



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
“SCIENZE BIOMEDICHE, NEUROFISIOLOGICHE ED
ENDOCRINOLOGICHE”

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Alessandro Martini

**IMPLICAZIONI CLINICHE DEI POLIMORFISMI
GENETICI NELLE ULCERE VENOSE DEGLI ARTI
INFERIORI: UN MODELLO DI DANNO E
RIPARAZIONE TISSUTALE**

Settore Scientifico Disciplinare MED/18

Dottorando

Dott. Serena Lanzara

Tutore

Prof. Alberto Liboni

Anni 2007/2009

Introduzione

Il danno e la riparazione tissutale sono processi multifattoriali e complessi, dove la genetica e soprattutto le interazioni gene-gene e gene-ambiente, svolgono un ruolo fondamentale (1,2). L'ulcera venosa degli arti inferiori (VLU), per la sua rilevante epidemiologia (3) e la sua posizione superficiale, rappresenta un modello ideale per studiare il ruolo dei più comuni plimorfismi genetici nelle lesioni di origine vascolare ed infiammatoria. Recenti studi, hanno identificato l'età avanzata dei pazienti, le dimensioni e la durata dell'ulcera e la presenza di fibrina su oltre il 50% della superficie della lesione, quali fattori di rischio indipendenti per la guarigione e la recidiva (4,5). Inoltre, molti pazienti affetti da malattia venosa cronica (CVD), non sviluppano lesioni cutanee, suggerendo una suscettibilità individuale. La genetica potrebbe giocare un ruolo nella suscettibilità individuale, anche se mancano evidenze di questo aspetto e della possibile ereditarietà. Negli ultimi anni, attraverso uno stretto lavoro di collaborazione tra clinici e biologi molecolari, sono state identificate diverse varianti genetiche (SNPs, singoli polimorfismi nucleotidici), con un ruolo ben definito nella etiopatogenesi, diagnosi e prognosi delle VLU (6-12). Questa scoperta potrà aiutare chiunque nell'affrontare problematiche comuni, ma difficilmente risolvibili fin'ora, che spesso si incontrano nella pratica clinica. Oggigiorno, la determinazione dei SNPs è un nuovo e importante strumento per incrementare la diagnosi e la prognosi.

Di seguito descriveremo come alcuni problemi clinici potrebbero essere meglio interpretati e spiegati attraverso l'analisi dei polimorfismi genetici e discuteremo il ruolo di questi ultimi nella guarigione delle ferite.

Recentemente, abbiamo scoperto che i polimorfismi genetici V34L e P564L del fattore XIII (FXIII) e quelli C282Y e H63D del gene HFE, giocano un ruolo nel modulare il processo di guarigione delle VLU e nel rischio di ulcerazione nella CVD, rispettivamente (9-12). Evidenze cliniche e sperimentali dimostrano che il fattore XIII della coagulazione svolge un ruolo nella patogenesi delle VLU. I pazienti affetti da VLU, così come quelli con deficit congenito del FXIII, presentano una difficile guarigione delle ferite (13-15), e l'apposizione locale di FXIII su VLU ne favorisce la guarigione (16-18). Recentemente, abbiamo riscontrato che esiste una correlazione tra le dimensioni dell'ulcera e sia i livelli di fattore XIII che le sue varianti genetiche (9). Innanzitutto, abbiamo trovato una corrispondenza ($P < 0.01$) tra l'area dell'ulcera e il numero di alleli polimorfici FXIII-L34 nel genotipo dei pazienti, inoltre, un'area

dell'ulcera maggiore nei casi con concentrazione plasmatica di FXIII minore di 0.65 U/ml ($P=0.08$). L'osservazione che l'area dell'ulcera è correlata con il genotipo-FXIII indipendentemente dai suoi livelli plasmatici e che l'area dell'ulcera è associata ad un deficit di FXIII indifferentemente dal genotipo-FXIII, indica che le due condizioni operano indipendentemente, ovvero cooperano nell'insorgenza dell'ulcera creando differenti profili di rischio. Nonostante questo, nei nostri studi caso-controllo, non abbiamo trovato una associazione con il rischio di sviluppare un'ulcera. Tuttavia, un significativo ($P<0.0001$) ritardo nei tempi di guarigione dell'ulcera è strettamente associato con la variante genica V34 del FXIII, dopo intervento chirurgico sul sistema venoso superficiale (11).

Inoltre, poiché la CVD porta ad un sovraccarico locale di ferro negli arti inferiori malati (19,20) e questa comune alterazione emodinamica è un fattore essenziale, ma non sufficiente a spiegare la progressione della CVD fino alle lesioni cutanee, uno degli obiettivi principali dei medici è quello di identificare fattori prognostici. Recentemente abbiamo dimostrato che le comuni varianti del gene HFE (C282Y e H63D), aumentano il rischio di comparsa dell'ulcera nei pazienti portatori di questi polimorfismi di circa 7 volte ($P<0.01$) (10) e anticipano l'insorgenza dell'ulcera di circa 10 anni ($P<0.004$) rispettivamente (21).

Infine, abbiamo analizzato i polimorfismi del promoter del gene che codifica per la metalloproteasi di matrice 12 (-82 AA, -AG, -GG) e abbiamo notato che, da un lato, il genotipo -AA è over-rappresentato nelle VLU primitive, con un rischio associato di 1.96 (95% CI, 1.18-3.22: $P=0.010$), dall'altro, i pazienti portatori del genotipo -GG hanno ulcere di minori dimensioni ($P=0.001$) (22).

Di seguito, discuteremo più dettagliatamente i sopra citati casi, dove la genetica trova una applicazione clinica, aiutando decisioni ed interpretazioni cliniche.

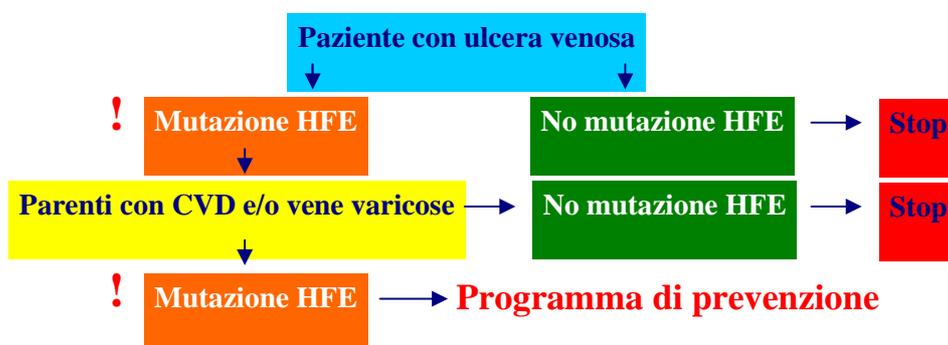
Tra i numerosi pazienti affetti da vene varicose (circa il 20% della popolazione generale), solo il 10% svilupperà un'ulcera venosa (23-28). Parametri clinici ed emodinamici, come eco-color-Doppler e pletismografia, non sono in grado di predire l'insorgenza dell'ulcera (23,29-33). Per queste ragioni, uno degli obiettivi principali dei medici coinvolti nella valutazione e trattamento della CVD è di identificare fattori prognostici per l'insorgenza dell'ulcera.

E' stato di recente descritto che il polimorfismo C282Y del gene dell'emocromatosi (HFE) (locus 6p21.3), che codifica per una proteina di membrana simile alle proteine MHC di classe I e ritenuto regolatore dell'assorbimento di ferro (34), ha un ruolo nel

predire l'insorgenza dell'ulcera (10,21). I polimorfismi del gene HFE, con le sue varianti C282Y e H63D, sono i più comuni e riconosciuti difetti genetici nel metabolismo del ferro. La popolazione generale, e in particolare i discendenti da popolazioni nord europee, frequentemente presenta la condizione di eterozigoti per C282Y o H63D, e i soggetti portatori di queste varianti genetiche sono generalmente considerati portatori asintomatici (35,36).

Tuttavia, è stato dimostrato un rischio aumentato di 6-7 volte di sviluppare VLU quando si sovrappongono due condizioni apparentemente non severe (10): CVD da un lato e la condizione di portatore della variante genetica C282Y dall'altro. Questo è uno straordinario esempio di interazione gene-ambiente. La sovrapposizione delle due condizioni determina una interazione negativa tra il sovraccarico cronico di ferro degli arti inferiori, determinato dall'insufficiente drenaggio venoso, e la ridotta capacità individuale geneticamente determinata di amministrare gli aumentati depositi locali di ferro (21). L'applicazione clinica immediata di questa scoperta implica che la minoranza di pazienti ad alto rischio può essere preventivamente identificata attraverso un semplice esame del sangue che serve come screening genetico. La pratica clinica potrebbe essere pesantemente influenzata dai test genetici per le mutazioni HFE. La presenza della mutazione C282Y potrebbe rappresentare una stretta indicazione per la correzione chirurgica della insufficienza del sistema venoso superficiale. Inoltre, potrebbero essere utilizzati alcuni accorgimenti, come calze elastocompressive, eliminazione dalla dieta di cibi ricchi di ferro ed integratori dietetici, che potrebbero rappresentare un programma di prevenzione mirato e potenzialmente molto efficace. Pertanto, la CVD potrebbe essere trattata più appropriatamente prima della comparsa di lesioni cutanee nei pazienti con specifiche caratteristiche genetiche. La **Figura 1** illustra il programma di screening proposto ed adottato presso il nostro Centro di Malattie Vascolari.

