

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Medicina

Scuola di Dottorato in Scienze della Vita e della Salute

Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche Cliniche e Sperimentali

Ciclo 25/ Anno 2010

“Walking through atherosclerosis”

Il training fisico intensivo nel paziente claudicante: effetti a breve e a lungo termine di due diversi protocolli su autonomia di marcia, performance emodinamica, funziona piastrinica e stress ossidativo.

SSD Med/09

Coordinatore Prof. Enzo Bonora

Tutor Prof. Enrico Arosio

Dottoranda Dott.ssa Sara Zecchetto

Sommario

Introduzione	pag. 3
Background	5
<i>Razionale dello studio</i>	5
<i>Obiettivi dello studio</i>	9
Metodi	11
<i>Descrizione dello studio e criteri di eleggibilità dei pazienti</i>	11
<i>Metodo di sviluppo dello studio</i>	13
<i>End-points, definizione della numerosità del campione</i>	15
Materiali	18
<i>Esami laboratoristici</i>	18
<i>Esami strumentali</i>	20
Risultati	22
<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	22
<i>Risultati al termine del 1° ciclo riabilitativo</i>	23
<i>Risultati al termine del follow-up</i>	31
Discussione	36
Conclusioni	43
Bibliografia	44

INTRODUZIONE

Il training fisico controllato costituisce un trattamento ormai validato dell'arteriopatia obliterante degli arti inferiori, determinando per il paziente un miglioramento sia clinico che prognostico. Il training fisico agisce attraverso vari meccanismi, ancora non completamente chiariti, e nonostante la sua comprovata efficacia non ha ancora criteri di prescrizione ben definiti.

In corso di training si instaurano meccanismi di compenso che coinvolgono diversi sistemi, che vengono stimolati e potenziati dall'allenamento; l'esercizio più efficace è quello aerobico supervisionato, ma non è stato ancora chiarito quale possa essere la periodicità che garantisce i maggiori risultati sia in termini di miglioramento della qualità di vita che di contrasto della progressione di malattia.¹⁻³

Lo studio si è articolato come trial clinico parallelo in aperto a due braccia (rapporto 1:1) con 26 mesi di follow-up: abbiamo arruolato pazienti affetti da arteriopatia obliterante al II stadio secondo la classificazione di Leriche-Fontaine, afferenti al nostro Day Hospital, che hanno eseguito un ciclo di training con misurazione prima e dopo il ciclo di capacità di marcia (tramite Treadmill test), indici di flogosi e stress ossidativo (HsPCR, Malondialdeide), attivazione piastrinica (PFA-100; espressione sulla superficie piastrinica di GpIIb/IIIa attivato, P-selectina), e parametri emodinamici come la portata dell'arteria femorale e la performance cardiaca.

I pazienti sono stati poi consecutivamente assegnati a due gruppi: uno ha eseguito un ciclo di training fisico controllato ogni 4 mesi (totale 6 cicli riabilitativi in 20 mesi, incluso il primo ciclo); l'altro un ciclo ogni 10 mesi (3 cicli riabilitativi in 20 mesi, incluso il primo ciclo). A 6 mesi dal termine dell'ultimo ciclo riabilitativo, in entrambi i gruppi, sono stati misurati nuovamente la capacità di marcia, la funzione piastrinica, lo stress ossidativo, e i parametri emodinamici valutati all'arruolamento.

L'*obiettivo primario* è stata la valutazione dell'efficacia di un protocollo di training più intenso rispetto ad uno meno impegnativo per numero di cicli/anno nel migliorare la massima capacità di marcia del paziente a 26 mesi dall'arruolamento (a sei mesi

dall'ultimo ciclo), in modo da definire la frequenza/anno migliore dei cicli di training tale da ottenere i migliori risultati dal punto di vista clinico, strumentale e laboratoristico; ci siamo poi riproposti di esaminare come il training modifichi parametri fondamentali nella determinazione e progressione dell'arteriopatia aterosclerotica quali: parametri emodinamici , funzione piastrinica, stress ossidativo e flogosi.

1. BACKGROUND

1.1 *Razionale dello studio*

L'arteriopatia periferica (PAD) è una patologia cronica caratterizzata dalla progressiva stenosi di uno o più vasi arteriosi degli arti inferiori, comportando non solo importanti limitazioni funzionali ma anche un notevole incremento del rischio cardiovascolare. Questa patologia diviene così un onere notevole, sia per il paziente, sia per il Sistema Sanitario Nazionale. Le lesioni aterosclerotiche a carico dei vasi arteriosi degli arti inferiori si sviluppano e progrediscono, analogamente a quanto accade in altri distretti, determinando progressive stenosi e occlusione del lume del vaso, provocando ischemia cronica a carico dei tessuti a valle della stenosi.

Nelle prime fasi della patologia le placche aterosclerotiche crescono di solito lentamente e in modo insidioso, determinando solo una lieve sintomatologia. Successivamente le lesioni provocano limitazione funzionale, nota come claudicatio intermittens (IC), che influenza negativamente la qualità di vita spesso in modo pesante. Negli stadi avanzati, l'ischemia cronica può evolvere nella necrosi dei tessuti, che spesso determina il ricorso all'amputazione maggiore.

Dal momento che arteriopatia periferica, coronaropatia e cerebrovasculopatia sono tutte manifestazioni di patologia aterosclerotica, non stupisce il fatto che queste tre condizioni spesso coesistano nello stesso paziente. I pazienti con arteriopatia periferica hanno più fattori di rischio cardiovascolare e un quadro aterosclerotico esteso, che li rende una popolazione ad elevato rischio cardiovascolare, simile ai pazienti con coronaropatia evidente. I soggetti con arteriopatia periferica infatti hanno un'incidenza del 2-3% di infarto miocardico non fatale e il loro rischio di angina è due-tre volte superiore rispetto ai controlli sani pareggiati per età. Inoltre l'incremento del rischio di eventi cardiovascolari è correlato con la severità dell'arteriopatia periferica.^{1,6,7,8}

I pazienti affetti da PAD hanno morbilità e mortalità per qualsiasi causa a 5, 10 e 15 anni rispettivamente del 30%, 50% e 70%. Inoltre l'arteriopatia periferica può essere

considerata un marker che identifica pazienti ad alto rischio e allo stesso tempo un indicatore di accelerazione e peggioramento della malattia aterosclerotica. L'estensione delle placche agli arti inferiori infatti amplifica il processo di flogosi e la disfunzione endoteliale, promuovendo un progressivo danno nei distretti coronarico e carotideo^{3,8}. L'arteriopatia periferica è associata infatti ad un incremento degli indici di flogosi. Elevati livelli di markers di infiammazione (IL-6, D-dimero, PCR, sICAM e sVCAM) sono associati con una performance motoria di più basso livello in pazienti con PAD, indipendente dai confounders, incluso l'Ankle Brachial Index (ABI).^{9,10}

La maggior parte dei pazienti con arteriopatia periferica ha una pesante limitazione della performance motoria e della capacità di marcia. La stenosi/occlusione dei vasi arteriosi degli arti inferiori determina un mismatch tra la richiesta muscolare di ossigeno e l'effettiva disponibilità dello stesso, quadro alla base della claudicatio intermittens (IC). La claudicatio è in effetti il sintomo più frequente dell'arteriopatia periferica, ed è definibile come sintomatologia dolorosa o crampiforme ai muscoli della coscia o del polpaccio scatenato dalla deambulazione e alleviato dal riposo. Questo determina un'importante compromissione della performance fisica dei pazienti e della loro qualità di vita. Inoltre la limitazione alla deambulazione induce ad uno stile di vita sedentario, che è associato ad un incremento dell'incidenza di eventi cardiovascolari e ad un conseguente aumento dei costi.^{3,8}

E' dimostrato che l'esercizio fisico controllato determina un miglioramento del l'IML (Intervallo di Marcia Assoluto: massima distanza percorsa in presenza di dolore all'arto), con un basso rischio inoltre di progressione di malattia e ricorso all'amputazione. L'efficacia del training fisico controllato e della terapia medica e la carenza di evidenze che supportino una maggior efficacia della terapia chirurgica nel prevenire l'amputazione, hanno fornito un forte supporto all'applicazione della terapia medica come trattamento di prima linea nei pazienti con IC. Inoltre il trattamento "anatomico" da solo non dà lo stesso beneficio fornito dalla terapia sistemica (training fisico e terapia medica).⁴

In letteratura infatti, sono ampiamente dimostrati, in pazienti con IC, gli effetti positivi di un programma di training fisico controllato nel migliorare la performance motoria (in particolare la capacità di marcia) e la funzione endoteliale.

L'effetto positivo del training fisico sull'arteriopatia periferica coinvolge vari meccanismi, strettamente correlati tra loro, che interessano la funzione endoteliale, l'attivazione piastrinica, lo stato flogistico e lo stress ossidativo.^{3,11,12} Poiché la funzione piastrinica gioca un ruolo fondamentale nella progressione della placca aterosclerotica anche nell'arteriopatia periferica e nello sviluppo degli eventi cardiovascolari acuti, sarebbe interessante studiare l'attivazione piastrinica e i suoi cambiamenti in risposta al training fisico nell'arteriopatia periferica. Il training fisico induce in effetti, in pazienti affetti da malattia aterosclerotica, anche modifiche della funzione piastrinica.

Molti dati in letteratura supportano l'ipotesi che l'esercizio strenuo o massimale (condotto fino alla soglia anaerobica) sia associato a un aumento della conta piastrinica con iperattivazione e iperaggregabilità piastriniche. Questa transitoria risposta pro-trombotica è ridotta in soggetti che svolgono una moderata e regolare attività fisica, attraverso un miglioramento dello shear stress e una riduzione di attivazione e aggregabilità piastriniche. Questi risultati sono meno supportati da evidenze nei soggetti arteriopatici periferici, che hanno di base un incremento dell'attivazione piastrinica, direttamente correlato con la severità e l'estensione di malattia. L'esercizio fisico moderato, regolare, potrebbe esercitare effetti favorevoli sull'attivazione piastrinica riducendo l'adesione piastrinica e l'espressione sulla superficie piastrinica di GpIIb/IIIa attivato. L'esercizio prolungato fino all'ischemia dell'arto incrementa i livelli sierici di P-selectina e delle molecole di adesione ICAM-1 and VCAM, e l'espressione di GPIIb/IIIa attivato, di fattore Willebrand e P-selectina sulla superficie piastrinica, ma questi dati non sono ampiamente confermati. La discrepanza di risultati riguardo la risposta piastrinica all'esercizio fisico può essere attribuita alla differenza di intensità e durata dei protocolli di training proposti, e alle diverse metodologie utilizzate per lo studio della funzione piastrinica.^{13,19}

L'esercizio fisico modificherebbe anche la concentrazione di precursori circolanti delle cellule endoteliali (EPC): questo dato è stato rilevato, in particolare, in pazienti affetti da cardiopatia ischemica post-infartuale, nei quali il training fisico provoca un aumento delle EPC, correlate con la vasculogenesi e il miglioramento della perfusione.

