad opera di Banting e Best, i due ricercatori che identificarono l'insulina, secondo i quali era da ritenersi insulinoresistente un soggetto che necessitasse di produrre più di 200 unità di insulina al giorno per mantenere un controllo metabolico accettabile ⁴⁰. Soltanto con l'acquisizione delle tecniche di misurazione dell'insulinemia, l'IR ha acquisito un connotato fisiopatologico più preciso. Berson e collaboratori per primi, negli anni '70, cominciarono ad indicare l'iperinsulinemia come marcatore di una condizione in cui sono necessarie concentrazioni più elevate di insulina per evocare una risposta fisiologica ⁴¹. Il concetto di IR è stato ulteriormente ampliato a seguito della definizione biologico-molecolare e fisiopatologica delle azioni dell'insulina. Alla fine degli anni '70, Kahn definì l'IR come "ogni condizione in cui concentrazioni normali di insulina producono una risposta biologica inferiore alla normalità" ⁴². Questa definizione contemplava due aspetti dell'IR: la minore sensibilità all'insulina e la ridotta azione dell'insulina. Per ridotta sensibilità si intende una situazione nella quale la curva dose-risposta mostra, rispetto ai soggetti normali, una risposta massimale simile, ma uno spostamento della stessa verso destra; per ridotta responsività all'insulina si intende una curva con andamento simile ma risposta massimale ridotta (ridotta azione dell'insulina). Il termine insulinoresistenza si riferisce ad entrambe le condizioni che, nella pratica clinica, sono praticamente sempre tra loro associate (Figura 9).

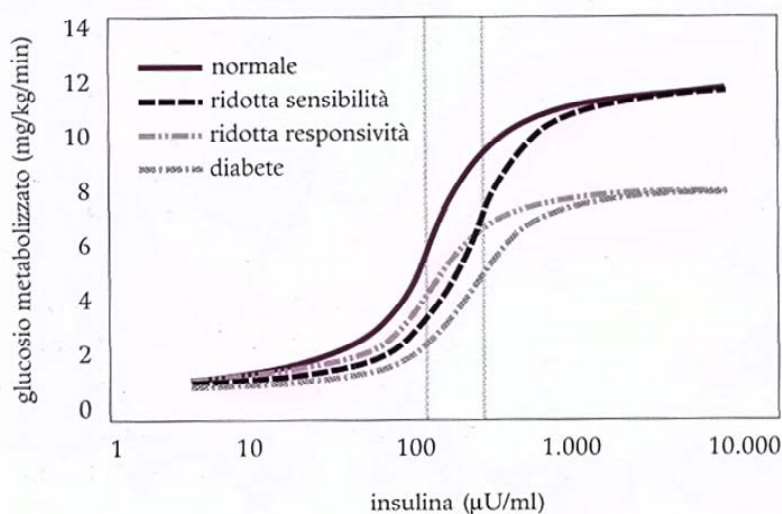


Figura 9. Curva dose-risposta durante clamp effettuati con diverse concentrazioni di insulina. Linea continua: curva dose-risposta tipica. Ridotta sensibilità: curva spostata verso destra con valori massimali normali. Ridotta responsività: curva con punto di flesso normale ma valori massimali ridotti. (Kahn CR *Metabolism* 1978; 27:1893-902).

Il metabolismo del glucosio rappresenta il cardine delle azioni metaboliche dell'insulina, quindi l'IR è stata correlata alla ridotta capacità dell'insulina di promuovere la captazione del glucosio. Questa proprietà dell'insulina viene valutata mediante la tecnica del *clamp euglicemico*⁴³, che consiste nella somministrazione di una dose prefissata di insulina a velocità costante e di glucosio in quantità variabile in modo da mantenere costante la glicemia fino al raggiungimento dello steady-state, ovvero quando la quantità di glucosio infuso corrisponde a quella utilizzata dai tessuti periferici, in particolare dal muscolo scheletrico. In base agli studi effettuati mediante questa tecnica è stata elaborata da Reaven un'ulteriore definizione di IR come "ridotta capacità di indurre consumo di glucosio nel muscolo scheletrico"⁴⁴. Il muscolo scheletrico, infatti, è responsabile del 70% del consumo di glucosio nella fase post-assorbitiva. Successivamente furono proposte ulteriori definizioni di IR. Nel 1991 Flier definiva l'IR come "uno stato in cui una data concentrazione di insulina si associa ad una risposta del metabolismo del glucosio subnormale"⁴⁵. Lo stesso autore dieci

anni più tardi affermò che l'IR è una risposta subnormale all'insulina prodotta dall'organismo (endogena) o somministrata dall'esterno (esogena) ⁴⁶. In questa ultima definizione è scomparso il riferimento al metabolismo glucidico, in quanto nel frattempo è stata posta maggior luce sulle azioni fisiologiche dell'insulina definendone il meccanismo d'azione. Mediante studi di biologia molecolare è stato sottolineato un ulteriore aspetto dello stato di insulinoresistenza: esso è dovuto al disaccoppiamento tra l'attivazione del recettore insulinico e quella del "pathway" a valle. Pertanto una possibile definizione d'insieme considera la resistenza insulinica come "una subnormale risposta all'insulina, misurabile come ridotta capacità di regolare il metabolismo del glucosio e degli altri nutrienti, con conseguenze fisiopatologiche a livello di cellule e tessuti, incluso il sistema cardiovascolare, e con importanti implicazioni e sequele cliniche" ⁴⁷.

2.5.2 Metodi di valutazione dell'insulinoresistenza nella pratica clinica ⁴⁸

Una volta data una definizione di insulinoresistenza si è cercato di misurare l'insulinosensibilità nella popolazione normale in modo da cercare un "valore soglia" oltre al quale un soggetto potesse essere considerato insulinoresistente. Il più vasto studio pubblicato in cui l'insulinoresistenza sia stata misurata su vasta scala è lo studio condotto dall'EGIR (European Group for the study of Insulin-Resistance), che ha coinvolto anche diversi centri italiani ^{49,50}. In questo studio l'insulinoresistenza è stata misurata mediante la metodica considerata il "gold standard", ovvero il clamp euglicemico iperinsulinemico. I soggetti reclutati per lo studio EGIR erano definiti normali in base ad alcuni criteri di inclusione: glicemia a digiuno <110 mg/dl, PA (pressione arteriosa) <140/90mmHg, BMI (Body Mass Index) <25 Kg/m². Dai dati pubblicati si evince una curva di distribuzione dei valori di insulinosensibilità di tipo gaussiano, suggerendo che l'insulinoresistenza sia una

variabile biologica continua. Da ciò deriva l'impossibilità teorica di definire un valore soglia se non attraverso artifici statistici. In particolare in questo studio vengono definiti insulinoresistenti i soggetti appartenenti al decile più basso dei valori di insulinosensibilità misurata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico (Figura 10).

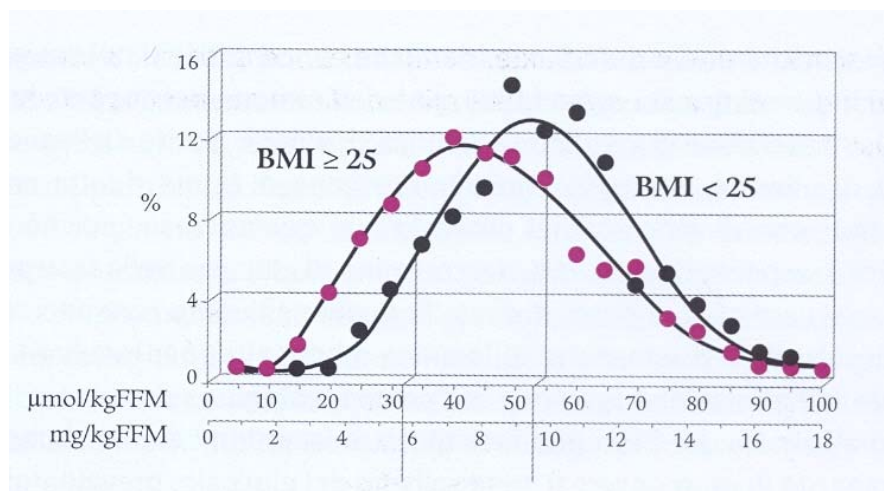


Figura 10. Curva di distribuzione della sensibilità insulinica in soggetti normali nello studio EGIR, secondo cui viene definito insulinoresistente ogni soggetto che dimostri una sensibilità al di sotto del decile inferiore dei clamp dei soggetti con BMI <25 kg/m² (non obesi). Con questa definizione solo una piccola parte dei soggetti obesi verrebbe confermato insulinoresistente. (Ferranini E et al, *J Clin Invest* 1997; 100 (5): 1166-73).

Esistono diverse metodiche in grado di dare una definizione quali-quantitativa della condizione di insulinoresistenza. Esistono due categorie di test: dinamici e statici. I primi valutano la risposta insulinica ad uno stimolo esogeno, mentre i secondi “fotografano” la situazione metabolica del soggetto senza influenzarla dall'esterno.

Test dinamici

Clamp euglicemico iperinsulinemico: Questo test è considerato il “gold standard” per la misurazione dell'insulinoresistenza⁵¹. Si basa sull'infusione a velocità costante di una dose prefissata di insulina mantenendo un livello glicemico stabile mediante l'infusione di glucosio

a velocità variabile. Raggiunto l'equilibrio, in presenza di glicemia costante, la quantità di glucosio libero nell'organismo è costante; quindi la quantità di glucosio infusa è pari a quella utilizzata dai tessuti periferici a condizione di soppressione della produzione epatica di glucosio. Questa tecnica possiede però alcuni limiti: è costosa, richiede personale esperto e locali idonei, l'esecuzione del test richiede almeno 3 ore, non è applicabile a studi epidemiologici, la riproducibilità tra diversi centri deve essere comprovata e richiede alti livelli di collaborazione da parte dei soggetti studiati.

Intravenous Glucose Tolerance Test (IVGTT): L'Intravenous Glucose Tolerance Test (IVGTT) associato al minimal model⁵² si basa sull'infusione di un bolo di 300 mg/kg di glucosio in circa un minuto. Sono raccolti campioni di sangue ogni 2 minuti per i primi 16 minuti per la misurazione della glicemia e dell'insulinemia e, successivamente, ad intervalli di 5-10 minuti per un totale di 180 minuti. Vengono utilizzati due modelli matematici per determinare la sensibilità insulinica (Insulin Sensivity Index- ISIO') ovvero la capacità dell'insulina di aumentare il declino della glicemia attraverso una accelerazione della propria scomparsa del plasma e la "glucose effectiveness" (SG) ovvero la capacità del glucosio di aumentare la propria scomparsa dal plasma in condizioni di insulinemia basale. Questa tecnica richiede una buona capacità secretoria pancreatica e non è applicabile a pazienti diabetici in terapia insulinica. È difficile inoltre la combinazione con altre metodiche al fine di definire il contributo relativo dei vari tessuti (fegato, muscolo, tessuto adiposo). La tecnica è costosa e richiede formule di calcolo complesse con l'assoluta esigenza di supporto informatizzato, ma nonostante ciò, si è dimostrata poco riproducibile e di difficile applicabilità in ampi studi epidemiologici.

Insulin Tolerance Test (ITT): L'Insulin Tolerance Test (ITT)⁵³ si basa sull'infusione rapida di un bolo endovenoso di insulina (0,1 U/Kg). Sono raccolti campioni di sangue ad intervalli di 5

minuti per un totale di 60 minuti, quindi viene calcolata una costante (K ITT) che rappresenta il declino della glicemia per minuto secondo la formula:

$$K\ ITT = (0,693 / t\ \frac{1}{2}) \times 100$$

Dove il $t\ \frac{1}{2}$ rappresenta il tempo occorso per ridurre la glicemia iniziale del 50%. Poiché l'inizio dell'azione insulinica impiega 5-10 minuti, è uso calcolare il declino della glicemia dopo i primi 10 minuti. Questo test utilizza dosi farmacologiche di insulina, mettendo il paziente a rischio di ipoglicemia. La risposta controregolatoria all'ipoglicemia, stimolando la produzione epatica di glucosio e alterando l'assorbimento periferico, può inficiare i risultati del test, che comunque permette una misura non quantitativa ma relativa dell'insulinosensibilità. Così come l'IVGTT non consente di definire il contributo relativo dei vari tessuti, anche questa tecnica è scarsamente riproducibile e di difficile applicazione in ampi studi epidemiologici

Test da carico orale di glucosio (OGTT) ed indici derivati: Il test da carico orale di glucosio consiste nella somministrazione orale di 75g di glucosio e nell'esecuzione di prelievi venosi seriati, a digiuno e successivamente a 60 e a 120 minuti ed eventualmente anche a 30, 90, 150, 180 minuti dall'introduzione del glucosio per la determinazione di glicemia ed insulinemia, in modo da ottenere una curva glicemica ed una insulinemica. I vantaggi dell'OGTT sono costituiti dalla facile elaborazione, dalla possibilità di ottenere informazioni relative alla capacità di secrezione insulinica e alla tolleranza ai carboidrati. I risultati di questa tecnica correlano bene con quelli ottenuti mediante clamp euglicemico⁵⁴. Esiste tuttavia una certa variabilità intra ed inter individuale per quanto concerne l'assorbimento intestinale di glucosio e sussiste una scarsa riproducibilità ed accuratezza anche nell'ambito degli stessi laboratori.

Test statici

- Dosaggio dell'insulinemia a digiuno
- Dosaggio della proinsulina intatta
- Rapporto insulina/glucosio
- Formule derivate dal rapporto insulina/glucosio, ad esempio l'Homeostasis Model Assessment (HOMA) Score ⁵⁵ (insulinemia ($\mu\text{U/ml}$) x Glicemia a digiuno (mmol/l)/22,5 ulteriormente diviso per 18 se glicemia è espressa in mg/dl) o il Quantitative Insulin Sensitivity Check (QUICKI) ⁵⁶ ($1/[\log(\text{ins}0)+\log(\text{Glu}0)]$)
- Insulin Sensivity index (ISI0') ($10^4 / (\text{Ins}0 \times \text{Gli}0)$)
- Rapporto trigliceridi/HDL (TG/HDL)

La scelta del metodo da utilizzare per misurare l'insulinoresistenza deve essere dettata dalla finalità che la misura stessa vuole raggiungere. Se la misurazione viene eseguita a scopo fisiopatologico, il clamp euglicemico è senza dubbio la tecnica più indicata, in quanto è l'unica che dà una stima dell'insulinoresistenza a livello individuale. Gli indici statici sono più agevoli se si intende studiare una vasta popolazione a fini epidemiologici perché sono meno costosi e richiedono un minore impiego di tempo e di personale. Per esempio l'insulinemia a digiuno è considerata un valido marker di insulinoresistenza in soggetti non diabetici ⁵⁷.

Un altro valido indice statico è il TG/HDL. Esso è considerato un indicatore di IR e sindrome metabolica, è, infatti, stato dimostrato che un rapporto TG/HDL > 3 identifica soggetti sani insulinoresistenti ed inoltre possiede la stessa abilità dei criteri proposti dall' ATP III ⁵⁸ nel definire la sindrome metabolica ⁵⁹. E' noto in letteratura come esso sia un predittore indipendente di rischio coronarico e di mortalità per accidenti CV. Questo è stato osservato in popolazioni adulte maschili ⁶⁰, femminili ⁶¹ ed anche pediatriche ⁶².

2.5.3 Eziologia e fattori di rischio per insulinoresistenza

Alla genesi della condizione di insulinoresistenza partecipano fattori genetici e ambientali, perciò attualmente l'eziologia dell'insulinoresistenza è ritenuta di origine multifattoriale. La componente genetica è stata dimostrata dall'osservazione che soggetti insulinoresistenti presentano familiarità positiva per diabete mellito(DM) di tipo 2 in parenti di primo grado. Non è ancora stato individuato un singolo gene specifico e responsabile, ma sono state studiate mutazioni a carico di diversi geni, in particolare del gene dei trasportatori del glucosio, del recettore per l'insulina, del gene dell'insulina, del DNA mitocondriale, del gene della leptina e del gene del Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)⁶³. Per questo, l'IR è considerata una patologia poligenica. Qualunque sia la sua origine si tratta di un difetto genetico che ha effetti negativi sulla sopravvivenza. Come ha potuto mantenersi nel genoma umano e diffondersi con un così alto tasso di prevalenza senza essere eliminato dalla Selezione Naturale? La spiegazione è stata proposta grazie alla formulazione della teoria del "genotipo economo" ("thrifty genotype")⁶⁴, secondo cui popolazioni un tempo esposte a continue variazioni nell'apporto alimentare (periodi di carestia alternati a periodi di abbondanza) hanno selezionato un genotipo che ottimizzasse l'accumulo di scorte energetiche in periodi di abbondanza di cibo, permettendo la sopravvivenza nei periodi di carestia. Il "genotipo economo" determina una IR selettiva a livello muscolare, permettendo al muscolo di non consumare tutte le energie in periodi di digiuno e di deviarle verso l'accumulo di tessuto adiposo nei periodi di abbondanza. Ciò consente inoltre alla massa muscolare di preservarsi più a lungo, aumentando le possibilità di ricerca del cibo⁶⁵. La dieta dell'uomo primitivo e dei primati in linea evolutiva con l'uomo, infatti, alternava periodi di digiuno protratto, a causa dell'indisponibilità di cibo, con pasti abbondanti ricchi di grassi e di proteine ma poveri in carboidrati. L'IR rappresenterebbe quindi, un sistema ancestrale di risparmio energetico,

geneticamente codificato, che mira a salvaguardare l'uomo nei periodi di prolungato digiuno, prediligendo lo stoccaggio energetico rispetto al consumo. Perché si manifesti l'IR, la predisposizione genetica deve interagire con lo stile di vita. Questo è stato dimostrato in alcune popolazioni come gli aborigeni australiani o gli indiani Pima del Nordamerica nei quali la recente esposizione alla dieta occidentale ha causato un aumento della prevalenza di obesità e di Diabete di tipo 2 dall'1% al 25-40%²⁰. Diversi studi^{66,67} hanno dimostrato che uno stile di vita sedentario, caratterizzato da scarsa attività fisica soprattutto di tipo aerobico e una dieta ad elevato tenore calorico, ricca in carboidrati semplici e in lipidi ma povera in fibre vegetali rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di resistenza all'insulina. Infatti, alimenti ad alto indice glicemico inducono iperglicemia, quindi iperinsulinemia che a sua volta causa un fenomeno di "down regulation" recettoriale per l'insulina peggiorando la condizione di IR.

2.5.4 Basi molecolari dell'insulinoresistenza

A livello molecolare l'IR sembra essere dovuta a difetti localizzati in diversi punti del percorso dell'insulina, dalla sua produzione, al legame col suo recettore fino ad un'alterazione delle vie di trasduzione del segnale⁶⁸. I difetti a livello pre-recettoriale non sono tuttora noti mentre a livello recettoriale si può osservare un ridotto numero di recettori, un'alterata struttura del recettore stesso, una difettosa affinità di legame recettoriale o una difficoltosa trasmissione del segnale⁶⁹. Le alterazioni a livello post-recettoriale sono quelle per le quali vi è un maggior numero di evidenze scientifiche, perciò ci soffermeremo soprattutto su queste. Fisiologicamente l'insulina, in seguito al legame con il suo recettore tirosin chinasi localizzato sulla superficie cellulare a livello dei tessuti bersaglio, determina l'attivazione di due vie di segnalazione intracellulare: la via della Chinasi Inositolo-3 Fosfato (IP3-Chinasi) e

quella della Chinasi della Proteina attivata dai Mitogeni (Mitogen-Activated Protein Kinase: MAPK) ⁷⁰(Figura 11).

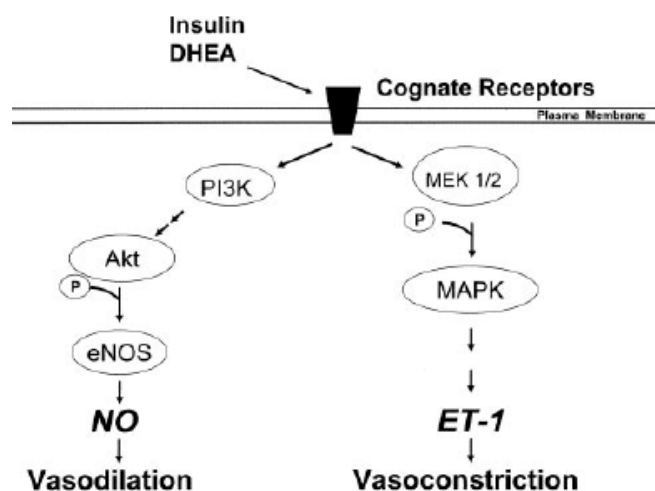


Figura 11. Principali vie di trasduzione del segnale del recettore insulinico a livello cellulare. (Kim et al. *Circulation* 2006 113(15):1888-904).

Gli effetti di queste due vie sono diametralmente opposti: la via dell'IP3 Chinasi stimola la captazione di glucosio da parte dei tessuti bersaglio (osso, cuore e muscoli, tessuto adiposo) ⁷¹ e la produzione di Ossido Nitrico (NO) a livello endoteliale ⁷² mentre la via della MAPK agisce a livello vascolare dove favorisce la proliferazione e la crescita delle cellule muscolari lisce, promuove la migrazione dei monociti ⁷³ ed ha un effetto protrombotico in quanto favorisce l'espressione del PAI-1 ⁷⁴. Da ciò si deduce come la via di trasduzione del segnale dell'IP3-chinasi abbia effetti positivi a livello endoteliale perché favorisce la vasodilatazione mediata dall'insulina mentre la via delle MAPK può essere definita proaterogena. È stato dimostrato che in condizioni di IR si manifesta un difetto a livello della via dell'IP3 Chinasi mentre la via della MAPK continua a funzionare correttamente ²⁸. Ne consegue uno sbilanciamento dei segnali post-recettoriali che potrebbe essere responsabile dei danni a livello vascolare che si verificano in tale circostanza. Le alterazioni della via di trasduzione del

recettore insulinico che causano IR possono essere indotte da alcune molecole, denominate adipochine, secrete dal tessuto adiposo, che agiscono con un meccanismo di tipo endocrino. Le principali molecole prodotte dal tessuto adiposo in grado di favorire l'IR sono il TNF- α e la Resistina, esistono tuttavia alcune adipochine in grado di favorire la sensibilità insulinica come la adiponectina e la leptina (a concentrazioni fisiologiche) ⁷⁵. La principale citochina capace di indurre IR risulta essere il TNF- α , la cui produzione è aumentata nel tessuto adiposo e muscolare di pazienti obesi e insulinoresistenti. Questa citochina si lega a due diversi recettori che una volta attivati stimolano I κ B kinase (IKK), una proteina ad attività chinastica in grado di inattivare la proteina IRS1 (Insulin receptor substrate 1) che fa parte della cascata di fosforilazioni a partenza dal recettore insulinico ⁷⁶. Il calo ponderale riporta nella norma la produzione di TNF- α ⁷⁷, che dunque potrebbe rappresentare uno dei mediatori dell'IR nell'obesità. Mediante la produzione di questo mediatore l'adipocita si tutela a fronte di un eccessivo accumulo di grasso inibendo la captazione insulino-mediata di glucosio ed inducendo un assetto cellulare antilipogenico. Ne consegue un ridotto accumulo di trigliceridi nel tessuto adiposo che si accompagna ad una ridotta sensibilità insulinica con aumento della lipolisi e dei livelli plasmatici di acidi grassi liberi. Il TNF- α inoltre inibisce la lipasi lipoproteica (LPL), enzima che agisce a livello endoteliale favorendo il metabolismo delle lipoproteine. Ciò determina un aumento del colesterolo LDL e dei trigliceridi circolanti ⁷⁸. Ulteriori alterazioni in grado di scatenare IR sono state riscontrate nell'ambito del sistema effetore: una difettosa azione del sistema di trasporto del glucosio mediata dal trasportatore GLUT-4 può essere riconducibile a diversi meccanismi come riduzione del contenuto intracellulare di GLUT-4, sua difettosa traslocazione sulla membrana cellulare o riduzione della sua attività funzionale ⁷⁹.

2.5.5 Conseguenze metaboliche dell'insulinoresistenza

Gli effetti metabolici dell'IR si esplicano a livello di 4 organi principali: tessuto adiposo, muscolo, fegato e pancreas endocrino. Questi organi, soprannominati "the deadly quartet", hanno ruoli ben precisi ed interdipendenti nello sviluppo e nel mantenimento dello stato di IR e nello sviluppo del Diabete Mellito di tipo 2 (Figura 12).

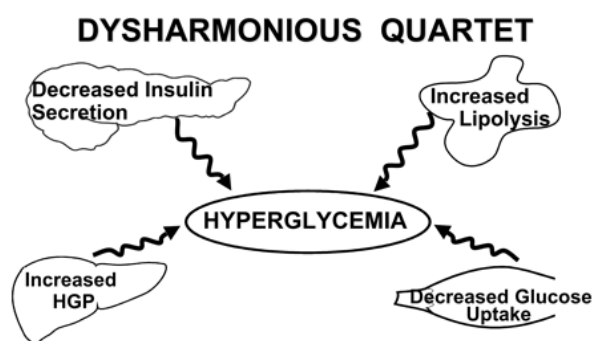


Figura 12. Interrelazione tra tessuto adiposo, tessuto muscolare, fegato e pancreas nel mantenimento dello stato di insulinoresistenza e nella genesi del Diabete Mellito di tipo 2. (DeFronzo RA *Med Clin North Am.* 2004 Jul;88(4):787-835).

Effetti sul tessuto adiposo

Le osservazioni più recenti attribuiscono un ruolo sempre maggiore al tessuto adiposo nella genesi e nel mantenimento dell'IR. Fisiologicamente a livello adipocitario l'insulina inibisce la lipolisi mediante l'inibizione della lipasi ormonosensibile e stimola l'attività della LPL, favorendo la lipogenesi. L'effetto antilipolitico dell'insulina si esplica principalmente nel periodo postprandiale. Nei soggetti insulinoresistenti questo meccanismo risulta fortemente compromesso portando ad un'esaltata lipolisi sia a digiuno sia nel periodo postprandiale e quindi ad un aumento dell'immissione in circolo di Free Fatty Acids (FFA)⁸⁰. In condizioni di IR, inoltre, l'attività enzimatica della LPL risulta fortemente rallentata, favorendo ulteriormente la mobilizzazione degli acidi grassi⁸¹. La quantità di FFA rilasciati dal tessuto

adiposo nelle 24 ore non è elevata, ma è il protrarsi del fenomeno nel tempo che condiziona i meccanismi dismetabolici a valle nel fegato, nel muscolo e nel pancreas⁸². La quantità di FFA immessi in circolo è maggiore nei soggetti obesi, in particolare in quelli con distribuzione centrale o viscerale dell'adipe⁸³. Il tessuto adiposo viscerale, soprattutto addominale, rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo presenta, infatti, una maggiore attività lipolitica, una incrementata vascolarizzazione, un'aumentata attività simpatico-adrenergica e un maggiore rilascio di adipochine e di citochine. Inoltre, gli FFA liberati dal tessuto adiposo viscerale vengono immessi nel circolo portale, raggiungendo direttamente il fegato senza essere prima metabolizzati dai tessuti periferici, in particolare dal muscolo scheletrico e dal cuore⁸⁴.

Effetti a livello epatico

L'IR epatica può essere definita come la ridotta capacità dell'insulina di sopprimere la sintesi epatica di glucosio. L'insulina inibisce due enzimi-chiave del metabolismo glucidico: la fosfoenolpiruvico-carbossi chinasi, ovvero la tappa limitante della gluconeogenesi, e la glucosio 6-fosfatasi, tappa finale della glicogenolisi. In condizioni di IR questa azione risulta fortemente deficitaria poiché gli FFA provenienti dal tessuto adiposo, una volta raggiunto il circolo portale, sono captati dal fegato dove sono in grado di aumentare l'IR epatica promuovendo la gluconeogenesi a partire da un surplus di Acetil-CoA disponibile ed inducendo la soppressione della glicogenosintesi indotta dall'insulina. Ne consegue una aumentata produzione epatica di glucosio cosicché il fegato immette in circolo una maggior quantità di glucosio, determinando iperglicemia.

Il fegato trasforma gli FFA in trigliceridi che tornano in circolo come VLDL (very low density lipoproteins). La LPL endoteliale trasforma le VLDL circolanti in lipoproteine remnants ad elevata quantità di colesterolo e quindi in LDL fenotipicamente alterate, le cosiddette LDL

“piccole e dense”, associate ad un maggior rischio di sviluppo della placca e della sua instabilità. L’alterazione delle VLDL e delle LDL causa un anomalo scambio di trigliceridi e colesterolo esterificato tra loro e le HDL, che risultano più soggette alla “clearance” epatica. Questo fenomeno spiega la riduzione delle HDL circolanti, che insieme all’ipertrigliceridemia ed alla presenza di LDL piccole e dense costituisce la triade lipidica caratteristica degli stati di IR. I trigliceridi che non vengono ossidati o incorporati nelle VLDL si accumulano all’interno degli epatociti determinando la condizione nota come NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) che può evolvere verso la steatoepatite e la cirrosi epatica⁸⁵.

Effetti sul tessuto muscolare

Quantitativamente il muscolo è il principale tessuto insulino-dipendente, perciò la presenza di IR muscolare, se non compensata da un contestuale aumento della secrezione insulinica, determina intolleranza ai carboidrati⁸⁶. Gli FFA a livello muscolare competono con il glucosio con un meccanismo definito di “furto di substrato”, inibiscono la cascata di attivazione dell’insulina e bloccano l’assorbimento muscolare di glucosio tramite l’inibizione dei trasportatori GLUT-4 e GLUT-1. Ne consegue un aumento di FFA circolanti, che determina una minore captazione di glucosio ed una maggiore ossidazione degli FFA da parte del muscolo.

Un altro dato importante è la tendenza all’accumulo di trigliceridi in sede intramuscolare che si verifica nei soggetti insulino-resistenti⁸⁷. La causa di questo fenomeno va ricercata nel deficit dell’ossidazione dei grassi nei periodi di digiuno, condizione metabolica tipica del soggetto insulino-resistente. L’eccesso di FFA e di trigliceridi nel muscolo determina un incremento di derivati acilati e di diacilglicerolo (DAG) che sono in grado di peggiorare la condizione di IR. In particolare il DAG può attivare diverse isoforme della Proteina Chinasasi C

(PKC) che inibisce l'azione dell'insulina agendo direttamente su IRS-1 ed inibendo la glicogenosintesi.

Effetti sul pancreas

Gli FFA, in particolare quelli saturi e a lunga catena, in acuto sono in grado di stimolare la secrezione insulinica da parte della β -cellula⁸⁸. Esperimenti condotti sia *in vitro* sia *in vivo* hanno infatti permesso di chiarire che mentre l'esposizione acuta (<4 ore) ad acidi grassi stimola il rilascio dell'ormone, l'esposizione protratta della β -cellula ad elevate concentrazioni di FFA può contribuire ad inibire la secrezione insulinica⁸⁹. Il permanere di elevati livelli circolanti di FFA sia a digiuno sia nel periodo postprandiale, come osservato nell'IR, nell'obesità e nel diabete di tipo 2, determina un accumulo progressivo di grassi in sede insulare con un meccanismo definito di lipotossicità. Tale fenomeno causa dapprima iperplasia della β -cellula con ipersecrezione insulinica ma a lungo termine apoptosi della stessa.

I mediatori del danno β -cellulare indotti dalla lipotossicità sono diversi: l'eccesso di NO causato dall'attivazione della NO sintasi inducibile⁹⁰, l'accumulo di ceramidi⁹¹, l'attivazione di isoforme della PKC che potenziano l'apoptosi cellulare indotta dal palmitato e l'aumentata attività dell'enzima Caspasi 3⁴⁷. Ciò determina la progressiva riduzione della secrezione insulinica e quindi la progressiva incapacità della β -cellula di fronteggiare l'aumentata produzione epatica di glucosio. Questo squilibrio porta all'instaurazione di uno stato di iperglicemia cronica che si configura inizialmente come intolleranza glucidica poi progredisce sino a sfociare nel Diabete Mellito di tipo 2.

L'iperglicemia inoltre, mediante un fenomeno definito glucotossicità, è in grado di inibire ulteriormente la secrezione insulinica. Si viene così a determinare un circolo vizioso che tende a cronicizzare e ad inasprire la condizione di IR (Figura 13).

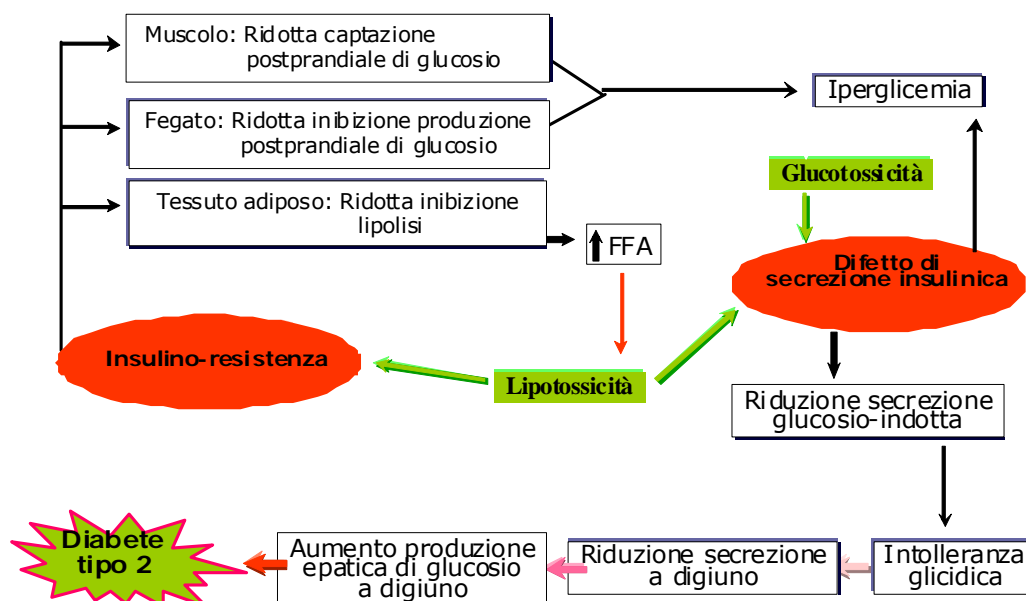


Figura 13. Circoli viziosi fisiopatologici comuni, iniziali ed avanzati, che conducono alla malattia diabetica conclamata.

2.5.6 Insulinoresistenza: l'evoluzione della Sindrome

L'associazione tra IR e fattori di rischio cardiovascolare è stata definita nel 1988 da Reaven come Sindrome da insulinoresistenza o Sindrome X^{92,93}. In particolare l'IR si associa ad obesità centrale, ridotta tolleranza al glucosio, "dislipidemia aterogena" (elevata trigliceridemia, ridotto colesterolo HDL, aumento delle LDL piccole e dense)⁹⁴ ed ipertensione arteriosa⁹⁵. La sindrome da IR predispone pertanto i soggetti al rischio di sviluppare diverse patologie tra cui Diabete di tipo 2, ipertensione arteriosa, aterosclerosi e malattia CV. Uno studio che ha illustrato in modo efficace la relazione tra IR e rischio CV è stato lo Studio Barilla, condotto su una popolazione di 647 soggetti sani non diabetici, ma con diversi gradi di IR definiti sulla base dei quartili di insulinemia 120 minuti dopo carico orale di glucosio⁹⁶. I soggetti appartenenti al quarto quartile hanno sviluppato nel corso dei 15 anni di osservazione previsti dallo studio, la maggiore incidenza di casi di diabete, ipertensione ed eventi CV (Figura 14).

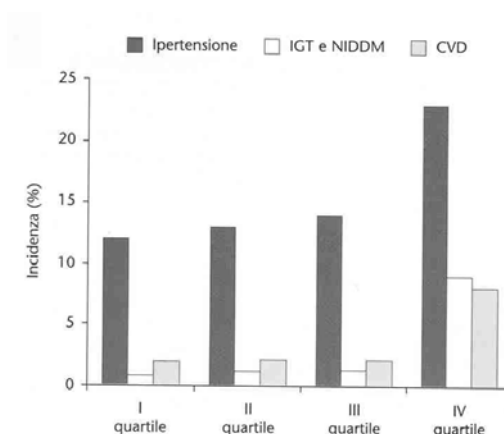


Figura 14. Incidenza di varie patologie nello studio Barilla a seguito di 15 anni di osservazione in 647 soggetti sani, non diabetici, ma con diversi gradi di insulinoresistenza definiti sulla base dei quartili di insulinemia 2 ore dopo carico orale di glucosio. (IGT= Impaired Glucose Tolerance, NIDDM= Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, CVD= Cardio-Vascular Diseases). (Zavaroni I et al. *Metabolism* 1999; 48: 989-994).

