



**SAPIENZA**  
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE  
XXXII CICLO**

**“Nuove frontiere per il trattamento dell’arteriopatia  
periferica nel paziente diabetico:  
il ruolo dalla terapia angiogenica”**

**DOTTORANDO**

**DOCENTE GUIDA**

Dott.ssa Francesca Persiani

Chiar.mo Maurizio Taurino

**COORDINATORE DEL DOTTORATO**  
Chiar.mo Maurizio Sorice

**ANNO ACCADEMICO 2018-2019**

## INTRODUZIONE

Il termine di ischemia critica degli arti inferiori indica una fase evolutiva e transitoria dell'arteriopatia obliterante cronica (AOCAI), durante la quale il paziente presenta un elevato rischio di amputazione e di mortalità. È caratterizzata dalla presenza di dolore a riposo da più di due settimane o dalla presenza di lesioni ischemiche cutanee sino alla gangrena.<sup>1</sup>

Nei soggetti diabetici l'AOCAI presenta alcune peculiarità. Rispetto al paziente non diabetico, il paziente diabetico con AOCAI è generalmente più giovane ed è affetto da comorbilità cardiovascolari più gravi. Clinicamente, l'arteriopatia ostruttiva nei pazienti diabetici ha una progressione più rapida e un'espressione topografica distale e simmetrica, interessando per lo più le arterie sottogenicolari.

A livello istopatologico, invece, la malattia si presenta più frequentemente sottoforma di occlusioni calcifiche e, nel paziente diabetico, la capacità compensatoria di sviluppare circoli collaterale è compromessa rispetto al paziente non diabetico.<sup>2-10</sup>

Nei pazienti diabetici con lesioni ischemiche, la prognosi negativa è probabilmente correlata alla coesistenza di alcuni fattori come la distribuzione anatomica dell'arteriopatia, la presenza di infezione, il quadro di neuropatia diabetica, l'insufficienza renale e la concomitante presenza della malattia vascolare a livello cerebrale e/o coronarico. Circa il 27% dei soggetti diabetici con AOCAI nei successivi 5 anni presenta una progressione di malattia, il 4% viene sottoposto ad amputazione e circa il 20% manifesta un evento cardiovascolare (infarto del miocardio/ictus). La prognosi dei pazienti diabetici affetti da ischemia critica degli arti inferiori è ancora più grave. Il

30% dei pazienti viene sottoposto ad amputazione maggiore ed il 20% muore per eventi cardiovascolari entro 1 anno.<sup>11</sup>

Il fallimento della rivascolarizzazione del paziente diabetico con AOCAI rappresenta un fattore predittivo indipendente di amputazione maggiore e di bassa sopravvivenza.<sup>12,13</sup>

La rivascolarizzazione mediante approccio endovascolare o confezionamento di bypass è la premessa indispensabile per la riduzione del dolore, la guarigione delle lesioni trofiche ed il salvataggio d'arto.<sup>14</sup>

Non tutti i pazienti diabetici affetti da ischemia critica sono però candidabili ad intervento di rivascolarizzazione, a causa delle loro comorbidità o delle caratteristiche anatomiche delle lesioni arteriose. Per questo sottogruppo di pazienti definiti “non rivascolarizzabili” e per quel sottogruppo di pazienti la cui rivascolarizzazione non è andata a buon fine, nell'ultimo decennio la ricerca ha indirizzato le proprie energie verso la medicina rigenerativa, intesa come l'applicazione della terapia cellulare angiogenica che vede l'utilizzo di diverse fonti di cellule autologhe come il midollo osseo, il sangue periferico ed il tessuto adiposo.

Diversi studi hanno dimostrato come l'impianto sia delle PBMNCs (Peripheral blood mononuclear cells) che delle BMMNCs (bone marrow-derived mononuclear cells), nell'arto ischemico abbia un'azione angiogenica.<sup>15-19</sup> Tuttavia, è stato dimostrato come le PBMNCs abbiano anche un'azione antinfiammatoria mediata dai macrofagi.<sup>20</sup>

L'applicazione della terapia cellulare autologa rigenerativa, sia da sangue periferico (PBMNCs) che da sangue midollare (BMMNCs) nei pazienti “non rivascolarizzabili”, sembra essere sicura ed efficace.<sup>15,21,22</sup>

A partire da tale evidenza scientifica, l'applicazione della terapia cellulare rigenerativa potrebbe rivelarsi utile anche come terapia adiuvante nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica per i quali la sola rivascolarizzazione non è sufficiente a risolvere il quadro clinico locale.

Il presente progetto di ricerca si pone come obiettivo quello di valutare e quantificare, nel medio termine, il possibile effetto adiuvante della terapia rigenerativa con PBMNCs, nei pazienti diabetici sottoposti a trattamento endovascolare confrontando i risultati con quelli ottenuti nei pazienti diabetici sottoposti alla sola procedura di rivascolarizzazione endovascolare.

## **MATERIALI E METODI**

Questa ricerca è stata condotta presso l'IRCCS dell'Istituto Dermatologico dell'Immacolata nella UOC di Chirurgia Vascolare in collaborazione con il Laboratorio di Patologia Vascolare.

Sono stati reclutati pazienti diabetici affetti da ischemia critica degli arti inferiori, categoria 5 e 6 secondo la classificazione di Rutherford, e considerati suscettibili di rivascolarizzazione endovascolare. Tali pazienti sono quindi stati sottoposti ad intervento di rivascolarizzazione endovascolare ed impianto di PBMNCs (gruppo adiuvante).