Sarebbe interessante valutare la stessa risposta nel paziente arteriopatico periferico anche dopo training fisico condotto fino al dolore ischemico, essendo il deficit di ossigenazione uno stimolo importante alla produzione di fattori di crescita per le cellule endoteliali.^{19,22}

Riguardo alla performance cardiaca, in aggiunta, è dimostrato nel cardiopatico ischemico che l'esercizio fisico provoca un miglioramento della stessa, ma pochi dati sono presenti in letteratura riguardo al paziente arteriopatico periferico. L'esercizio aerobico soprattutto se prolungato arresta il rimodellamento del ventricolo sinistro in pazienti affetti da insufficienza cardiaca stabile, migliorando inoltre la frazione di eiezione e riducendo il diametro telediastolico e il volume telediastolico del ventricolo sinistro, con, parallelamente, riduzione dei livelli di NTproBNP, un prodotto di clivaggio dell'ormone BNP (uno degli ormoni natriuretici atriali secreti dalle cellule miocardiche in risposta allo stretch di parete), segnalato in letteratura non solo come marker di insufficienza cardiaca, ma anche di prognosi. Alcuni lavori in letteratura mettono in relazione l'incremento di NTproBNP con un aumento di incidenza di patologie cardiovascolari e di mortalità anche in pazienti arteriopatici; tali pazienti mostrerebbero inoltre valori di NTproBNP tendenzialmente elevati.^{2,23,24}

Il training fisico ha inoltre un comprovato effetto positivo sull'assetto glicolipidico e sulla performance motoria; nonostante questo in letteratura non vengono forniti criteri univoci di prescrizione dei cicli riabilitativi in termini di durata, intensità e frequenza dei cicli stessi. Di conseguenza la prescrizione dipende spesso dal grado di conoscenza di questo tipo di approccio terapeutico da parte del curante, e dalla disponibilità di strutture specializzate; in Italia pochi centri possono offrire un'appropriateo counselling. Nella maggior parte dei trial in letteratura i pazienti con arteriopatia periferica vengono trattati con protocolli di training di 12 settimane con 3 sedute settimanali di 3 ore:

questo implica da un lato maggiori costi data la lunga durata del ciclo riabilitativo dall'altro una minor compliance. ^{1,25-27}

Data la cronicità della patologia spesso caratterizzata da un andamento progressivo, i pazienti affetti da arteriopatia obliterante periferica sono soggetti che necessitano di essere seguiti per lungo tempo, spesso per tutta la vita a partire dalla diagnosi di malattia, eseguendo periodicamente con regolarità dei cicli di training fisico controllato. Emerge dunque la necessità di:

-accrescere le nostre conoscenze riguardo agli effetti del training fisico nell'arteriopatia periferica;

-definire con chiarezza le indicazioni e le modalità di prescrizione di un approccio terapeutico quale quello del training fisico, che mostra notevole efficacia nel paziente con arteriopatia periferica, testando anche cicli intensivi quali quelli proposti presso la nostra Struttura.

1.2 *Obiettivi dello studio*

Sulla base di queste premesse ci siamo proposti di testare nei pazienti arteriopatici periferici afferenti al nostro Day Hospital, l'effetto del ciclo riabilitativo intensivo proposto presso la nostra struttura in termini di modifica di:

- intervallo di marcia assoluto e libero da dolore;
- grado di attivazione piastrinica; stress ossidativo; stato flogistico; numero di precursori circolanti delle cellule endoteliali;
- performance emodinamica cardiaca e periferica;
- Ankle Brachial Index;
- assetto glicolipidico e pressorio.

I pazienti arruolati sono stati consecutivamente assegnati a due gruppi destinati a protocolli di training di diversa intensità per numero di cicli/anno allo scopo di valutare

l'efficacia di un protocollo di training più intenso rispetto ad uno meno impegnativo per numero di cicli/anno nel migliorare la massima capacità di marcia del paziente.

2. METODI

2.1 *Descrizione dello studio e criteri di eleggibilità dei pazienti*

Il protocollo di studio si è articolato in un trial clinico longitudinale parallelo a due braccia in aperto, con periodo di follow-up di 26 mesi.

I criteri di inclusione sono:

- diagnosi clinica di claudicatio intermittens (II stadio secondo la classificazione di Leriche Fontaine) tramite anamnesi e visita con misurazione dell'Ankle Brachial Index e conferma diagnostica di presenza di arteriopatia periferica tramite Eco-Color-Doppler arti inferiori;
- età compresa tra 40 e 75 anni;
- ABI tra 0.4 e 0.9 all'arto sintomatico;
- controllo ottimale di ipertensione arteriosa, diabete (Hb glicata inferiore o uguale a 7%), dislipidemia se presenti.

I criteri di esclusione sono:

- microangiopatia diabetica avanzata con neuropatia periferica;
- infarto miocardico acuto/stroke nei 6 mesi precedenti l'arruolamento;
- intervento di rivascolarizzazione agli arti inferiori nei 6 mesi precedenti l'arruolamento;
- angina instabile/stabile;
- disfunzione cardiaca (frazione di eiezione <45%);
- insufficienza renale (creatinina >1.5 mg/dL);
- patologia respiratoria che riduca la performance fisica e la tolleranza allo sforzo;
- controindicazioni allo svolgimento di attività fisica (ad esempio patologia ortopedica/neurologica);
- neoplasia in fase attiva; depressione severa.

Tutti i pazienti arruolati sono stati ricoverati in regime di Day Hospital (DH), dopo una visita ambulatoriale iniziale. I soggetti affetti da arteriopatia obliterante che afferiscono ai nostri ambulatori vengono tutti indirizzati se non vi sono controindicazioni ad eseguire cicli riabilitativi in regime di DH presso la nostra Struttura: il ricovero in regime di DH rimane aperto per tutta la durata del ciclo riabilitativo, registrando quotidianamente gli accessi e le attività svolte dal paziente.

Ad ogni ciclo riabilitativo è associata:

- Visita medica con misurazione della pressione arteriosa periferica e dell'Ankle Brachial Index (ABI)
- Elettrocardiogramma (ECG)
- Treadmill test a inizio e fine ciclo riabilitativo

Il Treadmill test è una metodica di diagnosi e quantificazione della claudicatio intermittens nel paziente arteriopatico validata in ambito internazionale (TASCII). Viene somministrata abitualmente ai nostri pazienti all'inizio e al termine di ogni ciclo riabilitativo: si tratta di una camminata su tapis roulant che viene condotta fino alla comparsa del dolore ischemico all'arto (IML: Intervallo di Marcia Libero da dolore) e protratta fino al massimo dolore tollerato (IMA: Intervallo di Marcia Assoluto), registrando la distanza in metri percorsa, il tempo impiegato, localizzazione e tipologia del dolore muscolare, tempi e modalità di scomparsa dello stesso.

Ad ogni paziente che inizia per la prima volta un ciclo riabilitativo viene somministrato un pre-test su tapis roulant, per permettere al paziente di familiarizzare con la pedana mobile.

Il ciclo riabilitativo somministrato di norma presso la nostra Struttura ha una durata di 15 giorni, con sedute quotidiane di tre ore comprendenti:

- 30 minuti di esercizi aerobici volti a stimolare la propriocezione e la muscolatura respiratoria;
- camminata su pedana mobile (con pendenza e velocità corrispondenti al test diagnostico) per 50-60 minuti - alla comparsa del dolore ischemico il paziente

sospende l'esercizio fino alla scomparsa della sintomatologia per poi riprendere nuovamente la camminata;

- 20 minuti di cyclette libera senza resistenza.

2.2 Metodo di sviluppo dello studio

I pazienti considerati eleggibili hanno eseguito il ciclo riabilitativo intensivo somministrato routinariamente presso la nostra struttura (precedentemente descritto).

All'inizio del 1° ciclo riabilitativo i pazienti hanno eseguito:

- Elettrocardiogramma
- Misurazione dell'ABI
- Misurazione della pressione arteriosa tramite apparecchio oscillometrico
- EcocolorDoppler dei tronchi sovraortici
- Prelievo di sangue venoso periferico a riposo per dosaggio di colesterolo totale e frazionato, trigliceridi, HsPCR, creatinina, Hb glicata, emocromo con formula leucocitaria, dosaggio precursori delle cellule endoteliali
- Pre-test su tapis roulant, allo scopo di permettere al paziente di familiarizzare con la pedana mobile e di valutarne la capacità di camminare alla velocità e alla pendenza raccomandate per il test diagnostico (velocità 3,2 Km/h, pendenza 10%).
- Treadmill test per misurazione dell'intervallo di marcia libero da dolore e assoluto, con esecuzione appena all'inizio e al termine del test di:
 - Misurazione del volume di flusso all'arteria femorale comune, bilateralmente, tramite EcocolorDoppler
 - Misura di diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro con calcolo frazione di eiezione, tramite ecocardiogramma.
 - Prelievo per dosaggio di malondialdeide, PFA-100, NTproBNP, espressione sulla superficie piastrinica di GpIIbIIIa attivato e P-Selectina.