Nonostante sia ampiamente documentata e riconosciuta l'importanza dell'IR come fattore di rischio CV, permane il problema dell'individuazione sul piano clinico dei soggetti insulinoresistenti. I test che abbiamo precedentemente elencato per la misurazione dell'IR possono risultare utili ma si tratta di misurazioni complesse, indaginose e con costi elevati, quindi non sarebbe agevole un loro utilizzo routinario nella pratica clinica. Inoltre, non esistendo "cut-off" universalmente riconosciuti per stabilire i valori di normalità dell'insulinemia o il grado di alterazione, occorre fare riferimento alla loro distribuzione nella popolazione in esame⁹⁷. Pertanto, al fine di individuare con una buona approssimazione i soggetti insulinoresistenti, sono stati proposti diversi criteri clinici che si basano sulla presenza di un certo numero di alterazioni metaboliche ed emodinamiche che si associano all'IR (Tabella 1).

	WHO (1998)	EGIR (1999)	INCEP (2001)	IDF (2005)
Definizione	IGT,IFG, Diabete Mellito tipo 2, o bassa sensibilità insulinica e ≥ 2 dei seguenti fattori di rischio	Insulinemia a digiuno $>75^{\circ}$ percentile e ≥ 2 dei seguenti fattori di rischio	≥ 3 dei seguenti fattori di rischio	Circonferenza addome: >94 cm (uomini) >80 cm (donne) E >2 dei seguenti fattori di rischio
obesità	BMI >30 e/o rapporto vita/fianchi >0.9 (uomini) >0.85 (donne)	Circonferenza addome >94 cm (uomini) >84 cm (donne)	Circonferenza addome ≥ 102 cm (uomini) ≥ 88 cm (donne)	
lipidi	Trigliceridi ≥ 150 mg/dl e/o HDL <35 mg/dl (uomini) <39 mg/dl (donne)	Trigliceridi ≥ 180 mg/dl e/o HDL <39 mg/dl	Trigliceridi ≥ 150 mg/dl HDL <40 mg/dl (uomini) <50 mg/dl (donne)	Trigliceridi ≥ 150 mg/dl HDL <40 mg/dl (uomini) <50 mg/dl (donne) o trattamento antilipidemico
Glucosio	IGT, IFG o Diabete di tipo 2	IGT, IFG ma non Diabete di tipo 2	Glicemia ≥ 110 mg/dl	Glicemia ≥ 100 mg/dl
Pressione arteriosa	$\geq 140/90$ mmHg	$\geq 140/90$ mmHg o trattamento antipertensivo	$\geq 130/85$ mmHg	>130 SBP o >85 DBP mmHg o trattamento antipertensivo
Altro	microalbuminuria			

Tabella 1. Le principali definizioni di Sindrome Metabolica. (SBP= Systolic Blood Pressure, DBP= Diastolic Blood Pressure, IFG= Impaired Fasting Glucose, IGT=Impaired Glucose Tolerance, HDL=High Density Lipoprotein).

La prima definizione di Sindrome Metabolica fu data nel 1998 dal WHO (World Health Organization) ⁹⁸. Questa definizione poneva l'accento sull'alterata tolleranza glucidica e quindi includeva i diabetici di tipo 2 ma non i soggetti insulinoresistenti con una normale tolleranza ai carboidrati. La valutazione della tolleranza glucidica richiede uno screening con OGTT, pertanto la diagnosi poteva essere posta solo a seguito dell'esecuzione di questo esame.

Nel 1999 l'EGIR propose una nuova definizione di Sindrome Metabolica nella quale non vi era più alcun riferimento agli stati di intolleranza ai carboidrati, bensì all'insulinemia a digiuno come parametro per valutare l'IR in associazione ad almeno 2 fattori di rischio tra obesità addominale, ipertrigliceridemia, alterata tolleranza ai carboidrati (ma non Diabete di tipo 2) e

ipertensione arteriosa ⁹⁹. In tal modo i soggetti diabetici non venivano inclusi nella definizione di Sindrome Metabolica, ma si rendeva necessaria una misurazione dell'insulinemia a digiuno ed una standardizzazione di questo dato nella popolazione generale in quanto, come abbiamo visto in precedenza, si tratta di una variabile biologica continua.

La definizione di Sindrome Metabolica più attuale e maggiormente applicata nella pratica clinica è stata formulata nel 2001 dall'ATP III come una "costellazione di fattori di rischio lipidici e non lipidici di origine metabolica, strettamente legata all'insulinoresistenza" ¹⁰. Attraverso questo report dell'ATP III, la comunità cardiologica americana, oltre a proporre i criteri diagnostici della Sindrome Metabolica, ha ufficialmente riconosciuto l'importanza dell'IR e delle alterazioni ad essa correlate nello sviluppo della malattia CV. Questa definizione si è dimostrata la più agevole e la meno costosa per l'utilizzo nella pratica clinica in quanto si basa essenzialmente su criteri clinici: circonferenza addominale, trigliceridemia, valore di colesterolo HDL, glicemia a digiuno e pressione arteriosa. L'alterazione di almeno 3 di questi valori consente di fare la diagnosi di Sindrome Metabolica secondo i criteri dell' ATP III.

Al fine di definire l'epidemiologia della Sindrome da insulinoresistenza, i criteri diagnostici proposti dall'ATP III sono stati applicati ad un'ampia popolazione americana di età superiore ai 20 anni nello studio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) ¹⁰⁰. Da questo studio è risultata una frequenza della sindrome da insulinoresistenza simile negli uomini e nelle donne (24,45% vs 23,45%) e una prevalenza che aumenta con l'avanzare dell'età: 6,7% nella fascia dai 20 ai 29 anni, 42,5% al di sopra dei 79 anni. Nelle donne la prevalenza della Sindrome è risultata più elevata in post-menopausa rispetto alla pre-menopausa (Figura 15).

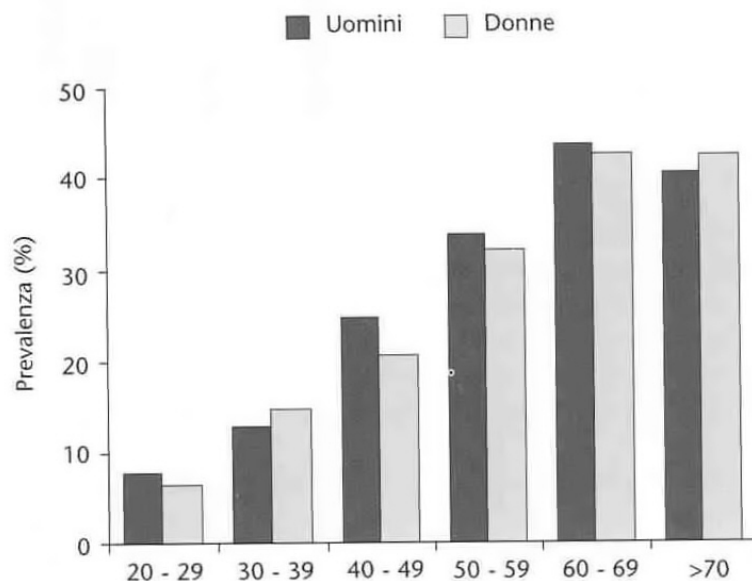


Figura 15. Prevalenza della sindrome metabolica in base all'età (criteri ATP III). (Modificata da Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, JAMA 2001; 285: 2486-2497).

Lo studio NHANES è stato condotto su una popolazione multietnica ed ha evidenziato che la prevalenza della sindrome da IR varia anche in base al gruppo etnico di appartenenza. La popolazione afroamericana ha una prevalenza della sindrome molto inferiore rispetto alla popolazione messicano-americana, ma anche una diversa distribuzione della circonferenza vita e una maggiore prevalenza di ipertensione. La mortalità e l'incidenza di diabete sono, tuttavia, molto elevate nella popolazione afroamericana e questo ha posto il dubbio che i criteri di classificazione proposti dall'ATP III non siano ugualmente validi nella predizione dello sviluppo di diabete in diversi gruppi etnici (Figura 16).

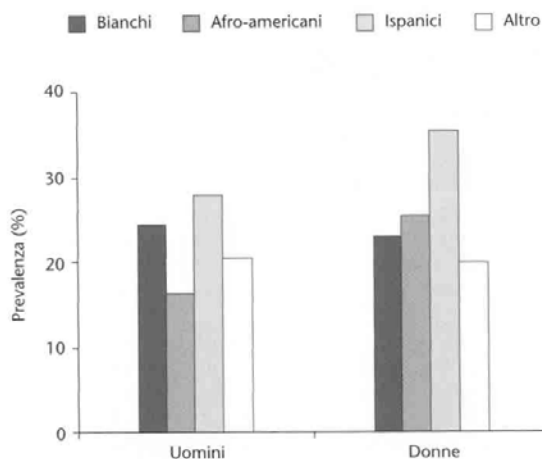


Figura 16. Prevalenza della sindrome metabolica nelle diverse razze (criteri ATP III) (Modificata da Ford ES et al. JAMA 2002; 287:356-359).

2.5.7 Alterazioni cliniche associate all' insulinoresistenza

Non è tuttora chiara la correlazione tra le diverse componenti della sindrome da IR, ma è possibile definire i principali fattori di rischio correlati allo stato di resistenza insulinica.

Alterata tolleranza ai carboidrati

Si tratta della prima alterazione glicemica che si manifesta qualora l'iperinsulinemia compensatoria non sia più adeguata al mantenimento dei valori glicemici. Si manifesta come alterata glicemia a digiuno (IFG – Impaired Fasting Glucose) o come alterata tolleranza ai carboidrati dopo carico di glucosio (IGT- Impaired Glucose Tolerance).

Dislipidemia

La mancata inibizione insulino-mediata della lipolisi causa un aumento degli FFA che giungono al fegato, con conseguente incremento della produzione epatica di VLDL, ricche in trigliceridi. La LPL endoteliale trasforma le VLDL circolanti in lipoproteine remnants ad elevata quantità di colesterolo e quindi in LDL "piccole e dense", associate ad un maggior rischio di sviluppo della placca. L'anomalo scambio di trigliceridi e colesterolo esterificato che avviene in circolo tra le LDL e le HDL determina una maggiore suscettibilità di queste ultime

alla clearance epatica. Questo fenomeno spiega la riduzione delle HDL circolanti, che insieme alla ipertrigliceridemia e alle LDL piccole e dense costituisce la triade lipidica aterogena caratteristica degli stati di IR ⁴⁰.

Iperensione arteriosa

Benché sia un disordine di origine multifattoriale, i meccanismi per cui una condizione di IR correla eziopatogeneticamente con l'ipertensione arteriosa sono diversi in quanto l'iperinsulinemia induce un aumentato riassorbimento renale di sodio ¹⁰¹, l'iperattivazione del sistema nervoso simpatico ¹⁰² e la presenza di sensibilità al sale ¹⁰³. Queste condizioni causano un aumento del volume extracellulare, con conseguente ipertensione. L'aumento della pressione arteriosa è dovuto anche ad un aumento delle resistenze periferiche totali mediato dall'ipertono simpatico, dall'alterata distribuzione dei cationi intracellulari a livello delle cellule muscolari lisce vasali (con aumento del calcio e del sodio) ¹⁰⁴ e dalla stimolazione insulino-mediata della proliferazione dei miociti e dei fibroblasti vasali ¹⁰⁵.

Stato proinfiammatorio

La resistenza insulinica di per sé si associa ad una condizione infiammatoria cronica, a sua volta in grado di favorire lo sviluppo di disfunzione endoteliale ed aterosclerosi. Tale stato è mantenuto dalle citochine proinfiammatorie prodotte dal tessuto adiposo viscerale ³⁰, dallo stress ossidativo a livello endoteliale ¹⁰⁶ e dall'attivazione del sistema monocito-macrofagico in seguito alla fagocitosi dei depositi lipidici a livello vasale. Lo stato proinfiammatorio favorisce lo sviluppo e la seguente rottura della placca aterosclerotica ¹⁰⁷.

Disordini della funzione emostatica

E' molto frequente negli stati di IR uno stato protrombotico dimostrato dall'aumento del fibrinogeno ¹⁰⁸, del PAI-1 ¹⁰⁹ e da diverse alterazioni a livello dell'attivazione piastrinica. In particolare le piastrine di soggetti insulinoresistenti mostrano una ridotta sensibilità agli

agenti che fisiologicamente si oppongono all'aggregazione piastrinica a causa di alterazioni nella trasduzione del segnale, di un'aumentata sintesi di trombossano A₂ e di un'aumentata espressione e funzione del complesso GPIIb/IIIa (Glicoproteina IIb/IIIa) posto sulla membrana cellulare. Inoltre l'aggregazione piastrinica è favorita dallo stress ossidativo che causa la produzione di isoprostano, fattore in grado di attivare le piastrine legandosi al recettore del trombossano ¹¹⁰.

Iperuricemia

Nella sindrome da IR si riscontra spesso uno stato di iperuricemia, la cui eziopatogenesi non è ad oggi del tutto nota. Tra le ipotesi più accreditate vi è quella secondo cui l'iperinsulinemia compensatoria ridurrebbe la clearance renale dell'acido urico ¹¹¹.

In conclusione, la resistenza insulinica predispone allo sviluppo di dislipidemia, alterata tolleranza ai carboidrati, iperuricemia, ipertensione, stato proinfiammatorio e protrombotico.

2.5.8 Sindrome da insulinoresistenza e rischio cardiovascolare

Finora pochi studi longitudinali hanno valutato la relazione tra sindrome da IR e mortalità CV. Il primo studio in tal senso è stato lo studio "Diabetes Epidemiology Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe" (DECODE) su iniziativa del Gruppo di studio Europeo dell'Epidemiologia del Diabete ¹¹² che si proponeva di valutare la prevalenza della sindrome metabolica in una larga popolazione di soggetti non diabetici e l'incidenza di mortalità CV nel periodo di follow-up. La mortalità generale nella popolazione affetta dalla sindrome metabolica era più elevata rispetto ai controlli ed in particolare la mortalità cardiovascolare è risultata 2,26 volte superiore negli uomini e 2,78 volte superiore nelle donne con sindrome metabolica dopo aver corretto per diversi fattori di confondimento (età, fumo ed

ipercolesterolemia).

Durante gli 11 anni di follow-up previsti dallo studio ARIC ¹¹³ l'aumento del rischio di cardiopatia ischemica associato alla sindrome metabolica risultava 1,7 volte superiore negli uomini e 2,6 volte nelle donne con sindrome metabolica. Oltre che in popolazioni di soggetti sani, la mortalità CV è risultata aumentata, anche in studi effettuati su soggetti con diabete di tipo 2: il Bruneck Study ha dimostrato che la presenza di sindrome metabolica ha comportato nel periodo di osservazione un'incidenza di malattie cardiovascolari 5 volte superiore rispetto ai diabetici non affetti da sindrome metabolica ¹¹⁴.

L'aumentato rischio CV nei soggetti affetti da sindrome da IR è dovuto a diversi fattori ma ancora non è noto che peso abbiano l'IR e la disfunzione endoteliale nello sviluppo della patologia CV, in quanto l'IR è un fattore di rischio CV complesso perché strettamente associato alle sue dirette conseguenze. Se la resistenza insulinica risulta una variabile correlata al rischio CV in maniera indipendente rispetto al sesso, all'età, al BMI, non lo è più quando nell'analisi statistica multivariata sono introdotti i parametri alterati nella sindrome metabolica. In numerosi studi longitudinali la resistenza insulinica non risulta correlata in modo indipendente al rischio CV, mentre in altri studi è stata riscontrata una correlazione molto debole. Alla base del problema vi è un limite statistico che si pone quando variabili strettamente associate sono introdotte insieme in un'analisi multivariata: i parametri connessi possono mascherare il valore predittivo della resistenza insulinica e inficiare il risultato ¹¹⁵.

Inoltre la complessità del problema tra malattie CV e suoi fattori di rischio è insito al problema stesso avendo la patologia CV genesi multifattoriale, caratterizzata dall'intreccio di numerosi fattori genetici e ambientali, che in larga parte non sono ancora stati identificati.

Ecco ripresentarsi un problema già accennato precedentemente: i fattori di rischio CV noti

non sono sufficienti a spiegare l'incidenza di nuovi eventi CV in pazienti apparentemente sani, esiste infatti quello che è chiamato "Detection Gap" tra i pazienti notoriamente a rischio che quindi sono sottoposti a trattamento e quella che è la reale totalità di pazienti a rischio CV ¹¹⁶. Per ovviare a questo problema negli anni scorsi la ricerca è stata spinta a identificare nuovi fattori di rischio CV, per l'appunto così detti "Emergenti". Nonostante, come già ampiamente discusso in precedenza, siano notevoli i risultati a riguardo, ad oggi non è certo possibile considerare colmato il "Detection Gap". E' infatti ancora forte l'impulso a ricercare altri marcatori per la malattia coronarica che possano avere un legame causale con il processo aterotrombogeno. Sono peraltro necessarie ulteriori e più approfondite ricerche per stabilire con certezza, sia l'importanza patogenetica dei nuovi fattori di rischio, sia le più efficaci strategie per prevenire e modulare il decorso clinico della malattia aterosclerotica ¹⁷. Il futuro mira ad identificare ulteriori marcatori in grado di fornire una migliore accuratezza nella determinazione del rischio CV totale, sfruttando nuove tecniche di "imaging", genetica e di "Neural Network Analysis (NNA) ¹¹⁷, ovvero la cosiddetta "Intelligenza Medica Artificiale", che permetterà non solo una migliore stratificazione del rischio ¹¹⁷, ma anche una migliore comprensione dell'interazione fra i vari fattori di rischio CV ¹¹⁸ noti, come diabete e IR, e quelli emergenti. E' in questo contesto che si inserisce lo studio sulla relazione tra numero di cellule progenitrici endoteliali, lunghezza telomerica leucocitaria (LTL), IR e rischio CV.

2.6 Cellule progenitrici endoteliali (EPCs)

2.6.1 Equilibrio tra danno e riparazione endoteliale

L'attore principale dei processi di aterosclerosi è l'endotelio vascolare, ovvero l'interfaccia tra sangue circolante e parete vascolare. Lo strato di cellule endoteliali rappresenta una superficie non adesiva per le piastrine e per i leucociti circolanti e produce importanti fattori regolatori, tra i quali il più importante è l'NO. L'endotelio ha una funzione protettiva nei confronti della genesi e delle complicanze della placca ateromastica, mentre la disfunzione endoteliale è un evento critico per favorire questo processo. L'invecchiamento e l'esposizione ai fattori di rischio che abbiamo precedentemente analizzato portano al rilascio di TNF- α ed alla conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno che causano danno ed apoptosi delle cellule endoteliali. L'apoptosi contribuisce in modo sostanziale alla disfunzione endoteliale in quanto la perdita dell'integrità endoteliale si comporta come stimolo per la trombosi e la proliferazione di cellule muscolari lisce¹¹⁹. Il bilancio tra danno e riparazione endoteliale è dunque un punto chiave per il mantenimento dell'omeostasi vascolare. La riparazione dell'endotelio danneggiato potrebbe verificarsi grazie alla migrazione ed alla proliferazione di cellule endoteliali mature se non fosse che esse sono differenziate in modo terminale, con un basso potenziale proliferativo e quindi con una capacità limitata di sostituirsi alle porzioni di endotelio danneggiato¹²⁰.

Nel 1997 Asahara e collaboratori identificarono per la prima volta una popolazione di cellule circolanti con proprietà simili a quelle degli angioblasti embrionali, capaci tuttavia di differenziarsi *ex vivo* in un fenotipo endoteliale. Queste cellule vennero definite Cellule Progenitrici Endoteliali¹²¹. L'importanza di questa scoperta risiede nel superamento del paradigma che la neovascolarizzazione post-natale fosse mediata esclusivamente dalla

proliferazione e rimodellamento delle cellule endoteliali già differenziate provenienti da vasi preesistenti, aprendo nuove prospettive di ricerca sia diagnostiche che terapeutiche.

2.6.2 Definizione di EPCs

Non esiste, ad oggi, in letteratura una definizione univoca di EPCs. Il concetto di EPCs, è basato sulle caratteristiche che esse possiedono, quali essere cellule non-endoteliali ad origine dal midollo osseo ematopoietico dell'adulto, con capacità di espansione clonale (abilità di una singola cellula di moltiplicarsi), di staminalità (capacità proliferative e differenziativa).

2.6.3 Origine e differenziazione delle EPCs

Le EPCs derivano dalle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) del midollo osseo, ed esprimono pertanto specifici marcatori di superficie caratteristici di staminalità quali il CD133 ed il CD34¹²². Nel processo di differenziazione le EPCs acquisiscono marcatori endoteliali precoci come il Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2), detto anche kinase insert domain receptor (KDR). Progressivamente si assiste alla perdita del CD133, marcatore di staminalità più precoce, che porta ad una sottopopolazione di EPCs con fenotipo CD34⁺/KDR⁺. Vi sono differenti fenotipi (CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺, CD133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺) che identificano la popolazione delle EPCs, essi hanno breve emivita, sono quindi transienti e riscontrabili anche contemporaneamente nel circolo sanguigno. Il processo differenziativo gradualmente porta a delineare Cellule Endoteliali Circolanti (CECs) caratterizzate dall'espressione di marcatori endoteliali maturi come il CD31 (o PECAM-1, platelet cell adhesion molecule-1), la VE-cad (caderina vascolare-endoteliale) e il von Willebrand factor (vWF) accompagnata dalla perdita di marcatori di staminalità. Nei processi

di differenziazione delle CECs in cellule endoteliali mature (ECs), si assiste ad una elevata espressione di tutti i marcatori specifici della linea delle cellule endoteliali quali: VE-cadherin, vWF, endothelial nitric oxide synthase, CD146 ed E-selectina¹²³ (Figura 17).

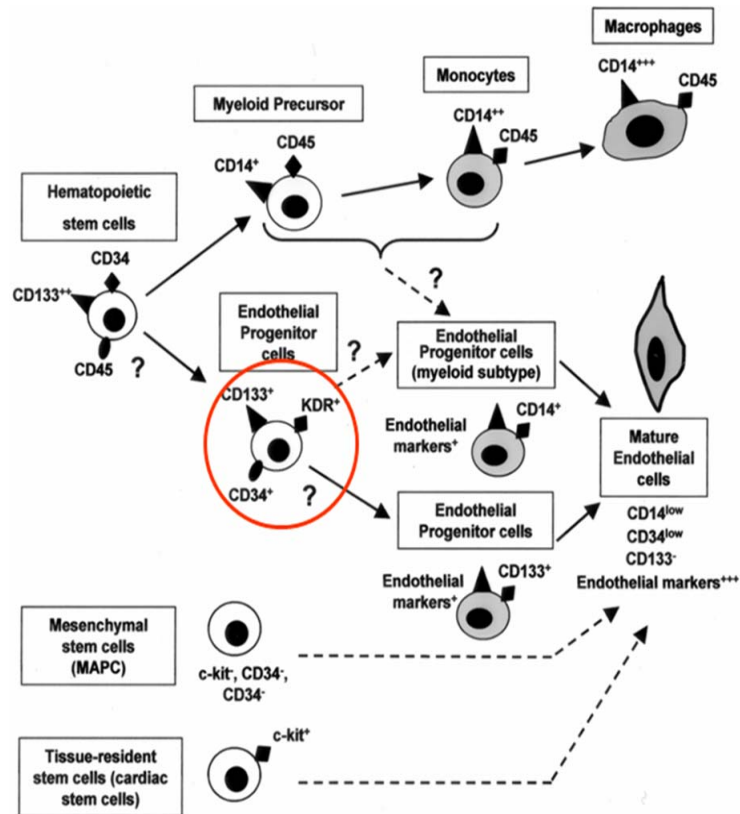


Figura 17: Origine e differenziazione delle Cellule Progenitrici Endoteliali (EPCs) dalle cellule staminali. (Urbich C et al. *Circulation Research*, 2004; 95:343-353).

2.6.4 Caratterizzazione ed identificazione delle EPCs

Esistono due approcci differenti per la identificazione e la caratterizzazione delle EPCs: la tecnica citofluorimetrica e quella delle colture cellulari. Queste metodiche rispondono a quesiti ed esigenze di ricerca diverse.

La tecnica citofluorimetrica si basa sulla identificazione delle EPCs mediante la valutazione dell'espressione di antigeni di superficie: marcatori di staminalità e di differenziazione in senso endoteliale maturo. Come già accennato i più comuni marcatori di staminalità utilizzati

sono il CD34 ed il CD133. Il CD34, pur identificando il pool di cellule progenitrici ematopoietiche, può essere espresso, sia pure a bassi livelli, anche dalle cellule endoteliali mature; per questa ragione alcuni ricercatori ritengono il CD133 un marcatore più attendibile di pluripotenza¹²⁴. Come marcatore endoteliale specifico, viene utilizzato il KDR in quanto rappresenta il marcatore più precoce di differenziazione in senso endoteliale. Sebbene la triplice marcatura (CD34, CD133 e KDR) sia, in teoria, la più completa per la caratterizzazione delle EPCs, non esiste in letteratura un consenso sul fenotipo antigenico da utilizzare per la precisa identificazione di queste cellule. Inoltre, data la rarità in circolo delle cellule esprimenti il CD133/CD34/KDR, diventa necessario poter selezionare sottopopolazioni (CD34⁺/KDR⁺ e CD133⁺/KDR⁺) con un fenotipo meno restrittivo e quindi più facilmente identificabile ma, forse, inevitabilmente meno accurato¹²⁵. Il numero di EPCs circolanti può essere espresso come numero assoluto ogni 10⁶ eventi citofluorimetrici, oppure in termini di percentuale all'interno di una popolazione o sottopopolazione citofluorimetrica. La caratterizzazione delle EPCs attraverso l'analisi citofluorimetrica ha il vantaggio di poter selezionare una popolazione più omogenea di cellule e di poter identificare più sottopopolazioni cellulari contemporaneamente, ma resta, tuttavia, complessa per l'assenza di marcatori unici e restrittivi per le presunte EPCs, data la co-espressione di antigeni di superficie comuni rispetto a quelli espressi sulle cellule della linea ematopoietica e sulle cellule endoteliali circolanti. Un'altra importante restrizione della metodica citofluorimetrica è la mancanza di informazioni di tipo funzionale.

L'approccio *ex vivo* (colture cellulari), al contrario, permette non solo l'identificazione e la valutazione numerica delle EPCs, ma fornisce informazioni anche di tipo funzionale. Questo si basa sull'isolamento delle EPCs dalla popolazione dei mononucleati circolanti da sangue periferico e sulla valutazione della loro capacità proliferativa (capacità di formare colonie), e

di differenziarsi in cellule endoteliali mature. Inoltre, è possibile eseguire test di funzione quali la valutazione della capacità di formare strutture tubulari simil-vascolari (“tubular forming assay”) e di migrazione, in seguito all’esposizione a sostanze chemiotattiche (“migration assay”). Le metodiche che prevedono l’allestimento di colture di EPCs, oltre che per l’espressione di marcatori specifici di membrana, vengono spesso caratterizzate per le proprietà funzionali. Esse mostrano infatti la capacità di “uptake” di LDL acetilate (AcLDL) e di legame con la Lectina, entrambe caratteristiche tipiche delle cellule appartenenti alla linea endoteliale ¹²⁶(Figura 18).

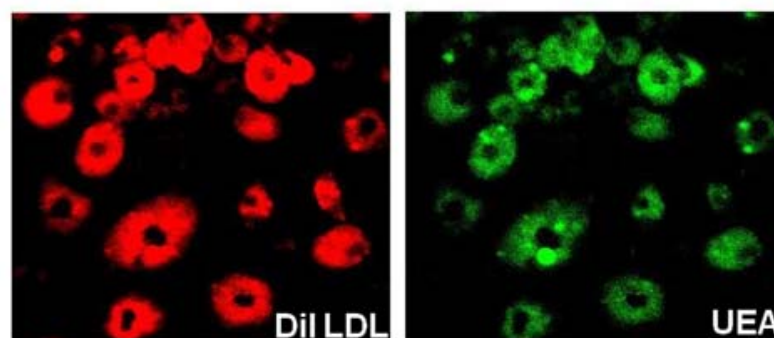


Fig 18: Immagine al microscopio a fluorescenza che mostra la colorazione delle EPCs con anticorpo anti-AcLDL (rosso) e Lectina (verde). (Kang L et al. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009)

Sono stati descritti in letteratura almeno 3 differenti protocolli di isolamento delle EPCs in coltura, parzialmente differenti tra loro ¹²⁷.

Il primo si basa sulla metodica messa a punto da Asahara e collaboratori in cui le cellule mononucleate vengono coltivate su piastre ricoperte di fibronectina e, dopo 48h, quelle non aderenti vengono ri-seminate generando colonie CFU-ECs (o CFU-Hill) dopo 5-9 giorni ¹²⁸ (Figura 19, Metodo A). La ri-semina delle cellule viene effettuata per ridurre la eterogeneità della popolazione cellulare di partenza (mononucleati, MNCs), escludendo le cellule di

origine mesenchimale e le cellule endoteliali mature che aderiscono rapidamente in coltura, ma non le cellule ad origine mieloide o i progenitori non ematopoietici che rimangono in sospensione.

In un altro protocollo, ampiamente utilizzato e metodologicamente simile, le MNCs vengono coltivate in terreno specifico, e le cellule aderenti in coltura dopo 4 giorni vengono identificate come cellule circolanti angiogeniche (CACs) (Figura 19, Metodo B), poiché sembrano promuovere la neo-vascolarizzazione dopo evento cardiovascolare acuto in modelli animali. Esse sono morfologicamente differenti dalle CFU-ECs, sebbene siano simili in termini di marcatori di superficie e di funzionalità ¹²⁹. Un terzo approccio, prevede l'isolamento di MNCs da sangue periferico e la semina su piastre coperte da collagene-1 in terreno di crescita specifico. Le ECFCs (Endothelial Colony-Forming Cells) si osservano dopo 10-21 giorni dalla semina mostrando una morfologia molto simile alle cellule endoteliali mature e in grado di formare vasi *de novo* ¹³⁰. Poiché le ECFCs compaiono molto più tardi in coltura rispetto sia alle CFU-ECs sia alle CACs, vengono chiamate anche "late outgrowth EPCs" (Figura 19, Metodo C).

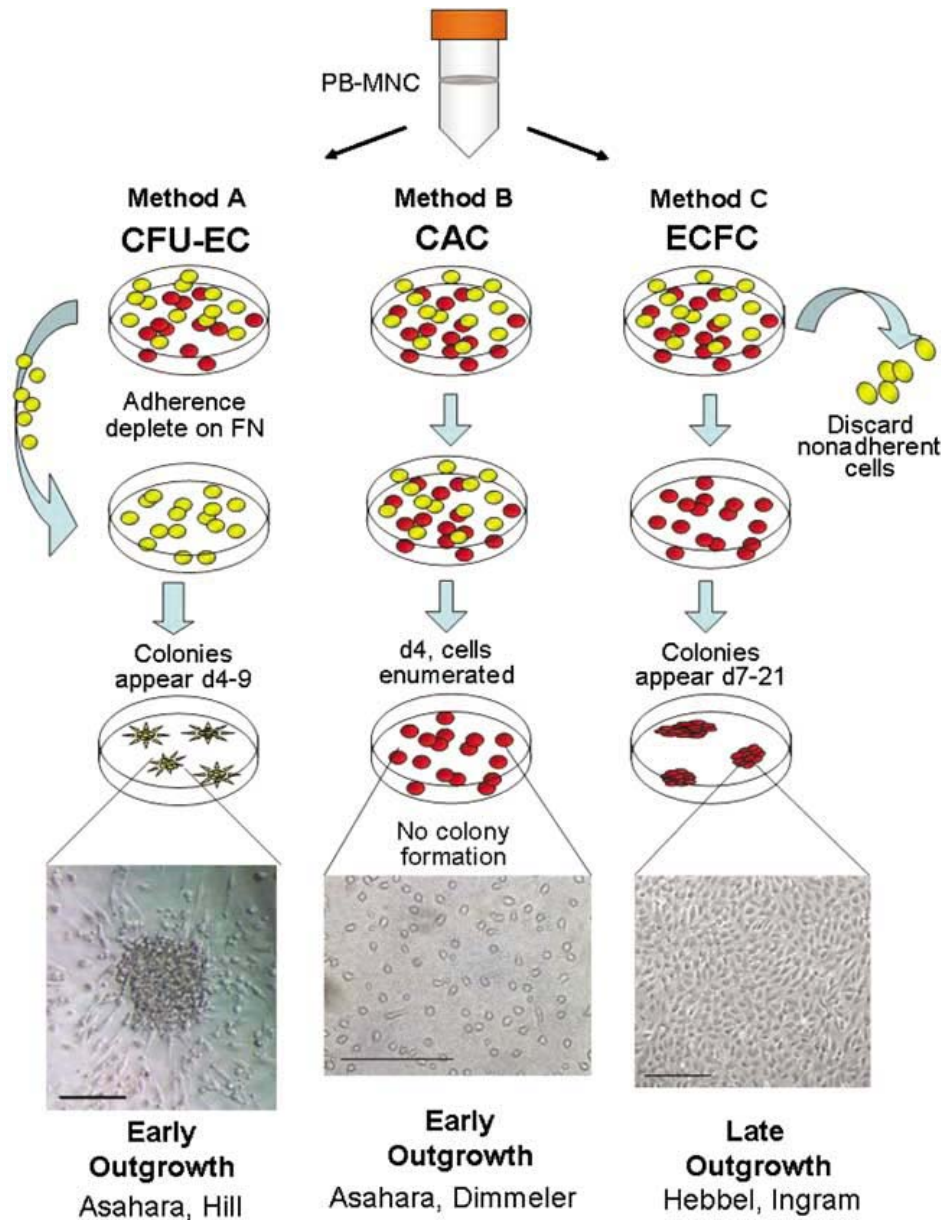


Figura 19. Metodi comunemente utilizzati per la coltura *ex vivo* di EPCs: Illustrazione schematica della coltura di CFU-EC (Method A, scale bar¼100 mm) , di CAC (Method B, scale bar¼200 mm) e di ECFCs (Method B, scale bar¼400 mm). (Prater DN et al. *Leukemia* 2007; 21, 1141–1149).

Le diverse tipologie di coltura precedentemente illustrate portano alla selezione di tipologie cellulari che differiscono per potenziale proliferativo, e per morfologia. Funzionalmente, le EPCs precoci sembrano stimolare la formazione di strutture tubulari, mentre le tardive mostrano capacità di incorporarsi nei vasi per la neovangiogenesi¹³¹. E' chiaro quindi come lo studio *ex vivo* delle EPCs sia un campo ancora ampiamente da esplorare, poiché le metodiche ad oggi disponibili per la coltura di queste cellule comportano notevoli differenze.

Rimane il dubbio se queste cellule derivino o meno da un precursore comune e se abbiano *in vivo* la stessa capacità di formare vasi.

2.6.5 Mobilizzazione dal midollo osseo

In corso di danno endoteliale, il rilascio di citochine e fattori di crescita da parte dei tessuti ischemici, stimola la proliferazione, la differenziazione e il richiamo delle EPCs dal midollo osseo verso il torrente circolatorio ed i siti di ischemia ¹²³. Le citochine maggiormente implicate in questo processo sono il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e lo Stromal-derived Growth Factor-1 (SDF-1) (Figura 20).

