





UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
in Scienze Cliniche**

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Marco Matucci Cerinic

**Studio di fattori di rischio cardiovascolari correlati al  
decadimento funzionale e cognitivo in una comunità  
anziana del Mugello**

Settore Scientifico Disciplinare MED/46

**Dottorando**

*Dott.ssa Silvia Galora*

**Tutor**

*Prof.ssa Anna Maria Gori*

**Coordinatore**

*Prof. Marco Matucci Cerinic*

Anni 2018/2019

## Indice

1 La popolazione Anziana	3
1.1 Comorbidità e multimorbidità negli anziani	4
1.2 Invecchiamento, immunosenescenza e infiammazione	5
1.3 Il rischio cardiovascolare negli anziani	9
1.4.1 Fisiopatologia	11
2 Lo Studio Mugello	15
3 Scopo del lavoro di tesi	17
4 Biologia delle cellule endoteliali progenitrici (CEP)	18
4.1 Caratterizzazione funzionale e fenotipica delle CEP	21
5 Cellule Endoteliali Circolanti (CEC)	24
6 Materiali e metodi	30
7 Risultati	63
8 Discussione	125
9 La metabolomica	133
10 NMR in Metabolomica	138
10.1 Applicazioni della Metabolomica	148
11 Materiali e metodi	150
12 Risultati	164
13 Discussione	170
14 Bibliografia	174

## 1 La popolazione anziana

### Comorbidità e multimorbidità negli anziani

Il miglioramento delle condizioni socio-sanitarie e l'aumento della sopravvivenza, anche nei pazienti anziani con gravi condizioni cliniche, pongono nuove sfide ai sistemi sanitari. Parallelamente all'invecchiamento della popolazione, infatti, è stato registrato un progressivo incremento delle malattie ad andamento cronico. Questo si realizza soprattutto nella popolazione anziana dove, generalmente, più patologie croniche ad andamento degenerativo e progressivo sono presenti contemporaneamente nello stesso individuo. La Relazione sullo stato Sanitario del Paese 2009-2010 (1) distingue tra *comorbidità* e *multimorbidità*. Il termine comorbidità, comparso per la prima volta nella Letteratura medica nel 1970, indica "l'esistenza o la comparsa di ogni entità clinica aggiuntiva durante il decorso di una specifica malattia (malattia indice) per il quale il paziente sia seguito" (2).

Più recentemente è stato sviluppato il concetto di multimorbidità, ovvero "la concomitanza di più malattie acute e croniche in un soggetto" (3).

Il paziente anziano con molteplici malattie croniche è il paradigma del "paziente complesso", oggetto dell'approccio multidisciplinare geriatrico che, ad oggi, rappresenta il miglior modello a disposizione per identificare e gestire pazienti in cui le problematiche mediche si intrecciano con le ripercussioni di queste sulle problematiche inerenti all'autonomia funzionale e con problematiche sociali ed economiche.

In un paziente geriatrico l'applicazione eccessivamente rigida di linee guida organo- e malattia-specifiche può comportare conseguenze indesiderabili, se non addirittura potenzialmente dannose (4), prima fra tutte è possibile citare come esempio la polifarmacoterapia (5). È stato dimostrato, infatti, come al crescere del numero di prescrizioni aumenti il rischio di interazioni farmacologiche dannose e gli effetti avversi inerenti all'associazione di più farmaci; inoltre, la polifarmacoterapia può rappresentare un fattore di rischio di morte indipendente nel paziente geriatrico (6).

La percentuale di anziani con due o più patologie croniche sale dal 40% negli ultrasessantacinquenni e al 60% negli ultraottantacinquenni. Le combinazioni più frequenti sono quelle fra patologie relative alla sfera cardiovascolare (ipertensione, dislipidemia, diabete, scompenso cardiaco) o combinazioni di patologie cardiovascolari associate a malattie croniche neurologiche e/o respiratorie.

Possiamo interpretare la comorbidità/multimorbidità come una zona di interfaccia tra patologie che, seppur differenti secondo la nosologia tradizionale, hanno in realtà processi fisiopatologici comuni quali infiammazione, stress ossidativo, ipossia, apoptosi alterazioni ormonali. Questi elementi hanno un effetto sinergico, più esponenziale che di semplice sommatoria, nel causare effetti negativi rilevanti per la salute e la qualità di vita dell'anziano in termini, sia di mortalità, che di perdita di autonomia funzionale e di decadimento cognitivo (8). Ne consegue, dunque, un circolo vizioso per cui le comorbidità presenti favoriscono l'insorgenza di ulteriori patologie, con ulteriori ripercussioni negative sul quadro prognostico e funzionale del paziente anziano. Gli effetti sinergici dell'associazioni di più patologie sul rischio di insorgenza di disabilità tendono a crescere con l'età, come suggerito dal fatto che, nei soggetti  $\geq 85$  anni, le menomazioni psico-fisiche hanno un maggior peso sulla perdita di autonomia rispetto alle singole patologie croniche (9).

### **0.1 Invecchiamento, immunosenescenza e infiammazione**

L'invecchiamento è un processo che interessa tutti gli organismi viventi, che può realizzarsi con maggiore o minore velocità, che si manifesta con una progressiva diminuzione della capacità di adattamento agli stimoli ambientali. Tale evento conduce inesorabilmente ad una condizione di maggiore suscettibilità e vulnerabilità nei confronti di malattie, con conseguente aumento della mortalità in maniera età-dipendente. L'invecchiamento è un processo irreversibile, anche se i miglioramenti che si sono realizzati nella salute pubblica, l'introduzione e la diffusione delle vaccinazioni e abitudini alimentari più sane nei Paesi sviluppati hanno contribuito ad allungare la vita media nella maggioranza dei soggetti. Pertanto, nelle condizioni attuali, l'aspettativa media di vita, ha subito un drastico aumento rispetto alla prima metà del secolo scorso, come dimostrano le curve di mortalità, in cui è possibile osservare una più alta percentuale relativa di soggetti anziani e un notevole aumento degli ultranovantenni e dei centenari. L'invecchiamento è associato al declino delle competenze funzionali del sistema immunitario, con una conseguente riduzione della capacità di difendersi dalle infezioni sostenute dai patogeni ambientali; si accompagna, inoltre, a una ridotta efficacia delle vaccinazioni, insorgenza di un fenotipo fragile, maggiore incidenza di malattie a eziopatogenesi autoimmune e all'insorgenza di patologia neoplastica (56) (57).

Nella specie umana la complessa organizzazione del sistema immuno-neuro-endocrino consente all'organismo di far fronte alla notevole quantità di agenti stressanti a cui è esposto durante tutta la vita. Le modificazioni caratteristiche dell'invecchiamento dei mammiferi, inerenti in particolare alla risposta allo stress come la riduzione del numero dei recettori catecolaminergici in periferia, la diminuzione dei livelli di "Heat Shock Proteins HSPs" e della loro inducibilità e un calo della responsività del sistema nervoso simpatico sono probabilmente determinate dalle conseguenze a lungo termine dello stress cronico a cui l'organismo è esposto durante tutto l'arco della propria vita. L'invecchiamento, inoltre, espone l'organismo agli effetti deleteri delle risposte infiammatorie; è stato dimostrato, ad esempio, come l'effetto tossico a livello metabolico delle HSPs e delle catecolamine, siano probabilmente responsabili della perdita selettiva di neuroni dopaminergici e dell'aumentata suscettibilità dell'ippocampo alla neurotossicità della  $\beta$ -amiloide.

La progettazione di strategie di intervento per ritardare o revertire il processo dell'immunosenescenza richiede una conoscenza dettagliata di come le diverse cellule che partecipano all'immunità acquisiscano un fenotipo senescente.

I cambiamenti che si realizzano a livello del sistema immunitario, descritti da Wikby et al. (66), correlati all'invecchiamento includono:

- Alterazioni funzionali a carico dei linfociti B, T, NK, dei monociti e dei neutrofili;
- Involuzione timica e riduzione della produzione delle cellule T;
- Alterazioni del profilo T-helper1/T-helper2 e inversione del rapporto CD4/CD8 (associato a una pre-esistente infezione da citomegalovirus);
- Aumento del numero delle cellule CD3+, CD8+, CD28-.

Il soggetto anziano è caratterizzato da un certo grado di infiammazione cronica che deriva da alterazioni nell'equilibrio tra la produzione di mediatori pro-infiammatori, mediatori anti-infiammatori e citochine; questa condizione è stata definita da Wordsworth e Dunn-Walters come "*inflammaging*" (68). L'*inflammaging* è intesa come un fenomeno di infiammazione cronica che porta al progressivo invecchiamento dell'organismo (73).

L'*inflammaging*, in parte sotto il controllo genetico, risulta essere dannosa per la longevità (74) (75) (76), in quanto questo stato di attività infiammatoria cronica porta, nel lungo termine, a danni tissutali e risulta essere legata a un aumento del rischio di mortalità per tutte le cause in persone anziane.

De Martinis e collaboratori (77) hanno ipotizzato che l'inflammaging sia il risultato di una esposizione cumulativa, durante la vita del soggetto, ad antigeni infettivi, in corso di infezioni sia manifeste che subcliniche, ma anche dell'esposizione ad antigeni non infettivi.

Se questo fosse confermato significherebbe che l'immunosenescenza e, probabilmente, la mortalità e la morbilità, sono accelerate in quei soggetti che sono esposti a un carico antigenico più cospicuo (65).

Più recentemente, tuttavia, è stato suggerito che gli eventi che si svolgono nel tratto gastro-intestinale possano svolgere un ruolo importante nello scatenare e/o mantenere il processo di "inflammaging" (78) (79).

Indipendentemente dalla sua origine la risposta infiammatoria, il danno tissutale e la produzione delle specie reattive dell'ossigeno causano un progressivo danno ossidativo, il quale amplifica il rilascio di citochine, soprattutto da parte del sistema immunitario innato (80). Ciò si traduce in un circolo vizioso che determina un rimodellamento del sistema immunitario a favore di mantenimento di uno stato infiammatorio cronico dove procedono contemporaneamente cambiamenti patofisiologici, uno stato di danno di tissutale e di guarigione dei tessuti. L'incremento dello stress ossidativo è coinvolto nelle alterazioni metaboliche ed energetiche che vanno a modificare alcune funzioni cellulari durante l'invecchiamento, quali la proliferazione, la morte cellulare programmata, definita apoptosi e l'omeostasi dell'organismo. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono implicate nella patogenesi di numerose patologie età-correlate tutte accumulate da una forte componente infiammatoria e immunologica, quali aterosclerosi, diabete mellito di tipo II, neurodegenerazione, osteoporosi. Il danno cellulare e molecolare irreversibile che ne deriva, non necessariamente clinicamente evidente si accumula nel corso degli anni. È ipotizzabile che la strategia per garantire una sopravvivenza a lungo termine sia quella di mantenere nell'organismo la risposta allo stress entro un determinato range, i cui insulti cronici possono rendere il sistema insensibile ai cambiamenti attraverso l'aumento della soglia di attivazione o la diminuzione della sensibilità di effettori periferici.

I meccanismi cellulari e molecolari correlati con la capacità dell'organismo di rispondere adeguatamente a stress di tipo ossidativo e infiammatorio sembrano giocare un ruolo importante nel favorire la longevità umana e nell'evitare/ritardare l'insorgenza delle principali patologie età-correlate.

Anche se è possibile riscontrare una notevole eterogeneità tra gli individui, verosimilmente legata ai diversi polimorfismi genetici, inerenti alla risposta immunitaria, alcuni fattori non genetici, e quindi potenzialmente modificabili, come le abitudini di vita e la nutrizione possono avere un ruolo in questo meccanismo (81). Di particolare interesse è l'uso della dieta e la supplementazione nutrizionale utilizzata per migliorare la funzione immunitaria nella popolazione anziana. Questo è stato razionalizzato su modelli geograficamente distinti di invecchiamento e sono state osservate: una minore incidenza di malattie cardiovascolari e di altre malattie croniche e una maggiore longevità nelle popolazioni che vivono nell'area del Mediterraneo. Queste popolazioni consumano una dieta più ricca in frutta, verdura, legumi, cereali non raffinati e olio d'oliva, associata a una bassa assunzione di carne, latticini e un moderato consumo di alcol (82) (83).

In letteratura sono stati studiati il ruolo di micronutrienti (quali Vitamina E, lo Zinco, i Carotenoidi) dei probiotici, dei prebiotici, dei polifenoli e dei macronutrienti (come gli acidi grassi).

Anche nel soggetto non anziano la Dieta Mediterranea ha dimostrato di essere in grado di influenzare i livelli dei marcatori della flogosi e delle cellule associate allo sviluppo e progressione dell'aterogenesi nei soggetti ad alto rischio di patologia cardiovascolare (84) (85) (86).

Ulteriori studi hanno dimostrato che il consumo di olio d'oliva è associato a cambiamenti nell'espressione endoteliale della Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) e della E-selectina e una diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di sICAM-1, sVCAM-1, SE-selectina, IL-6 e PCR nei pazienti ad alto rischio (87) (88).

Nei soggetti che seguono la Dieta Mediterranea è stato riscontrato, in una coorte di anziani ad alto rischio cardiovascolare, un miglioramento delle prestazioni cognitive nei soggetti affetti da Demenza (89), una riduzione dell'incidenza del deterioramento cognitivo lieve (90), una riduzione dell'incidenza di patologie neurodegenerative come il Parkinson (91) e una riduzione dell'incidenza della Malattia di Alzheimer (92) (93) (94).

Sebbene la cospicua letteratura sull'argomento evidenzi il beneficio della Dieta Mediterranea sulla popolazione anziana, ancora pochi studi sono stati condotti su e se come questa vada ad interessare il sistema immunitario. La Dieta Mediterranea è stata associata alla down-regulation di CD49d e all'aumentata espressione del CD40 tra i monociti circolanti (65). Da alcuni Autori è stata osservata la riduzione di citochine ad attività pro-infiammatoria come il TNF- $\alpha$  e Inteluchina-12 (IL-12) e l'aumento di citochine ad attività antiinfiammatoria come IL-10 dopo l'adesione alla Dieta Mediterranea (95).

## 0.2 Il rischio cardiovascolare negli anziani

### *Fisiopatologia*

La patologia cardiovascolare rappresenta la diagnosi più frequente e la prima causa di morte nella popolazione anziana collocandosi al terzo posto tra le malattie croniche inducenti disabilità; la conoscenza dei meccanismi che conducono all'invecchiamento del sistema cardiovascolare rappresenta una sfida molto importante nell'ottica di produrre interventi efficaci per la prevenzione, la diagnosi precoce e l'adeguato trattamento con l'obiettivo di migliorare la qualità di vita del paziente e nello stesso tempo di controllare i costi della spesa sanitaria (146) (147) (148).

Le caratteristiche dell'invecchiamento cardiovascolare nell'uomo comprendono un progressivo aumento della pressione arteriosa sistolica, della pressione differenziale, della velocità dell'onda sfigmica (Pulse Wave Velocity, PWV) e della massa ventricolare sinistra, nonché un aumento dell'incidenza di CAD e di fibrillazione atriale (149) (150) (151) (152). Si osservano diminuzioni riproducibili correlate all'età dei tassi di riempimento diastolico precoce del ventricolo sinistro, della frequenza cardiaca massima, della gittata cardiaca massima, della capacità aerobica massima o del massimo consumo di ossigeno ( $VO_{2max}$ ), un aumento della frazione di eiezione indotto dall'esercizio, delle risposte riflesse della frequenza cardiaca, della variabilità della frequenza cardiaca e della vasodilatazione in risposta a stimoli  $\beta$ -adrenergici o delle componenti vasodilatatorie mediate dall'endotelio (153).

Alterazioni cellulari, enzimatiche e molecolari nella parete dei vasi arteriosi contemplano la migrazione di cellule della muscolatura liscia vascolare attivate nell'intima, con un'aumentata produzione di matrice provocata dall'alterata attività di metalloproteasi di matrice, di angiotensina II, del fattore di crescita  $\beta$ -trasformante, delle molecole di adesione intercellulare e con produzione di collagene e cross-linking del collagene. Si verificano anche perdita di fibre elastiche, aumenti della fibronectina e progressiva calcificazione. Tali processi portano alla dilatazione arteriosa e all'ispessimento dell'intima che determinano una maggiore rigidità vascolare. L'aumento della rigidità arteriosa si manifesta mediante incrementi della velocità dell'onda sfigmica in direzione periferica e mediante accelerazione e aumento della riflessione dell'onda sfigmica di ritorno verso il cuore (spesso stimata come indice di aumento aortico).

Nei modelli di invecchiamento, sia animale sia umano, la produzione di ossido nitrico (NO) da parte delle cellule endoteliali diminuisce con l'età; si verifica una riduzione della massa delle cellule endoteliali associata a un aumento dell'invecchiamento cellulare e dell'apoptosi e a un incremento del consumo di NO dovuto a un aumento della produzione di anione superossido a livello vascolare età-correlato. Queste variazioni contribuiscono a ridurre le risposte vasodilatatorie delle cellule endoteliali mediate dal NO a livello della vascolarizzazione periferica e di quella coronarica. Con

l'invecchiamento si riducono anche le risposte vascolari agli agonisti  $\beta$ -adrenergici e ai bloccanti  $\alpha$ -adrenergici. Viceversa, le risposte ai composti derivati da cellule non endoteliali, come i nitrati e il nitroprussiato, sono preservate con l'invecchiamento, ma possono variare in relazione al letto vascolare o essere alterate da patologie quali ipertensione o diabete.

I cambiamenti nella matrice extracellulare del miocardio sono paralleli a quelli nel sistema vascolare con aumento del collagene, del diametro fibrillare, del cross-linking del collagene, del rapporto tra collagene di tipo I e III, con diminuzione del contenuto di elastina e con aumento di fibronectina. Si può anche verificare una variazione del bilancio tra metalloproteasi di matrice e inibitori tissutali delle metalloproteasi di matrice che favorisce l'aumento della produzione di matrice extracellulare. La proliferazione dei fibroblasti è indotta dai fattori di crescita, in particolare dall'angiotensina, dai fattori di crescita trasformanti, dal fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  e dal fattore di crescita di derivazione piastrinica. Questi cambiamenti sono accompagnati dalla perdita cellulare e dall'alterazione della funzione cellulare (149)

A livello atriale la diminuzione delle cellule del nodo del seno e dei canali del calcio di tipo L al loro interno e i cambiamenti della matrice extracellulare contribuiscono allo sviluppo della disfunzione del nodo del seno e della fibrillazione atriale. Le variazioni del collagene, del tessuto elastico e della calcificazione all'interno o presso il corpo fibroso centrale e il nodo atrioventricolare (AV) o la parte prossimale delle due branche contribuiscono ad anomalie della conduzione e alla calcificazione dell'anulus valvolare.

A livello ventricolare la deposizione di collagene e le variazioni della matrice extracellulare contribuiscono alla perdita delle cellule, all'ipertrofia dei miociti con cambiamenti nelle sottoforme della miosina e a un alterato controllo miocardico del calcio (152) I cambiamenti nel controllo del calcio a livello miocardico riducono o ritardano l'inattivazione della corrente di calcio transmembrana di tipo L, diminuiscono e ritardano la captazione del calcio ionizzato intracellulare da parte del reticolo sarcoplasmatico dei miociti cardiaci e riducono e ritardano l'attivazione della corrente di potassio rettificante diretta verso l'esterno. Il risultato è un prolungamento del potenziale d'azione della membrana e della corrente del calcio in entrata con prolungamento sia della contrazione sia del rilasciamento (149). Si osservano variazioni legate all'età anche nel compartimento intravascolare. In particolare è possibile riscontrare aumenti del fibrinogeno, dei fattori della coagulazione (V, VIII, IX e XIIa) e del fattore di von Willebrand non controbilanciati da aumenti dei fattori anticoagulanti. Nei soggetti anziani il contenuto fosfolipidico delle piastrine è alterato e l'attività delle piastrine è aumentata con incremento del legame dei fattori di crescita di derivazione piastrinica con le pareti arteriose. Con l'invecchiamento si rileva un aumento dei livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), specialmente in caso di stress, che provoca la compromissione della fibrinolisi. Anche le citochine infiammatorie protrombiniche circolanti, specialmente l'interleuchina-6, aumentano con l'età e possono intervenire nella patogenesi delle

sindromi coronariche acute. Tutte queste alterazioni favoriscono inoltre lo sviluppo e la progressione dell'aterosclerosi (152).

Cambiamenti costanti del sistema nervoso autonomo accompagnano l'invecchiamento e influenzano la funzionalità cardiovascolare. Relativamente al sistema  $\beta$ -adrenergico, le variazioni legate all'età comprendono una diminuzione del numero dei recettori, alterazioni dell'accoppiamento con la proteina G e alterazioni nella trasduzione dei segnali mediata dalla proteina G. Si verificano, inoltre, riduzioni correlate all'età dei recettori piastrinici  $\alpha$ -adrenergici e della vasoreattività arteriosa mediata dal sistema  $\alpha$ -adrenergico dei vasi sanguigni in alcuni distretti, mentre sembrano essere preservate in altri (variazioni si verificano a livello dell'avambraccio, mentre sembrano essere preservate le variazioni mediate dal sistema  $\alpha$ -adrenergico nelle vene delle mani).

Con l'invecchiamento la concentrazione dei recettori e dei trasportatori dopaminergici diminuisce e possono attenuarsi le risposte contrattili cardiache allo stimolo dopaminergico. Nei tessuti vascolari e cardiaci si assiste a una riduzione della sensibilità e delle risposte agli stimoli parasimpatici, mentre nei modelli di invecchiamento sono frequenti gli aumenti degli effetti del sistema nervoso centrale.

I cambiamenti combinati del sistema nervoso autonomo legati all'età portano alla riduzione della funzione barocettiva e delle risposte agli stress fisiologici con un aumento della sensibilità alla stimolazione parasimpatica del sistema nervoso centrale.

Le ipotesi unificanti per i cambiamenti legati all'età nell'intero organismo includono danno ossidativo cumulativo, risposte allo stress cellulare o infezione e morte cellulare programmata.

Alcune alterazioni cardiovascolari legate all'età possono essere parzialmente, se non completamente, reversibili. L'esercizio fisico aumenta la funzione endoteliale, riduce la rigidità arteriosa, e la funzione barocettiva nelle persone anziane. La restrizione calorica rallenta l'invecchiamento e i cambiamenti cardiaci e aumenta inoltre la massima aspettativa di vita in diversi modelli su animali di piccola taglia. Nell'uomo la restrizione calorica riduce il peso corporeo, la pressione arteriosa e i fattori di rischio per l'aterosclerosi e, negli studi osservazionali trasversali, ha migliorato gli indici di funzionalità diastolica (154) (155). I farmaci come gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), gli antagonisti dell'aldosterone e i  $\beta$ -bloccanti possono influenzare il rimodellamento vascolare e cardiaco associato all'ipertensione all'aterosclerosi o allo scompenso cardiaco (152) Gli studi pilota suggeriscono che l'associazione di esercizio fisico, gestione dello stress e dieta specializzata, che riduca le lipoproteine a bassa densità (LDL), aumenta anche l'attività della telomerasi e che i processi di invecchiamento cellulare possono essere rallentati (156) L'apporto alimentare di antiossidanti è stato associato a un rallentamento dei cambiamenti legati all'età a livello vascolare, tuttavia, approcci farmacologici mediante la somministrazione di acidi grassi omega-3 sia per la prevenzione primaria sia per la prevenzione secondaria non sono stati efficaci nell'uomo (157)

I cambiamenti correlati all'età creano un sistema cardiovascolare da una parte con un aumentato carico pulsatile e dall'altra meno capace di aumentare la gittata in risposta allo stress. Tali cambiamenti limitano, inoltre, la capacità massima e diminuiscono la capacità di riserva, contribuendo ad abbassare la soglia per i sintomi in presenza di malattie cardiovascolari che diventano più comuni con l'avanzare dell'età.

### **Declino delle funzioni cognitive nell'anziano**

Le funzioni cognitive si modificano con l'invecchiamento, questi cambiamenti sono evidenti soprattutto a livello delle principali abilità mentali. Il declino delle funzioni cognitive, tuttavia, non riguarda in egual misura tutta la cognitività. La natura di tali modificazioni, il limite oltre il quale queste modificazioni diventano evidenti, l'entità e la velocità di tali cambiamenti variano molto secondo la funzione cognitiva coinvolta (209)

Nelle persone non affette da patologie neurologiche, le prestazioni intellettive tendono a rimanere costanti almeno fino agli 80 anni d'età. Tuttavia, le azioni possono subire un rallentamento per una più lenta elaborazione a livello nervoso centrale. La capacità verbale è preservata fino ai 70 anni d'età, dopo di che, alcuni anziani riducono gradualmente il proprio vocabolario, tendono a fare errori semantici e sviluppano una prosodia anomala. Altre alterazioni intellettive senili sono più sfumate ma possono manifestarsi come difficoltà di apprendimento, specialmente linguistiche, e amnesia per eventi non rilevanti. Tuttavia, questa lieve amnesia è diversa dalla demenza perché non compromette la capacità di richiamare ricordi importanti né le funzioni nervose superiori (210).

Negli anni '50 l'ipotesi principale inerente all'invecchiamento cognitivo era quella del decadimento globale, prospettiva unidimensionale, associato a stati patologici progressivo-degenerativi. Dalla seconda metà del novecento le ricerche hanno chiarito che l'invecchiamento è un processo multidimensionale. L'affermazione di questa nuova visione del processo d'invecchiamento ha portato a focalizzare l'attenzione alla funzione cognitiva nella sua totalità, studiando sia gli aspetti che subiscono un declino età-correlato che le funzioni che si mantengono inalterate con l'invecchiamento.

Una delle prime ipotesi multidimensionale formulata sulla natura dell'invecchiamento è quella di Horn e Cattell (211) secondo cui l'intelligenza fluida, comprendente abilità come la velocità di elaborazione, il

*problem solving* e l'accuratezza, si deteriorerebbe con l'età, mentre l'intelligenza cristallizzata, basata su acquisizioni legate alla cultura e all'esperienza di vita, si manterrebbe pressoché inalterata.

Secondo Salthouse il peggioramento della prestazione della popolazione anziana nello svolgimento di compiti cognitivi sarebbe dovuto esclusivamente (212) al declino della velocità di elaborazione delle informazioni (213). La conseguenza di questo processo è il rallentamento nello svolgimento delle operazioni cognitive (214), la progressiva riduzione dello spazio disponibile nella memoria di lavoro (212) e deficit di memoria episodica (215).

Secondo i sostenitori dell'ipotesi della distribuzione delle risorse non sarebbe la quantità di risorse disponibili a cambiare ma la capacità dei meccanismi di controllo di destinarle a specifici processi.

Anche in questo caso la prestazione risulterebbe compromessa in modo proporzionale alla complessità del compito ma a causa di un deficit a livello di qualità, e non (216) quantità, di informazioni.

Un altro approccio considera un ruolo centrale della memoria di lavoro (217), in quanto, a causa del ruolo cruciale nel determinare la prestazione in compiti cognitivi complessi, è stato sostenuto che le modificazioni possano incidere sull'invecchiamento cognitivo (218). Secondo Hasher e Zacks (219) il declino della memoria di lavoro nel paziente anziano sarebbe causato a sua volta dal peggioramento delle funzioni inibitorie e dal conseguente controllo inefficace dei contenuti delle informazioni che hanno accesso alla memoria, determinando una generale mancanza di regolazione nei processi attentivi che spiegherebbe i deficit in altri domini cognitivi.

Altri autori Jennings (220), distinguendo tra processi automatici e controllati, hanno dimostrato, che mentre i processi controllati subiscono un declino con l'avanzare dell'età, i processi automatici si mantengono pressoché stabili con l'invecchiamento. Questo declino dei processi controllati potrebbe rendere gli anziani più suscettibili a distorsioni, errori e all'interferenza dei processi bottom-up (221).

L'elevato numero di persone affette da disturbi neurocognitivi e la previsione, nei prossimi anni, di un progressivo aumento numerico di tali patologie, a causa del fenomeno di invecchiamento della popolazione, suggeriscono la necessità di definire le caratteristiche e programmare una rete di servizi per far fronte ai bisogni dei malati.

L'invecchiamento cerebrale è un processo fisiologico imputabile più alla perdita di connessioni sinaptiche che alla perdita neuronale. Nell'anziano sano la ridondanza dei circuiti neuronali e i fenomeni di neuroplasticità garantiscono di solito il mantenimento di una normale attività cerebrale per un corretto adempimento delle attività quotidiane. L'età rimane il principale fattore di rischio per l'insorgere di patologie degenerative che implicano un deterioramento cognitivo progressivo (222), anche se vi sono altri fattori, ormai noti, suscettibili di intervento. Fattori protettivi per lo sviluppo di patologia sono la scolarizzazione, definibile come anni di studio, che contribuisce a migliorare la "riserva cognitiva" dell'individuo" e l'attività fisica, soprattutto attività aerobica.

In uno studio prospettico (223) è stato valutato l'associazione tra svolgimento di attività ricreative nell'anziano e sviluppo di demenza. Lo studio è stato condotto in 469 soggetti con più di 75 anni non affetti da demenza al momento dell'arruolamento ai quali sono stati fatte eseguire varie attività ricreative (lettura, gioco degli scacchi, uso di strumenti musicali, danza, etc) nell'arco di 5,1 anni. Durante il periodo di osservazione hanno sviluppato demenza 124 soggetti: l'incremento di 1 punto alla scala delle attività ricreative si associava a una riduzione significativa del rischio di essere colpiti da demenza con un hazard ratio 0,95 (0,90-0,97) I risultati erano simili sia quando si considerava la demenza vascolare che la demenza di Alzheimer.

Sono fattori di rischio negativi per lo sviluppo di patologie degenerative: l'ipertensione arteriosa, l'obesità, i traumi cranici e il diabete mellito.

### ***0.2.1 Infiammazione e SNC***

Negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse delle Neuroscienze nel ruolo che uno stato di infiammazione cronica possa avere nell'insorgenza e nell'aggravamento dei principali disturbi psichiatrici e neurologici. L'espansione della ricerca sperimentale e clinica ha portato alla consapevolezza che i cambiamenti patologici che si verificano nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) non sono limitati ad alterazioni di specifici neurotrasmettitori, ma riflettono il malfunzionamento di più sistemi, quello immunitario, endocrino (asse ipotalamo-ipofisi surrene) e dei diversi circuiti presenti nel SNC (236). Sostanziali evidenze sperimentali e cliniche indicano come una combinazione tra infiammazione e stress ossidativo svolga un ruolo cruciale nella fisiopatologia della depressione maggiore (237) (238). A livello del neurone, queste modifiche comportano l'attivazione di vie eccitotossiche che conducono all'apoptosi e ad una riduzione dei neuroni in aree del cervello (ad esempio l'ippocampo, amigdala e la corteccia prefrontale) criticamente coinvolte nella patogenesi della depressione. Smith (1991) è stato uno dei primi ad ipotizzare che le citochine pro-infiammatorie ( IL-1, IL-6, INF- $\gamma$ , e TNF) nel siero sono associate con l'insorgenza di sintomi di depressione (239), mentre citochine ad attività anti-infiammatoria risultano essere ridotte (IL-4, IL-10, IL-13) nello stesso gruppo.

È interessante osservare che le alterazioni infiammatorie associate a depressione, o avviate dalle citochine pro-infiammatorie, risultano attenuati dagli antidepressivi (240). Alcune evidenze cliniche dimostrano che i farmaci anti-infiammatori non steroidei, come celecoxib, un inibitore selettivo della COX-2 e l'aspirina, un inibitore COX non selettivo, hanno effetti antidepressivi come dimostra l'aumento della risposta antidepressiva (241) (242), anche quando somministrato in monoterapia al paziente depresso (243).

Numerosi studi epidemiologici hanno associato il declino cognitivo età-correlato e la depressione senile alla cronica elevazione dei livelli di citochine circolanti (244) (245).

Nello studio "Health ABC", elevati livelli di IL-6 e di PCR risultavano associate a basse performance cognitive in soggetti di età compresa tra 70-79 anni e con un maggior rischio di deterioramento cognitivo dopo due anni di follow-up (244).

È stato dimostrato che i soggetti affetti da malattia di Alzheimer avevano più alti livelli di IL-1 rispetto ai controlli (246).

In uno studio di centenari danesi i livelli di TNF- $\alpha$  erano associati a demenza anche dopo aver escluso dall'analisi i soggetti con storia di ictus o ischemia cerebrale transitoria (247). Non è ancora stato chiarito se l'effetto delle citochine sul deterioramento cognitivo sia attribuibile a fenomeni infiammatori localizzati nel sistema nervoso centrale o meno, dato che le citochine possono attraversare la barriera ematoencefalica (247).

Alcune evidenze lasciano ipotizzare che, nei casi di demenza, il sistema nervoso centrale rappresenti il principale sito di produzione di TNF- $\alpha$ . È stato dimostrato, infatti, che i livelli di TNF- $\alpha$  erano 25 volte più elevati nel fluido cerebrospinale di soggetti con malattia di Alzheimer e che anche i soggetti affetti da demenza vascolare avevano concentrazioni più elevate di TNF- $\alpha$  rispetto ai soggetti sani, ma in nessuno dei soggetti è stato dimostrato un aumento dei livelli circolanti (248)

Sebbene l'elevazione dei livelli di numerose citochine pro-infiammatorie riscontrate in soggetti affetti da demenza faccia ipotizzare che possano avere un ruolo causale nella patologia, non può essere escluso che il loro significato possa essere riconducibile ad un processo messo in atto dalle cellule cerebrali al fine di riparare i danni provocati da un processo patologico primario.

## Ricerche personali

### 0.3 Lo Studio Mugello

Lo Studio Mugello (467), studio epidemiologico condotto su una popolazione di ultranovantenni residenti in nove degli undici comuni del Mugello, è stato progettato come un'indagine trasversale, con possibili implicazioni future longitudinali.

I criteri di inclusione per entrare a far parte dello studio sono stati:

- essere un soggetto tra i 90-99 anni;
- vivere nel Mugello, area a nord-est di Firenze.

Sono stati inclusi nello studio un gruppo di anziani istituzionalizzati e un gruppo di soggetti ultracentenari (30 soggetti).

Il protocollo di studio, conforme ai principi della "Declaration of Helsinki" sulla ricerca clinica coinvolgente soggetti umani, è stato approvato dal comitato Etico dell' IRCSS Don Gnocchi.

Tutti i partecipanti hanno firmato il modulo di consenso informato per essere inclusi nello studio.

A fronte della distribuzione capillare dei partecipanti sul territorio, la limitata disponibilità di strumenti medici per effettuare la visita (vedi sezione metodi) e la necessità di limitare il numero di osservatori (almeno 1 osservatore per 100-120 partecipanti), è stato programmato di visitare 5-6 partecipanti per settimana e, di conseguenza, l'indagine sarebbe dovuta durare circa due anni, dal Gennaio 2010 al dicembre 2011.

Il campione potenziale dello studio è stato rappresentato da 562 residenti nella zona del Mugello il 1° Gennaio 2009, più partecipanti di età compresa tra 89 (n=153), 88 (n=281) e 87 (n=295) anni, che sarebbero entrati nel gruppo >90 anni nel corso dell'indagine, meno soggetti di 99 (n=14), 98 (n=15) e 97 (n=27) anni, che sarebbero usciti dal gruppo durante l'indagine.

In base alle tendenze del tasso di mortalità di soggetti <90 anni negli anni precedenti al 2009 è stata assunta una mortalità del 21% all'anno.

È stato stimato che, alla fine dell'indagine, un campione di 475 partecipanti, corrispondenti all'incirca al 65% degli ultranovantenni residenti nel Mugello, sarebbe stato ragionevolmente rappresentativa.

Dal punto di vista epidemiologico una partecipazione del 65% (circa 400 partecipanti) è stata in grado di garantire un campione rappresentativo e con adeguata potenza statistica.

#### **0.4 Popolazione oggetto di studio**

In questo studio sono stati studiati 414 ultranonagenari, attingendo alla banca dati dello Studio Mugello. Il campione è stato selezionato, sul totale dei 475 partecipanti allo Studio Mugello, in relazione alla presenza dell'informazione relativa al numero delle cellule progenitrici [(circulating progenitor cells-CPCs); (CD34+, CD133+, CD34+/CD133+)], delle cellule progenitrici endoteliali [(endothelial progenitor cells-EPCs); (CD34+/KDR+; CD133+/KDR+; CD34+; CD133+/KDR+)] e delle cellule endoteliali circolanti (circulating endothelial cells-CECs)

Dei 414 ultranonagenari partecipanti a questo studio, il 73,4% è stato costituito da soggetti di sesso femminile (304 donne) e il 26,6% è stato rappresentato da soggetti di sesso maschile (110 uomini). L'età mediana e la deviazione standard (DS) del campione è risultata essere: 93,1±3,3 anni.

#### **Scopo del lavoro di tesi**

Lo scopo di questa tesi è stato quello di mettere a punto e validare delle tecniche di identificazione delle cellule endoteliali progenitrici e delle cellule endoteliali circolanti mediante metodica citofluorimetrica. Lo studio dei profili metabolomici è stato effettuato su campioni di siero mediante RNM ad alta risoluzione. Gli spettri sono stati usati per la caratterizzazione del profilo metabolomico di ciascun paziente al fine di “identificare” i metaboliti associati con gli aspetti cognitivi-psicologici e funzionali nel grande anziano. Tutti gli spettri sono stati acquisiti a 310 K utilizzando uno spettrometro Bruker 600 MHz (Bruker BioSpin). L'acquisizione dei three one-dimensional H-NMR spectra, (nuclear Overhauser effect spectroscopy-NOESY), Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), e Diffusion-edited spectra, permette il rivelamento dei differenti dei metaboliti. L'acquisizione degli spettri NMR dei 357 pazienti dello studio Mugello non ha messo in evidenza associazioni significative fra i profili metabolomici e l'assenza di deficit cognitivo (MMSE-mini mental state examination >24MMSE), la presenza di depressione severa (GDS -Geriatric

Depression Scale >7), la funzionalità degli arti inferiori ridotta (SPPB -Short Physical Performance Battery <4) ed il. I livelli di metaboliti risultano essere correlati significativamente con la storia familiare di malattie cardiovascolari e cerebrovascolari.

#### **4 Biologia delle cellule endoteliali progenitrici (CEP)**

##### **4.1 Definizione, origine e ruolo**

Numerosi studi hanno identificato una popolazione cellulare, chiamata Cellule Endoteliali Progenitrici (Endothelial Progenitor Cells EPC), che può essere isolata dal torrente circolatorio (249) (250) (251), dal midollo osseo (252) e dal cordone ombelicale (253). Evidenze di laboratorio hanno dimostrato che queste cellule presentano numerose caratteristiche delle cellule staminali ed esprimono alcuni marcatori di superficie specifici dell'endotelio stesso. Inoltre, quando queste cellule sono iniettate in un modello animale dove è stata indotta ischemia tissutale vengono ad essere rapidamente incorporate nel sito dove si realizza il processo della neovasculogenesi (249) (253) (254).

Le cellule endoteliali progenitrici derivano da un progenitore mesodermico, contenuto nel midollo osseo, chiamato *Emangioblasto*, precursore a comune con le HSCs, anche se, più recentemente Rehman e collaboratori hanno dimostrato, che le CEP presenti in colture di sangue umano, possono originare anche dalla linea monocitomacrofagica. (255)

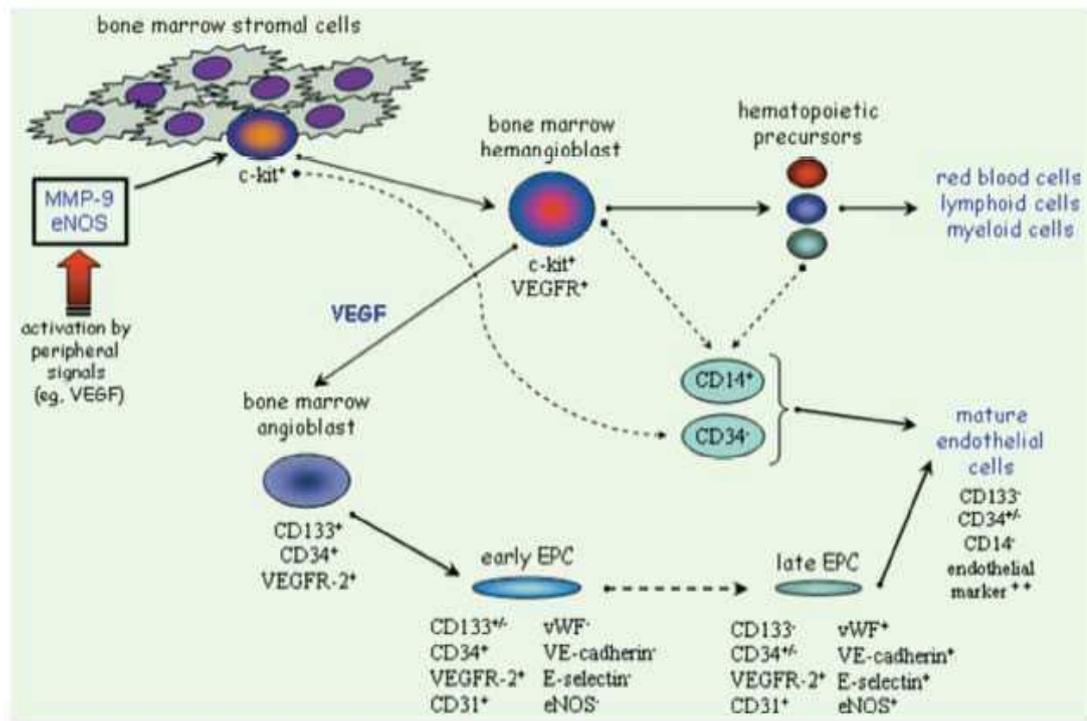
L'emangioblasto durante l'embriogenesi si differenzia da una parte in *Angioblasto*, dall'altra nel *Precursore Ematopoietico* (da qui il nome EM-ANGIO-blasto).

L'emangioblasto esprime, già nelle fasi precoci del suo sviluppo, due marcatori di superficie:

- CD34: una sialomucina di membrana;
- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2) o Kinase insert Domain Receptor (KDR): un recettore ad attività tirosino-kinasica legante il fattore di crescita dell'endotelio vascolare.

Nel midollo osseo dell'adulto la controparte dell'angioblasto embrionale è rappresentata dalle Cellule Endoteliali Progenitrici (CEPs). Queste cellule, nel corso del processo differenziativo, sono le prime che acquistano la capacità di migrare dal midollo osseo al sangue periferico, dove nel 1997 sono state isolate da Asahara e collaboratori (249). Successivi lavori hanno dimostrato come tali cellule siano in grado di migrare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature, partecipando quindi al processo della vasculogenesi anche nel periodo post natale (256). Questo fenomeno, in precedenza noto solo per quanto riguarda la patologia neoplastica, rappresenta un elemento chiave nel meccanismo di rigenerazione tissutale post-ischemico/necrotico e nel mantenimento della integrità funzionale e dell'omeostasi vascolare mediante il processo della riendotelizzazione post-traumatica. Possono, quindi, differenziarsi in cellule endoteliali mature, in grado di secernere Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Il TGF- $\beta$ , a

sua volta, induce l'espressione, sui precursori mesenchimali delle cellule muscolari lisce, del PDGFR- $\beta$  (Platelet Derived Growth Factor Receptor  $\beta$ ). Le cellule endoteliali secernono il PDGF- $\beta$  (Platelet Derived Growth Factor  $\beta$ ), che si lega allo specifico recettore presente sui precursori delle cellule muscolari lisce e ne induce la differenziazione; le cellule muscolari lisce mature aderiscono, quindi, all'endotelio, formando la tonaca media dei vasi (257).



**Figura 3.1-**Origine e differenziazione delle CEP. (258)

Se si considera che una delle funzioni fondamentali dell'endotelio è quella prevenire la formazione di trombi, ridurre l'aggregazione di leucociti e piastrine, garantire l'integrità funzionale dei vasi (259), e quindi che una sua disfunzione predisponga a vasocostrizione, trombosi ed aterosclerosi (260), si può ben capire il ruolo fondamentale che le CEP potrebbero assumere in un prossimo futuro; ruolo ancor più rilevante se si pensa che le cellule endoteliali mature hanno un basso potenziale proliferativo, per cui la loro capacità di sostituire l'endotelio danneggiato è molto scarsa.

In condizioni basali il numero di CEP presenti nel sangue periferico è esiguo e variabile. Tali cellule infatti, risiedono principalmente nel midollo osseo, dove mantengono una stretta associazione con le Cellule Staminali Ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells HSCs), lo stroma midollare e i fibroblasti, costituendo il microambiente dove si realizza il processo dell'ematopoiesi, a costituire la cosiddetta "Nicchia Staminale". Si calcola che le CD34+ siano il 3% delle cellule del midollo osseo, tale numero è in grado di ricostituire l'intera linea ematopoietica dopo terapia mieloablativa, mentre nel circolo periferico lo 0,01-0,05% di tutte le cellule mononucleate sono CD34+; è oramai confermato in letteratura che le CEP sono il 2% di tutte le CD34+, sia nel midollo sia in periferia (261).

I dati a disposizione indicano che il numero delle CEP sono inversamente correlate all'età, probabilmente per la fisiologica riduzione dell'attività del midollo osseo, mentre gli estrogeni (262), l'esercizio fisico intenso (263) e l'ipossia inducono un incremento dei livelli ematici di CEP, dando così una possibile spiegazione agli effetti benefici dell'attività sportiva. Tali aspetti, inerenti al livello delle CEP e alla biologia in relazione a fattori modificanti, verranno approfonditi successivamente.

Lo studio di Asahara e collaboratori pubblicato nel 1997 (249) rappresenta una pietra miliare per la conoscenza della biologia delle CEP: sono state isolate le CEP dal sangue periferico, ed identificate come endoteliali mediante l'uso di anticorpi diretti contro due epitopi presenti sulla loro superficie: CD34 e KDR (o VEGFR-2). Asahara e collaboratori hanno dimostrato che tali cellule erano in grado di differenziarsi in vitro (in terreni contenenti fattori stimolanti la differenziazione in senso endoteliale) in cellule endoteliali mature, e che il loro contributo, in vivo, alla neoangiogenesi e alla riparazione del danno endoteliale era fondamentale. Per dimostrare ciò, hanno realizzato dei modelli di ischemia degli arti inferiori indotta su topi e conigli atimici, così da evitare la reazione di rigetto al trapianto cellulare. Per riprodurre il quadro ischemico in vivo, hanno reciso l'arteria femorale, inducendo un quadro ischemico monolaterale. Dopo due giorni hanno iniettato endovena cellule di origine midollare CD 34+ precedentemente marcate con sonda fluorescente. A distanza di 1-6 settimane, l'esame istologico ha rivelato la presenza di numerose cellule marcate ( $13,4 \pm 5,7$  %) nei vasi neoformati a livello dell'arto ischemico; nelle aree tissutali non danneggiate, invece, non si è osservata alcuna integrazione delle cellule marcate.

Questi risultati hanno suggerito per la prima volta il potenziale ruolo terapeutico delle CEP nell'ischemia tissutale.

Questo studio, insieme a quello pubblicato l'anno successivo da Rafii et collaboratori (264), si è rivelato fondamentale per abbattere il dogma secondo cui la differenziazione dell'emangioblasto in angioblasto e, successivamente in cellula endoteliale avvenisse solo durante l'embriogenesi. Essi, infatti, hanno isolato i progenitori endoteliali circolanti derivati dal midollo osseo nel sangue periferico di soggetti adulti. Dimostrando l'esistenza pertanto, anche nell'adulto, di un emangioblasto e di un progenitori endoteliali circolanti.

Da allora numerosi studi hanno confermato il ruolo chiave delle ECPs nella biologia vascolare (265).

## 4.2 Caratterizzazione funzionale e fenotipica delle CEP

Sono stati identificati diversi fenotipi cellulari che possono differenziarsi in cellule endoteliali mature, creando confusione nella nomenclatura e definizione del gruppo di interesse. Ciò è reso più complesso dal fatto che, messe in coltura, le loro condizioni di crescita possono determinare un rapido cambiamento del fenotipo cellulare.

Relativamente a questo aspetto si è osservato che, se coltivate in presenza di statine nel mezzo di coltura il numero delle cellule endoteliali isolate dalle colonie aumenta (266), la crescita può determinare uno sviluppo precoce di marcatori delle cellule endoteliali mature.

Non conoscendo il *time-point* della maturazione cellulare, è difficile identificare le CEP sulla scorta di stretti parametri predefiniti. Inoltre, dobbiamo considerare come esse possano esprimere, con differente intensità, un'ampia varietà di marcatori tipici della linea endoteliale, a seconda della fase maturativa nella quale si trovano: precoce (CEP circolanti precoci) o tardiva (CEP circolanti tardive).

Comunque la letteratura internazionale si è trovata concorde nel definire CEP quelle cellule che presentano specifiche caratteristiche fenotipiche e funzionali.

I marcatori di superficie che individuano il fenotipo cellulare delle CEP sono il

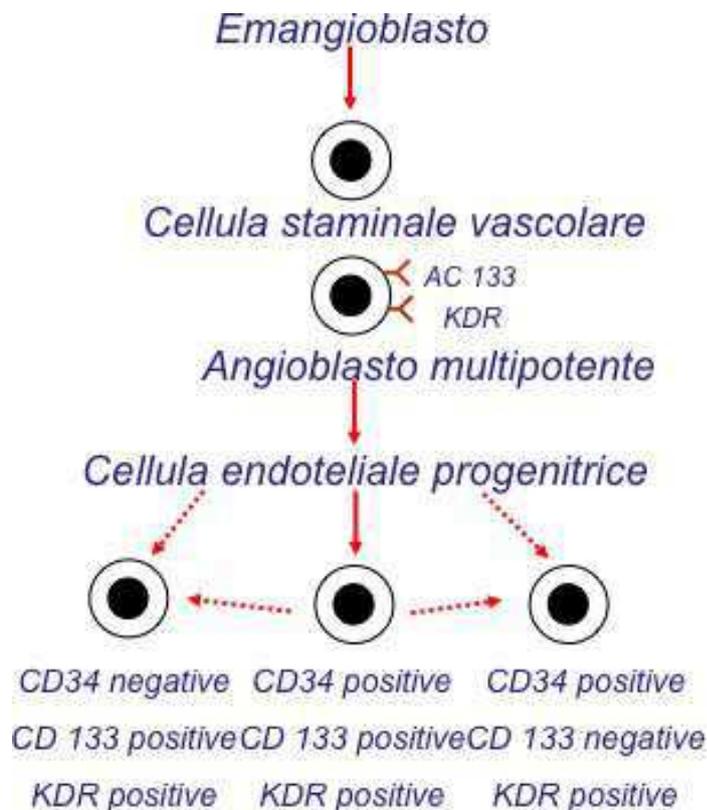
- CD34: una sialomucina di membrana presente anche sulla cellula staminale ematopoietica;
- Recettore del fattore di crescita vascolare [VEGRF-2/flk-1/KDR (nell'uomo)], tipico marker delle cellule endoteliali mature;
- CD133 (AC133, ckit) indice di immaturità cellulare (251) poiché compare sulla membrana cellulare molto precocemente per poi scomparire nel corso della maturazione (265).

L'identificazione del CD133 ha segnato un punto di svolta per ottenere una caratterizzazione ancora più precisa delle CEP: esso infatti, a differenza dei due antigeni sopraelencati, non si trova né sui loro precursori, né sull'endotelio maturo, ma solo sulle CEP. Attualmente viene considerato il marker più precoce della cellula staminale ematopoietica, infatti sembra venga espresso ancor prima del CD34. Il CD133, noto anche come AC133 o prominina, è un recettore orfano di natura glicoproteica, con 5 domini transmembrana, del peso di 120kDa, il cui legando e la cui funzione sono al momento sconosciuti; non è noto se rappresenti soltanto un marker di superficie o se sia coinvolto nella regolazione della neovascolarizzazione; tuttavia, quando incubate con Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF-2) e Insuline Growth Factor (IGF), si osserva una riduzione dell'espressione del CD133 e una differenziazione in cellule endoteliali mature aderenti, esprimenti marcatori endotelio-specifici quali il Fattore di vonWillebrand (FvW), il Vascular Endothelial-caderina (VE-caderina) e la nitrossido sintetasi II tipo o endoteliale (eNOS) (251). Inoltre, durante il processo maturativo vi è l'acquisizione di marcatori fenotipici caratteristici della linea endoteliale matura, quali: CD31+, PECAM1, Fattore di vonWillebrand, sintetasi dell'ossido nitrico

(eNOS), caderina, E-selectina. Si osserva, inoltre, l'incorporazione di lipoproteine acetilate a basso peso molecolare (ac-LDL). Il fenotipo endoteliale, definito in specifici terreni di coltura, possiede la capacità di captare il colesterolo LDL acetilato (up-take ac-LDL) e la capacità di adesione alle lectine (249) (267) (268).

Dunque, i marcatori di superficie che identificano le CEP sono tre e consentono di individuare diverse sottopopolazioni di CEP:

- CD34+/KDR+/CD133-;
- CD133+/KDR+/CD34-;
- CD34+/CD133+/KDR+.



**Figura 3.2-**Definizione dei marcatori di superficie delle CEP (269).

È stato dimostrato che i vari sottotipi di CEP esercitano una diversa funzione nella neovascolarizzazione conseguente all'ischemia tissutale e nella riparazione dell'endotelio: in particolare sembra che le CEP CD34+/CD133+ (una sottopopolazione di CEP che riconosce come precursore le CEP

(CD133+/KDR+/CD34+) si localizzano preferenzialmente a livello delle aree ischemiche, in quanto dotate di più potenti capacità vasorigenerative (Friedrich EB, 2006).

Per quanto riguarda gli aspetti funzionali di queste popolazioni cellulari sono legate al fatto che presentano caratteristiche, sia ematopoietiche, che caratteristiche tipiche delle cellule endoteliali. Le caratteristiche ematopoietiche rendono conto della capacità, se coltivate con particolari fattori di crescita, di formare colonie (eCFU) (270), mentre le caratteristiche endoteliali portano la capacità di formare nuovi capillari, produrre NO e dare origine a colonie tardive di crescita con caratteristico aspetto affusolato (spindle shaped) e ad "acciottolato" (cobblestone) simile all'endotelio (271).

### **4.3 Meccanismi d'azione delle CEP**

In passato si riteneva che la rigenerazione dell'endotelio dopo eventi lesivi fosse dovuta alla migrazione e proliferazione di cellule endoteliali limitrofe, processo noto come *Angiogenesi* (272). Attraverso questo processo si pensava venisse ripristinata la anatomia e la funzione del vaso coinvolto. Attraverso studi più recenti è stato dimostrato che questo meccanismo non è il solo a mantenere l'integrità della rete vascolare ma esiste un altro processo, che presuppone la mobilitazione di cellule staminali dal midollo osseo in circolo, la loro differenziazione in progenitori circolanti (CEP) e la successiva migrazione nelle aree ischemiche o lese, al fine di contribuire alla formazione di nuovi vasi. Questo processo è indicato con il termine di *Vasculogenesi*. (249) (273) (264) (274). Tuttavia il numero delle CEP introdotto nei capillari neoformati risulta alquanto ridotto, questo più recentemente ha portato a osservare che il contributo di tali cellule non si limita a solo l'introduzione fisica all'interno di nuovi vasi: esse, infatti, secernono numerosi fattori di crescita proangiogenici quali VEGF, HGF (Hepatocyte Growth Factor), SDF-1 (Stromal cell Derived Factor 1), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), che stimolano l'angiogenesi locale e la mobilitazione delle cellule mature e dei progenitori tissutali residenti.

Pertanto le CEP contribuiscono alla vasculogenesi, sia mediante la loro introduzione fisica nelle pareti dei nuovi vasi, sia attraverso il rilascio di fattori di crescita con funzione paracrina (275) (276) (277) (278) (271) (268) (279) (280) (281) (257) (282) (283) (270) (284) (251) (285) (286) (273) (287) (274) (255) (288).

#### **4.3.1 Reclutamento delle CEP nei tessuti ischemici**

Il processo di differenziazione delle CEP in cellule endoteliali mature, ma anche i loro effetti paracrini presuppongono lo *homing*, ovvero il reclutamento di tali cellule nelle aree soggette a ischemia. Il processo che determina il reclutamento delle CEP non è conosciuto tanto quanto lo *homing* dei linfociti in sede di infiammazione; tuttavia, studi recenti suggeriscono che i due processi presentino delle caratteristiche a comune.

Il reclutamento delle CEP presuppone una sequenza ordinata di eventi, ciascuno dei quali è regolato da specifici mediatori:

- ↯ *Rilascio dal midollo osseo e mobilitazione nel circolo sanguigno;*
- ↯ *Chemiotassi;*
- ↯ *Adesione;*
- ↯ *Diapedesi o migrazione transendoteliale;*
- ↯ *Migrazione e invasione tissutale;*
- ↯ *Differenziazione in cellule endoteliali mature.*

Nonostante possano essere classificati per fase, questi eventi tendono a sovrapporsi, così come l'azione dei fattori inducenti, che agiscono di concerto in ogni passaggio del processo maturativo delle cellule staminali.

Descriviamo gli aspetti salienti di ciascun evento e i mediatori coinvolti nel processo di reclutamento delle CEP nei tessuti ischemici.

### ***Rilascio dal midollo osseo e mobilitazione nel circolo sanguigno***

Il rilascio dal midollo osseo e la mobilitazione nel circolo sanguigno delle cellule staminali è regolata dal microambiente locale, la cosiddetta "nicchia delle cellule staminali", costituita da osteoblasti, fibroblasti e cellule endoteliali (289) (290) (291) che contraggono stretti rapporti con la cellula staminale. La nicchia si può definire come una microstruttura in cui alloggiato più elementi cellulari in grado di interagire tra di loro e con stimoli esterni che ne determinano cicli di autorinnovamento. Questo microambiente preserva il compartimento staminale in tutte le sue funzioni e lo protegge da stimoli differenziativi rappresenta, quindi, una sorta di "santuario della staminalità". All'interno della nicchia tali cellule sono mantenute in forma indifferenziata e in uno stato di quiescenza, cioè nella fase G0 del ciclo cellulare. Il mantenimento della staminalità all'interno della nicchia è il risultato dell'interazione eterologa con cellule istologicamente diverse; il ruolo della nicchia staminale midollare, non è quindi solo di supporto fisico, ma presenta il potenziale intrinseco di guidare il destino delle cellule che la occupano. La nicchia si divide in due zone distinte, ma ugualmente connesse: la "nicchia osteoblastica", dove è l'osteoblasto a svolgere un ruolo primario, caratterizzata da un alto contenuto in calcio e glicoproteine extracellulari, svolge un ruolo dominante nel mantenimento della quiescenza delle cellule staminali, e la "nicchia perivascolare/endoteliale", dove predominano le cellule endoteliali, rappresenta un ambiente più dinamico rispetto alla precedente, dove sembra presiedano principalmente la regolazione delle funzioni quali proliferazione, differenziamento, migrazione transendoteliale ed homing. La migrazione di tali cellule è mediata da proteinasi quali l'elastasi, la catepsina G, le metalloproteasi della matrice extracellulare (MMPs), in particolare la MMP-9 (292). Il Granulocyte-Colony Stimulating

Factor (G-CSF) è una citochina in grado di indurre la mobilitazione delle cellule CD34+, e di stimolare i granulociti neutrofilici presenti nel microambiente a secernere l'elastasi e la catepsina G: successivamente tali enzimi rompono i legami tra le molecole di adesione (CD106) sulle cellule stromali e le integrine presenti sulle cellule staminali ematopoietiche (293).

L'ischemia rappresenta uno tra i principali stimoli fisiologici che inducono la mobilitazione delle CEP: a livello dei tessuti soggetti a ischemia si assiste alla produzione di fattori proangiogenetici quali VEGF, Placental Growth Factor (PlGF), e citochine come Stromal-cell-Derived-Factor 1 (SDF-1), che sembrano svolgere un ruolo chiave nel processo della mobilitazione dal midollo osseo (294) (295). Diversi studi hanno inoltre evidenziato il ruolo essenziale che gioca la MMP-9 nella mobilitazione delle CEP indotta da VEGF, SDF-1, PlGF (296) (297). La MMP-9 induce il clivaggio del Kit-ligando di membrana, mKitL (o Fattore della cellula staminale, SCF), una glicoproteina di 248 amminoacidi, con successivo rilascio in circolo del Kit- ligando solubile, sKitL, una proteina di 164 amminoacidi, a sua volta, permette il trasferimento delle cellule staminali e progenitrici (tra cui le CEP) dal compartimento "quiescente" (nicchia quiescente, contenente cellule in fase G0) al compartimento "permissivo" (nicchia proliferativa), dove queste possono proliferare (entrando, quindi, nel ciclo cellulare) e differenziarsi (296). Per comprendere come interagiscono la MMP-9 e il VEGF (che rappresenta il prototipo dei fattori di crescita e delle citochine rilasciate dal tessuto ischemico), è necessario analizzare il ruolo di un altro protagonista fondamentale per la mobilitazione delle CEP: la Nitrossido Sintetasi Endoteliale (eNOS o NOS3).

La eNOS è un enzima espresso costitutivamente dall'endotelio, ma anche da altre cellule come piastrine, miocardiociti, cellule del midollo osseo che catalizza la sintesi dell'ossido nitrico (NO) a partire da L-arginina e O<sub>2</sub> molecolare. L'NO è prodotto dalla eNOS in piccole quantità e ha soprattutto una funzione protettiva per l'endotelio, infatti ha azione vasodilatante, inibisce l'aggregazione piastrinica e la proliferazione della muscolatura liscia vascolare. Alcuni studi hanno dimostrato che la eNOS espressa dalle cellule dello stroma midollare è essenziale per la mobilitazione delle cellule progenitrici e staminali e, quindi, per la neovascolarizzazione (293): infatti, esperimenti effettuati su topi knock out per il gene della eNOS indicano che in assenza di tale enzima il processo di vasculogenesi indotto dall'ischemia risulta alterato (292). Nei topi eNOS<sup>-/-</sup> l'iniezione di VEGF ricombinate o l'esercizio fisico (che determina un aumento delle richieste di ossigeno e, quindi, in presenza di altri fattori predisponenti, può indurre ischemia) attivano la mobilitazione delle CEP in misura molto limitata (294).