Al termine del 1° ciclo di training è stato ripetuto prelievo da sangue venoso periferico per dosaggio a riposo di colesterolo totale e frazionato, trigliceridi, HsPCR, creatinina, Hb glicata, precursori delle cellule endoteliali. E' stato inoltre ripetuto al termine del ciclo riabilitativo Treadmill test con, prima e dopo il test:

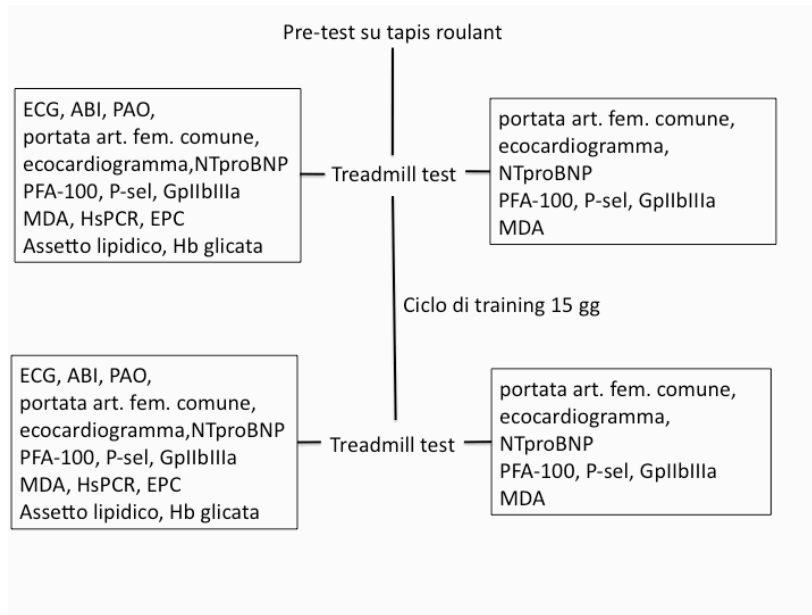
- misurazione del volume di flusso all'arteria femorale comune, bilateralmente, tramite EcocolorDoppler; diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro con calcolo frazione di eiezione, tramite ecocardiogramma;
- prelievo per dosaggio di malondialdeide, PFA-100, NTproBNP, espressione sulla superficie piastrinica di GpIIbIIIa attivato e P-Selectina.

I pazienti sono stati poi assegnati consecutivamente a due gruppi: un gruppo ha eseguito un ciclo riabilitativo ogni 4 mesi per un totale di 6 cicli riabilitativi in 20 mesi (incluso il primo ciclo), l'altro gruppo un ciclo riabilitativo ogni 10 mesi per un totale di 3 cicli riabilitativi in 20 mesi (incluso il primo ciclo).

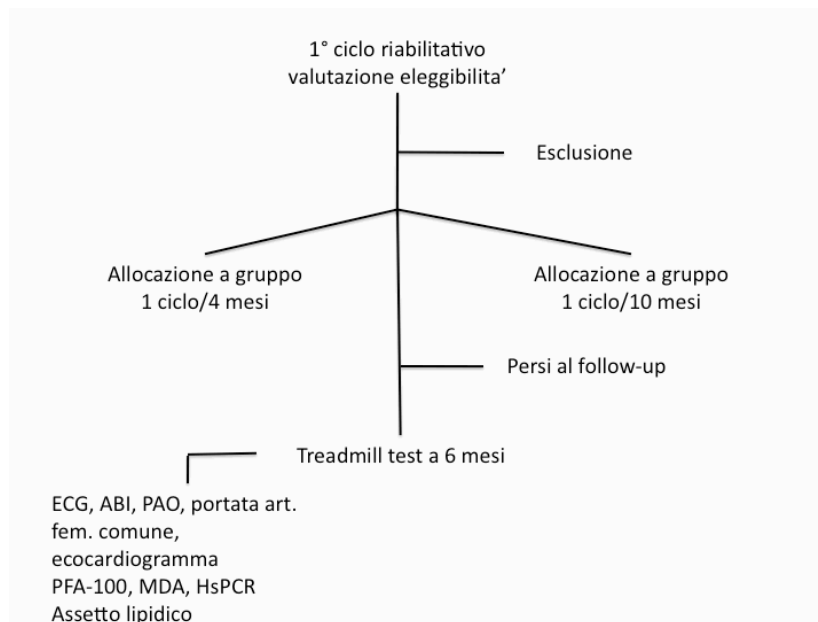
Ogni ciclo riabilitativo somministrato successivamente al 1° prevede l'esecuzione di:

- ECG
- Misurazione ABI
- Misurazione pressione arteriosa
- Treadmill test inizio e fine ciclo.

A 6 mesi dal termine dell'ultimo ciclo riabilitativo i pazienti arruolati hanno eseguito Treadmill test con associati, a riposo, misurazione ABI e PAO, ECG e prelievo per dosaggio di colesterolo totale e frazionato, trigliceridi, HsPCR, PFA-100, malondialdeide, misurazione del volume di flusso all'arteria femorale comune e misurazione di diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro con calcolo frazione di eiezione (Flow-chart 1 e 2).



Flow-chart 1: flow-chart 1° ciclo di training, con esami eseguiti prima e dopo Treadmill test.



Flow-chart 2: flow-chart dello studio

2.3 End-points, definizione della numerosità del campione

L'end-point primario è costituito dalla massima capacità di marcia (misurata in metri) nei due gruppi rilevata a 26 mesi.

Gli end-points secondari sono:

- massima capacità di marcia (misurata in metri) al termine del primo ciclo riabilitativo.
- Intervallo di marcia libero da dolore al termine del primo ciclo riabilitativo e al termine del follow-up
- ABI al termine del follow up
- volume di flusso delle arterie femorali comuni bilateralmente a riposo e dopo Treadmill test a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine del follow up
- diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro e frazione di eiezione del ventricolo sinistro a riposo e dopo Treadmill test a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine del follow up
- grado di attivazione piastrinica e di stress ossidativo a riposo e dopo Treadmill test a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine del follow up
- pressione arteriosa (misurata in mmHg) a riposo a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine del follow up
- concentrazione ematica di HsPCR, e concentrazione ematica di colesterolo totale, colesterolo HDL, colesterolo LDL e trigliceridi a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine del follow up.

Da trials precedenti è stato ottenuto in pazienti arteriopatici sottoposti a ciclo di training fisico controllato un incremento medio della massima capacità di marcia di 100 metri con deviazione standard di 66 metri. Considerando come clinicamente significativa una differenza di 80 metri di massima capacità di marcia tra i due gruppi, è necessario reclutare 15 soggetti per braccio per avere una potenza del 90% con livello di significatività a $p < 0.05$, con deviazione standard 66 metri.

In trial precedenti l'intervallo di marcia assoluto ha mostrato una distribuzione normale, motivo per il quale è stato utilizzato per l'analisi il test t di Student per campioni indipendenti.

Per gli end points secondari, che presentano una distribuzione per lo più non normale, abbiamo utilizzato il test di Wilcoxon per le variabili quantitative. Le indagini sugli end points secondari hanno un carattere esplorativo.

I dati sono riportati come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ e mediana.

3. MATERIALI

3.1 *Esami laboratoristici*

Per quanto riguarda gli esami laboratoristici, profilo glicometabolico (colesterolo totale e frazionato, trigliceridi, Hb glicata) e HsPCR sono esami eseguiti di routine presso l' UOC di Laboratorio Analisi dU - Sede di Borgo Roma.

Prelievo ematico I prelievi di sangue venoso periferico sono stati effettuati sia a riposo, pre-Treadmill a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo e al termine de follow-up, sia entro 5 minuti dalla fine del Treadmill (solo a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo). I prelievi sono stati ottenuti con minima occlusione venosa, e sono stati raccolti in provette contenenti trisodio citrato 0,106M per lo studio della funzione piastrinica, dopo aver eliminato i primi 2 mL di campione per minimizzare la formazione di aggregati piastrinici. Il campione, conservato a temperatura ambiente, è stato analizzato entro 1 ora per lo studio della funzione piastrinica; un'aliquota è stata raccolta entro 10 minuti per l'analisi con citometria di flusso. Per il dosaggio della malondialdeide il campione è stato raccolto in provette contenenti EDTA e immediatamente stoccato a bassa temperatura (-20°C).

3.1.1 Funzione piastrinica

L'attivazione piastrinica è stata testata attraverso un sistema di analisi della funzione piastrinica denominato PFA-100 (Dade Behring, Milano, Italia), in cui il processo di emostasi primaria (adesione e aggregazione piastriniche da danno endoteliale) è simulato ex vivo. I dettagli di questa metodologia sono già descritti in letteratura.⁵²

Un campione di sangue intero anticoagulato viene raccolto in una cartuccia monouso standardizzata e successivamente aspirato in modo da non attivare il meccanismo di shear stress in un anello rivestito con collagene e ADP o epinefrina. Le piastrine fluendo

all'interno dell'anello vengono attivate e aderiscono l'una all'altra formando aggregati che riducono il flusso sanguigno fino ad arrestarlo. Il tempo impiegato a occludere l'anello (closure time, in secondi), è preso a indicatore dell'attivazione piastrinica (adesione e aggregabilità), corrispondendo un minor tempo di chiusura a una maggiore attivazione piastrinica. Misure ripetute di closure time effettuate in modo randomizzato presso la nostra struttura hanno mostrato una differenza media del 5,5% in accordo con recenti trials presenti in letteratura.²⁹⁻³²

Per determinare l'espressione sulla superficie piastrinica di Gp IIb/IIIa attivato è stata effettuata a temperatura ambiente una diluizione del campione con un tampone fosfato, successivamente 40 ml di campione sono state incubati con 10 ml di CD62P per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. E' stata poi eseguita la citometria a flusso, dopo l'aggiunta di tampone fosfato.

Per determinare l'espressione sulla superficie piastrinica di P-selectina è stata effettuata a temperatura ambiente una diluizione del campione con un tampone fosfato, successivamente 30µl di campione sono stati incubati con 20µl di PAC-1 per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. E' stata poi eseguita la citometria a flusso, dopo l'aggiunta di tampone fosfato. La fluorescenza ottenuta da 10000 eventi (che rappresentavano le piastrine) è stata determinata utilizzando un citometro di flusso come descritto in precedenza (Becton Dickinson)^{50,51}. I campioni ottenuti a riposo sono stati utilizzati per correggere il risultato rispetto alla fluorescenza di fondo. Nei campioni prelevati al termine del Treadmill test (dolore ischemico), l'incremento di fluorescenza da anti-CD62P e PAC-1 rispetto ai campioni piastrinici a riposo è stata espressa come percentuale del totale delle piastrine.