Figura 1. Screening HFE per pazienti affetti da CVD parenti di pazienti portatori della mutazione HFE



Sicuramente è di grande interesse la catena patofisiologica che porta al sovraccarico locale di ferro ed alla insorgenza della infiammazione ferro-dipendente nella CVD. Come già detto, una alterata emodinamica venosa, è un elemento necessario, ma non sufficiente per spiegare la progressione attraverso le diverse classi di CVD fino alla lesione cutanea. Il declino della teoria delle cuffie di fibrina, ha portato negli ultimi 20 anni ad indagare altri fattori enfatizzando il processo infiammatorio come amplificatore dell'insufficiente drenaggio venoso. Studi recenti hanno dimostrato un ruolo cruciale dell'accumulo tissutale di ferro nella induzione e mantenimento della infiammazione nella CVD (21,23,31,37-40). I depositi di ferro nella CVD sono evidenziabili come aree cutanee brunastre, che talvolta precedono, ma che invariabilmente circondano l'ulcera. L'origine dell'aumento tissutale dei depositi di ferro (19,20) è rappresentata dallo stravasamento dei globuli rossi (RBC) durante una stasi venosa significativa (41). I RBC vengono degradati dai macrofagi interstiziali, con conseguente rilascio di ferro incorporato nella ferritina. Col passare del tempo, con l'aumento del sovraccarico di ferro, la struttura della ferritina si modifica in emosiderina (31, 37-40). Nel 1988, Ackerman riscontrò una concentrazione di ferro negli arti inferiori di pazienti affetti da VLU 20 volte superiore rispetto alla concentrazione di ferro negli arti superiori degli stessi soggetti (39). Il deposito della emosiderina, sembra interessare tutto il corpo, infatti questa proteina è stata ritrovata anche nelle urine di pazienti affetti da CVD (31). L'incremento dei depositi tissutali di ferro e lo stravasamento interstiziale di proteine sono potenti chemoattrattori e presumibilmente rappresentano il primo sottile segnale di infiammazione cronica responsabile del reclutamento e migrazione dei globuli bianchi nella matrice. Inoltre, nel 1988, Coleridge-Smith osservò leucociti intrappolati nel

microcircolo venoso in corso di ipertensione venosa (30). Il meccanismo della migrazione dei globuli bianchi nella matrice sottocutanea è stato spiegato successivamente con la espressione di molecole di adesione, come ICAM, VCAM e selectine, sia nella CVD che nelle VLU (23,42-45). Queste molecole di adesione bloccano i leucociti circolanti sulla parete venosa e ne facilitano la tras migrazione nel tessuto. Le cellule che prevalentemente migrano nella matrice extracellulare (ECM) sono macrofagi e T-linfociti (44). I macrofagi fagocitano il ferro accumulato nei tessuti e lo immagazzinano in strutture simil-ferritina intracellulari. Il sovraccarico intra- ed extra-cellulare di ferro nei tessuti è potenzialmente pericoloso per la generazione di radicali liberi determinato dal possibile rilascio dai depositi di ferro libero (21,31,37-40,42). Wenk et al. (38) e Yeoh-Ellerton (20) trovarono livelli di ferro aumentati negli essudati di VLU croniche rispetto a ferite acute. Entrambi gli autori poi, osservarono una significativa concentrazione di metabolici derivanti dallo stress ossidativo. Lo step finale della catena patogenetica che porta alla distruzione della matrice e alla conseguente insorgenza dell'ulcera è rappresentato dalla over-espressione delle metalloproteasi di matrice (MMPs) non più adeguatamente controbilanciate dai loro fisiologici inibitori tissutali (TIMPs). Le MMPs causano una degradazione substrato specifica dei componenti della ECM, come collagene, elastina e laminina. L'attività incontrollata delle MMPs, presente nel microambiente della ferita, può portare alla distruzione della matrice e alla comparsa dell'ulcera (37,38,46-49). Ulteriori evidenze dimostrano che la stasi locale, l'infiammazione ed il sovraccarico di ferro possono indurre la iper-attivazione delle MMPs attraverso la cosiddetta via ferro-guidata delle MMPs (37,50-54).

La conoscenza del metabolismo del ferro e della sua regolazione nella infiammazione è recentemente aumentata, così sono stati descritti nuovi "attori" di questo processo. Assieme alla proteina di membrana HFE (55,56), un altro meccanismo difensivo in risposta al sovraccarico di ferro e alla infiammazione è messo in atto dalla epcidina, peptide di 25 aminoacidi secreto dal fegato. L'epcidina si lega alla ferroportina, che è il principale esportatore di ferro presente sulla superficie dei macrofagi. Dopo il legame, la ferroportina viene internalizzata e degradata, causando una diminuzione del ferro liberato dalla cellula. La regolazione della ferroportina da parte della epcidina completa il loop emostatico: il ferro e l'interleuchina 6 (IL-6), un mediatore della infiammazione, regolano la secrezione di epcidina, che in pratica controlla la concentrazione di ferroportina sulla superficie cellulare (57,58). IL-6 è consistentemente over-

rappresentata nelle VLU (59), mentre, fino ad ora, non abbiamo informazioni sulla espressione di epcidina o ferroportina nelle VLU. Questo loop biologico certamente rappresenta una prospettiva nella futura comprensione del contributo alla cascata infiammatoria degli aumentati depositi di ferro, dovuti al drenaggio venoso insufficiente, dei radicali liberi e delle citochine (60). Così come per il gene HFE, è molto probabile che SNPs dei geni/promoter che codificano per queste molecole possano avere effetti sulla complessa catena di emostasi del ferro.

E' stato dimostrato che i pazienti portatori della variante H63D sviluppano un'ulcera più precocemente, almeno 10 anni prima (21). Questo fatto è stato spiegato attraverso la precedentemente illustrata instabilità dei depositi di ferro, che porta ad una aumentata liberazione del ferro con possibile aumento dello stress ossidativo e conseguente iperattivazione delle MMPs (55,56). Tutto questo accelera la degradazione della ECM, portando alla lesione cutanea ed alla comparsa dell'ulcera. Così come i pazienti affetti da CVD portatori della variante C282Y hanno un aumentato rischio di sviluppare l'ulcera anche nella condizione eterozigote, così i portatori della variante H63D vedono una più precoce insorgenza della lesione. Questo accade perché il sovraccarico locale di ferro, caratteristico dei pazienti con CVD, supera la possibilità di compensazione fisiologica dell'organismo, portando ad una inappropriata gestione del ferro tissutale, anche nella condizione di eterozigosi. Questo fatto dimostra ancora una volta la possibilità di prevenire l'insorgenza dell'ulcera attraverso uno screening genetico per le mutazioni del gene HFE. Nei parenti di pazienti affetti da VLU bisogna verificare la presenza di CVD, conditio sine qua non per l'insorgenza dell'ulcera. Così, i pazienti con CVD, se parenti di portatori della mutazione HFE, devono a loro volta essere studiati per ricercare queste mutazioni e, se presenti, devono essere sottoposti a misure preventive come già spiegato (**Figura 1**).

Il FXIII della coagulazione è una transglutaminasi plasmatica ed è codificata dal gene F13A1 (locus 6p24,2-p23). Esso circola nel sangue come tetramero inattivo costituito da due subunità catalitiche A e due subunità accessorie B (A2B2) (13,14). Il fattore XIII attivato (FXIIIa) interviene in numerosi processi fisiologici in diversi ambiti, che vanno dalle fasi finali della coagulazione, fino alla guarigione delle ferite. I substrati del FXIIIa appartengono a differenti categorie: sistema della coagulazione e fibrinolisi; proteine adesive della ECM; proteine contrattili/citoscheletriche. Da tempo è stato riconosciuto il ruolo del FXIII nella guarigione delle ferite (61,62). Per quanto riguarda specificamente la VLU, i pazienti con deficit di FXIII hanno una anomala e ritardata

guarigione della ferita (61,63,64). Nei pazienti con VLU, sono stati riscontrati bassi livelli di FXIII (9,15,64) e studi clinici o case reports dimostrano un effetto positivo della applicazione locale di FXIII concentrato sulla ferita di pazienti con VLU (16-18,65). Diversi sono i meccanismi con i quali il FXIII può da un lato favorire la guarigione e dall'altro contrastare la distruzione della ECM. Studi sperimentali diretti o indiretti portano alla ipotesi che il meccanismo chiave sia rappresentato da una azione positiva del FXIII sulla proliferazione cellulare e/o sui componenti della ECM. Quindi, il FXIII agisce sulla biosintesi del collagene attraverso la modulazione delle interazioni cellule-matrice (66). Inoltre, componenti strutturali fondamentali del tessuto connettivo vengono cross-linked dal FXIII (67-70), che pure incrementa la migrazione e la proliferazione dei fibroblasti nella matrice (71-73).