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica ma sottoposti alla sola rivascolarizzazione endovascolare (gruppo di controllo).

Sono state raccolte le caratteristiche demografiche di ogni paziente e confrontati i fattori di rischio dei due gruppi di pazienti.

Sono stati esclusi dallo studio donne in stato di gravidanza, pazienti con malattie neoplastiche, pazienti con infezione sistemica, pazienti poco collaboranti.

### **Indagini preoperatorie**

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame Ecocolor Doppler arterioso degli arti inferiori ed alla misurazione della tensione cutanea di ossigeno a livello dell'arto ischemico (TcPO<sub>2</sub>). Tale misurazione trova indicazione nei pazienti diabetici con lesioni ulcerative o gangrena, claudicatio o dolore a riposo in quanto è una misura della presenza e severità della patologia vascolare e soprattutto è in grado di dare informazioni sul potenziale riparativo di una lesione.

È stata eseguita un esame AngioTC o un'AngioRM degli arti inferiori alla maggior parte dei pazienti ed infine a tutti i pazienti è stata eseguita un'arteriografia intraoperatoria all'inizio della procedura di rivascolarizzazione endovascolare.

### **Isolamento delle PBMNCs e protocollo del trattamento**

La metodica da noi individuata, il sistema Monocells a filtrazione selettiva (MonoCells Solution Kit - Athena Srl – Biomedical Innovations) prevede una minima invasività mediante il prelievo di soli 100 ml di sangue periferico.

Il sistema concentra le cellule per filtrazione selettiva e non prevede l'uso di nessuna macchina dedicata ma unicamente il sistema monouso sterile chiuso che permette di ottenere il concentrato cellulare in sala operatoria.

Le PBMNCs così ottenute vengono immediatamente impiantate con 30-40 iniezioni da 0.25 ml ciascuna ad una profondità di circa 1-2 cm a livello intramuscolare lungo l'asse vascolare ed a livello perilesionale, in assenza di alcuna manipolazione e in condizioni di assoluta sterilità.

In questo studio, la procedura è stata effettuata la prima volta contestualmente alla rivascolarizzazione endovascolare e ripetuta altre 2 volte con un intervallo di 30/45 giorni tra un trattamento e l'altro.

L'osservazione clinica e strumentale è stata eseguita ad uno, a tre ed a sei mesi dall'ultimo ciclo. Nel follow up sono stati valutati i seguenti parametri: l'entità del dolore mediante la scala visuo-analogica (VAS score), il grado di perfusione dell'arto mediante un esame EcocolorDoppler

arterioso degli arti inferiori e il grado di ischemia cutanea mediante il monitoraggio dei valori di TcPO<sub>2</sub>.

Nel confrontare i risultati ottenuti con la terapia adiuvante (rivascolarizzazione endovascolare e terapia cellulare angiogenica) e quelli ottenuti con la sola rivascolarizzazione endovascolare sono stati considerati come endpoint primari il tasso di salvataggio d'arto e le variazioni dei valori di TcPO<sub>2</sub> nel tempo, mentre come endpoint secondario il grado di riduzione del dolore nel follow up.

### **Analisi statistica**

L'intera analisi statistica è stata realizzata mediante l'utilizzo del software di elaborazione statistica IBM SPSS, versione 22.

Le variabili categoriali sono state registrate come frequenze e percentuali. Le variabili continue sono state riportate come medie e deviazioni standard, quando erano caratterizzate da una distribuzione normale, e come mediana e 25°-75° percentile se, al contrario, non erano caratterizzate da una distribuzione normale.

Per l'analisi delle variabili dicotomiche e continue è stato usato il test di Fisher e X<sup>2</sup>. Wilcoxon signed-rank test è stato applicato per confrontare i valori di TcPO<sub>2</sub> e di VAS nel pre e nel postoperatorio. Un valore di P inferiore a 0,05 è stato considerato un valore statisticamente significativo.

## RISULTATI

Venti pazienti diabetici affetti da ischemia critica sono stati sottoposti a terapia adiuvante (rivascolarizzazione endovascolare + 3 cicli di terapia rigenerativa con PBMNCs) mentre 12 pazienti con le medesime caratteristiche sono stati sottoposti alla sola rivascolarizzazione endovascolare (gruppo controllo). La terapia adiuvante è stata destinata ai pazienti più gravi sulla base dei valori di TcPO<sub>2</sub>, del grado di dolore (VAS score) e delle caratteristiche delle lesioni periferiche.

Nella tabella 1 sono state elencate le principali comorbidità dei due gruppi di pazienti. Nel gruppo adiuvante l'età media era di 71.5±12.9 anni mentre nel gruppo di controllo era di 78.8±6.6 anni. Il 75% (15 pazienti) nel gruppo adiuvante e il 50% (6 pazienti) nel gruppo di controllo erano forti fumatori; il 75% (15 pazienti) e il 91.7% (11 pazienti) erano affetti da ipertensione arteriosa, rispettivamente nel gruppo adiuvante e nel gruppo di controllo. Confrontando i fattori di rischio, tra i due gruppi non si sono osservate differenze significative.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche

	<i>Gruppo Adiuvante</i> (n=20)	<i>Gruppo Controllo</i> (n=12)	<i>P value</i>
Sesso maschile	16 (80%)	7 (58.3%)	NS
Età	71.5±12.9	78.8±6.6	NS
Fumatore	15 (75%)	6 (50%)	NS
Diabete Mellito	20 (100%)	12 (100%)	NS
Dislipidemia	12 (60%)	7 (58.3%)	NS
Cardiopatìa	7 (35%)	7 (58.3%)	NS
Iipertensione arteriosa	15 (75%)	11 (91.7%)	NS
IRC	5 (25%)	5 (41.7%)	NS
ICV	2 (10%)	1 (8.3%)	NS

IRC, Insufficienza renale cronica. ICV, Insufficienza cerebrovascolare.