3.1.2 Malondialdeide

La concentrazione di Malondialdeide è stata misurata utilizzando la cromatografia liquida ad alta performance (HPLC) su colonna a fase inversa con rilevatore spettrofluorimetrico, dopo deproteinizzazione e reazione con acido tiobarbiturico.^{33,53,54}

3.1.3 NTproBNP

Il dosaggio di NTproBNP è stato effettuato utilizzando la metodica sandwich tramite incubazione del campione (15 µL), un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-NT-proBNP e un anticorpo monoclonale specifico anti-NT-proBNP marcato con un complesso di rutenio e microparticelle rivestite di streptavidina (Roche Diagnostics), come precedentemente descritto.^{34,55}

3.1.4 Precursori delle cellule endoteliali

Il dosaggio dei precursori delle cellule endoteliali è stato effettuato tramite citometria di flusso a inizio e fine del 1° ciclo riabilitativo, utilizzando anticorpi anti KDR e anticorpi anti CD34.³⁵

3.2 *Esami strumentali*

3.2.1 Ankle-Brachial Index

L'Ankle-Brachial Index è calcolato come rapporto tra la pressione arteriosa alla caviglia e la pressione arteriosa sistolica sull'arteria brachiale, mediante metodica ultrasonografica Doppler. Il bracciale dello sfigmomanometro viene posizionato a livello della caviglia e insufflato fino alla scomparsa del segnale Doppler dell'arteria tibiale posteriore omolaterale, quindi il bracciale viene sgonfiato e registrata la pressione arteriosa alla quale ricompare il segnale Doppler sull'arteria tibiale posteriore. La stessa procedura viene effettuata a livello dell'arteria brachiale.

3.2.2 Parametri cardiaci

La misurazione del diametro telediastolico e del volume telediastolico del ventricolo sinistro viene effettuato tramite ecocardiogramma (in configurazione M-mode per il diametro telediastolico del ventricolo sinistro); l'ecografo restituisce la stima della frazione di eiezione dopo aver misurato volume telediastolico e telesistolico del ventricolo sinistro.

3.2.3 Portata dell'arteria femorale

La misurazione del volume di flusso all'arteria femorale comune viene effettuato misurato, bilateralmente, ad un 1 cm dalla biforcazione, utilizzando una sonda eco-color-Doppler; il software misura automaticamente il volume di flusso sulla base della velocità media e del diametro del vaso, tracciato dall'operatore.

L'apparecchiatura a disposizione presso la Nostra Divisione include:

- Color Doppler Ultrasound GE Healthcare, model Vivid 7 Pro, con sonde 10L, M4S, 4C, che utilizziamo per effettuare esami ecocolor Doppler cardiaci, dei vasi degli arti inferiori e dei tronchi sovraortici.
- Color Doppler Ultrasound Acuson, Sequoia 512 (Imagegate), con sonde 3V2c, 8L5, 15L8w, che utilizziamo per effettuare esami ecocolor Doppler dei vasi degli arti inferiori e dei tronchi sovraortici.
- Doppler Basic S, Basicare 120032, che utilizziamo per misurare l'ABI.
- Apparecchiatura per la misurazione della pressione arteriosa dell 24 ore - Spacelab - e relativo software per l'analisi dei dati.
- Treadmill Ram Technogym 770 CE, per effettuare Treadmill test e training.
- Cyclette Technogym Bikerace HC 600, per effettuare il programma riabilitativo.

4. RISULTATI

4.1 *Caratteristiche dei pazienti*

Da Novembre 2010 a Novembre 2013 sono stati arruolati 40 pazienti affetti da arteriopatia obliterante periferica che soddisfacevano i criteri di eleggibilità. 20 pazienti sono stati assegnati al protocollo più intensivo e 20 all'altro protocollo. In condizioni basali i pazienti di entrambi i gruppi non differivano per età, massima capacità di marcia, assetto lipidico, pressione arteriosa. 8 pazienti nel gruppo assegnato a 3 cicli e 7 nell'altro gruppo avevano subito un intervento di rivascolarizzazione periferica. La terapia medica era simile nei due gruppi e non ha subito variazioni nel corso dello studio.

Nel corso del follow-up non ci sono state differenze significative nei due gruppi quanto a ospedalizzazioni, o peggioramenti del quadro: 1 paziente nel gruppo assegnato al protocollo meno intensivo ha registrato un peggioramento del quadro clinico dato da comparsa di lesione ulcerativa all'arto claudicante che ha richiesto medicazioni regolari, ma non ha compromesso la frequenza ai cicli riabilitativi; lo stesso dicasi per due pazienti assegnati al protocollo più intensivo. 2 pazienti nel gruppo assegnato al protocollo più intensivo e 3 assegnati all'altro gruppo sono usciti dallo studio per mancata compliance; nel gruppo assegnato al protocollo più intensivo 1 paziente è deceduto per causa non correlata all'arteriopatia periferica e 2 sono usciti dal trial per peggioramento del quadro clinico; nel gruppo assegnato al protocollo meno intensivo 2 pazienti sono usciti dal trial per peggioramento del quadro clinico (Tabella 1).

	Pazienti braccio 5 cicli n=20	Pazienti braccio 3 cicli n=20
Persi al follow-up	5	5
Decessi	1	0
Maschi/Femmine	15/2	15/5
Età	40-75 aa	57-72 aa
Diabete	7	5
Iperensione arteriosa	14	13
Dislipidemia	13	12
Abitudine al fumo	3	0
Diabete	7	5
Cardiopatia ischemica	5	2
Ateromasia carotidea	14	13
Rivascolarizzazione periferica	7	8

Tabella 1: caratteristiche dei pazienti arruolati

4.2 Risultati al termine del 1° ciclo riabilitativo

- *Parametri clinici* Al termine del 1° ciclo riabilitativo è stato rilevato un incremento significativo dell'intervallo di marcia assoluto (IMA pre-training: 270 ± 191 m, mediana 250 m; IMA post-training : 471 ± 244 m, mediana 470 m; $p < 0.005$) e dell'intervallo di marcia libero da dolore (IML pre-training: 142 ± 110 m, mediana 120 m; IML post-training : 250 ± 187 m, mediana 200 m; $p < 0.005$) (Grafico 1). Abbiamo inoltre osservato un incremento statisticamente significativo dell'Ankle Brachial Index al termine del ciclo riabilitativo (ABI pre-training 0.66 ± 0.14 , mediana 0.65; ABI post-training 0.73 ± 0.14 , mediana 0.70; $p < 0.05$) (Grafico 2). La pressione arteriosa media (PAM) è risultata ridotta al termine del ciclo riabilitativo (PAM pre-training 104 ± 11 mmHg, mediana 107 mmHg; PAM post-training 100 ± 8 mmHg, mediana 97 mmHg; $p < 0.05$), come pure la frequenza

cardiaca a riposo (frequenza cardiaca pre-training 68 ± 11 bpm, mediana 69 bpm; frequenza cardiaca post-training 64 ± 9 bpm, mediana 62; $p < 0.05$) (Grafico 3).

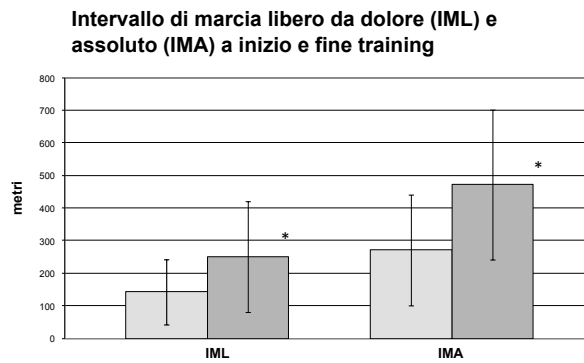


Grafico 1: Intervallo di marcia libero da dolore e assoluto a inizio e fine del 1° ciclo di training. * $p < 0.05$ rispetto a inizio training. □ pre-training. ■ post-training.

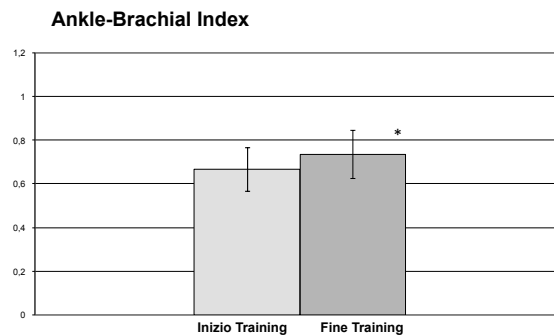


Grafico 2: Ankle-Brachial Index a inizio e fine del 1° ciclo di training. * $p < 0.05$ rispetto a inizio training.

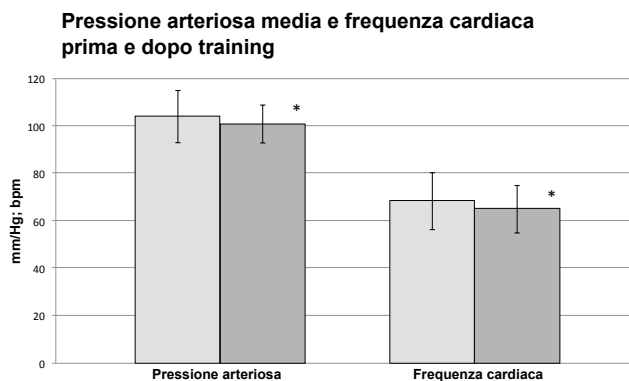


Grafico 3: Pressione arteriosa media e frequenza cardiaca a inizio e fine del 1° ciclo di training. * $p < 0.05$ vs inizio training. □ pre-training. ■ post-training.