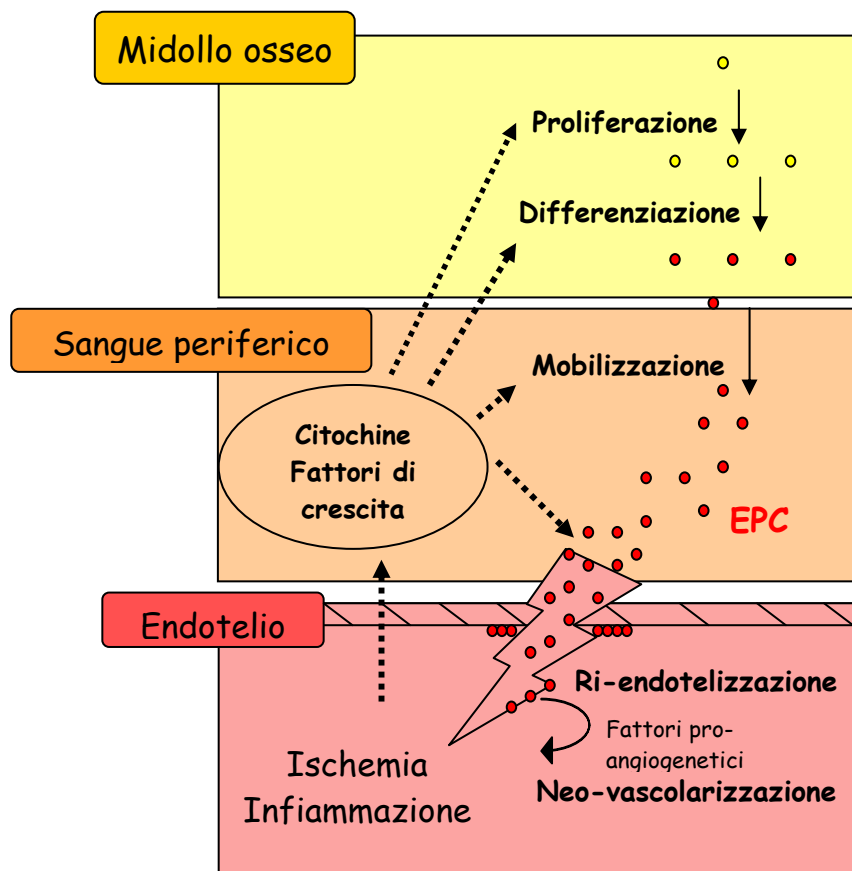


Figura 20: Rappresentazione schematica del processo di mobilizzazione delle EPCs in corso di ischemia

La mobilitazione delle EPCs è un processo complesso, regolato da una grande varietà di enzimi, fattori di crescita e ligandi. I segnali che iniziano la differenziazione degli emangioblasti in precursori ematopoietici piuttosto che in EPCs sono tuttora ampiamente sconosciuti, anche se con buona probabilità lo stimolo iniziale è dato dallo stesso VEGF¹²³. La mobilitazione delle cellule staminali dal midollo osseo verso i vasi sanguigni del microambiente midollare richiede inoltre l'attivazione della metalloproteinasi 9 della matrice (MMP-9), che promuove la solubilizzazione di un recettore per le citochine presente sulla membrana delle cellule staminali (il ligando di Kit di membrana o mKitL). Solo le cellule staminali positive per il ligando di Kit citoplasmatico (cKit) sono in grado di attraversare la parete dei sinusoidi del midollo osseo¹³². Questa migrazione potrebbe rappresentare inoltre lo stimolo di attivazione della cellula da uno stato quiescente ad uno proliferativo grazie all'azione del ligando di Kit sull'attivazione del ciclo cellulare (Figura 21).

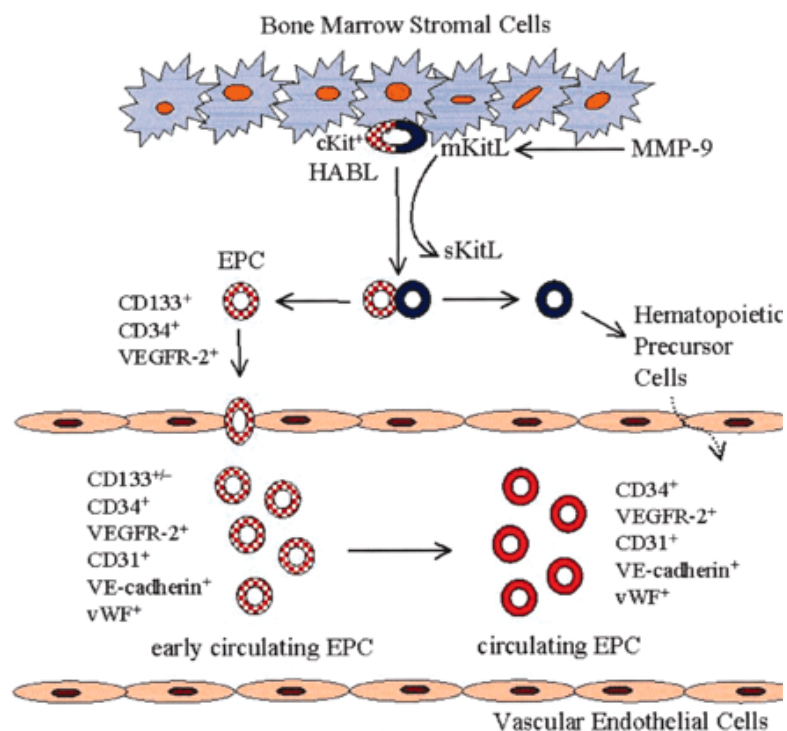


Figura 21 Rappresentazione schematica dei processi di mobilitazione delle EPCs dal midollo osseo. (Mihail H Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2003;23:1185).

2.6.6 Ruolo fisiopatologico

I fattori di rischio CV favoriscono l'apoptosi delle cellule endoteliali. I corpi apoptotici delle cellule endoteliali mature sono in grado di aumentare il numero di EPCs circolanti e favorirne la differenziazione in cellule endoteliali mature¹³³. Una volta che le EPCs circolanti hanno raggiunto il sito di endotelio danneggiato, i processi di adesione all'endotelio sono mediati dall'interazione tra EPCs e cellule endoteliali mature attraverso l'espressione di molecole di adesione quali ICAM-1/CD18¹³⁴ ed il rilascio di chemochine quali SDF-1¹³⁵. Attualmente non è conosciuto il contributo quantitativo delle EPCs all'omeostasi vascolare, ma è stato dimostrato che l'assenza di EPCs impedisce la completa rigenerazione dell'endotelio¹³⁶. Al contrario, Rehman e collaboratori, hanno dimostrato come le EPCs isolate dalla frazione mononucleata del sangue periferico non sono in grado di proliferare ma secernono fattori di crescita angiogenetici (come i mediatori dell'infiammazione che stimolano la formazione del tessuto di granulazione), non è quindi chiaro ad oggi se queste cellule si integrino fisicamente nell'endotelio o semplicemente siano in grado, attraverso la secrezione di fattori angiogenetici, di favorirne la riparazione *in loco*¹³⁷. Recenti studi suggeriscono che le EPCs mostrino anche la capacità di transdifferenziare in cellule muscolari lisce *in vitro*¹³⁸. Il processo di transdifferenziazione in cellule muscolari lisce sembra essere favorito dal TGF- β e da segnali paracrini veicolati mediante le giunzioni cellulari. Da questa scoperta si potrebbe evincere che EPCs strategicamente collocate all'interno dell'endotelio vascolare possano costituire un materiale d'emergenza per la riparazione sia delle cellule endoteliali sia delle cellule muscolari lisce.

2.6.7 Turnover delle EPCs

In considerazione del basso numero di EPCs e della difficoltà di identificazione delle stesse, esistono limitate informazioni riguardo al range di normalità ed alle caratteristiche funzionali di queste cellule in condizioni fisiologiche. Inoltre, non è nota con esattezza l'emivita di queste cellule *in vivo* sia in condizioni fisiologiche sia patologiche¹³⁹. Un altro fattore da considerare è che, non esistendo una univoca definizione delle EPCs, il numero, in condizioni fisiologiche risulta differente in base alle metodologie di identificazione e caratterizzazione utilizzate nei diversi studi. Uno dei primi studi ha riportato come il numero di cellule CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ circolanti in soggetti sani sia nell'ordine di 0,002% dei mononucleati totali, quindi circa 70-210 cellule/ml¹⁴⁰. La maggior parte degli studi tuttavia è concorde nell'affermare che il numero di EPCs circolanti nei soggetti sani è inferiore, rappresentando lo 0,0001% delle cellule circolanti, meno dello 0,001% del numero totale di cellule mononucleate di derivazione midollare e meno del 2% delle cellule staminali mesenchimali totali¹⁴¹.

2.7 Cellule progenitrici endoteliali e fattori di rischio cardiovascolare

Il bilancio tra danno e riparazione endoteliale è un punto cruciale nell'instaurarsi degli eventi CV. Diversi studi hanno evidenziato come un ridotto numero e funzione delle EPCs, deputate al mantenimento dell'integrità endoteliale, siano associati alla presenza di fattori di rischio e malattie CV ¹⁴². Il numero delle EPCs, in alcuni studi, si è dimostrato addirittura essere un predittore di malattia cardiovascolare superiore rispetto al Framingham risk score ¹²⁸. Di seguito riporterò per ogni fattore di rischio le evidenze scientifiche più recenti per quel che riguarda l'influenza di quest'ultimo sul numero e sulla funzionalità delle EPCs.

2.7.1 Età

L'incidenza dell'aterosclerosi aumenta con l'età. La riduzione progressiva nel corso della vita del numero di EPCs potrebbe accelerarne lo sviluppo, specialmente in associazione con altri fattori di rischio CV. L'invecchiamento, non si associa solo con la disfunzione endoteliale ¹⁴³ ma anche con una progressiva riduzione dell'angiogenesi ¹⁴⁴. Vasa e collaboratori hanno riportato una diminuzione delle cellule circolanti CD34⁺/KDR⁺ correlata all'età sia in soggetti sani sia in pazienti con cardiopatia ischemica ¹⁴⁵. Nei pazienti più anziani è inoltre stata evidenziata una minore mobilitazione di EPCs a seguito di intervento di bypass aortocoronarico ¹⁴⁶. La riduzione del numero di EPCs con l'età sarebbe il risultato da una parte della loro accelerata senescenza ed apoptosi, e dall'altra del progressivo esaurimento del pool di cellule progenitrici a livello midollare poiché il processo dell'invecchiamento limita la riserva funzionale di ogni organo, e di conseguenza anche quella midollare ¹⁴⁷. Con il progredire dell'età si riducono inoltre i livelli circolanti di VEGF ¹⁴⁸ e la produzione di NO a

livello endoteliale ¹⁴⁹, due dei fattori maggiormente implicati nella mobilizzazione, migrazione, proliferazione e sopravvivenza delle EPCs.

2.7.2 Dislipidemia

Il colesterolo è il principale componente della placca aterosclerotica e l'ipercolesterolemia è considerato il fattore di rischio più importante per lo sviluppo della patologia CV. Livelli elevati di colesterolo si associano ad una deplezione di EPCs indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio CV. In soggetti affetti da cardiopatia ischemica è stata osservata una correlazione inversa tra numero di EPCs e valori di colesterolo LDL. *In vitro*, soggetti con elevati livelli di colesterolo mostrano un numero di CFU-EC significativamente ridotto rispetto ai controlli sani ¹²⁸. In particolare i livelli di ox-LDL e trigliceridi sono risultati negativamente correlati col numero di CFU-EC in coltura ¹⁵⁰. Anche le caratteristiche funzionali (migrazione, proliferazione, adesione e capacità vasculogenica *in vitro*) di EPCs isolate da soggetti ipercolesterolemici sono risultate inferiori rispetto ai controlli sani ¹⁵¹. Studi su EPCs in coltura esposte a ox-LDL hanno dimostrato una diminuzione dose-dipendente della loro funzionalità, un'accelerata senescenza delle cellule probabilmente imputabile ad una ridotta attività della telomerasi che si associa ad una diminuzione fino al 70% del numero delle EPCs ¹⁵². Le LDL ossidate inoltre sono risultate inibire la differenziazione delle EPCs attraverso l'inattivazione della proteina Akt ¹⁵³.

2.7.3 Ipertensione arteriosa

Tra tutti i fattori di rischio CV, l'ipertensione è quello che mostra un impatto negativo maggiore sulla migrazione delle EPCs anche se in letteratura esistono dati contrastanti sulla variazione del numero di EPCs nei pazienti ipertesi. Nel 2007 Delva e collaboratori non hanno

infatti rilevato differenze significative per quanto riguarda il numero di cellule progenitrici tra un campione di soggetti ipertesi ed i controlli ¹⁵⁴, mentre un altro studio osservava una differenza significativa tra pazienti con ipertensione refrattaria (non responsiva ad un'associazione di 3 farmaci a dosi piene) ed i controlli normotesi ¹⁵⁵. In quest'ultimo studio la riduzione del numero di EPCs è risultata inoltre essere direttamente proporzionale alla severità dell'ipertensione .

L'ipertensione è in grado di diminuire il numero di EPCs circolanti in quanto ne accelera la senescenza. Questo dato è stato confermato sia nell'animale sia nell'uomo iperteso ¹⁵⁶. Alla base di questo fenomeno vi è il coinvolgimento dell'Angiotensina II nell'induzione di stress ossidativo, a sua volta responsabile della riduzione dell'attività telomerasica e quindi della senescenza cellulare ¹⁵⁷. Esistono tuttavia controversie sugli effetti dell'Angiotensina II sulla proliferazione *in vitro* delle EPCs: gli stessi autori hanno osservato in un altro studio come essa favorisca la proliferazione di EPCs indotta da VEGF, effetto probabilmente mediato da un aumento dell'espressione del KDR ¹⁵⁸. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per approfondire il ruolo della senescenza cellulare delle EPCs nei pazienti affetti da ipertensione essenziale.

Un'altra importante osservazione condotta nei pazienti ipertesi riguarda il gene *HOXA9*, un gene della famiglia homeobox la cui espressione è coinvolta nella differenziazione delle EPCs in cellule endoteliali mature. L'espressione di questo gene è ridotta nei pazienti ipertesi e questo potrebbe essere un ulteriore meccanismo in grado di spiegare la relazione tra riduzione delle EPCs ed ipertensione arteriosa ¹⁵⁹.

2.7.4 Obesità

Esiste una correlazione inversa tra circonferenza vita e numero di EPCs circolanti¹⁶⁰. La diminuzione del numero di EPCs circolanti nei soggetti obesi sembra essere dovuta alle adipochine prodotte dal tessuto adiposo, quali la leptina¹⁶¹ e il TNF- α ¹⁶² che *in vitro* mostrano un effetto negativo sulla proliferazione delle EPCs.

2.7.5 Sedentarietà

Uno stile di vita sedentario ha un impatto negativo sulla salute CV in termini di composizione corporea, funzione cardiocircolatoria, profilo lipidico e metabolismo dei carboidrati. Al contrario, l'esercizio fisico aiuta a mantenere l'omeostasi vascolare sia in soggetti sani¹⁶³ sia in soggetti affetti da coronaropatia¹⁶⁴ in quanto è in grado di favorire la mobilizzazione delle EPCs mediata dal VEGF e da NO e di diminuire l'apoptosi delle EPCs. Questo fenomeno potrebbe essere transitorio e non è ancora chiaro se la mobilizzazione delle EPCs sia favorita maggiormente dall'esercizio aerobico o anaerobico¹⁶⁵, tuttavia l'esercizio fisico è ad oggi, insieme alla dieta, l'unico intervento sullo stile di vita effettuabile al fine di aumentare il pool di EPCs circolanti¹⁶⁶.

2.7.6 Abitudine al fumo

Il fumo di sigaretta è un potente induttore di disfunzione endoteliale e di aterosclerosi. Il fumo si associa ad una riduzione del pool di EPCs circolanti, mentre la cessazione dell'abitudine al fumo è in grado di ripristinare un numero di EPCs uguale a quello dei non fumatori¹⁶⁷. Inoltre, EPCs isolate da fumatori sani, mostrano capacità funzionali alterate rispetto a quelle dei non fumatori in termini di proliferazione, adesione, differenziazione e migrazione¹⁶⁸. La causa di questi fenomeni è imputabile allo stress ossidativo causato dai

composti tossici contenuti nelle sigarette, mentre paradossalmente la nicotina, alle concentrazioni plasmatiche normalmente presenti nei fumatori, ha dimostrato di avere effetti positivi sulla mobilitazione delle EPCs¹⁶⁹.

2.7.7 Altri fattori di rischio

Elevati livelli di omocisteina sono considerati un fattore di rischio CV. Questa molecola è in grado di diminuire il numero e di peggiorare la funzionalità delle EPCs prelevate *ex vivo* e poste successivamente in coltura¹⁷⁰.

L'ADMA (dietilarginina asimmetrica) è un inibitore endogeno dell'NO sintasi, esso contribuisce alla disfunzione endoteliale e all'inibizione dell'angiogenesi ed è considerato un marker indipendente predittivo per futuri eventi CV o morte. *In vitro* è stato osservato come i livelli di ADMA siano inversamente proporzionali al numero di EPCs e come questa molecola inibisca la funzione delle EPCs¹⁷¹.

2.8 Le cellule progenitrici endoteliali negli stati di insulinoresistenza

2.8.1 Insulinoresistenza

L'IR ha un impatto negativo sul bilancio tra riparazione e danno endoteliale in quanto lo spettro di anomalie biochimiche associate all'IR interferisce negativamente con la riparazione vascolare EPC mediata.

Nell'uomo, il numero di EPCs circolanti è risultato essere ridotto nei soggetti con Sindrome Metabolica¹⁷², inoltre il numero di cellule CD34⁺ risultava negativamente correlato in modo sinergico all'aumentare del numero di fattori di rischio che compongono la Sindrome, suggerendo che essi siano in grado di influenzare negativamente la riparazione endoteliale.

La correlazione inversa tra numero di EPCs circolanti e grado di disfunzione endoteliale è stata riscontrata recentemente in uno studio condotto su due popolazioni di soggetti sani insulinoresistenti: una formata da soggetti di origine caucasica e una composta da soggetti provenienti dal Sud-Est Asiatico¹⁷³. Questo studio ha rivelato come i soggetti provenienti dal Sud-Est Asiatico presentino un maggior grado di IR rispetto ai soggetti caucasici ed ha dimostrato che rispetto ai caucasici questi soggetti presentavano un maggior grado di disfunzione endoteliale e un minor numero di EPCs circolanti. Questi risultati spiegano il maggior rischio CV delle popolazioni provenienti dal Sud-Est Asiatico rispetto a quelle di origine caucasica, rimane tuttavia da chiarire se in soggetti sani di origine caucasica vi sia una correlazione statisticamente significativa tra IR e riduzione del numero di EPCs circolanti.

La resistenza all'insulina sembra agire a vari livelli nel ridurre il numero delle cellule progenitrici circolanti in quanto è in grado di ridurre la mobilizzazione di EPCs dal midollo osseo, il loro attecchimento a livello dell'endotelio vascolare danneggiato e la risposta delle EPCs a chemochine a potenziale vasculogenetico. La ridotta mobilizzazione delle EPCs dal

midollo osseo è stata dimostrata in un modello animale di ischemia-riperfusion: il midollo osseo di ratti diabetici è risultato totalmente incapace di mobilitare le EPCs, a differenza dei ratti di controllo che mostrano una normale curva di mobilitazione ¹⁷⁴. In questo studio il difettoso rilascio di EPCs da parte del midollo è associato a ridotti livelli di SDF-1 e di VEGF e all'incapacità di upregolare i livelli di HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α). Inoltre è stato dimostrato che l'IR, attraverso la downregolazione della via di segnalazione PI3K/Akt ¹⁷⁵, causa una diminuita produzione di NO, che è importante per l'espressione di proteine del citoscheletro che regolano la motilità cellulare ¹⁷⁶ e di conseguenza una diminuzione dei livelli di MMP-9 che, come abbiamo visto precedentemente, rappresenta il *primum movens* della mobilitazione delle cellule staminali dal Midollo Osseo.

A seguito della mobilitazione, le EPCs devono raggiungere la sede della lesione, ancorarvisi, integrarsi con il letto endoteliale preesistente, proliferare e differenziarsi. La migrazione, la sopravvivenza e le potenzialità neoangiogenetiche delle EPCs sono risultate deficitarie in soggetti diabetici insulinoresistenti ¹⁷⁷. La spiegazione di questo dato è stata ricercata nell'iperinsulinemia compensatoria che attiva la cascata delle MAPK¹⁷⁸ favorendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno ¹⁷⁹ e di citochine proinfiammatorie come il TNF- α ¹⁸⁰ che inibiscono la mobilitazione, la proliferazione e la sopravvivenza delle EPCs. L'effetto negativo dell'IR è supportato dal fatto che i parametri di funzionalità delle EPCs migliorano, indipendentemente dal controllo glicemico, in seguito al trattamento con Rosiglitazone, un farmaco che migliora l'IR ¹⁸¹.

Pertanto si può concludere che in condizioni di IR esiste una ridotta immissione di EPCs in circolo ed una loro diminuita capacità funzionale: ciò potrebbe spiegare, almeno in parte, la ridotta capacità rigenerativa dei vasi e l'aumentata propensione in questi pazienti alla formazione di lesioni aterosclerotiche.

2.8.2 Diabete Mellito

Nel DM è nota una alterazione nella neovascolarizzazione a seguito di ischemia. Il numero di EPCs circolanti è ridotto nei soggetti affetti da DM di tipo 1¹⁸² e di tipo 2¹⁸³. In queste patologie le EPCs possiedono anche alterazioni funzionali a carico della proliferazione, adesione e proprietà angiogenetiche, suggerendo un loro ruolo nelle complicanze macroangiopatiche del diabete. EPCs in coltura provenienti da soggetti con DM di tipo 1, non solo mostrano minori capacità angiogenetiche rispetto a quelle prelevate da soggetti sani, ma, *in vitro*, secernono un inibitore alla formazione vascolare¹⁸². Per quanto riguarda il DM di tipo 2, è stato osservato come le EPCs prelevate da questi pazienti mostrino ridotta capacità di adesione all'endotelio vascolare. È stata inoltre riscontrata un'associazione tra elevati livelli di Emoglobina Glicata (HbA1c) e peggioramento della funzionalità delle EPCs¹⁸³. L'effetto negativo dell'iperglicemia sulle EPCs è stato ulteriormente confermato in uno studio su cellule mononucleate da sangue periferico provenienti da donatori sani, le quali coltivate in condizioni di iperglicemia hanno mostrato una significativa riduzione, non solo del numero e della funzionalità delle EPCs, ma anche della produzione di NO e dell'attività della MMP-9¹⁸⁴. Il numero di EPCs circolanti è risultato correlato negativamente alla durata della malattia diabetica e ad uno scadente controllo dell'assetto glicometabolico, suggerendo che bassi livelli di EPCs possano rivestire un ruolo causale nella genesi delle complicanze macroangiopatiche del DM. Questa tesi è stata supportata da un recente studio che ha messo in luce come pazienti diabetici con complicanze vascolari periferiche, mostrino livelli di EPCs inferiori rispetto sia a pazienti diabetici senza complicanze vascolari sia a pazienti non diabetici affetti da aterosclerosi¹⁸⁵. Nello stesso studio i pazienti affetti da ischemia degli arti inferiori con lesioni trofiche su base ischemica presentavano in assoluto i valori più bassi di EPCs circolanti, indice di una scarsa capacità neoangiogenetica. Uno studio successivo ha

confermato che la riduzione delle EPCs è proporzionale alla gravità dell'aterosclerosi periferica ¹⁸⁶. Tuttavia, in pazienti affetti da DM possono coesistere complicanze di tipo microangiopatico, in particolare la retinopatia diabetica proliferante, caratterizzate da un'esaltata capacità neoangiogenetica. Questo fenomeno è definito "Paradosso Diabetico" ¹⁸⁷. È dimostrato che EPCs prelevate da pazienti con retinopatia diabetica proliferante sopravvivano più a lungo in coltura e possiedano una maggiore capacità proliferativa e differenziativa rispetto a quelle prelevate da soggetti con aterosclerosi periferica ¹⁸⁸. Secondo alcuni autori l'ischemia retinica favorirebbe la secrezione di VEGF da parte della retina, che a sua volta richiamerebbe le EPCs dal sangue periferico ¹⁸⁹, tuttavia l'eziopatogenesi del paradosso diabetico non è tuttora chiara e saranno necessari ulteriori studi per definirla.

2.9 Le cellule progenitrici endoteliali nelle malattie cardiovascolari

Nella storia naturale della formazione della placca aterosclerotica si assiste ad una diminuzione del pool di EPCs in presenza di fattori di rischio CV e di alterazioni subcliniche, come l'aumento dello spessore medio-intimale, come descritto precedentemente. La presenza della placca ateromasica si associa ad un'ulteriore diminuzione del numero di cellule progenitrici endoteliali circolanti. Al contrario qualora si verifichi un evento CV acuto, come l'infarto del miocardio o l'ictus, si assiste ad una rapida mobilitazione delle EPCs da parte del midollo osseo¹⁵⁹ (Figura 22).

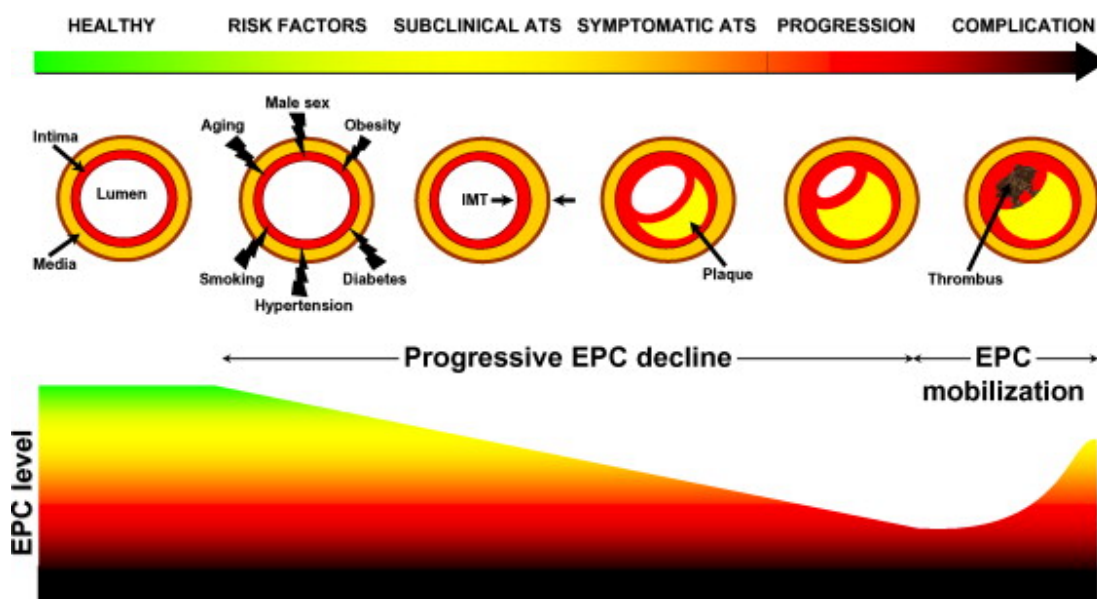


Figura 22: Variazioni nei livelli di cellule progenitrici endoteliali nel processo di formazione della placca aterosclerotica. (Fadini et al. *Atherosclerosis* 194(2007) 46-54)

Elencherò successivamente le osservazioni in letteratura riguardo l'associazione tra le principali patologie CV ed il numero e la funzionalità delle EPCs circolanti.

2.9.1 Cardiopatia ischemica cronica

Nonostante il numero di EPCs nei pazienti con malattia coronarica cronica sia simile a quello dei soggetti sani, le capacità funzionali delle cellule mononucleate *in vitro* sono significativamente ridotte e, se queste vengono impiantate in modelli murini di ischemia agli arti inferiori, dimostrano una ridotta capacità di ripristinare la perfusione tissutale¹⁹⁰.

2.9.2 Angina instabile

In pazienti con angina instabile è stato riscontrato un maggior numero di CFU-EC e nessuna alterazione nelle proprietà adesive di queste cellule, ma il numero di EPCs si riduceva di circa il 50% a seguito della stabilizzazione clinica¹⁹¹. Questo dato starebbe a indicare che nell'angina instabile vi sia un'iniziale aumento del numero di EPCs circolanti in risposta all'insulto ischemico, come avviene generalmente nelle sindromi coronariche acute¹⁹². Sono state evidenziate in questi pazienti anche correlazioni tra i livelli di hsPCR e livelli di EPCs circolanti, ma non è stata riscontrata una correlazione con le capacità funzionali delle EPCs¹⁹³. Esistono inoltre lavori scientifici che dimostrano come la hsPCR inibisca la proliferazione, la sopravvivenza, la differenziazione e la funzione delle EPCs¹⁹⁴. Da questi dati si può dedurre che in pazienti con angina instabile lo stato infiammatorio potrebbe interferire col reclutamento dal midollo osseo e con la funzionalità delle EPCs.

2.9.3 Infarto del miocardio

Nell'infarto del miocardio il numero di EPCs circolanti è notevolmente aumentato nelle fasi più precoci e raggiunge il picco in settima giornata per tornare ai livelli di base nel giro di 60 giorni¹⁹⁵. Lo stesso andamento hanno le concentrazioni di VEGF circolante, il fattore di crescita che risulta essere il principale responsabile della mobilitazione di cellule progenitrici

dopo un evento CV acuto. Inoltre, in settima giornata dopo un infarto del miocardio con tratto ST sopraslivellato, è stato registrato un calo delle cellule staminali mesenchimali, anch'esse deputate alla riparazione endoteliale. In questi studi potrebbero esserci fattori di confondimento perché alcuni farmaci utilizzati correntemente nella terapia di questi pazienti (in modo particolare statine e ACE inibitori) hanno la proprietà di mobilitare un maggior numero di EPCs ¹⁹⁶. Il ruolo delle cellule staminali nell'infarto del miocardio non è tuttavia attribuibile soltanto alla capacità angiogenetica, ma anche a quella di reintegrare la popolazione di cellule progenitrici cardiache. Sembra infatti che le cellule progenitrici siano in grado di localizzarsi nelle aree infartuate e di trasformarsi in cardiomiociti, come è stato evidenziato in alcuni modelli animali ¹⁹⁷.

Le EPCs inoltre sembrano avere un ruolo prognostico molto importante nell'infarto del miocardio, poiché un maggior numero di EPCs e una loro maggiore capacità di differenziarsi in cellule endoteliali mature sono correlati ad un migliore recupero della frazione di eiezione ed a un più favorevole rimodellamento del ventricolo sinistro dopo l'evento ¹⁹⁸. George e collaboratori inoltre hanno riportato che in pazienti con diffusa restenosi sullo stent coronarico, il numero di unità formanti colonie di EPCs in coltura era ridotto rispetto a quello dei pazienti con una stenosi solo focale ¹⁹⁹. Non vi erano differenze numeriche significative nel numero di EPCs tra i due gruppi di pazienti ma nel gruppo con restenosi è stata dimostrata una ridotta aderenza delle EPCs alla fibronectina, suggerendo che proprietà funzionali delle EPCs sarebbero coinvolte nella genesi di questa complicanza dello stenting.

2.9.4 Stroke

Il numero di EPCs circolanti non sembra essere associato con il grado di aterosclerosi cerebrovascolare in sé ma è significativamente diminuito a seguito di uno stroke anche in

soggetti in cui vi era stato un infarto cerebrale evidenziabile alla PET (Positron Emission Tomography) senza un'apprezzabile sintomatologia clinica²⁰⁰. In questo stesso studio è stata riscontrata una correlazione positiva tra il numero di EPCs e il flusso sanguigno regionale nelle aree di ipoperfusione cerebrale.

2.9.5 Scompenso cardiaco

Lo scompenso cardiaco cronico di classe NYHA (New York Heart Association) I e II è associato a un numero relativamente alto di EPCs circolanti, mentre negli stadi più avanzati dello scompenso cardiaco (classe NYHA III e IV) è stato osservato una progressiva riduzione di queste cellule²⁰¹. Livelli più elevati di BNP (Brain Natriuretic Peptide) sono risultati inoltre essere associati a un minor numero di EPCs indipendentemente dalla terapia in atto e dalla causa dello scompenso.

2.9.6 Altre patologie cardiovascolari

Una diminuzione delle cellule progenitrici circolanti è stata osservata anche in altre condizioni come ad esempio nella disfunzione erettile²⁰² e nel trapianto cardiaco in pazienti con nota vasculopatia²⁰³.

2.10 Ruolo prognostico delle EPCs sul rischio cardiovascolare

Un recente studio ha riscontrato come i livelli di cellule CD34⁺/KDR⁺ rivestano un ruolo predittivo di futuri eventi CV e di morte per ogni causa in pazienti coronaropatici ²⁰⁴. In questo studio è stato valutato il numero di EPCs in 519 pazienti con ostruzione di almeno un'arteria coronaria documentata angiograficamente. Dopo 12 mesi di follow up è stata valutata l'associazione tra livelli basali di EPCs e manifestazione di un evento CV maggiore (infarto del miocardio, ospedalizzazione, rivascolarizzazione, morte per cause cardiovascolari) e morte per qualsiasi causa. I pazienti con livelli basali più elevati di EPCs hanno mostrato una minore incidenza di incidenti CV, di ospedalizzazione e di morte per cause vascolari. Le EPCs non sono però risultate predittive di occorrenza di infarto del miocardio o di morte per tutte le cause. Queste associazioni sono risultate indipendenti dalla severità della coronaropatia, dalla diagnosi di una sindrome coronarica acuta all'epoca dell'arruolamento nello studio, dalla presenza di fattori di rischio CV e dalle terapie farmacologiche in atto. Secondo questo studio quindi la quantificazione delle EPCs sarebbe in grado di identificare una sottopopolazione di pazienti a più alto rischio CV. L'utilizzo della quantificazione delle EPCs con valore prognostico è molto promettente in quanto, a differenza del dosaggio di un singolo marker biochimico (come ad esempio è stato fatto con interleuchina-6(IL-6) ²⁰⁵, omocisteina ²⁰⁶ o hsPCR ²⁰⁷), fornisce un quadro maggiormente esaustivo di ciò che avviene *in vivo* in quanto unifica e rispecchia i molteplici fattori che entrano in gioco nella genesi della malattia CV. Perciò nell'ambito della complessa relazione tra alterazioni emodinamiche, infiammatorie e disfunzione endoteliale, che caratterizzano l'aterosclerosi e precedono di gran lunga la comparsa di eventi CV, lo studio delle EPCs

potrebbe rappresentare un modello interessante per studiare le alterazioni che precedono e accompagnano il danno endoteliale in modo da identificare i soggetti a maggior rischio CV.

2.11 I telomeri

2.11.1. Struttura e funzione dei telomeri

I telomeri sono complessi specializzati DNA-proteina localizzati ad entrambe le estremità dei cromosomi eucariotici costituiti da sequenze altamente ripetute di DNA a doppia elica con una sequenza terminale di circa 100-400 nucleotidi a singolo filamento protrudente al 3'. Le dimensioni e la sequenza specifica dei telomeri variano da specie a specie e nell'uomo essi raggiungono le 20 kb di lunghezza con sequenza $(TTAGGG)_n$ ripetuta in tandem. La porzione a singolo filamento presente all'estremità telomerica, si ripiega in una struttura tridimensionale altamente protettiva chiamata T-loop²⁰⁸. Poco si conosce della dinamica di formazione del T-loop, ma, è chiaro, che questo processo avvenga grazie alla presenza di proteine telomeriche. I telomeri sono associati a molteplici proteine a formare il cosiddetto Shelterin Complex. Ad oggi sono conosciute sei proteine telomeriche, tra le più note e oggetto di studio vi sono le Telomere Repeat binding Factors 1 e 2 (TRF1 e TRF2) che sono in grado di legare direttamente le regioni di DNA telomerico e indispensabili per la formazione del T-loop (Figura 23).

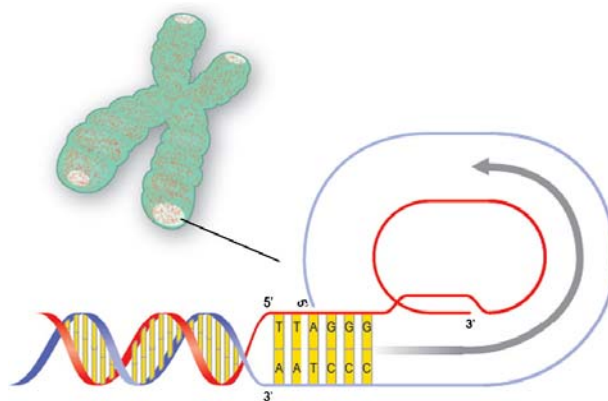


Figura 23. Rappresentazione del ripiegamento a T-loop dell'estremità telomerica. I telomeri sono costituiti da specifiche sequenze nucleotidiche (TTAGGG e AATCCC) ad entrambe le estremità dei cromosomi. (Wong LS, de Boer RA, Samani NJ, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. *Telomere biology in heart failure. Eur J Heart Fail. 2008:1049-56*).