Nel gruppo adiuvante, tutti i pazienti hanno presentato un quadro di ischemia critica con lesioni trofiche (grado III, categoria 5 -6 secondo la classificazione di Rutherford). Sette pazienti (35%), negli anni precedenti, erano già stati sottoposti a procedura di rivascolarizzazione endovascolare e 3 pazienti (15%) ad intervento di amputazione minore (tabella 2).

Tutti i pazienti di questo gruppo sono stati sottoposti a rivascolarizzazione endovascolare (PTA ± stenting dell'asse femoro-popliteo tibiale) contestualmente al primo ciclo di terapia rigenerativa con PBMNCs. A distanza di 30/45 giorni questo gruppo di pazienti è stato sottoposto ad altri 2 cicli di terapia rigenerativa. Quindici pazienti (75%), durante questi tre cicli sono stati sottoposti anche ad accurato debridment delle lesioni, mentre i restanti 5 pazienti (25%) sono stati sottoposti ad intervento di amputazione minore.

Nel gruppo di controllo, tutti i pazienti hanno presentato un quadro di ischemia critica con lesioni trofiche (grado III, categoria 5 -6 secondo la classificazione di Rutherford) meno gravi ed estese rispetto ai pazienti sottoposti a terapia adiuvante. Tre pazienti (25%), negli anni precedenti, erano già stati sottoposti a procedura di rivascolarizzazione endovascolare ma nessuno di loro era già stato sottoposto ad amputazione minore (tabella 2). I pazienti di questo gruppo sono stati sottoposti alla sola rivascolarizzazione endovascolare (PTA ± stenting dell'asse femoro-popliteo tibiale). Undici pazienti (91.7%) contestualmente alla rivascolarizzazione endovascolare, sono stati sottoposti a debridment delle lesioni mentre, in un solo caso (8.3%), il paziente è stato sottoposto ad amputazione minore.

Tabella 2. Caratteristiche pre-procedurali

	<i>Gruppo Adiuvante</i> (n=20)	<i>Gruppo Controllo</i> (n=12)	<i>P value</i>
Pregressa rivascolarizzazione endovascolare	7 (35%)	3 (25%)	NS
Pregressa amputazione minore	3 (15%)	/	NS

In entrambi i gruppi non si sono osservate complicanze perioperatorie.

Nel gruppo adiuvante un paziente è uscito dallo studio per la comparsa di gravi complicanze legate al diabete che non gli hanno permesso di completare i cicli di terapia cellulare. Un secondo paziente dopo il II ciclo di terapia rigenerativa ha eseguito un ultimo tentativo di salvataggio d'arto mediante confezionamento di un bypass femoro-distale in VGS (vena grande safena) concludendosi dopo circa 1 mese con l'intervento di amputazione transfemorale.

In entrambi i gruppi per ogni paziente è stato misurato il valore di TcPO<sub>2</sub> e valutato il grado di dolore mediante il VAS score. Nel gruppo adiuvante il valore medio di TcPO<sub>2</sub> nel preoperatorio era di 23.5±9.3mmHg (fig. 1A) mentre nel gruppo di controllo era di 27.7±18mmHg (fig.1B). Il valore medio di VAS score preoperatorio nel gruppo adiuvante era di 9.2±0.7 (fig.2A) mentre nel gruppo di controllo di 7.8±3.5 (fig. 2B).

La mediana del follow up è stata di 6 mesi (25°-75° percentile 6-12 mesi) nel gruppo adiuvante e 9 mesi (25°-75° percentile 6-12 mesi) nel gruppo di controllo.

Nel follow up, in entrambi i gruppi, sono stati raccolti ed analizzati il valore di TcPO<sub>2</sub> ed il grado di dolore mediante il VAS score. Nel gruppo adiuvante il valore medio di TcPO<sub>2</sub> è aumentato arrivando a 47.5±19mmHg (fig. 1A) mentre, nel gruppo di controllo il valore medio di TcPO<sub>2</sub> calcolato è stato di 49.5±24mmHg (fig.1B). Il valore medio di VAS score si è ridotto in entrambi i gruppi, 3.2±3.2 e 3.6±2.3 rispettivamente nel gruppo adiuvante e nel gruppo di controllo (fig.2A e 2B).

Confrontando i valori di TcPO<sub>2</sub> nel pre-operatorio e nel follow up in entrambi i gruppi si è osservato un incremento significativo dei valori di TcPO<sub>2</sub>, maggiore nel gruppo adiuvante ( $P<0.001$  nel gruppo adiuvante e  $P=0.008$  nel gruppo di controllo) (fig. 1).