- *Funzione piastrinica, stress ossidativo, stato flogistico, precursori delle cellule endoteliali* La concentrazione di malondialdeide (MDA) è risultata ridotta al termine del 1° ciclo riabilitativo a riposo (MDA pre-training 155.5 ± 31.2 mcg/L, mediana 156.2 mcg/L; MDA post-training 123.5 ± 24.9 mcg/L, mediana 127.6 mcg/L; $p < 0.05$), e ha mostrato un aumento significativo appena dopo Treadmill test sia all'inizio che al termine del training (MDA pre-training prima del Treadmill test 155.5 ± 31.2 mcg/L, mediana 156.2 mcg/L, appena dopo Treadmill test 169.7 ± 44.2 mcg/L, mediana 158.4 mcg/L; $p < 0.05$; MDA post-training prima del Treadmill test 123.5 ± 24.9 mcg/L, mediana 127.6 mcg/L, appena dopo Treadmill test 139.3 ± 27.8 mcg/L, mediana 138.2 mcg/L; $p < 0.05$) (Grafico 4). Anche i livelli di HsPCR sono risultati ridotti al termine del ciclo riabilitativo, a riposo (HsPCR pre-training 7.8 ± 4.3 mg/L, mediana 6.9 mg/L; HsPCR post-training 4.9 ± 4.6 mg/L, mediana 1.8 mg/L; $p < 0.05$) (Grafico 5). Il ciclo riabilitativo non ha indotto variazioni significative a riposo del PFA-100 ADP closure time, ma ha provocato una modifica della risposta dello stesso al Treadmill test massimale. A inizio training infatti il Treadmill test ha provocato in acuto un accorciamento del closure time da ADP (PFA-100 ADP pre-training prima del Treadmill test 82.1 ± 16.1 sec, mediana 76.0 sec; appena dopo Treadmill test 73.5 ± 8.5 sec, mediana 73.5 sec; $p < 0.05$), mentre a fine training ne ha provocato un allungamento (PFA-100 ADP post-training prima del Treadmill

test 77.6 ± 16.8 sec, mediana 74.0; appena dopo Treadmill test 89.4 ± 30.2 sec, mediana 79 sec; $p < 0.05$) (Grafico 6). Quanto al PFA-100 closure time con epinefrina, ne abbiamo osservato un allungamento al termine del ciclo di training a riposo (PFA-100 epinefrina pre-training 124.6 ± 51.1 sec, mediana 112.0 sec; PFA-100 epinefrina post-training 129.4 ± 34.0 sec, mediana 123.5 sec; $p < 0.05$). Il Treadmill test non ha indotto a inizio e fine training variazioni significative del PFA-100 epinefrina (Grafico 7). Parallelamente abbiamo osservato una riduzione dell'espressione di P-selectina e di GpIIbIIIa sulla superficie piastrinica al termine del ciclo di training a riposo (P-selectina pre-training $1.6 \pm 1.9\%$, mediana 1.0%; P-selectina post-training $0.9 \pm 1.3\%$, mediana 0.4%; $p < 0.05$; GpIIbIIIa attivato pre-training $8.3 \pm 5.6\%$, mediana 8.8%; GpIIbIIIa attivato post-training $4.6 \pm 3.8\%$, mediana 4.3%; $p < 0.05$). Il Treadmill test ha indotto un aumento di espressione di GPIIbIIIa attivato sia a inizio che a fine training, mentre non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative nell'espressione di P-selectina appena prima e appena dopo Treadmill test (Grafici 8 e 9). Abbiamo osservato un aumento dei precursori delle cellule endoteliali al termine del ciclo di training (EPC pre-training $0.007 \pm 0.007\%$, mediana 0.005%; EPC post-training 0.016 ± 0.020 , mediana 0.012%; $p < 0.05$) (Grafico 10). Non abbiamo osservato variazione significativa dei livelli di colesterolo totale e frazionato ed Hb glicata al termine del ciclo di training.

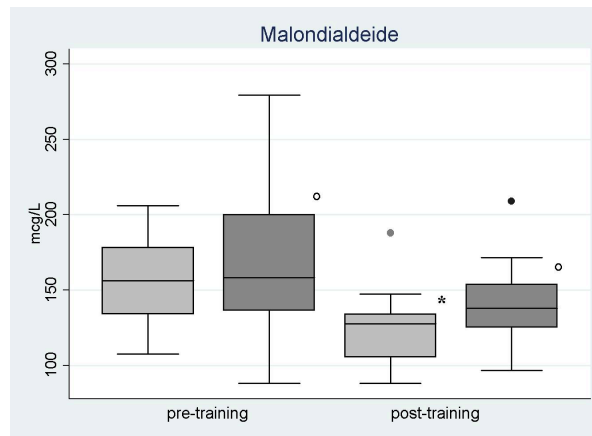


Grafico 4: Concentrazione di malondialdeide a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ rispetto a inizio training prima del Treadmill test. ° $p < 0.05$ vs corrispondente basale pre-Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

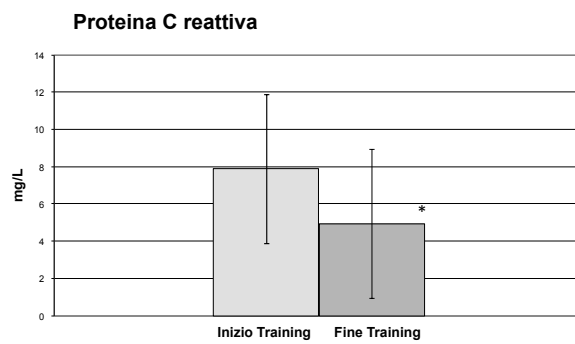


Grafico 5: Concentrazione di HsPCR a inizio e fine training. * $p < 0.05$ rispetto a inizio training.

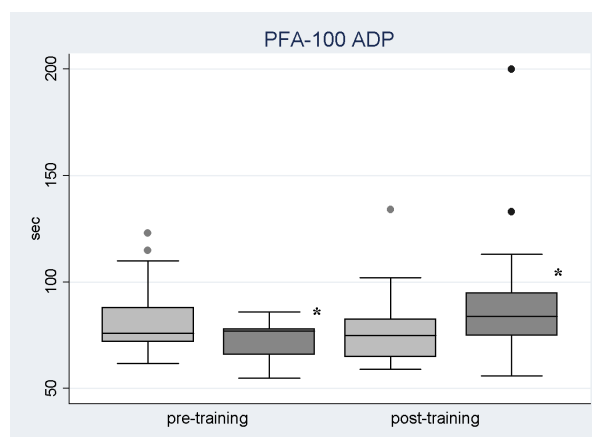


Grafico 6: PFA-100 ADP a inizio e fine training prima e immediatamente dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ rispetto al corrispondente basale pre-Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

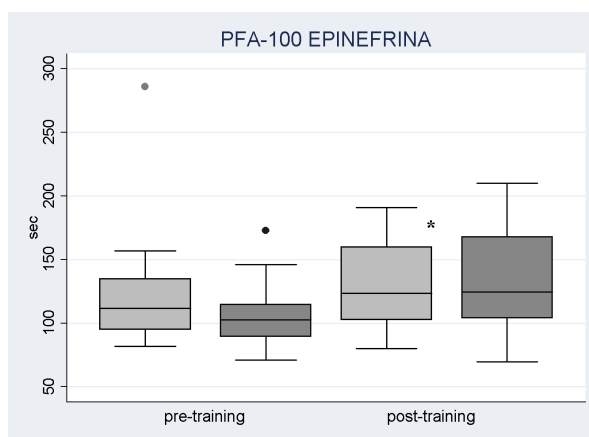


Grafico 7: PFA-100 epinefrina a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ vs inizio training prima del Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

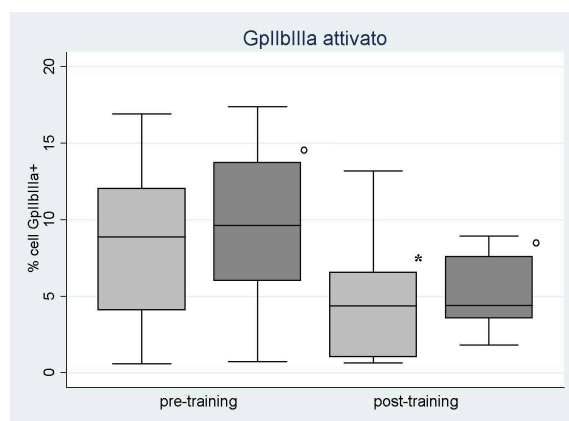


Grafico 8: Espressione di GpIIbIIIa attivato sulla superficie piastrinica a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test: * $p < 0.05$ vs inizio training prima del Treadmill test. ° $p < 0.05$ vs corrispondente basale pre-Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

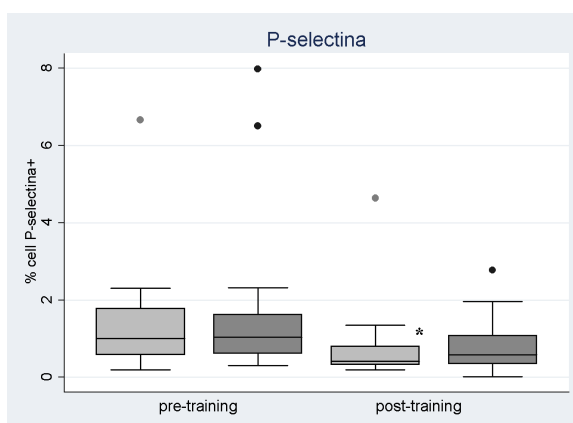


Grafico 9: Espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ vs inizio training pre-Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

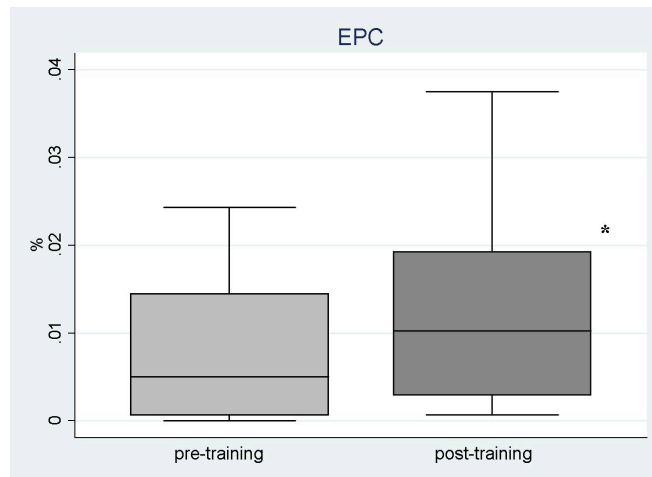


Grafico 10: Precursori delle cellule endoteliali a inizio e fine training. * $p < 0.05$ vs inizio training.