Altre proteine telomeriche sono: la Protection of Telomere 1 (POT1), Raf-associated protein 1 (Rap 1), tripeptidilpeptidasi 1, e la proteina nucleare 2 (che interagisce con TRF1 e TRF2)^{209,210}.

Il T-loop agisce come un cappuccio protettivo nel prevenire la perdita di materiale genetico sottraendo i cromosomi dal riconoscimento, da parte dei meccanismi di riparazione del DNA, di rotture di DNA a doppio filamento. Il “cappuccio” telomerico protegge i cromosomi anche dalla fusione delle estremità (end-to-end fusion) e dalla degradazione dei cromosomi che portano la cellula alla senescenza e apoptosi.

2.11.2. L'accorciamento telomerico e i meccanismi di signalling cellulare

Il meccanismo protettivo dei telomeri è generalmente attribuito alla struttura del T-loop, che cela l'estremità aperta del DNA nei cromosomi. Se i telomeri diventano disfunzionanti o eccessivamente corti perdono le loro capacità protettive attivando i meccanismi di risposta cellulare al danno del DNA. Nei mammiferi, le rotture del DNA causano la fosforilazione dell'istone H2AX da parte della chinasi ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) e ATR (Ataxia-Telangiectasia- e Rad3-Related). ATM e ATR a loro volta attivano le chinasi di checkpoint del DNA: Chk1 e Chk2 (che hanno un ruolo importante nel controllo del ciclo cellulare) le quali, nella cascata di trasduzione del segnale, attivano la proteina anti-apoptotica p53²¹¹ generando così l'espressione di p21 proteina legata alla senescenza cellulare. L'attivazione delle chinasi di “checkpoint” porta alla senescenza cellulare anche attraverso una via alternativa mediata dall'inibizione di Cdc25 (Cell division cycle 25). In seguito alla induzione della senescenza da parte di p21, p53 può indurre il pathway di apoptosi^{212,209}. La disfunzione telomerica può indurre la senescenza anche mediante un meccanismo, tuttora non completamente noto, basato sull'induzione di p16, la quale blocca CDK4 e CDK6 (chinasi

ciclina dipendenti) con conseguente iper-fosforilazione di RB (proteina del retinoblastoma) che rimane così attivata bloccando la progressione del ciclo cellulare (Figura 24)^{212, 213}.

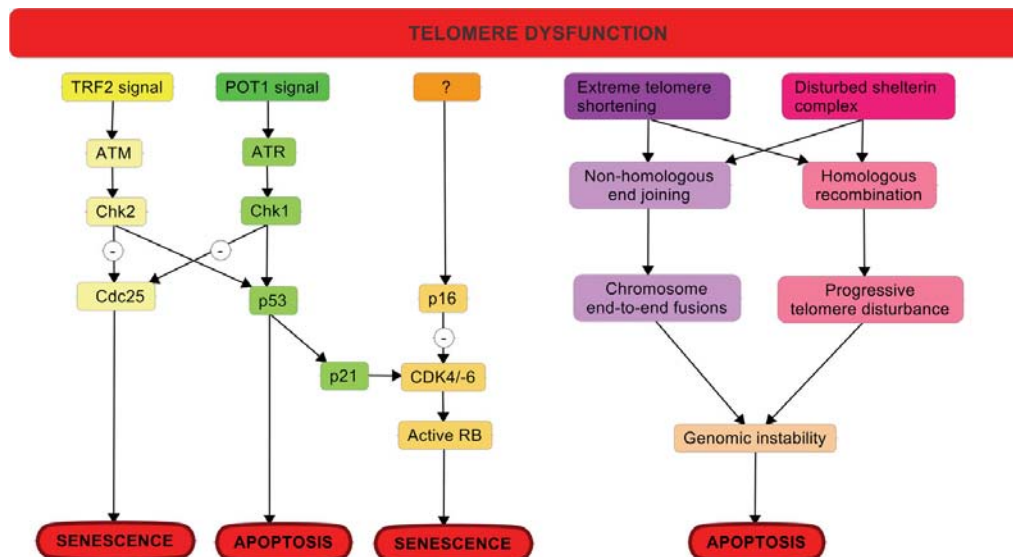


Figura 24. Rappresentazione schematica di alcuni pathways cellulari di trasduzione del segnale in risposta alla disfunzione telomerica. (Wong LS, Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Cardiovasc Res. 2009;81(2):244-52)

Nel lievito, la esonucleasi 1 (EXO1) è coinvolta nella risposta al danno cellulare associata ai telomeri, intervenendo in caso di eccessivo accorciamento telomerico. Recentemente il ruolo di EXO1 in queste risposte al danno è stato confermato anche in topo²¹⁴. La risposta al danno cellulare generata dal signalling telomerico può coinvolgere anche i sistemi di riparazione del DNA. In presenza di un accorciamento eccessivo dei telomeri o di alterazioni a livello del “shelterin complex”, le estremità telomeriche vengono riconosciute come rotture del DNA, innescando l’intervento di due meccanismi di riparazione del DNA: la ricombinazione omologa (HR) e la giunzione non-omologa delle estremità (NHEJ).

L'attivazione di entrambi questi meccanismi di riparazione del DNA porta la cellula verso l'instabilità genomica e inevitabilmente all'apoptosi.

2.11.3. The end replication problem e il limite di Hayflick.

Ad ogni ciclo cellulare i telomeri perdono una certa quota di nucleotidi, questo fenomeno è altresì noto con il nome di "end replication problem". Durante la replicazione del DNA, infatti, il filamento leader (o veloce) è sintetizzato dalla DNA polimerasi come una molecola continua che può replicare dall'inizio alla fine di uno stampo lineare. Il filamento ritardato (o lento) è sintetizzato invece sotto forma di un set discontinuo di corti frammenti di Okazaki (ciascuno dei quali richiede un nuovo primer) che devono essere poi uniti per ottenere un filamento continuo. Il filamento lento non può replicare dall'inizio alla fine del cromosoma lineare, poichè non c'è DNA oltre la fine per il primer (l'innescò) necessario per sintetizzare l'intervallo tra l'ultimo frammento di Okazaki e l'estremità (Figura 25).

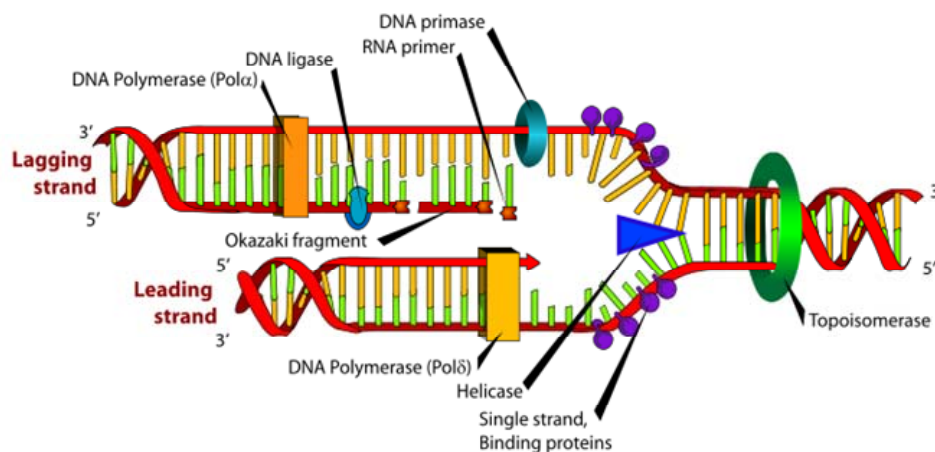


Figura 25. Rappresentazione schematica della replicazione del DNA. (Dal file: DNA replication it.svg)

Questo lascia un 3' protrudente. Al 5' del filamento lento quindi resta un tratto di sequenza non duplicata che porta al progressivo accorciamento dei telomeri, e quindi dei cromosomi, a ogni ciclo di replicazione.

Nel 1961 Hayflick osservò come fibroblasti umani in coltura non erano più in grado di proliferare dopo circa 50 divisioni, tutte le cellule perdevano la capacità proliferativa dopo un determinato numero di duplicazioni, questa soglia è stata chiamata “limite di Hayflick” e assume che ogni tipo di cellula ha un limitato potenziale replicativo intrinsecamente fissato²¹⁵ (Figura 26).

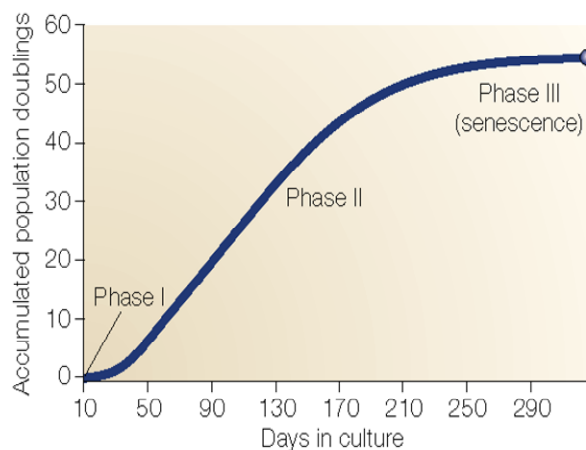


Figura 26. Rappresentazione schematica del limite di Hayflick.

La cellula perde circa 200 bp di DNA telomerico ad ogni divisione mitotica, questo progressivo accorciamento telomerico è un processo cumulativo che può portare il telomero ad una lunghezza critica e, come abbiamo precedentemente illustrato, alla progressione verso l'apoptosi²¹⁶. Dal momento che i telomeri sono indicatori del numero di divisioni cellulari, essi sono considerati come un *orologio biologico*, cioè un indicatore dell'età biologica di una cellula.

2.11.4. La telomerasi

L'età biologica di una cellula può essere definita dalla lunghezza delle estremità telomeriche, le quali subiscono un progressivo accorciamento ad ogni replicazione cellulare. Questa perdita può essere contrastata dall'enzima telomerasi: una DNA polimerasi RNA-dipendente deputata alla sintesi delle ripetizioni telomeriche a livello cromosomico. Si tratta di una ribonucleoproteina costituita da una componente ad RNA (human telomerase RNA, hTERC) e da un complesso multiproteico, in cui il componente principale è l'hTERT (human telomerase reverse transcriptase) ²¹⁷. La componente a RNA di questo enzima funge da stampo per la polimerizzazione di nuove sequenze telomeriche, che avviene grazie all'azione trascrittasiica inversa dell'hTERT. La telomerasi, nel suo complesso, è capace di allungare le estremità del filamento di DNA attraverso un meccanismo ciclico di trascrizione inversa. Il meccanismo di allungamento dei telomeri prevede una fase di sintesi e una di traslocazione (Figura 27).

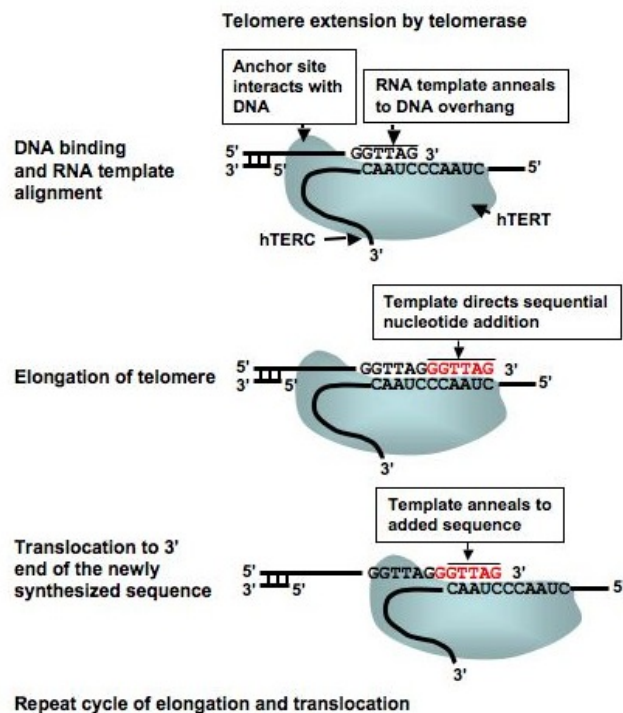


Figura 27. Meccanismo di allungamento dei telomeri da parte della telomerasi. (http://www.reactome.org/figures/telomerase_overview.jpg)

Nella prima fase la telomerasi si appaia, con il proprio RNA, all'estremità 3' del filamento sporgente del cromosoma. La regione a RNA della telomerasi può essere divisa in due parti funzionali, una è responsabile per l'allineamento con gli ultimi 3-5 nucleotidi del filamento di DNA telomerico da allungare, l'altra serve da stampo per la sintesi di una nuova unità telomerica. Durante la fase successiva di traslocazione, l'ibrido RNA-DNA neosintetizzato si denatura e, nuovamente, l'RNA della telomerasi si appaia con gli ultimi 3-5 nucleotidi del filamento di DNA da allungare. La telomerasi è normalmente espressa nella linea germinale, nelle cellule staminali adulte e in quelle del feto in sviluppo, dove raggiunge le estremità dei cromosomi in replicazione permettendo la ricostituzione dei telomeri. Nelle cellule somatiche la telomerasi è invece normalmente assente, mentre è presente e attiva in svariati tipi di cellule cancerose (Figura 28).

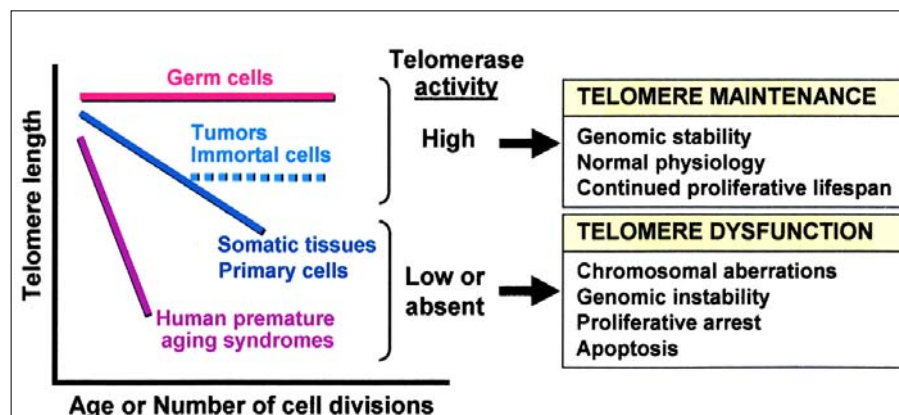


Figura 28. Diversa attività telomerasica nelle linee germinali e nelle cellule somatiche. (Serrano AL, Andrés V *Telomeres and cardiovascular disease: does size matter?*.Circ Res. 2004 Mar 19;94(5):575-84).

Una bassa attività della telomerasi ed una avanzata erosione telomerica sono stati osservati nella discheratosi congenita, una rara malattia fenotipicamente caratterizzata da anomalie muco-cutanee, complicanze polmonari, invecchiamento prematuro e morte precoce, a causa

di un insufficienza progressiva del midollo osseo ²¹⁸. Questa osservazione suggerisce che l'attività della telomerasi sia indispensabile per il mantenimento delle lunghezza telomerica. Inoltre, è stato dimostrato come telomeri eccessivamente corti e assenza di telomerasi siano associati ad un prematuro invecchiamento nell'uomo ²¹⁹.

2.11.5. Stress ossidativo e lunghezza dei telomeri

Oltre ad anomalie disfunzionali a carico della telomerasi, molti altri fattori sono associati ad un'aumentata erosione telomerica e quindi a telomeri più corti, tra questi lo stress ossidativo, il quale, indipendentemente dalle sue origini, è considerato la causa primaria di accorciamento telomerico ²²⁰. Cellule muscolari lisce e cellule endoteliali esposte a fonti di stress ossidativo mostrano, infatti, elevato accorciamento telomerico e prematura senescenza cellulare ²²¹. Inoltre, l'attività telomerasica diminuisce in risposta allo stress ossidativo ²²². E' stato osservato che la presenza di fattori di rischio CV quali fumo e obesità, condizioni che conferiscono un elevato stress ossidativo, sono correlate ad una riduzione della lunghezza telomerica ²²³. Infine, strategie per ridurre lo stress ossidativo, mediante la over-espressione di enzimi anti-ossidanti, sono in grado di mantenere integri i telomeri prevenendone un prematuro accorciamento e si associano ad un'aumentata attività telomerasica ²²⁴.

2.11.6. Lunghezza telomerica leucocitaria e fattori di rischio CV

Lo stress ossidativo che, come si è appena detto, è considerato la causa primaria di accorciamento telomerico ²²⁰, è anche alla base della teoria infiammatoria dell'aterosclerosi ²⁰ ed è stato dimostrato essere implicato nella senescenza vascolare e nell'aterosclerosi stessa ²²⁵. Le cellule endoteliali derivanti dalla placca aterosclerotica hanno mostrato una

ridotta lunghezza telomerica se confrontate con le cellule derivanti da segmenti vascolari non aterosclerotiche nello stesso individuo^{226,221}. Inoltre, pazienti affetti da aterosclerosi hanno ridotta lunghezza telomerica leucocitaria (LTL) rispetto ad individui sani di pari età^{227,228}. I leucociti circolanti sono considerati ottime cellule per studiarne la lunghezza telomerica relativamente alle patologie CV, in quanto sono protagonisti nel meccanismo patogenetico infiammatorio dell'aterosclerosi^{229,230,231}, sono sottoposte ad elevato "turnover" e sono bersaglio dello stress ossidativo. Infiammazione, elevato "turnover" linfocitario e stress ossidativo rappresentano i principali stress ambientali associati al prematuro accorciamento telomerico²²⁸. Rilevante, infatti, è stata la dimostrazione che la LTL è in grado di predire lo sviluppo di malattia coronarica²³², suggerendo il possibile utilizzo della LTL come indice prognostico della stessa. Da queste considerazioni, senza dimenticare che l'accorciamento telomerico è notoriamente correlato all'invecchiamento e quest'ultimo è considerato il fattore di rischio CV più importante²⁰, si evince che l'accorciamento telomerico possa essere considerato un marcatore di aterosclerosi. Inoltre, tutti i maggiori fattori di rischio CV si associano ad una riduzione della LTL²³³, suggerendo una stretta relazione tra LTL ed eziopatogenesi delle malattie CV. Numerose sono le evidenze di una alterata LTL in condizioni di patologie vascolari e metaboliche (Tabella 2).

Cell type	Main findings	Year
EC	Telomere loss in human vascular disease	1995
Leukocytes	Telomere shortening in respiratory chain disorders	1997
Leukocytes	Telomere shortening in type 1 diabetic patients	1998
Leukocytes	Short telomeres in vascular dementia	2000
Leukocytes	Biology of cardiovascular aging differs between men and women	2001
Leukocytes	Telomere shortening in severe CAD	2001
HAEC	Loss of telomere induces endothelial dysfunction	2002
PBMC	Telomere shortening in CAD with metabolic disorders	2003
Leukocytes	Short telomeres with risk of premature MI	2003
Coronary EC	Telomere shortening in CAD	2004
Leukocytes	Telomere shortening in CAD with plaques	2004
Leukocytes	Telomere shortening correlating with cardiovascular damage	2004
PBMC	Telomere shortening in response to life stress	2004
Leukocytes	Telomere shortening in type 2 diabetic patients	2005
		2007
Leukocytes	Menopause impacts telomere length and its relation to IR and inflammation	2006
Leukocytes	Rise in BMI causes telomere attrition	2005
Leukocytes	Obesity and smoking accelerates human ageing	2005
Leukocytes	Aldosterone might be linked to telomere attrition and perhaps increased biological ageing	2005
Leukocytes	Telomere shortening in calcific aortic valve stenosis	2006
Leukocytes	Telomere shortening in IR & hypertension	2006
Monocytes	Telomere shortening in type 2 diabetes	2006
Leukocytes	Telomere shortening in Cardiovascular Health Study (CHS)	2006
Leukocytes	Telomere shortening in IGT subjects	2007
Leukocytes	Type 2 diabetic subjects with carotid plaques exhibit shorter telomeres	2007
Leukocytes	Telomere length is associated with future CHD	2007

EC, endothelial cell; HAEC, human aortic endothelial cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; MI, myocardial infarction; CAD, coronary artery disease; IR, insulin resistance; IGT, impaired glucose tolerance

Tabella 2. Studi nell'uomo che hanno mostrato una associazione tra ridotta LTL e malattie vascolari e metaboliche. (Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Monickaraj SF, Mohan V Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. Indian J Med Res. 2007 Mar;125(3):441-50)

Di seguito sono presi in considerazione i principali fattori di rischio CV in relazione alla LTL.

Età

L'incidenza di aterosclerosi e patologia CV aumenta con l'età. L'attività della telomerasi è indispensabile per il mantenimento delle lunghezza telomerica, ed è stato dimostrato come telomeri eccessivamente corti e ridotta attività telomerasica siano associati ad un prematuro invecchiamento nell'uomo ²¹⁹. La LTL è inversamente correlata all'età ^{234,235}. In aggiunta individui con telomeri corti sono più predisposti a manifestare invecchiamento vascolare ²³⁶ e patologie età correlate, *in primis* quelle CV ²³⁷.

Genere

Notoriamente le donne in età fertile sono meno soggette alle malattie CV²³⁸. Numerosi studi confermano che la lunghezza telomerica è minore negli uomini rispetto alle donne^{236,239,240,241,235}. Ricerche condotte sia sull'animale sia sull'uomo, hanno dimostrato una maggiore attività telomerasica e minore esaurimento telomerico correlato al genere, risultante in una maggiore lunghezza telomerica nel genere femminile rispetto a quello maschile^{242,243,244}. La minore incidenza di malattie CV nelle donne in pre-menopausa è, in parte, attribuibile agli estrogeni²⁴⁵. In aggiunta alla ben caratterizzata azione sul metabolismo delle lipoproteine e sulle cellule vascolari, gli estrogeni potrebbero esercitare un'influenza anche sull'omeostasi telomerica, contribuendo al benefico effetto sul sistema CV²⁴⁶.

Una differente LTL legata al genere risulta assente in pazienti affetti da DM di tipo 2^{239, 247}. Questa osservazione supporta il ben noto fatto che le donne con DM di tipo 2 perdono la loro protezione dalle patologie associate. E' necessario quindi approfondire le relazioni tra la differenza di genere relativamente alla lunghezza telomerica e alla storia naturale del DM, utilizzando studi longitudinali che coinvolgano donne in età pre e post menopausale²⁴⁸. Questo è importante sia poiché gli estrogeni sono potenti agenti anti-infiammatori e anti-ossidanti²⁴⁹, sia perché si ritiene che variazioni ormonali nella donna possano influire notevolmente sull'IR, sull'adiposità, sullo stress ossidativo e sulla lunghezza telomerica²⁴⁶

Fumo di sigaretta

Il fumo di sigaretta, fra i fattori di rischio CV, è quello che induce la maggiore produzione di radicali liberi, sia acutamente, sia cronicamente²⁵⁰ inducendo una condizione di aumentato stress ossidativo. Tramite questi meccanismi, l'abitudine al fumo di sigaretta porta a disfunzione endoteliale, *primum movens* per la formazione della placca aterosclerotica. La

sospensione del fumo di sigaretta^{167, 251} e la terapia antiossidante²⁵² migliorano infatti la funzione endoteliale nei tabagisti. La disfunzione endoteliale è ipotizzabile possa essere mediata indirettamente dall'induzione della senescenza cellulare tramite accorciamento telomerico mediato dallo stress ossidativo stesso²²³.

Iperensione arteriosa

L'ipertensione si associa ad una ridotta lunghezza telomerica, in molti, ma non in tutti gli studi^{253,240}. Negli uomini ipertesi, i telomeri sono più corti rispetto a uomini normotesi anche dopo aggiustamenti per l'età²⁵⁴. La pressione differenziale, ovvero la differenza fra la pressione sanguigna diastolica e sistolica, che è nota aumentare con l'età, è considerata un indicatore dell'età biologica delle arterie di grosso calibro²⁴¹ e di mortalità CV²⁵⁵. Nell'uomo la LTL correla negativamente con la pressione differenziale, indipendentemente dall'età²⁴¹; questo non è stato riscontrato nel genere femminile²³⁶. Il sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAS) condiziona l'esito di pazienti coronaropatici²⁵⁶. A riguardo, il Framingham Heart Study, ha mostrato come l'accorciamento telomerico sia legato ad un attivazione del sistema RAS, che si associa ad aumentato stress ossidativo e infiammazione in particolare in soggetti ipertesi²⁵⁷.

Ipercolesterolemia

L'ipercolesterolemia è una disfunzione metabolica favorente l'aterosclerosi tramite infiammazione e stress ossidativo. In presenza di ipercolesterolemia è stato evidenziato un accorciamento della LTL che quindi potrebbe rappresentare un indice di aumentato turnover endoteliale e cellulare²⁵⁸.

Obesità

La diminuita LTL è associata a obesità, IR ed a diminuiti livelli di leptina sierica²²³. Uno studio ha osservato una riduzione della LTL in seguito all'aumento di peso nell'arco di dieci anni,

correlando inversamente l'aumento di BMI con la LTL ²⁵⁹. L'aumento di peso comporta un aumento dell'IR, ciò suggerisce che sia l'IR ad agire sulla LTL.

2.11.7. Lunghezza telomerica leucocitaria nelle patologie cardiovascolari

La LTL è stata dimostrata ridotta nella maggior parte delle patologie CV.

LTL e patologie coronariche acute e infarto miocardico.

Diminuita LTL è stata riscontrata in caso di patologia coronarica acuta ^{228,260}, ed è associata ad un rischio di sviluppare la stessa in futuro ²⁵³. Uno studio coinvolgente 383 soggetti ha mostrato un rischio circa tre volte maggiore di andare incontro ad infarto miocardico acuto (IMA) prematuro in presenza di ridotta LTL ²³⁷. Questo risultato è stato confermato da un ampio studio comprendente 1542 partecipanti, il quale ha dimostrato che soggetti con LTL risultante nel minore o nel medio terzile, avevano un maggiore rischio di sviluppare patologie coronariche acute, rispetto ad individui con telomeri più lunghi ²³². La stessa indagine ha mostrato come la terapia farmacologica con statine è di maggiore beneficio in individui con telomeri più corti. Diminuita LT è stata riscontrata anche nelle cellule endoteliali vascolari ²⁶¹ e coronariche ²²⁶:

Questo è dovuto al fatto che le cellule endoteliali umane perdono telomeri ad ogni ciclo replicativo e la perdita di telomeri è maggiore in tessuti suscettibili all'aterosclerosi ²⁶¹. Questo implica che la senescenza cellulare giochi un ruolo di rilievo nel determinare l'insorgenza e l'evoluzione delle patologie coronariche acute.

LTL e insufficienza cardiaca cronica

LTL ridotta è presente nell'insufficienza cardiaca (IC) ²⁰⁸. L'insufficienza cardiaca è caratterizzata da un'aumentata apoptosi ^{262,263}. Numerosi studi su modelli animali hanno portato ad importanti intuizioni fisiopatologiche circa il ruolo dei telomeri e della telomerasi

nell'insufficienza cardiaca e nell'apoptosi dei miociti ^{264,265}. Oggi, le cellule cardiache non sono più considerate come una omogenea popolazione di cellule post-mitotiche, bensì, il miocardio è ritenuto essere costituito da una popolazione eterogenea di miociti con diverse età biologiche; i miociti invecchiano prematuramente in determinate condizioni fisiopatologiche. Esperimenti su topi hanno mostrato come il tessuto cardiaco rinnovi continuamente il compartimento miocitario, rimpiazzando miociti senescenti e ipofunzionanti con altri di nuova generazione ²⁶⁶. Gli stessi miociti senescenti ed ipofunzionanti avevano telomeri fortemente ridotti, mentre le cellule giovani ed efficienti mostravano telomeri più lunghi ²³². Una possibile risorsa di giovani miociti potrebbe essere il pool di cellule cardiache progenitrici (CPCs). E' stato riportato che le CPCs hanno la capacità, simile a quella delle cellule staminali, di aumentare di numero in seguito ad IMA ²⁶⁷ e di migrare nelle zone danneggiate e generare nuovi, giovani miociti ²⁶⁸. Nel cuore umano insufficiente, i telomeri sono più corti rispetto ai controlli sani, di pari età. Questo suggerisce che l'accorciamento telomerico nel tessuto cardiaco non necessariamente accompagni il normale invecchiamento. Una possibile spiegazione per l'aumento del numero di miociti disfunzionanti e prematuramente invecchiati nell'insufficienza cardiaca, potrebbe essere l'accorciamento telomerico. Come già menzionato precedentemente, l'aterosclerosi, uno dei fattori di rischio per l'insufficienza cardiaca, è associata ad accorciamento telomerico. Tuttavia, recenti studi su esseri umani, hanno suggerito un importante ruolo dei telomeri nella patogenesi dell'IC non-ischemica. Biopsie endomiocardiche eseguite su diciannove pazienti anziani con cardiomiopatia dilatativa, sono state confrontate con quelle eseguite su sette pazienti di pari età ma senza cardiomiopatia. I miociti dei pazienti anziani e malati, hanno mostrato notevole accorciamento telomerico, senescenza cellulare e morte cellulare ²⁶². Questo risultato preliminare, è stato recentemente confermato in un'ampia coorte

formata da 620 pazienti con IC e 183 controlli di pari età e genere²²⁷. I telomeri sono risultati correlati alla severità dell'IC, essendo più corti in pazienti appartenenti ad una classe NYHA più alta²²⁷.

3. Scopo dello studio

3.1 Scopo dello studio 1

Abbiamo precedentemente descritto come in letteratura sia nota una diminuzione del numero di EPCs in associazione alla presenza di fattori di rischio e patologie CV. Il numero di EPCs circolanti è altresì ridotto in presenza di manifestazioni cliniche di IR, quali Sindrome Metabolica, ridotta tolleranza glucidica e DM.

Ad oggi, non è noto quali siano i principali determinanti del numero di EPCs circolanti e il loro possibile ruolo quali marcatori di stratificazione precoce di rischio CV in soggetti adulti sani, in assenza di patologie metaboliche e CV conclamate.

Abbiamo quindi valutato il numero di EPCs in una popolazione di giovani adulti sani, in relazione alla presenza di fattori di rischio CV noti, con particolare riferimento all'IR.

3.2 Scopo dello studio 2

La LTL risulta ridotta in presenza di fattori di rischio CV o patologie CV manifeste. Una loro riduzione è stata associata anche allo sviluppo di aterosclerosi ed è stato dimostrato come essa sia in grado di predire il rischio CV.

Ad oggi, non è noto quali siano i principali determinanti della LTL e il possibile ruolo come marcatore di stratificazione precoce di rischio CV in soggetti giovani adulti sani, a basso rischio CV e in assenza di patologie CV conclamate.

Abbiamo pertanto valutato la LTL in una popolazione di soggetti giovani adulti sani, in relazione alla presenza di fattori di rischio CV, di aterosclerosi subclinica e di indice cumulativo di rischio CV (FRs).

4. Disegno dello studio

4.1. Popolazione in studio

Lo studio è stato condotto in una popolazione di soggetti sani di ambo i generi in età fertile selezionati tra i figli dei partecipanti allo studio longitudinale osservazionale Barilla, studio epidemiologico intrapreso nel 1981 con un follow-up nel periodo tra il 1993 e il 1995. Lo Studio Barilla, che ha coinvolto 325 soggetti apparentemente sani, si proponeva lo scopo di indagare l'impatto dell'IR su alcuni aspetti della patologia CV⁹⁶.

Il reclutamento è stato effettuato inviando una lettera di invito alla partecipazione allo studio indirizzata ai figli dei soggetti reclutati nello studio Barilla (follow-up 1993-94). I soggetti, qualora interessati, sono stati invitati a contattare telefonicamente i ricercatori per fissare l'appuntamento per la visita di screening durante la quale ai soggetti venivano fornite esaustive informazioni riguardo gli intenti e il disegno dello studio, nonché delle procedure sperimentali che sarebbero state effettuate. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale ed i soggetti che accettavano di partecipare allo studio, venivano invitati a firmare un consenso informato.

I criteri di inclusione allo studio comprendevano:

- Entrambi i sessi
- Età compresa tra i 18 e i 65 anni
- Assenza di criteri di esclusione

I criteri di esclusione allo studio comprendevano:

- Donne in post-menopausa

- Gravidanza
- Pregressi eventi cardiovascolari
- Diabete di tipo 1 o di tipo 2
- Tumori maligni pregressi o attuali, con l'eccezione di neoplasie cutanee (ad eccezione del melanoma) e tiroidee (ad eccezione degli istotipi midollare e anaplastico)
- Patologie acute in atto
- Malattie autoimmuni o malattie infiammatorie croniche
- Insufficienza d'organo o severe patologie sistemiche
- Malattie psichiatriche o condizioni favorenti una scarsa compliance al protocollo dello studio
- Assunzione cronica di farmaci o introito alcolico >80 g/die

4.2 Valutazione clinica dei soggetti in studio

La parte clinica dello studio è stata articolata in tre incontri: visita di screening, visita metabolica e visita vascolare.

4.2.1 Visita di screening

Nella visita di screening i soggetti sono stati ampiamente informati riguardo gli intenti dello studio ed invitati a firmare il consenso informato in duplice copia. Una copia veniva consegnata al paziente, anche per informare il medico curante, mentre l'altra veniva archiviata nella documentazione riguardante lo studio. Ad ogni paziente reclutato, era assegnato un codice identificativo ed i dati anagrafici e personali venivano inseriti in un database computerizzato. Durante tale visita veniva valutata la eleggibilità allo studio verificando i criteri di inclusione ed esclusione, quindi erano concordate le date per le visite successive.

4.2.2 Visita metabolica

Durante tale visita venivano raccolti i seguenti dati anamnestici:

- Anamnesi fisiologica riguardante fumo, introito alcolico, esercizio fisico, ciclo mestruale
- Anamnesi patologica remota familiare e personale
- Farmaci assunti in passato (utilizzando il database CODIFA)

In seguito veniva svolto l'esame obiettivo e controllati i seguenti parametri:

- parametri antropometrici: altezza, peso e circonferenza vita.

La circonferenza vita è stata misurata seguendo il protocollo NHANES III²⁶⁹ con un metro da sarto con approssimazione al più vicino 0.5 cm. La circonferenza vita è stata misurata in

posizione eretta, valutando una linea orizzontale parallela al terreno, passante per le due spine iliache a fine espirazione.

- parametri cardiovascolari: pressione arteriosa e frequenza cardiaca

La misurazione della pressione arteriosa sistolica e diastolica è stata effettuata con il metodo auscultatorio mediante uno sfigmomanometro a mercurio (Riva-Rocci) nel braccio non dominante in posizione supina dopo un riposo di circa 5 minuti. La misura della pressione è stata rivalutata nuovamente dallo stesso operatore dopo un intervallo di 2 minuti, considerando come valore la media delle due misurazioni. La frequenza cardiaca è stata valutata con metodo palpatorio per un intervallo di tempo di 30 secondi.

- valutazione metabolica

Ai pazienti veniva richiesto di presentarsi al mattino a digiuno e di astenersi, per le 12 ore precedenti la visita, dalla assunzione di caffè e di fumo di sigaretta. Veniva incannulata la vena antecubitale per il prelievo di sangue venoso al fine di determinare i seguenti parametri ematochimici:

- Emocromo con formula leucocitaria
- Glicemia
- Colesterolo totale, Colesterolo HDL, Trigliceridi; il colesterolo LDL è stato ricavato mediante la formula di Friedewald ²⁷⁰
- Aspartato aminotransferasi (AST), Alanina amino transferasi (ALT);
- Gammaglutamil transpeptidasi (γGT); Fosfatasi alcalina (ALP)
- Acido Urico

I soggetti in studio venivano sottoposti ad ulteriore prelievo di 50ml di sangue periferico per l'isolamento di cellule mononucleate (utilizzate in seguito per la determinazione della LTL) e

plasma. E' stato eseguito un ulteriore prelievo di 3 ml in EDTA come anticoagulante per la valutazione del numero di cellule progenitrici endoteliali.