Da questo emerge che la funzione della eNOS in questo processo sembra essere insostituibile. Altri esperimenti dimostrano che la eNOS non è importante solo all'interno del midollo osseo, ma anche per l'angiogenesi nei tessuti ischemici: stimola, infatti, la migrazione delle CEP e la loro introduzione fisica all'interno dei vasi neoformati (298). Non è chiaro, al momento come la eNOS svolga questa funzione; è

stato, invece, maggiormente compreso il suo meccanismo d'azione a livello midollare. Dati recenti dimostrano che la eNOS espressa dalle cellule dello stroma midollare rappresenta l'anello di

congiungimento tra il VEGF e la MMP-9. In particolare, il VEGF (così come numerosi altri fattori stimolanti la mobilizzazione delle CEP, tra cui l'esercizio fisico e le statine) attiva la eNOS attraverso la phosphatidylinositol-3-kinase-Akt, un sistema di due kinasi (PI3K-AKT), che da un lato induce la mobilizzazione dei depositi intracellulari di ioni calcio (PI3K), dall'altro attiva la eNOS, mediante una reazione di fosforilazione dipendente dalla serino-treonino-kinasi (AKT). L'AKT, a sua volta, è attivata dal legame VEGF al recettore VEGFR-2, anche esso dotato di attività tirosino-kinasica (298). L' NO prodotto dalla eNOS induce, a sua volta, l'attivazione della pro-MMP-9 a MMP-9 mediante una S-nitrosilazione (299). La MMP-9, infine, stimola la liberazione di sKitL, con successivo reclutamento in circolo delle cellule staminali e progenitrici (296).

### Chemiotassi

Dopo la fase iniziale dell'ingresso in circolo a partire dal midollo, è necessaria l'attivazione di segnali che attraggano tali cellule a livello del tessuto ischemico. Durante questa fase risulta fondamentale il ruolo delle chemochine (300), una ampia famiglia di citochine che stimolano la motilità leucocitaria, ma anche delle CEP, regolano la migrazione verso i tessuti. Lo spostamento delle cellule circolanti verso la periferia è guidata da gradienti di chemochine; la capacità delle cellule di muoversi lungo un gradiente di concentrazione di una certa sostanza è definita *chemiotassi*. Una volta attivate dalle chemochine, le CEP assumono una posizione marginale nel torrente circolatorio (marginazione), così da poter arrestarsi e aderire all'endotelio.

### Adesione

La fase di adesione si articola in due momenti distinti che possono essere indicati come: *adesione instabile o "rolling"* e *adesione stabile*.

L'*adesione instabile* è mediata da una famiglia di molecole adesive chiamate *selectine*. Nello studio, che analizzava il reclutamento delle CEP di origine embrionale nelle sedi di angiogenesi tumorale, è stato dimostrato che il loro arresto in fase iniziale è mediato dalle P-selectine e E-selectine (301).

L'*adesione stabile*, invece, è mediata dalle integrine, proteine eterodimeriche di membrana (una catena  $\alpha$  e una catena  $\beta$ ) la cui principale funzione è quella di favorire l'adesione di cellule di vario tipo, tra cui cellule staminali ematopoietiche e leucociti, alle cellule endoteliali e alle proteine della matrice extracellulare.

Le  $\beta_2$ -integrine e la  $\alpha_4\beta_2$ -integrina mediano l'interazione cellula-cellula; le  $\beta_2$ , in particolare, sono fortemente espresse sulla membrana delle CEP destinate ai tessuti ischemici e favoriscono la loro adesione e transmigrazione.

Le integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , invece, mediano l'adesione tra cellule e proteine della matrice extracellulare, pertanto sono importanti nella riendotelizzazione: in tal caso, infatti, non conta tanto l'adesione CEP-cellula endoteliale e la successiva transmigrazione, quanto il legame CEP-matrice extracellulare, necessario per sostituire le cellule endoteliali danneggiate e rivestire i vasi denudati.

### **Diapedesi o migrazione transendoteliale**

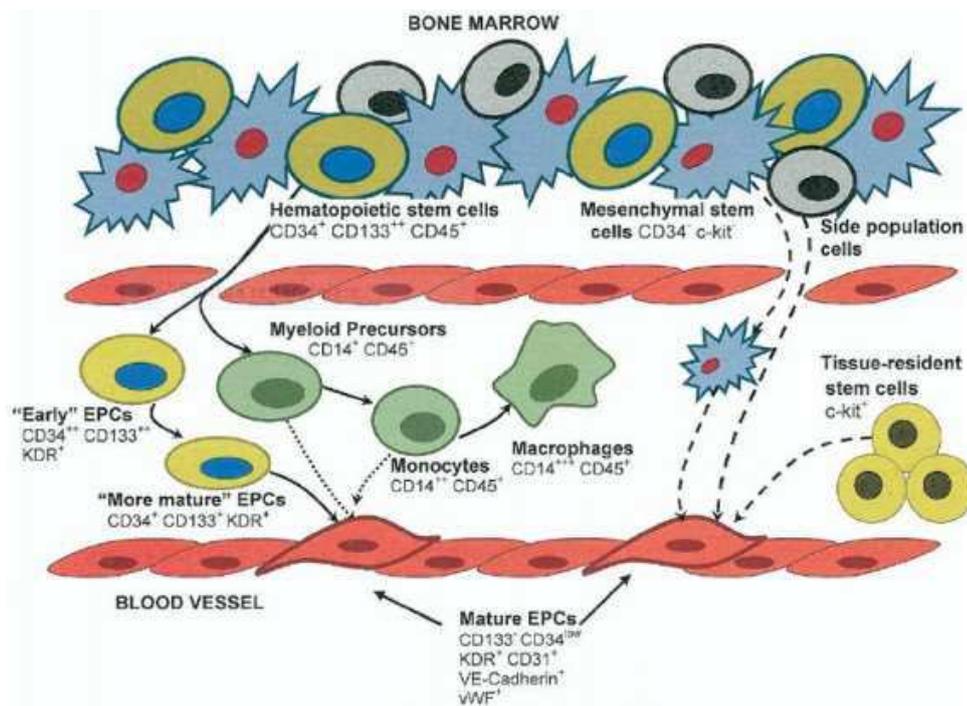
Successivamente all'adesione stabile, le ECPs fuoriscono dai vasi, migrano attraverso gli spazi dell'endotelio e dopo averlo attraversato perforano la membrana basale, probabilmente grazie alla secrezione di collagenasi, seguendo il gradiente di concentrazione chimica delle chemochine, si accumulano rapidamente dove sono necessarie.

### **Migrazione e invasione tissutale**

Dopo il processo di diapedesi, segue la migrazione e invasione tissutale. Nonostante i numerosi studi finalizzati a far luce sui fattori regolanti l'attrazione delle ECPs nel tessuto ischemico, i meccanismi alla base di queste due tappe del processo di homing sono ancora poco noti. Sembra che, in maniera analoga a quanto avviene per la flogosi la migrazione leucocitaria, sia necessaria la liberazione di proteinasi (MMPs, caepsina-L) che, dirigendo la matrice extracellulare, permettono alle CEP di raggiungere il loro traguardo. Urbich e collaboratori (302) hanno dimostrato che l'elevata espressione di catepsine è un requisito fondamentale per la capacità invasiva delle CEP: infatti, in un modello animale di ischemia degli arti è stato osservato come ceppi di topi knock out del gene per la catepsina-L mostravano una inadeguata capacità di prendere parte al processo di neovascolarizzazione.

### **Differenziazione in cellule endoteliali mature**

Dopo aver raggiunto il tessuto bersaglio, le CEP si differenziano in cellule endoteliali mature aderenti esprimendo marcatori endotelio-specifici quali il Fattore von Willebrand la VE-caderina e la NOS3 o eNOS (296). Il VEGF e i suoi recettori giocano un ruolo essenziale anche nel processo di differenziazione endoteliale.



**Figura 3.3-**Progressiva maturazione delle CEP.

Vediamo riassunte in figura le caratteristiche fenotipiche di tali cellule. La prima dettagliata descrizione dell'isolamento di progenitori endoteliali (Asahara, 1997) ha dimostrato come i marcatori che caratterizzano queste cellule allo stadio più precoce di differenziamento siano comuni a quelli delle cellule staminali emopoietiche, il CD34+, il CD133+, ed il vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR- 2) o Flt-1. Le cellule che esprimono questi marcatori sono residenti nel midollo osseo; la successiva migrazione nel torrente circolatorio è segnata da modificazioni dell'espressione di recettori di membrana. Il passaggio nel circolo, in particolare, è segnato da una diminuzione nell'espressione del CD133, mentre rimane positiva quella per il CD34 e per il Flt-1. La perdita della positività per il CD133+ e, successivamente, per il CD34 segna un ulteriore step differenziativo, fino alle cellule endoteliali mature, caratterizzate dall'espressione del CD31 (PECAM-1), VE-caderina, e vWF.

### ***Mediatori coinvolti nel Homing delle CEP***

Il tessuto soggetto a ischemia viene invaso dalle cellule immunocompetenti che producono citochine essenziali nel processo di homing quali: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Stromal cell Derived Factor-1 (SDF-1), IL-8/Gro-a, e di fattori di crescita come il VEGF.

- MCP1: è una citochina prodotta dai monociti in grado di attrarre i progenitori circolanti e di stimolare la loro tras migrazione con un meccanismo  $\beta_2$ -integrina dipendente (303)
- SDF-1: questa citochina, oltre a indurre la mobilitazione delle ECPs dal midollo osseo (cfr. *Mobilizzazione*), promuove il loro reclutamento nelle aree ischemiche (304). In uno studio

condotto da Askari e collaboratori (295) i livelli di questa proteina aumentavano nel primo giorno dopo un infarto miocardico; l'aumentata espressione di SDF-1 determinava a sua volta un incremento dello *homing* delle CEP e della loro introduzione nell'endotelio dei vasi neoformati (304) (295)

- VEGF: agisce in maniera analoga a SDF-1 (305) (306) (261)
- IL-8/Gro-a: il ruolo di queste citochine e dei loro recettori (CXCR2 e CXCR1, rispettivamente) nello *homing* delle CEP è stato individuato più recentemente da Kocher e collaboratori (307). È stato dimostrato che in seguito ad un infarto miocardico si realizza sia un aumento dell'espressione di queste citochine nel tessuto infartuato che un aumento dei loro livelli plasmatici. Inoltre le CEP esprimono sulla loro membrana i recettori CXCR1, CXCR2, CXCR4 (recettore di SDF-1), a dimostrazione della loro capacità di rispondere allo stimolo chemiotattico di IL-8 e di SDF-1. Lo stesso gruppo ha dimostrato, successivamente, che l'inibizione di IL-8/Gro-a o dei loro recettori attraverso specifici anticorpi, blocca parzialmente il reclutamento delle CEP nel miocardio ischemico e la neovascolarizzazione da esse mediata, annullando anche altri importanti effetti positivi quali la riduzione dell'area infartuata, la prevenzione della apoptosi dei miocardiociti, il recupero della funzione ventricolare sinistra.

Oltre che alle chemochine "classiche", sembra che nei tessuti ischemici vengano rilasciati anche altri fattori in grado di attrarre le CEP; tra questi uno dei più studiati è HMGB-1 (High Mobility Group Box-1), una proteina nucleare secreta durante i processi flogistici o necrotici, che esercita una funzione chemiotattica sia sulle cellule infiammatorie che sulle cellule staminali, sia in vivo che in vitro. Dal momento che la flogosi e la necrosi sono espressione di ischemia tissutale, è verosimile pensare che HMGB-1 promuova il reclutamento delle ECPs (308).

### **Apparato cardiovascolare e CEP**

Le cellule progenitrici circolanti hanno un ruolo ben definito da ormai diversi anni in una serie di situazioni extra-cardiche caratterizzate da una patologica formazione di neovasi, quali la retinopatia diabetica o l'angiogenesi tumorale. Esiste una associazione fra elevati livelli di CEP ed il rischio di sviluppare alcuni tumori (come ad esempio il mieloma multiplo), partecipando attivamente alla angiogenesi tumorale e supportando la crescita neoplastica.

Un'ampia parte della letteratura scientifica si è focalizzata sullo studio del ruolo delle CEP nella patogenesi delle malattie cardiovascolari, visto il ruolo centrale dell'endotelio nella biologia e nella funzione del cuore e dei vasi (309). È stato dimostrato chiaramente che il danno endoteliale è coinvolto nella genesi e nella progressione dell'aterosclerosi, così come nella trombosi e nello sviluppo dell'ipertensione arteriosa. Il prevalere della riparazione endoteliale rispetto al danno all'endotelio è di

preminente importanza nella riduzione degli eventi cardiovascolari (310). Le cellule endoteliali mature hanno limitate capacità rigenerative (311) (312); questo limite spiega il crescente interesse che si è sviluppato per le CEP, in particolare, nel mantenimento dell'integrità endoteliale, della funzione e della neovascolarizzazione postnatale (284). Numerose evidenze scientifiche crescenti segnalano la ridotta disponibilità e il deterioramento della funzione delle CEP in presenza di fattori di rischio o di malattia cardiovascolare in atto.

In considerazione di tutto ciò un numero crescente di studi si sta indirizzando verso il possibile utilizzo nel contesto clinico.

### **Fattori che influenzano il numero e la funzione delle CEP**

A causa del numero ridotto delle CEP e della difficoltà nella loro identificazione fenotipica, le informazioni che disponiamo riguardo al range di normalità e alle loro caratteristiche funzionali sono piuttosto limitate nella specie umana. I dati presenti in letteratura suggeriscono che diversi fattori possono influenzare i livelli delle CEP.

#### ***Fattori che riducono i livelli di CEP***

##### **Invecchiamento**

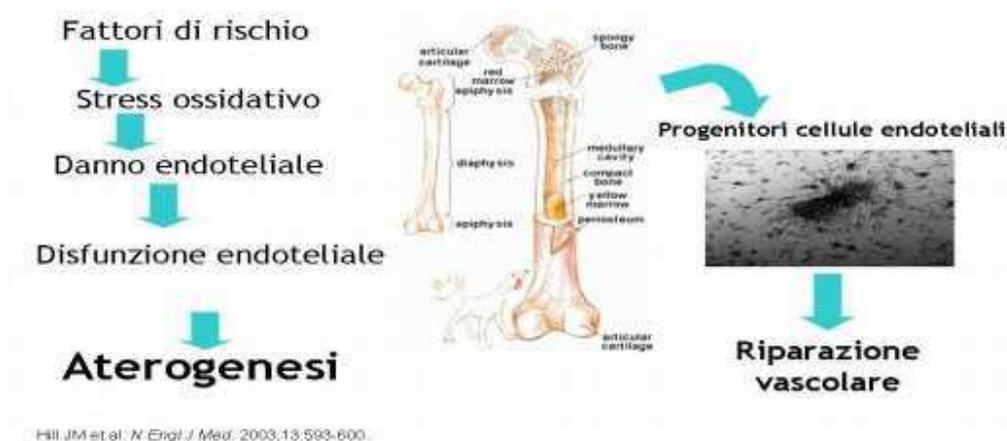
Diversi studi sia clinici che sperimentali hanno dimostrato come l'età possa incidere sulla disponibilità e sulla funzione delle CEP anche nel soggetto sano (278) (313) (314). Il processo di invecchiamento determina una riduzione dei livelli delle CEP circolanti in pazienti con malattia coronarica. Vasa (268) ha documentato una riduzione età-correlata nel numero delle cellule circolanti CD34/KDR+ sia nei soggetti sani che nei pazienti coronaropatici, inoltre Scheubel e collaboratori (313) hanno documentato che nei pazienti con angina stabile il numero delle CEP si riduceva progressivamente in relazione all'età. Inoltre lo stesso gruppo ha documentato che il numero delle CEP mobilitate a seguito di intervento di bypass aorto-coronarico è significativamente ridotto in pazienti più anziani.

##### **Fattori di rischio cardiovascolare**

È noto che sia il numero che l'attività funzionale delle CEP risultano ridotti in soggetti con fattori di rischio cardiovascolare (315) secondo Hill e collaboratori (271) i loro livelli ematici e la capacità di formare colonie è inversamente correlata al Framingham risk factor score. Possono essere così considerati dei surrogati di marcatori biologici per la valutazione della funzione vascolare e del rischio cumulativo cardiovascolare nei soggetti sani (271). Alcuni studi hanno dimostrato che le CEP contribuiscono alla formazione di nuovi vasi in misura pari al 25% (316). Si può dedurre che, nei



soggetti con fattori di rischio cardiovascolari, la scarsa disponibilità di questo pool di cellule contribuisca al mantenimento della disfunzione endoteliale e, dunque, alla progressione della malattia aterosclerotica. A tal proposito, recentemente è stato descritto come l'aumento dei livelli delle CEP circolanti sia associato a una riduzione del rischio di morte per cause cardiovascolari ed eventi cardiovascolari maggiori (317).



**Figura 3.4**-Fattori di rischio cardiovascolari e CEP. Effetti dei fattori di rischio sul processo di eterogenesi e ruolo riparativo delle CEP

Analizzeremo il meccanismo con cui i principali fattori di rischio cardiovascolare influiscono sulla funzione e il numero delle CEP.

### **a. Ipertensione arteriosa**

Tra i diversi fattori di rischio, l'ipertensione arteriosa sembra essere il più potente predittore del deterioramento della capacità migratoria delle CEP (268).

Tuttavia non è ancora ben chiaro come essa agisca; uno studio pubblicato recentemente ha dimostrato che l'ipertensione arteriosa accelera l'invecchiamento delle CEP sia in modelli sperimentali che clinici (318). Nella fase sperimentale sono stati studiati ceppi di topi con ipertensione essenziale o provocata dalla somministrazione di sale più desossicortisone acetato (DOCA); dopo l'isolamento delle ECPs e la loro caratterizzazione, le ECPs senescenti sono state evidenziate mediante la positività della  $\beta$ -galattosidasi acida, un marcatore biochimico di acidità tipico del fenotipo cellulare senescente. La stessa procedura è stata adottata nella fase clinica dello studio, su un campione di 37 pazienti con ipertensione essenziale. In entrambi i gruppi, poi, è stata misurata l'attività delle telomerasi con il metodo della Polymerase Chain Reaction (PCR). La telomerasi è un enzima che ha la funzione di mantenere costanti la lunghezza del telomero ad ogni divisione cellulare; i telomeri rappresentano le porzioni

terminali dei cromosomi e si accorciano progressivamente ad ogni divisione, in quanto la cellula per natura è incapace di duplicare la porzione più esterna del cromosoma. Dunque, ogni volta che la cellula si replica, il cromosoma si accorcia. Quando il telomero ha raggiunto una dimensione critica, la cellula non è più in grado di proliferare e assume un fenotipo senescente. La telomerasi, allungando i telomeri, contrasta e ritarda il fenomeno di invecchiamento cellulare. In entrambe le fasi dello studio è emerso che le ECPs con fenotipo senescente sono significativamente più numerose negli ipertesi rispetto ai controlli normotesi; inoltre nei primi l'attività della telomerasi è di gran lunga più ridotta che nei secondi (318).

Si può, dunque ipotizzare che l'ipertensione acceleri il processo di invecchiamento delle ECPS attraverso l'inattivazione delle telomerasi (318).

L'angiotensina II diminuisce l'attività telomerasica nelle CEP ed accelera la senescenza delle stesse attraverso un incremento dello stress ossidativo. Pareri contrastanti esistono circa gli effetti dell'angiotensina II sulla proliferazione delle CEP in vitro. Nonostante l'angiotensina II abbia inibito la proliferazione delle CEP in uno studio, ha avvantaggiato la proliferazione VEGF-indotta delle CEP in un altro (319) (320).

L'angiotensina II potenzia inoltre la formazione della rete VEGF-indotta CEP, probabilmente attraverso un upregulation del KDR (318).

#### **b. Abitudine al fumo**

Nei paesi occidentali il fumo di sigaretta costituisce il principale fattore di rischio modificabile associato alla cardiopatia ischemica e alla mortalità in soggetti di età superiore ai 50 anni di età.

L'associazione tra sviluppo di dell'aterosclerosi e abitudine al fumo di sigaretta è stata ampiamente dimostrata, anche se i meccanismi patogenetici con cui questo si realizza non sono completamente noti: è noto che il fumo di sigaretta determina un'alterazione strutturale e/o funzionale a livello dell'endotelio; l'insulto endoteliale costituisce a sua volta il primo gradino che porterà alla formazione della placca aterosclerotica.

Lo studio sull'effetto del fumo sulle CEP di soggetti fumatori cronici, asintomatici per aterosclerosi e con anamnesi negativa per tutti gli altri fattori di rischio (321); ha dimostrato che il numero delle CEP isolate dal sangue periferico dei fumatori cronici è ridotto di oltre il 50% rispetto ai controlli non fumatori. È stata dimostrata, inoltre, l'esistenza di una correlazione inversa tra numero di CEP circolanti e il numero di sigarette consumate (322). In risposta all'abitudine al fumo le CEP presentano anche delle importanti alterazioni funzionali, che interessano sia il processo di proliferazione che di migrazione. Nei fumatori entrambi i processi sono ridotti in risposta al VEGF, compromettendo anche la loro capacità di introdursi a livello della parete dei vasi neoformati. È stato evidenziato, inoltre, come le CEP dei fumatori cronici vadano incontro a morte prematura durante la fase precoce della coltura cellulare, rispetto allo stesso fenotipo cellulare nei soggetti non fumatori (322). Analogamente, la cessazione del fumo è associata con

un aumento del numero delle CEP più accentuato in coloro che hanno fumato meno (322). Tuttavia, se il soggetto riprende l'abitudine al fumo osserviamo una riduzione rapida del numero delle CEP con il raggiungimento dei livelli osservati prima dell'interruzione (322).

Gli effetti della nicotina su attività e funzione delle CEP sembra essere dose-dipendente. Il picco di effetto su numero, proliferazione, migrazione e sulla vasculogenesi in vitro si osserva a una concentrazione nicotinic di 10,8 mol/l, valore prossimo a quella trovata nel sangue dei fumatori (323). Tuttavia la citotossicità è stata osservata a concentrazioni nicotinic più alte (323). Quindi la nicotina ad elevate concentrazioni ( $>10^{-6}$  mol/l) danneggia le CEP, in piccole dosi sembra potenziare i loro effetti (323).

Michaud e collaboratori (321) hanno evidenziato che i potenziali meccanismi responsabili degli effetti negativi del fumo sulle CEP sono essenzialmente tre:

1. *Ridotta differenziazione verso il fenotipo endoteliale*

Le ECPs isolate dai fumatori mostrano una ridotta espressione del recettore per VEGF e una significativa down-regulation della VE-caderina, una caderina endotelio-specifica che media l'adesione cellulare e partecipa ai processi di vascolarizzazione sia nell'embrione che nell'adulto.

2. *Aumento dello stress ossidativo*

È stato dimostrato che le ECPs sono dotate di un potere antiossidante maggiore rispetto alle cellule endoteliali mature, grazie ad una maggiore espressione di enzimi "scavenger" (324). Ciò però non si riscontra nelle CEP dei fumatori, che, al contrario, mostrano una maggiore produzione di ROS (Reactive Oxygen Species) e una ridotta disponibilità di molecole ad azione antiossidante. Questi fattori contribuiscono ad alterare, non tanto il numero, quanto la funzione delle CEP.

3. *Ridotti livelli plasmatici di Ossido Nitrico (NO)*

Come già visto in precedenza, l'ossido nitrico è un mediatore essenziale sia per la mobilitazione delle CEP dal midollo osseo che per lo homing (325).

Nello studio in questione, i livelli plasmatici di NO misurati nei fumatori sono più bassi di oltre il 50% rispetto ai non fumatori. Ciò renderebbe conto, sia del minor numero (per la ridotta mobilitazione), sia della minore attività funzionale delle CEP nei fumatori.

Questi dati dimostrano che la disfunzione delle CEP causata dal fumo di sigaretta altera il fisiologico processo di riendotelizzazione che fa seguito al danno endoteliale, e contribuisce, in tal modo, allo sviluppo della placca aterosclerotica; inoltre, riduce significativamente la neovascolarizzazione indotta dallo stimolo ischemico, così da limitare l'efficacia delle terapie cellulari volte a ripristinare il flusso sanguigno.

### **c. Elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL**

È stato ampiamente dimostrato come elevati livelli plasmatici di colesterolo LDL promuovano e sostengano l'aterosclerosi in diverse fasi del suo sviluppo; infatti, il colesterolo LDL danneggia direttamente l'endotelio ed entra a far parte integrante della placca ateromastica.

Alcuni studi hanno evidenziato, inoltre, come elevati livelli plasmatici di colesterolo totale e colesterolo LDL si associno non solo ad una riduzione del numero delle ECPs ma anche ad una riduzione delle loro competenze funzionali (326) (327) (328). L'associazione tra il livello di colesterolo LDL e la biologia delle CEP è stata studiata, in soggetti sani, che in coronaropatici. Il numero delle CEP è significativamente ridotto anche nei soggetti sani con livelli elevati di colesterolo (271). Vasa e collaboratori hanno evidenziato che sussiste una correlazione inversa tra livello di colesterolo-LDL e il numero delle CEP nel soggetto sano (268). È stata osservato inoltre un deterioramento delle caratteristiche funzionali delle CEP isolate, come la proliferazione, la migrazione, l'adesione e la capacità vasogena in vitro nel paziente con ipercolesterolemia (268) (326). Esiste, quindi, un ulteriore meccanismo fisiopatologico con cui l'ipercolesterolemia contribuisce al danno endoteliale, non solo andando a danneggiare direttamente le cellule endoteliali mature, ma contrastando anche i processi di riendotelizzazione e di neoangiogenesi sostenuti dalle ECPs alterando, quindi, il naturale equilibrio tra fattori lesivi e processi riparativi.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione il colesterolo LDL interagisce con la via  $PI_3K/AKT$ . Le LDL ossidate danneggiano la differenziazione delle CEP VEGF-indotta attraverso la disattivazione dell'AKT, mediante defosforilazione (329).

Infine, per quanto riguarda la correlazione con il colesterolo HDL e con i trigliceridi, è stato osservato come i livelli plasmatici di HDL correlano positivamente con il numero delle CEP vitali, ma non con il numero dei progenitori CD34/CD133 positivi (330).

#### **d. Diabete Mellito**

L'iperglicemia, condizione caratterizzante il diabete mellito, gioca un ruolo centrale nello sviluppo della disfunzione endoteliale e nella comparsa delle lesioni aterosclerotiche, rappresentando uno dei principali fattori di rischio cardiovascolare. Questo è determinato, almeno in parte, da una riduzione del numero delle CEP (268) (331) (332), condizione che si osserva sia nel diabete di tipo 1 che in quello di tipo 2.

L'iperglicemia determina sia una riduzione delle CEP che alterazioni della funzione di tali cellule; viene, infatti, ad essere compromessa sia l'adesione, che le capacità angiogeniche delle CEP (332) (331) (333).

Riproducendo un modello in vitro, mediante la coltivazione delle CEP in un mezzo iperglicemico,

Krankel e collaboratori (334) hanno dimostrato che l'iperglicemia esercita effetti negativi attraverso vari meccanismi:

1. *Riduzione del numero delle CEP*

Dopo l'esposizione al mezzo iperglicemico, si verifica un arresto del ciclo cellulare, come dimostrato dalla netta prevalenza di CEP in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> rispetto a quelle in fase G<sub>2</sub>/M o S. Inoltre le CEP esposte all'iperglicemia mostrano, rispetto alle CEP nel mezzo di coltura fisiologico un'alterazione nell'espressione di alcuni geni regolatori dell'apoptosi.

### *2. Ridotta produzione di ossido nitrico*

L'ossido nitrico è uno tra i più potenti vasodilatatori e risulta essere un fattore chiave per la sopravvivenza dell'endotelio. La sua minor produzione, conseguente alla ridotta espressione del gene per la eNOS o a un'insufficiente fosforilazione dell'enzima stesso, si associa a un incremento dell'apoptosi delle cellule endoteliali, non adeguatamente controbilanciato da una più attiva replicazione cellulare.

Krankel e collaboratori nel loro studio hanno dimostrato che l'iperglicemia induce una maggiore espressione della PPA<sub>2</sub>, fosfatasi che inibisce sia la fosforilazione AKT-dipendente di eNOS, sia la fosforilazione della stessa Protein Kinasi-AKT (334).

Ne conseguono una minor produzione di NO, una riduzione della risposta all'incremento del VEGF ed infine nel processo angiogenetico nel diabetico (334).

### *3. Alterata capacità di migrazione e integrazione*

Numerosi studi hanno evidenziato l'incapacità delle CEP dei pazienti diabetici di invadere i tessuti bersaglio e integrarsi nella parete dei vasi in via di formazione (331) (332). Krankel e collaboratori hanno dimostrato che ciò deriva da un'insufficiente attivazione dell'enzima MMP-9, dovuta alla presenza di iperglicemia, sia indirettamente (attraverso la minor produzione di NO che, come già visto, provvede ad attivare la MMP-9 mediante nitrosilazione), sia direttamente.

Dunque, queste evidenze suggeriscono che l'iperglicemia conduca le CEP a una perdita delle loro competenze; nel diabetico, infatti, le CEP non sono in grado, né di contribuire alla riparazione dell'endotelio danneggiato, né di partecipare alla neoangiogenesi che sostiene lo sviluppo di circoli collaterali. Tutto ciò giustifica la gravità delle manifestazioni osservate nei pazienti diabetici che hanno subito eventi vascolari ischemici.

Recentemente, tuttavia, è stato dimostrato che l'infusione di PIGF (Placental Growth Factor) in topi diabetici con vasculopatia periferica aumenta di circa 6 volte la differenziazione delle CEP dal midollo osseo. Il PIGF sembra una molecola potenzialmente candidata a modulare la neoangiogenesi nei pazienti diabetici che hanno riportato eventi ischemici (335)

## **e.Farmaci**

### **e.1 Aspirina**

L'Aspirina è un farmaco che riveste un ruolo cruciale in prevenzione primaria e secondaria della patologia vascolare. Il suo effetto antiinfiammatorio e antiaggregante è legato alla riduzione della sintesi

di TXA<sub>2</sub>, attraverso inibizione irreversibile dell'enzima Ciclo-ossigenasi (COX), inibizione che si realizza attraverso una acetilazione di un residuo di serina localizzato nel sito attivo della COX.

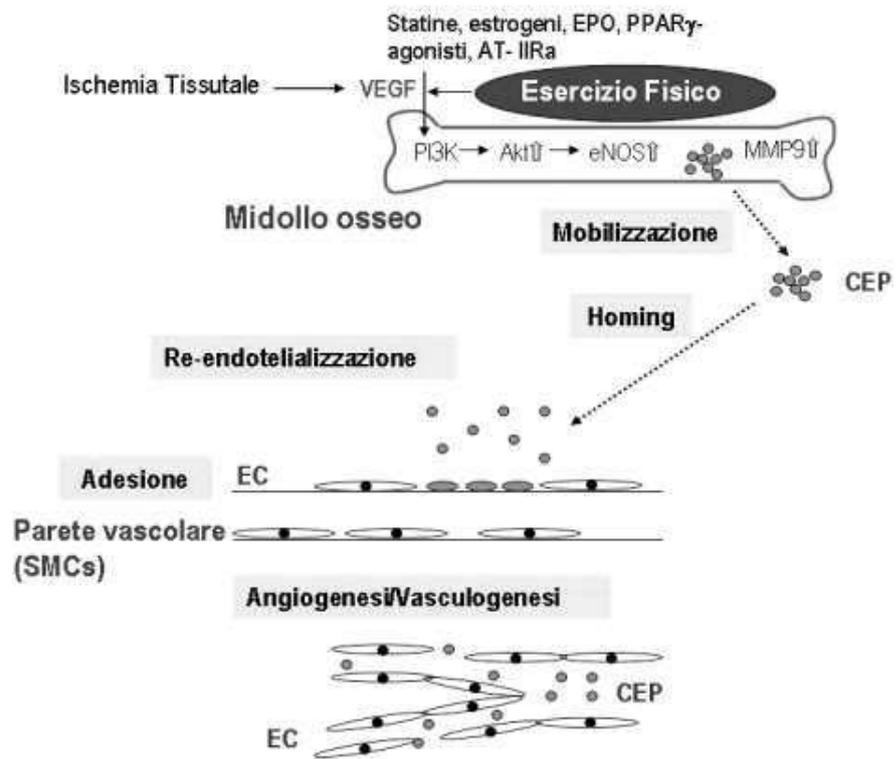
Gli effetti della somministrazione di aspirina sulle CEP sono stati studiati da Chen e collaboratori e hanno dimostrato che l'aspirina riduce il numero delle CEP, la loro funzione proliferativa, migratoria, adesiva e la capacità di angiogenesi in vitro, così come l'aspirina riduce i livelli di iNOS (Nitrossido Sintasi inducibile) in maniera tempo e concentrazione dipendente (349).

#### **f. Altri disordini**

Un numero ridotto di CEP si riscontra nei pazienti con disfunzione erettile (350), nei pazienti con stenosi intrastent (351) e nei pazienti trapiantati con vasculopatia (352). I livelli di CEP sono ridotti nei pazienti dopo stroke (353) ed in quei pazienti aterosclerotici in cui siano state riconosciute, per mezzo della PET, aree di infarto cerebrale (354); il numero delle CEP si è dimostrato correlato con il flusso sanguigno regionale in aree dell'encefalo cronicamente ipoperfuse (354).

#### ***Fattori che aumentano i livelli di CEP***

Lo stimolo ischemico rappresenta il principale meccanismo che porta alla mobilitazione delle CEP (273), tuttavia è stata dimostrata l'esistenza di altri fattori in grado di influenzare positivamente il numero e la funzione di queste cellule, quali il regolare esercizio fisico (357), la terapia con statine, con estrogeni, con rosigitazione, il trattamento con fattori di crescita come l'eritropoietina e il VEGF. Data la funzione delle CEP nei processi di riendotelizzazione e di neovascolarizzazione, questi elementi assumono una potenziale funzione terapeutica, volta a limitare gli effetti lesivi dell'ischemia e dell'aterosclerosi.



**Figura 3.5**-Fattori stimolanti la mobilizzazione, l'homing e l'adesione dell'endotelio delle CEP

### **a.Regolare esercizio fisico**

Lo svolgimento di regolare attività fisica è un elemento cruciale, sia nella prevenzione, che nel trattamento del paziente affetto da cardiopatia ischemica (355). L'attività fisica migliora la perfusione dei tessuti ischemici e potenzia la resistenza allo sforzo dei soggetti coronaropatici attraverso più meccanismi:

- Aumenta l'attività della eNOS mediante una maggiore espressione e una maggior fosforilazione dell'enzima stesso (356) (357) (358)
- Riduce lo stress ossidativo della parete dei vasi incrementando l'espressione della superossido dismutasi extracellulare (280)
- Stimola lo sviluppo di circoli collaterali (359)

Un regolare esercizio fisico correla con un miglioramento dell'umore, determina una riduzione del peso corporeo, riduce la pressione arteriosa, aumenta la sensibilità all'insulina, migliora l'assetto coagulativo e riduce gli indici di flogosi (360) (361).

In uno studio (362) è stata indagata l'influenza dell'esercizio fisico sulle ECPs, utilizzando come casi dei topi soggetti ad uno stile di vita attivo, e come controlli dei topi mantenuti in condizioni di vita sedentarie.

Le osservazioni si sono estese anche a un campione di pazienti con coronaropatia stabile che avevano seguito un programma di esercizio fisico della durata di 4 settimane. I risultati dimostrarono che l'esercizio fisico (362):

- Aumenta significativamente il numero di CEP (+34% dopo 28 giorni) sia a livello midollare che nel sangue periferico;
- Aumenta la disponibilità di VEGF, citochina essenziale per la mobilizzazione delle CEP;
- Incrementa i livelli dell'ossido nitrico di derivazione endoteliale che, come già evidenziato in precedenza, è indispensabile per la mobilizzazione delle CEP indotta dal VEGF;
- Esercita un effetto antiapoptotico sulle CEP;
- Stimola l'angiogenesi: in particolare, nei pazienti con arteriopatia periferica favorisce lo sviluppo di circoli collaterali.
- Secondo questo studio, inoltre, nei pazienti con coronaropatia ischemica stabile il quadro clinico migliora più rapidamente se il programma di esercizio viene eseguito per almeno 4 settimane. Sulla base di queste evidenze, si potrebbe ipotizzare che l'incremento delle CEP costituisce uno dei meccanismi molecolari con cui l'attività fisica realizza i suoi effetti positivi sull'apparato cardiovascolare.

### **b.Terapia con Statine**

Le statine sono una classe di farmaci che agiscono come inibitori dell'enzima 3idrossi-3metil-glutaril-CoA Reduttasi (HMG-CoA Reduttasi), che catalizza la tappa limitante nella sintesi biosintesi del colesterolo, la conversione dell' HMG-CoA in Acido Mevalonico. Le statine sono in grado di migliorare l'assetto lipidico plasmatico, determinando una riduzione del colesterolo LDL (25%-50%), un aumento del colesterolo HDL (5-9%) e una riduzione dei livelli di trigliceridi (5-30%). La percentuale di riduzione del C-LDL varia, a seconda del tipo e del dosaggio della statina utilizzata (363), fino ad una riduzione massima del 55% (364). Un'ulteriore riduzione del 20% si può ottenere associando alla statina l'ezetimibe o una resina a scambio ionico che riducono l'assorbimento intestinale del colesterolo (364). Grazie al miglioramento del profilo lipidico plasmatico prevengono lo sviluppo di nuove placche aterosclerotiche e stabilizzano le placche già presenti. Oltre a questa attività le statine esercitano il loro effetto benefico mediante altri meccanismi:

- Riducono la flogosi a livello della parete vascolare (362);
- Esercitano un effetto antiaggregante e dunque antitrombotico (275) (277) (365);
- Aumentano la produzione endoteliale di ossido nitrico (366)

È stato studiato l'effetto delle statine sulle CEP. Da uno studio condotto su un campione di pazienti con coronaropatia stabile, angiograficamente documentata, e trattati per 4 settimane con Atorvastatina al dosaggio di 40 mg/die è emerso che le statine aumentano le competenze delle CEP già dopo una settimana di terapia in misura paragonabile al VEGF. È stato indagato anche il ruolo delle statine in merito al numero di tali cellule ed è emerso che, più che aumentare numericamente la popolazione di cellule staminali ematopoietiche a livello midollare, le statine sono in grado di stimolare la differenziazione delle cellule CD34+ in CEP.

Le statine esercitano questa funzione incrementando l'attivazione della eNOS delle cellule stromali midollare attraverso la via PI<sub>3</sub>K-AKT (315); inoltre, è stato dimostrato che le statine sono in grado di ritardare l'invecchiamento delle CEP aumentando l'espressione della telomerasi (275) (276) (367).

In conclusione, dai dati presenti in letteratura emerge che le statine determinano un miglioramento clinico dei pazienti con coronaropatia non solo mediante la riduzione dei livelli di colesterolo plasmatici e la stabilizzazione delle placche aterosclerotiche, ma anche mediante un aumento quantitativo e qualitativo delle CEP.

Tutto ciò contribuirebbe a giustificare il rapido incremento del flusso coronarico misurato in pazienti con CAD stabile (368) e le minori recidive dopo infarto miocardico acuto già osservate dopo poche settimane di trattamento con statine.

### **c.Terapia con Estrogeni**

Gli estrogeni esercitano numerose azioni vasoprotettive, infatti, è noto che migliorano la funzione endoteliale, inibiscono l'iperplasia a livello della tonaca intima e accelerano il processo di riparazione dell'endotelio dopo eventi dannosi (369) (370) (371).

Non sono ancora chiari i meccanismi responsabili di questi effetti; si sa, però, che gli estrogeni aumentano la sintesi di ossido nitrico e riducono la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno, esercitando un'azione antiapoptotica sulle cellule della parete vascolare (262) (372) (373).

È stata formulata l'ipotesi che l'accelerazione del processo di riendotelizzazione indotto dagli estrogeni fosse, in parte, mediato dalle CEP (262). Uno studio condotto su topi sottoposti ad ovariectomia, seguita o meno da terapia ormonale sostitutiva, ha dimostrato che dopo l'intervento i livelli di CEP diminuiscono significativamente, sia nel midollo osseo che nel sangue periferico. Questi effetti sono completamente reversibili dopo somministrazione di estrogeni che causano un aumento dei livelli di CEP inibendo l'apoptosi attivata dalla caspasi-8. In tal modo accelerano la riparazione vascolare e prevengono l'iperplasia dell'intima.

#### **d.Terapia con Rosiglitazone**

Il Rosiglitazone è un farmaco facente parte della categoria degli agonisti del PPAR- $\gamma$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$ ), classe di farmaci utilizzati nel trattamento del Diabete Mellito di tipo 2 come insulino-sensibilizzanti.

È emerso che i PPAR- $\gamma$ -agonisti migliorano la funzione endoteliale anche altri meccanismi che sono indipendenti dal controllo glicemico (374): determinano, infatti, una riduzione della spessore della parete vascolare, abbassano i livelli plasmatici della PCR (375) e inibiscono l'iperplasia dell'intima dopo interventi di angioplastica su modelli animali diabetici e non diabetici (336) (376).

Dunque, oltre a ridurre il glucosio nel diabete, questi farmaci possono anche proteggere contro l'iperlipidemia e l'aterosclerosi.

Questa famiglia di farmaci sembra in grado di ridurre gli eventi totale di morte cardiovascolare e di altri eventi non fatali, anche se sono necessari studi conclusivi RCT in doppio cieco con grandi campioni per valutare l'efficacia e la sicurezza dei PPAR- $\gamma$ -agonisti nella prevenzione secondaria dello stroke e di altri eventi vascolari correlati (377).

Sono stati inoltre indagati gli effetti del Rosiglitazone sulle CEP di un campione di pazienti affetti da Diabete Mellito di tipo II, che già di per sé presentano una funzionalità e un numero ridotto di tali cellule. In questo studio è emerso che il trattamento con Rosiglitazone della durata di 12 settimane aumenta il numero e la funzione delle CEP indipendentemente dal controllo glicemico: nel corso dello studio, infatti, i livelli di emoglobina glicata, parametro utilizzato per valutare il livello di glicemia medio nel corso dei 2-3 mesi antecedenti al prelievo, si è mantenuta fundamentalmente invariata.

Sembra che il Rosiglitazone, in maniera analoga alle statine e ad altri mediatori endogeni ed esogeni, promuova i suoi effetti sulle CEP aumentando la disponibilità di ossido nitrico attraverso la via  $PI_3K$ -AKT (333).

## 5 Cellule Endoteliali Circolanti (CEC)

### 5.1 Definizione, origine e ruolo

#### 5.1.1 Definizione delle CEC

Come già sottolineato in precedenza l'endotelio si colloca in una posizione strategica: tra il torrente ematico e i tessuti, questa localizzazione rende tali cellule esposte a mediatori chimici circolanti e a stimoli biomeccanici; questi stessi possono essere responsabili della transizione da un fenotipo quiescente a un fenotipo attivato. È ormai riconosciuto che la perdita dell'integrità e della funzione dell'endotelio rappresenta un meccanismo essenziale nell'avvio e nello sviluppo delle malattie cardiovascolari (378).

L'esplorazione della funzione endoteliale negli ultimi anni è stata oggetto di un crescente interesse. Sono stati evidenziati e studiati una serie di test funzionali e di marcatori surrogati di danno endoteliale. Fra i test funzionali sono stati indagati aspetti quali la vasodilatazione endotelio-dipendente, la rigidità arteriosa e la propagazione dell'onda sfigmica (379). Sono stati anche studiati marcatori circolanti della risposta infiammatoria, dell'attivazione della coagulazione e della permeabilità, tuttavia i risultati sono stati deludenti a causa della scarsa specificità.

Successivamente è stato evidenziato un terzo gruppo di marcatori cellulari, corrispondente ai progenitori delle cellule endoteliali (CEP), alle cellule endoteliali circolanti (Circulating endothelial cells-CECs) e alle microparticelle endotelio derivate (Endothelial microparticles-EMPs) rilasciate dai vasi lesi nella circolazione ematica.

Le CEC sono state descritte per la prima volta più di 30 anni fa da Bouvier e Hladovec con tecniche quali la microscopia ottica vitale, la colorazione Giemsa e la separazione su gradiente di densità (380) (381)

(382) (383) e l'identificazione sulla base delle differenze morfologiche rispetto ad altri sottogruppi cellulari presenti nel sangue.

Successivamente sono emersi altri approcci per isolare le CEC, in particolare attraverso l'uso della citometria a flusso che sfrutta marcatori di superficie. Uno di questi marcatori utilizzato è S-endol o CD146 (384) (385).

#### *Origine delle CEC*

Per distinguere la possibile origine ematopoietica o vascolare delle CEC Linet e collaboratori (386) hanno studiato le CEC nel midollo osseo di pazienti trapiantati con un trapianto non genere corrispondente dove, per più di 5 mesi dopo il trapianto, più del 95% delle CEC erano ancora di origine

del ricevente. L'isolamento e la coltivazione delle CEC circolanti ha messo in evidenza che le CEC del ricevente presentavano una capacità di proliferazione più bassa delle cellule endoteliali circolanti derivate dal midollo osseo del donatore, elemento che indica che le CEC mature originano dalla parete vascolare al contrario delle CEP, che, invece, sono rilasciate in circolo dal midollo osseo.

### ***Ruolo delle CEC***

È stato dimostrato che le CEC sono presenti sia in condizioni normali che in condizioni patologiche, tuttavia nelle condizioni patologiche il loro numero è aumentato (387).

In modelli animali di shock indotto con un trattamento con endotossina il numero delle CEC risulta significativamente aumentato (382).

Gli studi sull'uomo hanno evidenziato l'aumento delle CEC nei pazienti affetti da infarto miocardico acuto e in soggetti con ipertensione arteriosa (381).

Blann e collaboratori hanno dimostrato che le CEC sono delle cellule mature che vengono riversate dalla parete vascolare nel torrente ematico in risposta al danno (387) vascolare.

Tutto questo suggerisce che il numero delle CEC potrebbe essere utilizzato in futuro come indicatore della gravità della malattia vascolare.

Lo studio di tali cellule, del loro ruolo e significato, rappresenta un importante obiettivo per riuscire a stratificare al meglio il rischio vascolare del paziente e potrebbe rappresentare un potenziale target terapeutico (388) nel prossimo futuro.

Le CEC presentano una dimensione eterogenea (compresa tra 10 e 50  $\mu\text{m}$ ) ed esprimono alcuni marcatori endoteliali, quali il vWF, il CD31 e il CD144, mentre risultano negative per i marcatori leucocitari.

A differenza delle CEP non esprimono il CD133 e non sono in grado di formare colonie ad alto potenziale proliferativo (388). A causa dell'esigua presenza delle CEC nel sangue periferico, un passo decisivo per la loro identificazione è stato lo sviluppo di tecniche di immunomarcatura con anticorpi monoclonali diretti contro antigeni endoteliali (389). Nei primi anni '90 si sono resi disponibili marcatori più specifici per le cellule endoteliali (390) (391); quali gli anticorpi in grado di riconoscere l'antigene CD146, molecola intimamente coinvolta nella formazione del citoscheletro e del signaling della cellula endoteliale. La combinazione della tecnica di marcatura con anticorpi CD146 e della tecnica di separazione immuno-magnetica (IMS) consente la caratterizzazione immunologica delle CEC nel sangue periferico dei pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica. George e collaboratori (384) hanno evidenziato il marcato incremento del numero delle CEC dopo angioplastica verosimilmente conseguenza del trauma endoteliale innescato dalla procedura di angioplastica. Successivamente,

utilizzando sempre la tecnica di separazione immuno-magnetica è stato messo in luce l'aumento delle CEC in un'ampia varietà di condizioni cliniche: dalla rickettsiosi (392) (393) alle sindromi coronariche acute (394). Nel 2001 Solovey e collaboratori, utilizzando un altro anticorpo monoclonale (P1H12) diretto contro CD146 hanno documentato l'aumento dei livelli delle CEC nell'anemia falciforme; mentre Mancuso e collaboratori (395) hanno descritto l'aumento delle CEC nel sangue periferico dei pazienti con patologia neoplastica.

### **Caratterizzazione funzionale e fenotipica delle CEC**

Nonostante la mancanza di un chiaro consenso sull'identificazione fenotipica le CEC sono generalmente definite CEC le cellule che esprimono alcuni marcatori endoteliali (vWF, CD146 e VE-caderina) in assenza di marcatori tipici delle cellule ematopoietiche (CD145, CD14) e in assenza dei marcatori tipici delle cellule progenitrici (CD133).

Il CD146, molecola di adesione delle cellule del peso di 113kDa che agisce come recettore per la laminina  $\alpha 4$ , come già sottolineato, è ampiamente considerato l'indicatore principale per le CEC, nonostante sia stato descritto anche in tromboplasti, cellule staminali mesenchimali, parodonto e su cellule neoplastiche (cancro prostatico e melanoma) (396).

### ***Tecniche di identificazione delle CEC***

#### **Immuno-Magnetic Separation (IMS)**

La separazione immunomagnetica è una tecnica che isola cellule endoteliali dalle altre cellule utilizzando anticorpi anti-endotelio legati a particelle paramagnetiche.

Vengono poi valutate dal punto di vista quantitativo dopo aver effettuato una colorazione con acridina. Questa metodica combina una prima fase di arricchimento, utilizzando microsferi magnetiche rivestite con anticorpi diretti verso il CD146 e una seconda fase di numerazione delle cellule, effettuata secondo criteri selezionati, utilizzando la microscopia a fluorescenza dopo colorazione con acridina o con il "endothelial specific Ulex europaeus agglutinin 1 lectin".

L'isolamento immuno-magnetico fornisce un numero esiguo di CEC (da 0 a 10 cellule/ml nel soggetto sano) (397) per almeno due motivazioni:

1. Lo strato di cellule endoteliali che tappezzano l'interno dei vasi ematici va incontro ad un tasso di replicazione basso, pari a circa lo 0-1% die, con la proliferazione cellulare che risulta limitata a livello dei siti di ramificazione (398) dove il flusso tende a diventare turbolento. È stato documentato, infatti, che il flusso laminare è in grado di sopprimere l'apoptosi endoteliale (399);
2. Il numero di CEC è molto variabile in funzione dell'organo considerato.

Dati sperimentali dimostrano che non vi è alcuna differenza fra l'analizzare le CEC a livello di un prelievo venoso oppure arterioso (391) (400).

Fra le accortezze che si devono avere per ottenere una misura accurata delle CEC sicuramente è importante scartare la prima provetta di sangue prelevata al fine di evitare falsi positivi causati da un prelievo venoso traumatico.

L'aggiunta di albumina o EDTA rappresenta un ulteriore passo per ridurre al minimo il legame non specifico fra le CEC e l'anti-CD 146 e le microsfele magnetiche.

È chiaro che il legame degli anticorpi al CD146 avviene tramite la porzione Fc pertanto vengono aggiunti agenti Fc-bloccanti per ridurre il numero di legami aspecifici.

I primi studi sono stati condotti utilizzando un solo colorante fluorescente (acridina).

Con il passare del tempo, tuttavia, è emersa la necessità di utilizzare un secondo colorante in quanto i linfociti attivati e altri sottotipi di cellule possono, almeno in certe condizioni, esprimere il CD146. Sono stati studiati molti antigeni endoteliali come possibili marcatori secondari e alla fine sono stati esclusi quelli che mancavano di specificità quali: CD31, CD62a, CD54, CD105, CD106, CD141 e Fattore Tissutale. Anche i biomarcatori, la trombomodulina o il vWF, necessitano di un processo multi-step poco maneggevole che non risulta utilizzabile in ambito clinico. Ulex Europaeus lectin 1 (UEA-1) è stata a lungo utilizzata come colorante delle cellule endoteliali. La positività della UEA-1 si presenta stabile a livello delle cellule endoteliali in molte condizioni. Ad esempio, l'endotelio che riveste i sinusoidi epatici si mantiene UEA-1 positivo anche quando l'espressione del vWF risulta essere ridotta o assente (401). Risultati simili sono stati riscontrati anche a livello delle cellule endoteliali nei vasi presenti in neoplasie della tiroide.

### ***Fenotipo delle CEC***

Nonostante la cospicua letteratura sull'argomento ancora alcuni Autori (419) sottolineano come ci siano degli aspetti non del tutto chiariti relativamente al fenotipo delle CEC. Recenti studi hanno infatti mostrato che la popolazione cellulare delle CEC, descritta in letteratura è apoptotica e può essere costituita da vescicole extracellulari (420).

Per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche abbiamo già detto in precedenza che le CEC sono delle cellule nucleate della dimensione compresa fra i 10-50µm. Le dimensioni delle CEC si estendono su un ampio ventaglio di possibilità, può trattarsi, infatti, di conglomerati cellulari multinucleati oppure di cellule endoteliali intere, fino a microparticelle endoteliali.

Il quadro è ancora più complesso in quanto il fenotipo delle CEC differisce notevolmente nell'ambito delle varie condizioni cliniche (421). Le cellule endoteliali intatte sono state isolate nei pazienti con Sindrome Coronarica Acuta (SCA), mentre nella rickettsiosi e nelle vasculiti le cellule isolate risultano

gravemente danneggiate e necrotiche (400). Le cellule endoteliali intatte hanno delle dimensioni che solitamente si collocano tra i 10 e 70 $\mu$ m, anche se in letteratura sono state descritte anche cellule giganti in corso di infezione da Citomegalovirus (422).

### *Apparato cardiovascolare e CEC*

Le cellule endoteliali circolanti si distaccano a partire dalla parete del vaso e si portano nel torrente ematico. Il processo attraverso il quale la cellula endoteliale si distacca dalla sua membrana basale può essere favorito da molti fattori: il danno meccanico sulla parete vascolare, come quello che si osserva dopo prelievo arterioso o venoso, il posizionamento di uno stent a livello coronarico e la rottura acuta di placca, può causare uno stress tale da poter favorire il distacco della cellula (433). Inoltre, anche una risposta infiammatoria protratta e la presenza dei radicali liberi dell'ossigeno in associazione all'azione di citochine e di proteasi tissutali può determinare un danno all'integrità di molecole fondamentali per l'adesione dell'endotelio alla membrana basale, quali le integrine e le caderine (434) (435). Anche alcuni farmaci possono favorire il distacco delle cellule endoteliali, per esempio gli inibitori della calcineurina e la ciclosporina A (436). Un ulteriore motivo per il quale le cellule endoteliali si distaccano dalla parete vascolare è rappresentato dalla fase apoptotica. Fino al 10% delle CEC può essere rappresentato da cellule che hanno intrapreso il processo apoptotico, con evidente presenza di frammentazione del DNA nucleare (394).

Nonostante i meccanismi che sottendono il rilascio delle CEC siano sempre più chiari, rimane da studiare meglio se le CEC presentino delle funzioni biologiche intrinseche e se possano, in qualche modo, favorire la trombosi e l'emostasi (419).

Le CEC andate incontro ad apoptosi e le microparticelle endoteliali promuovono la generazione di trombina e mantengono l'attività procoagulante intrinseca attraverso l'espressione sulla loro membrana plasmatica della fosfatidilserina, il rilascio di trombossano A<sub>2</sub> e la soppressione di molecole effettrici ad attività anticoagulante (437) (438) (439) (440) (441).

Un altro meccanismo suggerito è la perdita dell'espressione di ECPR ( Endothelial Cell Protein Receptor) da parte di queste cellule e di conseguenza l'impedimento dell'inibizione dell'attivazione endoteliale indotta dall'associazione trombomodulina-proteina C (406).

L'aumento dei livelli di CEC è stato dimostrato correlare con altri indicatori di danno e di disfunzione endoteliale: l'aumento della conta delle CEC nel paziente con patologia cerebro- e/o cardiovascolare è associato a un incremento dei livelli di alcuni marcatori quali von Willebrand Factor (vWF), IL-6, attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), fattore tissutale, trombomodulina solubile e E-selectina solubile (sCD62E) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449).

Inoltre, Galo e collaboratori (450) hanno proposto una correlazione tra la conta delle CEC e lo spessore medio-intimale delle carotidi. Tuttavia, nello studio precedentemente citato, le CEC sono state contate in pazienti con evento cerebrovascolare acuto entro le 48 ore dall'ingresso in ospedale, ed è probabile alcune delle CEC rilevate fossero la conseguenza del progresso evento.

Livelli di CEC elevati sono stati riscontrati elevati anche nell'infarto miocardico (442) (417) (451) (452). Wang e collaboratori (451), utilizzando sfere immunomagnetiche rivestite con anticorpi contro ilCD146, hanno isolato le CEC in 37 pazienti con infarto miocardico acuto e in 42 controlli indagando l'esistenza di una correlazione tra la PCR e le CEC. I risultati dello studio hanno dimostrato un incremento significativo delle CEC nei pazienti rispetto ai controlli e l'esistenza di una correlazione positiva tra il livello di PCR e la conta di CEC in pazienti con infarto miocardico acuto.

La relazione esistente tra le CEC e il rischio di eventi cardiovascolari futuri è già stata ampiamente documentata in Letteratura.

La conta delle CEC e la loro associazione con gli eventi cardiovascolari maggiori (Major Adverse Cardiac Events, MACE) e la morte per eventi cardioscolari è stata valutata su studi di coorti prospettici relativi alle sindromi coronariche acute.

In uno studio è stato valutato il ruolo delle CEC, del vWF e dell'IL-6 come indicatori della prognosi del paziente con sindrome coronarica acuta (447). Lo studio ha coinvolto 156 pazienti ai quali è stato effettuato un prelievo ematico al momento del ricovero e 48 ore più tardi. Ad un follow-up a 30 giorni e a 1 anno sono stati valutati i seguenti end points: morte cardiovascolare, infarto miocardico non fatale, angina refrattaria con alterazioni del tratto ST-T richiedente l'ospedalizzazione o una rivascolarizzazione coronarica urgente. I risultati dello studio hanno dimostrato che i livelli di CEC a 48 ore erano il più forte predittore di eventi cardiaci maggiori e l'unico predittore indipendente di morte a 30 giorni e a 1 anno.

È stato osservato come un numero elevato di CEC nel paziente con SCA sia associato a un elevato punteggio ottenuto utilizzando le seguenti scale: TIMI, PURSUIT e GRACE (444).

Al contrario che nelle SCA, nei pazienti con CAD stabile non è stato possibile osservare alcuna differenza nel numero delle CEC rispetto ai soggetti di controllo (444).

Oltre al loro possibile utilizzo come marker prognostici nelle sindromi coronariche acute (SCA), la conta delle CEC correla con la gravità della SCA, aumentando gradualmente da un quadro di angina instabile a STEMI, passando per NSTEMI (419). Altri Autori non hanno evidenziato alcuna associazione tra la conta delle CEC e lo STEMI (453). Come sottolineato da Schmidt e collaboratori questo risultato è verosimilmente la conseguenza di set diversi di marcatori utilizzati per identificare le CEC, che non includono il CD146 che viene utilizzato tradizionalmente.

È stato osservato che il numero delle CEC diminuisce gradualmente con il passare del tempo intercorso dall'evento vascolare, come evidenziato dagli studi condotti in pazienti con SCA, a cui venivano

effettuati prelievi seriali di sangue venoso periferico (454), (455) (456). Questo elemento rappresenta un ulteriore importante variabile che spiega i diversi livelli di CEC riscontrati nei diversi studi (419).

Oltre che nell'infarto miocardico elevati livelli di CEC sono stati documentati anche in altre patologie a carico dello stesso organo come lo scompenso cardiaco (457).

Nel paziente iperteso l'aumento della conta delle CEC correla debolmente con il punteggio ottenuto con il Pockock scores, uno score utilizzato per identificare il rischio di morte a 5 anni (458).

È stato suggerito che l'uso combinato della quantificazione delle CEC con la misurazione dei livelli di troponina cardiaca possa migliorare l'accuratezza diagnostica in tali pazienti (459).

Quilici J e collaboratori hanno riscontrato una sensibilità della conta delle CEC nella diagnosi di NSTEMI leggermente più bassa rispetto alla Troponina I (53% rispetto al 63%) (460), con una specificità per entrambi pari al 100%. Il valore diagnostico delle CEC in individui sani potrebbe essere stato sottovalutato in questo studio, in quanto la popolazione di controllo era costituita da pazienti sottoposti a controlli pre-operatori prima di sostituzione valvolare, una condizione associata a disfunzione endoteliale, che potrebbe aver influenzato i conteggi delle CEC (461). In considerazione della limitata sensibilità di questo parametro, nello studio citato (459), l'aumento delle CEC ha un valore predittivo positivo (PPV) del 100% e un elevato valore predittivo negativo (NPV) del 59%.

Questo potenziale ruolo diagnostico delle CEC è supportato da un PPV del 91% e da un NPV del 54% nei pazienti STEMI/NSTEMI (462), e da un PPV del 71% e un NPV del 65% nei pazienti con angina instabile. Un aumento della conta delle CEC è quindi altamente indicativa di un quadro di SCA, mentre un numero molto ridotto di CEC non può essere utilizzato come un criterio diagnostico di esclusione (419).

Nei pazienti con NSTEMI, la conta delle CEC alla dimissione, dopo 4 ore e dopo 8 ore ha un valore diagnostico rispettivamente superiore, analogo e inferiore rispetto alla troponina (419).

L'elevata specificità delle CEC nelle popolazioni studiate rende la quantificazione delle cellule endoteliali circolanti un interessante test da utilizzare nell'algoritmo diagnostico delle SCA. Alla dimissione del paziente fornisce un valore prognostico migliore rispetto alla troponina, tuttavia questi risultati necessitano di essere confermati su una popolazione più ampia. Inoltre rimane una sfida ancora aperta quella di cercare di sviluppare test che siano più rapidi e semplici da utilizzare per una quantificazione clinicamente applicabile delle cellule endoteliali circolanti (419).

### **Fattori che influenzano il numero e la funzione delle CEC**

Oltre che nella SCA, è stato osservato in diversi studi che la conta delle CEC nel sangue periferico può essere aumentata in molte patologie non di natura cardiovascolare, come quadri di sepsi, infezioni, ma

anche patologie reumatologiche, come ad esempio nella Sclerosi Sistemica e disturbi ematologici (406) (388).

Anche l'esercizio fisico può determinare un aumento dei marcatori di stress endoteliale, inclusa un aumento della conta delle CEC (446). Un analogo incremento può essere riscontrato durante il ciclo mestruale, come possibile espressione del rimodellamento vascolare in corso di proliferazione e secrezione dell'endometrio (395).

Nel paziente con Diabete Mellito di tipo 2 la conta delle CEC risulta essere aumentata rispetto ai soggetti di controllo, tuttavia, il loro numero potrebbe essere correlato con i livelli di concentrazione di HbA1c o con la glicemia (463)

La presenza di lesioni neoplastiche può influenzare la conta delle CEC più probabilmente per l'angiogenesi neoplasia-associata e il rimodellamento vascolare che si verifica nell'organo coinvolto (407) (395). Le CEC aumentano di almeno 5 volte rispetto ai soggetti di controllo nei pazienti con neoplasia mammaria e linfoma.