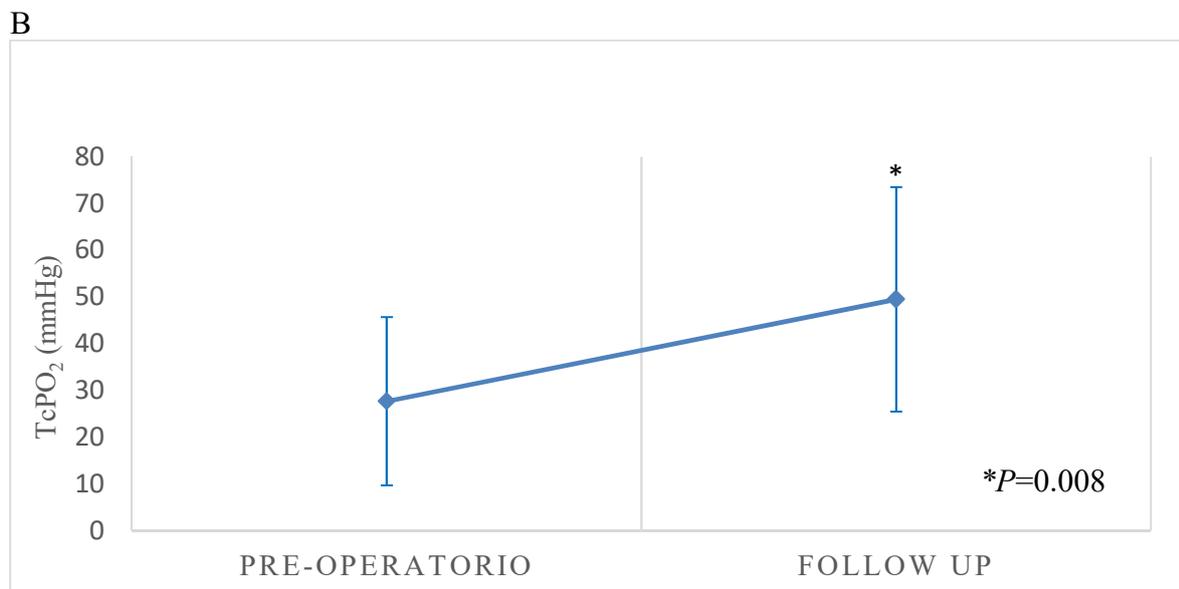
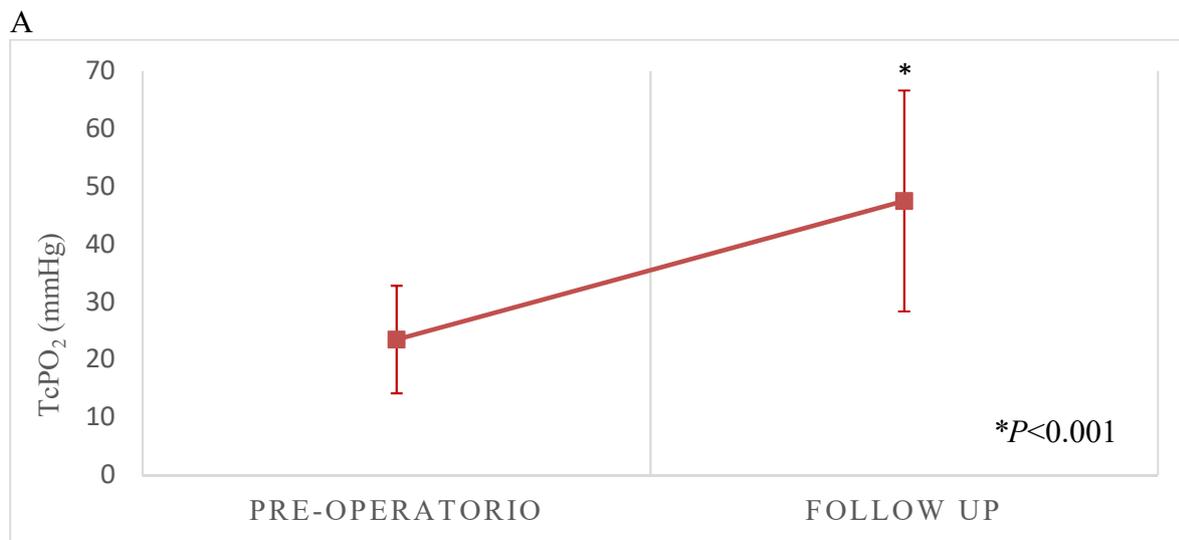


Figura 1. Valori di TcPO<sub>2</sub> (media  $\pm$ DS). (A) nel gruppo adiuvante. (B) nel gruppo di controllo.

Confrontando invece i valori di TcPO<sub>2</sub> tra i due gruppi non si sono osservate differenze statisticamente significative ( $P=0.6$ ).

Medesima analisi è stata eseguita per i valori medi di VAS score. Confrontando i valori registrati nel follow up con quelli registrati nel preoperatorio, in entrambi i gruppi si è osservata una riduzione significativa del dolore, maggiore nel gruppo adiuvante ( $P < 0.001$  nel gruppo adiuvante e  $P=0.003$  nel gruppo di controllo) (fig 2).