Il plasma isolato veniva conservato a -80°C per successive analisi biochimiche:

- PAI-1
- hsPCR
- IL-6 e TNF- α

Durante la stessa seduta è stato eseguito anche un test di tolleranza orale del glucosio (OGTT): dopo aver effettuato i prelievi precedentemente descritti, ai soggetti veniva infatti somministrata una soluzione contenente 75g di glucosio, da assumere nei 5 minuti successivi. Quindi, dopo 30, 60 e 120 minuti, veniva prelevato un campione di sangue periferico per la misurazione della glicemia e insulinemia plasmatica e per lo stoccaggio di aliquote di plasma, conservate a -80°C per eventuali successive misurazioni.

4.2.3 Visita vascolare

La visita vascolare consisteva nella determinazione dell' IMT carotideo e del calcolo del FRs. A tutti i soggetti partecipanti allo studio, è stata eseguita la misurazione dell'IMT tramite ultrasonografia Doppler. I soggetti sono stati esaminati in posizione supina, dopo avere rimosso vestiti e gioielli dall'area di osservazione. L'esaminatore era posizionato al capo del paziente. Durante il test è stata eseguita una registrazione elettrocardiografica in continuo e le immagini ultrasonografiche sono state registrate tramite un supporto digitale contestualmente alla fase telediastolica del ciclo cardiaco (come riferimento è stata usata la deflessione dalla linea isoelettrica, misurata dall'inizio del complesso QRS).

Per ciascuno dei 3 segmenti carotidei principali (carotide comune, biforcazione e bulbo della carotide interna) e per ogni scansione longitudinale sono stati registrati "loops" di

immagini specifici per la visualizzazione “near-wall” e della “far-wall, ottenute tramite inclinazione della sonda e del capo del soggetto in modo da ottenere una disposizione orizzontale dell’immagine della parete vasale. Le misurazioni sono state complessivamente eseguite in 36 punti differenti (2 lati x 3 proiezioni x 3 segmenti x 2 pareti), in modo da poter calcolare l’IMT medio (media dell’IMT massimo per ciascuno dei punti) e quello massimo (massimo valore misurato).

Calcolo del Framingham Risk score: i pazienti sono stati stratificati in classi di rischi CV, calcolando per ognuno di essi il rischio cumulativo, tramite l’algoritmo FRs²⁷¹, utilizzando alcuni dei dati anamnestici e ematochimici raccolti, in particolare: genere, età, fumo di sigaretta, pressione arteriosa, colesterolo totale.

5. Materiali e metodi

5.1 Valutazione del numero di EPCs

Il numero di EPCs circolanti è stato valutato tramite tecnica citofluorimetrica. Nonostante la tecnica sia ampiamente utilizzata non esiste ad oggi un protocollo standardizzato per la valutazione numerica delle EPCs.

Ritengo quindi importante sottolineare come la fase di messa a punto della metodica abbia richiesto tempo ed in particolare essa abbia riguardato:

- Ottimizzazione delle procedure di lisi dei globuli rossi usando una soluzione a base di Ammonio Cloruro
- Settaggio delle condizioni di analisi citofluorimetrica utilizzando sangue di cordone ombelicale come controllo positivo per i marcatori di staminalità
- Valutazione dell'affinità e della specificità di diversi anticorpi CD34 nella linea cellulare TF1 (CD34 costitutiva)
- Valutazione della variabilità intra assay mediante analisi in triplicato in un sottocampione di 20 soggetti

5.1.1 Principi di citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso (CFM) è una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido, garantendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa in tempi rapidi. La capacità di analizzare un elevato numero di cellule in breve tempo (50.000 cellule in pochi secondi), quantificando diversi parametri per

ogni cellula, fa sì che l'impiego della CFM sia largamente diffuso sia nei laboratori clinici sia in quelli di ricerca.

La sospensione cellulare viene iniettata in un sistema fluidico, il quale tende a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontrano un fascio di luce focalizzata proveniente da un laser. In generale, i citofluorimetri utilizzano una sorgente luminosa a ioni Argon centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu), che consente una efficace misura dei parametri fisici e la contemporanea eccitazione di diversi fluorofori. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare, ciascuna cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione e riflessione. In particolare la luce dispersa in avanti (forward scatter) è legata alle dimensioni delle cellule, mentre la luce riflessa a 90° (side scatter) è da attribuire alla morfologia cellulare come granulosità del citoplasma, rapporto nucleo/citoplasma, rugosità di superficie. Vengono inoltre raccolti ed analizzati i segnali luminosi provenienti da eventuali fluorofori coniugati ad anticorpi legati alla superficie cellulare. I segnali emessi vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi, filtri ottici ed inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi o fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore che provvede alla visualizzazione dei dati su monitor, rappresentazione grafica e definizione statistica (Figura 29).

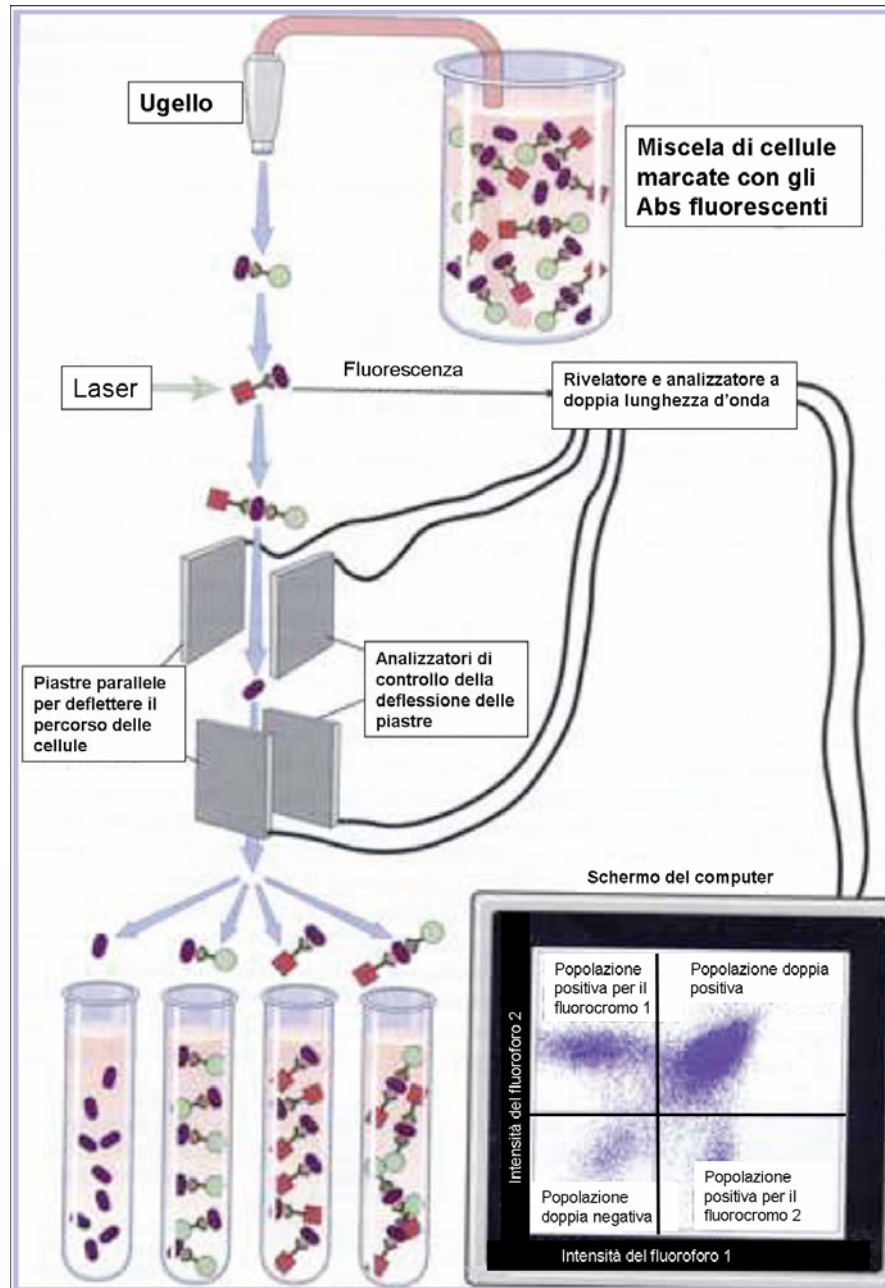


Figura 29: Schema delle componenti del citofluorimetro.
 (<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/insegnamenti/documents/lezione717-5-05.PDF.pdf>)

Il diagramma bidimensionale che si ottiene dalla combinazione del forward e del side scatter è detto citogramma e permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari basandosi solo sulle loro proprietà fisiche (Figura 30).

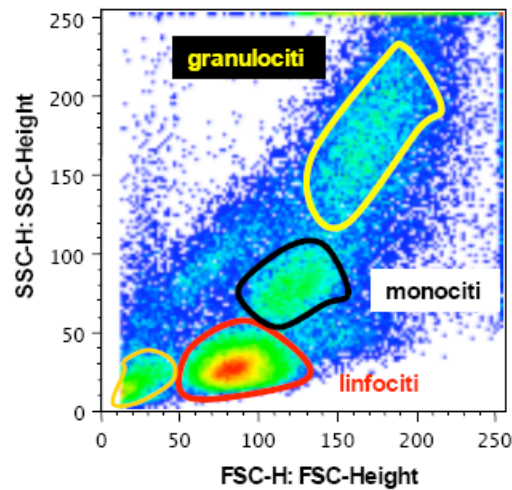


Figura 30: Esempio di citogramma

(<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/insegnamenti/documents/lezione717-5-05.PDF.pdf>)

La velocità di efflusso delle cellule viene valutata come numero di eventi al secondo: numero di particelle che hanno incontrato il raggio di luce nell'unità di tempo. Nel diagramma Dot-plot ogni singolo punto rappresenta un evento, mentre nel Contour-plot la visualizzazione di aree con stessa densità è evidenziata da linee concentriche (Figura 31).

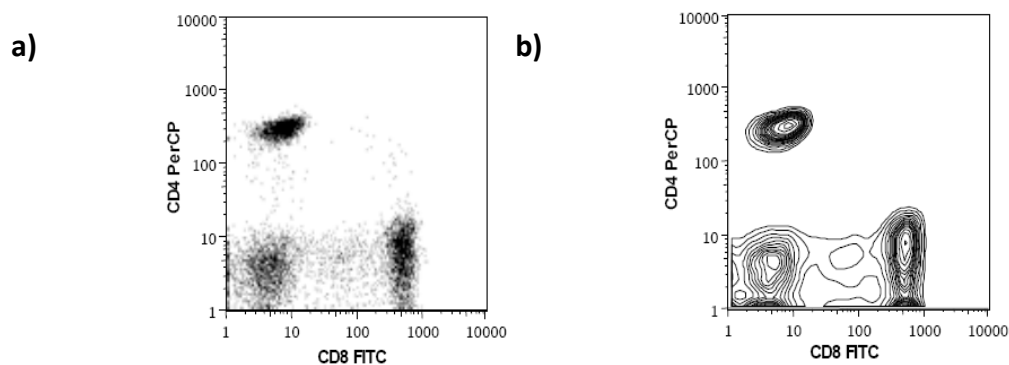


Figura 31: Esempio di dot-plot (a) e contour-plot (b)

(<http://www.uniurb.it/biotecnologie/didattica/insegnamenti/documents/lezione717-5-05.PDF.pdf>)

I segnali di fluorescenza in citofluorimetria normalmente vengono rilevati tramite le emissioni generate dall'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo. Ciò permette

l'identificazione di popolazioni e sottopopolazioni cellulari. I fluorofori maggiormente utilizzati sono: il FITC (fluoresceina isotiocianato), che emette ad una lunghezza d'onda di 520 nm (verde), l'APC (allofocianina), che emette ad una lunghezza d'onda di 700 nm (rosso lontano) e il PE (ficoeritrina), che a sua volta emette a 575 nm (rosso).

Ogni esperimento di immunofenotipizzazione deve includere un controllo marcato con anticorpi non reattivi dello stesso isotipo e coniugati con lo stesso fluorocromo degli anticorpi utilizzati al fine di valutare il segnale di autofluorescenza e l'eventuale "rumore di fondo". Questo campione costituisce il cosiddetto controllo isotipico o isotipo. I fluorocromi devono essere scelti in modo tale che le rispettive bande di emissione siano sufficientemente separate da permettere la loro appropriata misurazione. L'uso di filtri e specchi rende possibile la separazione delle lunghezze d'onda, ma, per evitare ogni minima sovrapposizione, si effettua la compensazione. La compensazione è un processo che ha lo scopo di sottrarre da in certo canale una quota fissa di segnale relativo alle emissioni di un altro fluorocromo.

5.1.2 Caratterizzazione delle EPCs

Le EPCs sono state identificate per la presenza di specifici antigeni di superficie, utilizzando una tripla marcatura con anticorpi monoclonali anti-CD34 anti-KDR e anti-CD133. Il protocollo prevedeva un prelievo a digiuno di 2ml di sangue venoso periferico in acido etilendiamminicotetracetico (EDTA). I campioni sono stati processati entro 2 ore dal prelievo, marcati con gli anticorpi specifici, sottoposti a lisi degli eritrociti e quindi a centrifugazione per l'isolamento della componente leucocitaria per l'analisi citofluorimetrica. Ogni campione prevedeva un controllo isotipico tramite la marcatura con immunoglobuline IgG1.

Nel dettaglio il protocollo prevedeva:

1. prelievo a digiuno di sangue periferico in provette da 2 ml in presenza di anticoagulante EDTA.
2. allestimento di due provette, ciascuna con 250 μ l di sangue, in modo tale da avere un controllo e un trattato.
3. aggiunta di 15 μ l di FcR (FcR Blocking Reagent: Miltenyi Biotec, Auburn, CA) per 15 minuti a 4°C al buio. Questo passaggio è indispensabile per ridurre il legame aspecifico tra gli anticorpi e le cellule che riconoscono e legano la porzione Fc delle immunoglobuline.
4. marcatura del trattato con anticorpi monoclonali:
 - 10 μ l di anticorpo anti CD34 coniugato con il fluoroforo FITC
 - 10 μ l di anticorpo anti KDR coniugato con il fluoroforo PE
 - 10 μ l di anticorpo anti CD133 coniugato con il fluoroforo APCseguita da incubazione per 30 minuti al buio a 4°C.
5. marcatura dei controlli con un ugual volume di immunoglobuline IgG1 (IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC)
6. incubazione del campione per 10-15 minuti con 3,5 ml di soluzione di lisi dei globuli rossi (4,013g di cloruro di ammonio, 0,5g di bicarbonato di potassio e 0,0185g di EDTA pesati con bilancia analitica su tre diverse cartine dissolti in H₂O distillata per un volume finale di 500ml.- soluzione titolata a pH 7.1-7.2 con HCl) fino ad ottenere una soluzione limpida.
7. risospensione del pellet, ottenuto dopo centrifugazione per 10 minuti a 1500rpm a 4°C, in 400 μ l di Phosphate buffered saline (PBS) + 0.5% Foetal Bovine Serum (FBS) prima della lettura al citofluorimetro a flusso

5.1.3 Quantificazione del numero di EPCs

La lettura citofluorimetrica consiste in due fasi: acquisizione ed analisi.

L'**acquisizione** permette di osservare le tre popolazioni cellulari (linfociti, monociti e granulociti), le quali vengono rappresentate in grafico secondo le loro dimensioni e la loro granulosità. Ciascuna popolazione appare come una "nuvola" più o meno densa in base agli eventi acquisiti. Lo strumento viene settato per l'acquisizione di 500.000 eventi totali.

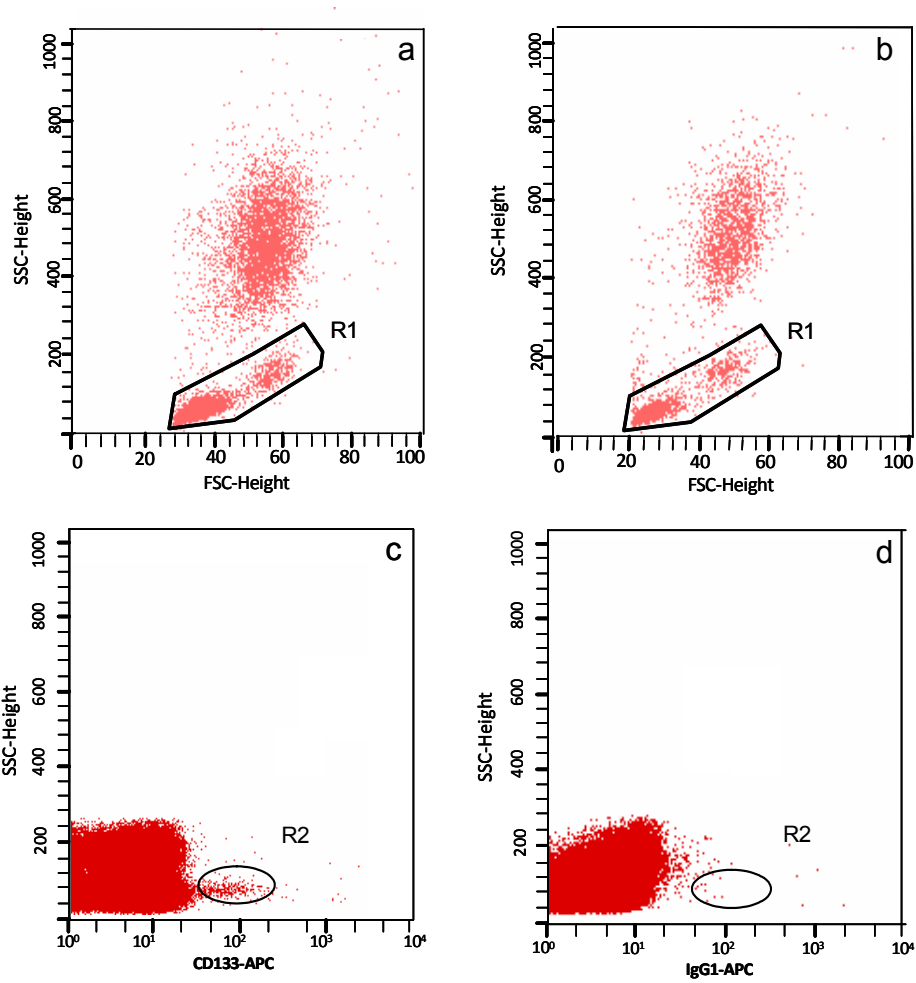
L'acquisizione è seguita dall'**analisi**, effettuata sulla popolazione dei linfomonociti, alla quale appartengono le EPCs. Ciascun Dot-Plot permette di individuare all'interno della popolazione selezionata le cellule che esprimono i marcatori CD34, KDR, CD133

In particolare come possiamo osservare in Figura 32:

1. I dati vengono analizzati individuando e delimitando dapprima la popolazione linfo-monocitaria R1 nel trattato e nel controllo isotipico.
2. All'interno della regione R1 viene valutata la percentuale di cellule che esprimono il marker CD133 (R2) nel trattato e nel controllo isotipico
3. All'interno della regione R1 viene valutata la percentuale di cellule che esprimono contemporaneamente i marker CD133 e CD34 (R3) nel trattato e nel controllo isotipico.
4. All'interno della popolazione delle cellule CD133 positive (R2) viene valutata la percentuale di cellule KDR positive, identificando la popolazione di CD133⁺/KDR⁺ EPCs nel trattato e nel controllo isotipico.
5. All'interno della popolazione delle cellule CD133 e CD34 positive (R3) viene valutata la percentuale di cellule KDR positive, identificando così la popolazione di CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs.

Abbiamo quindi analizzato due popolazioni di EPCs: le CD133⁺/KDR⁺ EPCs e le CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs. Di 122 soggetti studiati, in un sottogruppo di 20 soggetti la

valutazione del numero di CD133⁺/KDR⁺ EPCs e CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs è stata eseguita in triplicato per valutare la variabilità intra-assay che è risultata del 19% circa per entrambe le popolazioni.



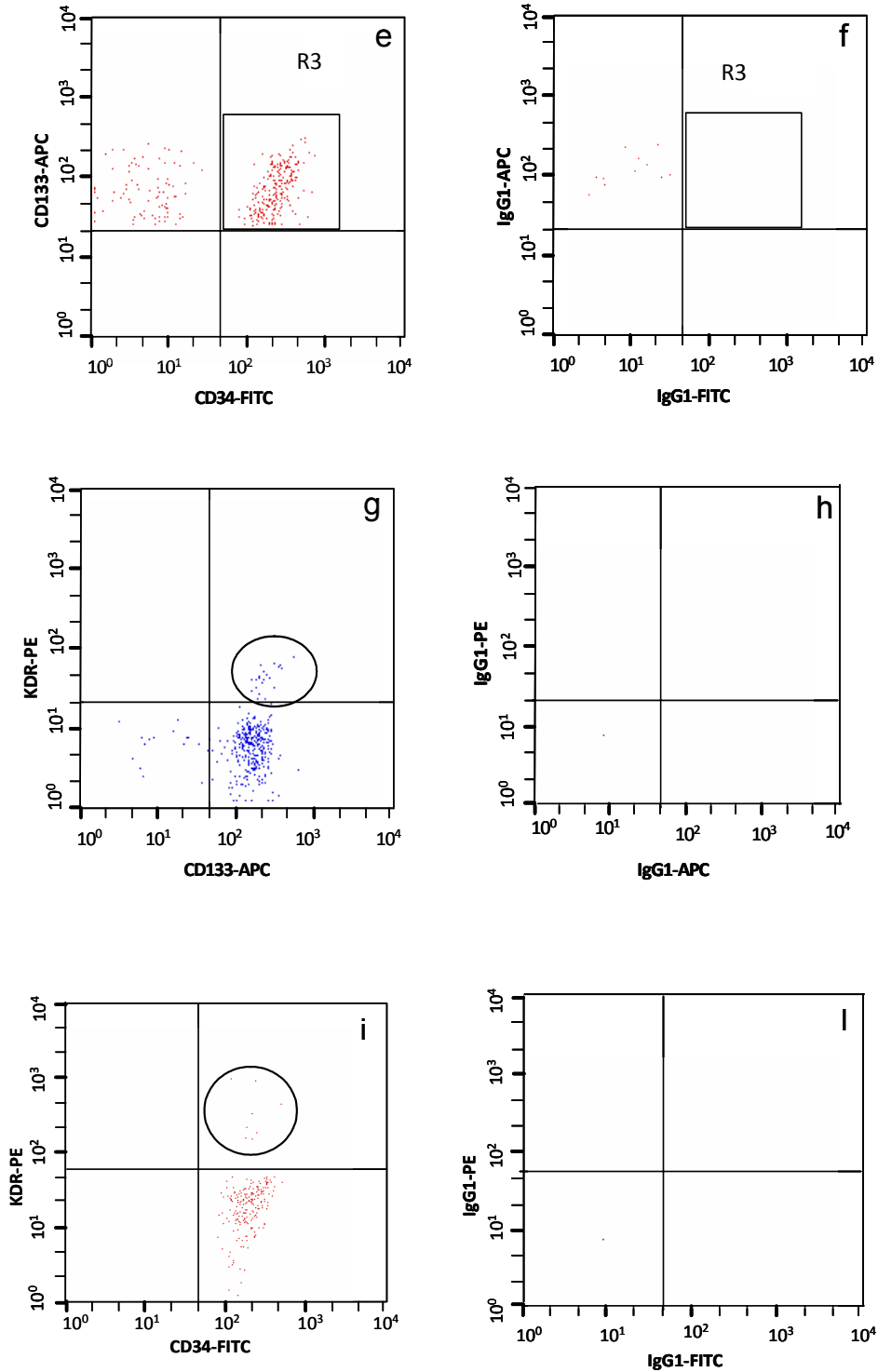


Figura 32: Esempio di Scatter Dot plots dell'analisi citofluorimetrica per la valutazione della conta delle EPCs. Delimitazione della popolazione linfomonocitaria (R1) sia nel campione (a) che nell'isotipo (b). Valutazione in R1 dell'espressione del marcatore CD133 nel campione (c), e nell'isotipo (d). Identificazione della sottopopolazione CD133⁺/CD34⁺ all'interno di R1 nel campione (e) e nell'isotipo (f). Analisi dell'espressione di KDR in R2 e R3 e identificazione rispettivamente della popolazione KDR⁺/CD133⁺ nel campione (g) e nel controllo isotipico (h) e della popolazione CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ nel campione (i) e nel controllo (l).

5.2 Determinazione della Lunghezza telomerica leucocitaria

5.2.1 Metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica

Esistono in letteratura tre diverse metodiche per la valutazione della lunghezza telomerica. Ad oggi la metodica di riferimento è il saggio Telomere Restriction Fragment (TRF) basato su un ibridazione in Southern Blot (Figura 33A). La tecnica prevede dapprima la digestione del DNA estratto seguita da elettroforesi e trasferimento su membrana di nylon per successiva ibridazione e visualizzazione mediante chemiluminescenza o radioattività.

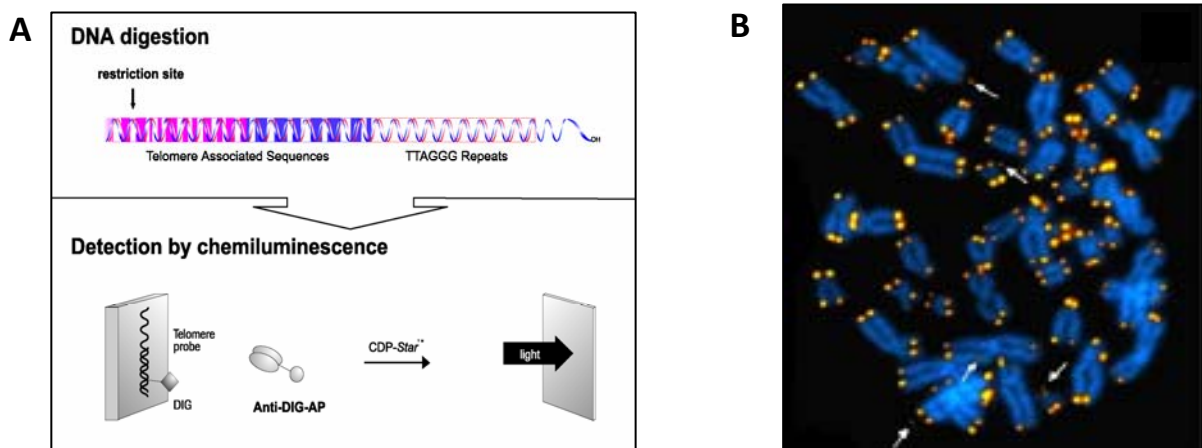


Figura 33. Metodiche di valutazione della lunghezza telomerica A) saggio Telomere Restriction Fragment (TRF) e B) saggio di quantitativo di fluorescenza *in situ* (q-FISH). (TeloTAGGG Telomere Length Assay (Roche) e Richard J. et al. Telomeres in T and B cells. 2002. Nature Reviews Immunology)

Un'altra metodica, di recente applicazione in questo campo, è la quantitativa *Fluorescent In Situ Hybridization* (q-FISH), riassumibile in un saggio di citogenetica che prevede l'ibridazione dei cromosomi fissati con una sonda fluorescente specifica per le estremità telomeriche (ripetizioni in tandem di TTAGGG) in seguito quantificata (Figura 33B). Entrambe queste metodiche sono di non semplice esecuzione ma soprattutto sono "time consuming" se si pensa ad una applicazione ad un ampio numero di campioni. La metodica senz'altro più

- Isolamento di PBMCs mediante centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep®.

Le cellule sono state impiegate per ottenere pellet secchi e per lo stoccaggio di aliquote conservate a -80°C.

- Estrazione del DNA dai pellets secchi di PBMCs
- Real-time PCR per la valutazione della LTL

Purificazione di cellule mononucleate da sangue periferico

Ad ogni paziente sono stati prelevati 50ml di sangue periferico processato entro poche ore.

La purificazione dei PBMCs è stata eseguita sotto cappa per ottenere la massima sterilità. I

PBMCs sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep®

(Sentinel, Milan, Italy), una soluzione costituita da polisaccarosio e sodiodiatrizoto.

Quando il sangue viene depositato su Lymphoprep e sottoposto a centrifugazione, le cellule

mononucleate vengono trattenute in corrispondenza dell'interfaccia tra la soluzione e il

plasma, mentre gli eritrociti precipitano sul fondo della provetta. La popolazione cellulare

dei linfomonociti appare quindi come un "anello" facilmente distinguibile (Figura 35).

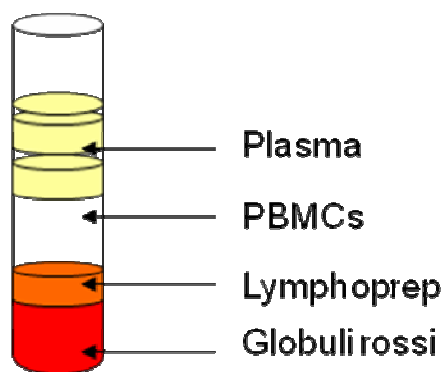


Figura 35. Stratificazione del sangue in seguito a centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep

Nello specifico il protocollo prevede:

- aggiunta di 5 ml di soluzione Lymphoprep, precedentemente portata a temperatura ambiente, in ciascun tubo.

- stratificazione di 7ml di sangue in ogni tubo, utilizzando la pipetta automatica e avendo cura di far scorrere lo stesso lungo la parete della provetta con un flusso continuo, in modo tale da ottenere due fasi ben distinte.
- centrifugazione per 20 minuti a 1800 rpm (800g) (senza utilizzare il sistema frenatura della centrifuga per non alterare le fasi che si vengono a creare).
- prelievo di 2-3ml di plasma da ciascun tubo, per successiva conservazione a -80°C (per futuri dosaggi chimici e di laboratorio)
- prelievo con la pipetta dell'anello dei linfomonociti che vengono raccolti in un tubo da 50ml.
- lavaggio delle cellule mediante l'aggiunta di PBS (phosphate buffered saline) (Invitrogen, San Diego, CA) a 4°C per un volume finale di 50ml centrifugando a 1500 rpm per 10 minuti e risospendendo le cellule in 20ml di PBS.
- conta delle cellule mediante camera di conta Neubauer. Dopo aver agitato bene la sospensione, si posizionano 7,5 μ l sul bordo del vetrino che copre la camera di conta e si contano le cellule al microscopio (figura 36).

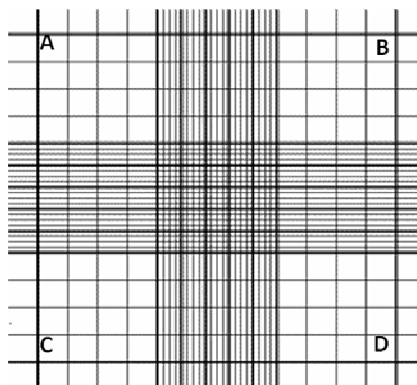


Figura 36. Camera di conta Neubauer

La camera Neubauer è formata da 4 quadrati grandi delimitati da linee triple, ognuno dei quali formato da ulteriori 16 quadrati più piccoli. Vengono contate le cellule contenute nei 4 quadrati grandi.

Effettuata la conta, il numero di cellule per ml si ottiene secondo la seguente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ cellule/ml} = \frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4$$

- secondo lavaggio con PBS centrifugando per 10 minuti a 1500 rpm e risospendendo in 10ml di PBS

Le cellule vengono ora impiegate per allestire pellets secchi, ognuno da 5×10^6 cellule

Per ottenere i pellets secchi:

- centrifugazione per 6 minuti a 8000 rpm a 4°C.
- eliminazione del surnatante.
- trasferimento dei pellets secchi a -80°C.

Estrazione del DNA

In un secondo momento il pellet di cellule mononucleate relativo ad ogni paziente dello studio viene utilizzato per l'estrazione del DNA mediante kit commerciale QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) (Qiagen Ltd, West Sussex, UK).

Nello specifico il protocollo prevede:

- Scongelo e risospensione dei pellet cellulari in PBS per un volume finale di 200µL
- Aggiunta 20µL di proteasi QIAGEN per lisare le cellule
- Aggiunta di 200µL di Buffer AL e rimescolamento al vortex per 15 secondi
- Incubazione a 56°C per 10 minuti
- Breve centrifugazione ai tubi per rimuovere le gocce dall'interno del tappo

- Aggiunta di 200 μ L di etanolo 100 % al campione e rimescolamento al vortex per 15 secondi
- Aliquota della soluzione all'interno delle colonnine QIAamp Spin Column e centrifugazione a 6000 x g per 1 minuto. Eliminazione del filtrato dal tubo di raccolta.
- Aggiunta di 500 μ l Buffer AW1 all'interno della colonnina e centrifugazione a 6000 x g per 1 minuto.
- Aggiunta di 500 μ l Buffer AW2 e centrifugazione a 20.000 x g per 3 minuti ed eliminazione del filtrato dal tubo di raccolta.
- Eluizione del DNA aggiungendo 200 μ l Buffer AE.
- Incubazione a temperatura ambiente per 1 minuto e infine centrifugazione a 6000 x g per 1 minuto
- 5×10^6 PBMCs danno una resa media di 6 μ g con un rapporto A_{260} / A_{280} di 1.7-1.9.

Valutazione della lunghezza telomerica leucocitaria mediante real-time PCR

Abbiamo già precedentemente illustrato le tre metodiche esistenti per la valutazione della lunghezza dei telomeri. Per il nostro studio ci siamo basati sulla metodica di PCR real-time, avendo essa i vantaggi di potere essere applicata ad un alto numero di campioni, di essere relativamente poco costosa e di rapida esecuzione.

La tecnica permette di misurare, per ogni campione di DNA, il fattore per il quale il campione differisce da un campione di DNA di riferimento nel suo rapporto tra i numeri di ripetizioni telomeriche rispetto al numero di ripetizioni di un gene a singola copia.

Per ogni campione di DNA (quindi per ogni soggetto dello studio) è stata effettuata una reazione di PCR quantitativa relativa alle estremità telomeriche ed in parallelo una analoga

reazione per l'amplificazione del gene a singola copia *36B4* (codificante per la fosfoproteina acida ribosomiale PO, localizzato sul cromosoma 12).

I protocolli per l'allestimento delle due reazioni sono del tutto analoghi, si differenziano per la sequenza dei primers usati e le temperature del ciclo di PCR real time (vedi tabelle 3, 4 e 5).

Nello specifico il protocollo prevede:

- Allestimento delle diluizioni di DNA per la curva standard (50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng)
- Preparazione del Mix di reazione (18 μ l per reazione) per i campioni in esame ed i controlli (standard interno e curva standard). Ogni campione viene analizzato in triplicato.
 - Primers 2 μ l (vedi tabella 3)
 - SYBR Green Mix 2X (10 μ l per reazione)
 - H₂O distillata a volume
- Dispensazione del Mix di reazione nei pozzetti
- Aliquota dei DNA (35 ng per campione) nei pozzetti relativi ai soggetti in studio e del DNA relativo alla curva standard
- In ogni piastra di PCR vengono riservati 3 pozzetti per uno standard interno: un campione di DNA di riferimento alla stessa concentrazione del DNA campione, necessario a normalizzare eventuali differenze tra i diversi saggi. Vengono quindi aliquotati 35ng di DNA relativo alle cellule 293 (cellule embrionali di rene umano)(il nostro standard interno)
- Copertura della piastra completa con apposita pellicola adesiva trasparente per evitare contaminazioni da agenti ambientali
- Programmazione dello strumento (iQ Real-Time PCR (Bio-Rad) per reazione di amplificazione e corsa di PCR real time
- Terminata la reazione di PCR si analizzano i dati

	SEQUENZA PRIMERS	CONCENTRAZIONE FINALE
Tel fw	<i>-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-</i>	5.4 μ M
Tel rev	<i>-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-</i>	18 μ M
36B4 fw	<i>-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-</i>	6 μ M
36B4 rev	<i>-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-</i>	10 μ M

Tabella 3. Sequenza dei primers utilizzati ed alle loro concentrazioni di utilizzo.

Ciclo 1:	(1X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 03:00
Ciclo 2:	(40X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 00:15
	Step 2:	54.0°C	Per 02:00
Ciclo 3:	(1X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 01:00
Ciclo 4:	(1X)		
	Step 1:	55.0°C	Per 01:00

Tabella 4. Ciclo di PCR real-time relativo all'amplificazione delle estremità telomeriche.