- *Parametri emodinamici* Il Treadmill test ha indotto a inizio training un incremento del diametro telediastolico del ventricolo sinistro, mentre a fine training non ha prodotto variazioni significative. Abbiamo osservato a fine training una riduzione a riposo del diametro telediastolico (diametro telediastolico ventricolo sx pre-training 48.7 ± 5.6 mm, mediana 49.0 mm; diametro telediastolico ventricolo sx post-training 47.9 ± 3.7 mm, mediana 48 mm; $p < 0.05$) e del volume telediastolico del ventricolo sinistro (volume telediastolico ventricolo sinistro pre-training 81.1 ± 24.3 mL, mediana 75.0 mm, volume telediastolico ventricolo sinistro post-training 74.4 ± 19.7 mL, mediana 73.5 mL; $p < 0.05$), associati ad un incremento della frazione di eiezione (frazione di eiezione ventricolo sinistro pre-training $60 \pm 8\%$, mediana 61%; frazione di eiezione ventricolo sinistro post-training $65 \pm 5\%$, mediana 65%; $p < 0.05$) (Grafico 11). Inoltre si è osservato un incremento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro in risposta al Treadmill test sia a inizio che a fine training (frazione di eiezione pre-training prima del Treadmill test $60 \pm 8\%$, mediana 61%, appena dopo Treadmill test $62.5 \pm 15\%$, mediana 64.5%; frazione di eiezione post-training prima del Treadmill test $65 \pm 5\%$, mediana 65%, appena dopo Treadmill test $68.4 \pm 4.9\%$, mediana 70%; $p < 0.05$). Parallelamente abbiamo osservato al termine del ciclo riabilitativo una riduzione dei livelli di NTproBNP a riposo (NTproBNP pre-training 209 ± 130 pg/mL, mediana 183 pg/mL; NTproBNP post-training

175±105 pg/mL, mediana 154 pg/mL; p<0.05) e dopo Treadmill test (NTproBNP appena dopo Treadmill test pre training 233±126 pg/mL, mediana 190 pg/mL; NTproBNP appena dopo Treadmill test post-training 188±108 pg/mL, mediana 163 pg/mL; p<0.05) con un delta di incremento di NTproBNP indotto da Treadmill test inferiore a fine training rispetto a inizio training (Grafico 12). Inoltre il ciclo riabilitativo ha determinato un miglioramento della portata dell'arteria femorale sull'arto claudicante sia a riposo (portata arteria femorale pre-training 1860±1304 mL/min, mediana 1376 mL/min; portata arteria femorale post-training 2554±2136 mL/min, mediana 2057 mL/min; p<0.05) sia appena dopo Treadmill test (portata arteria femorale appena dopo Treadmill test pre-training 2430±1491 mL/min, mediana 1957 mL/min; portata arteria femorale appena dopo Treadmill test post-training 3517±2526 mL/min, mediana 3218 mL/min; p<0.05), con un incremento della portata significativo in corso di Treadmill test sia all'inizio che al termine del ciclo riabilitativo (Grafico 13). Il diametro dell'arteria femorale ha mostrato un trend in aumento a riposo dopo training, ma non statisticamente significativo. Il Treadmill test ha indotto un aumento significativo del diametro dell'arteria femorale sia a inizio che a fine ciclo riabilitativo.

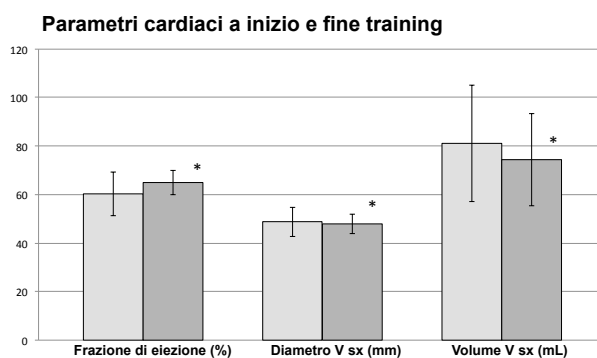


Grafico 11: Parametri cardiaci a inizio e fine training. *p<0.05 vs inizio training. □ pre-training. ■ post-training.

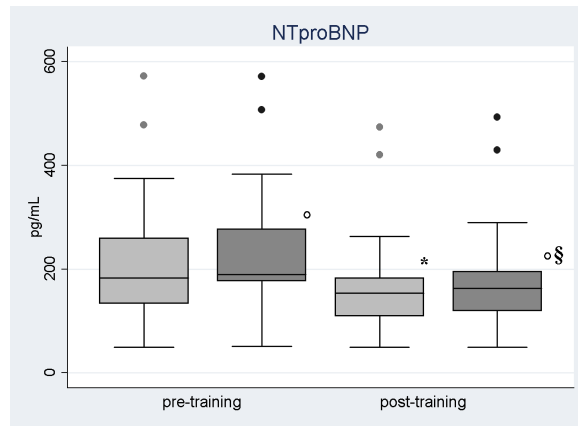


Grafico 12: Concentrazione di NTproBNP a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ vs inizio training prima del Treadmill test. ° $p < 0.05$ vs corrispondente basale pre-Treadmill test. § $p < 0.05$ vs inizio training dopo Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

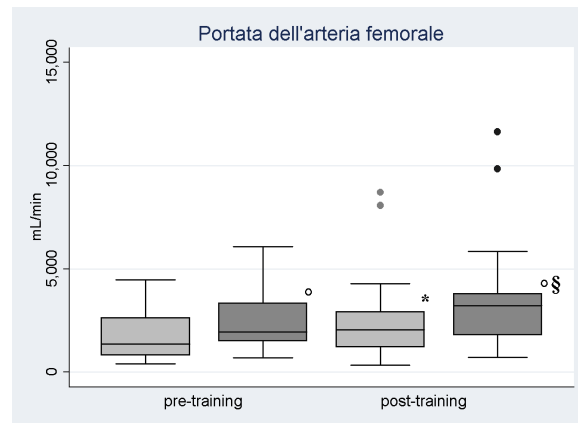


Grafico 13: Portata dell'arteria femorale comune a inizio e fine training immediatamente prima e dopo Treadmill test. * $p < 0.05$ vs inizio training pre-Treadmill test. ° $p < 0.05$ vs corrispondente basale pre-Treadmill test. § $p < 0.05$ vs inizio training immediatamente dopo Treadmill test. □ pre-Treadmill test. ■ post-Treadmill test.

4.3 Risultati al termine del follow-up

- *Parametri clinici* Entrambi i gruppi hanno mostrato un incremento statisticamente significativo dell'intervallo di marcia assoluto al termine del periodo di follow-up (gruppo 3 cicli: IMA inizio follow-up 241 ± 162 m, mediana 220 m; IMA termine follow-up : 407 ± 125 m, mediana 320 m; $p < 0.05$; gruppo 5 cicli: IMA inizio follow-up 301 ± 218 m, mediana 275 m; IMA termine follow-up: 549 ± 262 m, mediana 620 m; $p < 0.005$). Solo il gruppo assegnato a 5 cicli riabilitativi ha però mostrato un incremento statisticamente significativo dell'intervallo di marcia

libero da dolore al termine del follow-up (IML inizio follow-up 145 ± 109 m, mediana 105 m; IML termine follow-up : 398 ± 300 m, mediana 295 m; $p < 0.005$) (Grafico 14). L'Ankle Brachial Index è risultato migliorato in entrambi i gruppi di pazienti, assegnati a 3 o 5 cicli riabilitativi (0.6 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.2 ; $p < 0.05$) (Grafico 15). Abbiamo osservato nel solo gruppo assegnato al protocollo più intenso una riduzione della pressione arteriosa media e della frequenza cardiaca a riposo al termine del follow-up (102 ± 8.5 mmHg vs 91.9 ± 7 mmHg; $p < 0.005$; 69.8 ± 11.6 bpm vs 60.6 ± 8.2 bpm; $p < 0.05$) (Grafico 16 e 17) .

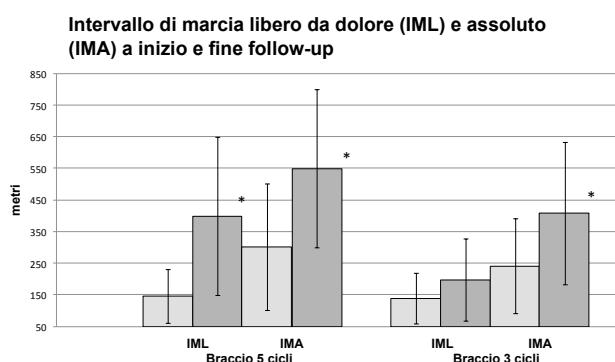


Grafico 14: Intervallo di marcia libero da dolore e assoluto a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. * $p < 0.05$ vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

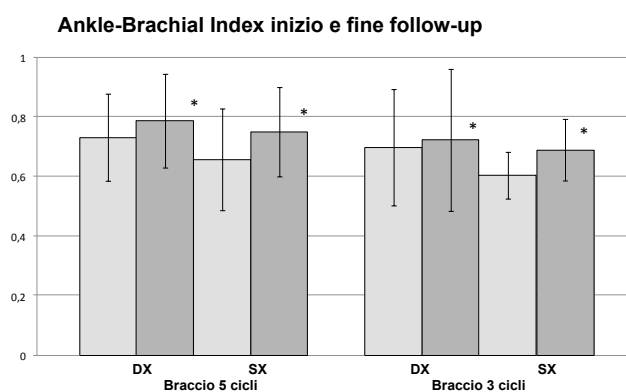


Grafico 15: Ankle-Brachial Index a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. * $p < 0.05$ vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

Pressione arteriosa media a inizio e fine follow-up

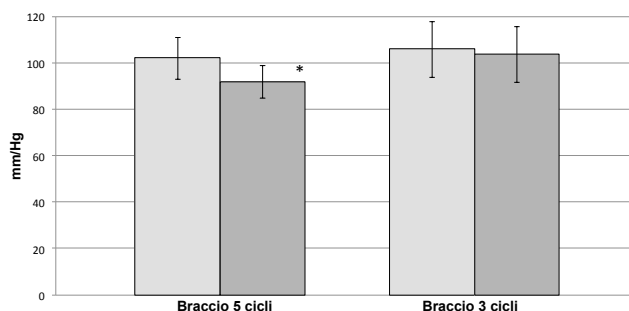


Grafico 16: Pressione arteriosa media a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. * $p < 0.05$ rispetto vs follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