Il nostro gruppo ha dimostrato che effettivamente il FXIII concentrato in-vitro contrasta gli effetti distruttivi delle MMPs sulle colture di fibroblasti, incrementando la proliferazione cellulare in modo dose-dipendente (74). La lesione cutanea nella VLU è determinata da una aumentata degradazione dei componenti della ECM, soprattutto collagene, dovuta alla incontrollata attività delle MMPs. Queste osservazioni in-vitro sono strettamente correlate con i principi della formazione della VLU (54,75), con il coinvolgimento del FXIII nel processo di guarigione (65,76) e con la scoperta che bassi livelli di FXIII sono associati a dimensioni maggiori dell'ulcera e con la relazione lineare esistente tra dimensioni della lesione e attività del FXIII (9).

Ulteriori osservazioni cliniche supportano il ruolo delle varianti genetiche del FXIII nell' influenzare l'estensione e la progressione delle ferite nei pazienti con VLU. L'attività e i livelli della molecola del FXIII dipendono strettamente da SNPs intragenici (77), e V34L è considerato il principale locus funzionale (78). Di fatti, abbiamo trovato un significativo trend positivo tra VLU cronica di dimensioni minori e l'aumento di varianti alleliche L34 nel genotipo dei pazienti (9). E' interessante notare che questo è indipendente dai livelli circolanti di FXIII, supportando così l'evidenza di una azione diretta della variante genetica sul fenotipo clinico. Il nostro gruppo ha poi pubblicato osservazioni più specifiche e clinicamente applicabili sul ruolo prognostico addizionale delle varianti genetiche del FXIII sulle VLU di difficile guarigione (12). Lo studio ha rilevato ulteriori associazioni con la dimensione dell'ulcera, dimostrando che diverse varianti alleliche dello stesso gene se coesistono nello stesso individuo possono amplificarsi a vicenda o agire insieme in termini di miglioramento della prognosi.

Successivamente sono stati effettuati ulteriori studi per indagare il ruolo di diversi geni/polimorfismi sulla espressione di diversi fenotipi o sul diverso andamento clinico. Da tempo è noto che il completamento della guarigione è il metodo migliore per identificare differenze nella guarigione stessa di ferite croniche (79), così abbiamo analizzato le possibili influenze dei polimorfismi genetici nella guarigione di VLU diverso tempo dopo intervento chirurgico sul sistema venoso superficiale (11). Abbiamo trovato una significativa over-rappresentazione di carrier L34 tra i pazienti con una guarigione più rapida. In una analisi più approfondita, questo si traduce nel rischio di avere un ritardo del tempo di guarigione di circa 5 volte nei pazienti con genotipo VV34, rispetto ai portatori L34. Infatti, l'analisi di sopravvivenza aveva lo scopo di valutare le differenze nei profili del tempo di guarigione per le due classi di genotipi FXIII-V34L e ha evidenziato differenze significative, attribuendo al genotipo FXIII-VV il peggiore outcome clinico in termini di ritardo della guarigione. Risultati con un trend simile, ma con una significatività borderline, sono stati trovati per il polimorfismo FXIII-P564L, comparando il genotipo PP564-wildtypes versus L564-carriers ($P=0.064$). Comparando PP564-wildtypes all'omozigosi 564LL, quest'ultimo ha un tempo di guarigione significativamente minore ($P<0.005$), così come una dimensione media dell'ulcera più piccola ($P=0.003$). Ancora, la coesistenza di differenti varianti genetiche del FXIII nello stesso soggetto possono agire in sinergia e determinare risultati positivi in termini di tempo di guarigione, dopo medesima procedura chirurgica.

Ancora, un buon esempio di interazione gene-gene e gene-ambiente, è fornita sia dal gene HFE che da quello FXIII. Abbiamo stratificato i pazienti rispetto alle varianti C282Y e V34L dopo avere corretto chirurgicamente il reflusso venoso (11). Come prima, i portatori della variante L34 avevano un tempo di guarigione apprezzabilmente ridotto, ma indipendentemente dalla presenza o meno della mutazione HFE C282Y. Una spiegazione di questo, sta nel fatto che una volta corretto il reflusso venoso superficiale, i fagociti HFE-mutati, non sono più a lungo sovraccaricati dall'eccesso di ferro. Il risultato emodinamico dell'intervento chirurgico riduce la generazione di ferro libero e di radicali liberi, quindi annulla la catena patogenetica ferro-dipendente prima descritta e allontana il polimorfismo HFE dalla manifestazione clinica. Contestualmente, la stessa procedura chirurgica, consente al FXIII e ad altri fattori di crescita di raggiungere la ferita, che, aiutando i componenti della ECM a contrastare l'incontrollata attività proteolitica delle MMPs, e favorendo la migrazione e proliferazione dei fibroblasti, in ultima analisi promuovono la guarigione.

Infine, recenti papers, attribuiscono al FXIII effetti pro-angiogenetici in-vitro e in-vivo (80,81), anche in un modello miocardico, con incremento la contrattilità cardiaca e la sopravvivenza dopo infarto (82-84). La angiogenesi, la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi del collagene ed il suo cross-linking con le fibre di fibrina sono processi fondamentali per la guarigione di una ferita e sono tutti regolati dal FXIII (13,14,72,73,80,81). Tutto ciò rende il FXIII una buona molecola e il suo gene un buon candidato per essere effettivamente coinvolti nel processo di rigenerazione e riparazione tissutale.

Indicatori prognostici validi per l'insorgenza dell'ulcera e la sua guarigione sono importanti per identificare pazienti con un potenziale ritardo o mancata guarigione della ferita. Questi pazienti a rischio potrebbero beneficiare maggiormente di nuove proposte terapeutiche ed è necessario un team multidisciplinare (chirurgo vascolare/plastico, dermatologo, biologo molecolare e genetista) per gestire questa complessa malattia.

Una gestione adeguata dei pazienti con VLU è basata strettamente sulla comprensione degli aspetti patofisiologici che causano anomalie. Nei prossimi anni, l'obiettivo deve essere quello di identificare fattori prognostici congeniti o acquisiti per la guarigione e di sviluppare nuovi approcci terapeutici.

Abbiamo parlato solo di alcune varianti genetiche associate a precisi aspetti clinici, ma dato che questo è solo un aspetto di un complesso meccanismo multifattoriale, riteniamo che sia un buon esempio da applicare ad altre patologie complesse, come quelle cardiovascolari (85,86) o neurodegenerative (42,87), pure caratterizzate da lesioni causate da un processo infiammatorio ferro-dipendente e da un inadeguato processo di riparazione (88).

Scopo della tesi

Fin'ora abbiamo dimostrato che esistono polimorfismi genetici che influenzano le dimensioni dell'ulcera, ma l'area è solo un momento nella storia della lesione e questo potrebbe aver falsato i dati ottenuti.

Con questo studio, invece, abbiamo seguito per la prima volta in longitudinale l'andamento dell'ulcera, per verificare se, a parità di trattamento medico, i polimorfismi genetici avessero effettivamente un ruolo nel processo di riparazione tissutale.

Materiali e Metodi

Da Febbraio 2007 a Ottobre 2008 abbiamo arruolato nel nostro studio 45 pazienti consecutivi con VLU, di cui 18 uomini (40%) e 27 donne (60%), con età media 72.9 anni (range 20-95 anni). La dimensione media iniziale dell'ulcera era 8.8+/-11.5 cm² (range 0.3-62.3 cm²) con un ampio spettro di durata della malattia, da 30 giorni fino a 20 anni.

I criteri di inclusione nello studio sono elencati nella tabella 1.

Le caratteristiche demografiche della nostra popolazione di pazienti sono riassunte nella tabella 2.

A ciascun paziente abbiamo effettuato un prelievo di sangue periferico per la determinazione dei polimorfismi genetici di nostro interesse (HFE, FXIII, MMP12) ed abbiamo eseguito medicazioni settimanali con la medesima strategia terapeutica (medicazione avanzata ed elastocompressione) effettuata dallo stesso operatore, questo nell'ottica di ridurre al minimo le variabili "umane", al fine di poter cogliere il reale ruolo delle varianti molecolari e genetiche.

Lo studio ha avuto una durata di 12 settimane.