Ciclo 1:	(1X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 03:00
Ciclo 2:	(40X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 00:15
	Step 2:	58.0°C	Per 01:00
Ciclo 3:	(1X)		
	Step 1:	95.0°C	Per 01:00
Ciclo 4:	(1X)		
	Step 1:	55.0°C	Per 01:00

Tabella 5. Ciclo di PCR real time relativo all'amplificazione del gene 36B4.

Per ogni soggetto studiato sono stati quindi allestiti tre pozzetti per amplificare in triplicato le estremità telomeriche e altrettanti per l'amplificazione del gene 36B4. Per la successiva analisi statistica è stato utilizzato il valor medio del ciclo soglia calcolato dal test in triplicato (Figura 37).

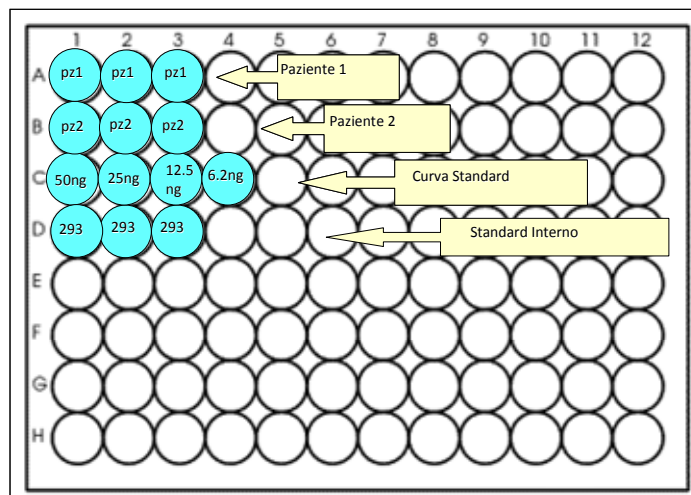


Figura 37. Esempio rappresentativo di allestimento di una piastra di PCR real-time relativo al DNA di due soggetti e controlli

Analisi dei dati della reazione PCR real-time e calcolo della T/S ratio

Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione, in cui il numero di cicli necessari perché un campione raggiunga il suo ciclo soglia C_t (Threshold Cycle) è inversamente proporzionale al numero di copie “target” presente inizialmente (quindi alla lunghezza telomerica). Per avere un indice che rifletta la reale lunghezza telomerica è necessario elaborare il valore del ciclo soglia per ottenere così una valida misura del parametro da noi studiato²⁷². Per prima cosa è importante normalizzare il valore di C_t ottenuto, rispetto al C_t di un gene espresso costitutivamente in singola copia. Il risultato che si ottiene è un rapporto assoluto tra ciclo-soglia telomerico e ciclo soglia del gene 36B4, che viene definito T/S ratio:

$$\text{T/S ratio} = (2^{C_t(\text{telomeri})} / 2^{C_t(36B4)})^{-1} = 2^{-\Delta C_t}$$

Si procede quindi alla quantificazione relativa che viene effettuata confrontando i cicli soglia dei due campioni con quello del controllo interno (DNA di cellule 293), normalizzando così il nostro campione con un campione di riferimento presente alla stessa quantità.

$$\text{T/S ratio relativa} = 2^{-(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Il valore di T/S ratio relativa così ottenuto è stato utilizzato per esprimere la LTL.

5.3 Dosaggi citochine

I parametri di laboratorio sono stati dosati con metodica standard. La hsPCR è stata dosata mediante un kit Elisa (ICN Pharmaceuticals, NY, USA), con una variabilità intra-assay e inter-assay CVs rispettivamente del 2.3% e del 2.5%.

Il PAI-1 è stato misurato utilizzando un kit Elisa (Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, France), con variabilità intra-assay del 4.0% e una variabilità inter-assay del 6.0%. Anche i livelli di TNF- α umano e di IL-6 sono stati misurati con metodica immunoenzimatica (Bender Medsystems GMBH, Vienna, Austria) con una variabilità intra-assay ed inter-assay del 6.0% e del 9.3% per quanto riguarda il TNF- α e del 5.0% e del 7.4% per il dosaggio dell'IL-6.

5.4 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come $\text{media} \pm \text{SD}$ (deviazione standard), ad eccezione delle variabili non normalmente distribuite che sono riportate come “interquartile range” (IQR).

Il numero di EPCs è stato espresso come percentuale di cellule esprimenti il KDR all'interno dei linfomonociti CD133 positivi ($\text{CD133}^+/\text{KDR}^+$), e all'interno dei linfomonociti $\text{CD34}^+/\text{CD133}^+$ ($\text{CD133}^+/\text{CD34}^+/\text{KDR}^+$). A causa della distribuzione non-normale dei valori di EPCs, sono stati applicati test non parametrici. Le correlazioni tra EPCs ed altre variabili sono state valutate mediante test delle correlazioni di Spearman. Le variabili significativamente correlate al numero di EPCs in analisi univariata, sono state inserite come variabili indipendenti in una analisi di regressione multipla lineare al fine di determinare quali fossero i migliori predittori dei valori di $\text{CD133}^+/\text{KDR}^+$ EPCs (variabile dipendente). È stato utilizzato un modello di regressione logistica per stimare gli odds ratio delle variabili in grado di predire un basso valore di $\text{CD133}^+/\text{KDR}^+$ EPCs. La determinazione della frequenza di distribuzione del genere nei quartili di insulinemia a digiuno è stata eseguita mediante test χ^2 . Le differenze tra i valori di EPCs in funzione della sensibilità insulinica e del genere sono state valutate mediante test per alternative ordinate (Jonkheere-Terpstra). Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per valutare le differenze tra gruppi appaiati con la correzione per confronti multipli.

I valori di T/S ratio sono log-normali e sono stati pertanto espressi come valori di $\log_{10} \text{T/S ratio}$. Le correlazioni tra T/S ratio e le variabili analizzate sono state valutate mediante la correlazione di Spearman. Per valutare le variabili indipendentemente correlate alla lunghezza telomerica, è stata eseguita una analisi di regressione multipla

inserendo nel sistema come dipendente la variabile T/S ratio e come variabili indipendenti le principali variabili ad essa correlate. I soggetti sono stati divisi in base al loro profilo di rischio CV in due sottogruppi: alto rischio (HR) con bassi livelli di LTL e EPCs (sotto il valore mediano); e basso rischio (LR) con alti livelli di LTL ed EPCs (sopra il valore mediano). Il test di Mann-Whitney e il t-test per dati non appaiati sono stati utilizzati in modo appropriato per valutare le differenze tra i gruppi HR e LR. La significatività statistica è stata accettata per un valore di $p < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS 15.0.

6. Risultati dello studio

6.1 Caratteristiche della popolazione studiata

Le caratteristiche della popolazione studiata, consistente in 122 soggetti giovani adulti sani, sono descritte nella tabella sottostante (Tabella 6). Nessuno tra i partecipanti allo studio assumeva alcuna terapia farmacologica. A seguito dell'OGTT, due soggetti sono stati definiti IGT e a due soggetti è stata posta diagnosi di DM e perciò sono stati esclusi dallo studio. La LTL è stata misurata in un sottogruppo di 82 soggetti.

Caratteristiche della popolazione in studio (=122)	Valori(M±SD)
Sesso (M/F)	73/49
Età (anni)	36.6±8
Abitudine al fumo (no/sì)	89/33
Storia familiare di diabete (no/sì)	112/10
Storia familiare di CVD (no/yes)	93/29
BMI (Kg/m ²)	24.6 ±4.2
Circonferenza Vita (cm)	88.6±11.1
Pressione arteriosa sistolica (mmHg)	116.4 ±14.6
Pressione arteriosa diastolica (mmHg)	74.9 ±12.1
Glicemia a digiuno (mg/dl)	87.2 ±9.2
Glicemia a 120 min da OGTT (mg/dl)	94.6±29.2
HDL (mg/dl)	58.5±15.4
Trigliceridi (mg/dl)	75.9 ±41.4
LDL (mg/dl)	128.4 ±31.2
Uricemia (mg/dl)	4.9 ±1.4
γGT (U/L)	20.8 ±14.1
GOT (U/L)	23.3±5.9
GPT (U/L)	24.2±12.8
PAI-1 (ng/ml)	19.1 ±14
hsCRP (mg/l)	1.1±1.9
WBCx10 ³ /ml	3.4 ±1
Monociti (x10 ³ /ml)	0.4 ±0.1
Insulinemia a digiuno (μU/ml)	7.6±6.5
Insulinemia a 120 min da OGTT(μU/ml)	28.5±23.3
EPC KDR-CD133 (%)	1.23 ±1.17
EPC CD133/CD34/KDR (%)	1.11 ±1.34
T/S ratio	7.08(19.50)

Tabella 6: Caratteristiche dei soggetti in studio

6.2 Studio 1: valutazione del numero di EPCs in relazione alla IR

Sono state studiate due popolazioni di EPCs: le CD133⁺/KDR⁺ EPCs e le CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs. Sono state espresse come percentuale di cellule positive per il KDR all'interno delle popolazioni CD133⁺ e CD133⁺/CD34⁺ rispettivamente. La distribuzione delle due popolazioni è rappresentata in Figura 38.

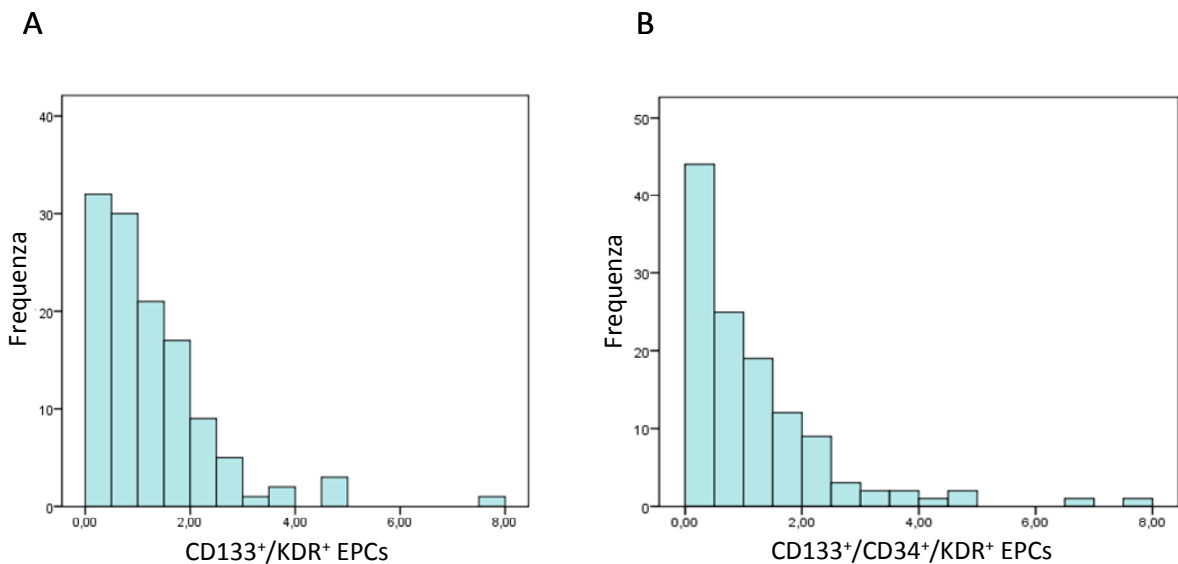


Figura 38 Distribuzione non-normale dei valori delle variabili A) CD133⁺/KDR⁺ EPCs (%) e B) CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs (%).

I livelli di CD133⁺/KDR⁺ EPCs sono risultati inversamente correlati con BMI ($\rho=-0,18$; $p<0,05$), circonferenza vita ($\rho=-0,2$; $p<0,05$), pressione arteriosa diastolica e sistolica ($\rho=-0,23$; $p<0,01$; $\rho=-0,21$; $p<0,05$), livelli di acido urico ($\rho=-0,24$; $p<0,005$), di PAI-1 ($\rho=-0,197$; $p<0,05$) e di insulina plasmatici ($\rho=-0,2$; $p<0,05$) e direttamente correlati con i valori di colesterolo HDL ($\rho=0,182$; $p<0,05$).

Il numero di CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs è risultato a sua volta inversamente correlato con l'uricemia ($r=-0,28$; $p<0,005$), i valori di ALT ($r=-0,2$; $p<0,05$) e di insulinemia a digiuno ($r=-$

0,2; $p < 0.05$) (Tabella 7). Da notare, il genere maschile mostrava ridotti livelli di EPCs rispetto a quello femminile in entrambi i fenotipi. (Figura 39).

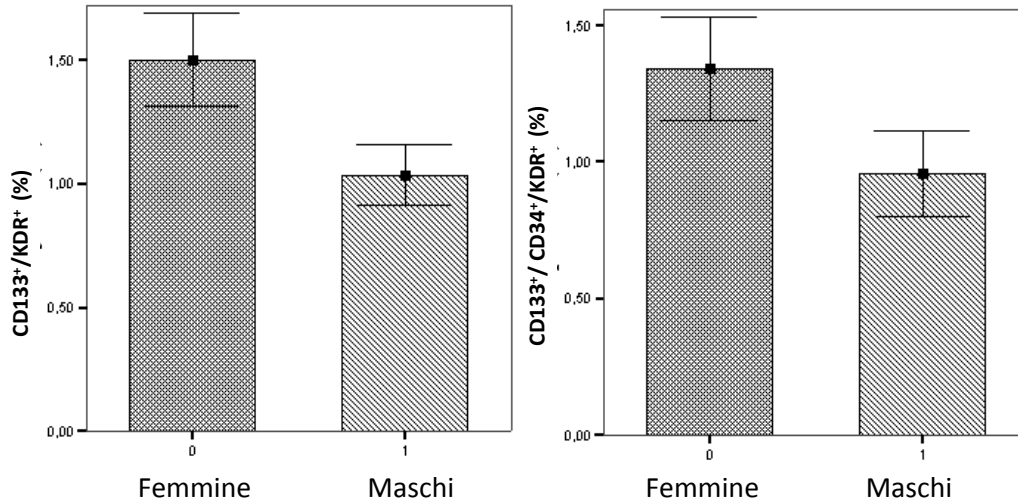


Figura 39. Correlazione tra i valori di EPCs circolanti ed il genere

Variabili	Analisi univariata					Analisi multivariata		Analisi univariata	
	Rho Spearman	p	Beta	t	p	Rho Spearman	p		
Genere (M=1; F=0)	-0.242	0.007	-0.203	-2.202	0.030	-0.199	0.028		
BMI (Kg/m ²)	-0.183	0.043	-	-	-	-0.166	n.s.		
Circonferenza vita (cm)	-0.204	0.024	-0.113	-1.125	n.s.	-0.175	n.s.		
Pressione Sistolica (mmHg)	-0.233	0.011	-0.132	-1.315	n.s.	-0.136	n.s.		
Pressione Diastolica (mmHg)	-0.211	0.020	-	-	-	-0.075	n.s.		
Colesterolo HDL (mg/dl)	0.182	0.047	0.036	0.352	n.s.	0.157	n.s.		
Acido Urico (mg/dl)	-0.242	0.009	-0.660	0.002	n.s.	-0.284	0.002		
ALT (U/L)	-0.08	n.s.	-	-	-	-0.203	0.028		
PAI-1 (ng/ml)	-0.197	0.030	-0.155	-1.639	n.s.	-0.060	n.s.		
Insulina Plasmatica (μU/ml)	-0.186	0.040	-0.002	-0.025	n.s.	-0.187	0.040		

Tabella 7: Analisi univariata e multivariata relativa al numero di CD133⁺/KDR⁺ e CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺ EPCs e le altre variabili considerate nello studio.

Una analisi di regressione lineare multipla, aggiustata per età, genere, circonferenza vita, pressione sistolica, insulina plasmatica, colesterolo HDL, acido urico e PAI-1, ha indicato il genere come unico predittore indipendente del numero di CD133⁺/KDR⁺ EPCs ($p < 0.05$) (Tabella 7). Inoltre, è stato calcolato come il genere maschile abbia un rischio 2.6 volte maggiore delle femmine di essere associato ad un basso valore di CD133⁺/KDR⁺ EPCs, indipendentemente dalle altre covariate (OR per regressione logistica= 2.61 (1.15-5.92); $p = 0.022$). La presenza di insulino resistenza, calcolata stratificando la popolazione per quartili di insulinemia a digiuno, è risultata altamente correlata al genere maschile, essendo i maschi più numerosi nel quarto quartile (χ^2 $p = 0.004$). Per indagare quindi l'effetto dell'insulinoresistenza sul numero di EPCs a prescindere dall'effetto del genere, è stata eseguita una analisi specifica per il genere, dividendo la popolazione in quattro sottogruppi in base al genere e al grado di insulinoresistenza (definita in base ai livelli di insulinemia a digiuno). I livelli di CD133⁺/KDR⁺ EPCs erano significativamente minori nei maschi insulinoresistenti rispetto a quelli insulinosensibili ($p < 0.05$). Nessuna differenza è stata riscontrata tra femmine insulinoresistenti ed insulinosensibili (Figura 40).

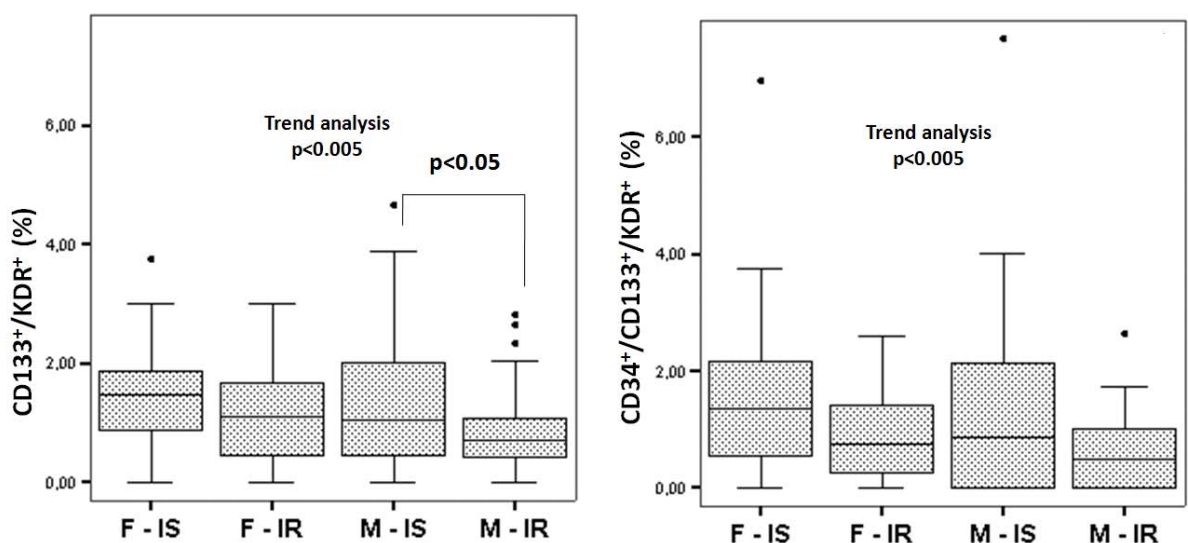


Figura 40: Box plot raffigurante la relazione tra livelli di EPCs (%), insulinosensibilità e genere. (F-IS=femmine insulinosensibili, F-IR= femmine insulinoresistenti, M-IS=maschi insulinosensibili, M-IR=maschi insulinoresistenti).

6.3 Studio 2: valutazione della lunghezza telomerica leucocitaria in relazione al rischio CV

6.3.1 Controllo qualità dei saggi di PCR real time

Nella fase iniziale di messa a punto della reazione di amplificazione delle sequenze telomeriche, sono state caricate come controllo, su gel d'agarosio 1%, le reazioni relative alla curva standard, cioè a quantità crescenti di DNA estratto da cellule HEK 293 (Figura 41). Si può osservare in figura come sia visibile una banda più intensa in corrispondenza di circa 75 basi che rappresenta la minor distanza possibile tra i due primers (amplificato più corto) ed uno "smear" di DNA di peso molecolare crescente rappresentante gli amplificati di lunghezza maggiore (un maggior numero di ripetizioni telomeriche). Si noti inoltre l'assenza di primer-dimer, problematica cruciale in questa prima fase di set up. Come specificato precedentemente in ogni reazione di PCR quantitativa sono stati inseriti i campioni per la curva standard corrispondenti a quantità crescenti di DNA di HEK 293 (Human embryonic kidney cell line) (50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng).

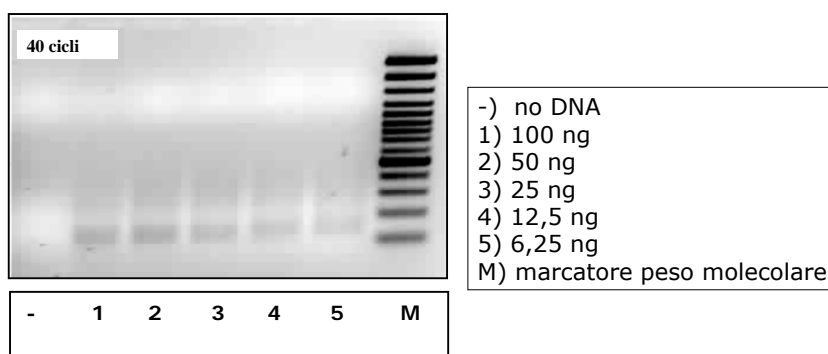


Figura 41. PCR real-time telomerica di DNA da cellule HEK 293 .

L'allestimento della curva standard in ogni reazione di PCR real-time è necessario per monitorare la qualità della reazione stessa (Figura 42). Da essa è infatti possibile

estrapolare il valore del coefficiente di correlazione della retta, definito ottimale se compreso tra 0.9 e 1.0 (nel nostro caso 0.985) e l'efficienza della reazione di PCR, che per essere considerata buona deve superare l'80% (abbiamo considerato solo le reazioni con una efficienza di PCR >85%).

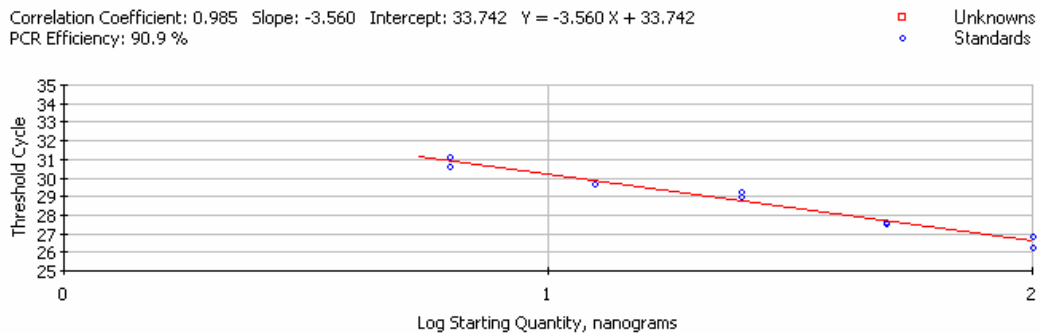


Figura 42. Esempio di rappresentazione della curva standard di una reazione di real-time PCR per la misurazione dei telomeri.

Il controllo qualitativo delle reazioni di PCR real-time prevede inoltre la possibilità di monitorare le temperature di melting dei prodotti di reazione di ogni pozzetto. L'amplificazione del gene 36B4 genera una curva di melting omogenea con un solo picco alla temperatura attesa per il prodotto di PCR (Figura 43). Osservando la curva di "melting" dei campioni relativi ai telomeri (Figura 44) si può notare la presenza di un picco più ampio ad indicare la presenza di amplificati di diverse lunghezze in ogni pozzetto. Ciò riflette di fatto l'atteso, cioè prodotti di diversa lunghezza corrispondenti a sequenze nucleotidiche derivate dall'amplificazione dei telomeri per l'appaiamento dei primers a distanze variabili. Infine è da considerare che la corretta amplificazione telomerica, nei controlli negativi (corrispondenti all'assenza di DNA templatato), non genera alcun amplificato (nessun picco nelle curve).

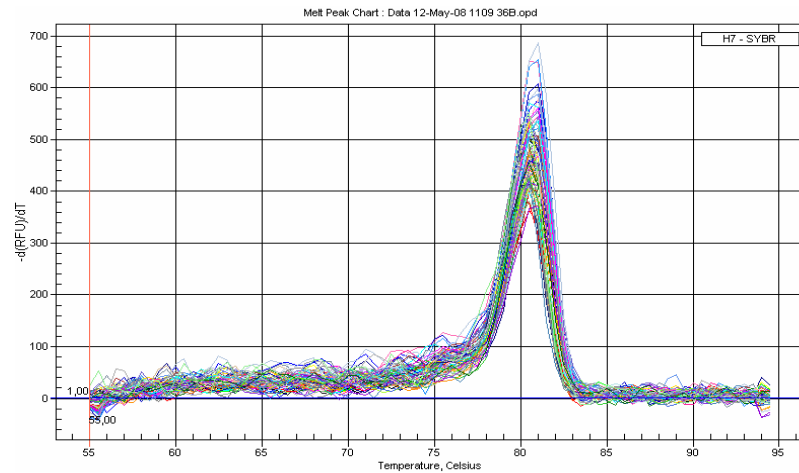


Figura 43. Curve di melting dei campioni analizzati in qPCR per il gene 36B4.

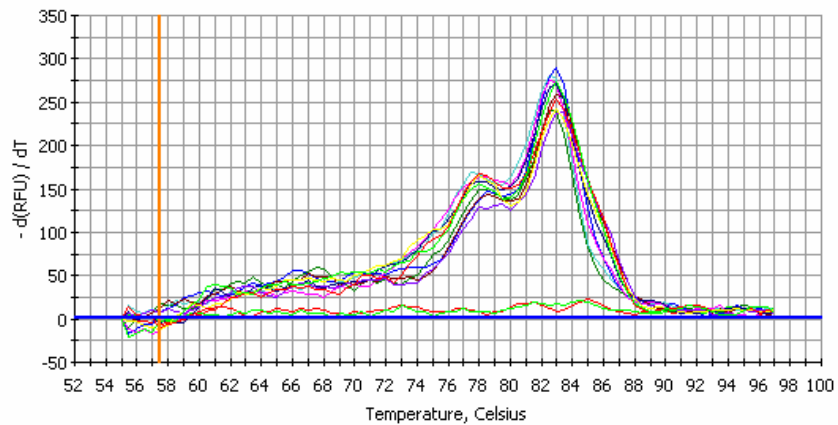


Figura 44. Curve di melting dei campioni analizzati in qPCR per le estremità telomeriche. Le curve di melting con valori oscillanti intorno allo zero rappresentano i controlli negativi.

Negli 82 soggetti studiati, il valor medio di Ct relativo all'amplificazione delle estremità telomeriche è risultato 17.9 ± 1.69 , mentre quello relativo al gene 36B4 è risultato essere 20.63 ± 0.73 . I valori di ciclo soglia sono stati elaborati secondo i calcoli presentati in sezione 5.2.2, per ottenere il valore di T/S ratio con valore mediano pari a 7.08 (IQR=19.50).

6.3.2 Valutazione della LTL in relazione al rischio CV

La valutazione della lunghezza telomerica è rappresentata, come descritto nella sezione precedente, dall'indice T/S ratio, nella sua trasformazione \log_{10} .

La lunghezza telomerica è risultata inversamente correlata con i valori di età ($\rho=-0.24$; $p<0.05$), circonferenza vita ($\rho=-0.29$; $p<0.01$), trigliceridi ($\rho=-0.25$; $p<0.05$), PAI-1 ($\rho=-0.28$; $p=0.01$), hsPCR ($\rho=-0.23$; $p<0.05$), IMT ($\rho=-0.24$; $p<0.05$) e FRs ($\rho=-0.28$; $p<0.05$) e direttamente correlata ai valori di colesterolo HDL ($\rho=0.35$; $p<0.01$) e CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs (0.26 ; <0.05) (Tabella 9) (Figura 45).

Variabili	T/S ratio	
	Spearman	p values
Età (anni)	-0.236	0.033
Circonferenza vita (cm)	-0.289	0.009
Colesterolo HDL (mg/dl)	0.350	0.001
Trigliceridi (mg/dl)	-0.255	0.021
PAI1 (ng/ml)	-0.282	0.010
hsCRP (mg/l)	-0.231	0.037
IMT valore medio (mm)	-0.241	0.037
EPC CD133 ⁺ /KDR ⁺ (%)	0.356	0.002
EPC CD133 ⁺ /CD34 ⁺ /KDR ⁺ (%)	0.260	0.029
Framingham Risk Score	-0.281	0.011

Tabella 9. Correlazioni tra la lunghezza telomerica (\log_{10} T/S ratio) e le variabili considerate nello studio

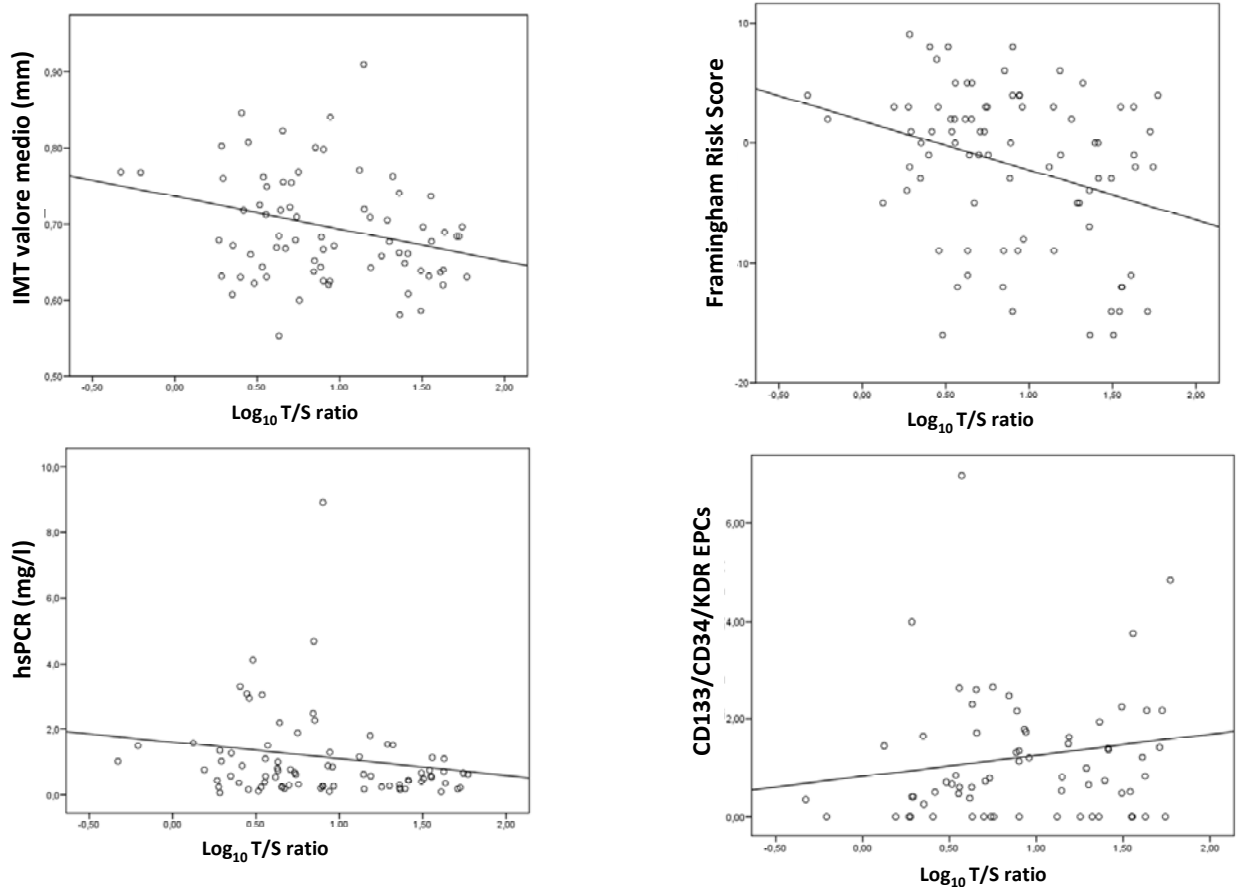


Figura 45. Grafici a dispersione rappresentanti la correlazione tra la lunghezza telomerica ed alcune variabili in studio (IMT, FRs, hsPCR, EPCs).

Successivamente, per valutare le variabili indipendentemente correlate alla lunghezza telomerica, è stata eseguita una analisi di regressione multipla inserendo nel sistema statistico la variabile T/S ratio come dipendente e i valori di genere, età, circonferenza vita, colesterolo HDL, trigliceridi, IMT medio, PAI-1, hsPCR e valori di $\text{CD133}^+/\text{CD34}^+/\text{KDR}^+$ EPCs come variabili indipendenti. Lo spessore medio intimale, come indice di aterosclerosi subclinica, il colesterolo HDL ed il numero di EPCs, sono risultati strettamente correlati alla lunghezza telomerica, indipendentemente dai valori delle restanti variabili inserite (Tabella 10).

Variabili nel modello	<i>b</i>	<i>Errore standard</i>	<i>Beta</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
IMT medio (mm)	-1.787	0.726	-0.280	-2.460	0.017
CD133+/CD34+/KDR+ EPC (%)	0.185	0.078	0.268	2.367	0.021
Colesterolo HDL (mg/dl)	0.009	0.004	0.281	2.474	0.016
Genere (M=1; F=0)	-	-	-0.002	-0.012	0.991
Età (anni)	-	-	-0.054	-0.353	0.726
Circonferenza vita (cm)	-	-	-0.063	-0.483	0.631
Trigliceridi (mg/dl)	-	-	-0.060	-0.460	0.647
PAI-1 (ng/ml)	-	-	-0.054	-0.447	0.657
hsCRP (mg/l)	-	-	-0.047	-0.396	0.693

Tabella 10. Analisi di regressione multipla considerando \log_{10} T/S ratio come variabile dipendente.

Per confermare il ruolo delle due variabili oggetto di studio come marcatori di rischio CV, la popolazione è stata quindi suddivisa in due sottogruppi, in base ai valori di CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺ EPCs e LTL, caratterizzati da un diverso profilo di rischio CV: alto rischio (HR) con bassi valori di EPCs e LTL e basso rischio (LR) con alti valori di EPCs e LTL. I risultati mostrano come negli individui HR il profilo di rischio CV veniva confermato più alto rispetto agli individui LR per la presenza di livelli significativamente maggiori di IMT, PAI-1, FRs e significativamente minori di colesterolo HDL (Figura 46).

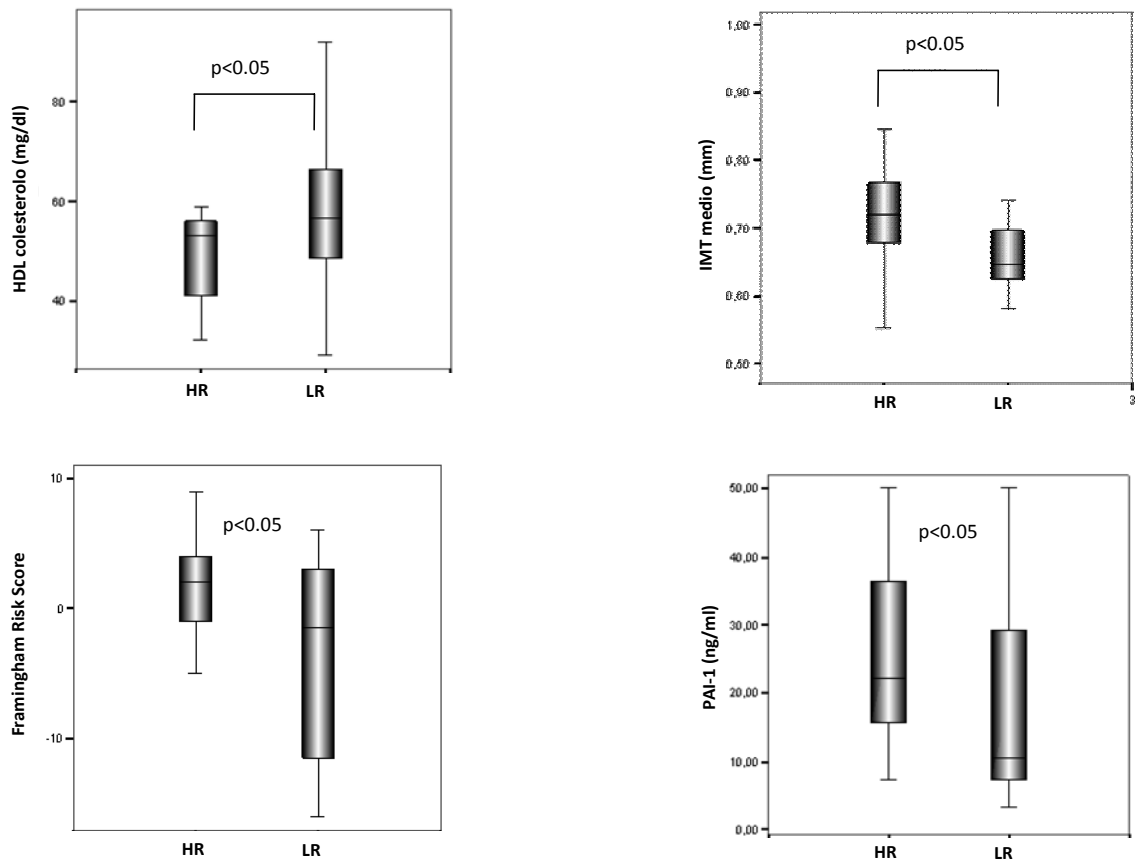


Figura 46. Box plots rappresentanti la distribuzione dei valori di colesterolo HDL, IMT, FRs e PAI-1 in soggetti HR e LR.