Per quanto riguarda le CEC nei tumori, ci sono ancora problemi aperti, ad esempio è necessario chiarire se tali cellule siano di origine neoplastica o "normale"; infatti il marcatore CD146, oltre che in altri tipi di cellule è stato descritto anche nei tessuti maligni (464) (465), rendendo necessaria della cautela nell'interpretazione di questi dati nei pazienti oncologici.

Poichè la conta delle CEC è influenzata dalle terapie anti-angiogeniche (466) è stato proposto di utilizzare questo parametro per valutare la risposta al trattamento.

## 6 Materiali e Metodi

### *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)*

La citometria a flusso rappresenta un ulteriore interessante approccio per isolare e contare le CEC (402) (403) (404) (405) (395). In generale la citometria a flusso multi-parametrica è utilizzata per rilevare le cellule endoteliali e distinguere queste ultime da altre cellule che presentano una sovrapposizione di antigeni. Per esempio, il CD146 espresso dalle cellule T attivate può essere distinto dal CD146 espresso sulle cellule endoteliali attraverso una co-colorazione con CD45 e/o CD3.

A differenza della metodica di isolamento immuno-magnetico, con la metodica FACS non è possibile ottenere la caratterizzazione del fenotipo cellulare.

Sono state osservate differenze significative sulla conta delle CEC a seconda se si utilizzi la metodica FACS o la metodica IMS. Dal punto di vista quantitativo attraverso la FACS il numero di CEC riscontrate può andare da 0 a 39.100/ml in un paziente con malattie vascolari e da 0 a 7900/mL in un soggetto sano. È da sottolineare come tutti i ricercatori utilizzando la metodica IMS riscontrino un numero di cellule che rientra tra 0 a 10 cellule/ml di sangue nel soggetto sano, mentre se viene utilizzata la FACS il numero trovato si colloca nell'ordine delle migliaia con un ampio range di variabilità (406).

Questa notevole differenza è verosimilmente da attribuire alle differenze metodologiche fra IMS e FACS. D'altra parte anche nell'ambito della stessa metodica FACS possono emergere delle differenze in relazione ai diversi protocolli utilizzati (397).

La citometria a flusso è stata la metodica più utilizzata per rilevare le CEC nei pazienti oncologici (407). Nonostante un tentativo di standardizzazione proposto da Duda (408) i valori normali delle CEC rilevati con citometria a flusso risultano essere molto eterogenei e circa da 100 a 1000 volte superiori rispetto a quelli riscontrati con IMS. Più recentemente sono stati proposti metodi ibridi che combinano arricchimento delle CEC mediante l'utilizzo di particelle paramagnetiche rivestite con anticorpi monoclonali anti-CD146 seguita da individuazione multiparametrica delle CEC mediante citometria di flusso o analisi di immagine (409) (410). Con queste metodiche la conta delle CEC in individui sani risulta essere nello stesso ordine di grandezza di quella trovata dalla metodica IMS.

È stato, inoltre, messo a punto un protocollo di citometria a flusso a 4 colori per valutare le CEC e le CEP in pazienti affetti da neoplasia (411) (412) (413).

In questi studi le CEC quiescenti sono state definite come negative per il marcatore leucocitario CD45, positive per i marcatori endoteliali P1H12, CD31, negative per il CD105 e CD106, e negative per il CD133.

Le CEC attivate sono risultate essere CD45-, P1H12+, CD31+, CD34+, CD105+, CD106+ e CD133- (413).

È necessario, inoltre, sottolineare come l'espressione dei marcatori di superficie delle CEC è influenzato dalla loro origine e questo aspetto può essere sfruttato per definire la provenienza di tali cellule. Ad esempio le cellule endoteliali presenti nel microcircolo esprimono il CD36 al contrario delle cellule endoteliali che tappezzano i grandi vasi (414). Quindi un cambiamento nel rapporto tra cellule CD36+ e CD36- indica uno cambiamento della loro origine o dal macro o dal microcircolo (415). Nei pazienti con infarto del miocardio e nei pazienti con scompenso cardiaco meno del 10% delle CEC sono CD36+, indicando una prevalente origine delle CEC dal macrocircolo (416) (417). D'altra parte va ricordato come alcune cellule endoteliali microvascolari possono essere CD36- (418).

### ***Raccolta dell'anamnesi ed esame obiettivo***

La raccolta delle informazioni, relative al partecipante, è stata effettuata al domicilio del partecipante e, poiché le persone anziane tendono a stancarsi facilmente, tutte le informazioni necessarie sono state raccolte entro la prima ora e l'esame obiettivo doveva essere completato in massimo due ore.

Prima di iniziare l'intervista (riportata nell'Appendice) è stato effettuato al partecipante un test per valutare il livello cognitivo (Mini Mental State Examination, MMSE) (225), utilizzando la prima parte del MMSE, che valuta l'orientamento spazio-temporale, per accertare l'eventuale necessità di delega per firmare il consenso informato e per rispondere all'intervista. In particolare, è stata necessaria una delega se il punteggio, raggiunto nel test di orientamento spazio-temporale a dieci voci, fosse stato inferiore a sei e se i partecipanti avessero mostrato un deficit sensoriale rilevante o fossero affetti da grave patologia.

In un secondo momento è stato somministrato il "Clock Drawing test" (468) e la seconda parte del MMSE (225).

L'MMSE (225) consente di distinguere in modo rapido i pazienti affetti o meno da demenza, e può quindi dare una panoramica generale delle capacità cognitive del soggetto in esame. È un test di screening composto da dodici voci tramite le quali vengono esplorate sette funzioni cognitive: orientamento temporale, orientamento spaziale, memoria immediata, attenzione e calcolo, memoria di richiamo, linguaggio, prassia visuo-costruttiva. Il punteggio minimo è uguale a zero, mentre il punteggio massimo è 30, il cut-off è 24.

Il grado di istruzione e l'età influenzano l'MMSE, è possibile correggere il punteggio utilizzando coefficienti di correzione che prendono in considerazione queste variabili.

I risultati di questo studio sono stati analizzati utilizzando il punteggio MMSE grezzo, in quanto non esistono coefficienti di correzione validati per la popolazione ultranonagenaria e utilizzato come cut-off 24.

All'inizio dell'intervista, oltre che i dati anagrafici del partecipante, sono state raccolte informazioni sulle condizioni sociali e sull'istruzione, sulla funzione visiva e uditiva e sulla mobilità del soggetto. Per i partecipanti non istituzionalizzati è stata indagata anche la composizione del nucleo familiare e la presenza di eventuali conviventi non familiari.

Relativamente all'anamnesi familiare è stata indagata la familiarità per patologie cardiovascolari, cerebrovascolari, malattie respiratorie, neoplasie e demenza.

Sono state raccolte informazioni inerenti all'attività lavorativa effettuata dal partecipante ed eventuali hobbies o sport. I dati relativi all'occupazione del soggetto e le eventuali patologie lavoro-correlate sono state ottenute utilizzando test specifici (469).

È stata indagata l'eventuale esposizione tabagica, indicando, se il soggetto fosse stato un fumatore in atto o pregresso, il numero di sigarette/die e la durata in anni dell'esposizione.

Sono state, inoltre, raccolte informazioni relative all'alimentazione, indicando in particolare eventuali modificazioni dell'appetito verificatesi nell'arco degli ultimi 3 mesi.

L'aderenza alla Dieta Mediterranea è stata valutata utilizzando una scala specifica riportata in letteratura (470).

Le informazioni relative all'anamnesi prossima e remota sono state ottenute utilizzando un questionario semi-strutturato che ha indagato le condizioni mediche dei partecipanti.

Sono state indagate la presenza di patologie cardiovascolari quali infarto del miocardio, insufficienza cardiaca congestizia, malattia vascolare periferica, ipertensione e dislipidemia. È stato, inoltre, valutato se il soggetto presentasse delle patologie neurologiche con particolare riferimento alla presenza di demenza, di malattia cerebrovascolare e di emiplegia. È stata indagata la presenza di malattia polmonare cronica, la presenza di malattie del tessuto connettivo e di malattia renale moderata o grave. Fra le patologie gastroenterologiche è stato chiesto se il soggetto fosse affetto o meno da ulcera peptica, epatopatia lieve o moderata-grave. Nell'ambito delle patologie endocrine è stato raccolto il dato relativo alla presenza di diabete mellito, distinguendo due gruppi: i soggetti con diabete senza danno d'organo e i soggetti con diabete con danno d'organo. Inoltre, è stata raccolta l'informazione relativa alle malattie oncologiche, quali neoplasie solide, neoplasie del sistema emolinfopoietico e metastasi.

È stato chiesto, inoltre, se fosse presente incontinenza urinaria da sforzo o da urgenza ed è stata raccolta l'informazione riguardo la presenza di incontinenza fecale.

Inoltre, è stato chiesto se il soggetto presentasse intolleranze o allergie sia a cibi che farmaci.

Per i partecipanti di sesso femminile è stata raccolta anche l'anamnesi ginecologica, indagando il numero di gravidanze a termine, di interruzioni di gravidanza, l'età del menarca e della menopausa.

Inoltre, sono stati annotati eventuali eventi traumatici ed interventi di chirurgia maggiore riportando la data del ricovero. Sono stati registrati, anche, i ricoveri ospedalieri, le visite specialistiche, visite del Medico di Medicina Generale e trattamenti odontoiatrici effettuati negli ultimi 12 mesi.

È stato preso nota della terapia farmacologica effettuata dal partecipante, riportando nella scheda di raccolta dati sia il tipo di farmaco che la durata del trattamento.

Sono stati indagati, inoltre, altri elementi geriatrici specifici, come l'indipendenza funzionale, il livello di attività fisica, la qualità della vita, il tono dell'umore, la qualità del sonno e l'eventuale storia di cadute accidentali.

Sono state valutate, durante l'esame obiettivo, anche alcune misure antropometriche come il peso, l'altezza, la lunghezza dell'ulna, la lunghezza degli arti inferiori, misurata nel punto di minore lunghezza, ovvero dalla spina iliaca anteriore superiore al malleolo interno, la circonferenza addominale, del bacino, della coscia e dell'anca.

Successivamente è stato calcolato l'indice di massa corporea (IMC) di ciascun soggetto dividendo il peso espresso in Kg per il quadrato dell'altezza espressa in metri.

La composizione corporea è stata valutata utilizzando, sia le pieghe cutanee tricipitali di entrambi i lati e quelle sovra-scapolari (Pinza, Metrica, Milano, Italia), sia la valutazione della impedenza corporea (BIA).

La misurazione delle pliche cutanee è stata effettuata sul lato sinistro del corpo, ripetendo almeno tre volte la misurazione e riportando il valore medio per ciascun soggetto.

La valutazione del livello di autonomia del soggetto è stata effettuata utilizzando una scala comprendente le voci presenti nel "Five-items Basic ADL score (53)" e nel "Lawton-Brody questionnaire" (52) che indaga le attività strumentali della vita quotidiana (I-ADL).

In particolare è stato chiesto il livello di difficoltà presentato dal soggetto nelle seguenti attività:

1. Mangiare;
2. Vestirsi;
3. Lavarsi la faccia, denti, farsi la barba, pettinarsi;
4. Farsi il bagno o la doccia;
5. Utilizzare il bagno;
6. Salire e scendere le scale;
7. Spostarsi dalla sedia al letto e viceversa;
8. Spostarsi per le stanze;
9. Camminare in piano;
10. Usare il telefono;
11. Fare la spesa quotidiana;
12. Cucinare un pasto caldo;

13. Effettuare lavori domestici leggeri come spolverare, lavare i piatti, rifare il letto;
14. Effettuare lavori domestici pesanti come lavare i pavimenti e spostare i mobili;
15. Fare il bucato;
16. Usare i mezzi pubblici;
17. Assumere correttamente la terapia farmacologica;
18. Maneggiare e fare uso del denaro.

Per ciascuna azione il soggetto partecipante è stato invitato a rispondere scegliendo fra le seguenti opzioni: nessuna difficoltà, con difficoltà ma senza aiuto, con aiuto per parte dell'azione, aiuto totale, potrebbe farlo autonomamente ma non lo fa per abitudine o altro.

È stato considerato autonomo (punteggio pari a 0) nella specifica attività chi ha riferito di essere in grado di svolgere autonomamente l'azione, pur se con difficoltà, mentre è stato considerato non autonomo (punteggio pari a 1) chi ha riferito di necessitare di aiuto anche se per solo parte dell'azione.

Il punteggio totale di questa scala è stato ottenuto sommando i punteggi assegnati ad ogni specifica attività e va da un punteggio minimo di 0 a un punteggio massimo di 18. I soggetti che hanno ottenuto il punteggio minimo è risultato essere autonomo in tutte le attività considerate, mentre chi ha ottenuto il punteggio massimo è risultato essere non autonomo in nessuna delle attività prese in considerazione.

I soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi in accordo con i terzili di distribuzione:

- Da 0 a 3 (soggetti autonomi): comprende i partecipanti che sono risultati non autonomi in massimo tre azioni considerate;
- Da 4 a 13 (soggetti parzialmente autonomi): comprende i partecipanti che sono risultati essere non autonomi in minimo quattro e massimo tredici attività esaminate;
- Maggiore di 13 (soggetti non autonomi): comprende i partecipanti che sono risultati essere non autonomi in minimo quattordici e massimo diciotto azioni valutate.

Nella valutazione del livello di autonomia non è stata considerata la voce "continenza" presente nel "Katz questionnaire" (51).

Il livello di attività fisica dei partecipanti nell'anno precedente la visita è stato valutato utilizzando un questionario sul modello del "Harvard Alumni Questionnaire" adattato ai soggetti italiani (471).

La qualità della vita è stata valutata utilizzando il SF-12 (472), versione sintetica del "Short Form 36-item questionnaire Health Survey (SF-36) (473). L'umore è stato stimato utilizzando un questionario di screening della depressione validato per la popolazione geriatrica, il "15-item Geriatric Depression Scale (GDS)" (232).

Si tratta di una scala composta da 15 voci che prevedono una risposta di tipo binario (si/no), elemento che rende più semplice l'utilizzo di questo strumento. Nella GDS non vengono presi in considerazione i sintomi somatici e psicotici della depressione. Il punteggio varia da 0 (non depresso) a 15 (massima gravità della depressione).

Tale scala non è stata somministrata se il soggetto partecipante avesse ottenuto un punteggio MMSE inferiore a 14.

In accordo con i terzili di distribuzione sono stati distinti tre gruppi in base al punteggio ottenuto:

- Da 0 a 2, identifica i soggetti non affetti da alterazioni del tono dell'umore;
- Da 3 a 6, identifica i soggetti affetti da depressione lieve;
- Da 7 a 15: identifica i soggetti affetti da depressione severa.

È stata valutata la qualità del sonno utilizzando il Pittsburgh Sleep Quality Index (474). Infine, la storia di cadute è stata indagata, sia utilizzando un questionario dedicato (469), che la "SAFE Scale" (475), studiata per indagare la paura di cadere.

L'intervista è stata seguita da un esame obiettivo generale, che si è focalizzato con attenzione sulla condizione neurologica del soggetto, sulla presenza di lesioni cutanee, come ulcere o piaghe da decubito, su pregresse amputazioni, sull'esame articolare e sull'esame obiettivo del cavo orale. La valutazione psichiatrica è stata condotta utilizzando il "Neuropsychiatric Inventory Questionnaire" (476). Sono state effettuate, inoltre, due prove funzionali la "Timed Up and Go test" (477) e la "Short Physical Performance Battery-SPPB" (478).

Il "Timed Up&Go" (40) è un test che misura il tempo impiegato per alzarsi da una sedia, camminare per tre metri, girarsi, tornare verso la sedia e sedersi di nuovo. La prova deve essere ripetuta 3 volte e deve essere preso il punteggio migliore. Il soggetto non deve essere aiutato durante la prova e può utilizzare ausili per la deambulazione come bastoni o tripodi se usualmente li utilizza.

Sono state considerate tre classi in accordo ai terzili di distribuzione del punteggio ottenuto:

- Soggetti che hanno terminato la prova in un tempo inferiore ai 20 secondi definiti come soggetti con funzionalità elevata;
- Soggetti che hanno impiegato dai 20 ai 30 secondi per completare la prova definiti come soggetti con funzionalità intermedia;
- Soggetti ai quali sono stati necessari più di 30 secondi per completare la prova definiti come soggetti con funzionalità bassa.

La SPPB è una breve batteria nata per valutare la funzionalità degli arti inferiori (478), costituita da 3 sezioni diverse:

1. Valutazione dell'equilibrio in 3 prove:

- (1) Mantenimento della posizione a piedi uniti per 10"
- (2) Mantenimento della posizione di semi-tandem per 10" (alluce posizionato lateralmente al calcagno)
- (3) Mantenimento della posizione di tandem per 10" (alluce posizionato dietro al calcagno)

Il punteggio parziale di questa prima sessione varia da un minimo di 0 se il paziente non riesce a mantenere la posizione a piedi uniti per almeno 10" a un massimo di 4 se riesce a completare tutte e tre le prove.

- 2) Valutazione del cammino (gait) su 4 metri lineari ed a seconda del tempo della performance il punteggio della sessione varia da 0 se incapace, a 4 se riesce ad assolvere il compito in meno di 4.1".
- 3) Valutazione della capacità di eseguire, per 5 volte consecutive, il "sit to stand" da una sedia senza utilizzare gli arti superiori che, per effettuare correttamente la prova, devono essere incrociati davanti al petto. Il punteggio varia da 0 se incapace a 4 se la prova viene completata in meno di 11.2".

Il punteggio totale della scala ha quindi un range da 0 a 12.

Relativamente al punteggio ottenuto nella scala SPPB sono stati ottenuti tre gruppi in accordo ai terzili di distribuzione:

- Da 9 a 12: soggetti con funzionalità degli arti inferiori elevata;
- Da 5 a 8: soggetti con funzionalità degli arti inferiori intermedia;
- Da 0 a 4: soggetti con funzionalità degli arti inferiori bassa

Inoltre, utilizzando un dinamometro (479) (Hydraulic Dynamometer, RO + TEN, Italy), è stato misurato l'handgrip ad entrambi gli arti, ed è stato preso in considerazione il valore più elevato fra arto destro e sinistro ottenuto da ciascun soggetto.

La funzione cardiovascolare è stata valutata mediante la rilevazione della frequenza cardiaca, del ritmo, della pressione arteriosa sistolica e diastolica e della saturazione di ossigeno a livello capillare (Onimax, Nellcor, Irlanda). Utilizzando uno strumento Doppler portatile ad onda continua a 8 Mhz (PicoDop, Microlab Elettronica, Italia) è stata valutata la pressione sistolica alla caviglia, utilizzata per misurare l'"Ankle Brachial Index" (480).

Al termine della visita è stato applicato al partecipante un calorimetro " SenseWear Armband "(BodyMedia Inc, USA) al di sopra del muscolo tricipite, a metà strada tra l'acromion e il processo oleocranico, così come suggerito dal costruttore.

I partecipanti sono stati invitati ad indossare la fascia, per almeno una settimana, rimuovendola solo per fare il bagno o la doccia.

Il sistema, fruttando una serie di sensori, ha raccolto per tutto il periodo in cui è stato indossato informazioni relative ai movimenti, al flusso di calore, alla temperatura corporea nelle vicinanze, la temperatura della pelle e la risposta galvanica della pelle stessa. Un algoritmo sviluppato dal costruttore (Professional Sense Wear, 6.1) ha permesso la misurazione del dispendio calorico, del numero di passi, la durata dell'attività fisica, il riposo e il sonno.

### ***Prelievi***

Infine, è stato programmato un incontro con un infermiere, il quale, giunto alla residenza del paziente, è stato incaricato di raccogliere il bracciale ed effettuare un prelievo ematico. In tutti i soggetti coinvolti sono stati eseguiti prelievi di sangue venoso periferico dalla vena cubitale con ago Vacutainer n°19. Le

provette di sangue con EDTA, con sodio citrato senza anticoagulante sono state centrifugate a 4°C a 2000 g per 15 minuti. Una provetta di sangue con EDTA è stata utilizzata prima della centrifugazione per la valutazione del numero delle cellule progenitrici, CEP e CEC.

Le cellule progenitrici circolanti, le cellule progenitrici endoteliali e le cellule endoteliali circolanti sono state valutate utilizzando la citometria a flusso, definendo:

- Le cellule cellule progenitrici circolanti come cellule CD34+,CD133+,CD34+/CD133+ ;
- Le cellule endoteliali progenitrici come quelle cellule che risultavano essere: CD34+/KDR+,CD133+/KDR+,CD34+/CD133+/KDR;
- Le cellule endoteliali circolanti come cellule CD146+/CD31+/CD45-/CD61-.

I campioni di plasma e siero così ottenuti sono stati suddivisi e conservati a -80°C fino al momento del loro utilizzo.

La determinazione del profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo-LDL, colesterolo-HDL, trigliceridi), glicemico e della creatinina è stata ottenuta attraverso metodiche convenzionali del Laboratorio dell' Ospedale San Giovanni di Dio.

I Medici di Medicina Generale che avevano in cura i partecipanti hanno ricevuto un rapporto dettagliato sulle valutazioni strumentali e i test di laboratorio di routine.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita mediante l'impiego del programma SPSS (Statistical Package for Social Sciences Chicago , Illinois, USA) versione 20.0.

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard per i dati parametrici, mentre come mediana e range interquartile per i dati non parametrici.

Il test Mann-Whitney per i dati non parametrici è stato utilizzato per confrontare singoli gruppi mentre il test chi-quadrato per il confronto dei dati categorici.

Il coefficiente di correlazione di Spearman per ranghi, indice di correlazione non parametrico, è stato utilizzato per valutare il grado di relazione tra due variabili quando le assunzioni del modello di correlazione parametrica non sono soddisfatte.

Al fine di valutare l'associazione fra il numero di cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti e le scale esaminate è stata effettuata un'analisi di regressione logistica multinomiale utilizzando come variabile dipendente il punteggio delle scale e come variabili indipendenti il numero delle cellule espresso in terzili e i fattori noti per essere confondenti.

La distribuzione in terzili delle cellule progenitrici circolanti è risultata essere:

1. Per le cellule CD34+: *primo terzile* <290,0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 290,0-482,6 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile* >482,6;

2. Per le cellule CD133+: *primo terzile*: <294,2 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 294,2-510,1 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>510,1 cellule/10<sup>6</sup> eventi;
3. Per le cellule CD34+/ CD133+: *primo terzile*<227,0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 227,0-413,0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>413,0 cellule/10<sup>6</sup> eventi;

La distribuzione in terzili delle cellule endoteliali progenitrici è risultata essere:

1. Per le cellule CD34+/KDR+: *primo terzile*<0.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 0.0-3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi;
2. Per le cellule CD133+/KDR+: *primo terzile*<0.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 0.0-3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi;
3. Per le cellule CD34+/CD133+/KDR+: *primo terzile*<0.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 0.0-3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>3.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi;

La distribuzione in terzili delle cellule endoteliali circolanti è risultata essere: *primo terzile*<0.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *secondo terzile* 0.0-5.0 cellule/10<sup>6</sup> eventi; *terzo terzile*>5.0; cellule/10<sup>6</sup> eventi

I valori p<0,005 sono stati considerati statisticamente significativi.

## 7 Risultati

### *Caratteristiche cliniche*

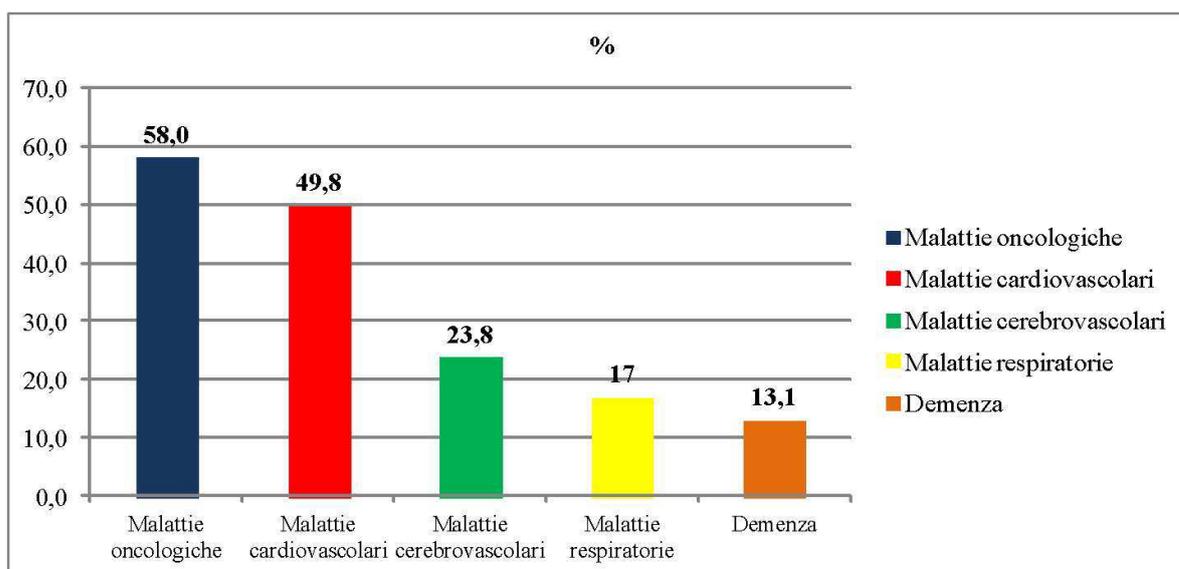
#### *Anamnesi familiare*

La prevalenza della familiarità nelle diverse condizioni cliniche, nel gruppo in cui è stato possibile risalire all'anamnesi familiare, è riportata nella tabella e nelle figura seguenti. Le malattie oncologiche sono state riscontrate come le patologie prevalenti nell'anamnesi familiare, prevalenza del 58,0 %, seguite dalle malattie cardiovascolari con una prevalenza del 49,8%, e dalle malattie cerebrovascolari, prevalenza del 23,8%. La prevalenza delle patologie respiratorie e della demenza all'anamnesi familiare è risulta essere rispettivamente del 17,0% e del 13,1% (Tabella 5.1 e Figura 5.1)

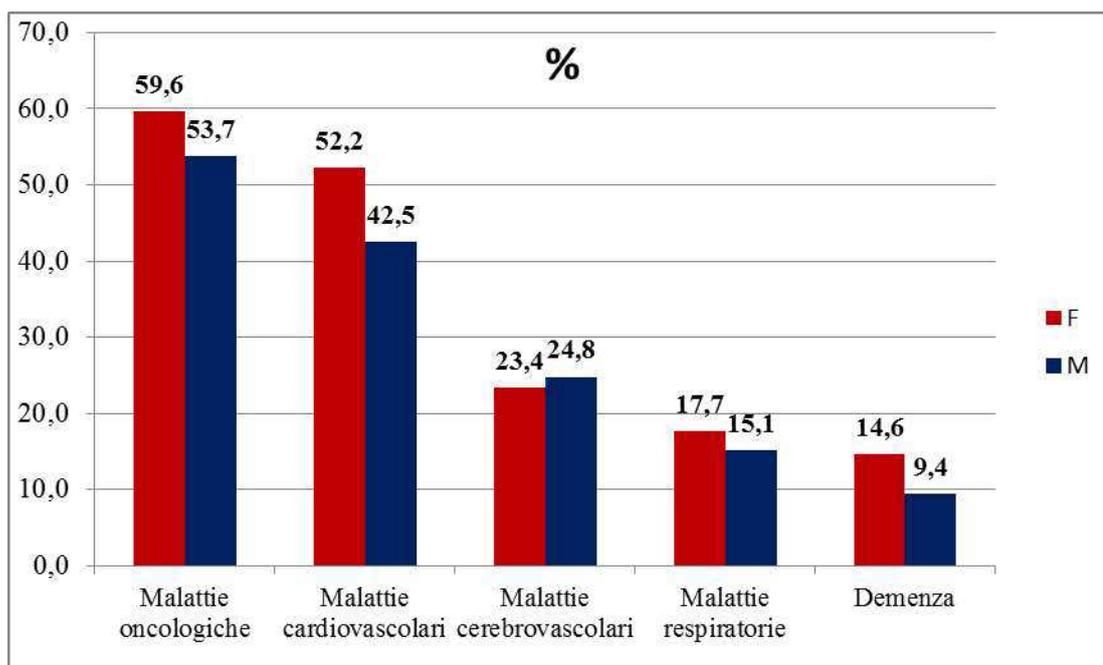
Confrontando la prevalenza di tali patologie nel gruppo di sesso femminile e nel gruppo di sesso maschile è stata evidenziata una differenza significativa solo per quanto riguarda la familiarità per demenza; infatti, la demenza nell'anamnesi familiare è risultata avere una prevalenza maggiore nei soggetti di sesso femminile rispetto ai soggetti di sesso maschile (Tabella 5.1 e Figura 5.2).

<b>Familiarità</b> <b>(n-tot=414)</b>	<b>n (%)</b>			<b>P</b> <b>F vs M</b>
	<b>Totale</b>	<b>Sesso</b>		
		<b>F</b> (304)	<b>M</b> (110)	
<b>Malattie Cardiovascolari,</b> (n=384)	190 (49,8)	145 (52,2)	45 (42,5)	<i>p=0,115</i>
<b>Malattie Respiratorie,</b> (n=371)	63 (17,0)	47 (17,7)	16 (15,1)	<i>p=0,401</i>
<b>Malattie Cerebrovascolari,</b> (n=370)	88 (23,8)	62 (23,4)	26 (24,8)	<i>p=0,524</i>
<b>Demenza, (n=367)</b>	48 (13,1)	38 (14,6)	10 (9,4)	<i>p=0,073</i>
<b>Malattie Oncologiche,</b> (n=383)	222 (58,0)	164 (59,6)	58 (53,7)	<i>p=0,286</i>

**Tabella 5.1-**Anamnesi familiare nella popolazione del Mugello



**Figura 5.1-** Anamnesi familiare nella popolazione del Mugello



**Figura 5.2-**Anamnesi familiare in relazione al sesso nella popolazione del Mugello

### Anamnesi patologica

Nella tabella seguente (Tabella 5.2) sono presetate le prevalenze delle singole patologie nella popolazione in studio; la prevalenza riscontrata è relativa al gruppo in cui è stato possibile ottenere tale informazione. Relativamente alle patologie cardiovascolari, l'ipertensione è quella che ha mostrato la prevalenza più elevata 59,3%, seguita dall'insufficienza cardiaca congestizia 22,9% e dalla malattia vascolare periferica che ha mostrato una prevalenza del 19,3%. L'infarto del miocardio ha interessato 57 soggetti (14,7%) e la dislipidemia è stata documentata in 43 intervistati (11,2%).

Fra le patologie neurologiche sono state raccolte informazioni relative alla presenza di demenza, riscontrata in 59 soggetti (15,3%), di malattia cerebrovascolare che ha interessato 83 soggetti (21,4%) e di eventuali esiti di stroke, quale presenza di emiplegia, riscontrata in 3 soggetti corrispondente ad una prevalenza dell' 0,8%.

Malattie polmonari croniche sono state riscontrate in 53 soggetti, con una prevalenza pari al 13,8%, mentre le malattie del tessuto connettivo hanno mostrato una prevalenza del 2,6%, sono state riscontrate in 10 soggetti.

Relativamente alle patologie di competenza gastroenterologica, un' ulcera è stata riscontrata in 59 soggetti (15,4%), e di epatopatia, distinta in forma lieve riscontrata in 21 soggetti (5,5%) e in forma moderata o grave, presente in 3 soggetti pari a una prevalenza dello 0,8%.

Le informazioni relative al Diabete Mellito sono state raccolte considerando la presenza o meno di danno d'organo; il diabete senza danno d'organo è stato documentato in 39 soggetti, pari a una prevalenza del 10,1%, mentre la compromissione d'organo è stata osservata in 17 soggetti pari al 4,4%.

La malattia renale moderata o grave era presente in 19 soggetti ed è stata evidenziata avere una prevalenza nella popolazione in studio del 5,0%.

L'anamnesi patologica per tumori è risultata positiva in 53 soggetti mentre per le metastasi è risultata positiva in 1 soggetto con prevalenza rispettivamente del 13,9% e dello 0,3%. Nessun soggetto, facente parte del campione studiato, è risultato avere un'anamnesi patologica positiva per linfoma, mentre la prevalenza di leucemia è stata dello 0,3%, con un solo soggetto affetto.

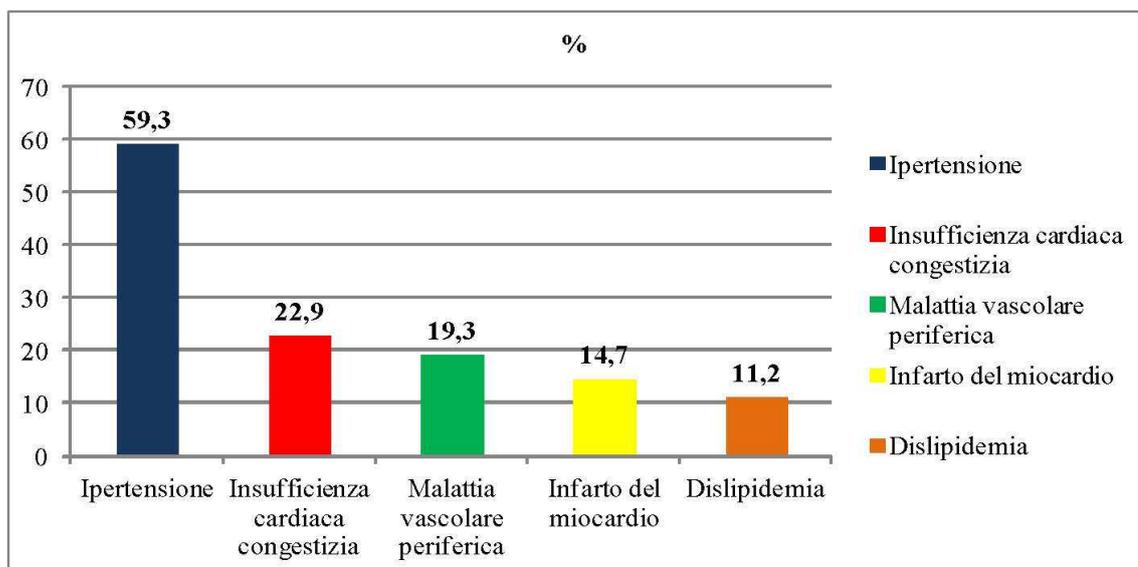
Analizzando tali informazioni in relazione al sesso del soggetto partecipante è stata riscontrata una differenza significativa nella prevalenza di infarto del miocardio, prevalenza più elevata nelle femmine rispetto ai maschi nella popolazione del Mugello, e nella prevalenza dell'ipertensione, anche in questo caso è stata riscontrata una prevalenza più elevata nei soggetti di sesso femminile rispetto ai soggetti di sesso maschile.

Inoltre, anche per quanto riguarda le patologie polmonari croniche e i tumori è stato possibile osservare una prevalenza significativamente più elevata nei soggetti di sesso femminile rispetto ai soggetti di sesso maschile.

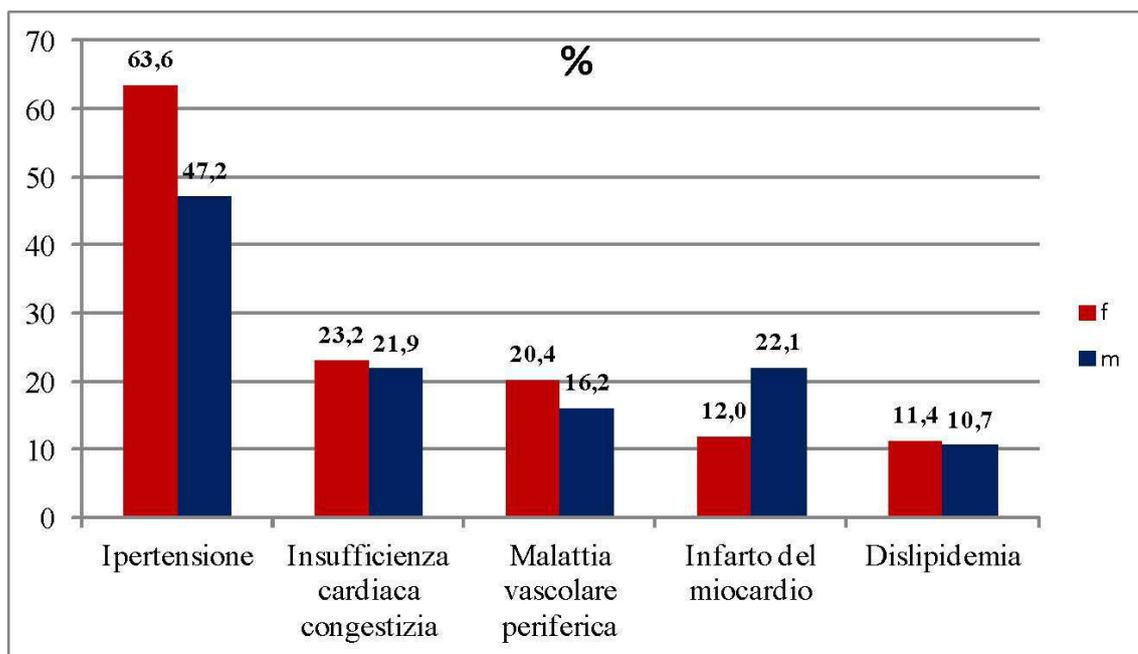
<i>Patologia</i> (n-tot=414)	<b>n (%)</b>			<b>P</b> <i>F vs M</i>
	<b>Totale</b>	<b>Sesso</b>		
		<b>F</b> (304)	<b>M</b> (110)	
<b>Cardiovascolari:</b>				
Infarto del miocardio, (n=388)	57 (14,7)	34 (12,0)	23 (22,1)	<i>p=0,012</i>
Insufficienza cardiaca congestizia, (n=389)	89 (22,9)	66 (23,2)	23 (21,9)	<i>p=0,781</i>
Malattia vascolare periferica, (n=389)	75 (19,3)	58 (20,4)	17 (16,2)	<i>p=0,348</i>
Ipertensione, (n=400)	237 (59,3)	187 (63,6)	50 (47,2)	<i>p=0,003</i>
Dislipidemia, (n=383)	43 (11,2)	32 (11,4)	11 (10,7)	<i>p=0,837</i>
<b>Neurologiche:</b>				
Demenza, (n=385)	59 (15,3)	49 (17,4)	10 (9,7)	<i>p=0,064</i>
Malattia cerebrovascolare, (n=388)	83 (21,4)	67 (23,6)	16 (15,4)	<i>p=0,081</i>
Emiplegia, (n=383)	3 (0,8)	2 (0,7)	1 (1,0)	<i>p=0,801</i>
<b>Malattia polmonare cronica, (n=385)</b>	53 (13,8)	32 (12,9)	21 (25,3)	<i>p=0,026</i>
<b>Malattia del tessuto connettivo, (n=382)</b>	10 (2,6)	7 (2,6)	3 (3,0)	<i>p=0,826</i>
<b>Gastroenterologiche:</b>				
Ulcera, (n=384)	59 (15,4)	41 (14,6)	18 (17,3)	<i>p=0,111</i>
Epatopatie lievi, (n=383)	21 (5,5)	18 (6,9)	3 (3,0)	<i>p=0,127</i>
Epatopatia moderata o grave, (n=383)	3 (0,8)	2 (0,7)	1 (0,9)	<i>p=0,574</i>
<b>Endocrine</b>	39 (10,1)	31 (11,0)	8 (7,8)	<i>p=0,358</i>
Diabete senza danno d'organo, (n=386)	17 (4,4)	14 (5,0)	3 (2,9)	<i>p=0,386</i>
Diabete con danno d'organo, (n=385)				
<b>Malattia renale moderata o grave, (n=383)</b>	19 (5,0)	14 (5,3)	5 (5,1)	<i>p=0,500</i>
<b>Oncologiche</b>				
Tumore, (n=382)	53 (13,9)	32 (11,5)	21 (20,4)	<i>p=0,025</i>
Leucemia, (n=382)	1 (0,3)	1 (100)	0 (0,0)	<i>p=0,543</i>
Linfoma, (n=382)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-
Metastasi, (n=382)	1 (0,3)	0 (0,0)	1 (1,0)	<i>p=0,098</i>

**Tabella 5.2-**Anamnesi Patologica nella popolazione del Mugello

Nelle figure seguenti (Figura 5.3 e Figura 5.4) sono riportate le prevalenze delle patologie cardiovascolari nella popolazione del Mugello e le prevalenze di tali patologie in relazione al sesso della popolazione oggetto di studio.

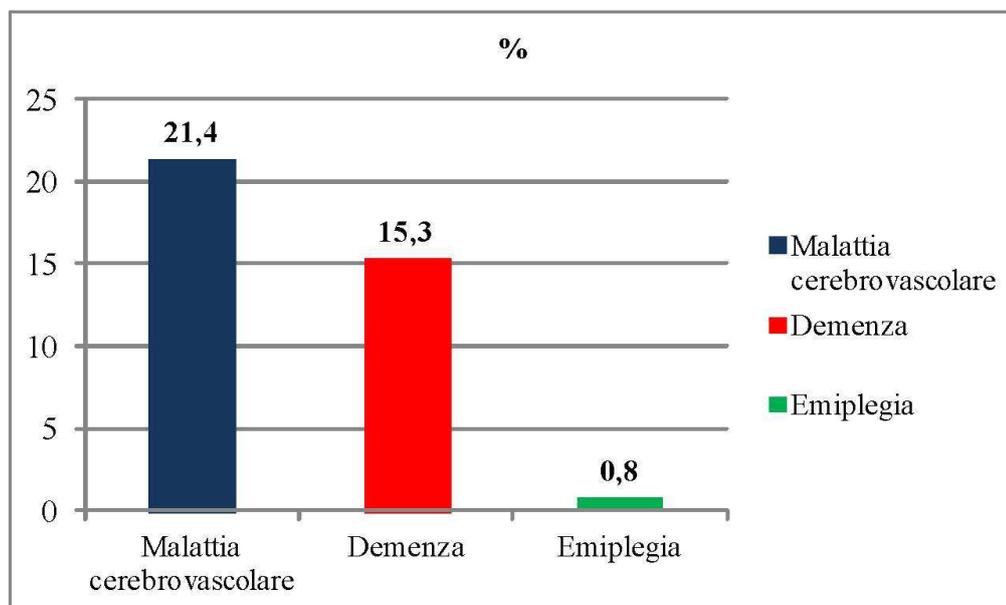


**Figura 5.3-**Prevalenza delle patologie cardiovascolari nella popolazione del Mugello

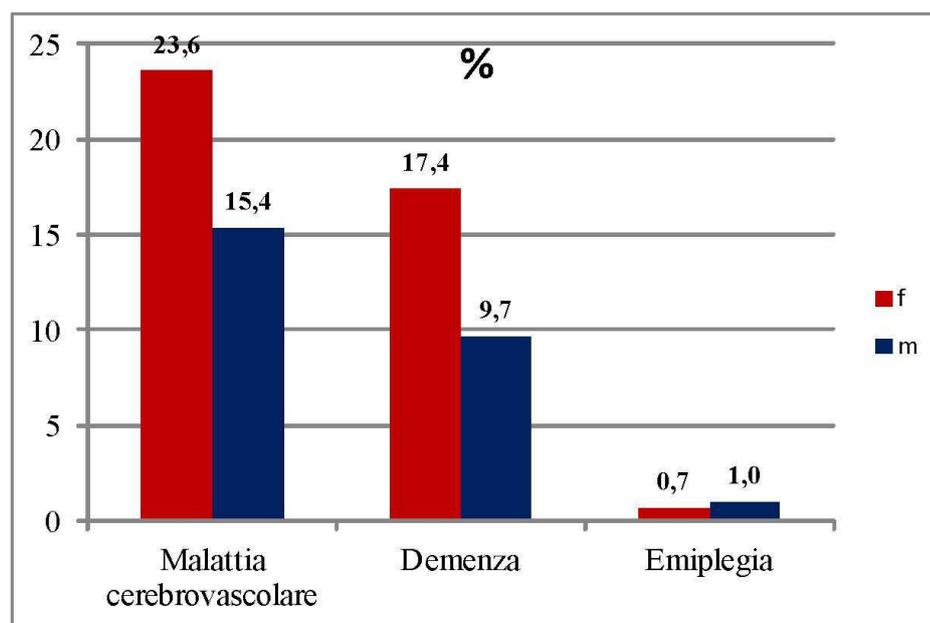


**Figura 5.4-**Prevalenza delle patologie cardiovascolari nella popolazione del Mugello in relazione al sesso

Nelle figure seguenti (Figura 5.5 e Figura 5.6) sono riportate le prevalenze delle patologie neurologiche nella popolazione del Mugello e le prevalenze di tali patologie in relazione al sesso della popolazione oggetto di studio.



**Figura 5.5**-Prevalenza delle patologie neurologiche nella popolazione del Mugello



**Figura 5.6**-Prevalenza delle patologie neurologiche nella popolazione del Mugello in relazione al sesso

### Misure antropometriche

La media e la deviazione standard delle misure antropometriche valutate è riportata nella tabella seguente (Tabella 5.3), tali valori si riferiscono al gruppo in cui sono state valutate queste variabili. Il valore medio del peso nella popolazione in esame è risultato essere di 61,8 Kg (DS=12,2 Kg) e l'altezza media 1,57 m (DS=0,1 m). Dividendo il peso per il quadrato dell'altezza è stato possibile ottenere l'informazione relativa all'Indice di Massa Corporea (IMC) che è risultato avere un valore medio di 24,9 Kg/m<sup>2</sup> (DS=4,4 Kg/m<sup>2</sup>).

La circonferenza addominale, misurata a livello del punto medio tra margine costale e cresta iliaca, ha presentato un valore medio di 95,8 cm (DS=12,3 cm), mentre la circonferenza fianchi, misurata a livello del punto massimo in corrispondenza dei grandi trocanteri, è risultata avere un valore medio di 102,0 cm (DS=10,9 cm). Il valore medio della circonferenza del braccio, misurata a livello del punto medio tra olecrano e acromion, è stato di 26,1 cm (DS=3,7 cm).

Relativamente agli arti inferiori è stata valutata la circonferenza della coscia, misurando il punto massimo a livello della piega dei glutei, la circonferenza del polpaccio, considerando la massima circonferenza, e la lunghezza dell'arto inferiore, facendo partire la misurazione dalla spina iliaca superiore fino al malleolo mediale. I valori medi di tali misurazioni sono risultati essere rispettivamente 44,4 cm (DS=6,9 cm), 31,8 cm (DS=4,6 cm) e 82,1 cm (DS=6,9 cm).

Il valore medio sia della plica tricipitale che della plica sovrascapolare del campione oggetto di studio è risultato essere 12,3, con una DS rispettivamente di 4,9 cm e di 4,4 cm.

Il valore dell'handgrip\*, definito come la forza di presa della mano, è stato di 14,5 Kg (DS=7,0 Kg) [nel campione femminile il valore medio è risultato essere di 11,9 Kg (DS=4,9 Kg), mentre nel campione maschile era di 20,7 Kg (DS=7,4 Kg)].

Analizzando le variabili antropometriche in relazione al sesso dei soggetti partecipanti è stato possibile osservare, come atteso, una differenza significativa nel peso, nell'altezza, nella circonferenza addominale, nella circonferenza del braccio, nella circonferenza del polpaccio, nella lunghezza dell'arto inferiore e nell'handgrip\*, che sono risultati essere maggiori nel soggetto di sesso maschile rispetto al soggetto di sesso femminile.

Una differenza significativa è stata evidenziata anche nel valore della plica tricipitale, risultando maggiore nella popolazione di sesso maschile rispetto alla popolazione di sesso femminile.

<i>Misure antropometriche</i> (n-tot=414)	Media ± DS			P F vs M
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
<b>Peso (Kg)</b> , (n=392)	61,8 ± 12,2	62,0 ± 12,0	68,7 ± 9,9	p<0,001
<b>Altezza (m)</b> , (n=399)	1,57 ± 0,1	1,54 ± 0,1	1,65 ± 0,1	p<0,001
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b> , (n=389)	24,9 ± 4,4	24,9 ± 3,4	24,9 ± 4,7	p=0,059
<b>Circonferenza addominale (cm)</b> , (n=400)	95,8 ± 12,3	94,2 ± 12,2	99,8 ± 11,9	p<0,001
<b>Circonferenza fianchi (cm)</b> , (n=398)	102,0 ± 10,9	101,5 ± 11,6	103,4 ± 8,9	p=0,115
<b>Circonferenza del braccio (cm)</b> , (n=402)	26,1 ± 3,7	25,8 ± 3,8	27,0 ± 3,1	p=0,003
<b>Circonferenza della coscia (cm)</b> , (n=397)	44,4 ± 6,9	44,4 ± 7,6	44,4 ± 4,8	p=0,995
<b>Circonferenza del polpaccio (cm)</b> , (n=402)	31,8 ± 4,6	31,2 ± 4,5	33,4 ± 4,5	p<0,001
<b>Lunghezza arto inferiore (cm)</b> , (n=260)	82,1 ± 6,9	80,4 ± 6,4	86,5 ± 6,0	p<0,001
<b>Plica Tricipitale (mm)</b> , (n=360)	12,3 ± 4,9	13,0 ± 4,8	10,8 ± 4,7	p<0,001
<b>Plica Sovrascapolare (mm)</b> , (n=345)	12,3 ± 4,4	12,5 ± 4,5	11,9 ± 4,2	p=0,216
<b>Handgrip* (Kg)</b> , (n=357)	14,5 ± 7,0	11,9 ± 4,9	20,7 ± 7,4	p<0,001

\*Handrip è il valore più elevato fra arto destro e arto sinistro.

**Tabella 5.3-**Misure antropometriche nella popolazione del Mugello

### *Fattori di rischio cardiovascolari*

La prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari considerati è riportata in tabella seguente (Tabella 5.4). Il valore medio dell'età è risultato essere di 93,1 anni (DS=3.3 anni), il 73.4% erano donne e il 26,6% uomini. Il 59,3% dei soggetti è risultato affetto da ipertensione arteriosa e l' 11,2% ha presentato una quadro di dislipidemia. La prevalenza del diabete mellito è stata del 14,5%, di cui il 10,1% risultavano essere affetti da diabete senza compromissione d'organo, mentre il 4,4% presentavano diabete con danno d'organo. L'esposizione tabagica è risultata essere presente nel 30,4%, il 3,2% dei soggetti al momento dell'intervista era un fumatore in atto, mentre l' esposizione tabagica è risulta essere progressa nel 27,2%.

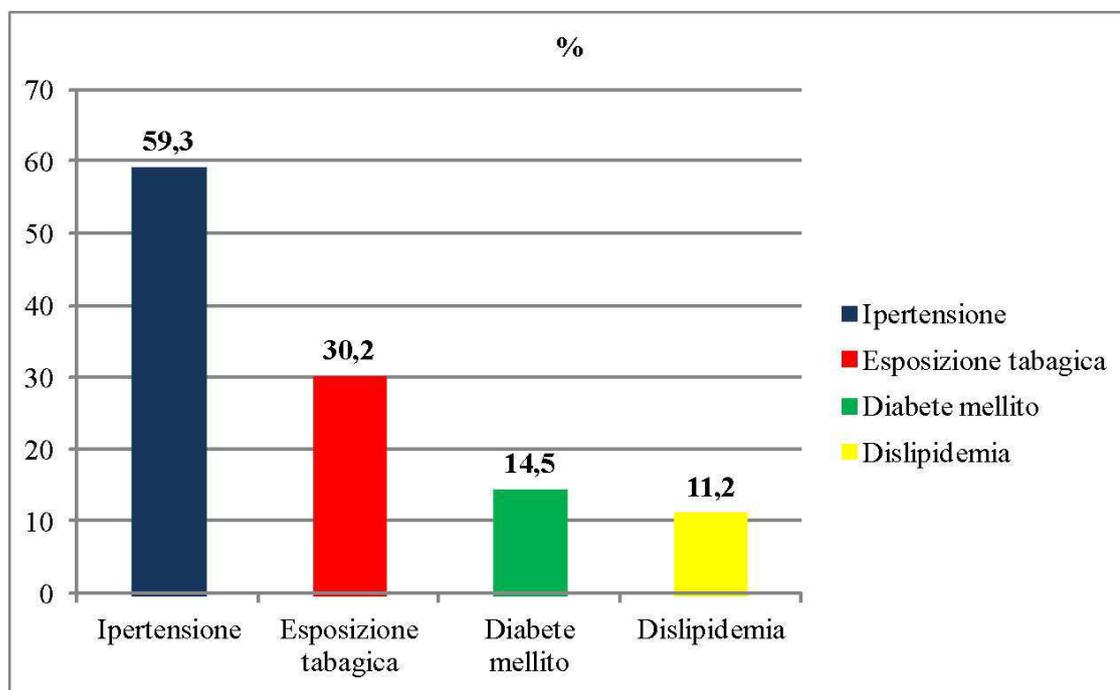
Analizzando la prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari in relazione al sesso, è stato possibile osservare una differenza significativa nella presenza dell'ipertensione arteriosa, che è ha una prevalenza maggiore nel sesso femminile, e una differenza significativa nell'esposizione tabagica, maggiore nel sesso maschile rispetto al sesso femminile della popolazione del Mugello.

Inoltre, il valore medio dell'età è risultato essere significativamente più elevato nel gruppo di sesso femminile rispetto al sesso maschile.

<i>Fattori di rischio cardiovascolari</i> (n-tot=414)	n (%)			<i>P</i> <i>F vs M</i>
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
Età, (anni); (media e DS)	93,1 ± 3,3	93,4 ± 3,5	92,4 ± 2,6	<i>p</i> =0,006
Ipertensione, (n=400)	237 (59,3)	187 (63,6)	50 (47,2)	<i>p</i> =0,003
Dislipidemia, (n=383)	43 (11,2)	32 (11,4)	11 (10,7)	<i>p</i> =0,837
<b>Diabete mellito:</b>				
Senza danno d'organo, (n=386)	39 (10,1)	31 (11,0)	8 (7,8)	<i>p</i> =0,358
Con danno d'organo, (n=385)	17 (4,4)	14 (5,0)	3 (2,9)	<i>p</i> =0,386
<b>Esposizione tabagica, (n=408)</b>				
Pregressa	111 (27,2)	37 (12,4)	74 (67,9)	<i>p</i> <0,001
Attuale	13 (3,2)	7 (2,3)	6 (5,5)	

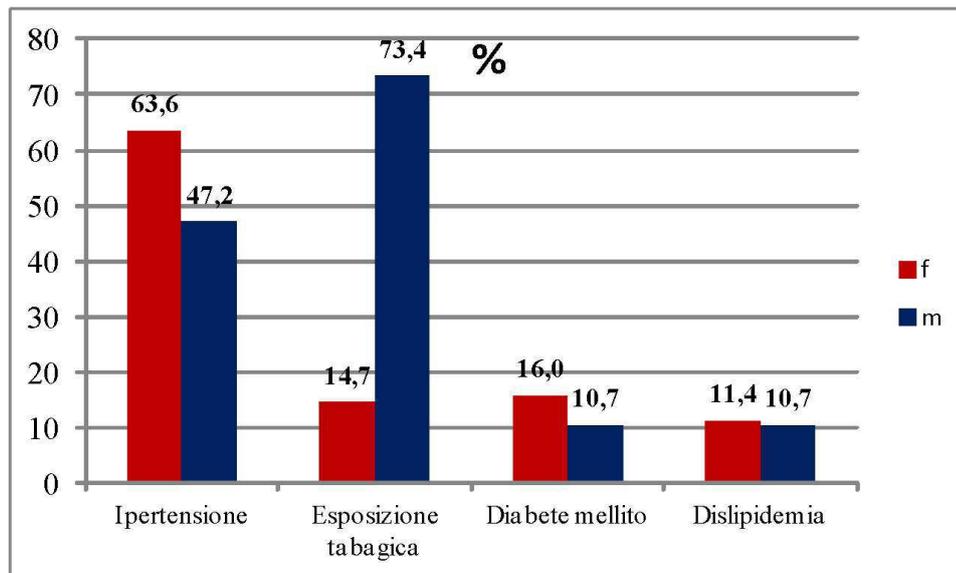
**Tabella 5.4-**Fattori di rischio cardiovascolari nella popolazione del Mugello

La prevalenza dei fattori di rischio modificabili, nella popolazione del Mugello, è stata rappresentata nella figura seguente (Figura 5.8) attraverso l'utilizzo di istogrammi.



**Figura 5.8-**Fattori di rischio cardiovascolari modificabili nella popolazione del Mugello

Nella figura successiva (Figura 5.9) è riportata la prevalenza dei fattori di rischio cardiovascolari modificabili in relazione al sesso



**Figura 5.9-Fattori di rischio cardiovascolari in relazione al sesso**

### **Parametri bioumorali**

Il valore medio e la DS (o la mediana e il RI) dei parametri bioumorali indagati sono riassunti nelle tabelle seguenti (Tabella 5.5, Tabella 5.6, Tabella 5.7, Tabella 5.8).

La Proteina C reattiva (PCR) è risultato avere una mediana di 0,41 mg/dL [range interquartile (RI) 0,19-0,81]. Il valore medio dei globuli bianchi nel campione di riferimento è risultato essere  $6,4 \times 10^3/\mu\text{L}$  (DS= $1,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), dei globuli rossi  $4,3 \times 10^6/\mu\text{L}$  (DS= $0,6 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), delle piastrine  $216,4 \times 10^3/\mu\text{L}$  (DS= $84,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), mentre il valore medio dell'ematocrito si è attestato al 38,8% (DS=5,0%). Il valore medio dell'emoglobina è stato 12,9 g/dL (DS=1,5 g/dL).

Inoltre sono state raccolte informazioni relative ai parametri corpuscolari derivati:

- Volume Corpuscolare Medio (*Mean Corpuscular Volume, MCV*), definito come il rapporto tra massa e numero degli eritrociti, è risultato avere un valore medio di 90,3 fL (DS=5,5 fL);
- Contenuto Corpuscolare Medio (*Mean Cell Hemoglobin, MCH*) di Hb, che esprime il rapporto fra emoglobina e numero di globuli rossi, è risultato essere 29,7 pg (DS=2,6 pg);
- Ampiezza di distribuzione degli eritrociti (Red Blood Cell Distribution Width-RDW), parametro utile nella discriminazione di anisocitosi, ha presentato un valore medio di 14,7 % (DS=1,4%).

Analizzando i valori medi e le rispettive DS dell'emocromo in relazione al sesso del soggetto, come atteso, è stato possibile osservare una differenza statisticamente significativa nella concentrazione di emoglobina e nel contenuto corpuscolare medio, maggiore nel sesso maschile rispetto al sesso femminile della popolazione del Mugello.

<i>Emocromo</i> (n-tot=414)	Media ± DS			<i>P</i> <i>F vs M</i>
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
Globuli bianchi [GB ( $10^3/\mu\text{L}$ )], (n=390)	6,4 ± 1,9	6,3 ± 1,9	6,5 ± 2,0	<i>p</i> =0,373
Globuli rossi [GR ( $10^6/\mu\text{L}$ )], (n=390)	4,3 ± 0,6	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,7	<i>p</i> =0,509
Ematocrito [Htc (%)], (n=390)	38,8 ± 5,0	38,7 ± 4,5	39,1 ± 6,2	<i>p</i> =0,468
Emoglobina [Hb (g/dL)], (n=390)	12,9 ± 1,5	12,8 ± 1,4	13,2 ± 1,8	<i>p</i> =0,017
MCV (fL), (n=390)	90,3 ± 5,5	90,0 ± 4,9	91,1 ± 6,7	<i>p</i> =0,085
MCH (pg), (n=390)	29,7 ± 2,6	29,5 ± 2,7	30,3 ± 2,5	<i>p</i> =0,003
RDW-CV (%), (n=387)	14,7 ± 1,4	14,7 ± 1,3	14,9 ± 1,5	<i>p</i> =0,260
Piastrine [PTL ( $10^3/\mu\text{L}$ )], (n=390)	216,4 ± 84,9	218,9 ± 72,9	209,9 ± 110,9	<i>p</i> =0,352

**Tabella 5.5**-Esame emocromocitometrico nella popolazione del Mugello

La formula leucocitaria ha mostrato che, del totale dei globuli bianchi, il valore medio dei neutrofili era 59,9% (DS=9,5%), il valore medio dei linfociti era di 28,4% (DS=8,7%), il valore medio dei monociti era di 7,8% (DS=2,3%), mentre gli eosinofili e i basofili avevano un valore medio rispettivamente del 3,3% (DS=2,4%) e dello 0,4% (DS=0,3%).

Nella tabella seguente sono riportati, oltre che il valore medio percentuale, anche, il valore medio assoluto e la rispettiva deviazione standard, espressi in  $10^3/\mu\text{L}$ , delle singole sottopopolazioni cellulari.

<i>Formula leucocitaria</i> (n-tot=414)	Media ± DS			<i>P</i> <i>F vs M</i>
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
<b>Globuli bianchi [GB (10<sup>3</sup>/μL)], (n=390)</b>	6,4 ± 1,9	6,3 ± 1,9	6,5 ± 2,0	<i>p</i> =0,373
<b>Neutrofili (%), (n=389)</b>	59,9 ± 9,5	59,9 ± 9,3	60,0 ± 10,0	<i>p</i> =0,864
<b>Linfociti (%), (n=389)</b>	28,4 ± 8,7	28,6 ± 8,5	28,0 ± 9,4	<i>p</i> =0,499
<b>Monociti (%), (n=389)</b>	7,8 ± 2,3	7,7 ± 2,3	8,0 ± 2,2	<i>p</i> =0,249
<b>Eosinofili (%), (n=389)</b>	3,3 ± 2,4	3,2 ± 2,4	3,6 ± 2,4	<i>p</i> =0,206
<b>Basofili (%), (n=389)</b>	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,5	<i>p</i> =0,573
<b>Neutrofili (10<sup>3</sup>/μL), (n=389)</b>	3,9 ± 3,4	3,8 ± 1,3	4,2 ± 4,0	<i>p</i> =0,065
<b>Linfociti (10<sup>3</sup>/μL), (n=389)</b>	1,8 ± 0,8	1,8 ± 0,9	1,8 ± 0,8	<i>p</i> =0,740
<b>Monociti (10<sup>3</sup>/μL), (n=389)</b>	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	<i>p</i> =0,042
<b>Eosinofili (10<sup>3</sup>/μL), (n=389)</b>	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	<i>p</i> =0,156
<b>Basofili (10<sup>3</sup>/μL), (n=389)</b>	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,02	<i>p</i> =0,378

**Tabella 5.6-**Formula leucocitaria nella popolazione del Mugello

Nella tabella seguente sono riassunti i valori medi del colesterolo totale, del colesterolo LDL, del colesterolo HDL e dei trigliceridi, riferiti al gruppo su cui è stato possibile ottenere tale informazione, e le rispettive deviazioni standard.