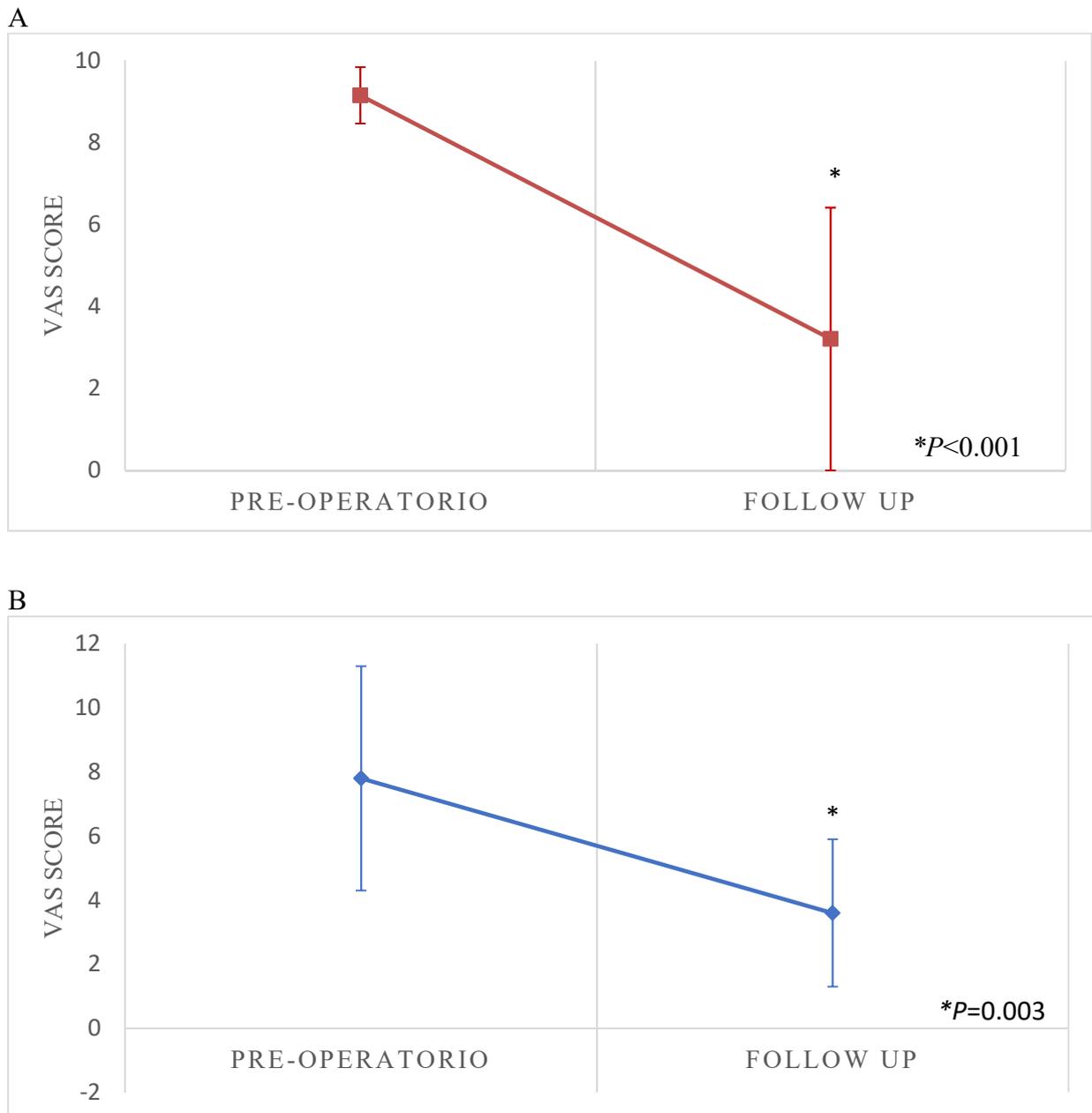


Figure 2. VAS (media  $\pm$ DS). (A) nel gruppo adiuvante (B) nel gruppo di controllo.

Come per la TcPO<sub>2</sub>, il confronto dei valori di VAS tra i due gruppi non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa ( $P=0.1$ ).

In termini di salvataggio d'arto si è osservato nel gruppo adiuvante un tasso del 90% con un caso di amputazione transfemorale a distanza di un mese dalla fine dei 3 cicli di terapia rigenerativa ed un secondo caso di amputazione transfemorale a distanza di 12 mesi. Nel gruppo di controllo il

tasso di salvataggio d'arto è stato del 91.7% con un caso di amputazione transtibiale a distanza di un mese dalla procedura di rivascolarizzazione endovascolare (fig.3).

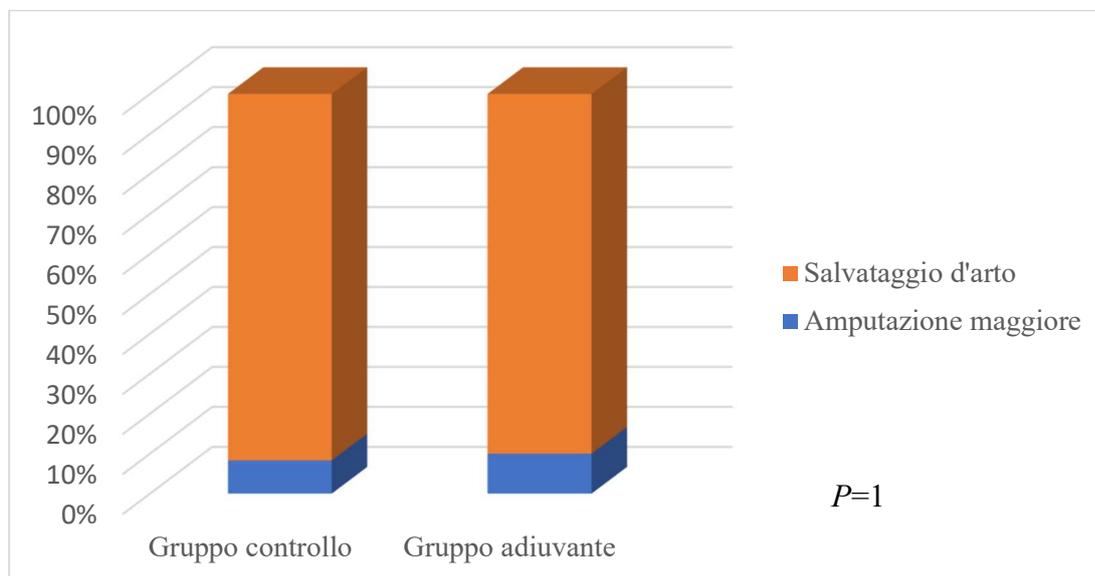


Figura 3. Tasso di amputazione maggiore: confronto fra il gruppo adiuvante ed il gruppo di controllo.