Medicazione. Per la medicazione abbiamo usato una medicazione attiva costituita da cellulosa ossidata rigenerata e collagene con argento (Promogran Prisma, Systagenix Wound Management, Gargrave, UK), come medicazione primaria, una medicazione di carbone attivo e argento (Actisorb Plus 25, Jhonson & Jhonson) come medicazione secondaria, più un bendaggio elastocompressivo multistrato. La medicazione è stata cambiata una volta alla settimana.

Determinazione dell'area. Prima dell'inizio del trattamento, poi settimanalmente, le dimensioni dell'ulcera sono state misurate con un software per calcolare aree irregolari (Visitrak Capture, Smith and Nephew UK Limited, London, UK).

Estrazione del DNA e condizioni PCR. Il DNA è stato isolato da sangue intero periferico congelato, tramite un presidio di estrazione e purificazione automatica del DNA (BioRobot EZ1 system, QIAGEN, Hilden, Germany), che effettua una completa estrazione e purificazione degli acidi nucleici utilizzando un sofisticato sistema magnetico.

Il protocollo PCR per la contemporanea amplificazione delle regioni genetiche contenenti le sostituzioni C282Y e H63D nel gene HFE, la sostituzione -82AG nel promoter del gene per la MMP12 e quella V34L nel gene FXIII, è stato ottenuto come descritto di seguito: inizialmente 10 minuti a 94°C, poi 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 56°C per 20 secondi e 72°C per 90 secondi. I cicli PCR sono stati effettuati in un apparato Peltier Thermal Cycler (PTC-200; M J Research, Inc, Watertown, Mass) e sono stati completati con uno step finale aggiuntivo di 5 minuti a 72°C. La reazione PCR è stata effettuata in un volume finale di 100 microL contenente 100 ng di DNA genomico, 20 microM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 15 pmol di ciascun *primer* e 2,0 U di polimerasi DNA ricombinanti (AmpliTaQ Gold, Applied Biosystems, Branchburg, NJ).

Genotipizzazione sul sistema nanogenico. Il genotipo degli amplicons è stato determinato con il sistema *microchip Nanogen* (Nanochip Molecular Biology Workstation, Nanogen Corporate, San Diego, Calif). Un volume di 10-20 microM contenente il mix amplicon è stato mischiato con istidina per ottenere una concentrazione di 50 mmol/L in un volume finale di 50 microL. Circa 100-200 ng di ciascun amplicon sono stati applicati sulla cartuccia del *Nanochip* (H2-type), per mezzo del caricatore *Nanochip* utilizzando parametri di base. Una denaturazione chimica degli amplicons, con NaOH 0,1 N per 5 minuti di trattamento, ha concluso il protocollo applicato. Ogni mix fungente da reporter, conteneva sostanze prova (discriminanti), stabilizzatori e oligonucleotidi reporters (dettagli pubblicati su www.nanogen.com) specifici per ogni SNP. Gli steps di ibridazione e fluorescenza della cartuccia sono stati portati a termine dal lettore *Nanochip*. E' stato determinato un protocollo di ibridazione ottimizzato per l'analisi di ciascun polimorfismo. La strumentazione e i protocolli generali seguiti sono spiegati in dettaglio in pubblicazioni precedenti (89,90). Circa il 20% dei campioni sono stati caricati e analizzati in doppio e i controlli eterozigoti sono sempre stati inclusi in ogni analisi. Le analisi quantitative e l'assegnazione del genotipo sono state realizzate utilizzando specifici software supportati da Nanogen ed entrambi sono stati collocati ad un livello diagnostico.

Procedura di conferma del genotipo. Gli aplotipi sono stati confermati ripetendo il genotipo di circa il 20% di campioni casuali selezionati per ogni differente gruppo genotipico per specifico polimorfismo per mezzo di restrizioni enzimatiche o sequenze dirette dello stesso amplicon utilizzato per la procedura *Nanochip*. Non sono state trovate discrepanze tra i genotipi determinati in doppio e/o con metodi differenti (22).

Analisi statistiche. E' stato effettuato uno studio prospettico. La significatività statistica per le differenze tra due gruppi è stata calcolata con il test *T di Student* per variabili parametriche e con il *Chi quadro* per quelle non parametriche.

Dove appropriato, è stato utilizzato il *Fisher exact test*. Gli Odds Ratios (ORs) e gli Intervalli di Confidenza del 95% (95% CIs) sono stati calcolati con modelli di regressione logistica condizionali, considerando variabili ed altri fattori di confondimento come sesso, età e peso. Inoltre, il modello considera un reciproco aggiustamento dei differenti SNPs considerati.

Abbiamo costruito una *retta di regressione lineare* per visualizzare l'andamento delle aree delle ulcere nel tempo.

Ogni valore di $P \leq 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando Systat V.5.0 (Systat Inc, Evanston III) e SPSS Statistical Package (SPSS Inc, Chicago, III).

Tabella 1. Elenco dei criteri di inclusione ed esclusione

Criteri di inclusione

- Età compresa tra i 20 e i 95 anni
- Entrambi i generi
- VLU con etiologia venosa confermata da un recente esame eco-color-Doppler e un indice caviglia-braccio > 0.8
- VLU comparsa da almeno 30 giorni
- VLU di qualsiasi dimensione
- I pazienti devono tornare al Centro dello Studio per i cambi di medicazione e per la valutazione della ferita
- Consenso informato firmato da ciascun paziente

Criteri di esclusione

- Allergia nota verso la medicazione primaria utilizzata
- Segni di infezione riconosciuti dai curanti
- Gravidanza o allattamento
- Uso di droghe o abuso di alcohol
- Chemioterapia al momento
- Ferita considerata neoplastica
- Diabete
- Patologia arteriosa periferica e/o indice caviglia-braccio ≤ 0.8
- Anemia emolitica e / o anemia ferro-carenziale e/o malnutrizione
- Incapacità a camminare
- Severa insufficienza cardiaca e/o epatica e/o renale e/o polmonare
- Assunzione cronica di cortisonici per malattie infiammatorie croniche e/o malattie autoimmuni

Tabella 2 Caratteristiche demografiche

	Pazienti
Maschi	18 (40%)
Femmine	27 (60%)
Età media	72.9 aa (range 20-95 aa)
Dimensione media dell'ulcera	8.8 cm ² (range 0.3-62.3 cm ²)

Endpoints dello studio

- 1) Stabilire il tasso di guarigione dopo 12 settimane di trattamento;
- 2) Determinare i pazienti *responders* sulla base del Margolis Index (riduzione delle dimensioni dell'ulcera del 50% dopo 4 settimane);
- 3) Verificare se esiste una correlazione tra varianti genetiche, guarigione, responders.

Risultati

Dei 45 pazienti arruolati inizialmente, 2 sono andati persi al follow-up e 3 non hanno più potuto recarsi settimanalmente al nostro Centro per eseguire le medicazioni a causa della distanza della loro abitazione.

Pertanto, la nostra analisi si è svolta sui 40 pazienti rimasti, di cui 17 (42%) uomini, 23 (58%) donne, con età media 74.4 anni (range 20-95 anni) e dimensione media iniziale dell'ulcera 9.2+/- 11.9 cm² (range 0.3-62.3 cm²).

Su questi pazienti, abbiamo valutato la velocità di guarigione rispetto ai polimorfismi genetici, sia in termini di guarigione assoluta entro le 12 settimane di trattamento, sia in termini di riduzione dell'area iniziale dell'ulcera di almeno il 50% dopo 4 settimane di trattamento (Margolis Index, MI).

Polimorfismi FXIII V34L. Nella nostra popolazione, 13 pazienti erano portatori della variante genica V34L (32.5%), 3 di quella LL (7.5%) e 24 della VV (60%). La variante 34L non influenza la guarigione dell'ulcera: 10 pazienti portatori di almeno un allele 34L guariti (62.5%) versus 14 pazienti VV (58%) (P=ns) (**Tabella 3**). Analogamente per il Margolis Index: 8 34L MI+ (50%), versus 15 VV MI+ (62.5%) (P=ns) (**Tabella 4**).

Tabella 3. Guarigione in base ai polimorfismi FXIII

Genotipo	Numero pazienti	Guariti	Non Guariti	Percentuale di guarigione
VV	24	14	10	58
VL	13	9	4	69
LL	3	1	2	33
Totale	40	24	16	
VL-LL	16	10	6	62.5

Tabella 4. Margolis Index in base ai polimorfismi FXIII

Genotipo	Numero pazienti	Margolis Index		Percentuale MI+
		+	-	
VV	24	15	9	62.5
VL	13	7	6	54
LL	3	1	2	33.5
Totale	40	23	17	
VL-LL	16	8	8	50

Polimorfismi HFE C282Y e H63D. Dei nostri pazienti, 6 (15%) presentavano la variante genetica H63D, che non influenza la guarigione, né il Margolis Index. Infatti, 20 (59%) dei portatori H63D e 4 (67%) dei genotipi HH sono guariti dopo 12 settimane di trattamento (P=ns) (**Tabella 5**). Per quanto riguarda la riduzione dell'area dopo 4 settimane di trattamento, questa si è avuta in 3 (50%) pazienti H63D e in 20 (59%) pazienti senza la variante (P=ns) (**Tabella 6**).