Il valore medio di colesterolo plasmatico totale riscontrato nel campione oggetto di studio è stato 191,1 mg/dL (DS=41,3 mg/dL), è stato osservato un valore medio di 110,7 mg/dL (DS=33,0 mg/dL) per il colesterolo LDL e un valore medio di 57,9 mg/dL (DS=17,0 mg/dL) per il colesterolo HDL.

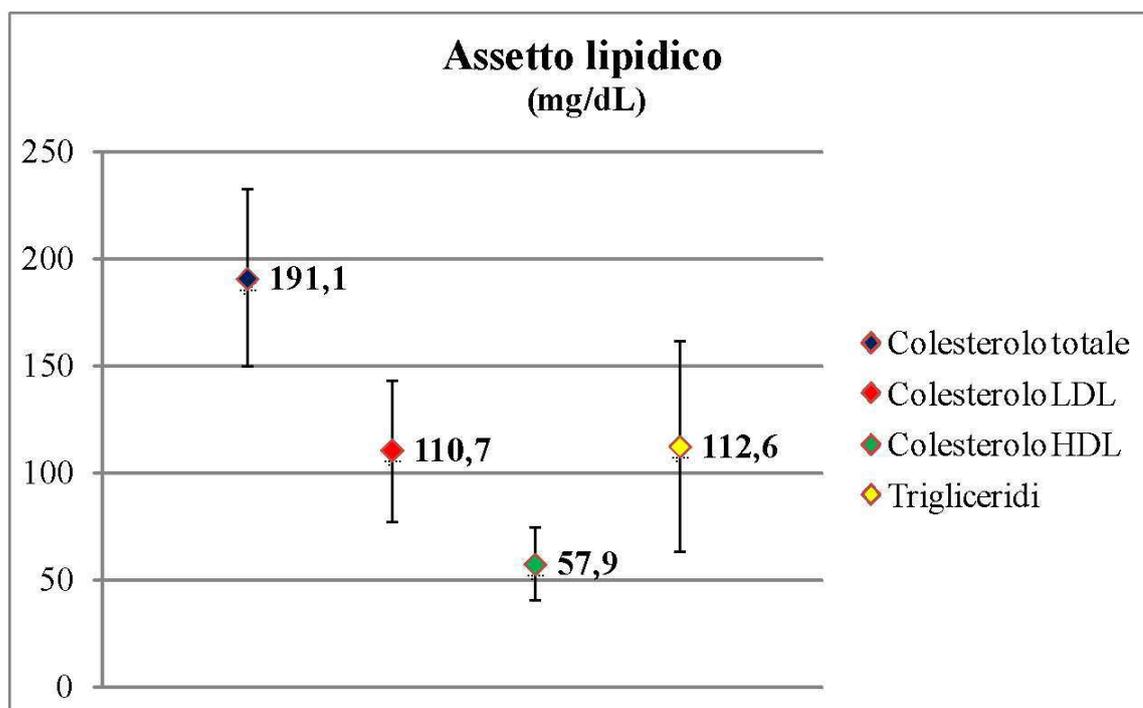
Relativamente alla concentrazione plasmatica dei trigliceridi è stato riscontrato un valore medio nel campione pari a 112,6 mg/dL (DS=48,8 mg/dL).

Analizzando l'informazione relativa alle concentrazioni dei lipidi plasmatici è emersa una differenza significativa nel valore medio del colesterolo totale, del colesterolo LDL e del colesterolo HDL in relazione al sesso, risultando tali concentrazioni più elevate nel sesso femminile rispetto al sesso maschile nella popolazione in studio.

<i>Lipidi plasmatici</i> (n-tot=414)	Media ± DS			<i>P</i> <i>F vs M</i>
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
<b>Colesterolo totale (mg/dL)</b> , (n=389)	191,1 ± 41,3	196,8 ± 41,2	176,2 ± 37,7	<i>p</i> <0,001
<b>Colesterolo LDL (mg/dL)</b> , (n=389)	110,7 ± 33,0	113,9 ± 32,7	102,4 ± 32,2	<i>p</i> =0,002
<b>Colesterolo HDL (mg/dL)</b> , (n=389)	57,9 ± 17,0	59,9 ± 17,7	52,6 ± 13,7	<i>p</i> <0,001
<b>Trigliceridi [TG (mg/dL)]</b> , (n=389)	112,6 ± 48,8	115,1 ± 50,4	106,1 ± 43,8	<i>p</i> =0,105

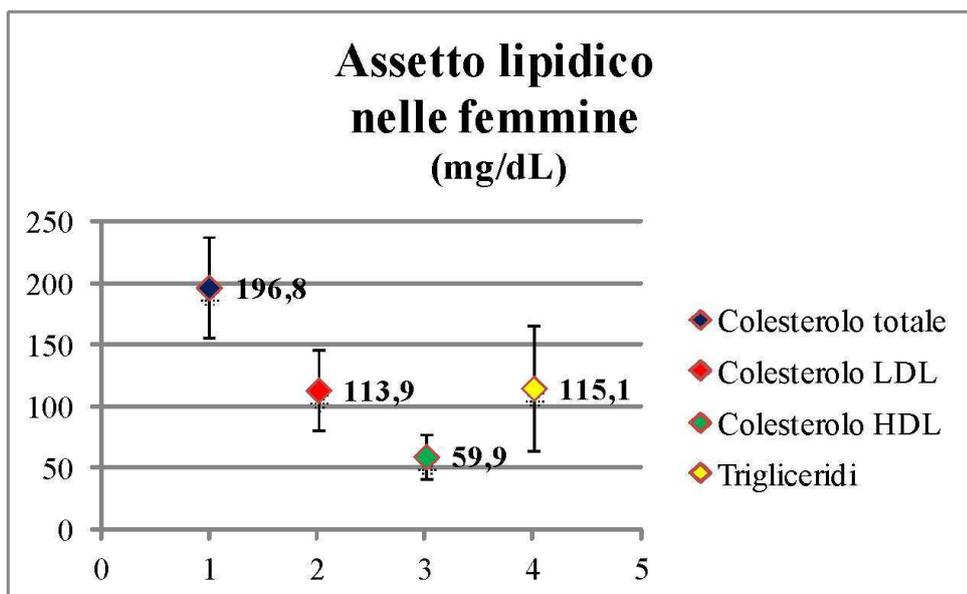
**Tabella 5.7**-Lipidi plasmatici nella popolazione del Mugello

Nella figura seguente (Figura 5.10) è riportata una rappresentazione grafica dei valori medi e delle rispettive DS dei lipidi plasmatici della popolazione del Mugello.

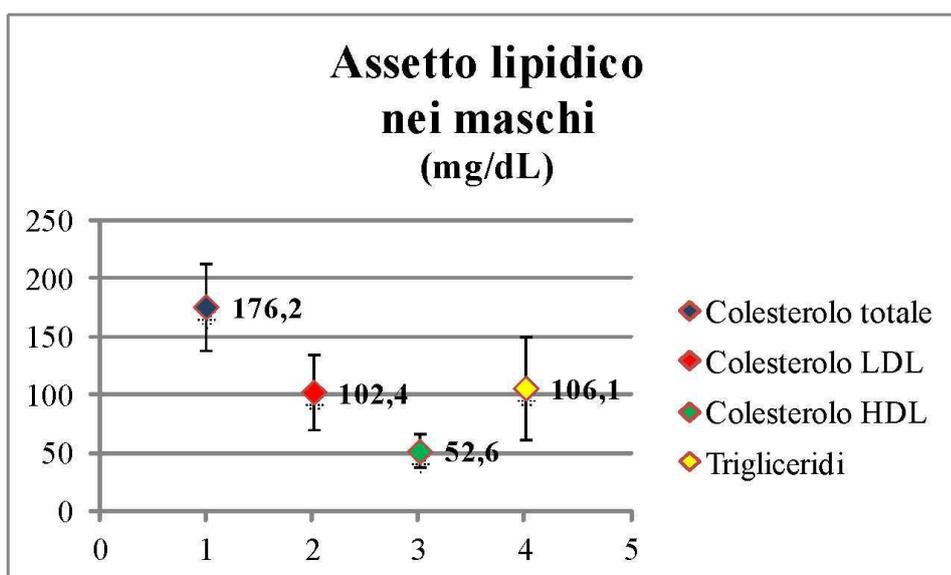


**Figura 5.10**-Lipidi plasmatici nella popolazione del Mugello

Nelle figure seguenti (Figura 5.11 e Figura 5.12) sono riportate delle rappresentazioni grafiche dei valori medi e delle rispettive DS dei lipidi plasmatici nei soggetti di sesso femminile e nei soggetti di sesso maschile.



**Figura 5.11**-Media e DS dei lipidi plasmatici nel gruppo di sesso femminile della popolazione del Mugello



**Figura 5.12**-Media e DS dei lipidi plasmatici nel gruppo di sesso maschile della popolazione del Mugello

Nella tabella seguente sono riassunte le medie e le DS degli altri parametri biochimici indagati, nel campione dove tale dato è stato disponibile.

Il valore medio della creatinina nella popolazione in studio è risultato essere 1,0 mg/dL (DS=0,5 mg/dL).

Sono stati studiati, inoltre, alcuni tra i principali elettroliti plasmatici, quali il sodio, che è risultato avere

un valore medio di 138,8 mEq/L (DS=2,9 mEq/L), il potassio, che ha presentato un valore medio di 4,3 mEq/L (DS=0,5 mEq/L), e il cloro, il cui valore medio è stato 101,6 mEq/L (DS=8,4 mEq/L).

L'acido urico è risultato avere un valore medio di 5,9 mg/dL (DS=3,4 mg/dL).

Il valore medio delle proteine totali è risultato essere 6,4 g/dL, di cui il 58,3% (DS=4,6%) è risultato essere costituito dall'albumina.

I valori medi degli indici di citolisi epatica sono risultati essere per AST 20,2 IU/L (DS=8,6 IU/L), per ALT 14,6 IU/L (DS=8,4 IU/L). La mediana di GGT, indice di colestasi, è stata di 17 IU/L (RI 13,0-25,0).

Sono stati, inoltre valutati, il TSH e gli ormoni tiroidei, T3 e T4. Per il primo, il valore medio è risultato essere 2,2  $\mu$ UI/mL (DS=5,4  $\mu$ UI/mL), mentre per i secondi i valori medi sono stati rispettivamente 2,8 pg/mL (DS=0,5 pg/mL) e 0,9 ng/dL (DS=0,2 ng/dL).

Il valore medio della glicemia è risultato essere 94,1 mg/dL (DS=25,0 mg/dL), mentre 5,6% è stata la media dell'HbA1C (DS=25,0%).

Valutando le medie di tali parametri biochimici in relazione al sesso dei soggetti partecipanti, è stato possibile osservare una differenza statisticamente significativa relativamente al valore medio della creatinina che è risultata essere più elevata nel soggetto di sesso maschile rispetto al soggetto di sesso femminile.

<i>Altri parametri biochimici (n-tot=414)</i>	Media ± DS			<i>P F vs M</i>
	Totale	Sesso		
		F (304)	M (110)	
Proteina C reattiva[PCR (mg/dL)], (n=389) (mediana e range interquartile)	0,41 (0,19-0,81)	0,40 (0,19-0,79)	0,44 (0,19-0,91)	<i>p=0,597</i>
Creatinina (mg/dL), (n=390)	1,0 ± 0,5	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,9	<i>p&lt;0,001</i>
Sodio (mEq/L), (n=390)	138,8 ± 2,9	138,9 ± 2,9	138,5 ± 2,9	<i>p=0,223</i>
Potassio (mEq/L), (n=390)	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,5	<i>p=0,186</i>
Cloro (mEq/L), (n=388)	101,6 ± 8,4	101,5 ± 7,4	101,6 ± 10,6	<i>p=0,928</i>
Acido urico (mg/dL), (n=283)	5,9 ± 3,4	5,9 ± 3,9	5,8 ± 1,4	<i>p=0,756</i>
Proteine totali (g/dL), (n=389)	6,4 ± 0,6	6,5 ± 0,6	6,4 ± 0,7	<i>p=0,624</i>
Albumina (%), (n=389)	56,3 ± 4,6	56,1 ± 4,7	56,6 ± 4,5	<i>p=0,389</i>
AST (IU/L), (n=389)	20,2 ± 8,6	20,5 ± 9,6	19,5 ± 5,0	<i>p=0,312</i>
ALT (IU/L), (n=389)	14,6 ± 8,4	14,8 ± 9,5	14,2 ± 4,4	<i>p=0,506</i>
GGT (IU/L), (n=388) (mediana e range interquartile)	17,0 (13,0-25,0)	16,0 (12,0-24,5)	19,0 (14,0-33,0)	<i>p=0,111</i>
TSH (μUI/mL), (n=388)	1,3 (0,8-2,1)	1,3 (0,8-2,2)	1,2 (0,8-1,9)	<i>p=0,140</i>
T3 (pg/mL), (n=389)	2,8 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,9 ± 0,5	<i>p=0,109</i>
T4 (ng/dL), (n=389)	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	<i>p=0,153</i>
Glicemia (mg/dL), (n=390)	94,1 ± 25,0	94,8 ± 27,2	92,1 ± 17,9	<i>p=0,346</i>
HbA1C [gHb (%)], (n=389)	5,6 ± 0,8	5,6 ± 0,8	5,5 ± 0,7	<i>p=0,750</i>

**Tabella 5.8-**Altri parametri biochimici nella popolazione del Mugello

### *Scale di valutazione della funzione cognitiva e del livello di autonomia nella popolazione del Mugello*

Le prevalenze dei punteggi riportati nelle scale effettuate sono riportate nella tabella seguente (Tabella 5.9). La valutazione del deficit cognitivo attraverso la scala MMSE è stata effettuata in tutti partecipanti allo studio. Hanno ottenuto un punteggio  $\geq$  a 24 180 soggetti, pari al 43.5% dei partecipanti, mentre un punteggio  $<$  a 24 è stato osservato in 234 soggetti, corrispondente al 56.5%

Relativamente al livello di autonomia, valutato nel 91,1% dei partecipanti, il 34,2% dei soggetti ha ottenuto un punteggio compreso tra 0 e 3, il 32,1% ha ottenuto un punteggio compreso tra 3 e 6, mentre il 33,7% ha ottenuto un punteggio superiore a 13.

La scala GDS è stata somministrata al 77,1% dei partecipanti. La prevalenza di soggetti con un punteggio compreso tra 0 e 2 alla valutazione GDS è stata del 35,7%, tra 3 e 6 è stata del 26,3%, mentre in chi ha ottenuto un punteggio compreso tra 7 e 15 è stata riscontrata una prevalenza del 37,9%.

Nella tabella seguente possiamo, inoltre, valutare la distribuzione dei soggetti nei tre gruppi in relazione al punteggio conseguito nella scala SPP, eseguita nel 65,8% dei soggetti. La prevalenza dei soggetti che hanno conseguito un punteggio compreso tra 9 e 12, che è stata del 14,6%, la prevalenza dei partecipanti che si sono collocati fra 5 e 8, che è stata del 35,4% e la prevalenza degli ultranonagenati che hanno conseguito un punteggio compreso fra 0 e 4 che è stata del 50.0%.

Infine, la prevalenza dei soggetti che hanno completato la prova Timed Up&Go test, valutato nel 59,1% dei partecipanti, in un tempo  $<$  a 20 sec è stata del 18,5%, la prevalenza di chi ha impiegato un tempo compreso fra 20 e 30 sec è stata del 28.6%, mentre il 52,8% ha necessitato di un tempo  $>$  a 30 sec.

<b><u>MMSE</u></b>	
Non eseguibile, n(%)	414 (100)
Eseguitibile, n(%)	0 (0)
≥24, n(%)	180 (43,5)
<24, n(%)	234 (56,5)
<b><u>Livello Autonomia</u></b>	
Non eseguibile, n(%)	37 (8,9)
Eseguitibile, n(%)	377 (91,1)
Da 0 a 3, n(%)	129 (34,2)
Da 4 a 13, n(%)	121 (32,1)
>13, n(%)	127 (33,7)
<b><u>GDS</u></b>	
Non eseguibile, n(%)	95 (22,9)
Eseguitibile, n(%)	319 (77,1)
Da 0 a 2, n(%)	114 (35,7)
Da 3 a 6, n(%)	84 (26,3)
Da 7 a 15, n(%)	121 (37,9)
<b><u>Timed Up&amp;Go</u></b>	
Non eseguibile, n(%)	166 (40,1)
Eseguitibile, n(%)	248 (59,1)
<20s	46 (18,5)
20-30s	71 (28,6)
>30s	131 (52,8)
<b><u>SPPB</u></b>	
Non eseguibile, n(%)	154 (37,2)
Eseguitibile, n(%)	260 (65,8)
Da 9 a 12, n(%)	38 (14,6)
Da 5 a 8, n(%)	92 (35,4)
Da 0 a 4, n(%)	130 (50,0)

**Tabella 5.9**-Prevalenza dei punteggi riportati nelle scale valutate nella popolazione del Mugello

Nelle figure seguenti (Figura 5.13 e Figura 5.14) è riportata una rappresentazione grafica delle prevalenze dei punteggi ottenuti dai soggetti nei diversi gruppi considerati.

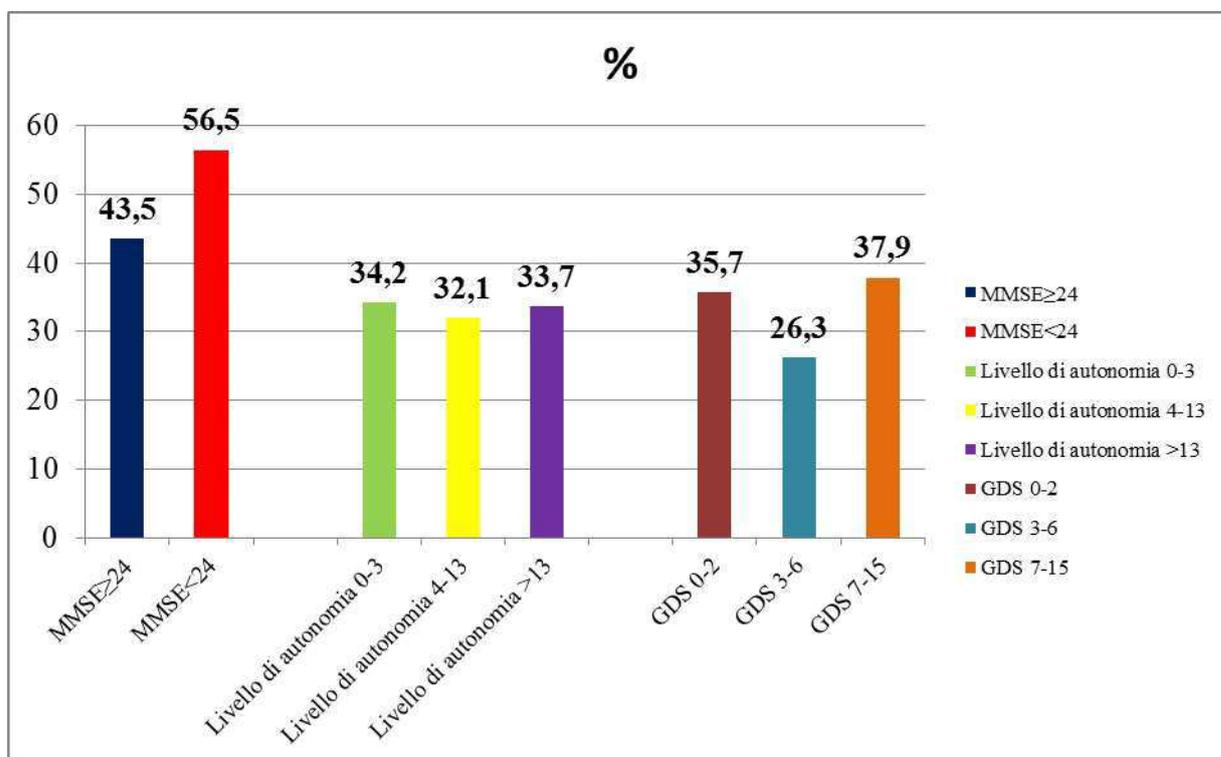


Figura 5.13-Prevalenza dei punteggi riportati nel MMSE, livello di autonomia e GDS

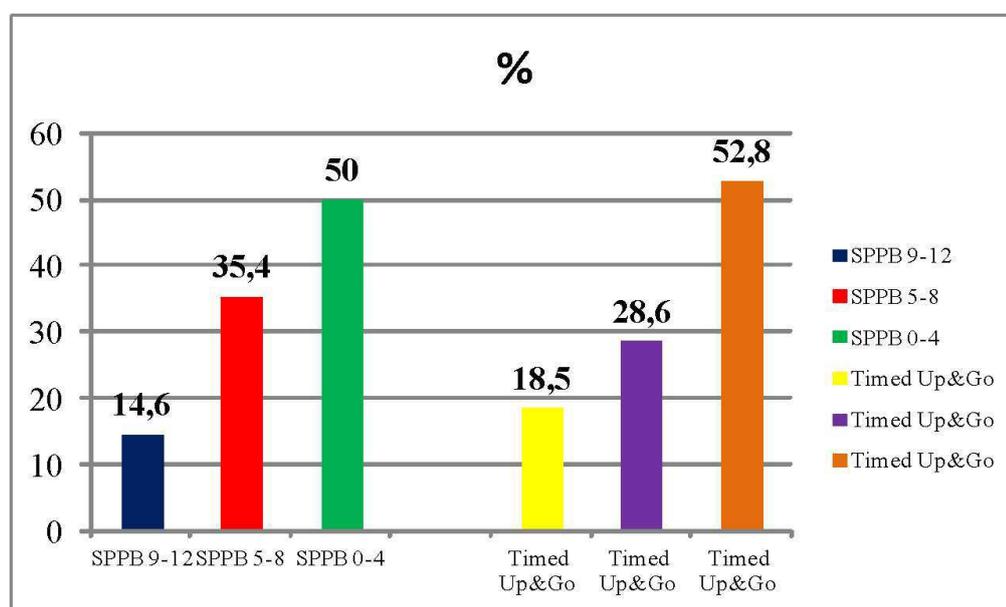


Figura 5.14-Prevalenza dei punteggi riportati nell'SPPB, e nel Timed Up&Go

**7.1.1 Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione all'anamnesi familiare**

**Cellule progenitrici circolanti**

Nella tabella seguente è riportato il numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione all'anamnesi familiare. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra il numero delle cellule progenitrici circolanti, espressa come cellule/10<sup>6</sup> eventi, e le patologie indagate all'anamnesi familiare.

<i>Anamnesi familiare</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Malattie cardiovascolari</b> No (n)=194 Si (n)=190	<b>366,5</b> (260,0-557,8) <b>358,0</b> (207,2-528,5) <b>p=0,299</b>	<b>372,5</b> (265,2-554,0) <b>363,0</b> (218,0-564,0) <b>p=0,489</b>	<b>303,0</b> (205,0-497,0) <b>303,0</b> (186,0-477,8) <b>p=0,304</b>
<b>Malattie Respiratorie</b> No (n)= 308 Si (n)= 63	<b>370,0</b> (227,8-550,0) <b>363,0</b> (220,0-557,0) <b>p= 0,717</b>	<b>375,0</b> (237,0-563,0) <b>361,0</b> (237,0-523,0) <b>p= 0,460</b>	<b>303,0</b> (193,0-497,0) <b>300,0</b> (17,0-437,0) <b>p= 0,552</b>
<b>Malattie cerebrovascolari</b> No (n)=282 Si (n)=88	<b>375,0</b> (225,8-563,0) <b>328,5</b> (237,0-512,2) <b>p= 0,239</b>	<b>375,0</b> (226,0-563,0) <b>355,0</b> (237,0-541,8) <b>p= 0,553</b>	<b>306,0</b> (197,5-500,8) <b>283,5</b> (189,2-435,2) <b>p= 0,155</b>
<b>Demenza</b> No (n)= 319 Si (n)= 48	<b>363,0</b> (215,0-550,0) <b>398,5</b> (267,0-589,5) <b>p= 0,171</b>	<b>372,0</b> (220,0-563,0) <b>376,0</b> (273,2-559,2) <b>p= 0,354</b>	<b>303,0</b> (193,0-492,0) <b>336,0</b> (201,2-496,0) <b>p= 0,386</b>
<b>Malattie Oncologiche</b> No (n)= 161 Si (n)= 222	<b>375,0</b> (246,0-565,0) <b>350,0</b> (203,8-547,8) <b>p= 0,106</b>	<b>400,0</b> (263,5-578,5) <b>355,0</b> (208,8-554,0) <b>p= 0,037</b>	<b>303,0</b> (197,0-501,5) <b>302,5</b> (190,0-477,0) <b>p= 0,370</b>

**Tabella XI-Numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione all'anamnesi familiare**

### Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti

Nella tabella seguente (Tabella 5.10) è riportato il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti in relazione all' anamnesi familiare. È possibile osservare una differenza significativa fra il numero delle cellule CD34+/CD133+/KDR+ in relazione alla presenza o meno nell'anamnesi familiare di patologie cardiovascolari, mentre, le cellule CD133+/KDR+ sono risultate essere inferiori nei soggetti con anamnesi familiare positiva per malattie cardiovascolari, senza, tuttavia, raggiungere la significatività statistica. Relativamente al numero di cellule progenitrici endoteliali è possibile valutare come questo differisca relativamente alla presenza di patologie oncologiche, risultando, tale numero, inferiore in chi ha una storia familiare positiva, senza raggiungere il livello di significatività statistica.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per quanto riguarda le CEC in relazione all'anamnesi familiare

<i>Anamnesi familiare</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/</u> <u>KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Malattie cardiovascolari</b> No (n)=194 Si (n)=190	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,107</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,078</b>	<b>2,0</b> (0,0-6,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,047</b>	<b>3,0</b> (0,0-8,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,250</b>
<b>Malattie Respiratorie</b> No (n)= 308 Si (n)= 63	<b>1,0</b> (0,0-4,8) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,660</b>	<b>0,0</b> (0,0-4,8) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,489</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,783</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,679</b>
<b>Malattie cerebrovascolari</b> No (n)=282 Si (n)=88	<b>2,5</b> (0,0-6,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,286</b>	<b>2,0</b> (0,0-6,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,197</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,074</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,424</b>
<b>Demenza</b> No (n)= 319 Si (n)= 48	<b>3,0</b> (0,0-6,0) <b>2,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,585</b>	<b>0,0</b> (0,0-6,0) <b>1,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,580</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,355</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,8) <b>p= 0,585</b>
<b>Malattie Oncologiche</b> No (n)= 161 Si (n)= 222	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,050</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,086</b>	<b>2,0</b> (0,0-6,5) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,083</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,422</b>

**Tabella 5.10**-Numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endotelali circolanti in relazione all'anamnesi familiare

### ***7.1.2 Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione all'anamnesi patologica***

#### **Cellule progenitrici circolanti**

Nelle tabelle seguenti (Tabella 5.11 e Tabella 5.12) è riportato il numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione all'anamnesi patologica. È stato osservato un numero significativamente più elevato di cellule progenitrici circolanti nei soggetti dislipidemici rispetto ai non dislipidemici, raggiungendo la significatività statistica solo per le CD34+ e le CD133+. Mentre non è stata osservata alcuna differenza significativa nel numero di tali cellule in relazione alla presenza delle altre patologie indagate.

<i>Anamnesi patologica 1/2</i>	<b>CD34+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Infarto del miocardio</b> No (n)=331 Si (n)=57	<b>363,0</b> (223,0-547,0) <b>380,0</b> (260,0-578,0) <b>p= 0,548</b>	<b>368,0</b> (239,0-550,0) <b>453,0</b> (275,0-582,0) <b>p= 0,399</b>	<b>303,0</b> (197,0-490,0) <b>303,0</b> (220,0-481,5) <b>p= 0,781</b>
<b>Insufficienza cardiaca</b> No (n)=300 Si (n)=89	<b>365,0</b> (230,8-547,0) <b>350,0</b> (231,0-565,0) <b>p=0,771</b>	<b>373,5</b> (242,0-550,0) <b>353,0</b> (238,5-593,5) <b>p=0,613</b>	<b>303,0</b> (198,0-481,5) <b>310,0</b> (193,0-498,5) <b>p=0,488</b>
<b>Malattia vascolare periferica</b> No (n)=314 Si (n)=75	<b>363,0</b> (223,0-547,0) <b>380,0</b> (260,0-578,0) <b>p=0,113</b>	<b>368,0</b> (239,0-550,0) <b>453,0</b> (275,0-582,0) <b>p=0,066</b>	<b>303,0</b> (197,0-490,0) <b>303,0</b> (220,0-481,5) <b>p=0,074</b>
<b>Ipertensione</b> No (n)=163 Si (n)=237	<b>363,0</b> (264,0-553,0) <b>353,0</b> (210,5-546,0) <b>p= 0,171</b>	<b>370,0</b> (269,0-560,0) <b>363,0</b> (214,0-557,0) <b>p= 0,249</b>	<b>303,0</b> (202,0-492,0) <b>303,0</b> (189,5-478,5) <b>p= 0,394</b>
<b>Dislipidemia</b> No (n)=340 Si (n)=43	<b>348,0</b> (224,0-547) <b>447,0</b> (332,0-583,0) <b>p= 0,046</b>	<b>360,0</b> (237,5-550,0) <b>502,0</b> (320,0-610,0) <b>p= 0,027</b>	<b>303,0</b> (196,2-488,0) <b>397,0</b> (263,0-545,0) <b>p= 0,085</b>
<b>Demenza</b> No (n)=326 Si (n)=59	<b>363,0</b> (232,8-545,0) <b>375,0</b> (215,0-590,0) <b>p=0,700</b>	<b>372,5</b> (247,2-557,0) <b>333,0</b> (205,0-583,0) <b>p=0,772</b>	<b>303,0</b> (198,0-480,0) <b>296,0</b> (189,0-517,0) <b>p=0,824</b>
<b>Malattia cerebrovascolare</b> No (n)=305 Si (n)=83	<b>370,0</b> (246,5-547,5) <b>333,0</b> (202,0-583,0) <b>p=0,540</b>	<b>375,0</b> (260,0-550,0) <b>323,0</b> (200,0-590,0) <b>p=0,626</b>	<b>306,0</b> (200,0-487,0) <b>290,0</b> (177,0-542,0) <b>p=0,753</b>
<b>Diabete senza danno d'organo</b> No (n)=347 Si (n)=39	<b>368,0</b> (230,0-550,0) <b>330,0</b> (202,0-487,0) <b>p=0,252</b>	<b>370,0</b> (240,0-557,0) <b>375,0</b> (198,0-550,0) <b>p=0,453</b>	<b>303,0</b> (198,0-492,0) <b>240,0</b> (170,0-467,0) <b>p=0,166</b>
<b>Diabete con danno d'organo</b> No (n)=368 Si (n)=17	<b>367,5</b> (237,8-547,8) <b>243,0</b> (194,0-605,0) <b>p=0,603</b>	<b>373,5</b> (250,0-557,0) <b>272,0</b> (194,0-558,5) <b>p=0,338</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>200,0</b> (161,0-495,0) <b>p=0,481</b>
<b>Malattia renale moderata o grave</b> No (n)=364 Si (n)=19	<b>360,0</b> (230,0-547,0) <b>433,0</b> (303,0-563,0) <b>p=0,350</b>	<b>370,0</b> (240,0-557,0) <b>450,0</b> (303,0-567,0) <b>p=0,325</b>	<b>303,0</b> (198,0-488,0) <b>393,0</b> (196,0-500,0) <b>p=0,549</b>

**Tabella 5.11-**Numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione all'anamnesi patologica

<i>Anamnesi patologica 2/2</i>	<b>CD34+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Malattia polmonare cronica</b> No (n)=332 Si (n)=53	<b>356,5</b> (232,3-547,0) <b>380,0</b> (221,0-568,0) <b>p=0,586</b>	<b>363,0</b> (245,8-556,0) <b>420,0</b> (221,0-582,0) <b>p=0,515</b>	<b>302,5</b> (198,0-484,5) <b>357,0</b> (190,5-502,0) <b>p=0,413</b>
<b>Malattia del tessuto connettivo</b> No (n)=370 Si (n)=10	<b>367,5</b> (230,5-547,8) <b>406,5</b> (237,5-785,8) <b>p=0,633</b>	<b>371,0</b> (241,3-556,0) <b>511,5</b> (252,5-807,5) <b>p=0,291</b>	<b>303,0</b> (198,0-488,0) <b>400,5</b> (182,5-553,5) <b>p=0,582</b>
<b>Ulcera</b> No (n)=330 Si (n)=59	<b>360,0</b> (225,0-549,0) <b>397,0</b> (250,0-553,0) <b>p=0,692</b>	<b>368,0</b> (239,5-557,0) <b>397,0</b> (250,0-557,0) <b>p=0,656</b>	<b>303,0</b> (197,5-490,0) <b>337,0</b> (198,0-490,0) <b>p=0,458</b>
<b>Epatopatie lievi</b> No (n)=362 Si (n)=21	<b>369,0</b> (231,5-550,0) <b>323,0</b> (215,0-486,5) <b>p=0,382</b>	<b>372,5</b> (243,8-557,0) <b>323,0</b> (215,0-555,0) <b>p=0,763</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>303,0</b> (180,0-479,0) <b>p=0,812</b>
<b>Epatopatia moderata o grave</b> No (n)=380 Si (n)=3	<b>367,5</b> (230,5-550,0) <b>342,0</b> (170,0- ) <b>p=0,602</b>	<b>372,5</b> (241,3-557,0) <b>342,0</b> (170,0- ) <b>p=0,523</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>300,0</b> (170,0- ) <b>p=0,834</b>
<b>Tumore</b> No (n)=329 Si (n)=53	<b>350,0</b> (220,0-547,0) <b>459,0</b> (291,5-568,5) <b>p= 0,073</b>	<b>363,0</b> (231,5-551,5) <b>490,0</b> (288,5-565,0) <b>p= 0,101</b>	<b>303,0</b> (194,5-491,0) <b>397,0</b> (241,5-487,0) <b>p= 0,233</b>
<b>Leucemia</b> No (n)=381 Si (n)=1	<b>367,0</b> (231,0-550,0) <b>487,0</b> (487,0-487,0) <b>p= 0,559</b>	<b>372,0</b> (242,5-557,0) <b>550,0</b> (550,0-550,0) <b>p= 0,417</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>140,0</b> (140,0-140,0) <b>p= 0,160</b>
<b>Metastasi</b> No (n)=381 Si (n)=1	<b>368,0</b> (232,5-550,0) <b>212,0</b> (212,0-212,0) <b>p=0,308</b>	<b>373,0</b> (246,5-557,0) <b>220,0</b> (220,0-220,0) <b>p=0,327</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>171,0</b> (171,0-171,0) <b>p=0,291</b>

**Tabella 5.12-**Numero delle cellule progenitrici in relazione all'anamnesi patologica

### **Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti**

Nelle tabelle seguenti (Tabella 5.13 e Tabella 5.14) è riportato il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti in relazione all'anamnesi patologica. È stata evidenziata una differenza significativa nel numero di cellule progenitrici endoteliali in relazione alla presenza di demenza con un numero ridotto di tali cellule nei soggetti affetti da demenza. Il numero delle cellule progenitrici nei soggetti affetti da malattie cerebrovascolari è risultato essere superiore rispetto ai soggetti senza patologie cerebrovascolari, ma non ha raggiunto la significatività statistica.

Il numero di cellule endoteliali circolanti è risultato essere significativamente superiore nei soggetti affetti da malattia renale moderata o grave, nei pazienti con malattia del tessuto connettivo e nei pazienti con epatopatia moderata o grave.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa del numero di cellule progenitrici endoteliali e cellule endoteliali circolanti in relazione alle altre patologie.

<i>Anamnesi patologica 1/2</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/ KDR±</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Infarto del miocardio</b> No (n)=331 Si (n)=57	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-5,0) <b>p= 0,506</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>p= 0,874</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>p= 0,797</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-10,0) <b>p= 0,391</b>
<b>Insufficienza cardiaca</b> No (n)=300 Si (n)=89	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,5) <b>p=0,474</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,351</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,482</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,106</b>
<b>Malattia vascolare periferica</b> No (n)=314 Si (n)=75	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,446</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>p=0,520</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>p=0,544</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-10,0) <b>p=0,090</b>
<b>Ipertensione</b> No (n)=163 Si (n)=237	<b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,945</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,786</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,994</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,610</b>
<b>Dislipidemia</b> No (n)=340 Si (n)=43	<b>0,0</b> (0,0-3,8) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,663</b>	<b>0,0</b> (0,0-4,8) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,306</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,334</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,997</b>
<b>Demenza</b> No (n)=326 Si (n)=59	<b>1,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,025</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,036</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,028</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,752</b>
<b>Malattia cerebrovascolare</b> No (n)=305 Si (n)=83	<b>2,0</b> (0,0-3,5) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,053</b>	<b>2,0</b> (0,0-3,5) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,053</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,062</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-8,0) <b>p=0,631</b>
<b>Diabete senza danno d'organo</b> No (n)=347 Si (n)=39	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,481</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-6,0) <b>p=0,479</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,399</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,399</b>
<b>Diabete con danno d'organo</b> No (n)=368 Si (n)=17	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,372</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,355</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,472</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,510</b>
<b>Malattia renale moderata o grave</b> No (n)=364 Si (n)=19	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,768</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,739</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,927</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>7,0</b> (2,0-10,0) <b>p=0,047</b>

**Tabella 5.13-**Numero delle cellule progenitrici endoteliali e cellule endotelali circolanti in relazione all'anamnesi patologica

<i>Anamnesi patologica 2/2</i>	<b>CD34+/KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+/KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+/KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CEC</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Malattia polmonare cronica</b> No (n)=332 Si (n)=53 p=0,917	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0)	0,0 (0,0-4,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,738	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,768	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-9,0) p=0,318
<b>Malattia del tessuto connettivo</b> No (n)=370 Si (n)=10 p=0,453	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-3,0) 1,5 (0,0-4,0) p=0,895	0,0 (0,0-3,0) 1,5 (0,0-4,0) p=0,778	3,0 (0,0-7,0) 7,0 (3,0-10,0) p=0,047
<b>Ulcera</b> No (n)=330 Si (n)=59 p=0,271	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,231	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,108	3,0 (0,0-7,0) 7,0 (3,0-10,0) p=0,293
<b>Epatopatie lievi</b> No (n)=362 Si (n)=21 p=0,674	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-4,5)	0,0 (0,0-3,0) 2,0 (0,0-3,5) p=0,910	0,0 (0,0-3,0) 2,0 (0,0-3,0) p=0,819	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-10,0) p=0,133
<b>Epatopatia moderata o grave</b> No (n)=380 Si (n)=3 p=0,039	0,0 (0,0-3,0) 7,0 (3,0- )	0,0 (3,0-3,0) 10,0 (0,0- ) p=0,155	0,0 (0,0-3,0) 7,0 (0,0- ) p=0,248	3,0 (0,0-7,0) 0,0 (0,0-0,0) p=0,045
<b>Tumore</b> No (n)=329 Si (n)=53 p= 0,093	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-7,0)	0,0 (0,0-3,0) 2,0 (0,0-7,0) p= 0,201	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-7,0) p= 0,178	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,0) p= 0,264
<b>Leucemia</b> No (n)=381 Si (n)=1 p= 0,365	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0) p= 0,375	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0) p= 0,390	3,0 (0,0-7,0) 7,0 (7,0-7,0) p= 0,388
<b>Metastasi</b> No (n)=381 Si (n)=1 p=0,365	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0) p=0,375	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-0,0) p=0,390	3,0 (0,0-7,0) 0,0 (0,0-0,0) p=0,246

**Tabella 5.14-**Numero delle cellule progenitrici endoteliali e cellule endoteliali circolanti in relazione all'anamnesi patologica

### 7.1.3 *Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione all'anamnesi farmacologica*

#### **Cellule progenitrici circolanti**

Nelle tabelle seguenti (Tabella 5.15 e Tabella 5.16) è riportato il valore delle cellule progenitrici circolanti in relazione alla terapia farmacologica assunta dai partecipanti allo studio. Il numero delle cellule progenitrici circolanti è risultato essere significativamente più elevato nei soggetti in trattamento con farmaci antidiabetici, nei soggetti terapia con insulina e nei soggetti in trattamento con i farmaci antiparkinson. Nei pazienti in trattamento con benzodiazepine è possibile osservare un numero di cellule

CD34+, CD133+ e CD34+/CD133+ superiore rispetto a chi non è in terapia, senza, però, raggiungere la significatività statistica.

Relativamente alle altre classi di farmaci non è stata osservata alcuna differenza significativa nel numero delle cellule progenitrici.

<i>Farmaci 1/2</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Diuretici</b> No (n)=203 Si (n)=209	<b>363,0</b> (230,0-532,0) <b>347,0</b> (217,5-565,0) <b>p=0,741</b>	<b>372,0</b> (245,0-547,0) <b>350,0</b> (227,0-567,0) <b>p=0,984</b>	<b>303,0</b> (197,0-476,0) <b>300,0</b> (191,5-497,0) <b>p=0,878</b>
<b>β-Bloccanti</b> No (n)=353 Si (n)=52	<b>360,0</b> (231,0-549,0) <b>334,5</b> (203,5-513,0) <b>p=0,247</b>	<b>363,0</b> (244,0-557,0) <b>348,0</b> (202,2-557,0) <b>p=0,404</b>	<b>303,0</b> (198,0-490,0) <b>301,5</b> (161,2-425,5) <b>p=0,285</b>
<b>Calcio-antagonisti</b> No (n)=338 Si (n)=74	<b>355,0</b> (229,2-547,2) <b>350,0</b> (200,2-555,5) <b>p=0,789</b>	<b>360,0</b> (237,0-551,8) <b>401,5</b> (218,8-567,0) <b>p=0,762</b>	<b>303,0</b> (196,8-489,2) <b>285,0</b> (169,2-492,5) <b>p=0,649</b>
<b>ACE-inibitori</b> No (n)=260 Si (n)=152	<b>356,5</b> (224,0-556,0) <b>349,5</b> (220,0-520,0) <b>p=0,665</b>	<b>360,0</b> (230,75-559,2) <b>374,0</b> (239,75-557,0) <b>p=0,882</b>	<b>302,0</b> (191,5-496,0) <b>303,0</b> (193,0-476,8) <b>p=0,863</b>
<b>Nitroderivati</b> No (n)=321 Si (n)=91	<b>368,0</b> (218,0-550,0) <b>333,0</b> (232,0-515,0) <b>p=0,469</b>	<b>375,0</b> (228,5-557,0) <b>329,0</b> (240,0-567,0) <b>p=0,532</b>	<b>305,0</b> (190,0-492,0) <b>290,0</b> (193,0-459,0) <b>p=0,337</b>
<b>Anticoagulanti orali</b> No (n)=391 Si (n)=21	<b>350,0</b> (223,0-547,0) <b>374,0</b> (219,0-582,0) <b>p=0,507</b>	<b>360,0</b> (230,0-557,0) <b>430,0</b> (244,0-567,0) <b>p=0,578</b>	<b>303,0</b> (190,0-483,0) <b>320,0</b> (202,5-567,0) <b>p=0,481</b>

**Tabella 5.15-**Numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione all'anamnesi farmacologica

<i>Farmaci 2/2</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Eparina</b> No (n)=369 Si (n)=43	<b>347,0</b> (219,0-546,0) <b>463,0</b> (290,0-567,0) <b>p=0,103</b>	<b>360,0</b> (228,5-557,0) <b>450,0</b> (290,0-563,0) <b>p=0,357</b>	<b>300,0</b> (190,0-478,5) <b>400,0</b> (200,0-520,0) <b>p=0,174</b>
<b>Antiaggreganti</b> No (n)=248 Si (n)=164	<b>347,0</b> (208,0-547,0) <b>371,5</b> (252,5-553,0) <b>p=0,298</b>	<b>346,0</b> (215,8-550,0) <b>393,5</b> (260,0-567,0) <b>p=0,151</b>	<b>301,0</b> (172,5-487,2) <b>305,0</b> (205,0-490,0) <b>p=0,301</b>
<b>Antidislipidemic</b> No (n)=379 Si (n)=33	<b>347,0</b> (218,0-545,0) <b>467,0</b> (362,5-673,0) <b>p=0,002</b>	<b>347,0</b> (223,0-550,0) <b>532,0</b> (362,5-655,0) <b>p=0,001</b>	<b>298,0</b> (190,0-480,0) <b>433,0</b> (301,5-572,0) <b>p=0,002</b>
<b>Insulina</b> No (n)=397 Si (n)=15	<b>363,0</b> (232,0-550,0) <b>198,0</b> (167,0-317,0) <b>p=0,002</b>	<b>372,0</b> (240,0-558,5) <b>198,0</b> (173,0-277,0) <b>p=0,004</b>	<b>303,0</b> (198,0-492,0) <b>170,0</b> (130,0-200,0) <b>p=0,001</b>
<b>Antidiabetici orali</b> No (n)=371 Si (n)=41	<b>353,0</b> (220,0-547,0) <b>347,0</b> (246,5-565,0) <b>p=0,871</b>	<b>360,0</b> (230,0-557,0) <b>377,0</b> (247,5-563,0) <b>p=0,916</b>	<b>303,0</b> (193,0-489,0) <b>245,0</b> (191,5-494,0) <b>p=0,997</b>
<b>Benzodiazepine</b> No (n)=341 Si (n)=71	<b>347,0</b> (213,0-546,0) <b>413,0</b> (291,0-597,0) <b>p=0,111</b>	<b>347,0</b> (223,0-549,0) <b>413,0</b> (297,0-600,0) <b>p=0,047</b>	<b>299,0</b> (190,0-480,0) <b>360,0</b> (202,0-550,0) <b>p=0,080</b>
<b>Antipertensivi</b> No (n)=327 Si (n)=85	<b>347,0</b> (223,0-550,0) <b>410,0</b> (202,0-547,5) <b>p=0,507</b>	<b>350,0</b> (233,0-557,0) <b>403,0</b> (220,5-563,0) <b>p=0,640</b>	<b>300,0</b> (193,0-480,0) <b>360,0</b> (173,5-497,5) <b>p=0,339</b>
<b>Antiparkinson</b> No (n)=394 Si (n)=18	<b>347,0</b> (219,5-547,0) <b>481,5</b> (379,8-616,8) <b>p=0,043</b>	<b>350,0</b> (227,0-554,0) <b>535,0</b> (415,0-602,5) <b>p=0,029</b>	<b>300,0</b> (190,0-489,2) <b>396,0</b> (301,5-528,2) <b>p=0,069</b>

**Tabella 5.16-**Numero delle cellule progenitrici in relazione all'anamnesi farmacologica

### Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti

Nelle tabelle seguenti (Tabella 5.17 e Tabella 5.18) è riportato il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti in relazione alla terapia farmacologica. Non è stata osservata alcuna differenza significativa nel numero di tali gruppi di cellule in relazione alle classi di farmaci assunti dalla popolazione oggetto di studio.

<i>Farmaci 1/2</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/ KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Diuretici</b> No (n)=203 Si (n)=209	<b>3,0</b> (0,0-6,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,259</b>	<b>2,0</b> (0,0-6,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,153</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,309</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,058</b>
<b>β-Bloccanti</b> No (n)=353 Si (n)=52	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-6,8) <b>p=0,399</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-6,8) <b>p=0,662</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-6,0) <b>p=0,627</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,253</b>
<b>Calcio-antagonisti</b> No (n)=338 Si (n)=74	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,452</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,640</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-5,2) <b>p=0,722</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,518</b>
<b>ACE-inibitori</b> No (n)=260 Si (n)=152	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,096</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,112</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>2,0</b> (0,0-6,0) <b>p=0,131</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,564</b>
<b>Nitroderivati</b> No (n)=321 Si (n)=91	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,423</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,238</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,440</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,969</b>
<b>Anticoagulanti orali</b> No (n)=391 Si (n)=21	<b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,077</b>	<b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,180</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,141</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-10,0) <b>p=0,474</b>

**Tabella 5.17**-Numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endotelali circolanti in relazione all'anamnesi farmacologica

<i>Farmaci 2/2</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/ KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Eparina</b> No (n)=369 Si (n)=43	2,0 (0,0-4,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,266	0,0 (0,0-4,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,320	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,471	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-5,0) p=0,541
<b>Antiaggreganti</b> No (n)=248 Si (n)=164	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,8) p=0,962	0,0 (0,0-3,8) 0,0 (0,0-3,8) p=0,654	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,620	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,954
<b>Antidislipidemici</b> No (n)=379 Si (n)=33	0,0 (0,0-5,0) 3,0 (0,0-3,0) p=0,739	0,0 (0,0-5,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,415	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,605	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,495
<b>Insulina</b> No (n)=397 Si (n)=15	0,0 (0,0-3,5) 0,0 (0,0-3,0) p=0,324	0,0 (0,0-4,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,362	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,454	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-8,0) p=0,716
<b>Antidiabetici orali</b> No (n)=371 Si (n)=41	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-5,0) p=0,933	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-7,0) p=0,867	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,706	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,5) p=0,533
<b>Benzodiazepine</b> No (n)=341 Si (n)=71	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-4,0) p=0,927	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-5,0) p=0,878	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-4,0) p=0,753	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,837
<b>Antidepressivi</b> No (n)=327 Si (n)=85	0,0 (0,0-3,0) 3,0 (0,0-6,0) p=0,443	0,0 (0,0-3,0) 2,0 (0,0-5,5) p=0,354	0,0 (0,0-3,0) 2,0 (0,0-4,5) p=0,439	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (0,0-7,0) p=0,647
<b>Antiparkinson</b> No (n)=394 Si (n)=18	1,0 (0,0-4,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,079	0,0 (0,0-4,2) 0,0 (0,0-3,0) p=0,072	0,0 (0,0-3,0) 0,0 (0,0-3,0) p=0,106	3,0 (0,0-7,0) 3,0 (2,2-7,2) p=0,498

**Tabella 5.18-**Numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endotelali circolanti in relazione all'anamnesi farmacologica

**7.1.4 Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali e le variabili antropometriche**

**Cellule progenitrici circolanti**

Nella tabella seguente (Tabella 5.19) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e le variabili antropometriche. Non è stata osservata alcuna correlazione significativa fra il numero di tali cellule e le variabili antropometriche analizzate.

<i>Variabili antropometriche</i>	<b><u>CD34+</u> cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>	<b><u>CD133+</u> cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>	<b><u>CD34+/CD133+</u> cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>
<b>Età (anni)</b>	r= -0,010 p= 0,832	r= 0,001 p= 0,989	r= -0,001 p= 0,992
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	r= 0,034 p= 0,510	r= 0,018 p= 0,727	r= 0,017 p= 0,735
<b>Circonferenza del polpaccio (cm)</b>	r= -0,024 p= 0,629	r= -0,015 p= 0,757	r= -0,009 p= 0,857
<b>Circonferenza addominale (cm)</b>	r= 0,057 p= 0,252	r= 0,052 p= 0,299	r= 0,005 p= 0,924
<b>Circonferenza della coscia (cm)</b>	r= -0,065 p= 0,194	r= -0,066 p= 0,192	r= -0,032 p= 0,520
<b>Circonferenza del braccio (cm)</b>	r= 0,058 p= 0,245	r= 0,059 p= 0,238	r= 0,010 p= 0,846
<b>Circonferenza fianchi (cm)</b>	r= 0,048 p= 0,343	r= 0,048 p= 0,336	r= -0,001 p= 0,990
<b>Lunghezza arto inferiore (cm)</b>	r= -0,037 p= 0,552	r= -0,038 p= 0,540	r= -0,042 p= 0,499
<b>Plica Tricipitale (mm)</b>	r= -0,015 p= 0,775	r= -0,032 p= 0,551	r= -0,003 p= 0,956
<b>Plica Sovrascapolare (mm)</b>	r= 0,026 p= 0,630	r= 0,002 p= 0,976	r= 0,030 p= 0,580
<b>Handgrip* (Kg)</b>	r= 0,008 p= 0,874	r= 0,017 p= 0,751	r= -0,002 p= 0,963

**Tabella 5.19-**Numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione alle variabili antropometriche

### Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti

Nella tabella seguente (Tabella 5.20) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici e le variabili antropometriche e la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali circolanti e le variabili antropometriche.

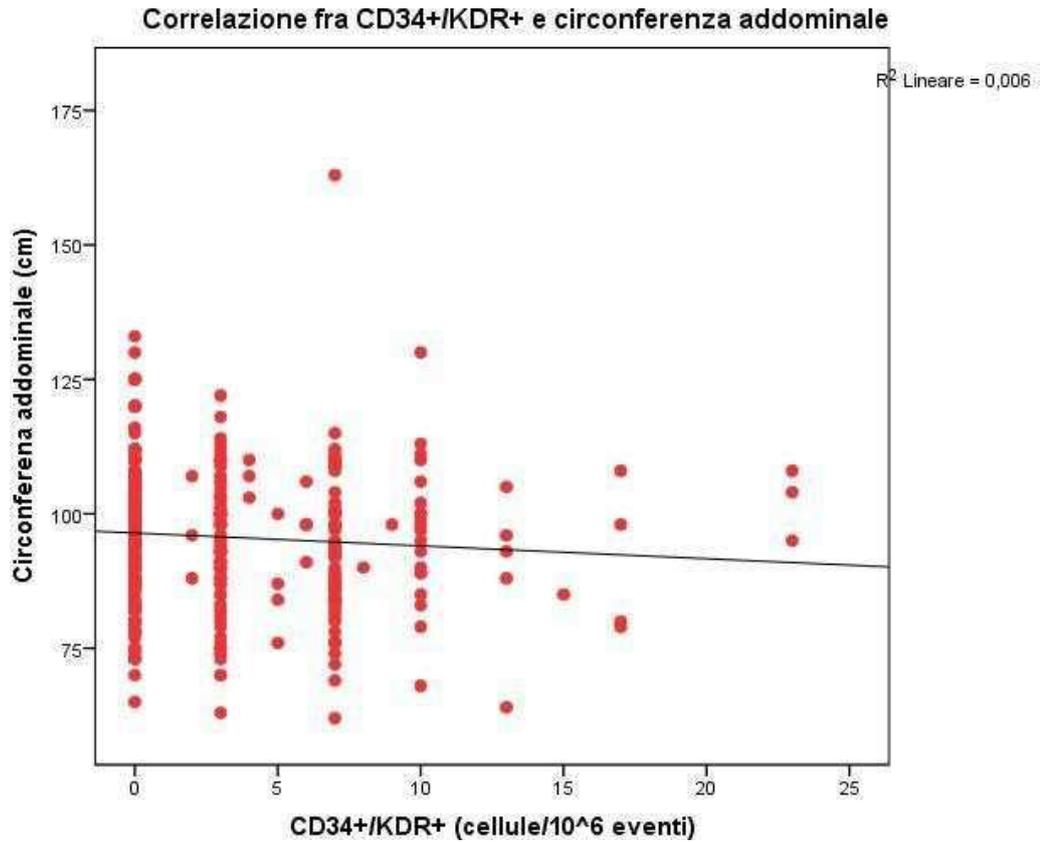
Il numero delle cellule progenitrici endoteliali è risultato correlare positivamente con la circonferenza addominale, raggiungendo la significatività statistica, mentre non è possibile osservare una correlazione significativa con gli altri parametri.

È stata osservata una correlazione positiva tra l'età e il numero delle cellule endoteliali circolanti, che però non ha raggiunto la significatività statistica.

<i>Variabili antropometriche</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/</u> <u>KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup>	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Età (anni)</b>	r= -0,021 p= 0,668	r= -0,002 p= 0,974	r= -0,009 p= 0,849	r= 0,089 p= 0,069
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	r= -0,002 p= 0,963	r= -0,016 p= 0,748	r= 0,013 p= 0,797	r= -0,023 p= 0,656
<b>Circonferenza del polpaccio (cm)</b>	r= 0,001 p= 0,977	r= -0,014 p= 0,774	r= 0,008 p= 0,874	r= 0,004 p= 0,932
<b>Circonferenza addominale (cm)</b>	r= -0,119 p= 0,030	r= -0,119 p= 0,017	r= -0,089 p= 0,076	r= -0,011 p= 0,819
<b>Circonferenza della coscia (cm)</b>	r= -0,020 p= 0,686	r= -0,044 p= 0,385	r= -0,018 p= 0,722	r= 0,021 p= 0,681
<b>Circonferenza del braccio (cm)</b>	r= 0,006 p= 0,906	r= -0,012 p= 0,817	r= 0,011 p= 0,832	r= 0,003 p= 0,953
<b>Circonferenza fianchi (cm)</b>	r= -0,055 p= 0,275	r= -0,065 p= 0,196	r= -0,033 p= 0,513	r= 0,049 p= 0,331
<b>Lunghezza arto inferiore (cm)</b>	r= -0,015 p= 0,815	r= -0,014 p= 0,816	r= -0,004 p= 0,943	r= -0,053 p= 0,392
<b>Plica Tricipitale (mm)</b>	r= -0,037 p= 0,479	r= -0,023 p= 0,665	r= -0,000 p= 0,996	r= -0,023 p= 0,665
<b>Plica Sovrascapolare (mm)</b>	r= -0,089 p= 0,098	r= -0,081 p= 0,135	r= -0,056 p= 0,297	r= -0,010 p= 0,859
<b>Handgrip* (Kg)</b>	r= 0,033 p= 0,537	r= 0,016 p= 0,757	r= 0,030 p= 0,574	r= 0,003 p= 0,961

**Tabella 5.20**-Numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endotelali circolanti in relazione alle variabili antropometriche

Nella figura seguente (Figura 5.15) è riportata una rappresentazione grafica della correlazione fra il numero delle cellule CD34+/KDR+ e la circonferenza addominale.



**Figura 5.15**-Correlazione fra CD34+/KDR+ e circonferenza addominale

**7.1.5** *Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali ed i parametri dell'emocromo*

**Cellule progenitrici circolanti**

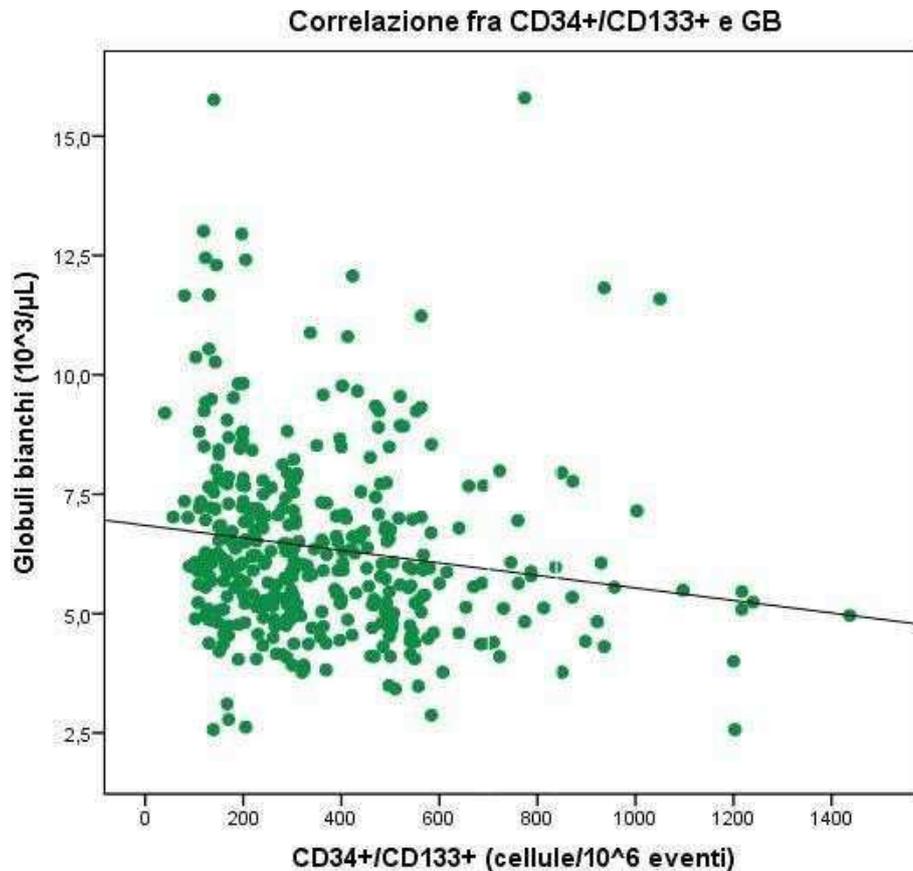
Nella tabella seguente (Tabella 5.21) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti ed i parametri dell'esame emocromocitometrico. È da segnalare una correlazione inversa, che raggiunge la significatività statistica, tra il numero di cellule progenitrici circolanti e il numero di globuli bianchi.

Relativamente agli altri parametri valutati non è stato possibile osservare alcuna correlazione statisticamente significativa.

<i>Emocromo</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	r= -0,167 p= 0,001	r= -0,134 p= 0,008	r= -0,216 p= 0,000
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	r= -0,007 p= 0,884	r= 0,007 p= 0,890	r= -0,023 p= 0,655
Ematocrito [Htc (%)]	r= 0,007 p= 0,894	r= 0,028 p= 0,580	r= 0,007 p= 0,894
Emoglobina [Hb (g/dL)]	r= 0,016 p= 0,757	r= 0,044 p= 0,390	r= 0,020 p= 0,695
MVC (fL)	r= 0,015 p= 0,767	r= 0,028 p= 0,579	r= 0,039 p= 0,445
MCH (pg)	r= 0,019 p= 0,711	r= 0,047 p= 0,359	r= 0,046 p= 0,369
RDW-CV (%)	r= -0,041 p= 0,421	r= -0,060 p= 0,241	r= -0,025 p= 0,627
Piastrine [PTL (10 <sup>3</sup> /μL)]	r= -0,047 p= 0,350	r= -0,060 p= 0,238	r= -0,033 p= 0,519

**Tabella 5.21**-Correlazione fra il numero di cellule progenitrici e l'emocromo

Nella figura seguente (Figura 5.16) è possibile osservare una rappresentazione grafica della correlazione esistente fra il numero delle cellule CD34+/CD133+ e il numero dei globuli bianchi.