Al termine del follow up nel gruppo adiuvante si sono osservati 16 casi di guarigione o di miglioramento della lesione (80%), mentre nel gruppo di controllo 9 casi (75%,  $P=1$ ).

## DISCUSSIONE

Il presente studio analizza la nostra esperienza con la terapia rigenerativa mediante PBMNCs associata alla procedura di rivascolarizzazione endovascolare nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica degli arti inferiori.

La letteratura indica una prevalenza dell'AOCAI variabile in funzione delle caratteristiche della casistica esaminata. Infatti, in una recente revisione della letteratura, Jude riporta una prevalenza compresa tra 8 e 30 % dei diabetici;<sup>13</sup> Prompers riporta una prevalenza del 50% circa nei pazienti diabetici con ulcera.<sup>23</sup>

L'arteriopatia periferica nel soggetto diabetico è una patologia ostruttiva su base aterosclerotica a localizzazione sistemica ma con alcune peculiarità.<sup>24</sup> I pazienti diabetici con AOCAI sono generalmente più giovani e presentano un maggior numero di comorbilità cardiovascolari rispetto alla popolazione non diabetica. L'AOCAI nel paziente diabetico presenta una rapida progressione e la sua espressione topografica è prevalentemente distale e bilaterale; le pareti arteriose sono molto spesso calcifiche e prevalgono le occlusioni rispetto alle stenosi. Nel soggetto diabetico inoltre la naturale risposta adattativa alla riduzione di flusso all'interno di un vaso arterioso risulta ridotta e con essa la capacità di generare circoli collaterali di compenso.<sup>5-9,25,26</sup>

La macroangiopatia diabetica rappresenta il risultato di una disfunzione severa dei componenti fisiologici più rappresentativi quali le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e le piastrine. I meccanismi alla base di una disfunzione vascolare sembrano essere riconducibili alla iperglicemia, allo stress ossidativo, alla formazione di AGE (prodotti di glicosilazione avanzata) e ad alterati livelli di PCR (Proteina C Reattiva).<sup>27</sup>

Ruolo determinante nel danno endoteliale e nella progressione della placca aterosclerotica è la persistenza di uno stato pro-infiammatorio.<sup>28-31</sup> Il diabete inoltre favorisce uno stato procoagulativo per una maggiore aggregazione piastrinica e gli incrementati livelli di alcuni fattori procoagulativi, fibrinogeno, PAI-1, fattore VII, fattore tissutale, e per ridotti livelli di anticoagulanti endogeni come l'antitrombina III e la proteina C.

Per tutti questi motivi, circa il 27% dei soggetti diabetici con AOCAI va incontro nei 5 anni successivi ad una progressione della patologia ed il 4% dei soggetti è sottoposto ad intervento di amputazione maggiore. Ancora più grave è la prognosi dei pazienti diabetici con ischemia critica dell'arto che hanno un rischio del 30% di andare incontro ad amputazione maggiore.<sup>11</sup>

Per tale motivo, una volta identificato un deficit di perfusione, la rivascolarizzazione deve essere sempre presa in considerazione. Nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica, la rivascolarizzazione periferica può essere più complessa a causa della distribuzione distale della malattia, della compromessa collateralità e delle calcificazioni dei vasi.

Il trattamento endovascolare è la prima strategia nei pazienti diabetici con ischemia critica.<sup>24,32</sup> La maggior parte dei pazienti sono anziani affetti da multiple comorbilità e ad alto rischio operatorio.<sup>33,34</sup>

Nonostante il recente sviluppo delle tecniche e del materiale endovascolare, persiste una frazione di pazienti affetti da ischemia critica che va dal 25% al 40% definita non rivascolarizzabile.<sup>11</sup> Per questo gruppo di pazienti la ricerca ha indirizzato le proprie energie verso la medicina rigenerativa.<sup>35</sup>

Tra le popolazioni cellulari di interesse nell'ambito della medicina rigenerativa, le cellule mononucleate prelevate da midollo osseo e da sangue periferico (BMMNCs e PBMNCs) sembrano le più idonee e promettenti in questo ambito di ricerca. Le caratteristiche comuni di queste due popolazioni cellulari sono la presenza di cellule progenitrici endoteliali (EPC) e la capacità di secernere diversi fattori pro-angiogenici. Sebbene le BMMNCs e le PBMNCs differiscano per l'eterogeneità cellulare e la capacità di differenziazione, il confronto dei loro risultati, sino ad oggi pubblicati, non ha evidenziato differenze significative.<sup>36-38</sup>

La nostra ricerca si è focalizzata sull'applicazione delle PBMNCs nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica per differenti motivi: in primo luogo è dimostrato come le PBMNCs stimolino la formazione di circoli collaterali attraverso il rilascio di fattori angiogenici e citochine nella sede ischemica.<sup>15,17-19,39</sup>

In secondo luogo, la terapia con PBMNCs ha un rilevante ruolo nel processo di riparazione e rigenerazione tissutale, consentendo ai macrofagi la polarizzazione al fenotipo M1 al fenotipo M2, coinvolto nel processo di guarigione delle ferite.<sup>20,21</sup>