Frequenza cardiaca a inizio e fine follow-up

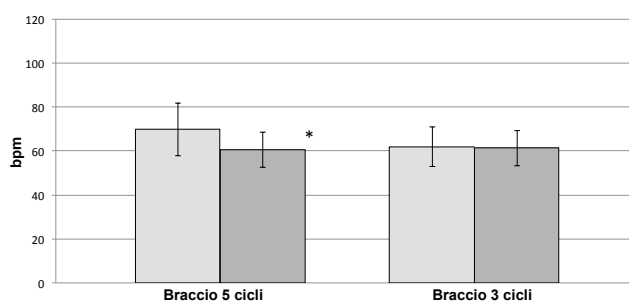


Grafico 17: Frequenza cardiaca a riposo a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. * $p < 0.05$ vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

- *Assetto lipidico, funzione piastrinica, stress ossidativo* Al termine del follow-up abbiamo rilevato nel gruppo assegnato al protocollo più intenso una riduzione della concentrazione di colesterolo totale (189 ± 43 mg/dL vs 163 ± 20 mg/dL; $p < 0.05$), mentre l'altro gruppo non ha mostrato variazioni significative (Grafico 18). Colesterolo frazionato, trigliceridi e Hb glicata non hanno mostrato variazioni significative. Abbiamo inoltre rilevato nel gruppo assegnato a 5 cicli riabilitativi una riduzione della concentrazione di HsPCR (8 ± 2.5 mg/L vs 5 ± 0.8 mg/L; $p < 0.05$) e malondialdeide (162.6 ± 38.8 mcg/L vs 126 ± 32.4 mcg/L; $p < 0.05$) al termine del follow-up, che non è stato osservato nel gruppo assegnato a 3 cicli (Grafici 19 e 20). Il PFA-100 a riposo sia indotto da ADP che

da epinefrina non ha mostrato variazioni significative al termine del follow-up.

- *Parametri emodinamici* Per quanto riguarda l'ambito cardiaco abbiamo osservato a fine follow-up una riduzione a riposo del diametro telediastolico (48.3 ± 4.1 vs 47.3 ± 4.3 mm; $p < 0.05$) e del volume telediastolico del ventricolo sinistro (87.3 ± 23 vs 65.8 ± 15 mL; $p < 0.05$), associati ad un incremento della frazione di eiezione ($61 \pm 6.9\%$ vs $64.7 \pm 6.5\%$) nel gruppo di pazienti che ha effettuato 5 cicli riabilitativi, mentre il gruppo assegnato al protocollo meno intenso ha mostrato solamente una riduzione diametro telediastolico del ventricolo sinistro (Grafico 21). Al termine del follow-up la portata dell'arteria femorale nell'arto claudicante non ha mostrato incremento significativo in nessuno dei due gruppi; il diametro dell'arteria femorale ha rilevato un trend in aumento ma non significativo.

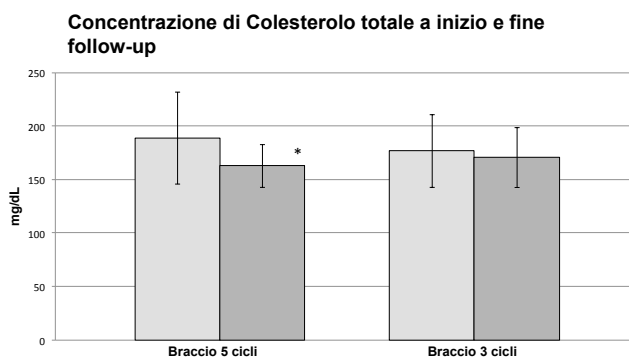


Grafico 18: Concentrazione di colesterolo totale a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. * $p < 0.05$ vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

Concentrazione di Proteina C reattiva a inizio e fine follow-up

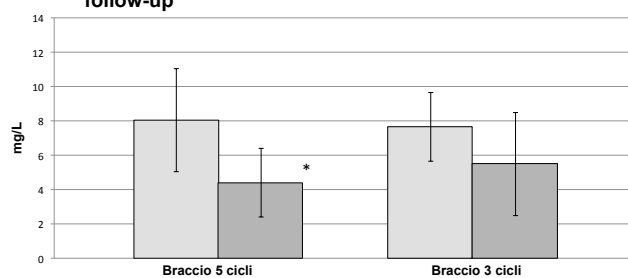


Grafico 19: HsPCR a riposo a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. *p<0.05 vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

Concentrazione di Malondialdeide a inizio e fine follow-up

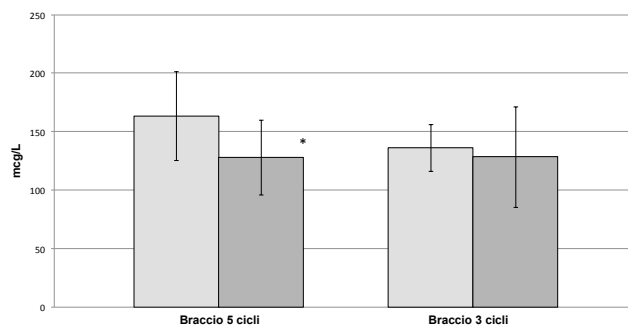


Grafico 20: Concentrazione malondialdeide inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. *p<0.05 vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

Parametri cardiaci a inizio e fine follow-up

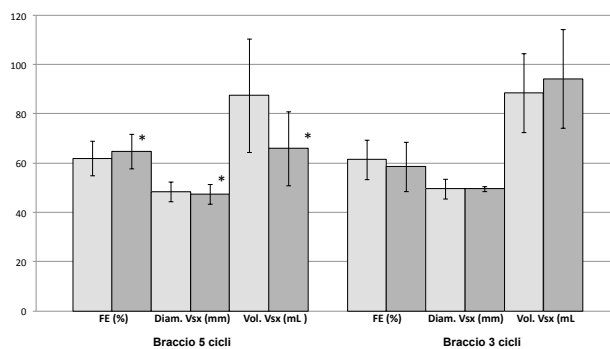


Grafico 21: Parametri cardiaci a inizio e fine follow-up nei due bracci, 5 cicli e 3 cicli riabilitativi. *p<0.05 vs inizio follow-up. □ inizio follow-up. ■ fine follow-up.

5. DISCUSSIONE

5.1 *Effetti del singolo ciclo di training*

Abbiamo osservato in risposta al ciclo di training proposto presso la nostra Struttura un miglioramento sia dell'intervallo di marcia assoluto (condotto fino al massimo dolore ischemico sopportabile) sia dell'intervallo di marcia libero da dolore. Questi dati confermano quanto riportato in letteratura riguardo all'effetto positivo del training fisico controllato nel ridurre i sintomi della claudicatio intermittens.¹

Nonostante la terapia medica sia divenuta l'approccio di prima linea nel trattamento della claudicatio intermittens, c'è ancora incertezza riguardo a quali caratteristiche debba avere il training quanto a frequenza, intensità e contenuto.²⁶ Inoltre nonostante la sua efficacia il training fisico controllato è ancora poco utilizzato e necessita ancora di essere promosso.²⁸ La maggior parte dei trial in letteratura propone cicli di training di 12 settimane con 3 sedute/settimana. Presso il nostro reparto proponiamo un training più intensivo che ha mostrato un'ottima compliance da parte del paziente e non ha registrato nessun abbandono nel corso del singolo ciclo riabilitativo. Una maggior aderenza al training intensivo correttamente prescritto rappresenta sicuramente un vantaggio rispetto ai risultati che si possono ottenere e rispetto alla possibilità di prevedere un programma riabilitativo di lungo termine.

Parallelamente all'incremento della capacità di marcia abbiamo rilevato un incremento dell'Ankle Brachial Index che conferma il miglioramento della perfusione complessiva all'arto claudicante. A conferma dell'aumentata perfusione periferica abbiamo registrato inoltre un incremento statisticamente significativo della portata dell'arteria femorale, a fine training. Tale fenomeno, non del tutto atteso, dimostra come il training, in particolare quello articolato in cicli intensivi e con prolungamento dell'esercizio sino all'ischemia, possa produrre un potenziamento dei meccanismi di compenso. Tali meccanismi si articolano in un miglioramento della funzione endoteliale, nella riduzione

della flogosi (riduzione HsPCR), dello stress ossidativo (vedi calo di malondialdeide) e dell'attivazione piastrinica, e in uno stimolo alla neoangiogenesi ed alla arteriogenesi.

Nel paziente claudicante è documentato un incremento dello stato flogistico e dello stress ossidativo, che promuovono l'aggravamento della malattia, attraverso il danno endoteliale e la progressione della placca. Anche l'attivazione piastrinica è aumentata nel paziente affetto da arteriopatia periferica.¹³ Anche a questo livello il training ha mostrato di produrre benefici con una documentata riduzione dell'attivazione piastrinica indotta da test massimale; tale fenomeno è stato evidenziato con l'incremento del PFA-100-ADP post-Treadmill a fine training confrontato con i dati iniziali, associato alla ridotta espressione, sempre a fine training, di P-selectina e GpIIbIIIa attivato sulla superficie piastrinica.