**Figura 5.16-**Correlazione fra CD34+/CD133+ e numero di globuli bianchi

#### **Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti**

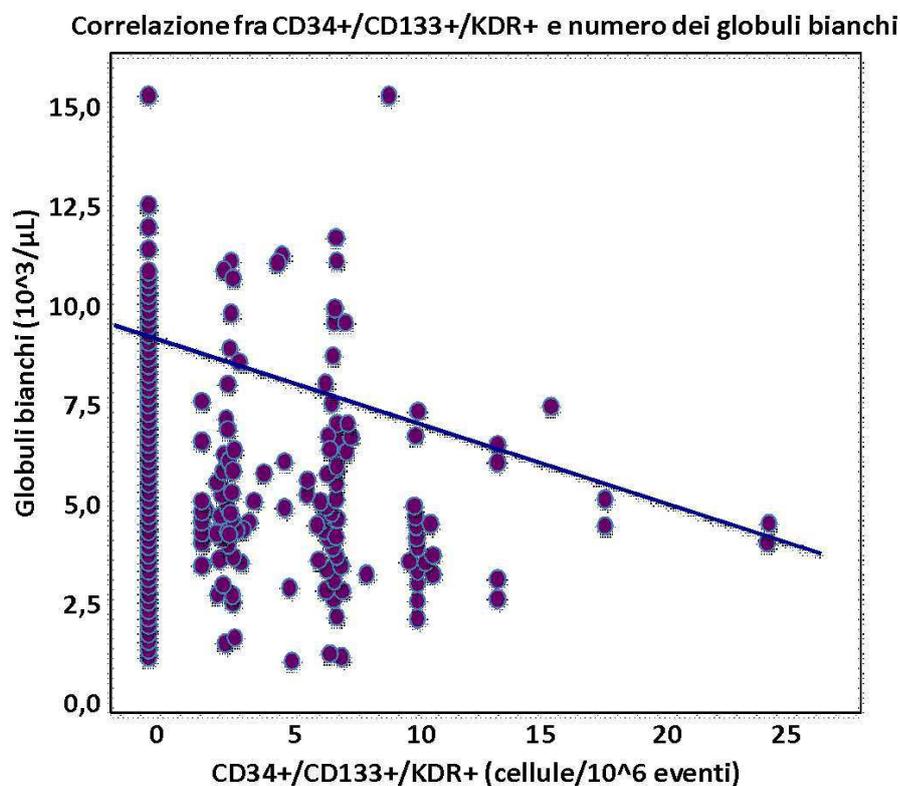
Nella tabella seguente (Tabella 5.22) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici ed i parametri dell'emocromo e la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali circolanti ed i parametri dell'emocromo. Le cellule progenitrici endoteliali risultano correlare inversamente con il numero di globuli bianchi raggiungendo la significatività statistica.

Relativamente al numero delle cellule endoteliali circolanti non è possibile evidenziare alcuna correlazione statisticamente significativa con i parametri dell'emocromo.

<i>Emocromo</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/</u> <u>KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	r= -0,129 p= 0,011	r= -0,135 p= 0,007	r= -0,132 p= 0,009	r= -0,005 p= 0,921
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	r= 0,048 p= 0,340	r= 0,042 p= 0,412	r= 0,047 p= 0,358	r= -0,033 p= 0,522
Ematocrito [Htc (%)]	r= 0,019 p= 0,715	r= 0,015 p= 0,774	r= 0,019 p= 0,714	r= -0,019 p= 0,706
Emoglobina [Hb (g/dL)]	r= 0,030 p= 0,559	r= 0,028 p= 0,586	r= 0,033 p= 0,512	r= -0,027 p= 0,600
MVC (fL)	r= -0,028 p= 0,585	r= -0,022 p= 0,668	r= -0,023 p= 0,653	r= 0,035 p= 0,495
MCH (pg)	r= -0,037 p= 0,464	r= -0,030 p= 0,559	r= -0,026 p= 0,605	r= 0,034 p= 0,501
RDW-CV (%)	r= 0,010 p= 0,850	r= -0,003 p= 0,949	r= 0,026 p= 0,608	r= -0,081 p= 0,113
Piastrine [PTL (10 <sup>3</sup> /μL)]	r= 0,016 p= 0,752	r= 0,026 p= 0,607	r= 0,028 p= 0,586	r= 0,003 p= 0,957

**Tabella 5.22**-Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti e l'emocromo

Nella figura seguente (5.17) è possibile osservare una rappresentazione grafica della correlazione esistente fra le cellule CD34+/CD133+/KDR+ e il numero dei globuli bianchi.



**Figura 5.17**-Correlazione fra CD34+/CD133+/KDR e numero di globuli bianchi

**7.1.6 Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti e la concentrazione dei lipidi plasmatici**

**Cellule progenitrici circolanti**

Nella tabella seguente (Tabella 5.23) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e le concentrazioni dei lipidi plasmatici. È stata riscontrata una correlazione inversa tra il numero di cellule progenitrici e i livelli di colesterolo totale, raggiungendo la significatività statistica per le CD133+ e una correlazione inversa con il colesterolo-LDL che ha raggiunto una significatività statistica per le CD133+ e le CD34+/CD133+.

<i>Lipidi plasmatici</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Colesterolo totale (mg/dL)</b>	r= -0,052 p= 0,389	r= -0,099 p= 0,050	r= -0,069 p= 0,172
<b>Colesterolo LDL (mg/dL)</b>	r= -0,052 p= 0,390	r= -0,151 p= 0,003	r= -0,102 p= 0,044
<b>Colesterolo HDL (mg/dL)</b>	r= -0,052 p= 0,391	r= 0,049 p= 0,339	r= 0,025 p= 0,619
<b>Trigliceridi [TG (mg/dL)]</b>	r= -0,052 p= 0,392	r= -0,081 p= 0,110	r= -0,074 p= 0,143

**Tabella 5.23**-Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici e la concentrazione dei lipidi plasmatici

**Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti**

Nella tabella seguente (Tabella 5.24) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici e la concentrazione dei lipidi plasmatici e la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali circolanti e la concentrazione dei lipidi plasmatici.

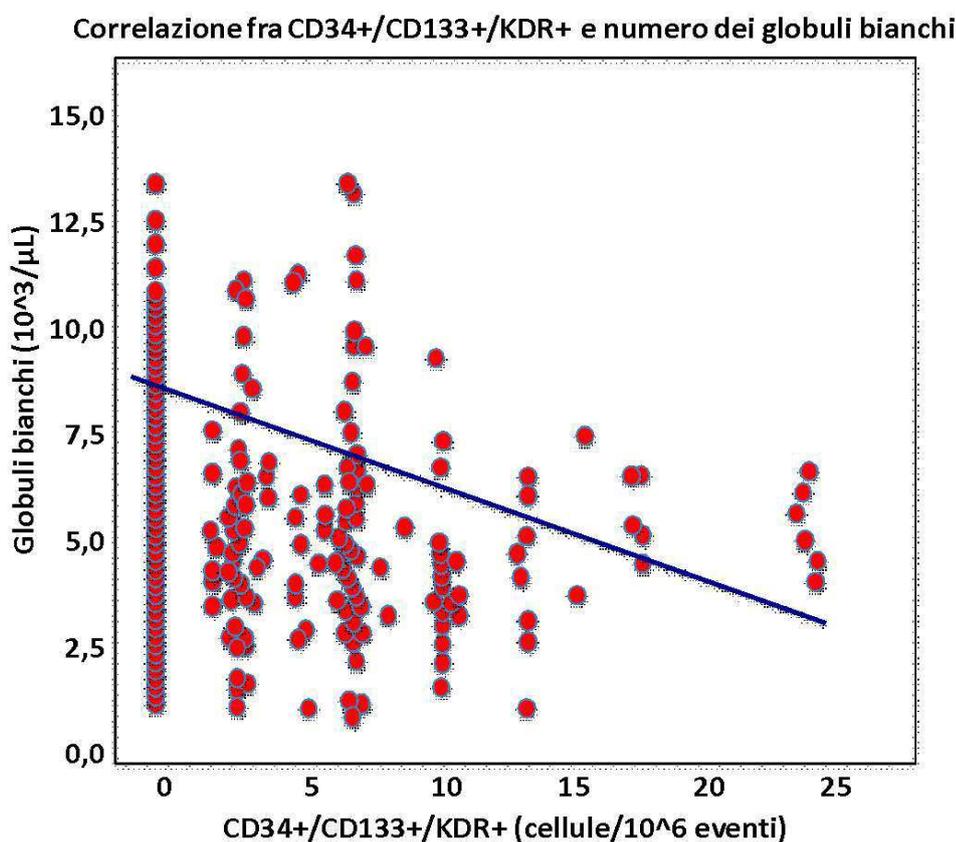
Non è possibile osservare alcuna correlazione significativa fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici e la concentrazione dei lipidi plasmatici.

È possibile osservare una correlazione inversa significativa fra il numero di cellule endoteliali circolanti e la concentrazione di colesterolo totale. Inoltre, una correlazione inversa significativa è, anche, presente fra il numero delle cellule endoteliali circolanti e la concentrazione di colesterolo LDL.

<i>Lipidi plasmatici</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/ KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
Colesterolo totale (mg/dL)	r= 0,008 p= 0,878	r= 0,005 p= 0,915	r= -0,013 p= 0,794	r= -0,131 p=0,009
Colesterolo LDL (mg/dL)	r= -0,041 p= 0,421	r= -0,037 p= 0,468	r= -0,040 p= 0,427	r= -0,113 p= 0,026
Colesterolo HDL (mg/dL)	r= 0,050 p= 0,327	r= 0,048 p= 0,349	r= 0,020 p= 0,694	r= -0,072 p= 0,159
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	r= 0,011 p= 0,832	r= 0,006 p= 0,900	r= 0,000 p= 0,994	r= -0,075 p=0,141

**Tabella 5.24**–Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti e l'assetto lipidico plasmatico

Nella figura seguente (Figura 5.18) è possibile osservare una rappresentazione grafica della correlazione esistente fra il numero di cellule endoteliali circolanti e la concentrazione di colesterolo totale.



**Figura 5.18**–Correlazione fra CEC e colesterolo totale

**7.1.7** *Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti ed altri parametri biochimici*

### Cellule progenitrici circolanti

Nella tabella seguente (Tabella 5.25) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e gli altri parametri biochimici esaminati. La Proteina C reattiva ha mostrato una correlazione inversa con le cellule progenitrici circolanti, anche se non è stata raggiunta la significatività statistica. Il potassio ha mostrato una correlazione negativa con le cellule progenitrici che, tuttavia, ha raggiunto il livello di significatività statistica solo per le CD133+/CD34+.

<i>Altri parametri biochimici</i>	<u>CD34+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
Proteina C reattiva [PCR (mg/dL)]	r= -0,097 p= 0,056	r= -0,079 p= 0,120	r= -0,093 p= 0,066
Creatinina (mg/dL)	r= -0,066 p= 0,192	r= -0,059 p= 0,242	r= -0,064 p= 0,209
Sodio (mEq/L)	r= -0,011 p= 0,834	r= -0,044 p= 0,382	r= 0,003 p= 0,955
Potassio (mEq/L)	r= -0,090 p= 0,074	r= -0,095 p= 0,061	r= -0,103 p= 0,042
Cloro (mEq/L)	r= 0,007 p= 0,883	r= 0,005 p= 0,921	r= 0,002 p= 0,969
Acido urico (mg/dL)	r= -0,052 p= 0,380	r= -0,034 p= 0,570	r= 0,006 p= 0,919
Proteine totali (g/dL)	r= -0,052 p= 0,381	r= -0,043 p= 0,396	r= -0,013 p= 0,791
Albumina (%)	r= -0,052 p= 0,382	r= -0,034 p= 0,509	r= 0,006 p= 0,900
AST (IU/L)	r= -0,052 p= 0,383	r= -0,027 p= 0,602	r= 0,010 p= 0,841
ALT (IU/L)	r= -0,052 p= 0,384	r= 0,001 p= 0,981	r= -0,002 p= 0,968
GGT (IU/L)	r= -0,052 p= 0,385	r= -0,029 p= 0,573	r= -0,023 p= 0,654
TSH (μUI/mL)	r= -0,052 p= 0,386	r= 0,041 p= 0,420	r= 0,031 p= 0,547
T3 (pg/mL)	r= -0,052 p= 0,387	r= 0,067 p= 0,189	r= 0,050 p= 0,327
T4 (ng/dL)	r= -0,052 p= 0,388	r= 0,052 p= 0,308	r= -0,026 p= 0,611
Glicemia (mg/dL)	r= -0,052 p= 0,393	r= -0,050 p= 0,327	r= -0,070 p= 0,166
HbA1C [gHb (%)]	r= -0,048 p= 0,345	r= -0,036 p= 0,475	r= -0,070 p= 0,166

**Tabella 5.25- Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici ed altri parametri biochimici**

### Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti

Nella tabella seguente (Tabella 5.26) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici e gli altri parametri biochimici valutati, e la correlazione fra questi ultimi e il numero di cellule endoteliali circolanti.

La Proteina C reattiva ha mostrato una correlazione inversa con il numero delle cellule endoteliali progenitrici e una correlazione diretta con le cellule endoteliali circolanti, anche se per entrambi i tipi cellulari non è stata raggiunta la significatività statistica.

È possibile osservare una correlazione positiva fra la glicemia e il numero delle cellule progenitrici endoteliali, che è risultata essere significativa per le cellule CD133+/KDR+ e al limite della significatività statistica per le cellule CD34+/KDR+ e le cellule CD34/CD133+/KDR+.

È stata osservata una correlazione inversa significativa fra il numero delle cellule endoteliali circolanti la concentrazione dell'ormone triiodotironina (T3).

<i>Altri parametri biochimici</i>	<u>CD34+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD133+/KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CD34+/CD133+/</u> <u>KDR+</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<u>CEC</u> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
Proteina C reattiva [PCR (mg/dL)]	r= -0,012 p=0,811	r= -0,024 p=0,630	r= -0,003 p=0,946	r= 0,077 p=0,132
Creatinina (mg/dL)	r= -0,087 p=0,085	r= -0,088 p=0,081	r= -0,069 p=0,173	r= -0,046 p=0,362
Sodio (mEq/L)	r= -0,063 p=0,213	r= -0,058 p=0,250	r= -0,060 p=0,239	r= -0,049 p=0,338
Potassio (mEq/L)	r= -0,022 p=0,658	r= -0,015 p=0,769	r= -0,017 p=0,743	r= -0,012 p=0,873
Cloro (mEq/L)	r= -0,049 p=0,335	r= -0,039 p=0,443	r= -0,041 p=0,426	r= -0,042 p=0,413
Acido urico (mg/dL)	r= 0,015 p=0,799	r= 0,010 p=0,864	r= 0,028 p=0,637	r= 0,028 p=0,637
Proteine totali (g/dL)	r= 0,086 p=0,091	r= 0,083 p=0,104	r= 0,078 p=0,125	r= -0,066 p=0,196
Albumina (%)	r= -0,028 p=0,587	r= -0,025 p=0,622	r= -0,037 p=0,470	r= 0,063 p=0,216
AST (IU/L)	r= 0,055 p=0,275	r= 0,051 p=0,318	r= 0,056 p=0,274	r= -0,045 p=0,376
ALT (IU/L)	r= 0,003 p=0,953	r= -0,005 p=0,929	r= -0,003 p=0,954	r= -0,009 p=0,856
GGT (IU/L)	r= 0,006 p=0,902	r= -0,010 p=0,852	r= -0,002 p=0,963	r= 0,076 p=0,134
TSH (μUI/mL)	r= -0,023 p=0,654	r= -0,042 p=0,410	r= -0,025 p=0,619	r= -0,012 p=0,810
T3 (pg/mL)	r= 0,021 p=0,687	r= 0,022 p=0,677	r= 0,021 p=0,677	r= -0,101 p=0,046
T4 (ng/dL)	r= -0,059 p=0,243	r= -0,061 p=0,227	r= -0,049 p=0,333	r= 0,008 p=0,875
Glicemia (mg/dL)	r= 0,099 p=0,052	r= 0,108 p=0,033	r= 0,099 p=0,050	r= -0,037 p=0,462
HbA1C [gHb (%)]	r= -0,006 p=0,907	r= -0,037 p=0,469	r= -0,051 p=0,314	r= -0,087 p=0,085

**Tabella 5.26**-Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti e altri parametri biochimici

**7.1.8 Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione ai fattori di rischio cardiovascolari**

**Cellule progenitrici circolanti**

Nella tabella seguente (Tabella 5.27) è riportato il numero delle cellule progenitrici circolanti in relazione ai fattori di rischio cardiovascolari esaminati. Il numero delle cellule progenitrici circolanti è risultato essere significativamente più elevato nei soggetti dislipidemici relativamente alla popolazione CD34+ e CD133+, mentre il numero delle cellule CD34+/133+ è risultato essere maggiore nei soggetti dislipidemici senza, tuttavia, raggiungere il livello di significatività statistica.

<i>Fattori di rischio cardiovascolari</i>	<b>CD34+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>Sesso</b> F(n)=304 M(n)=110	<b>347,0</b> (220,8-540,2) <b>381,5</b> (235,0-564,0) <b>p= 0,115</b>	<b>347,0</b> (227,0-545,0) <b>444,0</b> (265,2-607,8) <b>p= 0,017</b>	<b>303,0</b> (190,8-476,8) <b>303,0</b> (196,0-508,8) <b>p= 0,525</b>
<b>Iperensione</b> No (n)=163 Si (n)=237	<b>363,0</b> (264,0-553,0) <b>353,0</b> (210,5-546,0) <b>p= 0,171</b>	<b>370,0</b> (269,0-560,0) <b>363,0</b> (214,0-557,0) <b>p= 0,249</b>	<b>303,0</b> (202,0-492,0) <b>303,0</b> (189,5-478,5) <b>p= 0,394</b>
<b>Dislipidemia</b> No (n)=340 Si (n)=43	<b>348,0</b> (224,0-547) <b>447,0</b> (332,0-583,0) <b>p= 0,046</b>	<b>360,0</b> (237,5-550,0) <b>502,0</b> (320,0-610,0) <b>p= 0,027</b>	<b>303,0</b> (196,2-488,0) <b>397,0</b> (263,0-545,0) <b>p= 0,085</b>
<b>Diabete mellito</b> No (n)=331 Si (n)=55	<b>368,0</b> (233,0-548,0) <b>330,0</b> (201,0-550,0) <b>p=0,281</b>	<b>370,0</b> (250,0-557,0) <b>372,0</b> (198,0-550,0) <b>p=0,321</b>	<b>303,0</b> (200,0-492,0) <b>240,0</b> (177,0-480,0) <b>p=0,161</b>
<b>Esposizione Tabagica</b> No (n)=284 Progresso (n)=111 Attuale (n)=13	<b>347,0</b> (224,8-544,5) <b>370,0</b> (220,0-563,0) <b>300,0</b> (194,5-461,0) <b>p=0,169</b>	<b>350,0</b> (230,8-547,0) <b>407,0</b> (240,0-607,0) <b>300,0</b> (191,5-475,5) <b>p=0,108</b>	<b>303,0</b> (194,0-480,0) <b>302,0</b> (196,0-517,0) <b>297,0</b> (186,5-398,5) <b>p=0,389</b>

**Tabella 5.27**-Numero delle cellule progenitrici in relazione ad alcuni fattori di rischio cardiovascolari

**Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti**

Nella tabella seguente (Tabella 5.28) è riportato il numero delle cellule endoteliali progenitrici e il numero delle cellule endoteliali circolanti in relazione ai fattori di rischio cardiovascolari esaminati.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici e delle cellule endoteliali circolanti nei soggetti con fattori di rischio cardiovascolari rispetto ai soggetti senza fattori di rischio.

<i>Fattori di rischio cardiovascolari</i>	<b>CD34+/KDR+ cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>	<b>CD133+/KDR+ cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>	<b>CD34+/CD133+/ KDR+ cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>	<b>CEC cellule/10<sup>6</sup> eventi</b>
<b>Sesso</b> F(n)=304 M(n)=110	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>1,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,746</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,2) <b>p= 0,905</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-4,2) <b>p= 0,748</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,955</b>
<b>Ipertensione</b> No (n)=163 Si (n)=237	<b>0,0</b> (0,0-4,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,945</b>	<b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,786</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,994</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,610</b>
<b>Dislipidemia</b> No (n)=340 Si (n)=43	<b>0,0</b> (0,0-3,8) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,663</b>	<b>0,0</b> (0,0-4,8) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,306</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p= 0,334</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p= 0,997</b>
<b>Diabete mellito</b> No (n)=331 Si (n)=55	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,309</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,298</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>p=0,274</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>p=0,211</b>
<b>Esposizione Tabagica</b> No (n)=284 Pregresso (n)=111 Attuale (n)=13	<b>2,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>p=1,000</b>	<b>1,0</b> (0,0-5,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,846</b>	<b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-3,0) <b>0,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,852</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-7,0) <b>3,0</b> (0,0-5,0) <b>p=0,555</b>

**Tabella 5.28-**Numero delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endotelali circolanti in relazione ad alcuni fattori di rischio cardiovascolari

### **7.1.9 Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti e il punteggio ottenuto nelle scale esaminate**

#### **Cellule progenitrici circolanti**

Nella seguente tabella (Tabella 5.29) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e il punteggio ottenuto (come variabile continua) nelle scale e nei test esaminati. Nessuna correlazione significativa fra il numero di cellule progenitrici circolanti e il punteggi ottenuti.

<i>Scale e test</i>	<b>CD34+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>MMSE</b>	r= -0,050 p= 0,313	r= -0,014 p= 0,782	r= -0,035 p= 0,475
<b>Livello Autonomia</b>	r= 0,052 p= 0,310	r=0,020 p= 0,700	r= 0,025 p= 0,627
<b>GDS</b>	r= -0,051 p= 0,362	r= -0,051 p= 0,367	r= 0,003 p= 0,954
<b>SPPB</b>	r= 0,007 p= 0,907	r= 0,025 p= 0,694	r= 0,067 p= 0,283
<b>Timed Up&amp;Go</b>	r= 0,007 p= 0,917	r= -0,002 p= 0,980	r= -0,017 p= 0,791

**Tabella 5.29**-Correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e i punteggi ottenuti nelle scale e nei test valutati

### Cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti

Nella seguente tabella (Tabella 5.30) è riportata la correlazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti, delle cellule endoteliali circolanti e il punteggio ottenuto nelle scale e nei test esaminati.

È possibile una correlazione positiva fra il numero di cellule progenitrici endoteliali e il punteggio ottenuto al MMSE e fra il numero di cellule progenitrici e il livello di autonomia, che raggiungono un livello di significatività statistica sia per le CD34+/KDR+ sia per le CD133+/KDR+.

Relativamente alle cellule endoteliali circolanti è stata riscontrata una correlazione positiva significativa con il punteggio conseguito nella GDS.

Gli altri parametri, presenti in tabella, non hanno raggiunto la significatività statistica.

<i>Scale e test</i>	<b>CD34+/KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD133+/KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CD34+/CD133+/ KDR+</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi	<b>CEC</b> cellule/10 <sup>6</sup> eventi
<b>MMSE</b>	r= 0,124 p= 0,011	r= 0,100 p= 0,043	r= 0,088 p= 0,073	r= -0,049 p= 0,317
<b>Livello Autonomia</b>	r= -0,120 p= 0,020	r= -0,110 p= 0,033	r= -0,090 p= 0,080	r= 0,038 p= 0,458
<b>GDS</b>	r= -0,027 p= 0,636	r= -0,027 p= 0,634	r= -0,018 p= 0,752	r= 0,110 p= 0,049
<b>SPPB</b>	r= 0,022 p= 0,720	r= 0,013 p= 0,836	r= 0,001 p= 0,989	r= -0,056 p= 0,371
<b>Timed Up&amp;Go</b>	r= -0,046 p= 0,470	r= -0,043 p= 0,497	r= -0,027 p= 0,669	r= 0,098 p= 0,124

**Tabella 5.30**-Correlazione fra il numero delle cellule endoteliali progenitrici, delle cellule endoteliali circolanti e i punteggi ottenuti nelle scale e nei test valutati

***Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione al MMSE***

Nella tabella seguente (Tabella 5.31) è riportato il numero delle cellule progenitrici circolanti, delle cellule progenitrici endoteliali e delle cellule endoteliali circolanti in relazione al punteggio ottenuto al MMSE. Il numero delle cellule CD34+/KDR+ risulta significativamente più elevato in chi ha ottenuto un punteggio maggiore al MMSE ( $\geq 24$ ), inoltre, anche, il numero delle cellule CD133+/KDR+ è risultato essere maggiore in chi ha ottenuto un punteggio  $\geq 24$ , anche se tale differenza non raggiunge la significatività statistica.

<b><i>Cellule (cellule/10<sup>6</sup> eventi)</i></b>	<b><u>MMSE</u></b>		<b><i>P for trend</i></b>
	$\geq 24$ (assenza di deficit cognitivo)	$< 24$ (deficit cognitivo)	
<b>CD34+</b>	<b>347,0</b> (215,8-510,0)	<b>375,0</b> (224,8-566,0)	<i>p= 0,074</i>
<b>CD133+</b>	<b>348,5</b> (237,0-549,2)	<b>375,0</b> (230,8-563,0)	<i>p=0,364</i>
<b>CD34+/CD133+</b>	<b>297,0</b> (184,2-432,2)	<b>303,0</b> (197,2-501,8)	<i>p= 0,096</i>
<b>CD34+/KDR+</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,027</i>
<b>CD133+/KDR+</b>	<b>2,5</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,084</i>
<b>CD34+/CD133+/KDR+</b>	<b>0,0</b> (0,0-6,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,144</i>
<b>CEC</b>	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p= 0,593</i>

**Tabella 5.31-Numero di cellule in relazione al punteggio ottenuto al MMSE**

***Parametri biochimici e MMSE***

Nella tabella seguente (Tabella 5.32) sono riportati i livelli di alcuni parametri biochimici in relazione al punteggio ottenuto al MMSE. Sono stati documentati livelli significativamente più elevati di colesterolo totale, di colesterolo-LDL e colesterolo-HDL in chi ha ottenuto un punteggio migliore al MMSE. I valori medi, per quanto riguarda il colesterolo totale, sono stati 198,0 mg/dL nel gruppo con MMSE $\geq 24$  e 180,5 mg/dL nel gruppo con MMSE $< 24$ . I valori mediani di colesterolo LDL sono stati rispettivamente 114,0

mg/dL e 101,5 mg/dL, mentre per il colesterolo HDL sono stati 59,0 mg/dL e 53,5 mg/dL.  
Relativamente

ai trigliceridi è stato riscontrato un valore mediano di 105,0 mg/dL nel gruppo con MMSE $\geq$ 24 e 99,5 mg/dL nel gruppo con MMSE $<$ 24.

Il valore di glicemia e di emoglobina glicata (HbA1C) sono risultati essere significativamente più elevati nei soggetti che hanno raggiunto un punteggio più elevato al MMSE ( $\geq$ 24) rispetto ai soggetti con con MMSE $<$ 24.

<i>Parametri biochimici</i>	<b>MMSE</b>		<i>P for trend</i>
	$\geq$ 24 (assenza di deficit cognitivo)	$<$ 24 (deficit cognitivo)	
Proteina C reattiva[PCR (mg/dL)]	<b>0,37</b> (0,17-0,81)	<b>0,44</b> (0,20-0,80)	<i>p= 0,434</i>
Globuli bianchi [GB ( $10^3/\mu$ L)]	<b>5,9</b> (5,1-7,1)	<b>6,0</b> (5,0-7,2)	<i>p= 0,863</i>
Globuli rossi [GR ( $10^6/\mu$ L)]	<b>4,4</b> (3,9-4,7)	<b>4,3</b> (3,9-4,7)	<i>p= 0,221</i>
Ematocrito [Htc (%)]	<b>39,5</b> (36,1-41,9)	<b>38,4</b> (35,8-41,8)	<i>p= 0,248</i>
Emoglobina [Hb (g/dL)]	<b>13,1</b> (11,8-13,9)	<b>12,7</b> (11,8-14,0)	<i>p= 0,341</i>
Colesterolo totale (mg/dL)	<b>198,0</b> (167,0-227,5)	<b>180,5</b> (154,8-214,0)	<i>p= 0,003</i>
Colesterolo LDL (mg/dL)	<b>114,0</b> (90,0-139,5)	<b>101,5</b> (83,0-130,3)	<i>p= 0,025</i>
Colesterolo HDL (mg/dL)	<b>59,0</b> (49,0-70,0)	<b>53,5</b> (43,0-65,0)	<i>p= 0,002</i>
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	<b>105,0</b> (73,5-139,0)	<b>99,5</b> (76,0-133,3)	<i>p= 0,610</i>
Glicemia (mg/dL)	<b>91,0</b> (84,5-104,0)	<b>86,0</b> (79,0-96,0)	<i>p= 0,001</i>
HbA1C [gHb (%)]	<b>5,6</b> (5,2-6,2)	<b>5,4</b> (5,0-5,8)	<i>p= 0,003</i>
Linfociti/neutrofilii ratio	<b>0,45</b> (0,35-0,62)	<b>0,46</b> (0,34-0,62)	<i>p= 0,564</i>

**Tabella 5.32-**Parametri biochimici in relazione al punteggio ottenuto al MMSE

***Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione al livello di autonomia***

Nella tabella seguente (Tabella 5.33) è riportato il numero delle cellule in relazione al livello di autonomia. Il numero delle cellule progenitrici endoteliali è risultato essere significativamente maggiore ( $p<0,050$ ) nei soggetti che hanno ottenuto un punteggio compreso tra 0 e 3 nella valutazione del livello

di autonomia (soggetti autonomi), rispetto sia a quello osservato nel gruppo che ha raggiunto un punteggio compreso tra 4 e 13 (soggetti parzialmente autonomi) che rispetto a quello osservato nel gruppo con un punteggio >13 (soggetti non autonomi), raggiungendo il livello di significatività statistica per le cellule CD34+/KDR+ e raggiungendo un livello al limite della significatività statistica per le cellule CD133+/KDR+.

<i>Cellule (cellule/10<sup>6</sup> eventi)</i>	<b>Livello di autonomia</b>			<i>P for trend</i>
	0-3 (autonomo)	4-3 (parzialmente autonomo)	>13 (non autonomo)	
CD34+	<b>360,0</b> (255,0-545,0)	<b>333,0</b> (219,0-547,0=)	<b>383,0</b> (218,0-567,0)	<i>p= 0,742</i>
CD133+	<b>375,0</b> (263,5-563,0)	<b>345,0</b> (225,0-557,0)	<b>375,0</b> (215,0-577,0)	<i>p= 0,816</i>
CD34+/CD133+	<b>307,0</b> (204,0-476,5)	<b>297,0</b> (189,0-473,0)	<b>303,0</b> (190,0-507,0)	<i>p=0,540</i>
CD34+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,037</i>
CD133+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,052</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>2,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,124</i>
CRC	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p= 0,788</i>

**Tabella 5.33-**Numero delle cellule in relazione al livello di autonomia

### ***Parametri biochimici e livello di autonomia***

Nella tabella seguente (Tabella 5.34) sono riportati i valori di alcuni parametri biochimici in relazione al livello di autonomia. I livelli della Proteina C Reattiva sono risultati significativamente più elevati nei soggetti che hanno un livello di autonomia più basso (punteggio >13) rispetto sia ai soggetti con un punteggio tra 4 e 13 (soggetti parzialmente autonomi) che con un punteggio fra 0 e 3 (soggetti autonomi). I livelli di colesterolo totale sono risultati essere più elevati nei soggetti con un livello di autonomia elevato, anche se non raggiunge la significatività statistica. È stato osservato che i livelli del colesterolo HDL sono significativamente più elevati nei soggetti autonomi rispetto sia ai soggetti non autonomi ( $p < 0,010$ ) che ai soggetti parzialmente autonomi ( $p < 0,050$ ). I livelli di glicemia e di HbA1C sono risultati più elevati nei soggetti autonomi che nei soggetti non autonomi ( $p < 0,05$ ).

<i>Parametri biochimici</i>	<b>Livello di autonomia</b>			<i>P for trend</i>
	0-3 (autonomo)	4-3 (parzialmente autonomo)	>13 (non autonomo)	
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	5,9 (5,1-6,9)	6,0 (5,1-7,2)	6,2 (5,1-7,4)	<i>p</i> = 0,636
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	4,4 (4,0-4,9)	4,3 (3,9-4,7)	4,3 (4,0-4,7)	<i>p</i> = 0,110
Ematocrito [Htc (%)]	39,7 (37,1-42,4)	38,0 (35,7-41,3)	38,3 (35,4-41,6)	<i>p</i> = 0,058
Emoglobina [Hb (g/dL)]	13,2 (12,0-14,1)	12,6 (11,6-13,9)	12,7 (11,9-13,9)	<i>p</i> = 0,053
Colesterolo totale (mg/dL)	194,0 (164,0-226,5)	183,0 (161,0-214,0)	178,5 (151,0-215,0)	<i>p</i> = 0,054
Colesterolo LDL (mg/dL)	112,0 (87,0-139,0)	102,0 (81,0-130,0)	103,0 (84,3-132,5)	<i>p</i> = 0,306
Colesterolo HDL (mg/dL)	59,0 (49,0-71,0)	58,0 (47,0-68,0)	51,0 (42,0-63,5)	<i>p</i> = 0,002
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	105,0 (71,0-137,0)	99,0 (76,0-135,0)	99,5 (76,8-138,8)	<i>p</i> = 0,972
Glicemia (mg/dL)	89,0 (82,0-98,0)	91,0 (84,0-101,0)	85,0 (77,0-97,0)	<i>p</i> = 0,006
HbA1C [gHb (%)]	5,5 (5,2-5,9)	5,5 (5,1-6,1)	5,4 (5,0-5,7)	<i>p</i> = 0,058
Linfociti/neutrofilii ratio	0,5 (0,3-0,6)	0,4 (0,3-0,6)	0,5 (0,3-0,6)	<i>p</i> = 0,287

**Tabella 5.34**-Parametri biochimici in relazione al livello di autonomia

***Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione alla GDS***

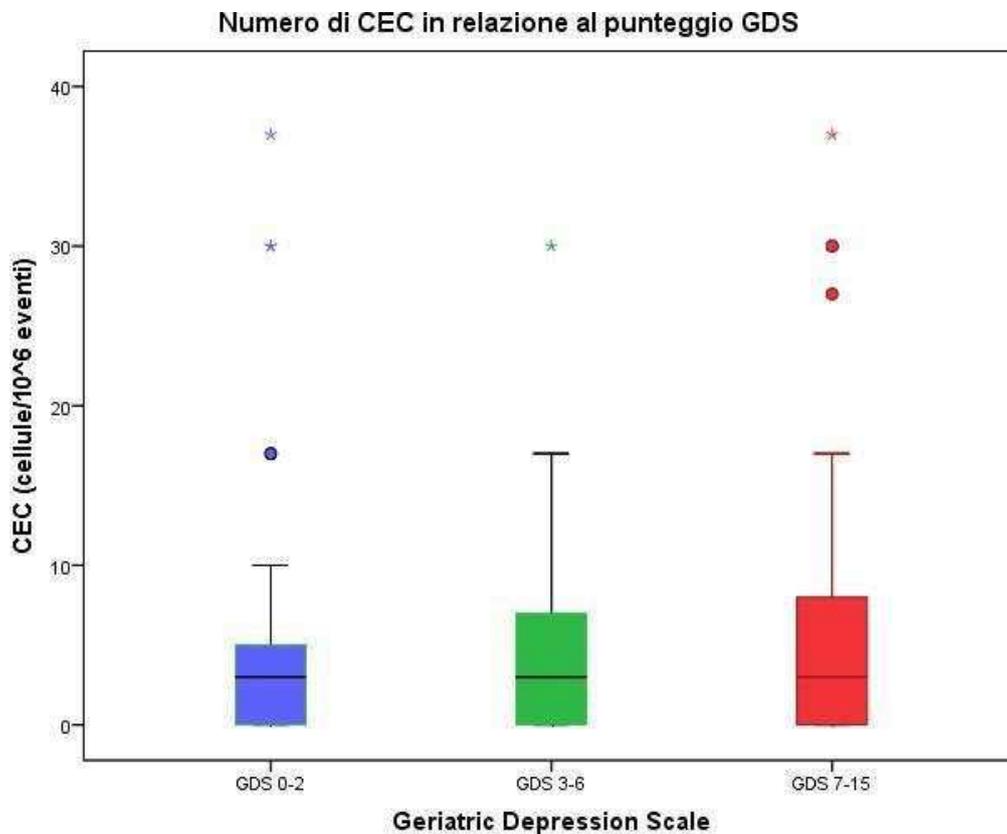
Nella tabella seguente (Tabella 5.35) è riportato il numero delle cellule in relazione al punteggio GDS. È possibile osservare che il numero delle cellule endoteliali circolanti è significativamente più elevato nei soggetti con GDS 7-15 (depressione severa) rispetto ai soggetti con punteggio compreso fra 3-6 (depressione lieve) e 0-2 (assenza di depressione). In particolare è stato possibile rilevare che il numero mediano di tali cellule è uguale nei tre gruppi, ma l'intervallo tra il 25° percentile e il 75° percentile è maggiore nel gruppo con GDS compreso tra 7 e 15.

<b>Cellule (cellule/10<sup>6</sup> eventi)</b>	<b>GDS</b>			<b>P for trend</b>
	0-2 (assenza di depressione)	3-6 (depressione lieve)	7-15 (depressione severa)	
CD34+	<b>372,5</b> (268,5-546,3)	<b>320,0</b> (213,5-515,0)	<b>347,0</b> (216,5-565,0)	<i>p</i> = 0,461
CD133+	<b>402,0</b> (278,8-547,8)	<b>337,0</b> (226,5-566,0)	<b>345,0</b> (227,0-567,0)	<i>p</i> = 0,701
CD34+/CD133+	<b>306,5</b> (202,3-470,0)	<b>289,0</b> (198,0-466,0)	<b>320,0</b> (197,0-535,5)	<i>p</i> = 0,483
CD34+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-6,3)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-6,5)	<i>p</i> = 0,325
CD133+/KDR+	<b>2,5</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-4,5)	<i>p</i> = 0,518
CD34+/CD133+/KDR+	<b>2,0</b> (0,0-5,3)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,5)	<i>p</i> = 0,521
CEC	<b>3,0</b> (0,0-5,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-9,0)	<i>p</i> = 0,044

**Tabella**

**5.35-Numero di cellule in relazione al punteggio ottenuto al GDS**

Nella figura seguente (Figura 5.19) è riportato il numero delle cellule endoteliali circolanti in relazione al punteggio conseguito alla GDS



**Figura**

**5.19-Numero di CEC in relazione al punteggio GDS**

### 7.1.10 Parametri biochimici e GDS

Nella tabella seguente (Tabella 5.36), dove sono riportati i parametri biochimici in relazione al GDS, è possibile osservare che i livelli di HbA1C sono significativamente più elevati nei soggetti con punteggio GDS 0-2 rispetto agli altri soggetti con punteggi GDS più elevati. Gli altri parametri non hanno mostrato alcuna relazione statisticamente significativa con il punteggio alla GDS.

<i>Parametri biochimici</i>	<b>GDS</b>			<i>P for trend</i>
	0-2 (assenza di depressione)	3-6 (depressione lieve)	7-15 (depressione severa)	
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	5,9 (5,1-7,0)	6,0 (5,3-7,1)	5,9 (4,9-7,0)	<i>p=0,583</i>
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	4,4 (3,9-4,7)	4,4 (3,9-4,7)	4,3 (4,0-4,7)	<i>p=0,558</i>
Ematocrito [Htc (%)]	39,6 (36,7-42,1)	39,3 (35,7-42,6)	38,5 (35,7-41,8)	<i>p=0,500</i>
Emoglobina [Hb (g/dL)]	13,1 (12,0-13,9)	13,1 (11,8-14,2)	12,8 (11,6-13,8)	<i>p=0,483</i>
Colesterolo totale (mg/dL)	195,0 (170,0-221,0)	190,0 (161,0-226,0)	187,0 (159,0-227,0)	<i>p=0,710</i>
Colesterolo LDL (mg/dL)	113,0 (89,5-131,5)	105,0 (83,0-138,0)	106,0 (86,0-138,0)	<i>p=0,717</i>
Colesterolo HDL (mg/dL)	60,0 (49,0-69,5)	57,0 (49,0-68,0)	56,0 (46,5-68,0)	<i>p=0,494</i>
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	106,0 (76,0-136,5)	95,0 (70,0-145,0)	111,0 (77,0-133,5)	<i>p=0,905</i>
Glicemia (mg/dL)	90,0 (84,5-104,0)	89,0 (81,0-99,0)	88,0 (81,5-97,0)	<i>p=0,439</i>
HbA1C [gHb (%)]	5,6 (5,2-6,0)	5,5 (5,2-6,0)	5,3 (5,0-5,8)	<i>p=0,029</i>
Linfociti/neutrofilo ratio	0,49 (0,35-0,62)	0,45 (0,35-0,61)	0,45 (0,33-0,62)	<i>p=0,763</i>

**Tabella 5.36-**Parametri biochimici in relazione al punteggio ottenuto al GDS

### *Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione al test Timed Up&Go*

Nella tabella seguente (Tabella 5.37), dove è riportato il numero delle cellule in relazione al punteggio Timed Up&Go, non è possibile osservare alcuna differenza significativa nei tre gruppi.

<i>Cellule (cellule/10<sup>6</sup> eventi)</i>	<u><b>Timed Up&amp;Go</b></u>			<i>P for trend</i>
	<20 sec (funzionalità elevata)	20-30 sec (funzionalità intermedia)	>30 sec (funzionalità bassa)	
CD34+	<b>380,0</b> (293,0-487,3)	<b>347,0</b> (220,0-567,0)	<b>347,0</b> (213,0-520,0)	<i>p=0,791</i>
CD133+	<b>411,5</b> (290,0-527,5)	<b>350,0</b> (223,0-584,0)	<b>350,0</b> (240,0-557,0)	<i>p=0,860</i>
CD34+/CD133+	<b>306,5</b> (225,3-430,8)	<b>297,0</b> (188,0-541,0)	<b>303,0</b> (177,0-467,0)	<i>p=0,888</i>
CD34+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p=0,061</i>
CD133+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p=0,097</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<b>2,0</b> (0,0-7,0)	<i>p=0,162</i>
CEC	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-8,0)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p=0,299</i>

**Tabella 5.37-**Numero delle cellule in relazione al punteggio Timed Up&Go

#### *Parametri biochimici e Timed Up&Go*

Nella tabella seguite (Tabella 5.38) sono riportati alcuni parametri biochimici in relazione al punteggio Timed Up&Go, non è possibile osservare alcuna differenza significativa nei tre gruppi. Tuttavia, valutando il rapporto linfociti/neutrofili è stato osservato come tale rapporto sia più elevato nei soggetti che hanno impiegato <20 sec per eseguire il Timed Up&Go rispetto agli altri soggetti.

<i>Parametri biochimici</i>	<b>Timed Up&amp;Go</b>			<i>P for trend</i>
	<20 sec (funzionalità elevata)	20-30 sec (funzionalità intermedia)	>30 sec (funzionalità bassa)	
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	6,0 (5,1-7,1)	5,9 (5,2-7,0)	5,9 (4,9-6,7)	<i>p=0,742</i>
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	4,4 (4,1-4,7)	4,4 (4,0-4,8)	4,4 (4,0-4,9)	<i>p=0,623</i>
Ematocrito [Htc (%)]	39,4 (37,3-41,8)	39,7 (36,4-42,7)	40,0 (36,4-42,3)	<i>p=0,876</i>
Emoglobina [Hb (g/dL)]	13,1 (12,0-13,9)	13,1 (11,8-14,2)	12,8 (11,6-13,8)	<i>p=0,799</i>
Colesterolo totale (mg/dL)	195,0 (170,0-221,0)	190,0 (161,0-226,0)	187,0 (159,0-227,0)	<i>p=0,144</i>
Colesterolo LDL (mg/dL)	113,0 (89,5-131,5)	105,0 (83,0-138,0)	106,0 (86,0-138,0)	<i>p=0,251</i>
Colesterolo HDL (mg/dL)	60,0 (49,0-69,5)	57,0 (49,0-68,0)	56,0 (46,5-68,0)	<i>p=0,438</i>
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	106,0 (76,0-136,5)	95,0 (70,0-145,0)	111,0 (77,0-133,5)	<i>p=0,891</i>
Glicemia (mg/dL)	90,0 (84,5-104,0)	89,0 (81,0-99,0)	81,5 (88,0-97,0)	<i>p=0,828</i>
HbA1C [gHb (%)]	5,6 (5,2-6,0)	5,5 (5,2-6,0)	5,3 (5,0-5,8)	<i>p=0,458</i>
Linfociti/neutrofilii ratio	0,49 (0,35-0,62)	0,45 (0,35-0,62)	0,45 (0,33-0,62)	<i>p=0,072</i>

**Tabella 5.38**-Parametri biochimici in relazione al punteggio Timed Up&Go

***Cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici e cellule endoteliali circolanti in relazione alla SPPB***

Nella tabella seguente (Tabella 5.39) è riportato il numero delle cellule in relazione al punteggio ottenuto alla SPPB. Il numero delle cellule progenitrici circolanti è risultato essere più elevato in chi ha ottenuto un punteggio maggiore alla SPPB.

In particolare, i soggetti con SPPB fra 9 e 12 avevano un numero più elevato ( $p < 0.005$ ) di cellule progenitrici circolanti rispetto sia al gruppo di soggetti con funzionalità intermedia (SPPB fra 5 e 8) che ridotta (SPPB fra 0 e 4).

Relativamente alle cellule progenitrici endoteliali il numero di tali cellule è stato riscontrato maggiore nel gruppo con punteggio SPPB più elevato (9-12) e più basso negli altri due gruppi [(5-8);(0-4)], senza però, tale differenza, essere statisticamente significativa.

Infine, per quanto riguarda le cellule endoteliali circolanti, non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra i tre gruppi, ma il valore medio di tali cellule è risultato più basso nel gruppo 9-12 e uguale nei restati due gruppi. Tuttavia il valore al 75° percentile delle cellule endoteliali circolanti è maggiore in chi ottiene un punteggio compreso tra 0 e 4 rispetto a chi si colloca tra 5 e 8.

<i>Cellule (cellule/10<sup>6</sup> eventi)</i>	<b>SPPB</b>			<i>P for trend</i>
	9-12 (funzionalità elevata)	5-8 (funzionalità intermedia)	0-4 (funzionalità bassa)	
CD34+	<b>381,5</b> (318,5-560,8)	<b>332,0</b> (175,0-467,0)	<b>315,0</b> (232,8-495,0)	<i>p= 0,091</i>
CD133+	<b>428,5</b> (332,3-560,8)	<b>347,0</b> (179,0-552,0)	<b>325,0</b> (250,0-514,3)	<i>p= 0,091</i>
CD34+/CD133+	<b>365,0</b> (277,8-511,5)	<b>296,0</b> (155,0-428,0)	<b>286,0</b> (186,8-440,3)	<i>p= 0,047</i>
CD34+/KDR+	<b>3,0</b> (0,0-3,3)	<b>0,0</b> (0,0-7,0)	<b>1,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,811</i>
CD133+/KDR+	<b>2,5</b> (0,0-3,3)	<b>0,0</b> (0,0-7,0)	<b>1,5</b> (0,0-3,3)	<i>p=0,938</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>1,0</b> (0,0-3,0)	<b>0,0</b> (0,0-7,0)	<b>0,0</b> (0,0-3,0)	<i>p= 0,973</i>
CEC	<b>1,5</b> (0,0-7,0)	<b>3,0</b> (0,0-6,5)	<b>3,0</b> (0,0-7,0)	<i>p= 0,766</i>

**Tabella 5.39**-Numero delle cellule in relazione al punteggio ottenuto alla SPPB

#### ***Parametri biochimici e SPPB***

Nella tabella seguente (Tabella 5.40), dove sono stati riportati i valori dei parametri biochimici in relazione al punteggio SPPB, non è stata osservata nessuna differenza significativa fra i tre gruppi presi in considerazione.

<i>Parametri biochimici</i>	<b>SPPB</b>			<i>P for trend</i>
	9-12 (funzionalità elevata)	5-8 (funzionalità intermedia)	0-4 (funzionalità bassa)	
Globuli bianchi [GB (10 <sup>3</sup> /μL)]	5,6 (4,8-6,7)	5,9 (5,0-6,7)	5,9 (5,1-6,9)	<i>p</i> =0,676
Globuli rossi [GR (10 <sup>6</sup> /μL)]	4,55 (4,0-4,9)	4,4 (3,9-4,7)	4,4 (4,0-4,7)	<i>p</i> =0,576
Ematocrito [Htc (%)]	40,7 (37,3-43,6)	39,4 (35,9-41,7)	39,8 (37,0-42,2)	<i>p</i> =0,405
Emoglobina [Hb (g/dL)]	13,5 (12,3-14,5)	12,9 (11,7-13,9)	13,0 (12,1-14,2)	<i>p</i> =0,434
Colesterolo totale (mg/dL)	202,0 (171,5-230,0)	196,0 (171,0-222,0)	204,0 (169,0-237,5)	<i>p</i> =0,864
Colesterolo LDL (mg/dL)	116,0 (97,5-133,0)	113,0 (94,0-139,0)	118,0 (86,0-149,5)	<i>p</i> =0,639
Colesterolo HDL (mg/dL)	62,0 (49,0-76,0)	62,0 (50,0-73,0)	60,0 (52,0-67,0)	<i>p</i> =0,757
Trigliceridi [TG (mg/dL)]	95,0 (65,5-136,0)	94,0 (71,0-123,0)	109,0 (85,5-132,5)	<i>p</i> =0,627
Glicemia (mg/dL)	91,0 (84,0-100,0)	89,0 (80,0-104,0)	91,0 (84,0-99,0)	<i>p</i> =0,971
HbA1C [gHb (%)]	5,5 (5,2-6,1)	5,4 (5,0-5,9)	5,5 (5,0-5,9)	<i>p</i> =0,586
Linfociti/neutrofilii ratio	0,51 (0,35-0,62)	0,49 (0,35-0,68)	0,44 (0,34-0,58)	<i>p</i> =0,648

**Tabella 5.40**-Parametri biochimici in relazione al punteggio SPPB

### 7.1.11 Associazione fra cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici, cellule circolanti progenitrici e deficit cognitivo (MMSE <24)

Al fine di analizzare l'associazione fra i vari tipi di cellule ed il deficit cognitivo misurato con il MMSE, il numero delle cellule è stato diviso in terzili secondo la loro distribuzione.

All'analisi di regressione logistica univariata il più alto terzile delle CEP risulta essere associato significativamente con la riduzione del rischio di deficit cognitivo. Tale associazione era significativa ( $p < 0,01$ ) nel gruppo delle donne della popolazione del Mugello, ma non nel gruppo degli uomini (Tabella 5.41).

Dopo correzione con i fattori confondenti, quali l'età, il sesso e la scolarità, i soggetti con valori di CEP nel più alto terzile sono coloro che hanno un rischio significativamente ( $p = 0,001$ ) minore di avere un deficit cognitivo (Tabella 5.42).

Sia le CPC che le CEC non risultano associate significativamente al deficit cognitivo.

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>					
	TUTTI	<i>P</i>	F	<i>P</i>	M	<i>P</i>
	(N=414)		(N=304)		(N=110)	
CD34+	<b>1,28</b> (0,99-1,61)	<i>0,054</i>	<b>1,22</b> (0,92-1,63)	0,170	<b>1,68</b> (1,02-2,75)	<i>0,040</i>
CD133+	<b>1,15</b> (0,91-1,61)	<i>0,245</i>	<b>1,17</b> (0,87-1,57)	0,295	<b>1,42</b> (0,89-2,28)	<i>0,143</i>
CD34+/CD133+	<b>1,18</b> (0,93-1,50)	<i>0,173</i>	<b>1,08</b> (0,81-1,44)	0,603	<b>1,54</b> (0,97-2,44)	<i>0,068</i>
CD34+/KDR+	<b>0,76</b> (0,60-0,96)	<i>0,019</i>	<b>0,62</b> (0,46-0,82)	0,001	<b>1,26</b> (0,80-1,99)	<i>0,318</i>
CD133+/KDR+	<b>0,79</b> (0,63-1,00)	<i>0,052</i>	<b>0,63</b> (0,48-0,84)	0,001	<b>1,37</b> (0,87-2,16)	<i>0,177</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>0,82</b> (0,64-1,03)	<i>0,093</i>	<b>0,67</b> (0,50-0,89)	0,006	<b>1,36</b> (0,97-2,17)	<i>0,140</i>
CEC	<b>1,03</b> (0,89-1,21)	<i>0,678</i>	<b>0,98</b> (0,81-1,18)	0,836	<b>1,117</b> (0,87-1,57)	<i>0,312</i>

**Tabella 5.41**-Analisi di regressione logistica univariata e rischio di MMSE < 24 nella popolazione del Mugello

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	Modello 1 *	<i>P</i>	Modello 2**	<i>P</i>
CD34+	<b>1,28</b> (0,99-1,61)	<i>0,054</i>	<b>1,22</b> (0,92-1,63)	<i>0,17</i>
CD133+	<b>1,15</b> (0,91-1,61)	<i>0,245</i>	<b>1,17</b> (0,87-1,57)	<i>0,295</i>
CD34+/CD133+	<b>1,18</b> (0,93-1,50)	<i>0,173</i>	<b>1,08</b> (0,81-1,44)	<i>0,603</i>
CD34+/KDR+	<b>0,76</b> (0,60-0,96)	<i>0,019</i>	<b>0,62</b> (0,46-0,82)	<i>0,001</i>
CD133+/KDR+	<b>0,79</b> (0,63-1,00)	<i>0,052</i>	<b>0,63</b> (0,48-0,84)	<i>0,001</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>0,82</b> (0,64-1,03)	<i>0,093</i>	<b>0,67</b> (0,50-0,89)	<i>0,006</i>
CEC	<b>1,03</b> (0,89-1,21)	<i>0,678</i>	<b>0,98</b> (0,81-1,18)	<i>0,836</i>

\* **Modello 1:** corretto per età e sesso

\*\* **Modello 2:** corretto per età, sesso, scolarità

**Tabella 5.42**-Analisi di regressione logistica multivariata e rischio di MMSE < 24 nella popolazione del Mugello

**7.1.12 Associazione fra cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici, cellule circolanti progenitrici e depressione (GDS)**

L'analisi di regressione logistica univariata ha messo in evidenza che i soggetti della popolazione del Mugello con un numero di CEC nel più alto terzile sono a più alto rischio di avere una depressione, misurata mediante l'utilizzo della scala GDS (Tabella 5.43).

Dopo correzione con i fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il MMSE<24, la disabilità e la condizione sociale (vivere solo o in compagnia di un familiare o di un non familiare) i soggetti con valori di CEC nel più alto terzile sono coloro che hanno un rischio significativamente ( $p=0,002$ ) maggiore di avere la depressione (Tabella 5.44).

Il numero delle CPC e delle CEP non sembra influenzare il rischio di demenza nella popolazione del Mugello.

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>GDS (3-6) vs GDS (0-2)</b>	<i>P</i>	<b>GDS (7-15) vs GDS (0-2)</b>	<i>P</i>
CD34+	<b>0,92</b> (0,65-1,29)	<i>0,615</i>	<b>0,94</b> (0,68-1,28)	<i>0,683</i>
CD133+	<b>1,15</b> (0,66-1,32)	<i>0,702</i>	<b>1,42</b> (0,89-2,28)	<i>0,143</i>
CD34+/CD133+	<b>0,93</b> (0,76-1,43)	<i>0,818</i>	<b>1,04</b> (0,76-1,43)	<i>0,818</i>
CD34+/KDR+	<b>0,76</b> (0,54-1,07)	<i>0,113</i>	<b>0,89</b> (0,66-1,21)	<i>0,456</i>
CD133+/KDR+	<b>0,80</b> (0,57-1,26)	<i>0,205</i>	<b>0,89</b> (0,66-1,21)	<i>0,456</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>0,79</b> (0,55-1,05)	<i>0,165</i>	<b>0,91</b> (0,66-1,22)	<i>0,520</i>
CEC	<b>1,15</b> (0,92-1,44)	<i>0,217</i>	<b>1,28</b> (1,04-1,57)	<i>0,021</i>

**Tabella 5.43**-Analisi di regressione logistica univariata multinomiale per rischio di depressione nella popolazione del Mugello

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>GDS (3-6) vs GDS (0-2)*</b>	<i>P</i>	<b>GDS (7-15) vs GDS (0-2)*</b>	<i>P</i>
<b>CD34+</b>	<b>0,89</b> (0,61-1,29)	<i>0,532</i>	<b>0,90</b> (0,63-1,30)	<i>0,580</i>
<b>CD133+</b>	<b>0,91</b> (0,62-1,33)	<i>0,615</i>	<b>0,94</b> (0,66-1,35)	<i>0,742</i>
<b>CD34+/CD133+</b>	<b>0,92</b> (0,63-1,35)	<i>0,658</i>	<b>1,02</b> (0,70-1,46)	<i>0,937</i>
<b>CD34+/KDR+</b>	<b>0,76</b> (0,51-1,09)	<i>0,019</i>	<b>0,87</b> (0,62-1,24)	<i>0,441</i>
<b>CD133+/KDR+</b>	<b>0,81</b> (0,56-1,18)	<i>0,270</i>	<b>0,90</b> (0,63-1,27)	<i>0,536</i>
<b>CD34+/CD133+/KDR+</b>	<b>0,77</b> (0,53-1,28)	<i>0,182</i>	<b>0,89</b> (0,62-1,26)	<i>0,505</i>
<b>CEC</b>	<b>1,19</b> (0,94-1,53)	<i>0,152</i>	<b>1,46</b> (1,15-1,878)	<i>0,002</i>

\* corretto per età, sesso, MMSE, variabili sociali, disabilità

**Tabella 5.44**-Analisi di regressione logistica multivariata multinomiale e rischio di depressione nella popolazione del Mugello

### **7.1.13 Associazione fra cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici, cellule circolanti progenitrici e livello di autonomia**

L'analisi di regressione logistica univariata ha messo in evidenza che un numero più elevato di CEP nei soggetti della popolazione del Mugello risulta essere associato significativamente ( $p < 0,05$ ) ad un rischio minore di avere un livello basso di autonomia (Tabella 5.45).

Dopo correzione con i fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il MMSE < 24, la forza muscolare misurata come handrip, la massa magra e massa grassa i soggetti con valori di CEP nel più alto terzile sono coloro che hanno un rischio significativamente ( $p = 0,05$ ) ridotto di avere una disabilità (Tabella 5.46).

Il numero delle CPC e delle CEC non sembra influenzare il rischio di disabilità nella popolazione del Mugello.

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>Livello Autonomia (4-13) vs Autonomia (0-3)</b>	<i>P</i>	<b>Livello Autonomia (&gt;13) vs Autonomia (0-3)</b>	<i>P</i>
CD34+	<b>0,94</b> (0,77-1,40)	<i>0,696</i>	<b>1,04</b> (0,77-1,40)	<i>0,443</i>
CD133+	<b>0,88</b> (0,66-1,20)	<i>0,443</i>	<b>0,94</b> (0,70-1,27)	<i>0,706</i>
CD34+/CD133+	<b>0,89</b> (0,66-1,20)	<i>0,438</i>	<b>0,98</b> (0,73-1,32)	<i>0,882</i>
CD34+/KDR+	<b>0,72</b> (0,53-0,97)	<i>0,029</i>	<b>0,71</b> (0,52-0,95)	<i>0,022</i>
CD133+/KDR+	<b>0,71</b> (0,54-0,97)	<i>0,025</i>	<b>0,72</b> (0,54-0,97)	<i>0,029</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>0,73</b> (0,54-0,99)	<i>0,044</i>	<b>0,75</b> (0,55-1,02)	<i>0,064</i>
CEC	<b>0,95</b> (0,78-1,16)	<i>0,609</i>	<b>0,99</b> (0,82-1,20)	<i>0,931</i>

**Tabella 5.45-**Analisi di regressione logistica univariata multinomiale e livello di autonomia nella popolazione del Mugello

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>Livello Autonomia (4-13) vs Autonomia (0-3)*</b>	<i>P</i>	<b>Livello Autonomia (&gt;13) vs Autonomia (0-3)*</b>	<i>P</i>
CD34+	<b>0,79</b> (0,52-1,20)	<i>0,273</i>	<b>0,71</b> (0,40-1,26)	<i>0,239</i>
CD133+	<b>0,77</b> (0,51-1,16)	<i>0,219</i>	<b>0,81</b> (0,46-1,41)	<i>0,454</i>
CD34+/CD133+	<b>0,77</b> (0,50-1,18)	<i>0,236</i>	<b>0,79</b> (0,45-1,38)	<i>0,399</i>
CD34+/KDR+	<b>0,67</b> (0,45-1,00)	<i>0,05</i>	<b>0,55</b> (0,62-1,04)	<i>0,091</i>
CD133+/KDR+	<b>0,64</b> (0,43-0,96)	<i>0,032</i>	<b>0,57</b> (0,32-0,96)	<i>0,035</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>0,65</b> (0,43-0,98)	<i>0,041</i>	<b>0,61</b> (0,35-1,06)	<i>0,08</i>
CEC	<b>0,89</b> (0,67-1,16)	<i>0,889</i>	<b>0,99</b> (0,68-1,45)	<i>0,979</i>

\* corretto per età, sesso, MMSE, handigrip, massa muscolare magra e massa grassa

**Tabella 5.46-**Analisi di regressione logistica multivariata multinomiale e livello di autonomia nella popolazione del Mugello

**7.1.14 Associazione fra cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici, cellule circolanti progenitrici e performance fisica**

L'analisi di regressione logistica univariata ha messo in evidenza che il più alto terzile di CD34+/CD133+ nei soggetti della popolazione del Mugello risulta essere associato significativamente ( $p < 0,05$ ) ad un rischio minore di avere un livello basso di performance fisica misurata con la scala SPPB (Tabella 5.47).

Dopo correzione con i fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il MMSE < 24, la forza muscolare misurata come handrip, la massa magra e massa grassa la variabile CD34+/CD133+ non rimane significativamente associata alla performance fisica (Tabella 5.48).

Il numero delle CEP e delle CEC non sembra influenzare la performance fisica nella popolazione del Mugello.