Diversi studi dimostrano che i macrofagi agiscono su uno spettro di fenotipi corrispondenti a diverse funzioni. La disregolazione del fenotipo è associata a molte patologie; in particolare, il difettoso switch dal fenotipo pro-infiammatorio (M1) al fenotipo anti-infiammatorio (M2) sembra essere alla base del persistente quadro infiammatorio che impedisce la guarigione di ferite croniche come le ulcere diabetiche.<sup>39</sup>

A favore di questi meccanismi molecolari De Angelis e coll. hanno osservato, mediante biopsia eseguita durante i cicli di terapia rigenerativa con sangue periferico, come il tessuto di granulazione

cutaneo mostri un incremento del numero di monociti (CD68 +) e una neoangiogenesi (CD31 +). Alla fine del trattamento con PBMNCs, al di sotto dell'epidermide guarita, persisteva la presenza dei neovasi, mentre l'infiammazione e l'infiltrazione dei monociti erano altamente ridotte.<sup>40</sup>

Inoltre, nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica, i monociti CD14 + prelevati da sangue periferico sembrano avere una migliore reattività allo stimolo ipossico e una migliore azione paracrina nel distretto ischemico, rispetto alle cellule CD34 + (EPC).<sup>41,42</sup>

Altri vantaggi nell'utilizzo di questa popolazione cellulare sono infine la sua ridotta invasività e la sua ripetibilità nel tempo.

Liew e coll., in una metanalisi sulla terapia rigenerativa applicata al paziente affetto da ischemia critica, hanno evidenziato come la terapia con PBMNCs riduca significativamente il rischio di amputazione maggiore e contribuisca in maniera significativa alla guarigione delle lesioni periferiche<sup>43</sup>.

Nell'ambito del presente studio, sono stati raccolti i risultati della nostra esperienza con la terapia cellulare rigenerativa con PBMNCs applicata ai pazienti diabetici affetti da ischemia critica e non suscettibili ad intervento di rivascolarizzazione. In linea con i dati presenti in letteratura abbiamo osservato una riduzione del dolore ed un incremento dei valori di TcPO<sub>2</sub>, confermando il suo ruolo nel trattamento del paziente non rivascolarizzabile.<sup>44</sup>

Per i pazienti diabetici, affetti da ischemia critica degli arti inferiori e suscettibili di rivascolarizzazione, il trattamento endovascolare rappresenta la prima opzione terapeutica. In alcuni casi però la sola rivascolarizzazione non sembra essere sufficiente nel determinare la

guarigione della lesione. Probabilmente esistono meccanismi molecolari che nei pazienti diabetici rivascolarizzati sono responsabili di una resistenza alla guarigione.<sup>45</sup>

Sulla base di queste osservazioni, è stata associata la terapia rigenerativa mediante il prelievo di cellule da sangue periferico alla rivascolarizzazione periferica al fine di combinare gli effetti positivi di entrambe le procedure.

Questo studio rappresenta una prima analisi dei risultati ottenuti dall'associazione tra terapia rigenerativa con PBMNCs e rivascolarizzazione endovascolare, e confronta i risultati con quelli della sola rivascolarizzazione endovascolare nel paziente diabetico affetto da ischemia critica degli arti inferiori.

I limiti di questo studio sono principalmente la mancata randomizzazione e la limitata numerosità campionaria. I pazienti più compromessi, valutati sulla base della gravità delle lesioni, i valori di TcPO<sub>2</sub> e l'entità del dolore, sono stati sottoposti a trattamento adiuvante mentre i pazienti meno gravi sono stati sottoposti alla sola rivascolarizzazione endovascolare. La necessità di uno studio multicentrico è stato il principale stimolo nel determinare la nascita del ROTARI, Registro Osservazionale Terapia Adiuvante Rigenerativa Italiano, che vede il coinvolgimento di 24 centri di Chirurgia Vascolare al fine di incrementare i risultati ed eventualmente confermare i vantaggi dell'associazione di queste due metodiche nel paziente diabetico affetto da ischemia critica degli arti inferiori.

## **CONCLUSIONI**

Nella nostra esperienza, abbiamo osservato come la terapia rigenerativa con PBMNCs rivesta un ruolo decisivo nei pazienti non suscettibili di rivascolarizzazione.

Nei pazienti diabetici affetti da ischemia critica, l'associazione della rivascolarizzazione periferica con la terapia rigenerativa con PBMNCs sembra rappresentare una valida opzione terapeutica, determinando il miglioramento di quadri clinici resistenti alla guarigione con la sola rivascolarizzazione periferica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Peinetti F, Bellandi G, Cappelli A e coll. Patologia ostruttiva cronica aorto-iliaca e delle arterie degli arti inferiori. *Italian Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2015 September;22(3 Suppl 2):25-68.
2. Brevetti G, Laurenzano E, Giugliano G e coll. Metabolic syndrome and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease. *Nutr Metab Card Dis* 2010;20:676e82.
3. Eryol NK, Unal S, Arinc H e coll. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 1999;99: 2239e42.
4. Ludwig LM, Chilian WM, Pagel PS e coll. Chronic hyperglycemia attenuates coronary collateral development and impairs proliferative properties of myocardial interstitial fluid by production of angiostatin. *Circulation* 2004;109:2343e8.
5. Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2001;49:554e60.
6. Chung Ada WY, Hsiang York N, Matzke Lise A e coll. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix Metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circ Res* 2006;99:140e8.
7. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S e coll. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 2007;116(11 Suppl.):I31e7.
8. van Golde JM, Ruiters MS, Schaper NC e coll. Impaired collateral recruitment and outward remodeling in experimental diabetes. *Diabetes* 2008;57:2818e23.
9. Ruiters MS, van Golde JM, Schaper NC e coll. Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms. *Clin Sci* 2010;119:225e38.
10. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and Atherosclerosis. *Epidemiology, Pathophysiology, and management. JAMA* 2002; 15:2570e81.
11. Norgren L, Hiatt WR, Nehler MR, Harris KA e coll. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67.