Tutti i nostri pazienti presentavano genotipo CC, che, pertanto, non è stato preso in considerazione.

Tabella 5. Guarigione in base ai polimorfismi HFE

Genotipo	Numero pazienti	Guariti	Non guariti	Percentuale di guarigione
HD	6	4	2	67
HH	34	20	14	59
Totale	40	24	16	

Tabella 6. Margolis Index in base ai polimorfismi HFE

Genotipo	Numero pazienti	Margolis Index		Percentuale MI+
		+	-	
HD	6	3	3	50
HH	34	20	14	59
Totale	40	23	17	

Polimorfismi MMP12. Nella nostra popolazione di pazienti, 1 (2.5%) era omozigote GG, 8 (20%) eterozigoti AG e 31 (77.5%) omozigoti AA.

Abbiamo osservato che la presenza dell'allele -G, aumenta di 2.27 volte (OR= 2.27, CI 0.5-10.25) il rischio di non guarigione, ovvero il genotipo AA aumenta di 2.27 volte la probabilità di guarigione. Infatti, sono guariti dopo 12 settimane di trattamento 20 (65%) dei pazienti con genotipo AA e solo 4 (44%) dei portatori dell'allele G (**Tabella 7**).

Se guardiamo invece al Margolis Index, notiamo un andamento opposto: solo 16 (52%) degli omozigoti AA ha una riduzione di almeno il 50% dell'area dell'ulcera alla quarta settimana di trattamento, contro 7 (78%) pazienti carrier dell'allele -G (**Tabella 8**). Questo significa che la presenza dell'allele -G aumenta di 3.28 volte la probabilità di essere MI+, ovvero il genotipo AA aumenta di 3.28 volte la probabilità di essere MI- (OR=3.28, CI 0.58-18.36).

I due gruppi sono omogenei per sesso ed età, infatti, nel primo gruppo abbiamo 13 uomini (42%) e 18 donne (58%) con una età media di 75.3+/-10.6 anni, e nel secondo 4 uomini (44%) e 5 (56%) donne, con età media di 71.3+/-19.5 anni.

La dimensione iniziale dell'ulcera è 10.04+/-13.15 cm² negli omozigoti AA e 6.3+/-5.2 cm² nei carrier -G, quindi, i due gruppi non sono omogenei, anche se la differenza, di fatto non è statisticamente significativa (P=0.10).

Per eliminare la variabile "dimensione iniziale dell'ulcera", abbiamo costruito delle rette di regressione, che mostrano l'andamento nel tempo delle dimensioni dell'ulcera nell'intera popolazione (**Figura 2**) e nei due gruppi indipendentemente dal valore assoluto dell'area, che è stata considerata percentualmente. Ancora, grazie a questo tipo

di grafico (**Figura 3**) notiamo che le ulcere dei portatori dell'allele -G, hanno una tendenza a ridursi di dimensioni più velocemente rispetto a quelle degli omozigoti AA, anche se con una significatività border-line (P=0.0517).

Tabella 7. Guarigione in base ai polimorfismi MMP12

Genotipo	Numero pazienti	Guariti	Non guariti	Percentuale di guarigione
AA	31	20	11	65
-G	9	4	5	44
Totale	40	24	16	

Tabella 8. Margolis Index in base ai polimorfismi MMP12

Genotipo	Numero pazienti	Margolis Index +	Margolis Index -	Percentuale MI+
AA	31	16	15	52
-G	9	7	2	78
Totale	40	23	17	

Figura 2. Andamento nel tempo delle dimensioni dell'ulcera nella intera popolazione di pazienti

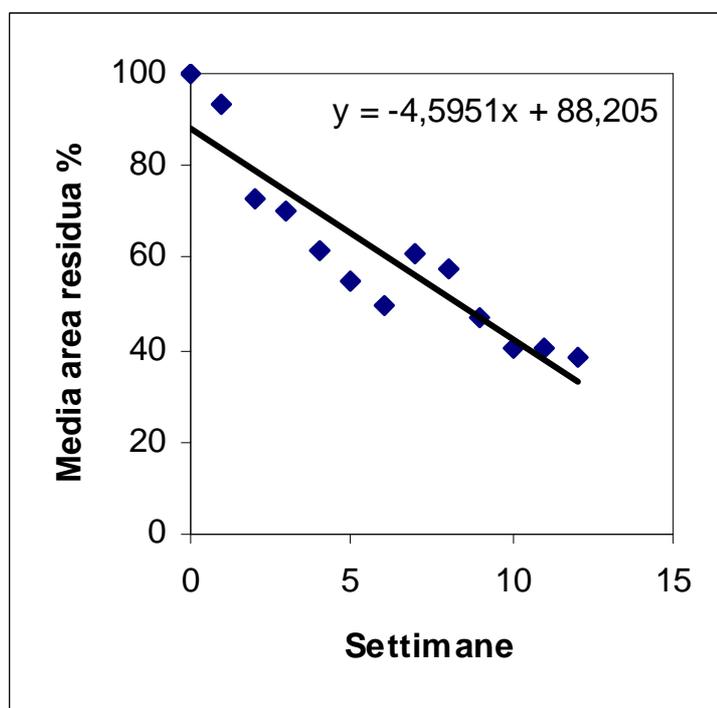
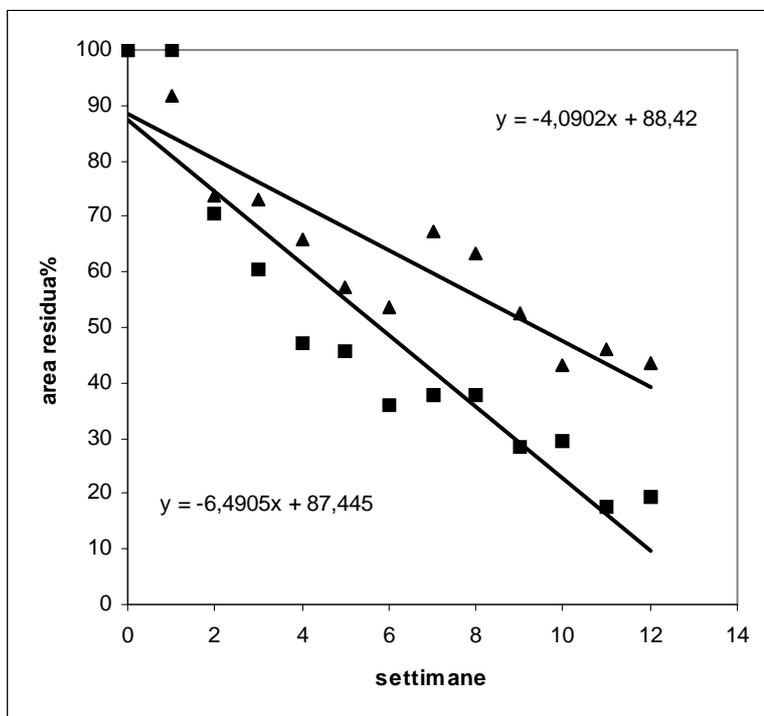


Figura 3. Andamento nel tempo delle dimensioni dell'ulcera nel gruppo AA (▲) e nel gruppo -G (■)



Discussione

Il danno e la riparazione tissutale sono processi estremamente complessi e multifattoriali, per il realizzarsi dei quali è fondamentale il ruolo della genetica e delle interazioni gene-gene e gene-ambiente.

Abbiamo scelto come modello di studio le VLU, in quanto queste hanno una rilevante epidemiologia e per la loro superficialità sono facilmente accessibili (possibilità di prelevare essudati): pertanto rappresentano un modello ideale per studiare il ruolo dei più comuni polimorfismi genetici nelle lesioni di origine vascolare ed infiammatoria.

Diverse varianti genetiche (SNPs, single nucleotide polymorphism) hanno un ruolo ben definito ed importante nella etiopatogenesi, diagnosi e prognosi delle VLU, quindi, l'identificazione dei SNPs nei diversi pazienti è fondamentale per la diagnosi e la prognosi di questa patologia (1).