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>SPPB (5-8) vs SPPB (9-12)</b>	<i>P</i>	<b>SPPB (0-4) vs SPPB (9-12)</b>	<i>P</i>
<b>CD34+</b>	<b>0,62</b> (0,36-1,02)	<i>0,062</i>	<b>0,67</b> (0,38-1,16)	<i>0,152</i>
<b>CD133+</b>	<b>0,71</b> (0,43-1,17)	<i>0,176</i>	<b>0,73</b> (0,42-1,26)	<i>0,254</i>
<b>CD34+/CD133+</b>	<b>0,56</b> (0,33-0,94)	<i>0,029</i>	<b>0,57</b> (0,32-0,99)	<i>0,046</i>
<b>CD34+/KDR+</b>	<b>0,93</b> (0,59-1,48)	<i>0,765</i>	<b>0,87</b> (0,52-1,44)	<i>0,592</i>
<b>CD133+/KDR+</b>	<b>1,02</b> (0,64-1,62)	<i>0,924</i>	<b>0,97</b> (0,59-1,60)	<i>0,898</i>
<b>CD34+/CD133+/KDR+</b>	<b>1,00</b> (0,63-1,60)	<i>0,982</i>	<b>0,99</b> (0,59-1,64)	<i>0,953</i>
<b>CEC</b>	<b>1,18</b> (0,74-1,64)	<i>0,332</i>	<b>1,17</b> (0,84-1,64)	<i>0,346</i>

**Tabella 5.47**-Analisi di regressione logistica univariata multinomiale e SPPB nella popolazione del Mugello

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>SPPB (0-4) vs SPPB (9-12)*</b>	<i>P</i>	<b>SPPB (5-8) vs SPPB (9-12)*</b>	<i>P</i>
<b>CD34+</b>	<b>0,85</b> (0,46-1,56)	<i>0,845</i>	<b>0,97</b> (0,46-2,02)	<i>0,931</i>
<b>CD133+</b>	<b>0,91</b> (0,50-1,66)	<i>0,750</i>	<b>1,05</b> (0,51-2,17)	<i>0,893</i>
<b>CD34+/CD133+</b>	<b>0,68</b> (0,36-1,25)	<i>0,212</i>	<b>0,74</b> (0,35-1,56)	<i>0,425</i>
<b>CD34+/KDR+</b>	<b>0,97</b> (0,55-1,70)	<i>0,916</i>	<b>0,81</b> (0,41-1,59)	<i>0,548</i>
<b>CD133+/KDR+</b>	<b>1,10</b> (0,62-1,94)	<i>0,755</i>	<b>0,93</b> (0,48-1,81)	<i>0,830</i>
<b>CD34+/CD133+/KDR+</b>	<b>0,98</b> (0,56-1,73)	<i>0,946</i>	<b>0,87</b> (0,44-1,69)	<i>0,674</i>
<b>CEC</b>	<b>1,15</b> (0,79-1,69)	<i>0,474</i>	<b>0,98</b> (0,62-1,55)	<i>0,994</i>

\* corretto per età, sesso, MMSE, massa magra, massa grassa, handigrip

**Tabella 5.48**-Analisi di regressione logistica multivariata multinomiale e SPPB nella popolazione del Mugello

#### **7.1.15 Associazione fra cellule progenitrici circolanti, cellule endoteliali progenitrici, cellule circolanti progenitrici e Timed&UpGo test**

L'analisi di regressione logistica univariata ha messo in evidenza che il più alto terzile di CD34+/CD133+ nei soggetti della popolazione del Mugello risulta essere associato significativamente ( $p < 0,05$ ) ad un rischio minore di eseguire il Timed&Go test con un tempo superiore a 20 secondi (Tabella 5.49).

Dopo correzione con i fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il MMSE < 24, la forza muscolare misurata come handrip, la massa magra e massa grassa la variabile CD34+/CD133+ non rimane significativamente associata alla performance fisica (Tabella 5.50).

Il numero delle CEP e delle CEC non sembra influenzare il tempo impiegato per eseguire il Timed&Go test.

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>Timed Up&amp;Go 20-30 sec vs Timed Up&amp;Go &lt;20 sec</b>	<i>P</i>	<b>Timed Up&amp;Go &gt; 30 sec vs Timed Up&amp;Go &lt;20 sec</b>	<i>P</i>
CD34+	<b>0,62</b> (0,36-1,02)	<i>0,062</i>	<b>0,67</b> (0,38-1,16)	<i>0,152</i>
CD133+	<b>0,71</b> (0,43-1,17)	<i>0,176</i>	<b>0,73</b> (0,42-1,26)	<i>0,254</i>
CD34+/CD133+	<b>0,56</b> (0,33-0,94)	<i>0,029</i>	<b>0,57</b> (0,32-0,99)	<i>0,046</i>
CD34+/KDR+	<b>0,93</b> (0,59-1,48)	<i>0,765</i>	<b>0,87</b> (0,52-1,44)	<i>0,592</i>
CD133+/KDR+	<b>1,02</b> (0,64-1,62)	<i>0,924</i>	<b>0,97</b> (0,59-1,60)	<i>0,898</i>
CD34+/CD133+/KDR+	<b>1,00</b> (0,63-1,60)	<i>0,982</i>	<b>0,99</b> (0,59-1,64)	<i>0,953</i>
CEC	<b>1,18</b> (0,74-1,64)	<i>0,332</i>	<b>1,17</b> (0,84-1,64)	<i>0,346</i>

**Tabella 5.49**-Analisi di regressione logistica univariata multinomiale e Timed Up&Go nella popolazione del Mugello

<i>TERZILI</i>	<b>ODDS RATIO (95% CI)</b>			
	<b>Timed Up&amp;Go 20-30 sec vs Timed Up&amp;Go &lt;20 sec*</b>	<i>P</i>	<b>Timed Up&amp;Go &gt; 30 sec vs Timed Up&amp;Go &lt;20 sec*</b>	<i>P</i>
CD34+	<b>1,23</b> (0,67-2,27)	0,501	<b>1,01</b> (0,57-1,80)	0,963
CD133+	<b>1,22</b> (0,66-2,23)	0,528	<b>1,03</b> (0,58-1,82)	0,933
CD34+/CD133+	<b>1,27</b> (0,69-2,34)	0,443	<b>1,05</b> (0,59-1,86)	0,878
CD34+/KDR+	<b>1,00</b> (0,56-1,77)	0,993	<b>1,44</b> (0,84-2,47)	0,181
CD133+/KDR+	<b>0,99</b> (0,57-1,75)	0,986	<b>1,44</b> (0,84-2,45)	0,184
CD34+/CD133+/KDR+	<b>1,10</b> (0,61-1,97)	0,75	<b>1,55</b> (0,89-1,55)	0,118
CEC	<b>1,01</b> (0,69-1,49)	0,958	<b>0,88</b> (0,62-1,28)	0,525

\* corretto per età, sesso, MMSE, massa magra, massa grassa, handgrip

**Tabella 5.50**-Analisi di regressione logistica multivariata multinomiale e Timed Up&Go nella popolazione del Mugello

## 8 Discussione

Lo studio Mugello è studio epidemiologico condotto su una popolazione di ultranovantenni residenti in nove degli undici comuni del Mugello ed è stato progettato come un'indagine trasversale, con possibili implicazioni future longitudinali.

Nello studio Mugello, che ha valutato 475 soggetti ultranovantenni, sono state rilevate informazioni non solo i dati antropometrici, demografici e anamnestici (anamnesi prossima, remota e familiare), ma sono state raccolte anche informazioni sulle variabili sociali, sulle abitudini alimentari, sul livello di attività fisica e su una serie di valutazioni che possono fornire un quadro degli aspetti cognitivi, psicologici e funzionali nel “grande anziano”. Inoltre, la raccolta di alcuni parametri biumorali (infiammatori e lipidici) e la determinazione del numero delle cellule circolanti progenitrici e delle cellule endoteliali circolanti come marcatori di disfunzione endoteliale ha consentito una valutazione globale del profilo proaterogenico e pro-infiammatorio in una popolazione di soggetti che hanno raggiunto un'età avanzata, nonostante la presenza di numerose patologie e condizioni di disabilità funzionale e neurologica.

La valutazione delle variabili ottenute dallo studio Mugello ha messo in evidenza che:

1- Il numero delle cellule progenitrici circolanti e quello delle CEP correla significativamente ed inversamente con il numero dei globuli bianchi. I livelli circolanti della PCR mostrano una debole correlazione inversa, con le cellule progenitrici circolanti, che non raggiunge tuttavia la significatività statistica. Le cellule endoteliali circolanti non correlano con nessuno dei marcatori dell'infiammazione disponibili in questo studio.

2- Fra i fattori di rischio tradizionali cardiovascolari, solo la dislipidemia è risultata associata ad un numero più elevato delle cellule progenitrici circolanti, mentre non è stata documentata alcuna associazione fra CEP e CEC con la dislipidemia. Gli altri fattori di rischio cardiovascolari non influenzano significativamente né il numero delle cellule progenitrici né quello delle cellule endoteliali circolanti.

3- L'analisi dei dati relativi all'associazione fra il numero delle cellule progenitrici circolanti e delle cellule endoteliali circolanti e l'anamnesi patologica non ha evidenziato alcuna associazione fra numero delle cellule progenitrici, il numero delle cellule endoteliali circolanti e malattie cardiovascolari e cerebrovascolari. I soggetti affetti da demenza presentavano un numero significativamente minore di CEP rispetto ai soggetti non dementi.

4- i) L'assenza di deficit cognitivo (MMSE >24) si associa ad un numero maggiore di cellule progenitrici endoteliali: i soggetti un numero di CEP nel più alto terzile della loro distribuzione sono coloro che all'analisi logistica multivariata hanno un rischio minore di avere un deficit cognitivo.

ii) Relativamente all'associazione fra i vari tipi di cellule e la depressione, l'analisi di regressione logistica ha messo in evidenza che un numero maggiore di cellule endoteliali circolanti è associato alla presenza di una depressione severa, anche dopo correzione per le variabili confondenti.

iii) I soggetti con un numero ridotto di CEP hanno un aumento del rischio di avere un livello basso di autonomia, misurato con le scale B-ADL e I-ADL. Tale associazione rimane significativa anche dopo correzione per i fattori confondenti.

iv) Una funzione degli arti inferiori elevata, misurata con la SPPB, si associa significativamente ad un numero più elevato di CPC, ma tale associazione non rimane significativa dopo correzione per i fattori confondenti.

1- E' noto dagli studi epidemiologici che un'elevata percentuale della popolazione anziana con età superiore ai 65 anni ha almeno una patologia cronica potenzialmente in grado di causare o favorire l'insorgenza di disabilità funzionale e che la percentuale di anziani con due o più patologie croniche sale dal 40% negli ultrasessantacinquenni al 60% negli ultraottantacinquenni. Le patologie più frequenti sono quelle relative alla sfera cardiovascolare o combinazioni di patologie cardiovascolari associate a malattie croniche neurologiche e/o respiratorie.

Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che tali patologie, seppur differenti secondo la nosologia tradizionale, hanno in realtà processi fisiopatologici comuni quali infiammazione, stress ossidativo, ipossia ed apoptosi.

E' noto, inoltre, che il soggetto anziano è caratterizzato da un grado di infiammazione cronica che deriva da alterazioni nell'equilibrio tra la produzione di mediatori pro-infiammatori, mediatori anti-infiammatori e citochine; questa condizione risulta essere dannosa per la longevità (74) (75) (76), in quanto lo stato di attività infiammatoria cronica, anche di basso grado, porta, nel lungo termine, a danni tissutali e risulta essere legata a un aumento del rischio di mortalità per tutte le cause in persone anziane.

Studi sperimentali hanno dimostrato, inoltre, che la PCR in vitro limita la sopravvivenza, la differenziazione e la funzione delle CEP ed altera il processo di angiogenesi (399) mediante la riduzione dell'espressione di eNOS e la conseguente minor disponibilità di NO, che gioca un ruolo essenziale nell'attivazione delle EPCs. Dunque, la capacità della PCR di influenzare negativamente la biologia delle EPCs può rappresentare un importante anello di collegamento tra infiammazione e malattia cardiovascolare.

Nello studio Mugello sono stati raccolti i dati relativi al numero dei globuli bianchi e le concentrazioni circolanti di PCR, come indici aspecifici di infiammazione. La dimostrazione che il numero delle cellule progenitrici circolanti e quello delle CEP correla significativamente ed inversamente con il numero dei globuli bianchi suggerisce come nella popolazione del Mugello una infiammazione anche se di basso

grado sia in grado di ridurre il rilascio in circolo da parte del midollo delle cellule progenitrici sia endoteliali che non-endoteliali. Nell'anziano la presenza di patologie infiammatorie croniche, piuttosto frequenti nell'anziano determina un disequilibrio tra la produzione di mediatori pro-infiammatori, mediatori anti-infiammatori e citochine da parte dei globuli bianchi con uno sbilanciato in senso pro-infiammatorio. Pertanto, nel lungo termine, questa condizione pro-infiammatoria cronica porta a danni tissutali e ad una continua richiesta di cellule staminali per la riparazione del danno vascolare, a cui il midollo non riesce a rispondere in maniera adeguata (per esaurimento o deplezione del pool midollare di cellule staminali) risultando così ridotto in circolo il numero delle cellule progenitrici.

I risultati del nostro studio non hanno messo in evidenza una relazione significativa fra il numero delle cellule progenitrici ed i livelli del marcatore aspecifico di infiammazione Proteina C reattiva. Questo dato sembra essere in contraddizione con i dati presenti in letteratura che documentano una relazione inversa significativa fra le CEP, le CPC e la PCR. Tuttavia la maggior parte dei dati della letteratura si riferiscono a condizioni in cui la risposta infiammatoria è di elevato livello (by-pyss aorto-coronarico, infarto acuto del miocardio e malattie infiammatorie croniche) e la popolazione in studio ha un'età non così avanzata come quella degli ultranovantenni del Mugello.

Dobbiamo anche considerare che i livelli di PCR incrementano con l'età fino ai 60 anni, dopo di che si raggiunge un plateau. Uno studio epidemiologico condotto negli Stati Uniti su 21,004 soggetti ha mostrato come i livelli mediani di PCR nella fascia 60-69 anni erano pari a 2,9 (1,2-6,1) mg/L, quelli nella fascia 70-79 anni erano pari a 2,8 (1,4-5,6) mg/L mentre tendevano a diminuire significativamente nella fascia superiore agli 80 anni raggiungendo i valori pari a 2,7 (1,3-5,4) mg/L (481).

Nel nostro studio i livelli di PCR superiori a 3 mg/L, che è il cut-off che definisce il rischio cardiovascolare, sono stati osservati 56,4 % della popolazione, mentre un terzo dei soggetti ha valori di PCR inferiori a 2,4 mg/L e il 50% ha valori inferiori al 4,1 mg/L.

E' verosimile, che in una condizione di basso grado di infiammazione e di età molto avanzata, come quella che si registra nella popolazione del Mugello, l'associazione fra PCR e riduzione del numero di CEP si attenui. Una possibile spiegazione risiede nel fatto che nell'area del Mugello potrebbero essere stati selezionati i soggetti con un background genetico particolare, capace di modulare la risposta infiammatoria e di rispondere in maniera efficace all'esposizione cumulativa degli agenti infettivi e non-infettivi riducendo i danni prodotti dal cosiddetto inflammaging sui tessuti. D'altra parte dobbiamo tenere anche in considerazione che oltre alle caratteristiche genetiche, altri fattori come le condizioni ambientali e sociali potrebbero aver favorito la selezione di soggetti capaci di avere una risposta infiammatoria efficace e sostenuta. Poichè, come è noto, la capacità del soggetto di mobilitare le cellule staminali dal midollo osseo si riduce proporzionalmente con l'età, è possibile che negli ultranovantenni la relazione fra più elevati livelli di PCR e minor numero di cellule staminali non sia più proporzionale.

2- Un dato inatteso derivante dall'analisi della relazione fra i fattori di rischio tradizionali cardiovascolari e le cellule progenitrici e quelle endoteliali circolanti è quello relativo all'assenza di associazione fra numero delle CEP e la dislipidemia.

Gli studi sperimentali effettuati su modelli animali hanno messo in evidenza come elevati livelli di colesterolo LDL sono associati con una riduzione del numero delle CEP ed una riduzione delle loro funzioni. L'ipercolesterolemia, infatti, è in grado di determinare l'apoptosi prematura delle CEP, di interferire con il signalling che regola la differenziazione e mobilizzazione delle CEP e di inibire il VEGF e quindi di inibire la differenziazione delle CEP. Nei pazienti con angina stabile il trattamento con le statine oltre a ridurre il colesterolo aumenta il numero delle CEP. Le statine, infatti, sono in grado di attivare la fosforilazione della eNOS e l'espressione di VEGF determinando così l'aumento del numero delle CEP in circolo e l'aumento delle loro capacità di adesione, migrazione e formazione di nuovi vasi. Questo effetto delle statine sulle CEP è un effetto di classe, in quanto i dati della letteratura hanno riportato effetti benefici del trattamento con tutti i tipi di statine sulle CEP.

Nel nostro studio i soggetti dislipidemici (11,2 % della popolazione) non avevano ridotti livelli di CEP. D'altra parte più del 60% dei soggetti dislipidemici del Mugello era in trattamento con statine ed il trattamento era efficace in quanto il colesterolo LDL nei soggetti trattati [90 (70-116 mg/dL)] era significativamente inferiore ( $p < 0,001$ ) a quello dei soggetti non trattati [110 (88-138 mg/dL)]. Inoltre, i nostri risultati dimostrano una correlazione negativa fra livelli di colesterolo LDL e numero di CPC e CEP, evidenziando quindi che più elevati livelli di colesterolo determinano una riduzione delle cellule progenitrici (endoteliali e non).

Oltre che le statine anche gli ACE-inibitori sono capaci di indurre un aumento del numero e delle attività delle CEP. Nel nostro studio l'uso degli ACE-inibitori è stato rilevato nel 36,9% della popolazione ed il numero delle CEP è risultato superiore, anche se non si è raggiunta la significatività statistica, nei soggetti trattati con ACE-inibitori rispetto ai soggetti non trattati. Pertanto, il trattamento con statine e ACE-inibitori potrebbe aver contrastato l'effetto deletereo del colesterolo LDL sulle CEP, rendendo non manifesta l'associazione fra dislipidemia e numero ridotto di CEP.

Nel nostro studio la dislipidemia è risultata associata ad un numero più elevato delle cellule progenitrici circolanti, mentre è stata osservata una correlazione negativa fra CPC e colesterolo LDL. Questo dato è un dato difficilmente spiegabile, in quanto le due osservazioni precedenti risultano essere in contraddizione l'una con l'altra. D'altra parte in letteratura non sono presenti evidenze sugli effetti della dislipidemia sul numero delle CPC. Inoltre, le CPC sono cellule progenitrici che possono dar luogo ad un ampio spettro di cellule mature, dalle cellule ematopoietiche alle cellule cardiache, cellule endoteliali, cellule ossee e cellule neuronali. Pertanto è possibile che gli effetti della dislipidemia possano essere differenti da quelli dimostrati per le CEP, così come le statine potrebbero avere un effetto più potente sul numero di CPC rispetto a quello sulle CEP.

Per quanto riguarda le cellule endoteliali circolanti non è stata documentata alcuna associazione fra tali cellule ed i fattori rischio tradizionali cardiovascolari. E' stato ampiamente dimostrato che le CEC sono delle cellule mature che vengono riversate dalla parete vascolare nel torrente ematico in risposta al danno (Blann A.D., 2005) vascolare. Pur essendo presenti le CEC in condizioni normali, nelle condizioni patologiche il loro numero è aumentato. Infatti, gli studi sull'uomo hanno evidenziato un aumento del numero delle CEC nei pazienti affetti da infarto miocardico acuto, da sepsi e nei soggetti con ipertensione arteriosa (Hladovec J., 1978). Tuttavia, una risposta infiammatoria protratta e la presenza dei radicali liberi dell'ossigeno in associazione all'azione di citochine e di proteasi tissutali può determinare un danno all'integrità di molecole fondamentali per l'adesione dell'endotelio alla membrana basale, quali le integrine e le caderine (Deanfield J.E., 2007) (Rüegg C, 1998) causando un rilascio in circolo di CEC. Come è già stato sottolineato, nell'anziano sono frequentemente riscontrabili patologie infiammatorie croniche capaci di indurre la produzione e rilascio in circolo di marcatori dell'infiammazione, che danneggiando l'endotelio determinano il rilascio in circolo delle CEC. E' pertanto ipotizzabile che nei soggetti del Mugello, il continuo stimolo pro-infiammatorio e pro-ossidante determini un rilascio costante di CEC, per cui l'effetto dei fattori di rischio tradizionali cardiovascolari non sono in grado di determinare un ulteriore aumento del numero delle CEC.

3- L'analisi dei dati emersi dall'anamnesi patologica non ha evidenziato alcuna associazione fra numero delle cellule progenitrici, numero delle cellule endoteliali circolanti e malattie cardiovascolari e cerebrovascolari. E' tuttavia interessante notare che i soggetti affetti da demenza presentano un numero significativamente minore di CEP rispetto ai soggetti non dementi.

La demenza è definita dal decadimento (rispetto ad un livello precedentemente acquisito) della funzione mnemonica, associato ad almeno un altro disturbo cognitivo (linguaggio, funzione prassica, funzione gnostica, funzioni esecutive, critica e pensiero astratto), in assenza di alterazioni dello stato di coscienza (Mutani R., 2012). Il termine demenza è quindi una definizione generica che identifica una disabilità di tipo cognitivo che deriva da diverse patologie e che compromette le funzioni superiori dell'encefalo.

Nella popolazione dello studio Mugello, la prevalenza della demenza è pari al 15,3%, mentre i dati relativi alla *prevalenza* della demenza in Italia indicano tassi oscillanti attorno al 33% tra 85 e 90 anni, per arrivare al 57% oltre i 90 anni, raddoppiando approssimativamente ogni 5 anni (Mutani R., 2012).

Numerosi processi patologici possono portare a un quadro clinico di demenza. La malattia di Alzheimer è la causa più frequente di demenza (50-70% dei casi), il 10-20% è su base vascolare mentre altre patologie neurodegenerative, quali la demenza a corpi di Lewy e la malattia di Pick, sono la causa della demenza nel 10-30% dei casi; il restante 10-20% è secondario a patologie potenzialmente reversibili (Bianchetti A., 2007).

La malattia di Alzheimer e la demenza vascolare hanno caratteristiche molto simili in vari aspetti, nei fattori di rischio e nei segni e sintomi clinici. Dati sperimentali e clinici hanno evidenziato che la

disfunzione endoteliale neurovascolare può giocare un ruolo importante nel declino cognitivo e nella neurodegenerazione della malattia di Alzheimer e nella demenza vascolare. L'alterazione del microcircolo, infatti, correla con cambiamenti patologici in entrambe le malattie.

Come è noto le CEP svolgono un ruolo fondamentale nel processo di riparazione dei vasi, le CEP una volta mobilizzate dal midollo, si riversano in circolo e possono differenziarsi in cellule endoteliali che sostituiscono così le cellule endoteliali disfunzionanti.

Precedenti studi hanno dimostrato che i fattori vascolari e le CEP svolgono un ruolo nella patogenesi e nella progressione della malattia di Alzheimer (482) (483).

E' stato dimostrato che i livelli delle CEP correlano con il flusso cerebrale e con il rate metabolico nei pazienti con ipoperfusione cerebrale cronica, un fattore determinante dei deficit cognitivi e della malattia di Alzheimer negli anziani.

I risultati ottenuti nel nostro studio sono in accordo a quelli ottenuti dagli altri studi sul ruolo delle CEP e demenza di Alzheimer. Infatti i soggetti della popolazione del Mugello che hanno demenza hanno un numero ridotto di CEP rispetto a quelli in cui non era stata evidenziata una demenza. Inoltre, nella popolazione del Mugello esiste una correlazione positiva e significativa fra il numero delle CEP e il punteggio del MMSE. I motivi che possono rendere ragione del numero ridotto di CEP nella demenza sono molteplici. La malattia di Alzheimer è determinata dall'accumulo della proteina  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) dovuta all'inefficiente clearance da parte della barriera ematoencefalica.

Tuttavia, anche la disfunzione endoteliale gioca un ruolo nell'inizio e progressione della malattia di Alzheimer. La deposizione anomala di  $A\beta$  nell'anziano risulta essere tossica per le cellule endoteliali e può causare una vasocostrizione endotelio-dipendente. La proteina  $\beta$  amiloide è inoltre in grado di indurre una riduzione dell'ossido nitrico attraverso la riduzione dell'attività enzimatica della eNOS. Perciò l'accumulo della proteina  $\beta$  amiloide porta alla degenerazione neuronale e a cambiamenti enzimatici e strutturali delle cellule endoteliali, fornendo un potenziale collegamento fra malattia di Alzheimer ed i meccanismi vascolari della demenza.

Le cellule endoteliali della barriera ematoencefalica a loro volta possono modulare la ratio  $aA\beta_{40/42}$  e giocare un ruolo importante nella regolazione delle concentrazioni di  $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$  nella demenza di Alzheimer. Il numero ridotto delle CEP nei pazienti con Alzheimer potrebbe causare una clearance alterata dell' $A\beta$  attraverso la barriera ematoencefalica. Inoltre, nei pazienti con malattia di Alzheimer familiare sono state identificate frequentemente mutazioni nel gene che codifica per la presenilina-1, una proteina che controlla la crescita e differenziazione delle CEP.

Un alterato numero di CEP è stato documentato anche nei modificazioni della sostanza bianca associati all'età (Age-related white matter changes) (WMC). I WMC sono una manifestazione dell'aterosclerosi dei piccoli vasi, sono strettamente correlati all'età avanzata e ai fattori di rischio cardiovascolari, sono associati ad eventi avversi, inclusi i deficit cognitivi, la demenza e sono fattori di rischio per l'ictus e la

morte. La dimostrazione che ridotti livelli di CEP sono associati al WMC suggerisce che la disfunzione endoteliale giochi un ruolo cruciale nella malattia dei piccoli vasi e nella demenza.

4.i- I soggetti dello studio Mugello che hanno un numero di CEP nel più alto terzile della loro distribuzione sono coloro che hanno un rischio minore di avere un deficit cognitivo misurato con la scala MMSE.

Nel nostro studio, abbiamo considerato il punteggio come variabile dicotomica utilizzando come cut-off il valore di 24: i soggetti con un punteggio >24 sono stati considerati soggetti senza deficit cognitivo.

Abbiamo utilizzato il punteggio grezzo del MMSE, perché la tabella di correzione non si applica per età >89 aa. La media del punteggio grezzo del MMSE è pari a 22 (range interquartile 13-27).

L'associazione fra MMSE > 24 e numero elevato di CEP rimane significativa anche dopo che prendiamo in considerazione tutti i fattori che possono influenzare compresa la scolarità espressa in anni.

I nostri dati, ottenuti su una popolazione di ultranonagenari in cui la prevalenza della demenza era del 15,3 %, sono in linea con quelli ottenuti nei pazienti con malattia di Alzheimer. Gli studi sui malati di Alzheimer, infatti, hanno dimostrato che esiste una correlazione positiva e significativa fra il punteggio di MMSE ed il numero delle CEP, sia valutate come cellule CD34+/CD133+/KDR+ (metodica citofluorimetrica) che come "early EPC colony-forming units (CFU-EPC)" (mediante colture cellulari e valutazione della capacità delle cellule di formare colonie di cellule endoteliali).

Analizzando la correlazione fra MMSE e CEP nei soggetti non dementi della popolazione del Mugello, non abbiamo documentato una correlazione significativa fra i tre sottotipi delle CEP ed il punteggio MMSE, suggerendo come la riduzione delle CEP sia una caratteristica peculiare della demenza.

4.ii- Relativamente all'associazione fra i vari tipi di cellule e la depressione l'analisi di regressione logistica ha messo in evidenza che un numero maggiore di cellule endoteliali circolanti è associato alla presenza di una depressione severa, anche dopo correzione per le variabili confondenti quali il MMSE<24, le disabilità fisiche e le condizioni sociali (vivere da solo o in compagnia di familiari o badanti). Al contrario le CEP e CPC non sembrano essere influenzate dalla presenza della depressione misurata con la GDS. Le malattie cardiovascolari e la depressione sono due condizioni con un'elevata prevalenza nelle società occidentali e costituiscono un importante problema sanitario. La depressione è frequentemente riscontrata nei pazienti con malattie cardiovascolari e rappresenta un fattore di rischio indipendente per la mortalità cardiovascolare. In letteratura sono presenti dati sulla relazione fra depressione, eventi avversi cardiovascolari ed infiammazione, sebbene non siano stati ancora del tutto chiariti i meccanismi patogenetici. Sempre più numerose sono le evidenze sul ruolo della disfunzione endoteliale nella depressione: più elevati livelli dei biomarcatori di danno endoteliale quali la molecola adesiva VCAM-1 ed il fattore von Willebrand sono stati documentati nei pazienti con depressione maggiore al momento della diagnosi rispetto ai soggetti di controllo (484).

Il nostro studio ha messo in evidenza come un altro marcatore surrogato della disfunzione endoteliale, che è rappresentato dalle CEC, è associato significativamente alla depressione, anche dopo correzione con i fattori confondenti sopra citati.

Questi risultati sono in accordo a quanto osservato dallo studio di Lopez-Vilchez che in un piccolo gruppo di pazienti depressi (n=12) di età inferiore ai 65 anni ha messo in evidenza un numero significativamente maggiore di CEC nei pazienti rispetto ai soggetti di controllo.

Come indagine di screening per identificare un soggetto affetto da un disturbo del tono dell'umore può essere utilizzata la Geriatric Depression Scale (GDS) (Yesavage J.A., 1983), una tra le più diffuse scale per la valutazione dei sintomi depressivi nell'anziano, che trova la sua applicabilità anche nel paziente demente di grado lieve-moderato, mentre è sconsigliato l'utilizzo nei pazienti con punteggio MMSE<14 o la versione a 15 voci la "15-items Geriatric Depression Scale (GDS)".

Per i pazienti affetti da demenza di entità moderato-severa l'unica scala appositamente disegnata per la valutazione dei sintomi depressivi nei pazienti dementi è la "Cornell Scale for Depression in Dementia (CSDD) (Alexopoulos G.S., 1988)" (Alexopoulos G.A., 1988).

Nello studio Mugello è stata utilizzata la versione di scala GDS a 15 item, per cui il massimo punteggio ottenibile è stato di 15. E' stato possibile valutare la GDS nel 77,1% dei soggetti del Mugello (319/414). Il punteggio mediano ottenuto è stato di 4 con un range di interquartile che va da 2 a 7. I soggetti con punteggio GDS nel più alto terzile rappresentavano il 37,9 % (121/319) della popolazione con MMSE > 14 ed erano quindi soggetti con sintomi depressivi clinicamente rilevanti suggestivi di una depressione grave.

La dimostrazione che nella popolazione del Mugello un numero elevato di CEC si associa alla depressione è quindi in linea con il concetto che alla fisiopatologia degli eventi depressivi possa contribuire in maniera importante la disfunzione endoteliale, qui rappresentata da un elevato numero di CEC.

Sulla scorta delle osservazioni presenti in letteratura sull'associazione fra un numero ridotto delle cellule progenitrici endoteliali e depressione, abbiamo valutato la relazione esistente fra numero delle CEP ed il punteggio GDS. Nella nostra popolazione non è stata osservata alcuna correlazione fra numero di CEP e punteggio GDS, così come un punteggio GDS nel più alto terzile non si associa ad un ridotto numero di CEP.

Le evidenze che sono fino ad oggi disponibili sono relative ad una riduzione delle CEP nei pazienti o con angina stabile che avevano un punteggio alto (>10) della Depression Anxiety Stress Scales (DASS), che è un questionario a 21-item auto-somministrato e che misura la sintomatologia depressiva, ansiosa e da stress. Quindi un punteggio elevato della DASS nei pazienti con angina stabile risulta associato ad una deplezione significativa delle CEP ma anche della FMD a dimostrazione del ruolo patogenetico della disfunzione endoteliale nella depressione (485).





per il mantenimento della propria indipendenza. È costituita da un elenco di otto funzioni complesse che richiedono competenza nell'uso di strumenti.

Il punteggio totale sia della BADL che delle IADL viene assegnato come somma delle attività indipendentemente eseguite. L'assegnazione del punteggio si basa sul grado di indipendenza del paziente e sull'eventuale necessità di assistenza o supervisione durante lo svolgimento del compito.

E' noto come l'esercizio fisico moderato sia un fattore protettivo per quanto concerne le patologie vascolari e come possa contribuire sia alla prevenzione primaria e secondaria. Uno dei meccanismi attraverso i quali l'esercizio fisico conferisca protezione è ritenuto essere il mantenimento e il miglioramento dell'integrità endoteliale e di conseguenza della funzione vascolare. In letteratura sono presenti numerosi studi che dimostrano come l'esercizio fisico moderato possa indurre la mobilizzazione delle CEP dal midollo al circolo e possa, quindi, contribuire a mantenere l'integrità del vaso e la funzione vascolare sia nei soggetti sani che nei pazienti con malattie cardiovascolari. Uno studio recentemente pubblicato (488), condotto su pazienti post-infarto del miocardio di età media pari a 68 anni, sottoposti ad un attenta valutazione dell'attività fisica totale e dell'Activity of Daily Living (ADL) valutata attraverso un questionario sulle attività fisiche di base (instrumental activities of daily living: camminare, andare in bicicletta, salire le scale ecc.) e attività del tempo libero (ad esempio giardinaggio) ha messo in evidenza che esiste una relazione significativa e positiva fra attività fisica di base e numero delle CEP, così come le ADL correlano positivamente con i livelli di granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Il G-CSF è probabilmente il meccanismo attraverso il quale l'esercizio fisico induce un rilascio di CEP, l'esercizio fisico, infatti, induce un aumento ei livelli circolanti di G-CSF, che è uno dei principali fattori capaci di indurre la mobilizzazione delle CEP. Gli stessi Autori hanno studiato il ruolo dell'ADL sulle funzioni della memoria in una coorte di soggetti istituzionalizzati con età fra 50 e 78 anni ed hanno dimostrato come le attività fisiche routinarie possono avere effetti benefici non solo sulla memoria ma anche e sulla probabilità di sviluppare demenza (489).

Fatte salve le debite differenze fra le ADL dei lavori sopra descritti e le ADL che si usano per la valutazione geriatrica dell'autonomia funzionale dell'anziano, e' interessante notare che nei pazienti affetti da demenza della popolazione del Mugello abbiamo documentato la presenza di un numero ridotto di CEP e che l'autonomia funzionale valutata con le ADL è significativamente associata ad un numero più elevato di CEP.

Nello studio Mugello livelli della PCR sono risultati significativamente più elevati nei soggetti che hanno un livello di autonomia più basso (punteggio>13) rispetto sia ai soggetti con un punteggio tra 4 e 13 (soggetti parzialmente autonomi) che con un punteggio fra 0 e 3 (soggetti autonomi).

Questi risultati sono in accordo alle evidenze derivanti dallo studio "The National Health and Nutrition Examination Survey,1999–2008". Lo studio è stato condotto su 1403 adulti con un età media di 73,2 anni e una diagnosi di malattia cardiovascolare; a tutti i pazienti è stato somministrato un questionario

sulle Disability in activities of daily living (ADL), e delle instrumental activities of daily living (IADL). Lo studio ha dimostrato che elevati livelli di PCR rappresentano un fattore di rischio indipendente di disabilità negli anziani affetti da malattia cardiovascolare. L'infiammazione cronica impatta negativamente sull'integrità dell'endotelio e sul controllo del flusso sanguigno nel microcircolo, riduce la risposta vasodilatatoria necessaria per aumentare l'apporto di sangue al muscolo. Elevati livelli dei marcatori dell'infiammazione sono correlati alla perdita di massa muscolare e di forza muscolare, entrambi importanti predittori della disabilità negli anziani (490).

E' di rilievo che nella popolazione del Mugello i soggetti con un buon livello di autonomia e ridotta disabilità sono coloro che hanno un numero di CEP nel più alto terzile della loro distribuzione. Anche dopo correzione dei fattori confondenti, quali l'età, il sesso, il MMSE<24, la forza muscolare misurata come handrip, la massa magra e massa grassa un numero più elevato di CEP rimane significativamente associato con la disabilità misurata con le scale ADL.

4.iv- Una funzione degli arti inferiori elevata, misurata con la SPPB, si associa significativamente ad un numero più elevato di CPC, ma tale associazione non rimane significativa dopo correzione per i fattori confondenti.

La scala SPPB è una breve batteria di test nata per valutare la funzionalità degli arti inferiori.

In letteratura, a nostra conoscenza, non sono presenti dati relativi alla funzionalità degli arti inferiori e cellule staminali.

La maggior parte dei dati sono relativi all'influenza dell'infiammazione sulla performance fisica. Nello studio International Mobility in Aging Study (IMIAS), che ha arruolato in 4 città: Natal (Brasile), Manizales (Colombia), Saint-Hyacinthe (Quebec, Canada) e Kingston (Ontario, Canada) con differenti condizioni socio-economiche e culturali, 200 uomini e 200 donne (età compresa fra 65 e 74 anni) per ciascuna città. Lo studio ha messo in evidenza che elevati livelli di PCR correlano negativamente con la performance fisica valutata con la SPPB. Tale associazione negativa rimane significativa anche dopo correzione per le covariate sesso, età, livello educativo, abitudine al fumo, indice di massa corporea e numero delle malattie croniche (491). Verosimilmente elevati livelli di PCR oltre ad influenzare negativamente le funzioni endoteliali sono anche in grado di indurre sarcopenia e quindi di influire negativamente sulle funzionalità degli arti inferiori.

L'analisi dei dati relativi alle cellule staminali nella popolazione del Mugello ha evidenziato che i soggetti con un'elevata funzionalità degli arti inferiori hanno un numero elevato di cellule progenitrici circolanti. Questo è un dato interessante in quanto le CPC sono cellule staminali che possono dare origine oltre che a cellule del tessuto osseo e cellule endoteliali anche a cellule muscolari. Tuttavia, all'analisi di regressione logistica multivariata corretta per tutti i fattori confondenti sopra elencati l'associazione fra performance fisica ed elevato numero di CPC perde la significatività statistica.

In conclusione, i risultati ottenuti dallo studio Mugello hanno messo in evidenza il ruolo cruciale della disfunzione endoteliale sulle funzioni cognitive e performance funzionale nel “grande anziano”.

Lo studio delle CEP ha consentito un approfondimento significativo sul ruolo delle CEP nel mantenimento e nella riparazione delle funzioni endoteliali negli anziani. Nell’anziano la risposta infiammatoria sostenuta e continua, caratteristica dell’età avanzata, determina un danno endoteliale che può essere riparato solamente dalle CEP, visto il limitato potenziale rigenerativo delle cellule endoteliali limitrofe al sito di danno. Nell’anziano la capacità del midollo di rilasciare cellule staminali è molto ridotta. Questo dato assieme alla constatazione che nell’anziano c’è una continua richiesta di CEP per riparare i danni a livello vascolare sottolinea l’importanza di studiare la capacità individuale dei soggetti anziani di riparare un endotelio danneggiato. Le CEP, infatti partecipano al mantenimento di un endotelio “sano” e funzionano come una riserva cellulare per la riparazione delle cellule endoteliali disfunzionanti. I fattori di rischio cardiovascolare e le patologie vascolari nella popolazione anziana del Mugello possono influire significativamente sulle CEP aumentandone l’apoptosi ed interferendo con le vie di signalling che regolano la differenziazione e mobilizzazione delle CEP.

Nello studio Mugello, abbiamo dimostrato che un numero elevato di CEP è associato ad una funzione motoria degli arti inferiore migliore e ad un livello di autonomia maggiore, mentre un numero ridotto di CEP è associato alla presenza di demenza e di un deficit cognitivo.

Dal nostro studio emerge anche il ruolo significativo di un altro marcatore di danno ed attivazione endoteliale le CEC. Il distacco dalla parete vascolare delle CEC determina un endotelio disfunzionante e facilita l’adesione delle piastrine al sottoendotelio, promuovendone la loro attivazione e facilitando la formazione di un trombo. Un aumento delle CEC correla con un aumentato turnover delle cellule endoteliali ed è specchio di uno sbilanciamento verso il danno endoteliale nell’equilibrio che esiste fra danno endoteliale e riparazione del danno ad opera delle CEP. Nello studio Mugello le CEC si associano significativamente ad un grado severo di depressione.

Lo studio Mugello grazie a tutte le valutazioni della performance fisica, della disabilità, delle funzioni cognitive e alla valutazione di una serie di biomarcatori umorali e cellulari ha consentito di approfondire lo scenario delle relazioni fra infiammazione, disfunzione endoteliale e età avanzata.

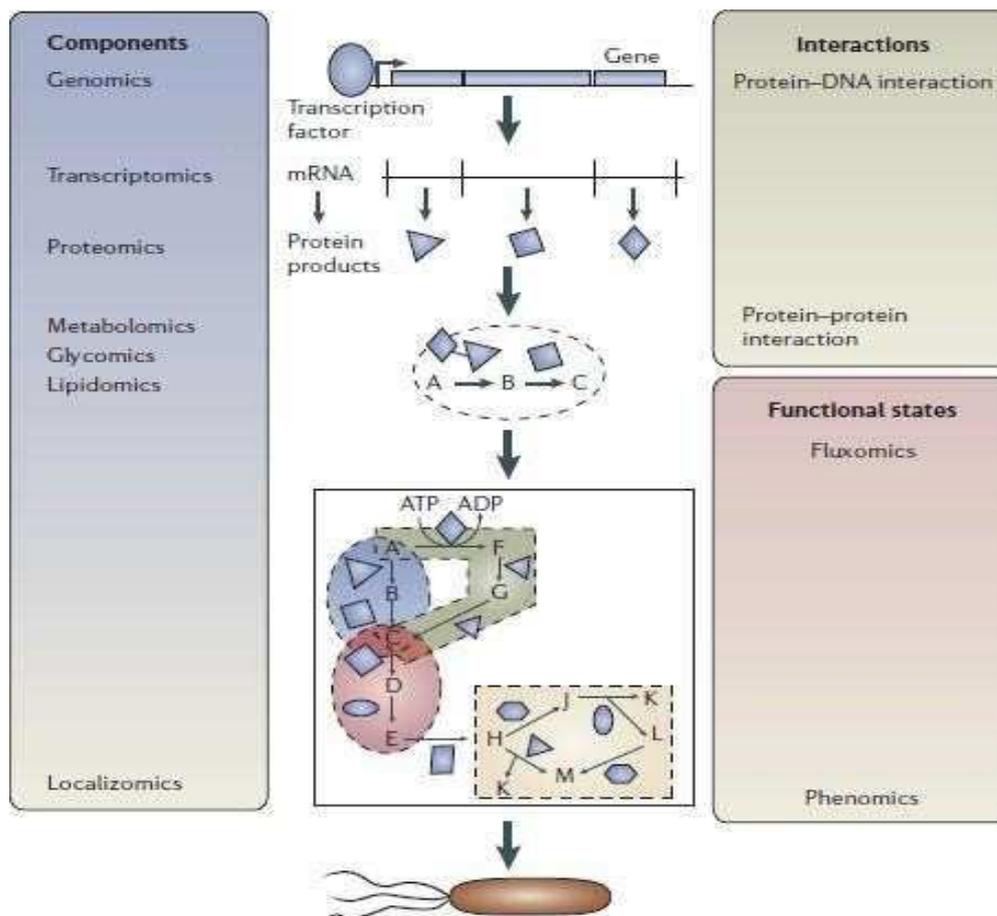
## 9 Metabolomica

### *Scienze Omiche e Metabolomica*

Nell'ambito della biologia dei sistemi<sup>1</sup>, hanno avuto un intenso sviluppo nell'ultimo ventennio le cosiddette "scienze omiche": l'avvento del sequenziamento dell'intero genoma e altre tecnologie sperimentali *high-throughput* hanno trasformato la ricerca biologica da una disciplina relativamente povera di dati ad un insieme molto ricco e complesso di informazioni<sup>2</sup>. L'obiettivo fondamentale delle scienze omiche sta nell'interpretare questo vasto insieme di dati in un approccio olistico e globale per ricavarne un'informazione a più livelli sugli ambienti cellulari e infine su sistemi viventi evoluti.

Le scienze definite omiche sono varie e consentono di ottenere diversi tipi di informazione [Figura 1]. Le prime e le più sviluppate, come la genomica, la trascrittomica e la proteomica, identificano e caratterizzano i componenti molecolari di una cellula. Nello specifico, la genomica è lo studio della sequenza dell'intero genoma e dell'informazione contenuta in esso, ed è sicuramente la più matura e la più sviluppata tra le scienze omiche. La trascrittomica fornisce informazioni sia sulla presenza che sull'abbondanza relativa di trascritti di RNA, indicando in tal modo i componenti attivi all'interno della cellula. La proteomica mira ad individuare e quantificare i livelli cellulari di ogni proteina codificata dal genoma.<sup>2</sup>

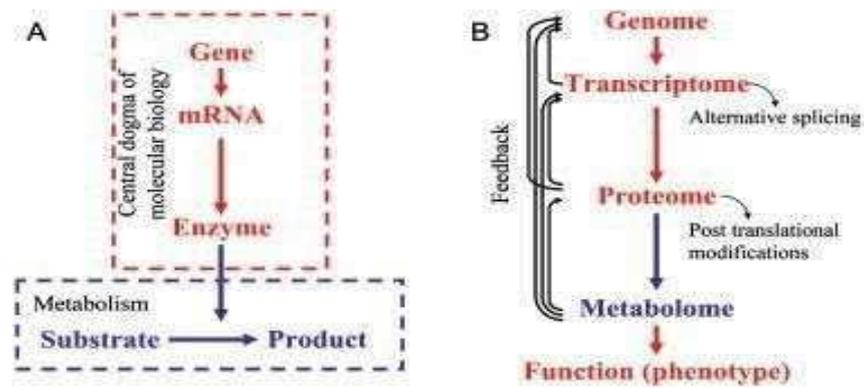
Nel vasto campo delle scienze omiche si collocano anche la metabonomica e la metabolomica, che sono definite rispettivamente come "la misura quantitativa della risposta metabolica dinamica multiparametrica dei sistemi viventi a stimoli patofisiologici o mutazioni genetiche"<sup>3</sup> e come "l'analisi globale e quantitativa di tutti i metaboliti"<sup>4</sup>. Anche se effettivamente esiste una differenza tra le due, esse vengono considerate in definitiva quasi equivalenti dalla comunità scientifica<sup>5</sup>, in quanto le procedure analitiche sono esattamente le stesse.



**Figura 1- Alcune tra le principali scienze omiche (Adattata da <sup>2</sup>)**

Fino a pochi anni fa, il paradigma dominante nella rappresentazione del funzionamento di un sistema biologico era dettato da una visione gerarchica dall'alto verso il basso, secondo un'interpretazione unidirezionale del flusso di informazioni, dai geni, ai trascritti, alle proteine, le quali vanno infine ad incidere sulle vie metaboliche e dunque conducono a cambiamenti nel fenotipo dell'organismo [Figura 2(A)]. Da questo postulato si poteva dedurre che l'identificazione della sequenza genica di un sistema biologico sarebbe stata da sola sufficiente per prevedere le principali caratteristiche funzionali.<sup>6</sup>

Tuttavia questa visione lineare dell'informazione biologica non è più valida, in quanto è stato ampiamente compreso che i processi cellulari sono in realtà strettamente connessi tra loro attraverso meccanismi retroattivi [Figura 2(B)].



**Figura 2-(A) Dogma centrale della biologia molecolare, in cui il flusso di informazioni procede in maniera gerarchica; (B) schema generale secondo le scienze omiche. (Adattata da <sup>6</sup>)**

Questo appare ovvio dal momento che un sistema vivente si modifica continuamente in relazione allo stato fisiologico e alle interazioni con l'ambiente esterno, in risposta a stimoli chimici e fisici e a modifiche geniche, determinando la variazione o l'insorgere di nuovi meccanismi. Un sistema biologico, come sistema complesso, può trovare vie alternative per i processi che determinano i flussi di materia ed energia, ovvero esercita un controllo sul suo funzionamento attraverso non una struttura gerarchica rigida, ma attraverso una struttura organizzata con interconnessioni tra il patrimonio genetico, proteico e metabolico, in maniera globale e flessibile.

Grazie alla metabolomica, è possibile dunque descrivere il profilo chimico in termini delle piccole molecole presenti in cellule, tessuti, organi e fluidi biologici. Le sue componenti (i metaboliti, che vanno a costituire il metaboloma) possono essere viste come il prodotto finale dell'espressione genica o dell'attività proteica (enzimi)<sup>7</sup>, definendo così il fenotipo biochimico di un sistema biologico nel suo insieme, compreso l'uomo.

Il metaboloma è l'insieme quantitativo di tutte le molecole a basso peso molecolare (tipicamente inferiore a 3000 Da) presenti nelle cellule in un particolare stato fisiologico o evolutivo.<sup>6</sup> Sebbene il metaboloma e quindi la metabolomica siano certamente complementari alla trascrittomica e alla proteomica, gli studi metabolomici hanno dimostrato alcuni importanti vantaggi che hanno reso questa scienza omica, nata molto dopo le altre, sempre più popolare, come è visibile dal sorprendente aumento di pubblicazioni su dati di metabolomica avvenuto nel primo decennio del ventunesimo secolo<sup>8</sup>. I motivi di questo crescente successo

sono diversi, a partire innanzitutto dalla possibilità di riconoscere e quantificare moltissimi metaboliti direttamente da sistemi biologici complessi con accuratezza e precisione. In più, il metaboloma è l'ultimo nella scala biologica che va dai geni alla loro funzione ed è quindi il più adatto a descrivere le attività della cellula a livello funzionale: qualsiasi variazione dovuta a stimoli fisiopatologici viene amplificata nel metaboloma, il che comporta un notevole aumento di sensibilità, oltre al fatto che la risposta a questi stimoli avviene in maniera estremamente rapida, molto più velocemente rispetto al genoma o al proteoma. Questo perché i flussi metabolici, e quindi anche le quantità stesse di metaboliti, sono regolati non solo dall'espressione genica ma anche da meccanismi post-trascrizionali e post-traduzionali influenzati da fattori ambientali, stati patofisiologici, microbioma intestinale, xenobiotici, perciò il metaboloma può essere considerato il più vicino al fenotipo<sup>6</sup>.

In altre parole, mentre la genomica e la proteomica suggeriscono un possibile modo di funzionamento del sistema, la metabolomica dà la rappresentazione reale del sistema, ed è quindi indispensabile per monitorare la risposta biochimica degli organismi dovuta a fattori esterni, quali farmaci, malattie, dieta, e così via.

La maggior parte degli studi di metabolomica viene condotta utilizzando biofluidi comuni come urine, siero e plasma, facilmente ottenibili da mammiferi, in particolare dagli umani, in una maniera non invasiva essendo questi facilmente reperibili e utilizzati in molte altre analisi biologiche.

Fluidi secreti o escreti da un organismo vivente forniscono una panoramica unica del suo stato biochimico poiché la composizione di un determinato biofluido è diretta conseguenza della funzione delle cellule che sono riservate alla produzione di esso. Numerose informazioni e utili dettagli biochimici ad esempio sulla disfunzione di un organo, su una malattia o sulla tossicità di un farmaco, possono essere infatti ricavati dalla composizione di un particolare liquido.

Possono essere impiegati per le analisi anche molti altri fluidi, come saliva, sudore, condensato di respiro, bile, fluido cerebrospinale e così via.<sup>9</sup> Tuttavia di norma non sono utilizzati in quanto o le tecniche di estrazione sono molto invasive, oppure non si riescono ad ottenere informazioni soddisfacenti dai metaboliti contenuti.

Il numero di metaboliti presenti in questi biofluidi umani non è esattamente conosciuto, ma si stima essere comunque dell'ordine di poche migliaia, che confrontato con i circa 24000

geni e le centinaia di migliaia di proteine stimate apporta un altro notevole vantaggio alla metabolomica, riducendo drasticamente il numero di elementi da determinare.

### *Tecniche Analitiche in Metabolomica*

Alla base di ogni studio di metabolomica che abbia successo c'è un insieme di dati di alta qualità che produce una fotografia a livello biochimico, la quale riflette lo stato di un organismo attraverso le sue piccole molecole endogene o esogene in quel determinato momento. Il tipo di informazione che la metabolomica cerca di raggiungere può essere suddiviso in due livelli, differenti ma complementari. Il primo di questi è fondamentalmente un risultato spettrale o cromatografico che riflette le variazioni complessive nella concentrazione dei metaboliti presenti, senza necessariamente identificare i componenti effettivi che stanno cambiando.<sup>10</sup> Questo tipo di dati può essere pensato come un'impronta digitale metabolica (*fingerprint*)<sup>8</sup> ed è semplicemente una rappresentazione numerica della risposta analitica derivante dai componenti che costituiscono il campione. In teoria qualsiasi metodo analitico potrebbe fornire un *fingerprint* metabolico, ma sono pochi quelli che si rivelano altamente riproducibili e contemporaneamente riescono a garantire un elevato livello di informazioni.<sup>11</sup> Il secondo livello di interpretazione, frequentemente usato soprattutto nell'ambito della *drug discovery*, è dato dall'identificazione e la quantificazione di un elenco predefinito di metaboliti che possono essere collegati a vie metaboliche specifiche e, quindi, fornire *biomarkers* e/o informazioni meccanicistiche di un processo, approccio che viene definito *metabolic profiling*.<sup>4,6,8,10</sup>

Ci sono relativamente poche tecniche che sono in grado di fornire in maniera esauriente entrambi questi livelli di dettaglio, e indubbiamente predominanti tra queste sono i metodi analitici basati sulla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e sulla spettrometria di massa (MS). Il grosso vantaggio di NMR e

MS è fondamentalmente dovuto alla capacità di entrambe queste tecniche di generare *patterns* spettrali riproducibili e ricchi di informazioni e di identificare direttamente componenti molecolari all'interno di campioni biologici complessi, oltre a poter determinare la struttura di metaboliti di interesse e l'abbondanza relativa e assoluta delle molecole.

La spettroscopia NMR è una tecnica non distruttiva che offre una risposta analitica riproducibile e lineare con un elevato *range* dinamico, e costituisce dunque un ottimo strumento sia per il *fingerprinting* che per il *profiling*. Un grande vantaggio degli approcci

basati sull’NMR è che i biofluidi possono essere analizzati direttamente con una minima preparazione del campione, ed il costo richiesto per l’acquisizione di ciascuno spettro è

piuttosto basso, tuttavia risulta una tecnica abbastanza insensibile.

Al contrario, la spettrometria di massa è una tecnica distruttiva ampiamente diffusa in metabolomica grazie alla sua elevata sensibilità. Per questo motivo, a differenza dell’NMR, usato principalmente per il *fingerprinting* di biofluidi, la MS viene più spesso impiegata come rivelatore altamente sensibile e selettivo per l’identificazione e la quantificazione di determinati metaboliti, normalmente utilizzata in combinazione con tecniche cromatografiche. I sistemi accoppiati con la MS più utilizzati impiegano gas cromatografia (GC), cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), o elettroforesi capillare (CE) come tecniche di separazione iniziali.<sup>10</sup>

Nonostante l’ormai incontrastata prevalenza di NMR e MS, anche altri approcci possono essere utilizzati per eseguire analisi metabolomiche. Tra questi, importanti sono sicuramente le tecniche di spettroscopia vibrazionale come IR e Raman, che sono state rivalutate come utili strumenti per il *fingerprinting* metabolico.<sup>6,8,10</sup>

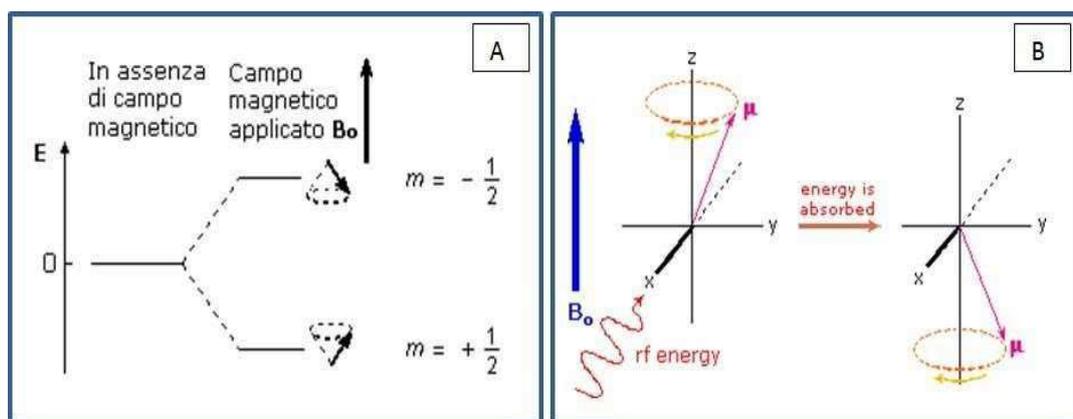
### ***10 NMR in Metabolomica***

Lo spin è una proprietà intrinseca introdotta dalla meccanica quantistica che caratterizza qualsiasi particella in grado di ruotare su se stessa, ed è pensabile quindi come una sorta di momento angolare, in analogia alla meccanica classica. Ad esso è associato un numero quantico  $I$ , che è un numero intero per i bosoni e semintero per i fermioni: protoni, neutroni ed elettroni assumono dunque valori di spin uguali a  $\pm \frac{1}{2}$ .

Particelle con spin  $I$  presentano  $(2I+1)$  sottolivelli energetici normalmente degeneri detti stati di spin.

Nel caso di un nucleo, le proprietà di spin dei protoni e dei neutroni che lo compongono si combinano per definire lo spin totale del nucleo, il quale, essendo carico, ruotando genera un campo magnetico a cui è associato un momento magnetico  $\mu = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)}$ , dove  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico caratteristico del nucleo in esame e  $\hbar$  è la costante di Planck.

Quando il momento magnetico nucleare associato ad uno spin nucleare è posto in un campo magnetico esterno, i diversi stati di spin forniscono diverse energie potenziali magnetiche [Figura 3(A)]. In presenza di un campo magnetico statico che produce una piccola quantità di polarizzazione di spin, un segnale a radiofrequenza (RF) di frequenza appropriata può indurre una transizione tra stati di spin. Questo salto pone alcuni degli spin nel loro stato energetico più elevato [Figura 3 (B)].



**Figura 3-Processo di assorbimento energetico che porta ad una transizione tra stati di spin nucleare, quando il nucleo in questione è sottoposto ad un campo magnetico esterno e ad un impulso di radiofrequenza.**

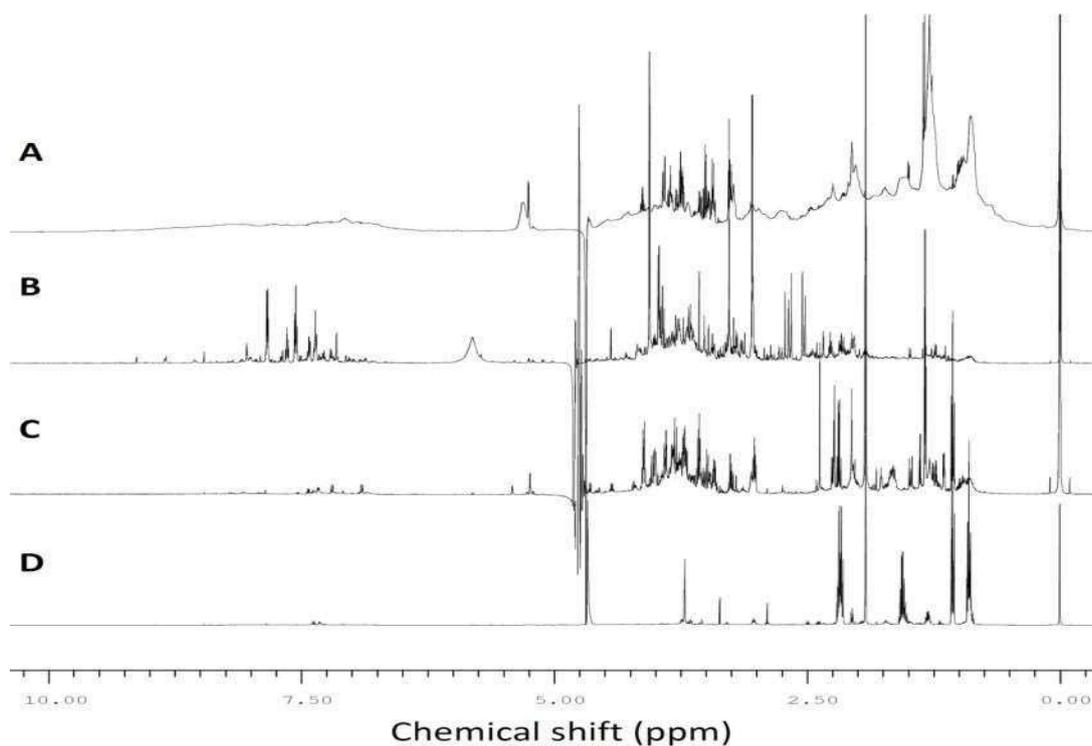
Se il segnale a radiofrequenza viene quindi spento, il rilassamento degli spin allo stato inferiore produce una quantità misurabile di segnale RF alla frequenza di risonanza associata con la transizione di spin nucleare. Questo processo è chiamato Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

Un momento magnetico  $\mu$  posto in un campo magnetico esterno avrà una energia potenziale legata al suo orientamento rispetto a tale campo e tenderà a compiere un moto di rotazione intorno alla direzione del campo stesso con una frequenza tradizionalmente chiamata frequenza di Larmor, che dipende sia dall'intensità del campo sia dal rapporto giromagnetico  $\gamma$ .

La frequenza di Larmor può essere visualizzata classicamente in termini di precessione del momento magnetico intorno al campo magnetico, analoga alla precessione di una trottola intorno al campo gravitazionale. Può anche essere visualizzata quanto-meccanicamente in termini di energia quantica di transizione tra i due possibili stati di spin per spin=1/2 . Questa può essere espressa come energia fotonica secondo la relazione di Planck, per cui la differenza di energia potenziale magnetica è  $h\nu_{\text{Larmor}} = 2 \mu B$ .

Ogni molecola contenente uno o più atomi con momento magnetico di spin nucleare  $\mu$  non nullo è potenzialmente rilevabile mediante spettroscopia NMR e, poiché gli isotopi con

momenti magnetici diversi da zero includono  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ , e  $^{31}\text{P}$ , tutte le molecole biologicamente importanti hanno almeno un segnale NMR. Questi segnali sono caratterizzati da frequenza (*chemical shift*), intensità, struttura fine, e proprietà di rilassamento magnetico, tutte caratteristiche che riflettono il preciso intorno chimico del nucleo rilevato. Perciò gli spettri NMR contengono molte informazioni circa l'identità delle molecole nel campione, ed è proprio per questo che l'NMR può essere usato per identificare e quantificare metaboliti in campioni di differente origine biologica [Figura 4].