12. Gabrielli L, Losa S, Mantero M e coll. Long- term prognosis of diabetic patients with critical limb ischemia: a population-based cohort study. *Diabetes Care* 2009 May;32(5):822e7.
13. Jude EB, Eleftheriadou I, Tentolouris N. Peripheral arterial disease in diabetes e a review. *Diabet Med* 2010 Jan;27(1):4e14.
14. Deriu G, Andreozzi GM, Grego F e coll. Indications for revascularization (open and endovascular) in patients with peripheral disease. *Min Cardioangiol* 2001; 49 (Suppl 1):54-6.
15. Rehman J, Li J, Orschell CM e coll. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1164-9.
16. Asahara T, Murohara T, Sullivan A e coll. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
17. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y e coll. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):2019-25.
18. Arras M, Ito WD, Scholz D e coll. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):40-50.
19. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S e coll. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):671-7.
20. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ e coll. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*. 2014 Jan;17(1):109-18.
21. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T e coll. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):427-35.
22. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, e coll. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013 Jul;29(5):369-76.

23. Prompers, Schaper N, Apelqvist J e coll. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study *Diabetologia* (2008) 51:747-755.
24. Faglia E, Dalla Paola L, Clerici G e coll. Peripheral angioplasty as the first choice revascularization procedure in diabetic patients with critical limb ischemia: prospective study of 993 consecutive patients hospitalized and followed between 1999 and 2003. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Jun; vol. 29(6) pp. 620-7.
25. Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S e coll. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 1999;99:2239–2242.
26. Weihrauch D, Lohr NL, Mraovic B e coll. Chronic hyperglycemia attenuates coronary collateral development and impairs proliferative properties of myocardial interstitial fluid by production of angiostatin. *Circulation.* 2004;109:2343-2348.
27. Ferraresi R., Centola M, Ferlini M e coll. Longterm outcomes after angioplasty of isolated, below-the-knee arteries in diabetic patients with critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009 Mar; vol. 37(3) pp. 336-42.
28. Kanter JE, Kramer F, Barnhart S e coll. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 Mar 20; vol. 109(12) pp. E715-2417.
29. Schalkwijk CG and Stehouwer CD. Vascular complications of diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin . Sci.* 2005; 109, 143-59.
30. Sjöholm A and Nystrom T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2006; 22, 4-10.
31. Huysman F, Mathieu C. Diabetes and Peripheral Vascular Disease. *Acta Chir Belg* 2009; 109, 587-94.
32. Adam DJ, Beard JD, Cleveland T e coll. Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366:1925–1934.
33. Aiello A, Anichini R, Brocco E. Treatment of peripheral arterial disease in diabetes: a consensus of the Italian Societies of Diabetes (SID, AMD), Radiology (SIRM) and Vascular Endovascular Surgery (SICVE). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014 Apr;24(4):355-69.

34. Faglia E, Clerici G, Clerissi J e coll. Early and five-year amputation and survival rate of diabetic patients with critical limb ischemia: data of a cohort study of 564 patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;32:484e90.
35. Lawall H, Bramlage P, Amann B. Treatment of peripheral arterial disease using stem and progenitor cell therapy. *J Vasc Surg.* 2011;53:445–453.
36. Minamino T, Toko H, Tateno K e coll. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet.* 2002;360:2083–2084.
37. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R e coll. Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013 Jul;29(5):369-76.
38. Onodera R, Teramukai S, Tanaka S e coll. Bone marrow mononuclear cells versus G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells for treatment of lower limb ASO: pooled analysis for long-term prognosis. *Bone Marrow Transplant.* 2011 Feb;46(2):278-84.
39. Spaltro G, Straino S, Gambini E e coll. Characterization of the Pall Celeris system as a point-of-care device for therapeutic angiogenesis. *Cytotherapy.* 2015 Sep;17(9):1302-13.
40. De Angelis B, Gentile P, Orlandi F. Limb rescue: a new autologous-peripheral blood mononuclear cells technology in critical limb ischemia and chronic ulcers. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 May;21(5):423-35.
41. Jarajapu YP, Hazra S, Segal M e coll. Vasoreparative dysfunction of CD34+ cells in diabetic individuals involves hypoxic desensitization and impaired autocrine/paracrine mechanisms. *PLoS One.* 2014 Apr 8;9(4):e93965.
42. Awad O, Dedkov EI, Jiao C e coll. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):758-64.
43. Liew A, Bhattacharya V, Shaw J e coll. Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Angiology.* 2016 May;67(5):444-55.
44. Persiani F, Paolini A, Camilli D e coll. Peripheral Blood Mononuclear Cells Therapy for Treatment of Lower Limb Ischemia in Diabetic Patients: A Single-Center Experience. *Ann Vasc Surg.* 2018 Nov;53:190-196.

45. Furgiuele S, Ciarapica R, Cirielli C e coll. Lesioni trofiche resistenti alla rivascolarizzazione nel paziente diabetico: prospettive terapeutiche innovative su base epigenetica. *It J Vasc Endovasc Surg.* 2015; Suppl.1 al N.3.