7. Discussione

7.1 Variazioni nei livelli di EPCs circolanti in relazione all'insulinoresistenza

Questo studio mostra come il genere maschile sia associato ad un ridotto numero di EPCs rispetto a femmine in premenopausa di pari età in una popolazione di giovani soggetti adulti non diabetici con diversi gradi di IR. I risultati mostrano inoltre come i livelli di EPCs circolanti siano inversamente correlati ai valori di insulinemia plasmatica, come indice surrogato di IR, e alle principali variabili cliniche e metaboliche associate all'IR.

Il numero di EPCs circolanti è stato identificato come numero di cellule esprimenti i marcatori di superficie CD34, CD133, KDR. Sebbene il fenotipo identificativo delle EPCs sia tuttora oggetto di dibattito, l'utilizzo dei tre marcatori viene generalmente considerato come il metodo più completo e rigoroso per l'identificazione citofluorimetrica delle EPCs. Tuttavia l'espressione contemporanea dei tre marcatori identifica una sottopopolazione transiente e di difficile valutazione. Il fenotipo CD133⁺/KDR⁺ riflette invece una forma cellulare più immatura (dal momento che il CD133 non risulta mai espresso sulle cellule endoteliali mature ¹²⁵) e al contempo meno rara. In letteratura è stata documentata una riduzione di entrambi i fenotipi cellulari CD34⁺/KDR⁺ e CD133⁺/KDR⁺ in presenza di fattori di rischio e patologia CV conclamata ^{145,273}. Tuttavia nella nostra popolazione i fenotipi CD133⁺/KDR⁺ e CD133⁺/CD34⁺/KDR⁺, ma non la popolazione CD34⁺/KDR⁺, risultavano significativamente inversamente correlati ai valori di insulinemia plasmatica e ai principali fattori di rischio CV.

I risultati del nostro studio sono in linea con i dati della letteratura che dimostrano come i maschi abbiano un numero di EPCs minore rispetto alle femmine, e confermano questa

osservazione anche in giovani adulti sani. E' stato riportato come femmine in premenopausa abbiano un maggior numero di EPCs e con miglior capacità proliferativa rispetto alle femmine in postmenopausa ²⁷⁴. Hoetzer e collaboratori hanno inoltre osservato come la capacità di formare colonie e l'attività migratoria delle EPCs sia migliore in donne in premenopausa rispetto a uomini di pari età e con lo stesso profilo di rischio CV ²⁷⁵. Una possibile spiegazione dei diversi livelli di EPCs circolanti tra il genere maschile e quello femminile è stata ipotizzata nel ruolo degli estrogeni, è stato infatti osservato come questi ormoni siano in grado di proteggere le EPCs dall'apoptosi e giochino un ruolo chiave nella mobilizzazione di queste dal midollo osseo ²⁷⁶.

Nella nostra popolazione il numero di EPCs risultava inversamente correlato ai livelli di insulinemia plasmatica a digiuno e ai fattori di rischio CV ad essa associati. Sebbene i nostri dati dimostrino chiaramente come il genere sia il determinante principale del numero di EPCs nei nostri soggetti, così come in altre popolazioni ^{277,278}, il nostro studio suggerisce come la relazione tra numero di EPCs ed IR possa prescindere dall'effetto del genere, almeno nei maschi. Nessuna differenza infatti è stata riscontrata nel genere femminile. Si potrebbe pertanto ipotizzare un differente impatto dell'IR, e dei fattori di rischio ad essa associati, sui livelli di EPCs nei maschi rispetto alle femmine in età fertile.

In letteratura, un ridotto numero di EPCs è stato documentato in presenza di manifestazioni cliniche di IR come diabete o intolleranza glucidica. Il numero di cellule CD34⁺ è risultato negativamente correlato al rischio CV con un decremento sinergico nel numero di queste cellule all'aumentare del numero delle componenti della sindrome metabolica in una popolazione a rischio CV intermedio ¹⁷². In un altro studio soggetti IGT mostravano un ridotto numero di progenitori CD34⁺ (ma non CD34⁺/KDR⁺) e i livelli di glucosio dopo OGTT erano predittori indipendenti dei livelli di cellule CD34⁺ e CD34⁺/KDR⁺ ²⁷⁹.

Una ridotta biodisponibilità di NO e una aumentata produzione di ROS sono i principali meccanismi proposti per interpretare la riduzione del numero ed attività delle EPCs negli stati di IR^{178,176}.

La natura trasversale del nostro studio non ci permette di formulare ipotesi di tipo fisiopatologico ed il relativo basso numero di soggetti non consente di effettuare ulteriori analisi in sottogruppi.

I risultati di questo studio sono stati accettati e sono in corso di pubblicazione su *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2010), *doi:10.1016/j.numecd.2009.11.011* (IF 3.56).

7.2 Ruolo della LTL come marcatore di stratificazione precoce di rischio CV

In questo studio abbiamo valutato la LTL come marcatore emergente di stratificazione precoce di rischio CV in giovani adulti sani.

La LTL è risultata inversamente correlata alla presenza dei tradizionali fattori di rischio CV, al numero di EPCs, come fattore emergente di rischio CV, all'IMT, come marcatore surrogato di aterosclerosi subclinica e al rischio CV cumulativo calcolato mediante il FRs.

La lunghezza telomerica, in accordo con la letteratura, è stata misurata nella popolazione dei linfomonociti e crescenti evidenze suggeriscono che l'accorciamento telomerico, in questa popolazione cellulare, rappresenti un marcatore di stress ossidativo e infiammazione, associati al progressivo invecchiamento biologico²²⁸.

Il nostro studio, condotto in giovani adulti sani, mostra come il numero di EPCs, l'ispessimento intimale ed i valori di colesterolo HDL siano in grado di predire i livelli di LTL, in modo indipendente da età anagrafica, genere e altri fattori di rischio CV.

Lo studio presenta alcune importanti osservazioni. Per la prima volta si evidenzia una correlazione indipendente tra LTL, IMT e numero di EPCs suggerendo come lo stress ossidativo e l'infiammazione cronica possano accelerare l'erosione telomerica nelle cellule di derivazione dal midollo osseo tra cui appunto le EPCs e i linfomonociti, quale possibile meccanismo di progressione della patologia CV. Secondo questa ipotesi, il midollo osseo produrrebbe EPCs prematuramente senescenti, limitando la loro mobilitazione e il loro potenziale replicativo. Ciò condurrebbe ad un conseguente ridotto meccanismo riparativo dell'endotelio danneggiato, aggravando la progressione della patologia aterosclerotica²⁸⁰.

A supporto di questa ipotesi, EPCs con telomeri più corti sono state riscontrate in pazienti con coronaropatia rispetto a soggetti sani e la terapia ipolipemizzante con statine era in

grado di ridurre lo stress ossidativo e di prevenire un ulteriore accorciamento telomerico ²⁸¹. D'altra parte, è stato descritto come leucociti più senescenti secernano più citochine infiammatorie, aggravando la progressione del processo aterosclerotico ²⁸². Rimane tuttavia da indagare se l'associazione tra LTL ed EPCs possa rappresentare un meccanismo causale o solo un epifenomeno, che scaturisce da una origine comune, nel determinare la progressione della patologia CV ²⁸³(Figura 47).

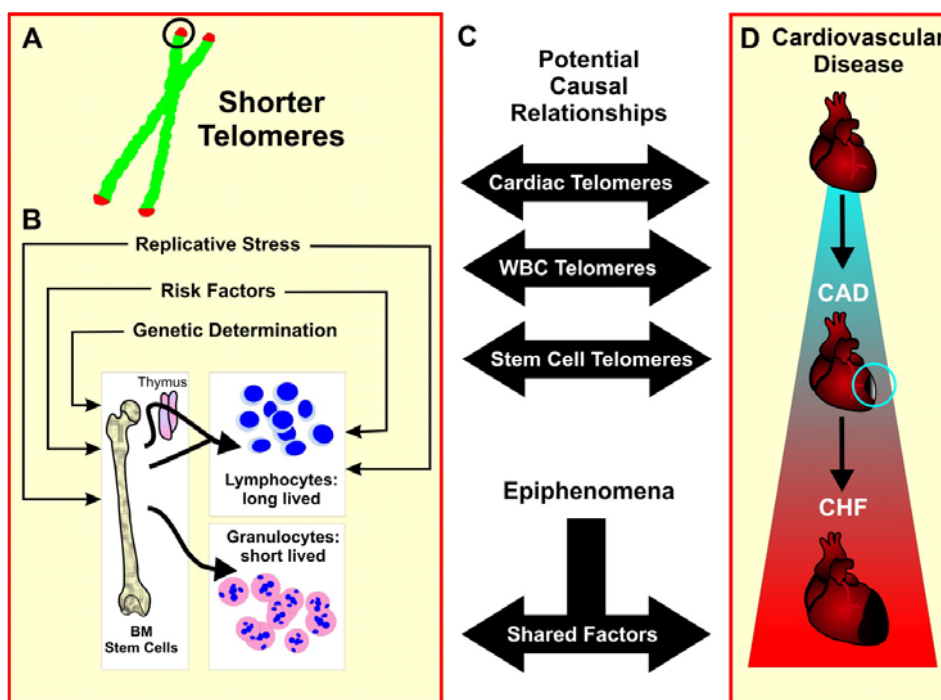


Figura 47. Rappresentazione schematica del possibile meccanismo fisiopatologico in grado di spiegare la stretta relazione tra livelli di EPCs e LTL. Lo stress ossidativo, insieme alla determinante genetica e ai fattori di rischio CV, potrebbero accelerare l'erosione telomerica nelle cellule che derivano dal midollo osseo come le EPCs o i linfomonociti. Questo potrebbe causare una prematura senescenza replicativa delle EPCs contribuendo così alla progressione della patologia CV. (Van der Harst P. et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008)

Un meccanismo causale sembra essere suggerito dall'evidenza che una ridotta lunghezza telomerica è in grado di predire gli eventi CV ²³⁷. Nel nostro studio la correlazione indipendente tra LTL ed aterosclerosi subclinica suggerisce anch'essa un rapporto causale,

tuttavia la natura osservazionale del nostro studio non ci permette di confermare questa ipotesi.

Inoltre, abbiamo dimostrato come una alterazione nella LTL sia un evento precoce nel processo aterosclerotico riscontrabile anche in soggetti sani senza fattori di rischio CV clinicamente evidenti o patologie CV.

Una riduzione della LTL è stata osservata in presenza di fattori di rischio e patologie CV (scompenso cardiaco, patologie metaboliche ed ischemiche cardiovascolari) ^{227,240,253,260,}

Una riduzione della LTL anche in relazione agli IMT, è stata riscontrata in popolazioni caratterizzate da un elevato rischio CV (maschi obesi ²⁸⁴, IGT e DM di tipo 2 ²³⁹ ed età più avanzata ²⁵³). I nostri risultati, per la prima volta, dimostrano una riduzione nella LTL in relazione all'aterosclerosi subclinica anche in una popolazione di giovani adulti sani con un basso profilo di rischio CV in assenza di fattori di rischio CV clinicamente evidenti. Infatti variazioni nei valori di colesterolo HDL, circonferenza vita, trigliceridi, hsPCR, PAI-1, o IMT, sebbene considerati nel range di normalità, si associano a modificazioni significative dei livelli di EPCs e LTL, suggerendo come vi sia un *continuum* nell'intervallo di normalità dei marcatori surrogati di rischio CV.

Studi longitudinali prospettici si rendono necessari al fine di confermare questi dati in una popolazione più ampia e studiare l'eventuale valore prognostico dei due marcatori.

Infine, dividendo la popolazione in due gruppi in base ai valori alti/bassi di EPCs e LTL, si individuano due sottopopolazioni con diverso profilo di rischio CV, che risultano caratterizzate da un diverso grado di aterosclerosi subclinica, PAI-1 colesterolo HDL e FRs, dimostrando l'efficacia dell'utilizzo contemporaneo dei due marcatori nella caratterizzazione di un diverso profilo di rischio CV.

Sebbene la natura trasversale del nostro studio non ci permetta di formulare ipotesi sul meccanismo fisiopatologico alla base della relazione tra numero di EPCs e LTL, la comune origine dal midollo osseo, in presenza degli stessi fattori ambientali, può legittimare e sostenere le correlazioni osservate e le conseguenti ipotesi formulate.

8. Ricerche in corso

Per indagare in modo più approfondito il ruolo delle cellule progenitrici endoteliali e l'impatto di una loro eventuale accelerata senescenza sull'omeostasi vascolare, abbiamo messo a punto un protocollo per l'isolamento e la coltura delle EPCs da sangue periferico.

Brevemente, il protocollo prevede l'isolamento di 60 ml di sangue periferico in tubi contenenti EDTA, da cui, come abbiamo visto dettagliatamente in precedenza, vengono isolati i PBMCs. Le cellule mononucleate così purificate vengono, dopo accurati lavaggi, seminate alla concentrazione di 5×10^6 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti ricoperte di fibronectina ($10 \mu\text{g/ml}$) e lasciate differenziare in terreno EGM-2 (Clonetics, Inc, San Diego, CA) arricchito con fattori di crescita endoteliali. Dopo 5 giorni in coltura, vengono eliminate completamente le cellule presenti nel surnatante e vengono caratterizzate le cellule adese considerate *early EPCs*.

In parallelo, i PBMCs seminati in una diversa piastra, dopo 48 ore vengono ripuliti delle cellule presenti nel surnatante e vengono coltivati in EGM-2 per un tempo più prolungato (circa 21 giorni), portando alla identificazione di quelle che in letteratura vengono chiamate *late outgrowth EPCs*²⁸⁵. Entrambe le metodiche di coltura prevedono il cambio del terreno ogni 2-3 giorni. Le *early EPCs* sono state caratterizzate al giorno +6, mentre le *late outgrowth EPCs* al giorno +21. Dal momento che l'isolamento in colture *ex vivo* di cellule progenitrici endoteliali non è ad oggi riconducibile ad una metodica standardizzata, ma esistono diversi protocolli anche notevolmente differenti (per dettagli vedi sezione 2.6.4), è necessario caratterizzare in modo completo e con molteplici metodiche le colture ottenute, per poterle definire EPCs (Figura 48).

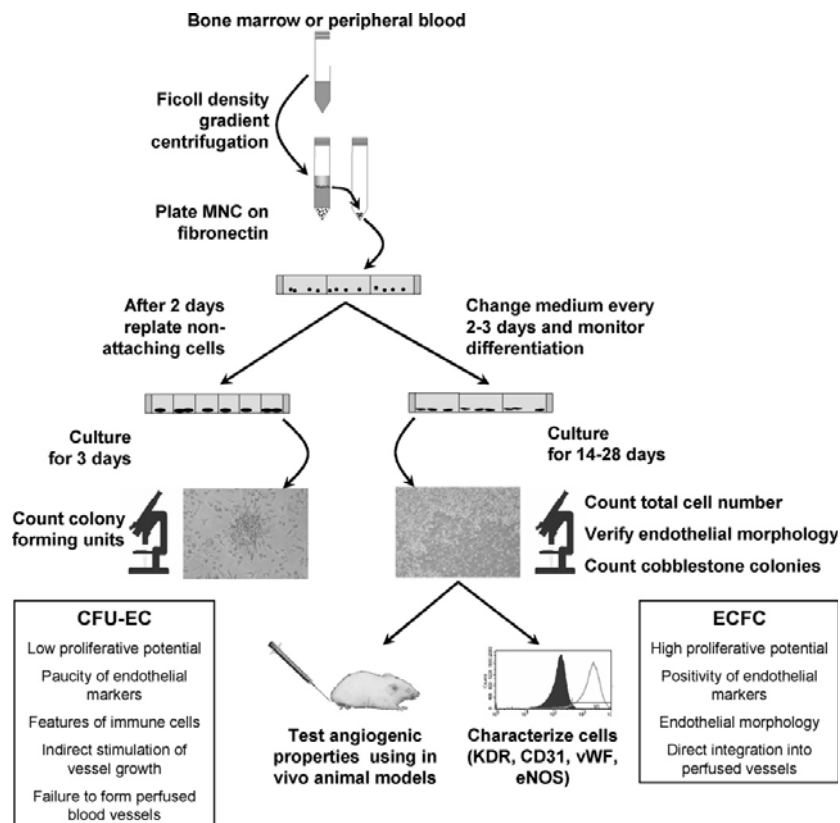


Figura 48. Illustrazione schematica di due delle principali metodiche ad oggi utilizzate per l'isolamento *ex vivo* delle EPCs. E' possibile osservare come l'autore consigli una caratterizzazione molto accurata delle culture isolate anche con test di funzionalità. (Fadini GP et al. *u.Atherosclerosis*. 2008;197(2):496-503).

La messa a punto della metodica di coltura di EPCs all'interno nel nostro laboratorio ci permetterà innanzitutto di eseguire studi per approfondire il possibile meccanismo fisiopatologico alla base della relazione tra EPCs e telomeri. L'obiettivo è infatti quello di studiare la senescenza cellulare delle EPCs di soggetti con diverso profilo di rischio CV, in termini di lunghezza telomerica ed attività telomerasica. Supponiamo infatti che queste cellule abbiano l'enzima telomerasi attivo, essendo esse capaci di proliferare e differenziarsi.

La coltura *ex vivo* delle EPCs ci permetterà altresì di studiare la risposta di queste cellule a terapie farmacologiche con un potenziale effetto benefico sul sistema cardiovascolare (es. agonisti del PPAR γ), in termini di numero, funzionalità e vitalità cellulare.

8.1 Caratterizzazione morfologica di EPCs coltivate *ex vivo*

Le popolazioni cellulari ottenute con i due diversi protocolli di coltura *ex vivo*, sono state innanzitutto caratterizzate per quanto riguarda la morfologia cellulare che al microscopio ad inversione di fase appare tondeggiante e ben definita per i PBMCs al giorno 0, più allungata nelle *early EPCs* e più “acciottolata” nelle *late EPCs* (Figura 49) che risultano ben adese.

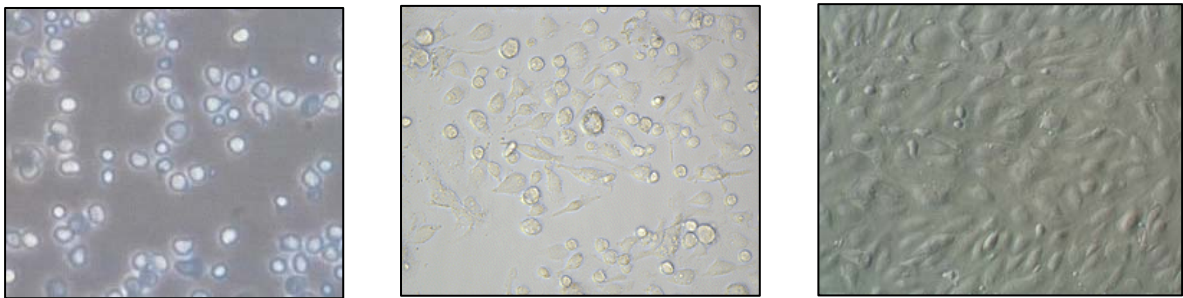


Figura 49. Morfologia delle cellule seminate al giorno 0 (PBMCs), e delle popolazioni cellulari (EPCs) osservabili al giorno +6 e +21. Microscopio ad inversione di fase OLYMPUS CX21 (ingrandimento 100X)

Come già noto, le *late EPCs* sono in grado, dopo circa 20 giorni di coltura, di formare colonie di cellule endoteliali, definite ECFC (endothelial colony-forming cells) (Figura 50) caratterizzate dalla tipica morfologia endoteliale “cobblestone like”. Il numero di colonie che si formano, in accordo con la letteratura²⁸⁶, è molto esiguo, circa 1-2 colonie ogni 40 ml di sangue.



Figura 50. Morfologia di una colonia di cellule endoteliali visibile in coltura al giorno +20. OLYMPUS CX21 (ingrandimento 40X)

8.2 Caratterizzazione fenotipica di EPCs coltivate *ex vivo*

Entrambe le tipologie cellulari sono state ampiamente caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica per l'espressione di specifici antigeni di superficie.

In particolare le *early EPCs* sono risultate esprimere marcatori endoteliali come il CD31 ed il VEGFR2 e a bassi livelli il CD34 (marcatore di cellule progenitrici di derivazione ematopoietica), ma anche marcatori tipici della popolazione monocitica/macrofagica esprimendo il CD14 (80%), il CD45 (85%) il CD11b ed il CD44 (Figura 51).

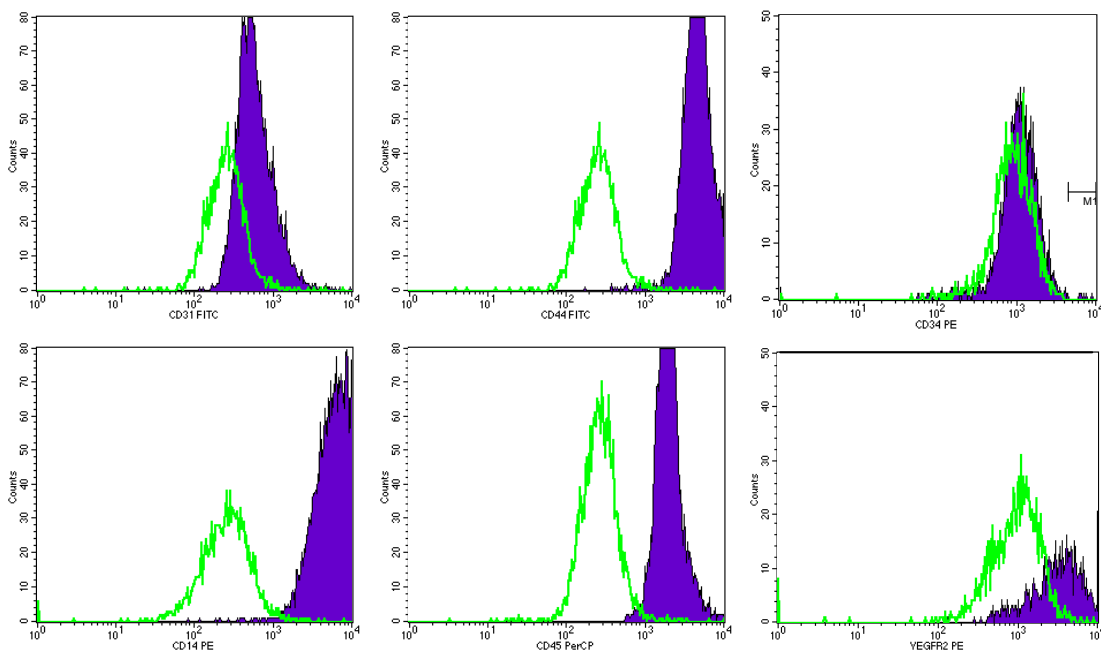


Figura 51. Istogrammi rappresentanti l'espressione di marcatori di superficie in *early EPCs* (giorno +7) mediante analisi FACS (FacsCalibur BD, New Jersey - US)

In parallelo è stata condotta una analisi di immunofluorescenza per valutare l'espressione della Ve-Caderine (Ve-Cad) e del Fattore von Willebrand (vWF) a conferma del loro fenotipo endoteliale e nuovamente del CD34 (Figura 52). Mediante la conta manuale di 30 campi

microscopici casuali, le *early EPCs* mostravano un'espressione di Ve-Cad pari al 60%, di vWF del 78% e di CD34 del 5%.

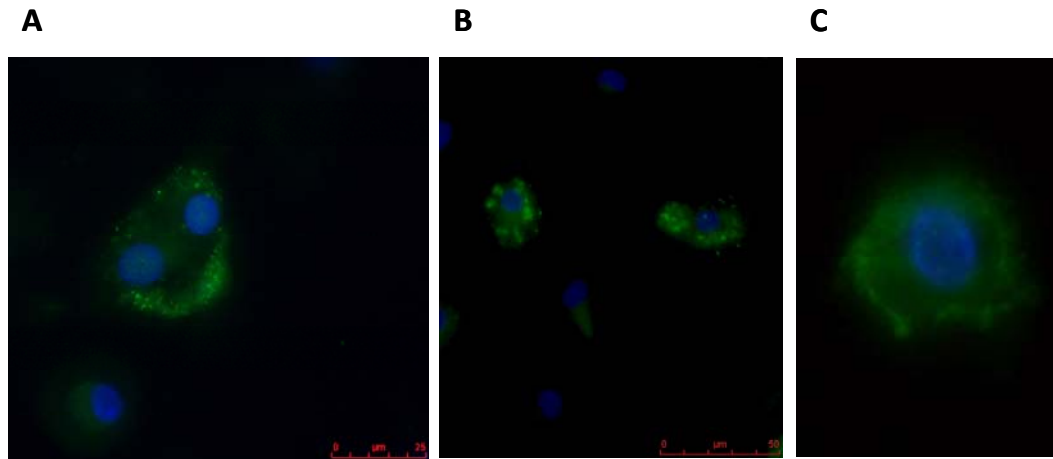


Figura 52. Esperimenti di immunofluorescenza sulle *early EPCs* (giorno +7) per valutare l'espressione di A)Ve-Cad, B) vWF e C) CD34. Microscopio Leica AF6000 (Leica Microsystems, Illinois, US)

Le late EPCs da saggi di immunofluorescenza sono risultate esprimere ad alti livelli le Ve-CAD (>95%) ed il CD34 (63%) (Figura 53). L'analisi FACS ha evidenziato l'espressione di marcatori endoteliali più tardivi come il CD146 (<85%).

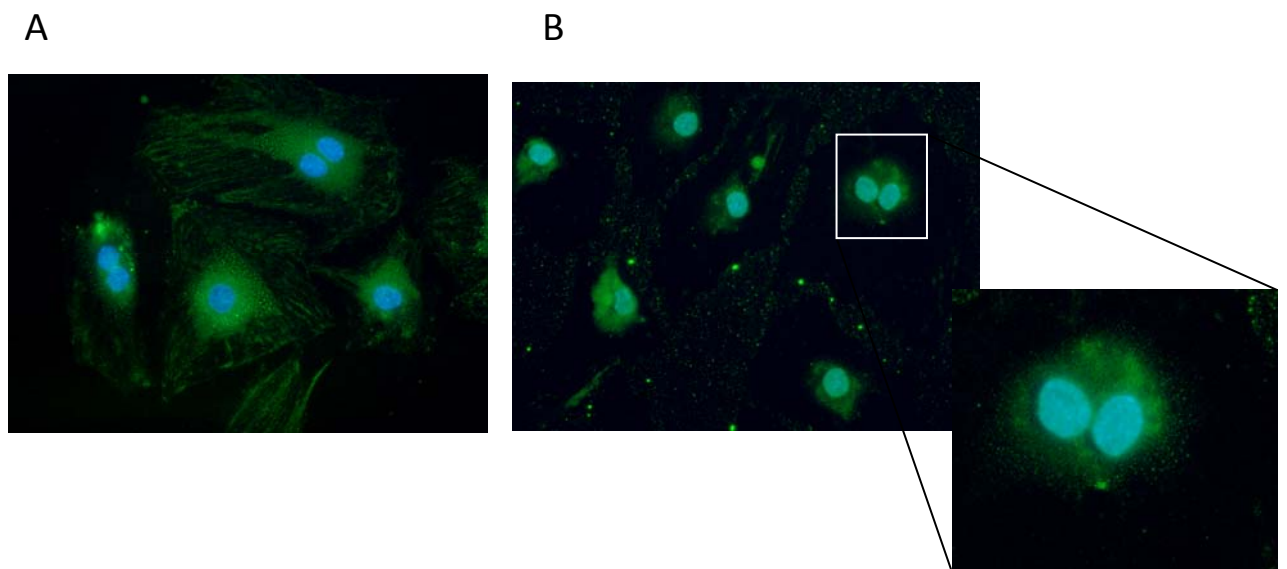


Figura 53. Esperimenti di immunofluorescenza sulle *late EPCs* (giorno +21) per valutare l'espressione di A)Ve-Cad, B) CD34. Microscopio Leica AF6000 (Leica Microsystems, Illinois, US)

8.3 Caratterizzazione funzionale di EPCs coltivate *ex vivo*

Le popolazioni cellulari isolate sono state inoltre caratterizzate dal punto di vista funzionale. E' noto in letteratura, come le EPCs, sia precoci che tardive siano in grado di assorbire le LDL-acetilate (Ac-LDL) e di legare la Lectina. Per questo è stato programmato un esperimento di immunofluorescenza per la valutazione contemporanea di queste due specifiche funzioni delle EPCs (Figura 54). I risultati mostrano come oltre il 90% delle cellule isolate, sia precoci che tardive, mostrino queste specifiche qualità.

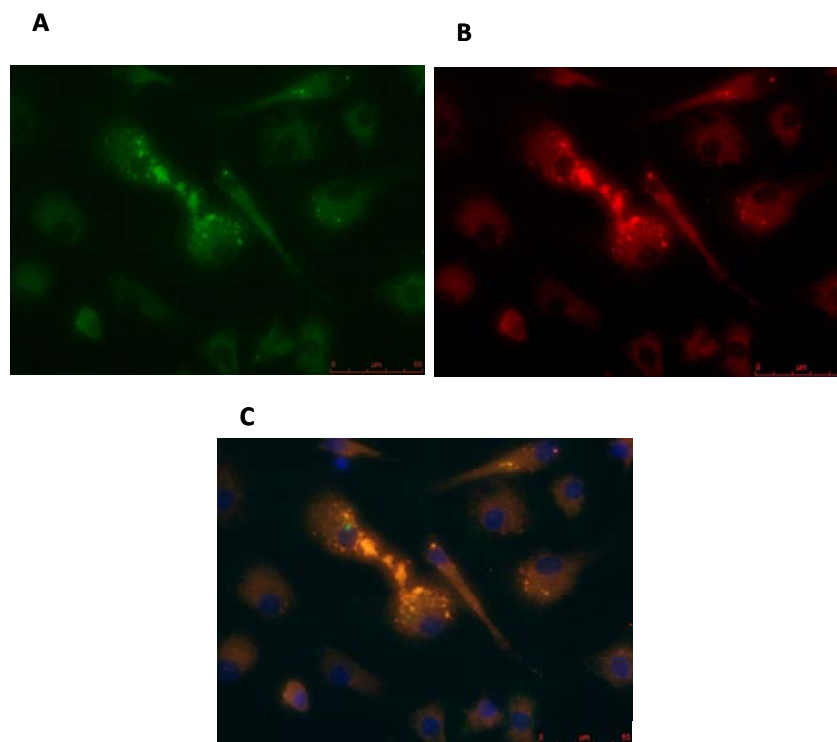


Figura 54. Saggio di immunofluorescenza per la valutazione nelle *early EPCs* di A) legame con la Lectina (FITC) e B) assorbimento delle Ac-LDL (Dil). C) Merge delle due immagini precedenti con microscopio Leica AF6000 (Leica Microsystems, Illinois, US)

Per poter affermare che le cellule in esame sono a tutti gli effetti EPCs, *early* oppure *late*, è indispensabile svolgere un saggio di funzionalità per quanto riguarda la capacità di queste cellule di cooperare alla formazione di tubuli. Il saggio dedicato è il "Tubular formation

assay” che prevede per le *early EPCs* la co-coltura di HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ed EPCs (marcate per l’assorbimento delle Ac-LDL) su uno strato di matrice extracellulare (Matrigel™ BD, New Jersey, US). Il saggio visualizzato in microscopia a fluorescenza mostra tubuli, creati dalle HUVECs in cui sono incorporate EPCs, le quali si integrano nelle strutture tubulari, allungandole (Figura 55).

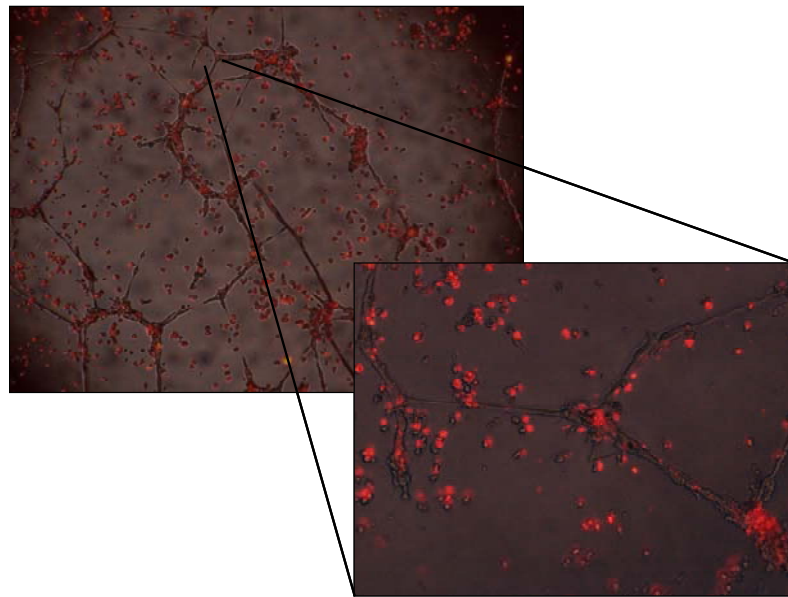


Figura 55. Tubular formation assay: in rosso è possibile visualizzare le *early EPCs* incorporate nei tubuli formati dalle HUVECs su matrice extracellulare. Microscopio Leica AF6000 (Leica Microsystems, Illinois, US)

Per quanto concerne le late EPCs il saggio è semplificato, poiché esse sono in grado di formare strutture tubulari senza le HUVECs. Il protocollo prevede quindi la semina di 1×10^4 cellule su Matrigel™ in piastra da 96 pozzetti.

Il saggio mostra aggregati cellulari localizzati preferenzialmente in prossimità dei tubuli (Figura 56).

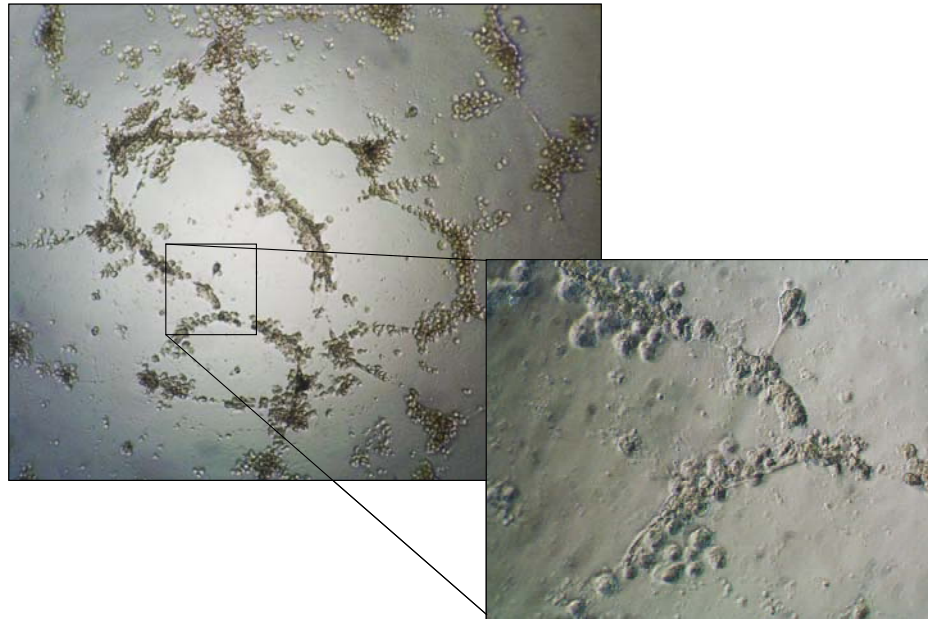


Figura 56. Tubular formation assay relativo alle *late EPCs*. OLYMPUS CX21 (ingrandimento 40X e 100X)

9. Conclusioni

STUDIO 1

Lo studio mostra come il genere maschile sia associato ad un ridotto numero di EPCs rispetto a femmine in premenopausa di pari età in una popolazione di giovani soggetti adulti non diabetici con diversi gradi di IR. Questi risultati suggeriscono come una riduzione dei livelli di EPCs nei maschi potrebbe contribuire a spiegare il maggiore rischio CV nel genere maschile rispetto a quello femminile in premenopausa di pari età.