**Figura 4- Spettri  $^1\text{H-NMR}$  ottenuti dall'analisi di siero (A), urine (B), saliva (C), ed estratti fecali (D).**

Oltre a ciò, l' $^1\text{H-NMR}$  è una tecnica molto versatile che presenta numerosi vantaggi. Per prima cosa, è un metodo non distruttivo, e possono essere acquisiti spettri di sospensioni cellulari, tessuti, piante, di metaboliti estratti e purificati. In particolare, lo sviluppo della tecnica  $\text{NMR HR-MAS}$ , per cui la rapida rotazione del campione ad un angolo di  $54.7^\circ$  (il cosiddetto “angolo magico”) rispetto al campo magnetico applicato provoca la riduzione dello slargamento dei segnali e della perdita di informazione associata, ha reso sperimentalmente realizzabile l'analisi su interi pezzi di tessuto senza trattamento preliminare.

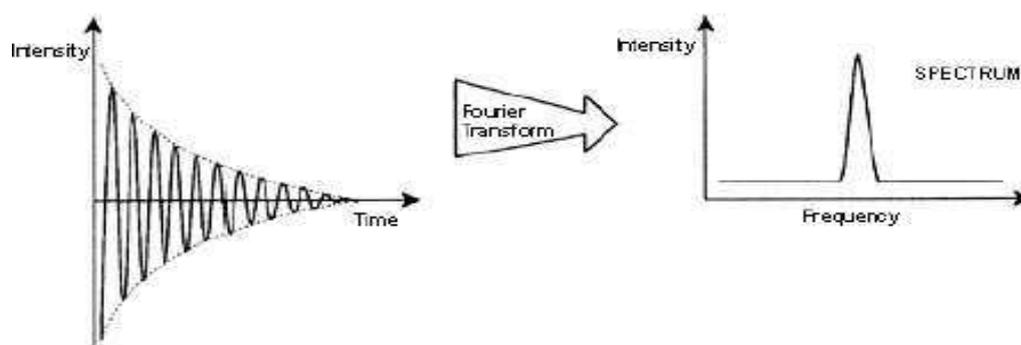
È inoltre possibile mediante  $\text{NMR}$  determinare la struttura di un nuovo metabolita, dimostrare l'esistenza di una particolare via metabolica in vivo, e localizzare la distribuzione di un metabolita in un tessuto. Infine, l'abbondanza naturale di alcuni isotopi magnetici biologicamente rilevanti è bassa e questo consente di utilizzare come *labels* questi isotopi, in particolare  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , introducendoli nel sistema metabolico prima dell'analisi  $\text{NMR}$ . Ciò permette l'esplorazione di vie metaboliche, portando a informazioni qualitative sui legami tra precursori marcati e i loro prodotti e informazioni quantitative sui flussi metabolici.

L'isotopo magneticamente attivo indubbiamente più utilizzato nella maggior parte delle applicazioni di NMR per il *fingerprinting* e il *profiling* metabolico è l' $^1\text{H}$ .

In  $^1\text{H}$ -NMR viene misurata la precessione dello spin protonico quando è sottoposto ad un campo magnetico esterno. Dal punto di vista pratico, un campione contenente protoni (nuclei di idrogeno) viene posto all'interno di un intenso campo magnetico per produrre polarizzazione parziale dei protoni. Viene anche imposto un forte impulso RF sul campione per eccitare alcuni degli spin nucleari nel loro stato di energia superiore. Quando questo forte segnale RF viene spento, gli spin tendono a tornare al loro stato inferiore, producendo una piccola quantità di radiazione alla frequenza di Larmor associata a tale campo. L'emissione di radiazione è associata al rilassamento degli spin dei protoni dal loro stato eccitato. Si induce un segnale a radiofrequenza in una bobina del rivelatore che viene amplificato per visualizzare il segnale NMR. Il segnale raccolto è oscillante con frequenza  $\nu$ , la frequenza di Larmor per il nucleo in esame, si smorza nel tempo e viene detto FID (Free Induction Decay), libero decadimento dell'induzione.

Se il campione contiene nuclei con differenti frequenze di risonanza, questi vengono tutti eccitati contemporaneamente dall'impulso RF e quindi il segnale raccolto sarà una curva complessa, chiamata interferogramma, data dalla combinazione di più FID, uno per ogni frequenza assorbita dai nuclei.

Per poter risalire alle singole frequenze che combinandosi tra loro hanno generato il segnale complesso, è necessario applicare una procedura matematica detta Trasformata di Fourier che permette di passare dal grafico in funzione del tempo, il FID, al grafico in funzione delle frequenze, lo spettro NMR [Figura 5].



**Figura 5- Passaggio dal dominio del tempo (FID) a quello delle frequenze (spettro NMR) grazie alla Trasformata di Fourier**

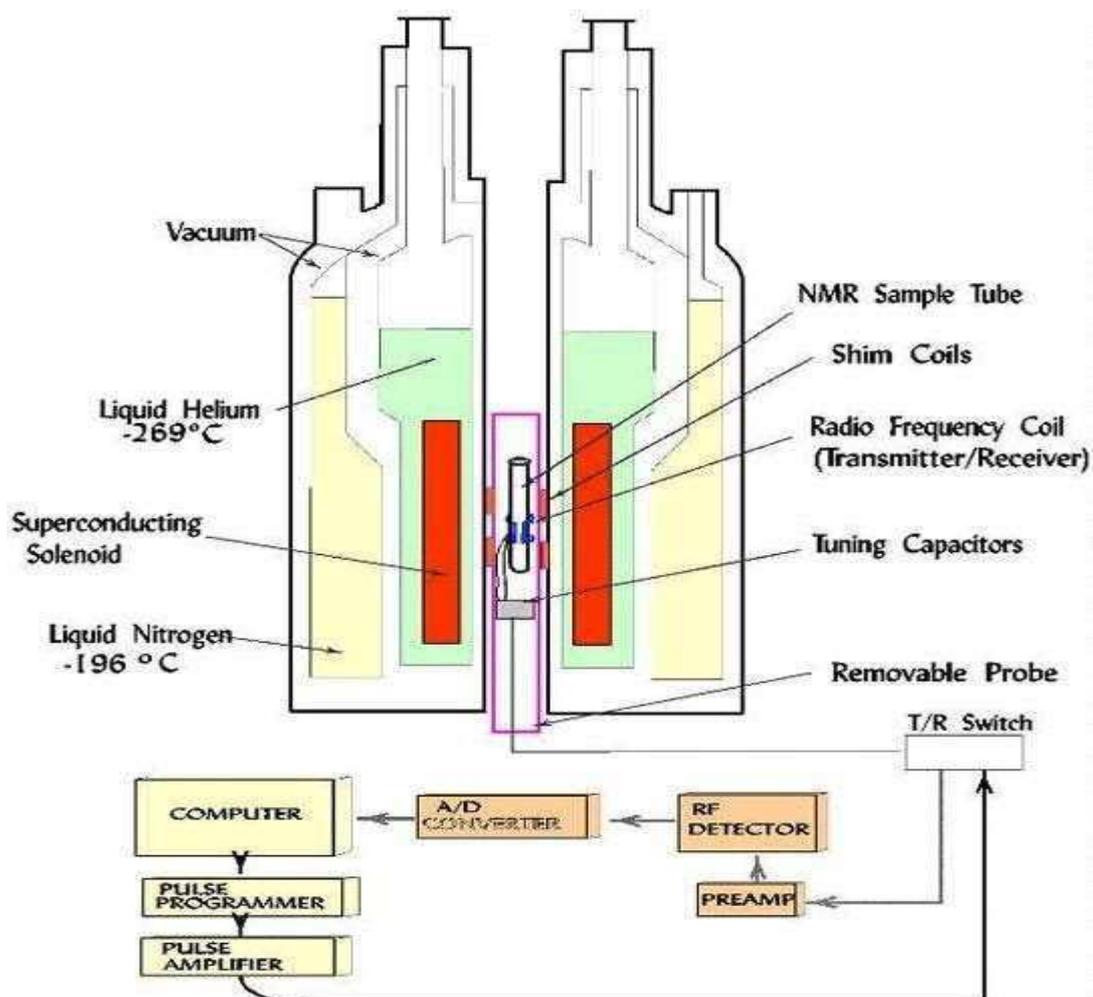


Figura 6- Sezione di uno spettrometro NMR

Per  $^1\text{H-NMR}$ , la soglia di concentrazione per il rilevamento di un metabolita in un estratto utilizzando un moderno spettrometro ad alto campo magnetico è circa  $10\ \mu\text{M}$ , corrispondente ad una quantità di  $5\ \text{nmol}$  nel volume di campione (tipicamente  $500\ \mu\text{L}$ ). In pratica, la sensibilità ottenibile è fortemente dipendente dalla forza del campo magnetico e dalla progettazione del *probehead* che permette di rilevare i segnali. Sono disponibili spettrometri NMR con intensità di campo fino a 21 Tesla, corrispondente ad una frequenza  $^1\text{H-NMR}$  di 900 MHz, ma l'analisi metabolomica viene fatta con strumenti più comunemente disponibili che operano nella gamma 300-600 MHz. Poiché l'incremento della forza di campo aumenta anche la risoluzione spettrale, riducendo il numero di segnali

sovrapposti nello spettro, sono gli spettrometri all'estremità superiore di questa gamma di frequenze i più efficaci e i più usati per il *profiling* metabolico mediante  $^1\text{H-NMR}$ .<sup>10</sup>

Inoltre, recenti sviluppi tecnologici, in particolare l'introduzione di *cryoprobes*, dove la bobina del rivelatore e il pre-amplificatore sono raffreddati a 20K, e di *microcoil probes*<sup>12</sup>, hanno migliorato notevolmente la sensibilità della tecnica<sup>10</sup>.

Oltre alla sensibilità non elevata, l'<sup>1</sup>H-NMR è affetta dal problema che la dispersione dei segnali nello spettro è piuttosto piccola, e questo comporta un'estesa sovrapposizione dei picchi in molte regioni spettrali. Questo svantaggio è poco importante se l'approccio seguito è quello di indagare le variazioni del *fingerprint* complessivo, mentre risulta determinante nel caso si voglia riconoscere e quantificare specifici metaboliti.

Una pur parziale soluzione consiste nell'utilizzare tecniche basate su esperimenti NMR bidimensionali, che aumentano la risoluzione spettrale distribuendo i segnali lungo due assi di frequenza. Questi esperimenti sfruttano le interazioni tra gli isotopi rilevabili in una molecola, ed è possibile ottenere sia correlazione omonucleare, dove i due assi di frequenza dello spettro corrispondono al medesimo nucleo, di solito <sup>1</sup>H, sia correlazione eteronucleare, se un'asse di frequenza corrisponde all'<sup>1</sup>H e l'altro corrisponde a <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N o, occasionalmente,

<sup>31</sup>P. Esempi di esperimenti bidimensionali omonucleari <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H sono il J-res, utile per

attenuare i segnali di macromolecole e per ottenere informazioni ulteriori su molteplicità e costanti di accoppiamento, il COSY e il TOCSY, dai quali si ricavano indicazioni sulle relazioni tra i protoni; tra quelli eteronucleari invece il più usato è il <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC, che permette di identificare i protoni che sono legati ad un certo carbonio e viceversa.

Manipolare i segnali NMR per produrre uno spettro bidimensionale richiede più tempo ed elaborazioni più complesse rispetto ad un esperimento monodimensionale semplice, per questo in metabolomica l'utilizzo di spettri a due dimensioni è poco diffuso e riservato solamente a particolari necessità.

Infine, la dipendenza dal pH del *chemical shift* di protoni vicini a gruppi ionizzabili può costituire una limitazione per l'NMR come strumento di *fingerprinting*. L'utilizzo di strumenti informatici, come algoritmi di allineamento oppure la procedura del *bucketing*, minimizza le differenze dovute a piccole variazioni di pH o di forza ionica.

## *Metodi Chemiometrici*

Da uno studio di metabolomica viene ottenuta una grossa quantità di dati che viene analizzata tramite tecniche di analisi chemiometrica.

La chemiometria è una branca della chimica analitica rivolta all'applicazione di metodi matematici e statistici per gestire, interpretare e predire dati chimici.<sup>13</sup> In particolare, i modelli chemiometrici più usati nell'indagine metabolomica sono quelli di classificazione, di *modeling* e di regressione dell'analisi statistica multivariata, in quanto è necessario utilizzare più variabili per caratterizzare i sistemi in esame. Le misurazioni possono essere disposte in una matrice di dati, in cui ogni riga costituisce un'osservazione (ad esempio ciascun campione, un esperimento, un intervallo di tempo) e le colonne rappresentano le variabili misurate (ad esempio lunghezza d'onda, numero di massa, *chemical shift*, con le relative intensità). Questo processo genera un insieme di dati enorme e complesso, che è difficile da riassumere e manipolare senza gli strumenti adeguati.<sup>14</sup>

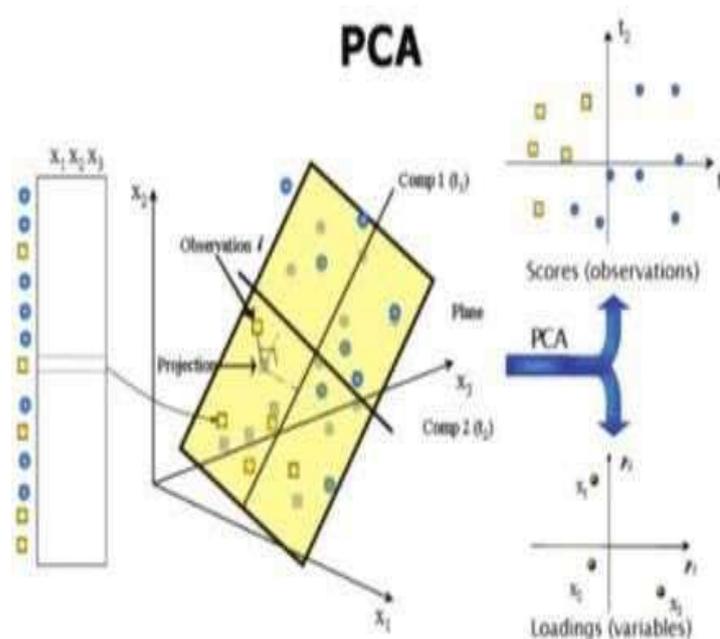
Tali strumenti sono forniti proprio dalla statistica multivariata che, a partire da questo set multidimensionale di coordinate metaboliche, permette di realizzare con ottimi risultati i principali scopi dell'analisi metabolomica, ovvero:

- esaminare complessivamente le differenze globali, le tendenze nelle variazioni e le relazioni che intercorrono tra campioni e variabili;
- determinare se i campioni esaminati tendono o meno a dividersi in *clusters*, in gruppi evidentemente distinti (ad esempio sani/malati);
- mettere in evidenza i metaboliti maggiormente responsabili di tali differenze;
- realizzare modelli predittivi per nuovi campioni.

I metodi di visualizzazione per evidenziare le differenze tra campioni e/o tra variabili possono essere divisi in due gruppi: *unsupervised* e *supervised*. I metodi *unsupervised* sono utilizzati per l'esplorazione preliminare dei dati e il loro scopo è quello di fornire una visualizzazione complessiva dei dati, riducendo le variabili e cercando di massimizzare la varianza tra di essi, senza però fornire informazioni basate su una conoscenza a priori dei dati per guidare l'analisi.

Il metodo *unsupervised* più utilizzato è sicuramente l'analisi delle componenti principali (PCA) che consente di valutare le correlazioni tra le variabili e la loro rilevanza, visualizzare gli oggetti, individuando l'eventuale presenza di *outliers* e di *clusters*, sintetizzare la descrizione dei dati, eliminando rumore o informazione spuria, e ridurre la

dimensionalità. La PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali definiti da una matrice  $X$  di dimensione  $n \times p$ , effettuato in modo che il primo nuovo asse sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati, il secondo sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza dei dati, e così di seguito per tutti i  $p$  nuovi assi. Visto che le prime componenti sono le più significative in quanto spiegano la maggiore varianza tra i dati, ogni campione può essere rappresentato da relativamente poche componenti, che sono combinazioni lineari delle variabili originali, piuttosto che da migliaia di variabili. Questo processo dà origine a due nuove matrici: la matrice dei *loadings* e quella degli *scores*. Quella dei *loadings* è la matrice le cui colonne rappresentano gli autovettori della matrice di covarianza (o di correlazione); le righe rappresentano le variabili originali: ciò significa che, selezionato un autovettore, in ciascuna riga troviamo i coefficienti numerici che rappresentano l'importanza di ciascuna variabile originale in quell'autovettore. In altre parole, il grafico dei *loadings* consente di analizzare il ruolo di ciascuna variabile nelle diverse componenti, le loro correlazioni dirette e inverse, la loro importanza. Gli *scores* esprimono le coordinate per ciascun campione nel nuovo sistema di riferimento, ed il relativo grafico permette di visualizzare il comportamento degli oggetti nelle diverse componenti e le loro similarità, ovvero di individuare raggruppamenti di oggetti simili (*clusters*), la presenza di oggetti particolari (*outliers*), il manifestarsi di particolari regolarità e distribuzioni, ed è perciò il più importante per l'indagine preliminare dei dati ottenuti. [Figura 7]



**Figura 7- Esempio di analisi delle componenti principali in un set tridimensionale di dati (tre variabili), con relativi grafici degli scores e dei loadings.**

Anche i metodi *supervised* vengono utilizzati per visualizzare l'esistenza di raggruppamenti e similarità tra dati, in questo caso però il sistema viene istruito con informazioni aggiuntive, ad esempio il numero e il tipo di classi che si vogliono individuare. Il più usato tra questi metodi è quello di regressione parziale con minimi quadrati (PLS), che correla la matrice  $X$  delle variabili indipendenti (la matrice dei dati) con una matrice  $Y$  che contiene le variabili dipendenti, ad esempio delle informazioni sulla natura dei campioni (sani/malati, maschi/femmine, e così via). In altre parole la PLS ricava delle nuove variabili (analoghe alle componenti principali, in questo caso più spesso chiamate variabili latenti) che massimizzano la covarianza tra i dati in  $X$  e le informazioni contenute in  $Y$ .

Inoltre, sia i metodi *supervised* che quelli *unsupervised* sono frequentemente applicati in combinazione con altre procedure tipiche dell'analisi multivariata, con lo scopo di aumentare la separazione tra i gruppi di campioni. In particolare, un metodo molto usato è quello dell'analisi canonica (CA) che consente di studiare le correlazioni tra i due blocchi di variabili  $X$  e  $Y$ , ma a differenza dei metodi di regressione non presume alcuna relazione causa-effetto tra la matrice  $X$  e la matrice  $Y$ .

A questo punto uno dei punti cruciali dell'analisi metabolomica è riuscire a costruire



modelli robusti che valgano anche per nuovi dati e consentano cioè di predire se un campione appartenga o meno ad un determinato gruppo: per questo scopo sono necessari metodi di classificazione. Il più semplice di questi metodi è il k-NN (k-Nearest Neighbors), che si basa sulla scelta di una distanza, generalmente la distanza euclidea, e sulla selezione di un numero intero di k intorni (gli oggetti più vicini a ogni oggetto da classificare) ai quali si estende la valutazione delle classi cui essi appartengono al fine di collocare l'oggetto considerato con un criterio di assegnazione maggioritario. Come si può vedere anche dalla Figura 8, la scelta del numero k di intorni è sempre fondamentale poiché spesso si rivela cruciale nell'assegnare un campione (contrassegnato da una stella) ad una classe o ad un'altra.

### ***10.1 Applicazioni della Metabolomica***

La metabolomica ha un grande numero di applicazioni differenti, in quanto, grazie all'utilizzo di strumenti statistici (per l'analisi di profili metabolici) e bioinformatici (per la creazione di *database* e per l'annotazione e il trattamento di dati), può essere utilizzata come potente strumento per la caratterizzazione dei sistemi viventi a livello biochimico. Prima di tutto, essendo incentrata sullo studio delle alterazioni metaboliche e dell'omeostasi a livello dell'intero organismo, essa svolge un ruolo fondamentale nel comprendere l'integrità funzionale del sistema, consentendo di individuare l'insorgere di processi patologici, osservare la presenza di mutazioni genetiche, verificare la tossicità di un farmaco<sup>15</sup>.

Analizzando le differenze metaboliche tra sistemi perturbati e non perturbati, ad esempio tra volontari sani e pazienti con una malattia, si può arrivare ad avere una comprensione molto più profonda di quest'ultima<sup>16</sup>, risalendo persino al meccanismo di sviluppo, ai flussi metabolici coinvolti, all'eventuale scoperta di specifici *biomarkers*.

Finora la metabolomica è stata in grado di fornire informazioni significative su una vasta gamma di patologie come cancro, diabete, celiachia, malattie cardiovascolari, disturbi neurologici, respiratori, intestinali.<sup>17</sup>

Applicata nel campo alimentare, la metabolomica consente di creare un'impronta

molecolare in grado di rappresentare fedelmente la varietà di un prodotto alimentare che può avere valore diagnostico o comunque di classificazione. Per questo motivo, questa scienza offre un'eccezionale opportunità di studiare molti aspetti legati agli alimenti, tra cui l'analisi delle componenti molecolari, la qualità e la rilevazione di autenticità.

### ***Il Fenotipo Metabolico***

Una delle applicazioni più importanti e più rivoluzionarie della metabolomica è quella che riguarda la determinazione dell'esistenza di un fenotipo metabolico individuale, basato sulla teoria per cui l'insieme dei metaboliti presenti all'interno di uno stesso biofluido fornisce un'impronta digitale (*fingerprint*), che è caratteristica per ciascun soggetto e procura informazioni sullo stato fisiologico del soggetto stesso. Tra gli obiettivi più interessanti della metabolomica c'è infatti quello di arrivare a spiegare completamente la natura della relazione che intercorre tra i polimorfismi genetici dei diversi individui e il loro *fingerprint* metabolico, allo scopo di comprendere chiaramente la risposta dei differenti organismi agli stimoli esterni.

In passato sono state osservate differenze sperimentali in profili metabolici dovute a differenze di ceppi genetici in due tipi di ratto, cosa che ha suggerito l'esistenza di diversi "metabotypes", definiti come "la descrizione multiparametrica di un organismo in un determinato stato fisiologico basato su dati metabolomici"<sup>18</sup>. Essi possono perciò essere visti come una fotografia degli stati stazionari che definiscono l'omeostasi, il cui mantenimento, che è alla base della vita di ogni essere vivente, è regolato da numerosi cicli biochimici e meccanismi cellulari e

molecolari: l'immenso potenziale della metabolomica sta quindi nel fornire tali immagini ed infine dare informazioni sulle deviazioni dalle condizioni ottimali, che possono essere direttamente collegate alla presenza di uno stato patofisiologico.

La presenza di un fenotipo metabolico unico per ciascun individuo o gruppo di individui è stata dunque da tempo ipotizzata, ma solo nell'ultimo decennio sono state raccolte evidenze sperimentali grazie ad analisi complete e sistematiche di biofluidi, in particolare utilizzando urine<sup>19,20,21</sup>.

L'identificazione di un *metabotype* caratteristico per ogni soggetto potrebbe rivelarsi estremamente importante in molti campi, come la nutrigenomica e la farmacologia, introducendo innovativi miglioramenti nella pianificazione di terapie e diete personalizzate, nella predizione e nella valutazione sull'efficacia o sulla tossicità di farmaci, nella prognosi e nella diagnosi di malattie. Ovviamente, una condizione



essenziale per la loro utilità è che questi si mantengano praticamente inalterati nel tempo; inoltre, il fatto che i profili metabolici sperimentali siano differenti non solo per motivi genetici ma anche per fattori legati all'ambiente esterno, allo stile di vita, all'età, allo stato nutrizionale e di salute, fa sì che i continui cambiamenti giornalieri, siano essi casuali (per esempio legati alla dieta) oppure dovuti a variazioni biochimiche cicliche, costituiscano una fonte di rumore non trascurabile che incide sulla ricerca sistematica di un *fingerprint* metabolico invariante per un dato soggetto. Grazie alla raccolta di numerosi campioni e all'analisi metabolomica è stato possibile dimostrare che questo esiste e che si mantiene relativamente stabile nel tempo, anche a distanza di anni<sup>20</sup>, ma ulteriori studi devono necessariamente essere compiuti affinché si raggiunga una caratterizzazione completa e definitiva dei *metabotypes*.

## 11 Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 357 campioni di siero di nonagenari, 96 uomini (età  $92,61 \pm 3,4$ ) e 261 donne (età  $93,2 \pm 3,2$ ). Seguendo le procedure operative standard, i campioni di siero fresco sono stati conservati a  $-80^\circ\text{C}$  e quindi scongelati a temperatura ambiente al momento dell'analisi.

Un totale di 350  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato sodico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  70 mM; 20% (v / v)  $2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025% (v / v)  $\text{NaN}_3$ ; 0,8% (p / v) sodio trimetilsilil [2,2,3,3 - $2\text{H}_4$ ] -propionato (TMSP) pH 7,4) è stato aggiunto a 350  $\mu\text{L}$  di ciascun campione di siero e la miscela è stata omogeneizzata mediante vortice per 30 s. Un totale di 600  $\mu\text{L}$  di questa miscela è stato trasferito in una provetta NMR da 5 mm (Bruker BioSpin srl) per analisi.

Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR monodimensionali (1D) per tutti i campioni sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro Bruker 600 MHz (Bruker BioSpin) funzionante alla frequenza del protone del protone a 600,13 MHz e dotato di una sonda di disaccoppiamento PATXI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  e  $2\text{H}$  da 5 mm tra cui az bobina a gradiente di asse, un accordatore automatico (ATM) e uno scambiatore di campioni automatico e refrigerato (SampleJet).

Una termocoppia BTO 2000 serviva per la stabilizzazione della temperatura a un livello di circa 0,1 K sul campione. Prima della misurazione, per equilibrare la temperatura a 310 K, i campioni sono stati tenuti all'interno della testa della sonda NMR per almeno 5 minuti. Una sequenza di impulsi di spettroscopia ad effetto Overhauser nucleare standard NOESY 1 Presenta (noesygppr1d.comp; sequenza di impulsi Bruker BioSpin), utilizzando 32 scansioni, 98304 punti dati, una larghezza spettrale di 18.029 Hz, un tempo di acquisizione di 2,7 se un ritardo di rilassamento di 4 se è stato applicato un tempo di miscelazione di 0,01 s per ottenere uno spettro in cui sono visibili sia segnali di metaboliti che

macromolecole ad alto peso molecolare.

I decadimenti dell'induzione libera sono stati moltiplicati per una funzione esponenziale equivalente al fattore di ampliamento della linea di 0,3 Hz prima di applicare la trasformata di Fourier. Gli spettri trasformati sono stati corretti automaticamente per le distorsioni di fase e basali e calibrati su doppietto di glucosio anomalo a 5,24 ppm usando un software di elaborazione NMR (Topspin versione 3.5 pl 7 Bruker BioSpin srl).

Gli spettri <sup>1</sup>H-NMR monodimensionali sono stati usati per identificare trenta metaboliti e calcolare la loro concentrazione relativa. 31 metaboliti sono stati identificati negli spettri mediante l'uso della routine di abbinamento di AMIX 3.8.4 (Bruker BioSpin) in combinazione con il database BBIOREFCODE (Bruker BioSpin), database pubblici (ad esempio HMDB) che memorizzano riferimenti e pubblicazioni quando disponibili.

Ogni metabolita è stato allineato ad un valore di riferimento di spostamento chimico, ottenendo un perfetto allineamento tra tutti gli spettri. Le concentrazioni relative (esprese in unità arbitrarie) dei vari metaboliti sono state calcolate integrando i segnali corrispondenti nell'intervallo spettrale definito<sup>2</sup>. Quindi sono stati analizzati segnali integrati per determinare i metaboliti discriminanti tra i gruppi in studio. Il test Wilcoxon è stato scelto per inferire le differenze tra due gruppi di soggetti<sup>3</sup>.

La correzione del tasso di scoperta è stata applicata utilizzando il metodo Benjamini & Hochberg (FDR), un valore P aggiustato <0,05 è stato considerato statisticamente significativo. Le variazioni dei livelli di metaboliti sono calcolate come rapporto log<sub>2</sub>Fold-Change (FC) delle intensità mediane normalizzate dei segnali corrispondenti negli spettri dei due gruppi. Le dimensioni dell'effetto sono state calcolate e per i confronti di gruppi (cioè maschio contro femmina) usando la formulazione delta (Cd) di Cliff 5, per aiutare a identificare i segnali significativi dando una stima dell'entità della separazione nei diversi confronti. La magnitudo viene valutata utilizzando le soglie fornite in Romano et al.<sup>6</sup>, ovvero | Cd | <0.147 "trascurabile", | Cd | <0,33 "piccolo", | Cd | <0.474 "medio", altrimenti "grande"

L'effetto netto dei metaboliti sugli esiti clinici è stato valutato mediante modelli di regressione logistica binomiale. Odds ratio (OR)> 1 con un valore P statisticamente significativo (p <0,05) è stato scelto per indicare l'associazione positiva con l'evento clinico, 0 <OR <1 con un valore P statisticamente significativo (p <0,05) indica un effetto "protettivo" del livello di metaboliti.

Il software online gratuito MetaboAnalyst 4.0 è stato utilizzato per l'analisi dei percorsi

## **12 Risultati**

Sono stati identificate differenze statisticamente significative nei livelli di metaboliti ( $P < 0,05$ ) in associazione alla caratterizzazione dei nonagenari in base al sesso: i maschi sono caratterizzati da livelli sierici più elevati di isoleucina, leucina, valina, creatinina e livelli più bassi di glicina, glicerolo e creatina rispetto alle femmine nonagenarie (Figura 1).

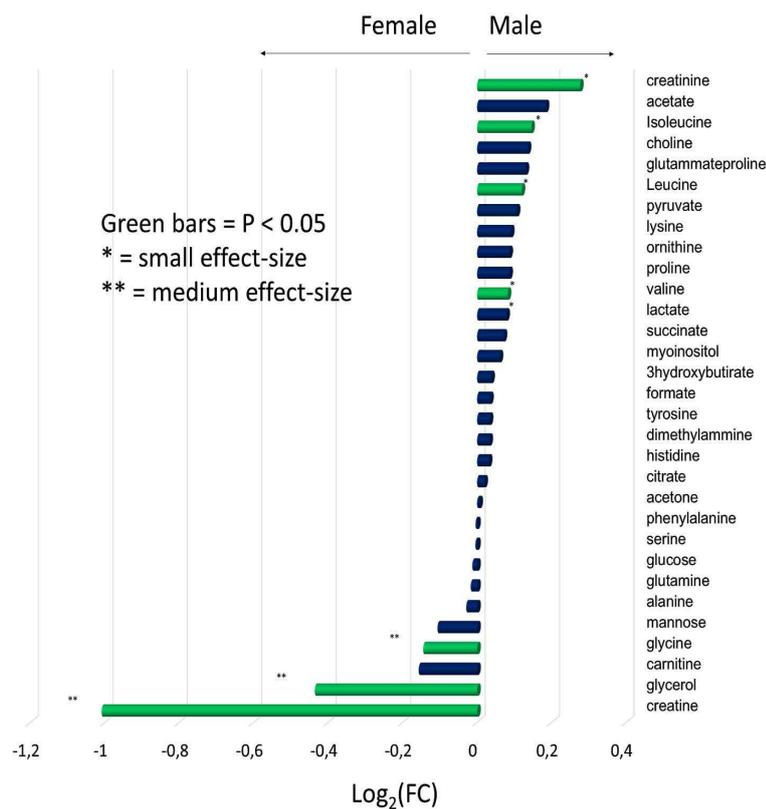
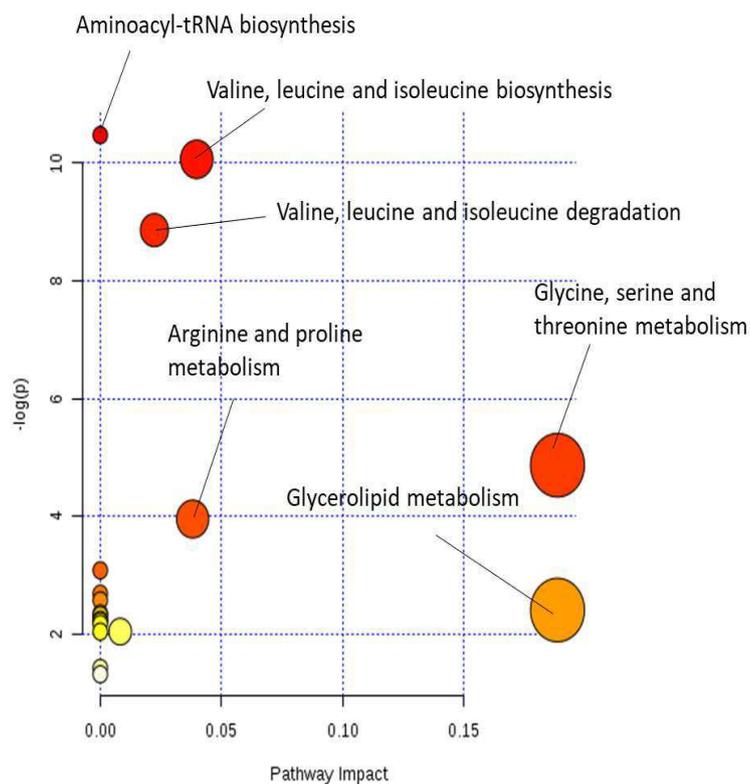


Fig .1 valori Log2Fold-Change (FC) per i metaboliti significativamente modificati (valore P <0,05). Valori positivi di Log2FC significano livelli più alti di metaboliti nei soggetti maschi, valori negativi di Log2FC significano livelli più alti di metaboliti nei soggetti femminili.

Un elenco semplificato delle vie metaboliche più coinvolte, basato sul software MetaboAnalyst, è riportato nella Figura. L'analisi ha mostrato un'alterazione delle vie biochimiche come quella della biosintesi di aminoacil-tRNA, la biosintesi di valina / leucina / isoleucina, la degradazione valina / leucina / isoleucina, il metabolismo della glicina, serina e treonina, il metabolismo dell'arginina e della prolina e il metabolismo dell'acido cyanoamino. L'analisi è stata calcolata in base al valore di significatività (valore P <0,05) dell'analisi di arricchimento del pathway. I dati nel dettaglio sono riportati nella tabella



Riepilogo dell'analisi del percorso dei metaboliti sierici significativamente alterati, effettuata utilizzando il software MetaboAnalyst 4.0. I dati dettagliati sono riportati nella tabella

Tabella 1. Un'analisi integrata basata sul software MetaboAnalyst 4.0 basata su livelli di metaboliti espressi in modo diverso nei soggetti maschi e femmine. Il valore P è il valore P originale calcolato dall'analisi di arricchimento; Il valore P di Holm è il Pvalue regolato dal metodo Holm-Bonferroni; l'FDR è il valore P rettificato utilizzando False Discovery Rate; Impatto è il valore di impatto del percorso calcolato dall'analisi della topologia del percorso.

Pathway	Raw p	Holm adjust	FDR	Imp
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2.84E-05	0.002271	0.001712	
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	4.28E-05	0.003381	0.001712	
Valine, leucine and isoleucine degradation	0.000142	0.011092	0.003792	
Glycine, serine and threonine metabolism	0.007674	0.59086	0.15347	
Arginine and proline metabolism	0.019114	1	0.30582	
Cyanoamino acid metabolism	0.045669	1	0.60892	

Sono stati considerati importanti fattori di rischio cardiovascolare come ipertensione, dislipidemia e insufficienza cardiaca congestizia.

Inoltre, sono state eseguite regressioni logistiche multivariate per valutare il rischio di MMSE (Mini Mental State Examination), GDS (Geriatric Depression Scale), test di attività fisica come Timed & UpGo (> 20 s) e SPPB (Short Physical Performance Battery), la storia familiare è stata anche utilizzata per valutare il rischio di malattie cardiovascolari e cerebrovascolari e demenza.

Tabella 2. Effetto dei metaboliti sull'esito e sulla familiarità dei pazienti per i soggetti nonagenari. Per ciascuna variabile predittore, vengono riportati valori OR e P per i livelli più bassi (“-“) e livelli più alti (“+“) di tutti i metaboliti che hanno mostrato almeno un'associazione significativa con i casi considerati.

Clinical outcome	metabolites	OR	P-value
(0) 24>MMSE≥24 (1), adjusted for gender, schooling and GDS	Isoleucine -	1.03	0.9
	Isoleucine +	1.83	0.048*
	Alanine -	1.1	0.5
	Alanine +	2.3	0.006*
(1) 30≤TimeUp&GO≤17(0), adjusted for gender and MMSE24	Acetate -	1.9	0.2
	Acetate +	2.9	0.036*
	Proline -	3.6	0.012*
	Proline +	2	0.18
(0) 6≤SPPB≤3(1), adjusted for gender and BMI	Lactate -	0.82	0.64
	Lactate +	2.79	0.02*
	Proline -	2.6	0.027*
	Proline +	1.6	0.36
Hypertension NO (0), Yes (1), adjusted for gender and age	Alanine -	0.6	0.08
	Alanine +	0.5	0.01*
	Glycine -	0.6	0.09
	Glycine +	0.5	0.02*
	Glycerol -	0.9	0.07
	Glycerol +	0.5	0.03*
Fam. Cardiovascular dis. NO(0), YES(1), adjusted for gender and age	Glutamine -	0.6	0.19
	Glutamine +	0.4	0.0014*

	myo-inositol -	1.4	0.16
	myo-inositol +	1.9	0.015*
	phenylalanine -	1.2	0.47
	phenylalanine +	2	0.011*
Fam. Cerebrovascular dis. NO(0), YES(1), adjusted for gender and age	Choline -	2.1	0.02*
	Choline +	1.3	0.4
	Creatinine -	0.49	0.04*
	Creatinine +	0.66	0.2
	Mannose -	0.65	0.1
	Mannose +	0.4	0.02*

Nella tabella è riportato un elenco di metaboliti per i quali è stata trovata un'associazione con l'esito clinico o la familiarità per la malattia. Come si osserva, livelli più alti di isoleucina e alanina sembrano essere associati a un punteggio MMSE  $\geq 24$ ; livelli più alti di acetato e livelli più bassi di prolina potrebbero essere associati a un TimeUp & Go  $\geq 30$ ; livelli più alti di lattato e livelli più bassi di prolina potrebbero essere associati all'SPPB  $\leq 3$ ; livelli più elevati di alanina, glicina e glicerolo possono essere considerati "protettivi" contro il rischio di ipertensione; livelli più elevati di glutammina possono essere considerati protettivi contro la familiarità per le malattie cardiovascolari, mentre livelli più elevati di mioinositolo e fenilalanina sono più frequenti nei soggetti con familiarità per le malattie cardiovascolari; per quanto riguarda la familiarità per le malattie cerebrovascolari, livelli più bassi di colina suggeriscono una maggiore associazione mentre livelli più elevati di creatinina e mannosio sono più elevati in soggetti senza familiarità con questa malattia.

## 10 Discussione

La letteratura scientifica relativa allo studio dei parametri associati al raggiungimento dell'età avanzata è ampia e nel tempo sono stati identificati singoli parametri biochimici o abitudini dietetiche o stili di vita "sani" che predispongono ad un "invecchiamento di successo".

Tuttavia, manca un approccio globale multi-parametrico, che prenda in considerazione l'insieme dei vari analiti e non di un singolo analita e che ci dia una immagine di insieme del profilo "di rischio" per il raggiungimento dell'età avanzata.

Lo studio Mugello, che è uno studio epidemiologico condotto su una popolazione di ultranovantenni residenti in nove degli undici comuni del Mugello, ci ha consentito di ottenere questa "fotografia" completa dei metaboliti. Infatti, il fingerprinting metabolico può essere considerato come un super-biomarcatore con un potere predittivo indubbiamente superiore a quello della somma di pochi metaboliti quantificati.

Ottenere un'impronta metabolica e quindi avere informazioni di cambiamenti metabolici anche lievi, tramite la sovrapposizione dei segnali osservabili dei metaboliti endogeni ad alto e basso peso molecolare rappresenta un ottimo strumento, attraverso il quale è possibile analizzare i cambiamenti fisiologici e patologici in un sistema biologico, tenendo conto di tutte le variazioni dei metaboliti anche quelle più piccole.

La genomica fornisce informazioni su cosa potrebbe accadere, mentre la metabolomica ci dice quello che sta accadendo.

Gli ultranovantenni rappresentano un gruppo sempre più ampio nella popolazione Italiana, ma ancora molto rimane da comprendere in relazione ai meccanismi fisiopatologici che sottostanno ad un invecchiamento ed ai determinanti dell'invecchiamento di successo.

Dall'acquisizione degli spettri NMR dei 357 pazienti dello studio Mugello, assieme alle variabili demografiche, cliniche e ad alcuni aspetti cognitivi, psicologici e funzionali sono emerse alcune evidenze:

1- una differenza di genere all'interno della popolazione relativamente ai metaboliti. I maschi, infatti, sono caratterizzati da livelli sierici più elevati di isoleucina, valina, leucina, creatinina e da livelli sierici più ridotti di glicina, glicerolo e creatina rispetto alle donne.

I risultati ottenuti dal nostro studio relativi ai più elevati livelli di BCAAs (valina, leucina ed isoleucina) nei maschi rispetto alle femmine sono in accordo con quelli ottenuti dagli studi presenti in letteratura (510,511).

I BCAA rappresentano il 35% di tutti gli aminoacidi essenziali presenti nelle proteine dei muscoli e sono attivamente ossidati nel muscolo scheletrico. I BCAA sono stati descritti come substrati preferiti per il tessuto muscolare: durante il digiuno a breve termine, il glucosio rilasciato dalle riserve di glicogeno nel fegato viene fornito come combustibile per i tessuti che necessitano di glucosio (ad esempio il cervello). La degradazione delle proteine muscolari fornisce aminoacidi che sono usati dal fegato per la gluconeogenesi, in modo particolare l'alanina. Inoltre, I BCAA sono una delle principali fonti di azoto per la sintesi muscolare di aminoacidi glucogenici come l'alanina ed aumentano nello stato di digiuno parallelamente a un aumento della degradazione delle proteine. Pertanto, durante il digiuno notturno, le concentrazioni sieriche di BCAA sono aumentate in modo proporzionale alla massa muscolare.

Studi in vivo hanno documentato come i BCAA siano positivamente correlati alla massa muscolare nei soggetti non diabetici, ma non in quella dei diabetici. Ciò potrebbe rappresentare una spiegazione della correlazione positiva fra BCAA ed il genere maschile in quanto gli uomini, se pur di età avanzata, hanno una massa muscolare maggiore rispetto alle donne. Tuttavia, nella popolazione del Mugello dei soggetti non diabetici la prevalenza dei maschi è simile a quella delle donne.

L'altro aspetto che va considerato è il ruolo del genere sull'insulino-resistenza indotta dalla dieta e sull'obesità. Sappiamo che gli ormoni correlati al genere sono capaci di regolare l'attività e l'espressione di enzimi chiave coinvolti nel trasporto del glucosio, nella glicolisi, nel ciclo dell'acido citrico, nell'ossidazione degli acidi grassi e nella composizione corporea e che esiste una correlazione diretta fra BCAA e la resistenza insulinica. Gli ormoni influenzano quindi, la correlazione fra i BCAA ed i parametri metabolici attraverso la modulazione del metabolismo glicidico e lipidico e la composizione corporea. I risultati di uno studio hanno riportato che l'integrazione con BCAA prima dell'esercizio fisico può ridurre la mialgia ad esordio ritardato, suggerendo che i BCAA sono in grado di reprimere la disgregazione muscolare indotta dall'esercizio fisico. Inoltre, i BCAA ricchi in leucina possono esercitare un feed-back positivo sulla via di segnalazione mTOR1 compromessa e reprimere la proteolisi autofagica nel muscolo scheletrico dei pazienti con sarcopenia [511]. Queste evidenze suggeriscono che i BCAA, in particolare la leucina, possono promuovere la sintesi proteica e ridurre la proteolisi nel muscolo scheletrico. Una tale disgregazione muscolare depressa e una maggiore proteosintesi muscolare possono contribuire ad aumentare il volume muscolare.

Analogamente a quanto osservato nella coorte del Mugello, lo studio del profilo metabolomico effettuato in tre distinte coorti di soggetti più giovani rispetto alla coorte del Mugello, ha messo in evidenza livelli significativamente più elevati di BCAA,[512] anche

se la differenza fra soggetti di sesso femminile e di sesso maschile non era statisticamente significativa.

Per quanto riguarda l'escrezione della creatinina ed i livelli minori di creatina riscontrati in associazione con una maggiore massa muscolare, si osserva un trend inverso dei due metaboliti in relazione all'età. Studi di letteratura hanno mostrato infatti come i livelli sierici di creatinina tendano ad aumentare in misura minore con l'avanzare dell'età e siano significativamente più elevati negli uomini rispetto alle donne.

Per quanto concerne i livelli di glicina essi risultano maggiori nelle donne anziane rispetto agli uomini di pari età.

Questo risultato appare in linea con i risultati di altri studi condotti in popolazioni di soggetti più giovani. Infatti, in un ampio studio che ha visto coinvolti 7 coorti di soggetti Finlandesi ed una coorte di soggetti Estoni ha messo in evidenza un profilo metabolomico differente nelle donne rispetto agli uomini. Il fingerprint metabolomico nelle donne varia in relazione all'età: la concentrazione dei metaboliti pro-aterogenetici è stabile fino all'età di 40 anni ed aumenta significativamente dopo fra i 40 e 50 anni, raggiungendo un altro plateau dopo i 50 anni. Focalizzandosi sugli effetti della menopausa sul finger metabolomico l'analisi dei dati ha messo in evidenza che le donne in post-menopausa avevano concentrazioni significativamente più elevate degli aminoacidi acidi glutammici e glicina. (A metabolic view on menopause and ageing (514).

La documentazione di elevati livelli di glicerolo nelle donne rispetto agli uomini della popolazione anziana del Mugello si collega con quella dello studio sopracitato e di altri studi clinici, che hanno documentato un profilo metabolico "più aterogenetico" nelle donne in post-menopausa rispetto agli uomini. Il glicerolo, infatti deriva dall'idrolisi o transesterificazione dei fosfolipidi o glicolipidi. Pertanto, la maggiore presenza di metaboliti pro-aterogenetici come colesterolo LDL, colesterolo totale e trigliceridi potrebbe rappresentare la causa dell'aumento del livello di glicerolo nelle donne.

Inoltre, alcuni studi hanno osservato concentrazioni maggiori di glicerolo e acidi grassi esterificati nelle donne rispetto agli uomini in seguito a periodi di digiuno: le risposte metaboliche durante l'ipoglicemia erano quasi due volte maggiori negli uomini rispetto alle donne in premenopausa. I cambiamenti metabolici durante l'ipoglicemia erano simili a quelli osservati nel periodo di digiuno.

I meccanismi che innescano queste differenze potrebbero includere: (1) distribuzione del grasso differente tra i due sessi, (2) effetto degli estrogeni sulle catecolamine circolanti, (3) differenze di genere nella sensibilità dell'epinefrina.

2- livelli elevati di alanina, isoleucina come fattore protettivo del decadimento cognitivo valutato come MMSE.

L'osservazione di più elevati livelli di isoleucina e alanina risultano essere associati a valori di MMSE  $\geq 24$  e quindi ad una migliore capacità cognitiva. Questo risulta essere in linea con le osservazioni di letteratura: infatti è stato osservato come una dieta ricca di proteine sia in grado di migliorare la funzione mentale e il tempo di reazione. I partecipanti allo studio che consumavano una dieta ad alto contenuto di proteine (3 grammi per kg di peso corporeo di proteine al giorno) avevano avuto dei risultati significativamente migliori su test di fluidità verbale, con un tempo di reazione più rapido rispetto ai partecipanti che assumevano solo 1,5 grammi di proteine per kg di peso corporeo al giorno. Alla fine del periodo di studio, il gruppo che consumava un alto apporto di proteine presentava livelli più elevati di BCAA rispetto ai soggetti che consumavano meno proteine. Dato il ruolo dei BCAA nella riduzione della fatica e nel miglioramento delle funzioni cerebrali dopo un allenamento pesante, è possibile che i livelli plasmatici di BCAA giochino un ruolo cruciale nelle funzioni cerebrali.

3- livelli elevati di lattato e livelli ridotti di prolina sono associati ad una funzione motoria peggiore (SPPB  $\leq 3$ ).

Livelli più alti di lattato e più bassi di Prolina risultano, dai nostri dati, associati a SPPB  $\leq 3$ . E' noto come la prolina partecipi alla ricostituzione del tessuto muscolare, delle cartilagini e delle ossa e, in seguito alla sua metabolizzazione in idrossiprolina, del collagene e che quindi abbia un ruolo centrale e determinante nelle funzioni motorie. Come evidenziato già in letteratura, livelli più elevati di Prolina si riscontrano in associazione alla sarcopenia e si ritrovano in soggetti che praticano minore attività fisica e che passano più tempo a sedere durante la giornata. Non vi sono evidenze dei meccanismi alla base dell'aumento delle concentrazioni plasmatiche di prolina nei soggetti che fanno poca attività fisica: è noto che un'alta concentrazione di prolina sia associata, nei ratti, a danni ossidativi a proteine, lipidi e DNA.

Nel modello animale di ratti, è stato dimostrato che la prolina impedisce l'assorbimento del glutammato da parte dei neuroni nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo.

Nell'uomo le concentrazioni plasmatiche di questo amminoacido risultano aumentate nei pazienti con Alzheimer e danno cognitivo lieve.

Inoltre è noto che gli aminoacidi Prolina, alanina e glutammina sono implicati nella via anaplerotica del ciclo dell'acido tricarbossilico: nei pazienti malnutriti, la prolina e l'alanina sono generate dalla proteolisi nei muscoli scheletrici e utilizzate per il metabolismo energetico mentre nei soggetti anziani sani con un apporto sufficiente di carboidrati, prolina

e alanina non vengono metabolizzate attraverso la via anaplerotica, determinando concentrazioni più elevate di tali aminoacidi.

Per quanto riguarda il lattato, è ben noto come questo sia un composto tossico per le cellule, il cui accumulo nel torrente ematico è correlato alla comparsa della cosiddetta fatica muscolare. La maggior parte degli effetti negativi del lattato, nell'insorgenza della fatica muscolare, sono causati dalle alte concentrazioni di  $H^+$ , create dalla dissociazione dell'acido lattico nei due ioni; infatti, oltre l'85 % dell'  $H^+$  libero è generato dalla dissociazione dell'acido lattico (Sahlin 1982). L'aumento della concentrazione di ioni idrogeno determina un aumento dell'acidità e l'abbassamento del pH che, nella cellula muscolare può passare da valori di 6,9 sino a 6,3 e nel sangue da 7,4 fino a 6,9. Una simile acidità può essere pericolosa per la cellula, motivo per cui subentrano sistemi di difesa che, in ultima analisi, comportano l'arresto della contrazione o la riduzione dell'intensità dell'esercizio. L'eccessiva concentrazione di ione  $H^+$  determina infatti, sia un'inibizione della fosfofruttokinasi (PFK), enzima che catalizza una delle reazioni della glicolisi anaerobica, limitando il rifornimento energetico alla cellula, sia un'inibizione nei confronti degli  $Ca^{++}$ , ostacolando anche in questo modo la possibilità di proseguire un lavoro troppo intenso. Nonostante ciò, il ruolo del pH nella fatica muscolare non è ancora ben stabilito, ed il suo abbassamento nel muscolo potrebbe non essere sempre decisivo nello sviluppo della fatica (Bangsbo, 1995) anche se, il decremento della produzione di potenza, normalmente viene associato con il basso pH intramuscolare e viene attribuito proprio all'inibizione della via glicolitica. Inoltre, è stato osservato come una aumentata concentrazione di ioni  $H^+/NH_4^+$  sia associata ad un abbassamento delle capacità di coordinazione .

3- livelli elevati di acetato sono associati ad un TimeUp&Go < 17

Nella popolazione del Mugello livelli aumentati di acetato sono risultati essere associati ad una peggiore performance fisica, valutata con il test TimeUp&Go. In letteratura non sono presenti dati relativi all'associazione fra Acetato e performance fisica. Tuttavia, dati derivanti da uno studio sui pazienti con infarto acuto del miocardio ha dimostrato come elevati livelli di Acetato siano significativamente e positivamente associati al rischio di morte (514). E' verosimile che livelli di acetato più elevati siano associati alla malattia ischemica e ad un danno tessutale. D'altra parte l'età dei pazienti dello studio AMI Florence II che non sopravvivevano all'infarto era di 82 anni, età non molto dissimile a quella degli ultranonagenari dello studio Mugello.

I nostri dati, anche se preliminari, supportano l'utilità dell'approccio metabolomico al fine di approfondire i meccanismi fisiopatologici sottostanti ad un invecchiamento di successo e di identificare un profilo di rischio specifico all'interno di una popolazione.

Gli ultranagenari dello studio Mugello sono dei “sopravvissuti” e pertanto molte delle caratteristiche biochimiche e metaboliche che abbiamo identificato mediante la metabolomica i.e. elevati livelli di alcuni aminoacidi potrebbero rappresentare un fattore protettivo per il raggiungimento dell'età avanzata.

Lo studio Mugello prosegue ed è previsto un follow-up clinico, strumentale con un prelievo di sangue che permetterà la valutazione dei cambiamenti metabolici nel tempo.

Sarà importante proseguire la raccolta dei dati e valutare quale profilo metabolico si associ ad un ulteriore “invecchiamento di successo”. Sarà inoltre possibile condurre le analisi del fingerprint metabolomico mediante l'utilizzo di un nuovo software per poter avere la quantificazione assoluta dei metaboliti e delle frazioni e sottofrazioni lipidiche, ed ottenere così un numero maggiore di informazioni che definiscano l'impronta metabolica della popolazione dei grandi anziani.

## 14 Bibliografia

1. <http://www.rssp.salute.gov.it/rssp/homeRssp.jsp>. *Relazione sullo Stato Sanitario del Paese*. [Online] 2009-2010-2011 йил.
2. *The pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease*. **Feinstein A.** 1970 йил, J Chronic Dis, Vol. 23, pp. 455-468.
3. *Multimorbidity in general practice: prevalence, incidence, and determinants of co-occurring chronic and recurrent disease*. **Van den Akker M., Buntinx F., Metsemakers J.F., Roos S., Knottnerus J.A.,** 1998 йил, J Clin Epidemiol, Vol. 51, pp. 367-375.
4. *Clinical practice guidelines and quality of care for older patients with multiple comorbid diseases: implications for pay for performance*. **Boult L, Wu AW, Boyd CM, Darer J, Boult C, Fried LP,** 2005 йил, JAMA, Vol. 294, pp. 716-724.
5. *Epidemiology of suboptimal prescribing in older community-dwellers: a two-wave, population-based survey in Dicomano, Italy*. **Lapi F., Pozzi C., Mazzaglia G., et al.** 2009 йил, Drugs Aging, Vol. 26, pp. 1029-1038.
6. *Suboptimal medication use and mortality in an older adult community-based cohort: results from the Hispanic EPESE Study*. **Espino D.V., Bazaldúa O.V., Palmer R.F., et al.,** 2006 йил, J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Vol. 61, pp. 170-175.
7. Cronicità e comorbilità negli anziani dai dati dell'Ossevatorio ARNO. [Online]
8. *Report of the National Institute on Aging Task Force on comorbidity*. **Yancik R., Ershler W., Satariano W., et al.** 2007 йил, J Gerontol A Biol Sci Med, Vol. 62, pp. 275-280.
9. *Common chronic diseases and general impairments as determinants of walking disability in the oldest-old population*. **Bootsma-van der Wiel A., Gussekloo J., De Craen AJ., et al.** 2002 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 50, pp. 1405-1410.

10. *Predictive validity of measures of comorbidity in older community-dwellers: the Insufficienza Cardiaca negli Anziani Residenti a Dicomani Study.* **Di Bari M., Virgillo A., Matteuzzi D., et al.** 2006 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 54, pp. 210-216.
11. *How to measure comorbidity. A critical review of available methods.* **de Groot V., Beckerman H., Lankhorst GJ., Bouter LM.** 2003 йил, J Clin Epidemiol, Vol. 56, pp. 221-229.
12. *A chronic disease score from automated pharmacy data.* **Von Korff M., Wagner EH., Saunders K.** 1992 йил, J Clin Epidemiol, Vol. 45, pp. 197-203.
13. *A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation.* **Charlson M.E., Pompei P., Ales K.L., MacKenzie C.R.,** 1987 йил, J Chronic Dis, Vol. 40, pp. 373-383.
14. *Patterns of care related to age of breast cancer patients.* **Greenfield S., Blanco DM., Elashoff RM., Ganz PA.** 1987 йил, JAMA, Vol. 257, pp. 2766-2770.
15. *Cumulative illness rating scale.* **Linn B.S., Linn M.W., Gurel L.,** 1968 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 16, pp. 622-626.
16. *Comorbosità, disabilita, fragilita.* **Di Bari M., Rubbieri G.** 3, 2013 йил, G Ital Cardiol, Vol. 14, pp. 1S-6S.
17. *Guiding principles for the care of older adults with multimorbidity: an approach for clinicians.* **Society, American Geriatrics.** 2012 йил, J Am Geriatr Soc , Vol. 60, pp. E1-E25.
18. *Steering Committee, Canadian Initiative on Frailty and Aging. Models, definitions, and criteria of frailty.* **Hogan D.B., et al.** 3, 2003 йил Jun , Aging Clin Exp Res;, Vol. 15, pp. 1-29.
19. *Frailty: an emerging research and clinical paradigm—issues and controversies.* **Bergman H., et al.** 7, 2007 йил Jun, Journals of Gerontology. Series A: Biological and Medical Sciences, Vol. 62, pp. 731-737.
20. *A multidisciplinary systematic literature review on frailty: overview of the methodology used by the Canadian Initiative on Frailty and Aging.* **Karunanathan S., et al.** 68, 2009 йил 12-Oct, BMC Med Res Methodol, Vol. 9.
21. *Untangling the concepts of disability, frailty and comorbidity: Implications for improved targeting and care.* **Fried L.P., et al.** Journals of Gerontology. Series A: Biological and Medical Sciences, Vol. 59, pp. 255-263.
22. *A conceptual framework of frailty.* **Bortz W.M.** 2002 йил, Journals of Gerontology. Series A: Biological and Medical Sciences., Vol. 57, pp. M283-M288.
23. *Untangling the concepts of disability, frailty, and comorbidity: Implications for improved targeting and care.* **Fried LP, et al.** 3, 2004 йил, Journals of Gerontology. Series A: Biological and Medical Sciences, Vol. 59, pp. 255-263.
24. *In search of an integral conceptual definition of frailty: opinions of experts.* **Gobbens R.J., et al.** 5, 2010 йил Jun, J Am Med Dir, Vol. 11, pp. 338-343.

25. *Validation and Comparison of Two Frailty Indexes: The MOBILIZE Boston Study*. **Kiely D.K., et al.** 2009 йил, Journal of the American Geriatrics Society, Vol. 57, pp. 1532-1539.
26. *A Frailty Instrument for primary care: findings from the Survey of Health, Ageing and Retirement in Europe (SHARE)*. **Romero-Ortuno R, et al.** 2010 йил, BMC Geriatrics, Vol. 10, p. 57.
27. Ministero della Salute-Criteri di appropriatezza clinica, tecnologica e strutturale nell'assistenza all'anziano.Criteri di appropriatezza clinica, tecnologica e strutturale nell'assistenza all'anziano. *Quaderni del Ministero della Salute*. [Online] 2010 йил. [www.quadernidellasalute.it/quaderni.html/6-novembre-dicembre-2010.php#3](http://www.quadernidellasalute.it/quaderni.html/6-novembre-dicembre-2010.php#3).
- 28. Topper A.K., Maki B.E., Holliday P.J., a.**
29. *Association of habitual dietary resveratrol exposure with the development of frailty in older age: the Invecchiare in Chianti study*. **Rabassa M., Zamora-Ros R., Urpi-Sarda M., Bandinelli S., Ferrucci L., Andres-Lacueva C., Cherubini A.** 2015 йил, Am J Clin Nutr., Vol. 6, pp. 1534-1542.
30. *Lower Plasma Vitamin E Levels Are Associated With the Frailty Syndrome: The InCHIANTI Study*. **Ble A., et al.** 3, 2006 йил, Journals of Gerontology. Series A: Biological and Medical Sciences, Vol. 61, pp. 278-283.
31. *For the Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels and Frailty Status in Older Women*. **Ensrud K.E., et al.** 12, 2010 йил, Endocrinology & Metabolism;, Vol. 95, pp. 5266-5273.
32. *For the Study of Osteoporotic in Men Study Group. Circulating 25-Hydroxyvitamin D Levels and Frailty Status in Older Men: the osteoporotic fractures in men study*. **Ensrud K.E., et al.** 1, 2011 йил, J Am Geriatr Soc;, Vol. 59, pp. 101-106.
33. *The association between obesity and the frailty syndrome in older woman: the Women's Health and Aging Studies*. **Blaum C.S., et al.** 6, 2005 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 53, pp. 827-834.
34. *For the European Male Aging Study Group. Frailty in Relation to Variations in Hormone Levels of the Hypothalamic–Pituitary–Testicular Axis in Older Men: Results From the European Male Aging Study*. **Tajar A., et al.** 12, 2011 йил, Journal of the American Geriatrics Society, Vol. 59, pp. 814-821.
61. *Innate immunity and aging*. **Gomez C.R, Nomellini V., Faunce D.E, Kovacs E.J.** 2008 йил, EXP Gerontol, Vol. 43, pp. 718-728.
62. *Immunity and ageing in man*. **Pawelec G.** 2006 йил, Exp. Gerontol., Vol. 41, pp. 1239-1242.
63. *Aging of the innate immune system*. **Shaw A.C., Joshi S., Greenwood H., Panda A., Lord J.M.** 2010 йил, Current. Opin. Immunol., Vol. 22, pp. 507-513.
64. *Aging and innate immunity*. **Solana R., Pawelec G., Tarazona R.** 2006 йил, Immunity., Vol. 24, pp. 491-494.

*Effect of age on human neutrophil function.* **Wenisch C., Patruta S., Daxbock F., Krause R., Horl W.** 2000 йил, *J. Leukoc. Biol.* , Vol. 67, pp. 40–45.