Noi sappiamo che almeno il 20% della popolazione è affetta da malattia venosa cronica (CVD), ma di questi, solo il 10% svilupperà VLU, che quindi rappresenta solo la *punta dell'iceberg* di un fenomeno molto più vasto. Ci siamo chiesti perché alcuni soggetti sviluppino l'ulcera ed altri no e abbiamo ipotizzato che questa predisposizione fosse geneticamente determinata. Tutti i pazienti affetti da CVD hanno un sovraccarico tissutale di ferro, che si manifesta come aree cutanee brunastre che spesso circondano ed invariabilmente precedono l'insorgenza dell'ulcera. Il sovraccarico locale di ferro, porterebbe all'insorgenza di un processo infiammatorio, caratterizzato dalla liberazione di ferro libero, che genera radicali liberi dell'ossigeno che a loro volta attivano le metalloproteasi tissutali (MMPs), che risultano iperattivate in quanto non più adeguatamente controbilanciate dai loro fisiologici inibitori tissutali (TIMPs). Le MMPs rappresenterebbero lo step finale del danno tissutale nell'infiammazione ferro-dipendente, in quanto, distruggendo i componenti della matrice tissutale (ECM) ed in particolare il collagene, portano all'insorgenza dell'ulcera. Nonostante tutti i pazienti affetti da CVD abbiano un sovraccarico tissutale di ferro locale e diffuso (la presenza di emosiderina è stata dimostrata anche nelle urine di questi pazienti), solo alcuni sviluppano la VLU. Allora abbiamo studiato i più comuni polimorfismi del gene HFE dell'emocromatosi, ovvero C282Y e H63D (che sono implicati nel metabolismo del ferro) ed abbiamo scoperto un importante esempio di interazione gene-ambiente. Infatti, i pazienti affetti da CVD e portatori della mutazione C282Y hanno un rischio di 6-7 volte maggiore di sviluppare VLU e quelli con genotipo H63D svilupperanno

anticipatamente l'ulcera, almeno 10 anni prima. Tutto ciò è dovuto ad una interazione negativa tra il sovraccarico tissutale di ferro e la ridotta capacità di amministrarlo geneticamente determinata.

Questa scoperta porta ad importanti ripercussioni cliniche, infatti, sulla base di uno screening genetico di pazienti affetti da CVD o dei loro parenti, sarà possibile stabilire a priori chi svilupperà con maggiore probabilità l'ulcera e quindi impostare per questi soggetti un programma di prevenzione, basato sulla elastocompressione, un precoce intervento chirurgico sul sistema venoso superficiale, l'eliminazione dalla dieta di elementi ricchi in ferro, ovvero la assunzione di integratori alimentari (2).

Esistono poi dei polimorfismi genetici che influenzano le dimensioni dell'ulcera. Il fattore XIII (FXIII) della coagulazione, è una transglutaminasi plasmatica che interviene in diversi processi, dalle fasi finali del processo coagulativo alla riparazione delle ferite. I suoi substrati appartengono a diverse categorie, che vanno dal sistema di coagulazione e fibrinolisi, alle molecole di adesione della ECM fino a proteine contrattili/citoscheletriche. In particolare, il FXIII interviene nella biosintesi del collagene, determinando il cross-linking dei suoi componenti fondamentali –in particolare della fibrina- e nella proliferazione dei fibroblasti; inoltre, contrasta la attività delle MMPs, che, come abbiamo detto, iperattivate distruggono i componenti della ECM. Pertanto, il FXIII è fondamentale per i processi di riparazione tissutale e infatti, livelli plasmatici ridotti di FXIII sono stati trovati nei pazienti affetti da VLU e la sua applicazione locale sulle ferite ha un effetto positivo. V34L è il principale locus funzionale del FXIII ed abbiamo dimostrato che la sua variante allelica L34 è aumentata nel genotipo di pazienti con VLU di dimensioni minori (3). Esiste poi un altro polimorfismo che influenza le dimensioni dell'ulcera ed è nel promoter del gene che codifica per la MMP12: abbiamo osservato che le dimensioni dell'ulcera sono significativamente minori nei portatori del genotipo 82GG, rispetto ai genotipi AA o AG (4). Dunque, le MMPs avrebbero un ruolo anche nel processo di riparazione -oltre che di danno- tissutale, che è un processo dinamico, che prevede continui rimodellamenti.

Abbiamo infine dimostrato, che, dopo intervento chirurgico sul sistema venoso superficiale, i pazienti portatori del polimorfismo L34 del FXIII guariscono più rapidamente, mentre il genotipo VV34 causa un ritardo nel tempo di guarigione di circa 5 volte. In questo caso il genotipo HFE-C282Y è ininfluenza, e ciò è abbastanza intuitivo, perché l'intervento chirurgico ristabilisce il normale deflusso venoso, pertanto

non c'è più sovraccarico locale di ferro –fenomeno su cui influisce la mutazione di HFE-, bensì un miglior apporto di FXIII ed altri fattori di crescita alla ECM: il FXIII favorisce la angiogenesi, la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi di collagene e pertanto è fondamentale per la riparazione e rigenerazione tissutale (5).

Riassumendo, abbiamo dimostrato che esistono polimorfismi genetici che influenzano:

1. L'insorgenza dell'ulcera (in termini di rischio assoluto di svilupparla e di sua precocità di insorgenza);
2. Le dimensioni dell'ulcera
3. La guarigione dell'ulcera dopo intervento chirurgico sul sistema venoso superficiale

Con il presente studio, invece, abbiamo voluto verificare se i singoli polimorfismi genetici influenzino anche la guarigione dell'ulcera a parità di trattamento medico, sia rispetto al tasso di guarigione dopo 12 settimane di trattamento, che sulla base del Margolis Index, MI (riduzione delle dimensioni dell'ulcera del 50% dopo 4 settimane). Pertanto, abbiamo arruolato 40 pazienti consecutivi affetti da VLU e a ciascun paziente abbiamo effettuato un prelievo di sangue periferico per la determinazione dei polimorfismi genetici di nostro interesse (HFE, FXIII, MMP12) ed abbiamo eseguito medicazioni settimanali con la medesima strategia terapeutica (medicazione avanzata ed elastocompressione) effettuata dallo stesso operatore, per di ridurre al minimo le variabili "umane" e poter quindi cogliere il reale ruolo delle varianti molecolari e genetiche.

Lo studio ha avuto una durata di 12 settimane.

Non abbiamo trovato nessuna correlazione tra varianti genetiche del FXIII e del gene HFE e la guarigione dell'ulcera o la sua riduzione di dimensioni di almeno il 50% dopo 4 settimane di trattamento. Infatti, il 62.5% dei pazienti portatori di almeno un allele 34L versus il 58% dei pazienti VV (58%) (P=ns), sono guariti dopo 12 settimane di trattamento; analogamente, il 59% dei portatori H63D e il 67% dei genotipi HH sono guariti dopo 12 settimane di trattamento (P=ns). Per il Margolis Index: il 50% dei carriers 34L era MI+, versus il 62.5% dei VV (P=ns) e il 50% dei pazienti con genotipo HD era MI+ versus il 59% dei portatori HH (P=ns).

Abbiamo invece notato delle interessanti correlazioni con i polimorfismi del promoter del gene che codifica per la metalloproteasi di matrice 12 (MMP12; -82AG).

Infatti, la presenza dell'allele -G, aumenta di 2.27 volte (OR= 2.27, CI 0.5-10.25) il rischio di non guarigione, ovvero il genotipo AA aumenta di 2.27 volte la probabilità di

guarigione. Infatti, sono guariti dopo 12 settimane di trattamento il 65% dei pazienti con genotipo AA e solo il 44% dei portatori dell'allele G.

Se guardiamo invece al Margolis Index (MI), notiamo un andamento opposto: solo il 52% degli omozigoti AA ha una riduzione di almeno il 50% dell'area dell'ulcera alla quarta settimana di trattamento, contro il 78% dei pazienti carrier l'allele -G. Questo significa che la presenza dell'allele -G aumenta di 3.28 volte la probabilità di essere MI+, ovvero il genotipo AA aumenta di 3.28 volte la probabilità di essere MI- (OR=3.28, CI 0.58-18.36).

Dunque, abbiamo dei dati apparentemente in contraddizione. Vediamo di analizzarli più dettagliatamente.

Se confrontiamo i due gruppi di pazienti, e cioè, omozigoti AA e portatori dell'allele G, notiamo che essi sono omogenei per sesso ed età, infatti, nel primo gruppo abbiamo 13 uomini (42%) e 18 donne (58%) con una età media di 75.3+/-10.6 anni, e nel secondo 4 uomini (44%) e 5 (56%) donne, con età media di 71.3+/-19.5 anni.

Se invece consideriamo le dimensioni dell'ulcera nei due gruppi, essa è 10.04+/-13.15 cm² negli omozigoti AA e 6.3+/-5.2 cm² nei carrier -G, quindi, i due gruppi non sono omogenei per le dimensioni iniziali dell'ulcera, anche se la differenza, di fatto, non è statisticamente significativa (P=0.10), ma questo è verosimilmente legato alla esigua numerosità del campione preso in esame.

Per eliminare la variabile "dimensione iniziale dell'ulcera", abbiamo costruito delle rette di regressione, che mostrano l'andamento nel tempo delle dimensioni dell'ulcera nell'intera popolazione (**Figura 2**) e nei due gruppi (**Figura 3**) indipendentemente dal valore assoluto dell'area, che è stata considerata percentualmente. Ancora, grazie a questo tipo di grafico notiamo che le ulcere dei portatori dell'allele -G, hanno una tendenza a ridursi di dimensioni più velocemente rispetto a quelle degli omozigoti AA, anche se con una significatività borderline (P=0.0517), probabilmente dovuta alla esigua numerosità dei casi.