Il ridotto numero di EPCs nei maschi insulinoresistenti potrebbe rappresentare uno dei possibili meccanismi tramite cui l'IR si accompagna ad un aumentato rischio CV almeno nel genere maschile.

STUDIO 2 I risultati suggeriscono come la LTL possa essere considerata un marcatore precoce di rischio CV e di aterosclerosi subclinica, anche in una popolazione di soggetti giovani adulti sani a basso rischio CV. I risultati di questo studio suggeriscono per la prima volta una correlazione indipendente e diretta tra LTL e numero di EPCs; l'origine midollare comune di queste due popolazioni cellulari, suggerisce l'esistenza di un meccanismo fisiopatologico condiviso alla base di queste alterazioni implicate nello sviluppo e progressione della patologia CV.

Il numero di EPCs e la LTL si confermano marcatori di stratificazione precoce di rischio CV anche in soggetti giovani adulti sani, sebbene siano necessari ulteriori studi per confermarne un ruolo prognostico.

EPCs e LTL possono definirsi *marcatori fisiopatologici* poiché un loro studio più mirato e dettagliato (ed è in questo senso che si stanno muovendo le nostre ricerche) potrebbe permettere di fornire informazioni anche di tipo molecolare sugli stadi iniziali del processo aterosclerotico.

10. Bibliografia

-
- ¹ Signorelli C. Igiene Epidemiologia Sanità Pubblica. Società editrice Universo III edizione 2006 pag. 377.
- ² Chockalingam A, Balaguer-Vintro I, Achutti A, de Luna AB, Chalmers J, Farinaro E, Lauzon R, Martin I, Papp JG, Postiglione A, Reddy KS, Tse TF. The World Heart Federation's white book: impending global pandemic of cardiovascular diseases: challenges and opportunities for the prevention and control of cardiovascular diseases in developing countries and economies in transition. *Can J Cardiol.* 2000;16(2):227-9.
- ³ Harrison "Principi di medicina interna" Società editrice McGraw Hill XV edizione pag. 1614.
- ⁴ Istat. Cause di morte. Anno 2002. Roma: Istat, 2005.
- ⁵ Hamm TE Jr, Kaplan JR, Clarkson TB, Bullock BC. Effects of gender and social behaviour on the development of coronary artery atherosclerosis in *Cynomolgus* macaques. *Atherosclerosis* 1983, 48(3):221-33.
- ⁶ Kaplan JR, Adams MR, Clarkson TB, Koritnik DR. Psychosocial Influences on female protection among *Cynomolgus* macaques. *Atherosclerosis* 1984, 53(3):283-295.
- ⁷ Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, DeSouza CA. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony forming capacity and migratory activity in middle aged adults. *Am J cardiology* 2007;99(1):46-8.
- ⁸ McPherson R. Is hormone replacement therapy cardioprotective? Decision-making after the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study. *Can J Cardiol* 2000;16:14A- 9A.
- ⁹ Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health* (1951) 41:279-86.
- ¹⁰ Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and treatment of high blood cholesterol in Adults (Adult Treatment panel III) *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
- ¹¹ Grundy SM. Atherosclerosis imaging for risk assessment and primary prevention of cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003; 46(2): 115-21.
- ¹² Palmieri L, Panico S, Vanuzzo D, Ferrario M, Pilotto L, Segna R, Cesana G, Giampaoli S; Gruppo di Ricerca del Progetto CUORE. Evaluation of the global cardiovascular absolute risk: the Progetto CUORE individual score. *Ann Ist Super Sanita.* 2004;40(4):393-9. Italian.
- ¹³ Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998 12;97(18):1837-47.

-
- ¹⁴ Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. The distribution of 10-year risk for coronary heart disease among US adults: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Am Coll Cardiol* 2004, 43:1791-1796.
- ¹⁵ Giampaoli S, Palmieri L, Cesana G, Ferrario M, Panico S, Pilotto L, Vannuzzo D, Gruppo di ricerca del Progetto CUORE. Studi longitudinali Valutazione del rischio cardiovascolare globale assoluto: la carta del progetto CUORE. *Not Ist Super Sanità* 2005;18(5).
- ¹⁶ http://www.cuore.iss.it/cuore_exe/cuore_exe.asp
- ¹⁷ Puddu P. Fattori emergenti di rischio cardiovascolare. *Medical Practice*. 2005: pag.12.
- ¹⁸ Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, Keltai M, Diaz R, Rangarajan S, Yusuf S; INTERHEART Investigators. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J*. 2008;29(7):932-40.
- ¹⁹ Gerber TC, Taylor AJ. Carotid intima-media thickness: can it close the "detection gap" for cardiovascular risk? *Mayo Clin Proc*. 2009;84(3):218-20.
- ²⁰ Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- ²¹ Fuller CJ, Agil A, Lender D, Jialal I. Superoxide production and LDL oxidation by diabetic neutrophils. *J Diabetes Complications*. 1996;10(4):206-10.
- ²² Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia*. 2000;43(3):312-20.
- ²³ Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis*. 2006;184(1):1-7.
- ²⁴ Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. 2009;335(1):191-203.
- ²⁵ De Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, Kastelein JJ. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III33-8.
- ²⁶ Criqui MH, Coughlin SS, Fronek A. Noninvasively diagnosed peripheral arterial disease as a predictor of mortality: results from a prospective study. *Circulation* 1985;72:768-73.
- ²⁷ Salonen R, Salonen JT. Carotid atherosclerosis in relation to systolic and diastolic blood pressure: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Ann Med* 1991;23:23-7.
- ²⁸ Blankenhorn DH, Selzer RH, Crawford D, et al. Beneficial effects of colestipol-niacin therapy on the common carotid artery. Two- and four-year reduction of intima-media thickness measured by ultrasound. *Circulation* 1993;88:20-8.

-
- ²⁹ Crouse JR, Craven TE, Hagaman AP, Bond MG. Association of coronary disease with segment-specific intimal-medial thickening of the extracranial carotid artery. *Circulation* 1995;92:1141-7.
- ³⁰ Espeland MA, Craven TE, Riley WA, Corson J, Romont A, Furberg CD, for the Asymptomatic Carotid Artery Progression Study Research Group. Reliability of longitudinal ultrasonographic measurements of carotid intimal-medial thicknesses. *Stroke* 1996;27:480-5.
- ³¹ Wong M, Edelstein J, Wollman J, Bond M. Ultrasonic pathological comparison of the human arterial wall: verification of intima-media thickness. *Arterioscler Thromb* 1993;13:482-6.
- ³² Bots ML, de Jong PT, Hofman A, Grobbee DE. Left, right, near or far wall common carotid intima-media thickness measurements: association with cardiovascular disease and lower extremity arterial atherosclerosis. *J Clin Epidemiol* 1997;50:801-7.
- ³³ O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 14-22.
- ³⁴ Bots ML, van Meurs JCHM, Grobbee DE. Assessment of early atherosclerosis: a new perspective. *J Drug Res.* 1991;16:150-154.
- ³⁵ Hollander M, Bots ML, Del Sol AI, et al. Carotid plaques increase the risk of stroke and subtypes of cerebral infarction in asymptomatic elderly: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2002;105:2872-2877.
- ³⁶ Chambless L.E., Heiss G., Folsom A.R., et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Epidemiol.* 1997; 146: 483-94.
- ³⁷ Howard G, Sharrett AR, Heiss G, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke.* 1993;24:1297-1304.
- ³⁸ European Society Hypertension/European Society Cardiology: Linee Guida 2007 per il trattamento dell'ipertensione arteriosa. *Journal of Hypertension* 2007;25:1105-1187.
- ³⁹ Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH, Crouse JR III, Friedman L, Fuster V, Herrington DM, Kuller LH, Ridker PM, Roberts WC, Stanford W, Stone N, Swan HJ, Taubert KA, Wexler L. Prevention Conference V: beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden. *Circulation* 2000;101:111-16.
- ⁴⁰ Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem.* 2002;48(12):2270-88.
- ⁴¹ Yalow RS, Berson SA. Dynamics of insulin secretion in early diabetes in humans. *Adv Metab Disord.* 1970;1:Suppl 1:95

-
- ⁴² Kahn CR. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. *Metabolism* 1978;27(12 Suppl 2):1893-902
- ⁴³ Elahi D. In praise of the hyperglycemic clamp. A method for assessment of beta-cell sensitivity and insulin resistance. *Diabetes Care*. 1996;19(3):278-86.
- ⁴⁴ Reaven GM, LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, Eds. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. Insulin resistance and its consequences: type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. In *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, 2000, p.604 -615
- ⁴⁵ Moller DE, Flier JS. Insulin resistance mechanisms, syndromes and implications. *N Engl J Med*. 1991;325(13):938-48.
- ⁴⁶ Flier JS, Mntzoros C. Insulin resistance: definition and clinical spectrum. In: *UptoDate*, Rose BD (Ed), Wellesley, MA 2001.
- ⁴⁷ Accademia nazionale di Medicina, incontro di studio sull'insulinoreistenza, Roma 2002.
- ⁴⁸ Accademia Nazionale di Medicina, L'insulinoreistenza nel 2004, Genova 2004.
- ⁴⁹ Ferrarini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U. Insulin action and age. European group for the study of insulinresistance (EGIR) *Diabetes* 1996;45(7):947-53.
- ⁵⁰ Ferrarini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. insulin resistance and hypersecretion in obesità. European group for the study of insulin resistance (EGIR) *J Clin Invest*. 1997;100 (5):1166-73.
- ⁵¹ DeFronzo RA, Tobin JD, Andrei R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979 Sep;237(3):E214-23.
- ⁵² Bergman RN, Philips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucosesensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* 1981;68(6):1456-67.
- ⁵³ Shen DC, Shieh SM, Fuh MM, Wu DA, Chen YD, Reaven GM. Resistance to insulin-stimulated-glucose uptake in patients with hypertension. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(3):580-3
- ⁵⁴ Piché ME, Lemieux S, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J, Weisnagel SJ. Measuring insulin sensitivity in postmenopausal women covering a range of glucose tolerance: comparison of indices derived from the oral glucose tolerance test with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *Metabolism*. 2007;56(9):1159-66.
- ⁵⁵ Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.

-
- ⁵⁶ Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin-sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2402–2410.
- ⁵⁷ Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest* 1997; 100(5):1166-1173.
- ⁵⁸ Executive Summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–2497.
- ⁵⁹ McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. *Ann Intern Med.* 2003;139(10):802-9.
- ⁶⁰ Hadaegh F, Khalili D, Ghasemi A, Tohidi M, Sheikholeslami F, Azizi F. Triglyceride/HDL-cholesterol ratio is an independent predictor for coronary heart disease in a population of Iranian men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008 .
- ⁶¹ Bittner V, Johnson BD, Zineh I, Rogers WJ, Vido D, Marroquin OC, Bairey-Merz CN, Sopko G. The triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts all-cause mortality in women with suspected myocardial ischemia: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Am Heart J.* 2009;157(3):548-55.
- ⁶² Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, Camacho N, Cichetti R, Villarroel V, Arata-Bellabarba G, Lanes R. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatr Diabetes.* 2008 Oct;9(5):464-71.
- ⁶³ Fatati G. Genotipo parsimonioso, sindrome metabolica e società moderna. Dall'insulinoreistenza alla sindrome metabolica, 2004, Critical Medicine Publishing, p.25-31.
- ⁶⁴ Neel JV. Diabetes Mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet* 1962;14:353-362.
- ⁶⁵ Reaven GM. Hypotesis: muscle insulin resistance is the (“non-so”) thrifty genotype. *Diabetologia* 1998;41(4)482-4.
- ⁶⁶ Miller JC, Colagiuri S. The carnivore connection: dietary carbohydrate in the evolution of NIDDM. *Diabetologia* 1994; 37(12):1280-86.
- ⁶⁷ Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett W. Diet, lifestyle and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001;345:790-797.
- ⁶⁸ Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 Diabetes. *Cell.* 2001;104(4):517-29.

-
- ⁶⁹ Bansilal S, Farkouh ME, fuster V. Role of Insulin Resistance and Hyperglycemia in the development of Atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2007;99(4A):6B-14B
- ⁷⁰ Duncan E, Ezzat V, Kearney M. Insulin and endothelial function: physiological environment defines effect on atherosclerotic risk *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(1):51-61.
- ⁷¹ Shepeherd PR, Withers DJ, Siddle K. hspoinositide3-kinase: the key switch mechanism in insulin segnaling. *Biochem J;* 1998;333:471-490.
- ⁷² Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M. Roles for insulin receptor, PI3-kinase and Akt in insulin-signaling pathways related to production of NO in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000;101:1539-1545.
- ⁷³ Sasaoka Y, Ishiki M, Sawa T, ishihara H, Tarata Y. Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mithogenic intracellular signalling pathways. *Endocrinology* 1996;137:4427-4434.
- ⁷⁴ Takeda K, Ichki T, Tokunou T, iino M, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H. Critical role of Rho-kinase and MEK-ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:868-873.
- ⁷⁵ Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue a san endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(8):327-32.
- ⁷⁶ Birnbaum MJ. Turning down insulin signaling. *J Clin Invest* 2001; 108(5):655-9.
- ⁷⁷ Rydén M, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue--from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med.* 2007;262(4):431-8.
- ⁷⁸ Memon RA, Grunfeld C, Moser AH, Feingold KR. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. *Endocrinology.* 1993;132(5):2246-53.
- ⁷⁹ Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414(6865):799-806.
- ⁸⁰ Taylor SI. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell.* 1999;97(1):9-12.
- ⁸¹ Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7522-7.
- ⁸² Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a crosssectional study. *Diabetes* 1997;46:1001-1009.
- ⁸³ Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):367-77.

-
- ⁸⁴ Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859-2865.
- ⁸⁵ George J, Liddle C. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets. *Mol Pharm*. 2008;5(1):49-59.
- ⁸⁶ Wells GD, Noseworthy MD, Hamilton J, Tarnopolski M, Tein I. Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can J Neurol Sci*. 2008;35(1):31-40.
- ⁸⁷ Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzi L. Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*. 1999;48(8):1600-6.
- ⁸⁸ Opara EC, Garfinkel M, Hubbard VS, Akavari OE. Effect of fatty acids on insulin release: role of chain length and degree of unsaturation. *Am J Physiol* 1994;266:E635-E639.
- ⁸⁹ Warnotte C, Nenquin M. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *J Biol Chem* 1997;272:1659-1664.
- ⁹⁰ Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. *J Clin Invest* 1997;100:290-295.
- ⁹¹ Spiegel S, Merrill AH. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J* 1996;10:13388-13397.
- ⁹² Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37(12):1595-607.
- ⁹³ Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G, Bonati PA, Bergonzani M, Gnudi L, Passeri M, Reaven G. Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. *N Engl J Med*. 1989 Mar 16;320(11):702-6.
- ⁹⁴ Ruotolo G, Howard BV. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:494-500.
- ⁹⁵ Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension: sites and mechanism. *N Engl J med* 1987;317:350-357.
- ⁹⁶ Zavaroni I, Bonini L, Gasparini P, et al. Hyperinsulinemia in a normal population as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension, and coronary heart disease: the Barilla factor revisited. *Metabolism* 1999;48:989-994.
- ⁹⁷ Yeni-Komshian H, Carantoni M, Abbasi F, Reaven GM. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin-mediated glucose disposal in 490 healthy, nondiabetic volunteers. *Diabetes Care* 2000;23:171-175.

-
- ⁹⁸ Alberti KG, Zimmet PZ, for the WHO Consultation. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus: provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539–553.
- ⁹⁹ Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.
- ¹⁰⁰ Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287:356-359.
- ¹⁰¹ DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. *J Clin Invest* 1975;55:845-855.
- ¹⁰² Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusion on sympathetic nervous system activity in normal men. *Diabetes* 1981;30:219-225.
- ¹⁰³ Redgrave J, Rabinowe S, Hollenberg NK, Williams GH. Correction of abnormal renal blood flow response to angiotensin II by converting enzyme inhibition in essential hypertensives. *J Clin Invest* 1985;75:1285-1290.
- ¹⁰⁴ Sowers JR, Draznin B. Insulin, cation metabolism and insulin resistance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998;9:223-233.
- ¹⁰⁵ Noel J, Pouyssegur J. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na/H exchanger isoforms. *Am J Physiol* 1995;268:C283-296.
- ¹⁰⁶ Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract.* 2006;60(3):308-14.
- ¹⁰⁷ Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III15-9.
- ¹⁰⁸ Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med.* 2007;262(2):157-72.
- ¹⁰⁹ Bastard JP, Piéroni L, Hainque B. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16(3):192-201.
- ¹¹⁰ Anfossi G, Trovati M. Pathophysiology of platelet resistance to anti-aggregating agents in insulin resistance and type 2 diabetes: implications for anti-aggregating therapy. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2006;4(2):111-28.
- ¹¹¹ Marangella M. Uric acid elimination in the urine. Pathophysiological implications. *Contrib Nephrol.* 2005;147:132-48.

- ¹¹² The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: collaborative analysis of Diagnostic criteria in Europe. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999; 354:617-621.
- ¹¹³ McNeill AM, Rosamond WD, Girman CJ, Heiss G, Golden SH, Duncan BB, East HE, Ballantyne C. Prevalence of coronary heart disease and carotid arterial thickening in patients with the metabolic syndrome (The ARIC Study). *Am J Cardiol.* 2004;94(10):1249-54.
- ¹¹⁴ Bonora E, Targher G, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Gemma L, Santi L, Bonadonna RC, Muggeo M. The metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet Med.* 2004;21(1):52-8.
- ¹¹⁵ Zavaroni I, Ardigò D. L'insulinoresistenza: un fattore di rischio cardiovascolare non ancora "pesato". *Agorà* 2001;(2):25-34.
- ¹¹⁶ Rajaram V, Pandhya S, Patel S, Meyer PM, Goldin M, Feinstein MJM, Neems R, Liebson PR, Fiedler BM, Macioch JE, Feinstein SB. Role of surrogate markers in assessing patients with diabetes mellitus and the metabolic syndrome and in evaluating lipid-lowering therapy. *Am J Cardiol.* 2004;93(suppl):32C-48C.
- ¹¹⁷ Assmann G. Dyslipidaemia and global cardiovascular risk: clinical issues. *Eur Heart J* 2006;8:40-6.
- ¹¹⁸ Nadeau JH, Burrage LC, Restivo J, Pao YH, Churchill G, Hoit BD. Pleiotropy, homeostasis, and functional networks based on assays of cardiovascular traits in genetically randomized populations. *Genome Res* 2003;13:2082-91.
- ¹¹⁹ Mather K, Anderson TJ, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res* 2001; 38(5): 415-422
- ¹²⁰ Dignat-George F and Samol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematology*, 2000; 65; 215-220
- ¹²¹ Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis *Science* 1997; 275:964-967
- ¹²² Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG et al. AC133, a novel marker for human haematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997; 90:5002-5012
- ¹²³ Urbich C and Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in vascular biology. *Circulation Research*, 2004; 95:343-353
- ¹²⁴ Walter DH, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz*, 2002; 27: 579-588

-
- ¹²⁵ Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau *Atherosclerosis*. 2008;197(2):496-503
- ¹²⁶ Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*, 2004; 53: 195–199
- ¹²⁷ Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 2007; 21, 1141–1149
- ¹²⁸ Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA et al. Circulating Endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl J Med* 2003;348: 593–600.
- ¹²⁹ Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-7
- ¹³⁰ Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;105(7):2783-6
- ¹³¹ Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000, 105(1):71-7.
- ¹³² Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109: 625–637.
- ¹³³ Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004; ;104(9):2761-6
- ¹³⁴ Wu Y, Ip JE, Huang J et al Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 2006; 99:315-22
- ¹³⁵ Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1 *Nat Med* 2004 10:858-64
- ¹³⁶ Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 967-72

- ¹³⁷ Rehman J., Li J., Orschell C.M. , March K.L.. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003. 107:1164–1169
- ¹³⁸ Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002, 90:1189-1196
- ¹³⁹ Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*. 2008; 201(2):236-47
- ¹⁴⁰ Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, and Rafii S. Expression of VEGFR-2 and CD133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95:952-958
- ¹⁴¹ Ingram DA, NM Caplice, and MC Yoder Unresolved questions, changing definitions and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells *Blood* 2005;106:1525-1531
- ¹⁴² Endemann D.H. and Schiffrin E.L, Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 19:1983-1992
- ¹⁴³ Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92:652-662
- ¹⁴⁴ Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99(23):3043-9
- ¹⁴⁵ Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease, *Circ Res*. 2001; 89(1):E1-7
- ¹⁴⁶ Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting, *J Am Col Cardiol* 2003; 42:2073–2080
- ¹⁴⁷ Chambers SM, Goodell MA. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. *Stem Cell Rev*. 2007 3(3):201-11
- ¹⁴⁸ Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, Kearney M, Curry C, Branellec D, Semenza GL, Isner JM. Age dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000; 275:29643–29647
- ¹⁴⁹ Cooke J.P. and Losordo D.W. Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 2002; 105:2133–2135
- ¹⁵⁰ Pellegatta F, Bragheri M, Grigore L, Raselli S, Maggi FM, Brambilla C, Reduzzi A, Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels, *Int J Mol Med* 2006;17:203–208

-
- ¹⁵¹ Chen J.Z., Zhang F.R., Tao Q.M., Wang X.X., Zhu J.H. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia, *Clin Sci* 2004; 107:273–280
- ¹⁵² Wang X., Chen J., Tao Q., Zhu J., Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol* 2004; 27:243–255
- ¹⁵³ Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:665–670
- ¹⁵⁴ Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, Di Chio M, Lechi A. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:127-132
- ¹⁵⁵ Oliveras A, Soler MJ, Martínez-Estrada OM, Vázquez S, Marco-Feliu D, Vila JS, Vilaró S, Lloveras J. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *Journal of Human Hypertension* 2008; 22:183-190
- ¹⁵⁶ Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension* 2005, 23: 1831-1837
- ¹⁵⁷ Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress, *J Hypertens* 2005; 23:97–104
- ¹⁵⁸ Imanishi T., Hano T. Nishio I. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells, *Hypertens Res* 2004; 27:101–108
- ¹⁵⁹ Pirro M, Schillaci G, Menecali C, Bagaglia F, Paltriccia R, Vaudo G, Mannarino MR, Mannarino E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *Journal of Hypertension* 2007; 25:2093-2099
- ¹⁶⁰ Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 194:46-54
- ¹⁶¹ Wolk R, Deb A, Caplice NM, Somers VK. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells *Atherosclerosis*. 2005 183(1):131-9
- ¹⁶² Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C, Rössig L, Corbaz A, Chvatchko Y, Zeiher AM, Dimmeler S. p38 Mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005; 111:1184-91
- ¹⁶³ Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: effects on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; 12:407-14

- ¹⁶⁴ Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109:220–226
- ¹⁶⁵ Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Kränkel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 2005; 111:3391-99
- ¹⁶⁶ Fadini G, Avogaro A. Endothelial progenitor cells and physical exercise. From the bench to the clinic. *J Sport Cardiol* 2005; 2:92-101
- ¹⁶⁷ Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1442-7
- ¹⁶⁸ Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*. 2006 187(2):423-32
- ¹⁶⁹ Avogaro A, Fadini GP. The Janus face of nicotinic angiogenesis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2561-3
- ¹⁷⁰ Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, Zhu JH, Xie XD, Sun J, Shang YP, Guo XG, Dai HM, Hu SJ Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:233–239
- ¹⁷¹ Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G, Bauersachs J. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1693–1701
- ¹⁷² Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2006; 27: 2247-55
- ¹⁷³ Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, Rehman S, Shah AM, Marber MS, Kearney MT. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(4):936-42
- ¹⁷⁴ Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, Agostini C, Avogaro A. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischemia-riperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006; 27(18): 2247-2255
- ¹⁷⁵ Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt Kinase/protein kinase B signalling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol res* 2005; 54(1): 1-16

- ¹⁷⁶ Segal MS, Shah R, Afzal A, Perrault CM, Chang K, Schuler A, Beem E, Shaw LC, Li Calzi S, Harrison JK, Tran-Son-Tay R, Grant MB. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 2006; 55(1):102-09
- ¹⁷⁷ Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006; 98:697-704
- ¹⁷⁸ Kuki S, Imanishi T, Kobayashi K, Matsuo Y, Obana M, Akasaka T. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen activated protein kinase. *Circ J* 2006; 70:1076-81
- ¹⁷⁹ Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006; 440:944-8
- ¹⁸⁰ Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2007; 100:204-12
- ¹⁸¹ Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, Gross P. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2005;183:163-7
- ¹⁸² Loomans CJ, De Koning EJ, Staal FJ, Rabelink TJ, Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes* 2004; 53:195–199
- ¹⁸³ Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106:2781–2786
- ¹⁸⁴ Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:698–703
- ¹⁸⁵ Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complication of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; 4:1449-1457
- ¹⁸⁶ Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2140-2146
- ¹⁸⁷ Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial Growth factor and Diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999; 48:1899-906

- ¹⁸⁸ Fadini GP, Sartore S, Baesso I, Lenzi M, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 2006; 29:714-16
- ¹⁸⁹ Ozawa CR, Banfi A, Blazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest* 2004; 113:516-527
- ¹⁹⁰ Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease, *Circulation* 2004; 109:1615–1622
- ¹⁹¹ Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48:1538-47.
- ¹⁹² Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103:2776–2779
- ¹⁹³ George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation, *Eur Heart J* 2004; 25:1003–1008
- ¹⁹⁴ Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmítko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function, *Circulation* 2004; 109:91–100
- ¹⁹⁵ Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sørensen M, Jørgensen E, Fang W, Kastrup J. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2006; 92:768–774
- ¹⁹⁶ Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, Tsikas D, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2006; 70:50–60
- ¹⁹⁷ Mouquet F, Pfister O, Jain M, Oikonomopoulos A, Ngoy S, Summer R, Fine A, Liao R. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res* 2005;97:1090–1092
- ¹⁹⁸ Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Osanai H, Kondo T, Murohara T. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation* 2006;114(1 suppl):114-9
- ¹⁹⁹ George J, Herz I, Goldstein E, Abashidze S, Deutch V, Finkelstein A, Michowitz Y, Miller H, Keren G. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23 :e57–e60

- ²⁰⁰ Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, Todo K, Mori K, Stern DM, Soma T, Naritomi H. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004;109:2972–2975
- ²⁰¹ Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34⁺ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:1209–1212
- ²⁰² Foresta C, Caretta N, Lana A, Cabrelle A, Palù G, Ferlin A. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2005;17:288–290
- ²⁰³ Simper D, Wang S, Deb A, Holmes D, McGregor C, Frantz R, Kushwaha SS, Caplice NM. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of non cardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation* 2003;107:143–149
- ²⁰⁴ Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007
- ²⁰⁵ Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 874-7
- ²⁰⁶ Nygard O, Nordrehhaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997; 337:230-6
- ²⁰⁷ Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N C Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-43.
- ²⁰⁸ Wong LS, de Boer RA, Samani NJ, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Telomere biology in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008; 10:1049-56.
- ²⁰⁹ Palm W, de Lange T. How sheltering protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008; 42:301-34.
- ²¹⁰ Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(8):611-2.
- ²¹¹ Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* 2004; 23(13):2554-63.
- ²¹² Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(6):450-8.
- ²¹³ Jeyapalan JC, Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129(7-8):467-74.

- ²¹⁴ Schaetzlein S, Kodandaramireddy NR, Ju Z, Lechel A, Stepczynska A, Lilli DR, Clark AB, Rudolph C, Kuhnel F, Wei K, Schlegelberger B, Schirmacher P, Kunkel TA, Greenberg RA, Edelmann W, Rudolph KL. Exonuclease-1 deletion impairs DNA damage signaling and prolongs lifespan of telomere-dysfunctional mice. *Cell*. 2007; 131(1):190.
- ²¹⁵ Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965; 37:614-36.
- ²¹⁶ Artandi SE. Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med*. 2006; 21;355(12):1195-7.
- ²¹⁷ Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L. Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(18):6151-60.
- ²¹⁸ Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001; 413(6854):432-5.
- ²¹⁹ Handley TP, McCaul JA, Ogden GR. Dyskeratosis congenita. *Oral Oncol*. 2006; 42(4):331-6.
- ²²⁰ von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(7):339-44.
- ²²¹ Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res*. 2006; 99(2):156-64.
- ²²² Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 11):2417-26.
- ²²³ Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*. 2005; 366(9486):662-4.
- ²²⁴ Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem*. 2003; 278(9):6824-30.
- ²²⁵ Gorenne I, Kavurma M, Scott S, Bennett M. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2006; 72:9–17.
- ²²⁶ Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, Kayo S, Yoshimi N, Hai E, Shirai N, Ehara S, Komatsu R, Naruko T, Ueda M. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:546–550.
- ²²⁷ van der Harst P, van der Steege G, de Boer RA, Voors AA, Hall AS, Mulder MJ, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ; MERIT-HF Study Group. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1459–1464.

- ²²⁸ Samani NJ, Boulton R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001; 358:472–473.
- ²²⁹ Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233–241.
- ²³⁰ Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002; 8:1218–1226.
- ²³¹ Greaves DR, Channon KM. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol.* 2002; 23:535–541.
- ²³² Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet.* 2007; 369(9556):107-14.
- ²³³ Edo MD, Andres V. Aging, telomeres, and atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2005; 66:213–221.
- ²³⁴ Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet.* 2004; 55:876–882.
- ²³⁵ Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet.* 2004; 363:507–510.
- ²³⁶ Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension.* 2003; 37:381–385.
- ²³⁷ Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(5):842-6.
- ²³⁸ Chen YF. Sexual dimorphism of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 6:181-5.
- ²³⁹ Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Ravikumar R, Deepa R, Mohan V. Association of telomere shortening with impaired glucose tolerance and diabetic macroangiopathy. *Atherosclerosis.* 2007; 195(1):83-9.
- ²⁴⁰ Jeanclos E, Krolewski A, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Warram JH, Aviv A. Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* 1998; 47:482-6.
- ²⁴¹ Jeanclos E, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 2000; 36:195- 200.
- ²⁴² Cherif H., Tarry J.L., Ozanne S.E., Hales C.N. Ageing and telomeres: a study into organ-and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:1576–1583.

- ²⁴³ Coviello-McLaughlin G.M., Prowse K.R. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus*. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3051–3058.
- ²⁴⁴ Leri A., Malhotra A., Liew C.C., Kajstura J., Anversa P. Telomerase activity in rat cardiac myocytes is age and gender dependent. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32:385–390.
- ²⁴⁵ Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F365-88.
- ²⁴⁶ Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Finny Monickaraj S, Mohan V. Telomere shortening & metabolic/vascular diseases. *Indian J Med Res* 2007; 125:41-450.
- ²⁴⁷ Adaikalakoteswari A, Balasubramanyam M, Mohan V. Telomere shortening occurs in Asian Indian type 2 diabetic patients. *Diabetic Med* 2005; 22:1151-6.
- ²⁴⁸ Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *J Diabetes Complications* 2000; 14:108-15.
- ²⁴⁹ Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 45:509-11.
- ²⁵⁰ Nicita-Mauro V, Basile G, Maltese G, Nicita-Mauro C, Gangemi S, Caruso C. Smoking, health and ageing. *Immun Ageing.* 2008; 5:10.
- ²⁵¹ Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005; 26(17):1765-73.
- ²⁵² Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 996; 94(1):6-9.
- ²⁵³ Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 2007; 65(1):14–21.
- ²⁵⁴ Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, Cupples LA, Gardner JP, Herbert A, Kimura M, Larson MG, Meigs JB, Keaney JF, Aviv A. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006; 5:325-30.
- ²⁵⁵ Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension.* 1998;32(3):560-4.
- ²⁵⁶ van der Harst P, Volbeda M, Voors AA, Buikema H, Wassmann S, Böhm M, Nickenig G, van Gilst WH. Vascular response to angiotensin II predicts long-term prognosis in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Hypertension.* 2004; 44(6):930-4.

- ²⁵⁷ Vasan RS, Demissie S, Kimura M, Cupples LA, Rifai N, White C, Wang TJ, Gardner JP, Cao X, Benjamin EJ, Levy D, Aviv A. Association of leukocyte telomere length with circulating biomarkers of the renin-angiotensin-aldosterone system: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2008; 117(9):1138-44.
- ²⁵⁸ Obana N, Takagi S, Kinouchi Y, Tokita Y, Sekikawa A, Takahashi S, Hiwatashi N, Oikawa S, Shimosegawa T. Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders. *Intern Med*. 2003; 42(2):150-3.
- ²⁵⁹ Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, Berenson GS, Aviv A. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005; 111:2171-7.
- ²⁶⁰ Benetos A, Gardner JP, Zureik M, Labat C, Xiaobin L, Adamopoulos C, Temmar M, Bean KE, Thomas F, Aviv A. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* 2004; 43:182-5.
- ²⁶¹ Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(24):11190-4.
- ²⁶² Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heleniak H, Colussi C, Di Meglio F, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A, Anversa P. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res*. 2003; 93(7):604-13.
- ²⁶³ Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(9):5378-83.
- ²⁶⁴ Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(18):10308-13.
- ²⁶⁵ Leri A, Barlucchi L, Limana F, Deptala A, Darzynkiewicz Z, Hintze TH, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(15):8626-31.
- ²⁶⁶ Rota M, Hosoda T, De Angelis A, Arcarese ML, Esposito G, Rizzi R, Tillmanns J, Tugal D, Musso E, Rimoldi O, Bearzi C, Urbanek K, Anversa P, Leri A, Kajstura J. The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function. *Circ Res*. 2007; 101(4):387-99.
- ²⁶⁷ Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(24):8692-7.
- ²⁶⁸ Gonzalez A, Rota M, Nurzynska D, Misao Y, Tillmanns J, Ojaimi C, Padin-Iruegas ME, Müller P, Esposito G, Bearzi C, Vitale S, Dawn B, Sanganalmath SK, Baker M, Hintze TH, Bolli R, Urbanek K,

Hosoda T, Anversa P, Kajstura J, Leri A. Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ Res.* 2008; 102(5):597-606.

²⁶⁹ Nichols N. Clinical practice guidelines for the management of dyslipidemia. *Can J Cardiovasc Nurs.* 2004;14(2):7-10.

²⁷⁰ Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem.* 1990;36(1):15-9.

²⁷¹ Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 1987; 59(14):91G-94G.

²⁷² Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(10):e47.

²⁷³ Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, Mitchell G, Oates C, Razvi S, Weaver JU, Shaw JA, Home PD. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 2009.

²⁷⁴ Bulut D, Albrecht N, Imohl M, Gunesdogan B, Bulut-Streich N, Borgel J, Hanefeld C, Krieg M, Muggle A. Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. *Clin.Res.Cardiol.* 2007; 96: 258-263

²⁷⁵ Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, DeSouza CA. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am.J.Cardiol.* 2007; 99: 46-48.

²⁷⁶ Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065.

²⁷⁷ Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: A link to gender differences in vascular protection? *Int.J.Cardiol.* 2008.

²⁷⁸ Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2008; 28: 997-1004.

²⁷⁹ Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, Baesso I, Penno G, Balbarini A, Di Stefano R, Miccoli R, de Kreutzenberg S, Coracina A, Tiengo A, Agostini C, Del Prato S, Avogaro A. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 2007; 50: 2156-2163.

-
- ²⁸⁰ Spyridopoulos I, Erben Y, Brummendorf TH, Haendeler J, Dietz K, Seeger F, Kissel CK, Martin H, Hoffmann J, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for hematopoietic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):968-74
- ²⁸¹ Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond).* 2009;116(11):827-35
- ²⁸² Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res.* 2007 Jan 5;100(1):15-26.
- ²⁸³ Van der Harst P, van Veldhuisen DJ, Samani NJ. Expanding the concept of telomere dysfunction in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):807-8.
- ²⁸⁴ O'Donnell CJ, Demissie S, Kimura M, Levy D, Gardner JP, White C, D'Agostino RB, Wolf PA, Polak J, Cupples LA, Aviv A. Leukocyte telomere length and carotid artery intimal medial thickness: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 ; 28(6):1165-71
- ²⁸⁵ Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(9):1584-95.
- ²⁸⁶ Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood.* 2004;104(9):2752-60.