90. *Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T, cells, B cells and macrophages.* **Ogawa T., Kitagawa M., Hirokawa K.** 2000 йил, *Mech. Ageing Dev.* , Vol. 117, pp. 57–68.
91. *IFN-g-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice.* **Herrero C., Marque's L., Lloberas J., Celada A.** 2001 йил, *J. Clin. Invest.*, Vol. 107, pp. 485-493.
92. *Innate immunity in aging: impact on macrophage function.* **Plowden J., Renshaw-Hoelscher M., Engleman C., Katz J., Sambhara S.** 2004 йил, *Aging Cell* , Vol. 3, pp. 161-167.
93. *Age-related decrease in accessory cell function of human alveolar macrophages.* **Zissel G., Schlaak M., Muller-Quernheim J.** 1999 йил, *J. Investig. Med.*, Vol. 47, pp. 51–56.
94. *Aging and innate immune cells.* **Plackett T.P., Boehmer E.D., Faunce D.E., Kovacs E.J.,** 2004 йил, *J. Leukoc. Biol.* , Vol. 76, pp. 291–299.
122. *Influenza-induced production of interferon-alpha is defective in geriatric individuals.* **Canaday D., Amponsah N., Jones L., Tisch D., Hornick T., Ramachandra L.,** 2010 йил, *J. Clin. Immunol.* , Vol. 30, pp. 373–383.
123. *Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood.* **Jing Y., Shaheen E., Drake R.R., Chen N., Gravenstein S., Deng Y.,** 2009 йил, *Hum. Immunol.*, Vol. 70, pp. 777-784.
124. *Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors.* **Pe' rez-Cabezas B., Naranjo-Go' mez M., Ferna' ndez M.A., Gri'fols J.R., Pujol-Borrell R., Borra' s F.E.,** 2007 йил, *Exp. Gerontol.* , Vol. 42, pp. 1033-1038.
125. *The upregulation of TNFalpha production is not a generalised phenomenon in the elderly between their sixth and seventh decades of life.* **Mysliwska J., Bryl E., Foerster J., Mysliwski A.,** 1999 йил, *Mech. Ageing Dev.*, Vol. 107, pp. 1–14.
126. *Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human ageing.* **Shodell, M., Siegal, F.P.** 2002 йил, *Scand J. Immunol*, Vols. 518-521, p. 56.
127. *Effect of age on surface molecules and cytokine expression in human dendritic.* **Ciaramella A., Spalletta G., Bizzoni F., Salani F., Caltagirone C., Bossu' P.,** 2011 йил, *Cell. Immunol.* , Vol. 269, pp. 82–89.
128. *Dendritic cells in human aging.* **Agrawal A., Agrawal S., Gupta S.,** 2007b йил, *Exp. Gerontol.*, Vol. 42, pp. 421-426.

135. *A gender--dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity.* **Bonafè M., Olivieri F., Cavallone L., Giovagnetti S., Mayegiani F., Cardelli MPieri C., Marra M., Antonicelli R., Lisa R., Rizzo M.R., Paolisso G., Monti D., Franceschi C.,** 8, 2001 йил 31-Aug, Eur J Immunol. , Vol. 31, pp. 2357-2361.
136. *Quantity, not quality, of antibody response decreased in the elderly.* **Blomberg B.B., Frasca D.,** 2011 йил, J. Clin. Invest., Vol. 121, pp. 2981–2983.
137. *B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status.* **Gibson K.L., Wu Y.C., Barnett Y., Duggan O., Vaughan R., Kondeatis E., Nilsson B.O., Wikby A., Kipling D., Dunn-Walters D.K.,** 2009 йил, Aging Cell , Vol. 8, pp. 18-25.
138. *Age effects on B cells and humoral immunity in humans.* **Frasca D., Diaz A., Romero M., Landin A.M., Blomberg B.B.,** 2011 йил, Ageing Res. Rev. , Vol. 10, pp. 330–335.
139. *Repertoire diversity of antibody response to bacterial antigens in aged mice. II.Phosphorylcholine-antibody in young and aged mice differ in both VH/VL gene repertoire and in specificity.* **Nicoletti C., Borghesi-Nicoletti C., Yang X.H., Schulze D.H., Cerny J.** 1991 йил, J. Immunol., Vol. 147, pp. 2750-2755.
144. *Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency.* **Schenkein, J.G., Park, S., Nahm, M.H.** 2008 йил, Vaccine, Vol. 26, pp. 5521-5526.
145. *Intrinsic defects in B cell response to seasonal influenza vaccination in elderly humans.vaccination in elderly humansaccine.* **Frasca D., Diaz A., Romero M., Landin A.M., Phillips M., Lechner S.C., Ryan J.G., Blomberg B.B.,** 2010 йил, Vol. 28, pp. 8077-8084.
146. *Executive summary:pivotal research in cardiovascular syndromes in the elderly.* **McKay C.R., Rich M.W., Vlietstra R.E., et al.,** 2000 йил, Am J Geriatr Cardiol., Vol. 9, pp. 243-250.
147. *Age-related mortality, clinical heart failure,and ventricular fibrillation in 4259 Danish patients after acute myocardial infarction.* **Rask-Madsen C, Jensen G, Kober L, Melchior T, Torp-Pedersen C, Hildebrand P.** 1997 йил, Eur Heart J., Vol. 18, pp. 1426-1431.
148. *Clinical epidemiology of acute myocardial infarction.* **Tavazzi L.** 1999 йил, Am Heart J., Vol. 138, pp. 48-54.
149. *Arteria and cardiac aging. Mayor shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part III. Cellular and molecular clues to heart and arterial aging.* **Lakatta E.** 2003 йил, Circulation, Vol. 107, p. 490.
150. *Arterial and cardiac aging. Major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part II. The aging heart in health: link to heart disease.* **Lakatta E.** 2003 йил, Circulation, Vol. 107, p. 346.

151. *Mechanical factors in arterial aging. A clinical perspective.* **O'Rourke M., Hashimoto J.,** 2007 йил, J Am Coll Cardiol, Vol. 50, p. 1. *Arterial aging and subclinical arterial disease are fundamentally intertwined at macroscopic and molecular levels.* **Lakatta E., Wang M., Najjar S.,** 2009 йил, Med Clin North Am, Vol. 93, p. 583.
152. **Schwartz J.B., Zipes D.P.,** Malattia cardiovascolare in popolazioni speciali. [book auth.] Douglas L. Mann, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Robert O. Bonow. *Malattie del cuore di Braunwald.* s.l. : Elsevier, 2012.
153. *Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans.* **Fontana L., Meyer T., Klein S., Holloszy J.,** 2004 йил, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 101, p. 6659.
154. *Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans.* **Meyer T.E., Kovacs S.J., Ehsani A.A., et al.,** 2006 йил, J Am Coll Cardiol, Vol. 47, p. 398.
155. *Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes. A pilot study.* **Ornish D., Lin J., Daubenmier J., et al.,** 2008 йил, Lancet Oncol, Vol. 9, p. 1048.
156. *Vitamins and cardiovascular disease.* **Honarbahsh S., Schacter M.,** 2009 йил, Br J Nutr, Vol. 101, p. 1113.
161. *La terapia della cardiopatia ischemica nell'anziano: rischi e benefici.* **Santangelo L, Nigro G, Panico F, Montefusco A, Iacono A.** 2001 йил, Ital Heart J Suppl., Vol. 2, pp. 1087-1090.
162. *Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project.* **Knoops K.T., de Groot L.C., Kromhout D., et al.,** 2004 йил, JAMA, Vol. 292, pp. 1433-1439.
163. *European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the Management of Arterial Hypertension.* **European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee.** 2013 йил, J Hypertens.
164. *Principal results of the Japanese trial to assess optimal systolic blood pressure in elderly hypertensive patients (JATOS).* **JATOS Study Group.** 2008 йил, Hypertens Res., Vol. 31, pp. 2115-2127.
165. *Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP).* **SHEP Co-operative Research Group.** 1991 йил, JAMA, Vol. 265, pp. 3255-3264.
166. *Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension).* **Dahlof B., Lindholm L.H., Hansson L., Schersten B., Ekblom T., Wester P.O.,** 1991 йил, Lancet, Vol. 338, pp. 1281-1285.
167. *Mortality and morbidity results from the European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly trial.* **Amery A., Birkenhager W., Brixko P., et al.,** 1985 йил, Lancet, Vol. 1, pp.

1349-135 Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adults: principal results.

**MRC Working Party.** 1992 йил, BMJ, Vol. 304, pp. 405-412.

168. *Randomised trial of treatment of hypertension in elderly patients in primary care.* **Coope J., Warrender T.S.,** 1986 йил, BMJ, Vol. 293, pp. 1145-1151.
169. *Morbidity and mortality in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension (STOP-Hypertension).* **Dahlof B., Lindholm L.H., Hansson L., Schersten B., Ekblom T., Wester P.O.,** 1991 йил, Lancet, Vol. 338, pp. 1281-1285.
170. *Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators.* **Staessen J.A., Fagard R., Thijs L., Celis H., Arabidze G.G., Birkenhager W.H., Bulpitt C.J., deLeeuw P.W., Dollery C.T., Fletcher A.E., Forette F., Leonetti G., Nachev C., O'Brien E.T., Rosenfeld J., Rodicio J.L., Tuomilehto J., Zanchetti A.** 1997 йил, **A., Olofsson B., Trenkwalder P., Zanchetti A.,** 2003 йил, J Hypertens., Vol. 21, pp. 875-886.
175. *Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Program (SHEP).* **SHEP Co-operative Research Group.** 1991 йил, JAMA, Vol. 265, pp. 3255-3264.
176. *Effects of different regimens to lower blood pressure on major cardiovascular events in older and younger adults: meta-analysis of randomised trials.* **Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration.** 2008 йил, BMJ, Vol. 336, pp. 1121-1123.
177. *2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension.* **European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).** 2013 йил, European Heart Journal, Vol. 3, pp. 2159-2219.
182. *Intensive vs Standard Blood Pressure control and Cardiovascular Disease Outcomes in Adults Aged  $\geq 75$  Years: A randomized Clinical Trial.* **Williamson J.D., Supiano M.A., Applegate W.B., et al.,** 2016 йил, JAMA, Vol. 315, pp. 2673-2682.
183. *Characterizing Frailty Status in the Systolic Blood Pressure Intervention Trial.* **Pajewski N.M., Williamsom J.D., Applegate W.B., et al.,** 2016 йил, J Gerontol A Biol Sci Med Sci, Vol. 71, pp. 649-655.
184. **Rugarli.** *Medicina Interna Sistemica.* Sesta Edizione.
185. **Porter Robert S, Kaplan Jusin L.** *Il Manuale di Merck.* Sesta edizione Italiana. 2011.
186. **Hardman J.G., Limbrid L.E.,** *The pharmacological basis of therapeutics.* 2001. pp. 973-977.
187. *The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease.* **Assmann G., Schulte H.** 1988 йил, Am Heart J., Vol. 6, pp. 1713-1724.

188. *Lipoproteins, nutrition, aging and atherosclerosis*. **Schaefer E.J., Lichtestein A.H., Lamon-Fava S., et al.**, 1995 йил, Am J Clin Nutr., Vol. 61, pp. 726-740.
189. *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS)*. **Catapano L., Graham I., De Backer G., et al.**, European Heart Journal .
190. *Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths*. **Prospective Studies Collaboration, Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R**. 2007 йил, Lancet, Vol. 307, pp. 1829-1839.
191. *Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other societies on coronary prevention*. 1998 йил, Eur Heart J, Vol. 19, pp. 1434-1503.
197. *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial*. **Heart Protection Study Collaborative Group**. 2002 йил, Lancet, Vol. 360, pp. 7-22.
198. **Fauc L., Hauser K., Loscalzo J.**, *Harrison- Principi di Medicina Interna*. s.l. : 18° Edizione.
199. *Management of elderly patients with Type 2 diabetes mellitus: experience from the IMPROVE Italian observational study*. 2009 йил, G Gerontol , Vol. 57, pp. 267-274.
200. *Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care*. **Koekkoek P.S., Kappelle L.J., van den Berg E., Rutten G.E., Biessels G.J.**, 2015 йил, Lancet Neurol , Vol. 14, pp. 329-340.
201. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS)*. **UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group**. 1998 йил, Lancet , Vol. 352, pp. 837-853.
202. *10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes*. **Holman R.R., Paul S.K., Bethel M.A., Matthews D.R., Neil H.A.**, 15, 2008 йил, N Engl J Med., Vol. 359, p. 1577-1589.
203. *Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes*. **Action to control cardiovascular risk in Diabetes Study Group, Gerstein H.C., Miller M.E., Byington R.P., et al.**, 2008 йил, New Engl J Med, Vol. 358, pp. 2545-2559.
204. *Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. **The ADVANCE Collaborative Group**. 2008 йил, N Engl J Med, Vol. 358, pp. 2560-2572.
205. *Glucose Control and Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes*. **Duckworth W., Abraira C., Moritz T.**, 2009 йил, The New England Journal of Medicine, Vol. 360, pp. 129-139.

206. *Targeting vascular risk factors in older adult-from polypill to personalized prevention.* **Mossello E.** 2015 йил, JAMA Intern Med, Vol. 175, pp. 1949-1950.
207. *Glycosylated hemoglobin and functional decline in community-dwelling nurse home-eligible elderly adults with diabetes mellitus.* **Yau C.K., Eng C., Cenzer I.S., Boscardin W.J., Rice-Trumble K., Lee S.J.,** 2012 йил, J Am Geriatric Soc, Vol. 60, pp. 1215-1221.
208. *HbA1c levels and all-causes mortality in type 2 diabetic patients: epidemiological evidence of the need for personalised therapeutic targets.* **Monami M., Vitale V., Lamanna C., et al.,** 2013 йил, Nutr Metab Cardiovasc Dis, Vol. 23, pp. 300-306.
209. **Marilyn S.A.** Funzioni cognitive e invecchiamento. [book auth.] Hazzard. *Principi di Geriatria e Gerontologia.* Terza Edizione. 1999.
210. **Merck's Manual of Geriatrics.** Manuale MSD di Geriatria. [Online] [www.msd-italia.it](http://www.msd-italia.it).
211. *Age difference in fluid and crystallized intelligence.* **Horn J.L., Cattell R.B.,** 1967 йил, Acta Psychologica., Vol. 22, pp. 193-225.
223. *Leisure Activities and the Risk of Dementia in the Elderly.* **Vergheze J., Lipton R.B., Katz M.J., Hall C.B., Derby C.A., Kuslansky G, Ambrose F., Sliwinski M., Buschke H.,** 2003 йил, The New England Journal of Medicine, Vol. 348, pp. 2508-2516.
224. **Mutani R., Lopiano L., Durelli L., Mauro A., Chiò A.,** La valutazione neuropsicologica. [book auth.] Bergamini. *Il Bergamini di Neurologia.* s.l. : Edizioni libreria cortina Torino., 2012.
225. "Mini-mental state". *A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.* **Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R.,** 1975 йил, J Psychiatr Res, Vol. 12, pp. 89-98.
226. **Mutani R., Lopiano L., Durelli L., Mauro A., Chiò A.,** Sindromi da danno corticale focale. *Il Bergamini di Neurologia.* s.l. : Edizioni libreria cortina Torino, 2012.
227. **Alzheimer's Disease International.** *World Alzheimer Report 2015-The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends.* 2015.
228. **American Psychiatric Association.** *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition.* Arlington : s.n., 2013.
229. **Bianchetti A., Boffelli S., Trabucchi M.,** *Il progresso medico tra scienza ed esperienza. Il caso delle demenze.* Milano : Elsevier Masson, 2007.
230. **Bianchetti A., Trabucchi M.,** La valutazione clinica del demente. *Le demenze.* Torino : UTET, 2005, pp. 37-101.
231. *Development and validation of geriatric depression screening: a preliminary report.* **Yesavage J.A., Rose T.L., Lum O., Huang V., et al.,** 1983 йил, J Psychiatr Res, Vol. 17, pp. 37-49.

232. *Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report.* **Yesavage J.A., Brink T.L., Rose T.L., Lum O., Huang V., Adey M., et al.,** 1982 йил, J Psychiatr Res, Vol. 17, pp. 37-49.
233. *Validation of the Five-Items Geriatric Depression Scale in Elderly Subjects in three different settings.* **Rinaldi P., Mecocci P., et al.,** 2003 йил, JAGS, Vol. 51, pp. 694-698.
234. *Cornell scale for depression in dementia.* **Alexopoulos G.S., Abrams R.C., Young B.C., Shamoian C.A.,** 1988 йил, BiolPsychiatr, Vol. 23, pp. 271-284.
235. *Cornel scale for depression in demetia.* **Alexopoulos G.A., Abrams R.C., Young R.C., et al.,** 1988 йил, Biol Psych, Vol. 23, pp. 271-284.
236. *Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: An insight into the action of antidepressants.* **Leonard B.E.** 2014 йил, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, Vol. 48, pp. 261-267.
237. *The new 5HT hypothesis of depression: cell mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase which leads to lower plasma tryptophan and an increase in the synthesis of detrimental tryptophan catabolites, both of which contribute to the onset of d.* **Maes M., Leonard B.E., Myint A.M., Kubera M.,** 2011 йил, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., Vol. 35, pp. 702-721.
238. *Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis.* **Maes M.** 1995 йил, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., Vol. 19, pp. 305-312.
239. *Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment.* **Pariante C., Miller A.H.,** Biol Psychatry, Vol. 49, pp. 391-404o.
240. *Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major.* **Brian E. Leonard.** 2014 йил, Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, Vol. 48, pp. 261-267.
241. *Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study.* **Mendlewicz J., Oswald P., Souery D., Alboni S., Brunello N., et al.,** 2006 йил, Int Clin Psychopharmacol ., Vol. 21, pp. 227-231.
242. *The cyclo-oxygenase 2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects on major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled add-on pilot study to reboxetine.* **Mueller N., Schwarz M.J., Dehning S., Douhe A., Cerovecki A., et al.,** 2006 йил, Mol Psychiatry , Vol. 11, pp. 680-684.
243. *Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double-blind and placebo controlled trial.* **Akhondzadeh S., Jafari S., Raisi F., Naseh A.A., Ghoreishi A., et al.** 2009 йил, Depress Anxiety., Vol. 26, pp. 607-611.
244. *Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and whitw elders.* **Yaffe K., Lindquist K., Penninx B.W., Simonsick E.M., Pahor M., Kritchevsky S., Launer L., Kuller L., Rubin S., Harris T.,** 2003 йил, Neurology, Vol. 61, pp. 76-80.

245. *Inflammatory markers and depressed mood in older person: result from the Health, Aging and Body Compositin study.* **Pennix B.W., Kritchevsky S.B. , Yaffe K., Newman A.B., Simonsick E.M., Rubin S., Ferrucci L., Harris T., Pahor M.,** 2003 йил, Biol Psychiatry , Vol. 54, pp. 566-572.
246. *Increased plasma levels of interlukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? .* **Licastro F., Pedrini S., Caputo L., Annoni G., Davis L.J., Ferri C., Casadei V., Grimaldi L.M.,** 2000 йил, J. Neuroimmunol, Vol. 103, pp. 97-102.
247. *Inflammatory mediators in the elderly.* **Krabbe K.S., Pedersen M., Bruunsgaard H.,** 2004 йил, Exp Gerontol, Vol. 39, pp. 687-699.
248. *Intrathecal release of nitric oxide in Alzheimer's disease and vascular dementia.* **Tarkowski E., Ringqvist A., Blennow K., Wallin A., Wennmalm A.,** 2000 йил, Dement Geriatric Cogn Disord, Vol. 11, pp. 322-326.
249. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.* **Asahara T., Murihara T., Sullivan A., et al.,** 1997 йил, Science, Vol. 275, pp. 964-967.
250. *Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.* **Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Hebbel R.P.,** 2000 йил, J Clin Invest, Vol. 105, pp. 71-77.
251. *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating CD34+ cells identificate a polutation of functional endothelial precursor.* **Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Raffi S.,** 2000 йил, Blood, Vol. 95, pp. 952-958.
252. *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.* **Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM.** 2002 йил, J Clin Invest, Vol. 109, pp. 337-346.
253. *Transplanted cord blood-derived endothelial progenitor cells augment postnatal neovascularization.* **Murohara T., Ikeda H., Duan J., et al.,** 2000 йил, J Clin Invest, Vol. 105, pp. 1527-1536.
254. *Vascularprogenitors: from biology to treatment.* **Luttun A., Carmeliet G., Carmeliet P.,** 2002 йил, Trends Cardiovasc Med, Vol. 12, pp. 88-96.
255. *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.* **Rehman J., Li J., Orschell C.M., March K.L.,** 2003 йил, Circulation, Vol. 107, pp. 1164-1169.
256. *Expression of VEGFR-2 and AC133.* **Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Raffi S.,** 2000 йил, Blood , Vol. 95, pp. 952-958.
257. *Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Blood Vesse in Ischemic Tissue and Tumours.* **Manish A., Chiocca E.A.,** 6, 2005 йил, Mol Ther, Vol. 12, pp. 994-1005.

258. *Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance.* **Hristov M., Weber C.,** 200 жыл 8-Дес, J Cell Mol Med, pp. 498-508.
259. *Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization.* **Libby P.** 8В, 2000 жыл 19-Oct, Am J Cardiol, Vol. 86, pp. 3J-8J.
260. *Fundamentals of endothelial function for clinical cardiologist.* **Verma S, Anderson TJ.** 2002 жыл, Circ, Vol. 105, pp. 546-549.
261. *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.* **Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, et al.** 2001 жыл, Circulation , Vol. 103, pp. 2776-2779.
262. *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation.* **Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickening G.** 2003 жыл, Circulation, Vol. 107, pp. 3059-3065.
263. *Endurance training increased the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease.* **Steiner S, Niesser A, Ziegler S, Richter B, Sidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW.** 2005 жыл, Atherosclerosis, Vol. 181, pp. 305-310.
264. *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.* **Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent regenerative capacities.** **Friedrich E.B., Walenta K., Scharlau J., et al.,** 2006 жыл, Circ. Res. , Vol. 98, pp. e20-25.
265. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.* **Folkman J.** 1995 жыл, nat. Med., Vol. 1, pp. 27-31.
266. *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.* **Shi Q, et al.** 1998 жыл, Blood, Vol. 92, pp. 362-367.
267. *Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells.* **Urbich C, Aicher A et al.** 2005 жыл, J. Mol. Cel. Cardiol., Vol. 39, pp. 733-742.
268. *Regulatory mechanisms in stem cell biology.* **Morrison S.J., et al.,** 1997 жыл, Cell, Vol. 88, pp. 287-298.
269. *Osteoblastic cells regulate the Hematopoietic stem cell niche.* **Calvi L.M., et al.,** 2003 жыл, Nature, Vol. 425, pp. 842-846.
270. *Identification of the Hematopoietic stem cell niche and control of the niche size.* **Zhang J., et al.,** 2003 жыл, Nature, Vol. 425, pp. 836-841.

271. *Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.* **Lapidot T., Petit I.,** 2002 йил, *Exp. Hematol*, Vol. 30, pp. 973-981.
272. *Vascular adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following haematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor.* **Levesque J.P., et al.,** 2001 йил, *Blood*, Vol. 98, pp. 1289-1297.
273. *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* **Asahara T., et al.** 1999 йил, *EMBO J*, Vol. 18, pp. 3964-3972.
274. *Effect of stromal-cell-derived factor 1 in stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.* **Askari A.T, et al.** 2003 йил, *Lancet*, Vol. 362, pp. 697-703.
275. *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand.* **Heissing B., et al.,** 2002 йил, *Cell*, Vol. 109, pp. 625-637.
276. *Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone marrow microenvironment.* **Hattori K., et al.,** 2002 йил, *Nat. Med.*, Vol. 8, pp. 841-849.
277. *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells via Akt-dependent phosphorylation.* **Dimmeler S., et al.,** 1999 йил, *Nature*, Vol. 399, pp. 601-605.
278. *S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death.* **Gu Z., et al.,** 2002 йил, *Science*, Vol. 297, pp. 1186-1191. *Impaired CxCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease.* **Walter DH, et al.** 2005 йил, *Circ. Res.*, Vol. 97, p. 1142.
279. *Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis.* **Vajkoczy P, Blum S, et al.** 2003 йил, *J Exp Med*, Vol. 197, p. 1755.
280. *Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization.* **Urbich C, et al.** 2005 йил, *Nat. Med.*, Vol. 11, pp. 206-213.
281. *Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells.* **Fujiyama S., Amano K., Uehira K., Yoshida M., et al.,** 2003 йил, *Circ. Res.*, Vol. 93, pp. 980-989.
282. *Stroma cell-mediated reendothelialization as endothelial progenitor cells factor-1-dependent manner and accelerates.* **Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, et al.** 2003 йил, *Circ. Res.*, Vol. 93, pp. 980-989.
283. *Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.* **Kalka C., Masuda H., Takahashi T., et al.,** 2000 йил, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, pp. 3422-3427.

284. *Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting.* **Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, Kuss O, Morawietz H, Holtz J, Simm A.** 12, 2003 йил 17-Dec, J Am Coll Cardiol, Vol. 42, pp. 2073-2080.
285. *Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore agingimpaired cardiac angiogenic function.* **Edelberg J.M., et al.** 2002 йил, Circ Res, Vol. 90, pp. e89-e93.
286. *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin in patients with stable coronary artery disease.* **Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmler S.** 24, 2001 йил 19-Jun, Circulation, Vol. 103, pp. 2885-2890.
287. *Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cells significance in angiogenic growth factor-induced neovascularisation in vivo.* **Murayama T., Tepper O.M., Silver M., Ma H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T., Kalka C.,** 2002 йил, Exp Hematol., Vol. 30, pp. 967-972.
288. *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.* **Werner N, Kisiol S, Schiegl T, Ahlers P, Talenta K, Link A, Bohm M, Nickening G.** 2005 йил, N Engl J Med, Vol. 353, pp. 999-1007.
289. *Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension.* **Imanishi T., et al.,** 2005 йил, Journal of hypertension, Vol. 23, pp. 1831-1837.
290. *Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells.* **Imanishi T., et al.,** 2004 йил, Hypertens Res, Vol. 27, pp. 101-108.
291. *Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress.* **Imanishi T., et al.,** 2005 йил, Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress., Vol. 23, pp. 97-104.
292. *Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities.* **Michaud S.E., Dussault S., Haddad P., et al.,** 2005 йил, Atherosclerosis .
293. *Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers.* **Kondo T., et al.,** 2004 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol, Vol. 24, pp. 1442-1447.
294. *Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells.* **Wang X, et al.** 2004 йил, J Clin Pharmacol, Vol. 44, pp. 881-889.
295. *Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells:evidence for enhanced resistance against oxidative stress.* **Dernbach E., Urbich C., Brandes R.P., et al.,** 2004 йил, Blood, Vol. 104, pp. 3591-3597.
296. *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.* **Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., et al.** 2003 йил, Nat Med, Vol. 9, pp. 1370-1376.

297. *Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia.* **Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH.** 2004 йил, Clin Sci (Lond), Vol. 107, pp. 273-280.
298. *Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells.* **Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y.** 2004 йил, Drug Chem Toxicol, Vol. 27, pp. 243-255.
299. *Oxidized low-density lipoprotein induced endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction.* **Imanishi T., Hano T., Sawamura T., Nishio I.,** 2004 йил, Clin Exp Pharmacol Physiol. , Vol. 31, pp. 407-413.
300. *Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction.* **Imanishi T., et al.,** 2004 йил, Clin Exp Pharmacol Physiol, Vol. 31, pp. 407-413.
301. *In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels.* **Pellegatta F, et al.** 2006 йил, Int J Mol Med, Vol. 17, pp. 203-208.
302. *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures.* **Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Cagne PJ, Jacobowitz GR, et al.** 2002 йил, Circulation, Vol. 106, pp. 2781-2786.
303. *Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes.* **Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ.** 2004 йил, Diabetes , Vol. 53, pp. 195-199.
304. *PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells.* **Pistrosch F, et al.** 2005 йил, Atherosclerosis, Vol. 183, pp. 163-167.
305. *Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells.* **Krankel N., Adams V., Linke A., Gielen S., Erbs S., Lenk K., Schuler G., Hambrecht R.,** 2005 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol., Vol. 25, pp. 698-703.
306. *Impairment in ischemia induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. .* **Tamarat R, Silvestre JS, Ricousse-Rousanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, Duriez M, Tobelem G, Levy BI.** 2004 йил, Am J Pathol. , Vol. 164, pp. 457-466.
307. *New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I.* **Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, et al.** 2003 йил, Circulation , Vol. 108, pp. 1917-1923.
308. *Haemostatic and inflammation markers in acute coronary syndromes and its relationship with adverse cardiovascular events.* **Díaz C.J., Núñez A.C., Flores M.I., Arcaute H.D., Archondo T.,** 2006 йил, Arch Cardiol Mex., pp. 366-375.

309. *C-reactive protein impairs angiogenic functions and decrease the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells.* **Suh W, Kim KL, Choi JH, Lee YS, Lee JY, Kim JM, Jang HS, Shin IS, Lee JS, Byun J, Jeon ES, Kim DK.** 2004 йил, *Biochem Biophys Res Commun* , Vol. 321, pp. 65-71.
310. *C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease.* **Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ.** 2004 йил, *Circulation*, Vol. 109, pp. 2058-2067.
311. *Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.* . 2001 йил, *JAMA*, Vol. 285, pp. 2486-2497.
312. *Implications of recent clinical trials for the National Xholesterol Education Program Adult Treatment Panel II guidelines.* **Grundy S.M., Cleeman J.I., Merz C.N., et al.,.** 2004 йил, *Circulation*, Vol. 110, pp. 227-239.
313. *JUPITER Trial Study Group. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular events rates initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial.* **Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al.** 2009 йил, *Lancet*, Vol. 373, pp. 1175-182.
314. **Society., International Atherosclerosis.** An International Atherosclerosis Society position paper: global recommendations for the management of dyslipidemia. . [Online] [Cited: 20114 йил 19-March.] [http://www.athero.org/download/IASPPGuidelines\\_Full\\_Report\\_2.pdf](http://www.athero.org/download/IASPPGuidelines_Full_Report_2.pdf).
315. *C-reactive protein and reclassification of cardiovascular risk in the Framingham Heart Study.* **Wilson PW, Pencina M, Jacques P, Selhub J, D'Agostino R Sr, O'Donnell CJ.** 2008 йил, *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, Vol. 1, pp. 92-97.
316. *Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood.* **Chen J.Z., Zhu J.H., Wang X.X., Zhu J.H., Xie X.D., Sun J., Shang Y.P., Guo X.G., Dai H.M., Hu S.J.,** 2004 йил, *J Mol Cell Cardiol.*, Vol. 36, pp. 233-239.
317. *ADMA causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* **Achan V., Broadhead M., et al.** 2003 йил, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , Vol. 23, pp. 1455-1459.
318. *Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study.* **Schnabel R, et al.** 2005 йил, *Circ Res*, Vol. 97, pp. e53-e59.
319. *Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine.* **Thum T, et al.** 2005 йил, *J Am Coll Cardiol*, Vol. 46, pp. 1693-1701.

320. *Effects of aspirin on number, activity and inducible nitric oxide synthase of endothelial progenitor cells from peripheral blood.* **Chen T., Chen J., et al.,** 2006 йил, Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 27, pp. 430-446.
321. *Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction.* **Foresta C., et al.,** 2005 йил, Int J Impot Res, Vol. 17, pp. 288-290.
322. *Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis.* **George J., et al.,** 2003 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol, Vol. 23, pp. e57-e60.
323. *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.* **Simper D, et al.** 2003 йил, Circulation, Vol. 107, pp. 143-149.
324. *Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. Stroke.* **Ghani U., et al.,** 2005 йил, Vol. 36, pp. 151-153.
325. *Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function.* **Taguchi A, et al.** 2004 йил, Circulation, Vol. 109, pp. 2972-2975.
326. *Exercise as cardiovascular therapy.* **Shepard RJ, Balady GJ.** 1999 йил, Circulation, Vol. 99, pp. 963-972.
327. *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.* **Sandri M., Adams V., Gielen S., Linke A., Lenk K., Krankel N., Lenz D., Erbs S., Scheinert D., Mohr F.W., Schuler G., Hambrecht R.,** 2005 йил, Circulation, Vol. 111, pp. 3391-3399.
328. *Effect of exercise on endothelial function in patients with coronary artery disease.* **Hambrecht R., Wolff A., et al.,** 2000 йил, New England Journal of Medicine, Vol. 342, pp. 454-460.
329. *Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase.* **Hambrecht R., Adams V., et al.,** 2003 йил, Circulation, Vol. 107, pp. 3152-3158.
330. *Physical inactivity increase oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis.* **Laufs U., Wassmann S., Czech T., Munzel T., Eisenhauer M., Bohm M., Nickenig G.,** 2005 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol., Vol. 25, pp. 809-814.
331. *Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects.* **Laufs U., Urhausen A., Werner N., Scharhag J., Heitz A., Kissner G., Bohm M., Kindermann W., Nickenig G.,** 2005 йил, Eur J Cardiovasc Prev Rehabil., Vol. 12, pp. 407-414.
332. *Endurance training increase the number of endothelial progenitor cells in patient with cardiovascular risk and coronary artery disease.* **Steiner S, Neissner A, et al.**

333. *HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis.* **Bustos C., Hernandez-Presa M.A., et al.,** 1998 йил, *J Am Coll Cardiol.*, Vol. 32, pp. 2057-2064.
334. *A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins.* **Weng TC, Yang YH, Lin SJ, Tai SH.** 2010 йил, *J Clin Pharm Ther*, Vol. 35, pp. 139-151.
335. **TP., Bersot.** Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. *Knollmann BC, ed. Goodman & Gilman's The.* 12th edition. s.l. : McGraw-Hill, 2011, Chapter 31.
336. *Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction.* **Lacoste M., Lam J.Y., et al.,** 1995 йил, *Circulation*, Vol. 92, pp. 3172--3177.
337. *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase.* **Laufs U., Liao J.K.,** 1998 йил, *J Biol Chem* , Vol. 273, pp. 24266-24271.
338. *Statins enhance migratory capacity by up-regulation of telomere-capping protein TRF2 in endothelial progenitor cells.* **Spyridopoulos I, et al.** 2004 йил, *Circulation*.
339. *Risk factors for coronary disease, circulating Endothelial Progenitor Cells and the role of HMG-CoA reductase.* **Urbich C, Dimmeler S.** 2005 йил, *Kidney International* , Vol. 67, pp. 1672-1676.
340. *Estradiol accelerates reendothelization in mouse artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta.* **Brouchet L., Krust A., et al.,** 2001 йил, *Circulation*, Vol. 103, pp. 423-428.
341. *Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone hypertensive rats.* **Imanishi T., Kobayashi K., Hano T., Nishio I.,** 2005 йил, *Hypertens Res.*, Vol. 28, pp. 763-772.
342. *Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelization after arterial injury.* **Iwakura A., Luedemann C., Shasry S., Hanley A., Kearney M., Aikawa R., Isner J.M., Asahara T., Losordo D.W.,** 2003 йил, *Circulation*, Vol. 108, pp. 3115-3121.
343. *Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats.* **Wassmann S, Strelhow K, et al.** 2001 йил, *Circulation*, Vol. 103, pp. 423-441.
344. *Differential effects of estrogen and progesterone on AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells.* **Nickeing G., Strehlow K., et al.,** 2000 йил, *Circulation*, Vol. 102, pp. 1828-1833.
345. *Glitazones and heart failure: critical appraisal for the clinician.* **Banch C.h., Weisel R.D., et al.,** 2003 йил, *Circulation*, Vol. 107, pp. 1350-1354.

346. *Effect of rosiglitazone treatment on non traditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus.* **Haffner S.M., Greenberg A.S., et al.,** 2002 йил, *Circulation*, Vol. 106, pp. 679-684.
347. *Troglitazone stimulates repair of the endothelium and inhibits neointimal formation in denuded rat aorta.* **Hannan K.M., Dilley R.J., et al.,** 2003 йил, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 23, pp. 762-768.
348. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists for preventing recurrent stroke and other vascular events in patients with stroke or transient ischaemic attack.* **Liu J., Wang L.N.,** 2015 йил 29-Oct, *Cochrane Database Syst Rev.* , Vol. 10.
349. *Endothelial function and hypertension.* **Landmesser U., Drexler H.,** *Curr Opin Cardiol.*2007, Vol. 22, pp. 316-320.
350. *Clinical assessment of endothelial dysfunction: combine and rule.* **Goligorsky M.S.** 2006 йил, *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, Vol. 15, pp. 617-624.
351. *Circulating endothelium as an indication of vascular injury.* **Bouvier C.A., Gaynor E., Cintron J.R., Bernhardt B., Spaet T.,** 1970 йил, *Thromb Diath Haemorrh*, Vol. 40, p. 163.
352. *Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris.* **Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V., Fabian J.,** 1978 йил, *Klin Wochenschr*, Vol. 56, pp. 1033-1036.
353. *Circulating endothelial cells and arterial endothelial mitosis in anaphylactic shock.* **Wright HP, Giacometti NJ.** 1972 йил, *Br J Exp Pathol*, Vol. 53, pp. 1-4.
354. *A technique for locating rare cells in the circulation for ultramicroscopy.* **Gaynor E., Bouvier C.A., Cintron J.R.,** 1970 йил, *Proc Soc Exp Biol Med*, Vol. 33, pp. 520-523.
355. *Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty.* **George F., Brisson C., Poncelet P., Laurent J.C., Massot O., Arnoux D., Ambrosi P., Klein-Soyer C., et al.,** 1992 йил, *Thromb Haemost.*, Vol. 67, pp. 147-153.
356. *S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen.* **Bardin N., George F., Mutin M., Brisson C., Horschowski N., Frances V., et al.,** 1996 йил, *Tissue Antigens*, Vol. 48, pp. 531-539.
357. *Origins of circulating endothelial cells and endothelial out growth from blood.* **Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Hebbel R.P.,** 2000 йил, *J Clin Invest*, Vol. 105, pp. 71-77.
358. *Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease.* **Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Hebbel R.P., Lip G.Y., Mancuso P.,** 2005 йил, *Thromb Haemost.*, Vol. 93, pp. 228-235.
359. *Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence.* **Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F.** 3, 2009 йил, *J. Cell. Mol. Med*, Vol. 13, pp. 454-471.

360. *Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S- Endo 1 monoclonal antibody.* **George F., Poncelet P., Laurent J.C., Massot O., Arnoux D., Lequeux N., Ambrosi P., Chicheportiche C., Sampol J.,** 1991 йил, J Immunol Methods, Vol. 139, pp. 65-75.
361. *Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood.* **Sbarbati R, de Boer M, Marzilli M, Scarlattini M, Rossi G, van Mourik JA.** 1991 йил, Blood, Vol. 77, pp. 764-769.
362. *Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty.* **George F., Brisson C., Poncelet P., et al.,** 1992 йил, Thromb Haemost, Vol. 67, pp. 147-153.
363. *Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of Rickettsia conorii in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads.* **Drancourt M., George F., Brouqui P., Sampol J., Raoult D.,** 1992 йил, J Infect Dis, Vol. 166, pp. 660-663.
364. *Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever.* **George F., Brouqui P., Boffa M.C., et al.,** 1993 йил, Blood, Vol. 82, pp. 2109-1016.
365. *Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells.* **Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Sampol J., Dignat-George F.,** 1999 йил, Blood, Vol. 93, pp. 2951-2958.
366. *Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients.* **Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F.,** 2001 йил, Blood, Vol. 97, pp. 3658-3661.
367. *Circulating Endothelial Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Endothelial Microparticles in Cancer.* **Goon P.K.Y., Lip G.Y.H., Boos C.J., Stonelakey P.S., Blann A.D.,** 2, 2006 йил, Neoplasia, Vol. 8.
368. *Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage.* **Uta Erdbruegger, Marion Haubitz, Alexander Woywodt.** 2006 йил, Clinica Chimica Acta, Vol. 373, pp. 17-26.
369. *Increased endothelial cell turnover in areas of in.* **Caplan B.A., Schwartz C.J.,** 1973 йил, Atherosclerosis, Vol. 17, pp. 401-417.
370. *Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells.* **Dimmeler S., Hermann C., Galle J., Zeiher A.M.,** 1999 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol, Vol. 19, pp. 656-664.
- 371.

372. *Visualization of live endothelial cells ex vivo and in vitro.* **Hamid S.A., Daly C., Campbell S.,** 2003 йил, *Microvasc Res*, Vol. 66, pp. 159-163.
373. *Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement.* **Holmen C., Elsheikh E., Stenvinkel P., et al.,** 31, 2005 йил, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 16, pp. 10-20.
374. *Increased levels of circulating endothelial cells in chronic periaortitis as a marker of active disease.* **Moroni G., Del Papa N., Moronetti L.M., et al.,** 2005 йил, *Kidney Int*, Vol. 68, pp. 562-568.
375. *Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis.* **Del Papa N., Colombo G., Fracchiolla N., et al.,** 2004 йил, *Arthritis Rheum*, Vol. 50, pp. 1296-1304.
376. *Strategies to investigate circulating endothelial cells in cancer.* **Mancuso P., Rabascio C., Bertolini F.,** 2003 йил, *Pathophysiol Haemost Thromb*, Vol. 33, pp. 503-506.
377. *Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease.* **Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., et al.,** 2005 йил, *Thromb Haemost*, Vol. 93, pp. 228-235.
378. *The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification.* **Bertolini F., Shaked Y., Mancuso P., Kerbel R.S.,** 2006 йил, *Nat Rev Cancer.*, Vol. 6, pp. 835-845.
379. *A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood.* **Duda D.G., Cohen K.S., Scadden D.T., Jain R.K.,** 2007 йил, *Nat Protoc.*, Vol. 2, pp. 805-810.
380. *Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas.* **Rowand JL, Martin G, Doyle GV, Miller MC, Pierce MS, Connelly MC, Rao C, Terstappen LW.** 2007 йил, *Cytometry A.*, Vol. 71, pp. 105-113.
381. *CD146-immunomagnetic enrichment followed by multiparameter flow cytometry: a new approach to counting circulating endothelial cells.* **Widemann A, Sabatier F, Arnaud L, Bonello L, Al-Massarani G, Paganelli F, Poncelet P, Dignat-George F.** 2008 йил, *J Thromb Haemost.*, Vol. 6, pp. 869-876.
382. *Strategies to investigate circulating endothelial cells in cancer.* **Mancuso P., Rabascio C., Bertolini F.,** 2003 йил, *Pathophysiol Haemost Thromb*, Vol. 33, pp. 503-506.
383. *Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes.* **Cortelezzi A., Fracchiolla N.S., Mazzeo L.M., et al.,** 2005 йил, *Leuk Lymphoma*, Vol. 46, pp. 1345-1451.
384. *Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis.* **Mancuso P., Calleri A., Cassi C., et al.,** 2003 йил, *Adv Exp Med Biol*, Vol. 522, pp. 83-97.

385. *Human dermal microvascular endothelia lbut not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro.* **Swerlick RA, LeeKH,WickTM,LawleyTJ.** 1992 йил, J Immunol, Vol. 48, pp. 78-83.
386. *Circulating endothelial cells. Biomarker of vascu-lar disease.* **Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., et al.,** 2005 йил, Thromb Haemost, Vol. 93, pp. 228-235.
387. *Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectine.* **Chong A.Y., Lip G.Y.H., Freestone B., Blann A.D.,** 2006 йил, Eur J Heart Fail , Vol. 8, pp. 167-172.
388. *Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells.* **Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Sampol J., Dignat george F.,** 1999 йил, Blood , Vol. 93, pp. 2951-2958.
389. *Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture.* **Petzelbauer P., Bender J.R., Wilson J., PoberJ.S.** 1993 йил, J Immunol , Vol. 151, pp. 5062-5072.
390. *Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome.* **Schmidt D.E., Manca M., Hofer I.M.,** 2015 йил, Trends in Cardiovascular Medicine, Vol. 25, pp. 578-587.
391. *Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells.* **Mund J.A., Estes M.L., Yoder M.C., Ingram D.A., Case J.,** 2012 йил, Arterioscler Thromb Vasc Biol , Vol. 32, pp. 1045-1053.
392. *Circulating endothelial cells in vascular disorders:new insights into an old concept.* **Dignat-George F., Sampol J.,** 2000 йил, Eur J Haematol, Vol. 5, pp. 215-220.
393. *Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMVinfections with organ involvement.* **Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G.** 1993 йил, J Clin Invest, Vol. 92, pp. 663-670.
394. *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant.* **Combes V., Simon A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat G.,** 1999 йил, J Clin Invest., Vol. 104, pp. 93-102.
395. *Function and role of microparticles in varius cinical setting.* **Nomura S., Ozaki Y., IkedaY.,** 2008 йил, Thromb Res, Vol. 123, pp. 8-23.
396. *Anovel flow cytometric approach to distinguish circulating endothelial cells from endothelial microparticles: relevance for thee valuation of endothelialdysfunction.* **Lanuti P., Santilli F., Marchisio M., Pierdomenico L., Vitacolonna E., Santavenere E., et al.,** 2012 йил, J Immunol Methodos., Vol. 380, pp. 16-22.

397. *Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells.* **Burger D., Touyz R.M.,** 2012 йил, J Am Soc Hypertens, Vol. 6, pp. 85-99.
398. *Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes.* **Lee S.T., Chu K., Jung K.H., Kim J.M., Moon H.J., Bahn J.J., et al.,** 2012 йил, PLoS One , Vol. 7, p. e35713.
399. *Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes.* **Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Wermer N.** 2011 йил, Eur Heart J , Vol. 32, pp. 2034-2041.
400. *Function and role of micro-particles in various settings.* **Nomura S., Ozaki Y., Ikeda Y.,** 2008 йил, Thromb Res, Vol. 123, pp. 8-23.
401. *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes.* **Bernal-Mizrachi L., Jimenez J.J., Pastor J., Mauro L.M., Horstman L.L., et al.,** 2003 йил, Am Heart J, Vol. 145, pp. 962-970.
402. *Circulating endothelial microparticles in patients with acute myocardial infarction.* **Zielińska M., Koniarek W., Goch J.H., Cebula B., Tybura M., Robak T., et al.,** 2005 йил, Kardiol Pol, Vol. 62, pp. 531-542.
403. *Circulating endothelial and platelet derived microparticles reflect the size of myocardium at risk in patients with ST-elevation myocardial infarction.* **Jung C., Sörensson P., Saleh N., Arheden H., Rydén L., Pernow J.,** 2012 йил, Atherosclerosis , Vol. 221, pp. 226-231.
404. *Lip GYH. Effects of percutaneous coronary intervention on peripheral venous blood circulating endothelial cells and plasma indices of endothelial damage/ dysfunction.* **Boos C.J., Balakrishnan B., Jessani S., Blann A.D.,** 2007 йил, Chest, Vol. 132, pp. 1920-1926.
405. *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance.* **Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J.,** 2007 йил, Circulation, Vol. 115, pp. 1285-1295.
406. *Evidence for the involvement of endothelial cell integrin  $\alpha V\beta 3$  in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma.* **Rüegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ.** 1998 йил, Nat Med, Vol. 4, pp. 408-414.
407. *Cyclosporine-induced detachment of vascular endothelial cell initiates the intrinsic coagulation system in plasma and whole blood.* **Bombeli T., Müller M., Straub P.W., Haerberli A.** 1996 йил, J Lab Clin Med , Vol. 127, pp. 621-634.
408. *Formation of procoagulant microparticles and properties.* **Freysinet J.M., Toti F.,** 2010 йил, Thromb Res, Vol. 125, pp. 546-548.
409. *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes.* **Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P.G., Freysinet J.M., et al.,** 2000 йил, Circulation, Vol. 101, pp. 841-843.

410. *Hemostatic implications of endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea.* **Solh EI AA, Akinnusi ME, Berim IG, Peter AM, Paasch LL, Szarpa KR.** 2008 йил, *Sleep Breath*, Vol. 12, pp. 331-337.
411. *Apoptotic vascular endothelial cells be come procoagulant.* **Bombeli T., Karsan A., Tait J.F., Harlan J.M.,** 1997 йил, *Blood*, Vol. 89, pp. 2429-2442.
412. *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.* **Berckmans R.J., Nieuwland R., Böing A.N., Romijn F.P., Hack C.E., Sturk A.,** 2001 йил, *Thromb Haemost* , Vol. 85, pp. 639-646.
413. *Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor.* **Makin A.J., Blann A.D., Chung N.A.Y., Silverman S.H., Lip G.Y.H.,** 2004 йил, *Eur Heart J*, Vol. 25, pp. 371-376.
414. *Circulating endothelial cells in atrial fibrillation with and without acute cardiovascular disease.* **Freestone B., Lip G.Y.H., Chong A.Y., Nadar S., Lee K.W., Blann A.D.,** 2005 йил, *Thromb Haemost*.
415. *The relationship of circulating endothelial cells to plasma indices of endothelial damage/dysfunction and apoptosis in acute coronary syndromes: implications for prognosis.* **Boos C.J., Balakrishnan B., Blann A.D., Lip G.Y.H.,** 2008 йил, *J Thromb Haemost* , Vol. 6, pp. 1841-1850.
416. *Circulating endothelial cells and von Willebrand factor as indices of endothelial damage/dysfunction in coronary artery disease: a comparison of central vs. peripheral levels and effects of coronary angioplasty.* **Boos C.J., Jaumdally R.J., Mac Fadyen R.J., Varma C., Lip G.Y.H.,** 2007 йил, *J Thromb Haemost*, Vol. 5, pp. 630-632.
417. *The effects of exercise stress testing on soluble E-selectin, von Willebrand factor, and circulating endothelial cells as indices of endothelial damage/dysfunction.* **Boos C.J., Balakrishnan B., Lip G.Y.H.,** 2008 йил, *Ann Med*, Vol. 40, pp. 66-73.
418. *Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes.* **Lee K.W., Lip G.Y.H., Tayebjee M., Foster W., Blann A.D.,** 2005 йил, *Blood* , Vol. 105, pp. 526-532.
419. *Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction.* **Martínez-Sales V., Sánchez-Lázaro I., Vila V., Almenar L., Contreras T., Reganon E.,** 2011 йил, *Dis Markers* , Vol. 31, pp. 75-82.
420. *Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke.* **Nadar S.K., Lip G.Y.H., Lee K.W., Blann A.D.,** 2005 йил, *Thromb Haemost*, Vol. 94, pp. 707-712.
421. *Circulating endothelial cells as potential markers of atherosclerosis.* **Gao Y., Liu C., Zhang X., Gao J., Yang C.,** 2008 йил, *Can J Neurol Sci*, Vol. 35, pp. 638-642.

422. *Serum C-reactive protein and circulating endothelial cells in patients with acute myocardial infarction.* Wang C, Li H, Fu P, Zhang S, Xiu R. 2005 йил, Clin Hemorheol Microcirc, Vol. 32, pp. 287-296.
423. *Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes.* Lee K.W., Lip G.Y.H., Tayebjee M., Foster W., Blann A.D., 2005 йил, Blood, Vol. 105, pp. 526-532.
424. *Proteomic characterization of EPCs and CECs "in vivo" from acute coronary syndrome patients and control subjects.* Mourino-Alvarez L., Calvo E., Moreu J., Padial L.R., Lopez J.A., Barderas M.G., et al., 2013 йил, BiochimBiophysActa., Vol. 1830, pp. 3030-3053.
425. *Temporal and venepuncture-related decline in circulating endothelial cell capture from mixed venous blood.* Boos C.J., Lane D.A., Kang D., Goon P.K.Y., Blann A.D., Lip G.Y.H., 2006 йил, J Thromb Thrombolysis, Vol. 22, pp. 125-131.
426. *Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease1.* Bonello L., Sabatier F., Paganelli F., Dignat-George F.,
427. *Detection and validation of circulating endothelial cells, a blood-based diagnostic marker of acute myocardial infarction.* Li C., Wu Q., Liu B., Yao Y., Chen Y., Zhang H., et al., 8, 2013 йил, PLoS One, p. e58478.
428. *Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide.* Chong A.Y., Blann A.D., Patel J., Freestone B., Hughes E., Lip G.Y.H., 2004 йил, Circulation, Vol. 110, pp. 1794-1798.
429. *Circulating endothelial cells, arterial stiffness, and cardiovascular risk stratification in hypertension.* Boos C.J., Lane D.A., Karpf M., Beevers D.G., Haynes R., Lip G.Y.H., 2007 йил, Chest, Vol. 132, pp. 1540-1547.
430. *Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes.* Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard J-B, Mutin M, Bonnet J-L, et al. 2004 йил, Circulation, Vol. 110, pp. 1586-1591.
431. —. Quilici J, Banzet N, Paule P, Meynard J-B, Mutin M, Bonnet J-L, et al. 2004 йил, Circulation, Vol. 110, pp. 1586-1591.
432. *Endothelium and valvular diseases of the heart.* Leask R.L., Jain N., Butany J., 2003 йил, Microsc Res Tech, Vol. 60, pp. 129-137.
433. *Relation ship between circulating endothelial cells and the predicted risk of cardiovascular events in acute coronary syndromes.* Boos C.J., Soor S.K., Kang D., Lip G.Y.H., 2007 йил, Eur Heart J, Vol. 28, pp. 1092-1101.

434. *Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c.* **McClung J.A., Naseer N., Saleem M., Rossi G.P., Weiss M.B., Abraham N.G., et al.**, 2005 йил, Diabetologia , Vol. 48, pp. 345-350.
435. *Ectopical expression of human MUC18 increases metastasis of human prostate cancer cells.* **Wu G-J, Peng Q, Fu P, Wang S-W, Chiang C-F, Dillehay DL, et al.** 2004 йил, Gene, Vol. 327, pp. 201-213.
436. *Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor.* **Guezguez B., Vigneron P., Lamerant N., Kieda C., Jaffredo T., Dunon D.**, 2007 йил, J Immunol, Vol. 179, pp. 6673-6685.
437. *Clinical value of circulating endothelial cell detection in oncology.* **Kraan J., Sleijfer S., Foekens J.A., Gratama J.W.**, 2012 йил, Drug Discov Today, Vol. 17, pp. 710-717.
438. *The Mugello Study, a survey of nonagenarians living in Tuscany: Design, methods and participants general characteristics.* **Molivo-Lova R., Sofi F., Pasquini G., Gori A.M., Vannetti F., Abbate R., Gensini G.F., Macchi C.**, 2013 йил, European Journal of Internal Medicine, Vol. 24, pp. 745-749.
439. *Does the Clock Drawing Test predict cognitive decline in older persons independent of the Mini-Mental State Examination? The FINE Study Group. Finland, Italy, The Netherlands Elderly.* **Ferrucci L., Cecchi F., Guralnik J.M., Giampaoli S., Lo N.C., Salani B., et al.** 1996 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 44, pp. 1326-1331.
440. *Subsystems contributing to the decline in ability to walk: bridging the gap between epidemiology and geriatric practice in the InCHIANTI study.* **Ferrucci L., Bandinelli S., Benvenuti E., Di Iorio A., Macchi C., Harris T.B., et al.** 2000 йил, J Am Geriatr Soc, Vol. 48, pp. 1618-1625.
441. *Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore.* **Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C.**, 2007 йил, Prev Med, Vol. 44, pp. 335-340.
442. *One-year adherence to exercise in elderly patients receiving postacute inpatient rehabilitation after cardiac surgery.* **Macchi C., Polcaro P., Cecchi F., Zipoli R., Sofi F., Romanelli A., et al.** 2009 йил, Am J Phys Med Rehabil, Vol. 88, pp. 727-734.
443. *A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity.* **Ware Jr J, Kosinski M, Keller SD.** 1996 йил, Med Care, Vol. 34, pp. 220-233.
444. *The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I.* **Ware Jr JE, Sherbourne CD.** 1992 йил, Med Care, Vol. 30, pp. 473-483.

445. *The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research.* **Buysse D.J., Reynolds III C.F., Monk T.H., Berman S.R., Kupfer D.J.,** 1989 йил, *Psychiatry Res*, Vol. 28, pp. 193-213.
446. *Fear of falling and activity restriction: the survey of activities and fear of falling in the elderly (SAFE).* **Lachman M.E., Howland J., Tennstedt S., Jette A., Assmann S., Peterson E.W.,** 1998 йил, *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, Vol. 53, pp. 43-50.
447. *The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia.* **Cummings J.L., Mega M., Gray K., Rosenberg-Thompson S., Carusi D.A., Gornbein J.,** 1994 йил, *Neurology*, Vol. 44, pp. 2308-2314.
448. *The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly person. .* **Podsiadlo D, Richardson S.** 1991 йил, *J Am Geriatr Soc*, Vol. 39, pp. 142-148.
449. *A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission.* **Guralnik J.M., Simonsick E.M., Ferrucci L., Glynn R.J., Berkman L.F., Blazer D.G., et al.,** 1994 йил, *Gerontol*, Vol. 49, pp. M85-94.
450. *Measuring muscular strength of the lower limbs by hand-held dynamometer: a standard protocol.* **Bandinelli S., Benvenuti E., Del L.I., Baccini M., Benvenuti F., Di Iorio A., et al.,** 1999 йил, *Aging (Milano)*, Vol. 11, pp. 287-293.
451. *Ankle-arm index as amarker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group.* **Newman A.B., Siscovick D.S., Manolio T.A., Polak J., Fried L.P., Borhani N.O., et al.,** 1993 йил, *Circulation*, Vol. 88, pp. 837-845.
- 452.
453. **ISTAT.** [www.demo-istat.it](http://www.demo-istat.it). *ISTAT.* [Online] 2009 йил.
454. *Geriatric Depression Scale (GDS). Recent evidence and development of shorter version.* **Sheikh RL, Yesavage JA.** *Clin. Gerontol.*, pp. 165-173.
455. *2016 European Guidelines on cardiovascular. practice, European Society of Cardiology disease prevention in clinical.* 2016 йил, *European Heart Journal*.
456. *Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevità.* **Franceschi C., Motta L., Valensin S., Rapisarda R., Franzone A.** 2000а йил, *Aging Clin Exp Res.*, Vol. 12, pp. 77-84.
457. *Relationship between between exercise capacity, endothelial progenitor cells and cytochemokines in patients undergoing cardiac rehabilitation.* **Cesari F., Sofi F., Caporale R., Capalbo A., Marcucci R., Macchi C., et al.** 2009 йил, *Thromb Haemost*, Vol. 101, pp. 521-526.

458. *Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score.* Sofi F., Macchi C., Abbate R., Gensini G.F., Casini A. 2004 йил, Public Health Nutr, Vol. 12, pp. 2769-2782.
459. *ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases.*, **European Society of Cardiology (ESC)**. 2011 йил, European Heart Journal, Vol. 32, pp. 2851-2906.
460. *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) final report.*, **National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)**,. 2002 йил, Circulation, Vol. 106, pp. 3143-3421.
461. *Criteria di appropriatezza clinica, tecnologica e strutturale nell'assistenza all'anziano.* **Bernabei R., Carbonin P., Di Bari M., et al.**, s.l. : 6, 2010 йил, Collana "Quaderni del Ministero della Salute".
462. *Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients.* **Beerepoot L.V., Mehra N., Vermaat J.S.P., Zonnenberg B.A., Gebbink M.F.G.B., Voest E.E.**,. 2004 йил, Ann Oncol, Vol. 15, pp. 139-145.
463. *Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes.* **ADVANCE Collaborative Group - Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al.** 2008 йил, N Engl J Med, Vol. 358, pp. 2560-2572.
464. *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias.* (**EAS**), **European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis**. 2016 йил, European Heart Journal.
465. *Morbidity and mortality in hypertensive adults with a low ankle/arm blood pressure index.* **Newman A.B.** 1993 йил, JAMA, Vol. 113, pp. e463-e654.
- 495 Bernini, P. *et al.* Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J. Biomol. NMR* **49**, 231–243 (2011).
- 496 Wishart, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 228–237 (2008).
- 497 Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. in *Breakthroughs in Statistics* (eds. Kotz, S. & Johnson, N. L.) 196–202 (Springer New York, 1992). doi:10.1007/978-1-4612-4380-9\_16
- 498 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *J. Educ. Behav. Stat.* **25**, 60–83 (2000).
- 499 Cliff, N. *Ordinal Methods for Behavioral Data Analysis*. (Psychology Press, 1996).
500. Appropriate statistics for ordinal level data: Should we really be using t-test and Cohen'sd for evaluating group differences on the NSSE and other surveys? | BibSonomy. Available at: <https://www.bibsonomy.org/bibtex/216a5c27e770147e5796719fc6b68547d/kweiand>. (Accessed: 27th September 2019)

- 501 Chong, J. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W486–W494 (2018).
- 502 . Bernini, P. *et al.* Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J. Biomol. NMR* **49**, 231–243 (2011).
503. Wishart, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* **27**, 228–237 (2008).
- 504 Wilcoxon, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. in *Breakthroughs in Statistics* (eds. Kotz, S. & Johnson, N. L.) 196–202 (Springer New York, 1992). doi:10.1007/978-1-4612-4380-9\_16
- 505 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *J. Educ. Behav. Stat.* **25**, 60–83 (2000).
506. Cliff, N. *Ordinal Methods for Behavioral Data Analysis*. (Psychology Press, 1996).
507. Appropriate statistics for ordinal level data: Should we really be using t-test and Cohen's d for evaluating group differences on the NSSE and other surveys? | BibSonomy. Available at: <https://www.bibsonomy.org/bibtex/216a5c27e770147e5796719fc6b68547d/kweiand>. (Accessed: 27th September 2019)
- 508 Chong, J. *et al.* MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, W486–W494 (2018).
- 509** Krumsiek J, Mittelstrass K, Do KT, Stückler F, Ried J, Adamski J, Peters A, Illig T, Kronenberg F, Friedrich N, Nauck M, Pietzner M, Mook-Kanamori DO, Suhre K, Gieger C, Grallert H, Theis FJ, Kastenmüller G. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*. 2015;11(6):1815-1833
- 510** Krumsiek J, Mittelstrass K, Do KT, Stückler F, Ried J, Adamski J, Peters A, Illig T, Kronenberg F, Friedrich N, Nauck M, Pietzner M, Mook-Kanamori DO, Suhre K, Gieger C, Grallert H, Theis FJ, Kastenmüller G. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*.
- 511** Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle Y Shimomura, Y Yamamoto, G Bajotto 2006 n.36 di Honda
- 512** Batch BC, Shah SH, Newgard CB, Turer CB, Haynes C, Bain JR, Muehlbauer M, Patel MJ, Stevens RD, Appel LJ, Newby LK, Svetkey LP. Branched chain amino acids are novel biomarkers for discrimination of metabolic wellness. *Metabolism*. 2013 Jul;62(7):961-9
- 513** Auro K, Joensuu A, Fischer K, Kettunen J, Salo P, Mattsson H, Niironen M, Kaprio J, Eriksson JG, Lehtimäki T, Raitakari O, Jula A, Tiitinen A, Jauhiainen M, Soininen P, Kangas AJ, Kähönen M, **514** Vignoli A, Tenori L, Giusti B, Takis PG, Valente S, Carrabba N, Balzi D, Barchielli A, Marchionni N, Gensini GF, Marcucci R, Luchinat C, Gori AM. NMR-based metabolomics identifies patients