Ricapitolando:

- Nella nostra popolazione di pazienti, l'allele -G è correlato ad ulcere di dimensioni minori;
- I -G-carrier hanno una maggiore probabilità che le dimensioni dell'ulcera si riducano di almeno il 50% dopo 4 settimane di trattamento;
- I -G-carrier presentano una maggiore velocità di riduzione di dimensioni dell'ulcera.

Tutto questo correla con quanto precedentemente dimostrato (22) rispetto alla influenza del polimorfismo del gene MMP12 sulle dimensioni dell'ulcera.

E' invece contraddittorio con quanto abbiamo detto fin'ora quanto segue:

- Gli omozigoti AA nel tempo (12 settimane) hanno una maggiore probabilità di guarigione rispetto ai carrier -G;
- Inoltre, abbiamo dimostrato che le MMPs hanno un ruolo cruciale nella distruzione dei componenti della ECM e quindi nella formazione dell'ulcera, mentre questa MMP12 avrebbe un ruolo nella guarigione dell'ulcera stessa.

Come possiamo giustificare queste contraddizioni?

Iniziamo con una premessa basilare. Le metalloproteasi di matrice, fondamentalmente sono delle collagenasi e, in particolare, la MMP 12 degrada il collagene di tipo I e II (91) ed è pure espressa dai miofibroblasti (92). Durante il processo di guarigione di una ferita, avviene un continuo e complicato rimaneggiamento della ECM, che comporta un rimodellamento del collagene ad opera, appunto delle MMPs (93).

Detto questo, riteniamo che quelle enunciate siano contraddizioni solo apparenti dovute alla complessità del processo di danno e riparazione tissutale. Infatti, se da un lato è vero che le MMPs rappresentano lo step finale del processo infiammatorio ferro-dipendente che porta alla distruzione della ECM e alla insorgenza dell'ulcera, dall'altro è pure assodato che la riparazione tissutale è un processo multifasico, dinamico e multifattoriale che prevede numerosi e successivi rimaneggiamenti dei componenti della ECM per arrivare alla guarigione. Pertanto, nulla vieta che quelle stesse MMPs che hanno causato il danno o famiglie particolari delle MMPs come la MMP12, intervengano in fasi diverse del rimodellamento tissutale che porta alla guarigione di una ferita (94).

In questa ottica, è possibile che la presenza dell'allele -G nel promoter del gene MMP12 non solo determini dimensioni minori dell'ulcera, ma intervenga pure nelle fasi iniziali della riparazione tissutale accelerando l'iniziale riduzione delle dimensioni dell'ulcera (Margolis Index), ma che non sia importante per le fasi intermedie e finali della riparazione, laddove potrebbe essere maggiormente coinvolta la variante AA, che appunto aumenta la probabilità di guarigione a 12 settimane.

Possiamo anche speculare che differenti famiglie di MMPs e -nella stessa famiglia- differenti varianti genetiche, abbiano una concentrazione diversa negli essudati delle ulcere a seconda della fase del processo di guarigione.

Quindi, le apparenti contraddizioni citate in precedenza, non sarebbero in realtà tali, ma farebbero semplicemente parte di un processo estremamente complicato, dinamico, multifasico, multifattoriale e forse in parte ancora non del tutto spiegato, quale è il processo di danno e riparazione tissutale.

Bibliografia

1. Riedel K, Riedel F, Goessler UR, et al. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair. *Int J Mol Med* 2006; 17: 183–193.
2. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117 (7 Suppl): 1e-S-32e-S.
3. Abbade LP, Lastoria S. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. *Int J Dermatol* 2005; 44: 449–456.
4. Gohel MS, Taylor M, Earnshaw JJ, et al. Risk factors for delayed healing and recurrence of chronic venous leg ulcers—an analysis of 1324 legs. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 29: 74–77.
5. Margolis DJ, Berlin JA, Strom BL. Risk factors associated with the failure of a venous ulcer to heal. *Arch Dermatol* 1999; 135: 920–926.
6. Ashworth JJ, Smyth JV, Pendleton N, et al. The dinucleotide (CA) repeat polymorphism of estrogen receptor beta but not the dinucleotide (TA) repeat polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with venous ulceration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 266–270.
7. Nagy N, Szolnoky G, Szabad G, et al. Single nucleotide polymorphisms of the fibroblast growth factor receptor 2 gene in patients with chronic venous insufficiency with leg ulcer. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1085–1088.
8. Wallace HJ, Vandongen YK, Stacey MC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism associated with increased susceptibility to venous leg ulceration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 921–925.
9. Gemmati D, Tognazzo S, Serino ML, et al. Factor XIII V34L polymorphism modulates the risk of chronic venous leg ulcer progression and extension. *Wound Repair Regen* 2004; 12: 512–517.
10. Zamboni P, Tognazzo S, Izzo M, et al. Hemochromatosis C282Y gene mutation increases the risk of venous leg ulceration. *J Vasc Surg* 2005; 42: 309–314.
11. Gemmati D, Tognazzo S, Catozzi L, et al. Influence of gene polymorphisms in ulcer healing process after superficial venous surgery. *J Vasc Surg* 2006; 44: 554–562.
12. Tognazzo S, Gemmati D, Palazzo A, et al. Prognostic role of factor XIII gene variants in non healing venous leg ulcers. *J Vasc Surg* 2006; 44: 815–819.
13. Ichinose A. Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb Haemost* 2001; 86: 57–65.

14. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII. Structure and function. *Thromb Res* 1999; 94: 271–305.
15. Vanscheidt W, Hasler K, Wokalek H, et al: Factor XIII-deficiency in the blood of venous leg ulcer patients. *Acta Derm Venereol* 1991; 71: 55–57.
16. Wozniak G, Noll T, Brunner U, et al. Topical treatment of venous ulcer with fibrin stabilizing factor: Experimental investigation of effect on vascular permeability. *Vasa* 1999; 28: 160–163.
17. Herouy Y, Hellstern MO, Vanscheidt W, et al. Factor XIII mediated inhibition of fibrinolysis and venous leg ulcers. *Lancet* 2000; 355: 1970–1971.
18. Hildenbrand T, Idzko M, Panther E, et al. Treatment of non healing leg ulcers with fibrin-stabilizing factor XIII: a case report. *Dermatol Surg* 2002; 28: 1098–1099.
19. Zelikovski A, Podlipski A, Sternberg A, et al. Changes in chemical, hematological and blood gases values in chronic venous insufficiency of the lower limbs. *Vasa* 1977; 6: 26–30.
20. Yeoh-Ellerton S, Stacey MC. Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 918–925.
21. Zamboni P, Izzo M, Tognazzo S, et al. The overlapping of local iron overload and HFE mutation in venous leg ulcer pathogenesis. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 1869–1873.
22. Gemmati D, Federici F, Catozzi L, et al. DNA-Array of gene variants in venous leg ulcers: detection of prognostic indicators. *J Vasc Surg* 2009; 50 (6): 1444–1451.
23. Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PD, et al. Chronic venous disease. *N Engl J Med* 2006; 355: 488–498.
24. Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR, et al. Chronic ulceration of the leg: extent of the problem and provision of care. *Br Med J* 1985; 290: 1855–1856.
25. Nelzen O, Bergqvist D, Lindhagen A. The prevalence of chronic lower-limb ulceration has been underestimated: results of a validated population questionnaire. *Br J Surg* 1993; 83: 255–258.
26. Eberth-Willershausen W, Marshall M. Prevalence, risk factors and complications of peripheral venous diseases in the Munich population. *Hautarzt* 1984; 35: 68–77.

27. Ruckley CV, Evans CJ, Allan PL, et al. Chronic venous insufficiency: clinical and duplex correlations. The Edinburgh Vein Study of venous disorders in the general population. *J Vasc Surg* 2002; 36: 520–525.
28. Heit JA, Rooke TW, Silverstein MD, et al. Trends in the incidence of venous stasis syndrome and venous ulcer: a 25-year population-based study. *J Vasc Surg* 2001; 33: 1022–1027.
29. Nicolaides AN. The international consensus group. The investigation of chronic venous insufficiency. A Consensus Statement. *Circulation* 2000; 102: 126–163.
30. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, et al. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J* 1988; 296: 1726–1727.
31. Zamboni P, Izzo M, Fogato L, et al. Urine haemosiderin: a novel marker to assess the severity of chronic venous disease. *J Vasc Surg* 2003; 37: 132–136.
32. Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet* 1982; 2: 243–245.
33. Joshi A, Sloan P. Role of "fibrin" cuffs in chronic non specific oral ulceration. *Wound Repair Reg* 2004; 12: 18–23.
34. Distant S. Genetic predisposition to iron overload: prevalence and phenotypic expression of hemochromatosis-associated HFE-C282Y gene mutation. *Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66: 83–100.
35. Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, et al. Penetrance of C282Y hereditary haemochromatosis mutation in USA. *Lancet* 2002; 359: 211–218.
36. McCune CA, Ravine D, Worwood M, et al. Screening for hereditary haemochromatosis within families and beyond. *Lancet* 2003; 362: 897–898.
37. Zamboni P, Scapoli G, Lanzara V, et al. Serum iron and MMP-9 variations in limbs affected by chronic venous disease and venous leg ulcers. *Dermatol Surg* 2005; 31: 644–649.
38. Wenk J, Foitzik A, Achterberg V, et al. Selective pick-up of increased iron by deferoxamine-coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase 1 and lipid peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro: a new dressing concept. *J Invest Dermatol* 2001; 116: 833–839.
39. Ackerman Z, Seidenbaum M, Loewenthal E, et al. Overload of iron in the skin of patients with varicose ulcers. Possible contributing role of iron accumulation in progression of the disease. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1376–1378.

40. Sullivan JL. Is stored iron safe? *J Lab Clin Med* 2004; 144: 280–284.
41. Wenner A, Leu HJ, Spycher MA, et al. Ultrastructural changes of capillaries in chronic venous insufficiency. *Expl Cell Biol* 1980; 48: 1–14.
42. Zamboni P. The big idea: iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. *J R Soc Med* 2006; 99: 589–593.
43. Takase S, Pascarella L, Lerond L, et al. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004; 28: 484–493.
44. Wilkinson LS, Bunker C, Edwards JC, et al. Leukocytes: their role in the etiopathogenesis of skin damage in venous disease. *J Vasc Surg* 1993; 17: 669–675.
45. Rosner K, Ross C, Karlsmark T, et al. Role of LFA-1/ICAM-1, CLA/E-selectin and VLA-4/VCAM-1 pathways in recruiting leukocytes to the various regions of the chronic leg ulcer. *Acta DermVenereol* 2001; 81: 334–339.
46. Trengove N J, Stacey M C, Macauley S, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 442–452.
47. Palolahti M, Lauharanta J, Stephens RW, et al. Proteolytic activity in leg ulcer exudate. *Exp Dermatol* 1993; 2: 29–37.
48. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 64–68.
49. Bullen EC, Longtaker MT, Updike DL, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 236–240.
50. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, et al. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1119–1124.
51. Vaalamo M, Weckroth M, Puolakkainen P, et al. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds. *Br J Dermatol* 1996; 135: 52–59.
52. Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum Pathol* 1999; 30: 795–802.

53. Saito S, Trovato MJ, You R, et al. Role of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 2001; 34: 930–938.
54. Herouy Y, Mellios P, Banderir E, et al. Inflammation in stasis dermatitis upregulates MMP-1, MMP-2 and MMP-13 expression. *J Dermat Science* 2001; 25: 198–205.
55. Drakesmith H, Sweetland E, Schimanski L, et al. The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *PNAS* 2002; 99: 15602–15607.
56. Moura E, Noordermeer MA, Verhoeven N, et al. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. *Blood* 1998; 92: 2511–2519.
57. Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G199–203.
58. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090–2093.
59. Harris IR, Yee KC, Walters CE, et al. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 1995; 4: 342–349.
60. Gurjar MV, Deleon J, Sharma RV, et al. Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H2568–2574.
61. Duckert F, Jung E, Shmerling DH. A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. *Thromb Diath Haemorrh* 1960; 5: 179–186.
62. Haanen C. Importance of factor XIII for hemostasis and wound healing *Ned Tijdschr Geneesk* 1972; 116: 448–454.
63. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJM. Human factor XIII: Fibrin-stabilizing factor. *Progr Haemost Thromb* 1980; 5: 245–290.
64. Miloszewski KJA, Losowsky MS. Fibrin stabilization and factor XIII deficiency. In: Francis JL, Fibrinogen, Fibrin Stabilisation and Fibrinolysis. Chichester Ellis Horwood 1988; 175–202.
65. Peschen M, Thimm C, Weyl A, et al. Possible role of coagulation factor XIII in the pathogenesis of venous leg ulcers. *Vasa* 1998; 27: 89–93.

66. Paye M, Nusgens BV, Lapiere CM. Factor XIII of blood coagulation modulates collagen biosynthesis by fibroblasts in vitro. *Haemostasis* 1989; 19: 274–283.
67. Keski-Oja J, Mosher DF, Vaehri A. Cross-linking of a major fibroblast surface-associated glycoprotein (fibronectin) catalyzed by blood coagulation factor XIII. *Cell* 1976; 9: 29–35.
68. Barry EL, Mosher DF. Factor XIII cross-linking of fibronectin at cellular matrix assembly sites. *J Biol Chem* 1988; 263: 10464–10469.
69. Barry EL, Mosher DF. Factor XIIIa-mediated crosslinking of fibronectin in fibroblast cell layers. Crosslinking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments. *J Biol Chem* 1989; 264: 4179–4185.
70. Sane DC, Moser TL, Phippen AM, et al. Vitronectin is a substrate for transglutaminases. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 115–120.
71. Ueyama M, Urayama T. The role of factor XIII in fibroblast proliferation. *Jpn J Exp Med* 1978; 48: 135–142.
72. Bruhn HD, Pohl J. Growth regulation of fibroblasts by thrombin, factor XIII and fibronectin. *Klin Wochenschr* 1981; 59: 145–146.
73. Brown LF, Lanir N, McDonagh J, et al. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* 1993; 142: 273–283.
74. Zamboni P, De Mattei M, Ongaro A, et al. Factor XIII contrasts the effects of metalloproteinases in human dermal fibroblast cultured cells. *Vasc Endovascular Surg* 2004; 38: 431–438.
75. Herouy Y, May AE, Pornschelegel G, et al. Lipodermatosclerosis is characterized by elevated expression and activation of matrix metalloproteinases: Implications for venous ulcer formation. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 822–827.
76. Norgauer J, Mockenhaupt M, Herouy Y. Blood coagulation factor XIII and wound healing in leg ulcers. *Biochem Prog* 2001; 14: 67–70.
77. Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, et al. Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood* 1999; 93: 897–905.
78. De Lange M, Andrew T, Snieder H, et al. Joint linkage and association of six single-nucleotide polymorphisms in the factor XIII-A subunit gene point to V34L as the main functional locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1914–1919.

79. Stacey MC, Burnand KG, Layer GT, Pattison M, Browse NL. Measurement of the healing of venous ulcers. *Aust N Z J Surg* 1991; 61: 844–848.
80. Dardik R, Solomon A, Loscalzo J, et al. Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1472–1477.
81. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A. Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost* 2006; 1: 19–25.
82. Nahrendorf M, Hu K, Frantz S, et al. Factor XIII deficiency causes cardiac rupture, impairs wound healing, and aggravates cardiac remodeling in mice with myocardial infarction. *Circulation* 2006; 113: 1196–1202.
83. Dardik R et al. Evaluation of the pro-angiogenic effect of factor XIII in heterotopic mouse heart allografts and FXIII-deficient mice. *Thromb Haemost* 2006; 95: 546–550.
84. Gemmati D, Federici F, Campo G, et al. Factor XIII A-V34L and factor XIII B-H95R gene variants: effects on survival in myocardial infarction patients. *Mol Med* 2007; 13: 112-120.
85. Alpert PT. New and emerging theories of cardiovascular disease: infection and elevated iron. *Biol Res Nurs* 2004; 6: 3–10.
86. Kervinen H, Tenkanen L, Palosuo T, et al. Serum iron, infection and inflammation; effects on coronary risk. *Scand Cardiovasc J* 2004; 38: 345–348.
87. Levine SM, Chakrabarty A. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1012: 252–266.
88. Zamboni P, Gemmati D. Clinical implications of gene polymorphism in venous leg ulcers: a model in tissue injury and reparative process. *Thromb Haemost* 2007; 98: 131-137.
89. Ferrari M, Cremonesi L, Bovini P, et al. Single-nucleotide polymorphism and mutation identification by the nanogen microelectronic chip technology. *Methods Mol Med* 2005; 114: 93-106.
90. Sosnowski R, Helle MJ, Tu E, et al. Active microelectronic array system for DNA hybridization, genotyping and pharmacogenomic applications. *Psychiatr Genet* 2002; 12: 181-192.
91. Taddese S, Jung MC, Ihling C et al. MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III.

- 92.** Iwanami H, Ishizaki M, Fukuda Y et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP)-12 by myofibroblasts during alkali-burned corneal wound healing. *Curr Eye Res* 2009; 34: 207-214.
- 93.** Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc* 2002; 92: 12-18.
- 94.** Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S et al. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *Br J Surg* 2008; 95: 319-325.

Indice

Introduzione	Pag. 1
Materiali e Metodi	Pag. 10
Risultati	Pag. 14
Discussione	Pag. 19
Bibliografia	Pag. 25