L'aterosclerosi, di cui l'arteriopatia periferica rappresenta una manifestazione, passa attraverso un danno endoteliale che induce l'espressione di molecole di adesione da parte dell'endotelio che richiamano leucociti e piastrine, che a loro volta amplificano l'attivazione piastrinica e endoteliale, in un processo che si autoalimenta anche a causa dell'alterato shear stress locale e dello stimolo ipossico cronico. In questo contesto l'esercizio strenuo condotto fino al dolore ischemico dell'arto (come avviene in corso di test al Treadmill) non fa che incrementare l'attivazione endoteliale (di un endotelio però danneggiato e mal funzionante), l'attivazione piastrinica e la produzione di radicali liberi¹⁴⁻¹⁶. Si verifica di conseguenza un'iperattivazione piastrinica, espressa da un accorciamento del closure time piastrinico stimolato da ADP (come abbiamo osservato a inizio training in risposta al Treadmill test). Lo stesso risultato di iperattivazione piastrinica espressa da accorciamento del PFA-100 ADP è osservata nel paziente cardiopatico ischemico, nel quale inoltre è dimostrato che l'incremento dell'attivazione piastrinica indotta da esercizio strenuo è significativamente ridotta da un esercizio condotto fino alla soglia ischemica (sospeso all'inizio del dolore ischemico) effettuato 45 minuti prima dell'esercizio massimale. Il PFA-100 ADP closure time cala cioè significativamente in risposta all'esercizio fisico massimale, ma non con lo stesso stress massimale somministrato 45 minuti dopo un esercizio sotto soglia ischemica. Questo

effetto è inibito dalla somministrazione di teofillina, suggerendo un ruolo dell'adenosina in questo fenomeno.³⁶ Anche in soggetti sani l'esercizio fisico moderato riduce l'iperattivazione piastrinica indotta da esercizio strenuo (calo dell'aggregazione piastrinica indotta da shear-stress e ridotta espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica) e questi effetti sull'aggregabilità piastrinica dopo esercizio strenuo si perdono dopo un periodo di decondizionamento.¹⁸ All'inizio del training abbiamo osservato un incremento della risposta piastrinica al Treadmill test massimale, espresso da un accorciamento del closure time da ADP. Al termine del training inaspettatamente abbiamo rilevato un suo allungamento in risposta al Treadmil test massimale: parrebbe cioè che a fine training il test al Treadmill massimale riduca l'attivazione piastrinica.

Le piastrine una volta attivate tendono ad amplificare l'aggregazione e l'attivazione attraverso vari meccanismi, tra cui il rilascio di ADP (adenosina difosfato, attivatore dei recettori P2Y₁₂) che è l'agonista finale nel processo di attivazione e reclutamento di nuove piastrine.³⁷ L'endotelio gioca un ruolo fondamentale nel modulare l'attivazione piastrinica attraverso l'espressione sulla superficie di una ectonucleosidasi di membrana nota come CD39 (NTPDasi-1) che metabolizza ATP e ADP in AMP, risultando in una inibizione dell'attivazione piastrinica, attraverso la degradazione dell'ADP, attivatore piastrinico.³⁸ L'enzima CD39 costituisce una via attraverso cui l'endotelio modula l'attivazione piastrinica controllando l'eccessivo accumulo di piastrine e garantendo una corretta fluidità ematica.³⁸

E' dimostrato in soggetti sani che l'esercizio strenuo induce attivazione piastrinica attraverso un rilascio di ADP, e questa risposta pro-trombotica è controbilanciata da una up-regulation di NTPDasi-1.³⁹ Si può quindi ipotizzare che l'esecuzione ripetuta di esercizio regolare fino al dolore ischemico - come nel corso del nostro ciclo riabilitativo - induca una up-regulation di NTPDasi-1 e una miglior performance endoteliale, in termini di miglior espressione dello stesso enzima in risposta al Treadmill test a fine training, tale da ridurre l'attivazione piastrinica in risposta a esercizio massimale al termine del ciclo riabilitativo.⁴⁰ Inoltre, il ruolo piastrino-regolatore di CD39 sarebbe più rilevante in quelle categorie di pazienti che hanno un'umentata aggregabilità piastrinica

a riposo e dopo esercizio, oltre ad una disfunzione endoteliale e insufficiente rilascio di fattori anti-piastrinici, caratteristiche comuni ai pazienti arteriopatici.^{41,42}

L'ADP induce l'espressione di P-selectina sulla superficie piastrinica e media l'attivazione piastrinica indotta da epinefrina. L'aumentata degradazione di ADP potrebbe dunque spiegare a fine training non solo la ridotta aggregazione da ADP in risposta al test massimale, ma anche la riduzione di espressione di P-selectina e la ridotta aggregazione da epinefrina (espressa da un allungamento del closure time da epinefrina) a riposo. La riduzione di espressione di P-selectina a fine ciclo riabilitativo si potrebbe spiegare anche con la riduzione del rilascio di catecolamine e la down-regulation dei recettori adrenergici piastrinici, che si verificano con il training fisico regolare. E' inoltre dimostrato in letteratura che il training fisico aumenta il rilascio di ossido nitrico, che inibisce l'aggregazione piastrinica indotta da shear stress e attenua l'up-regulation della P-selectina.^{37,50}

Abbiamo inoltre osservato a fine training un aumento dei precursori delle cellule endoteliali, indice di migliorata vasculogenesi e perfusione periferica. Questo dato, associato all'aumentata portata femorale e all'incremento dell'ABI registrati a fine training, testimonia il miglioramento della perfusione periferica.

E' dimostrato che lo stimolo ipossico, quale quello che si ha in corso di arteriopatia periferica, determina l'attivazione di fattori di trascrizione che provocano un aumentato rilascio di NO (Nitric Oxide) e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).^{45,46} Il training fisico quindi, attraverso un reiterato stimolo ipossico, può fungere da stimolo al rilascio di VEGF con conseguente aumento dei precursori delle cellule endoteliali circolanti, come abbiamo osservato al termine del ciclo riabilitativo. L'aumento di NO in corso di training fisico, inoltre, favorirebbe lo switch dei precursori delle cellule endoteliali dalla forma quiescente alla forma proliferativa ed è dimostrato che l'esercizio fisico regolare determina una riduzione delle citochine pro-infiammatorie, che hanno un effetto inibitorio sul rilascio di EPC, con conseguente aumento dei precursori delle cellule endoteliali.^{35,45,46}

Al termine del training abbiamo inoltre osservato un miglioramento della performance cardiaca, espresso dall'aumento della frazione di eiezione, e la riduzione di diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro. Questo dato è dimostrato in letteratura nel paziente cardiopatico ischemico, ma è stato poco valutato nel paziente arteriopatico periferico. Nel paziente post-infartuato infatti è dimostrato che il training fisico migliora la frazione di eiezione, rallenta il rimodellamento del ventricolo sinistro e riduce di livelli di NTproBNP, molecola che incrementa in risposta allo stretch della parete ventricolare.³⁵ NTproBNP è un prodotto di clivaggio del fattore natriuretico atriale, molecola rilasciata dai cardiomiociti in risposta allo stretch di parete, e induce diuresi, vasodilatazione, inibizione del sistema renina-angiotensina-aldosterone e crescita dei miociti cardiaci e della parete vasale. Questa molecola emergerebbe in letteratura non solo come marker di disfunzione cardiaca (correlata con peggioramento della performance cardiaca) ma anche come marker prognostico sfavorevole, correlata con aumentato rischio di eventi cardiovascolari.^{35,47} La riduzione del diametro telediastolico e del volume telediastolico del ventricolo sinistro, unitamente al miglioramento della frazione di eiezione, confermano l'effetto positivo del training fisico sulla performance cardiaca anche nel paziente arteriopatico periferico. Questo dato va di pari passo con la riduzione di NTproBNP, che testimonia il miglioramento della funzione cardiaca.

Si aggiunge a questo il fatto che NTproBNP entrerebbe in gioco anche nella regolazione della perfusione periferica: è infatti dimostrato che le cellule satellite della muscolatura striata rilasciano NTproBNP in risposta allo stimolo ipossico.^{46,48,49} In quest'ottica la riduzione dei livelli di NTproBNP che abbiamo osservato a fine training può essere messa in relazione non solo con la migliorata performance cardiaca ma anche con un miglioramento della perfusione periferica, con riduzione dello stimolo ipossico. In questo senso NTproBNP potrebbe essere valutato in studi più ampi come marcatore di efficacia del training fisico nel paziente arteriopatico periferico.

b) Differenze di effetti dei due protocolli

Per quanto riguarda le differenze di effetti dei due protocolli di diversa intensità abbiamo osservato in entrambi i gruppi un incremento a fine follow-up di intervallo di marcia assoluto e dell'ABI. Il dato interessante è che invece l'intervallo di marcia libero da dolore aumenta solo nel gruppo destinato a 5 cicli riabilitativi, mentre nell'altro gruppo non si ha una variazione significativa. Parimenti, anche lo stato ossidativo e flogistico (concentrazione di Malondialdeide e HsPCR) migliorano nel gruppo destinato ad un protocollo più intenso ma restano invariati nell'altro gruppo. E lo stesso dicasi per i parametri cardiaci: infatti nel solo gruppo che ha effettuato 5 cicli riabilitativi è stato rilevato un miglioramento di frazione di eiezione e diametro telediastolico e volume telediastolico del ventricolo sinistro. Anche pressione arteriosa media e livelli di colesterolo totale calano al termine del follow-up nei paziente assegnati al protocollo più intensivo, ma non variano negli altri.

Riguardo invece ai parametri di attivazione piastrinica, il PFA-100 al termine del follow-up non ha mostrato variazioni significative, tuttavia correggendo i dati in rapporto ai pazienti con peggioramento del quadro clinico (comparsa di due ulcere, che hanno richiesto prolungato ciclo di medicazione), il PFA-100 risulta allungato nei pazienti assegnati al protocollo più intensivo, indicando una minor attivazione piastrinica a riposo (PFA-100 ADP inizio follow-up 73.0 ± 8.4 sec, mediana 73 sec; PFA-100 ADP fine follow-up 82.1 ± 9.4 sec, mediana 77 sec; $p < 0.05$).

Emerge dunque un effetto positivo non solo sull'autonomia di marcia ma anche sui parametri che valutano la perfusione periferica, lo stato ossidativo-flogistico e l'attivazione piastrinica di un protocollo di training più intenso rispetto a quelli proposti in letteratura, che potrebbe avere il vantaggio di garantire una migliore compliance del paziente. Sul lungo termine si è evidenziato che la somministrazione di 1 ciclo di training intenso ogni 4 mesi risulta più efficace della somministrazione di 1 ciclo ogni 10 mesi nel miglioramento dell'intervallo di marcia libero da dolore, e nel controllo dei fattori di rischio quali ipercolesterolemia e ipertensione arteriosa, nonché

nel miglioramento della performance cardiaca e nella riduzione dell'attivazione piastrinica. Emergerebbe dunque un dato nuovo, e non presente in letteratura, di un possibile effetto soglia nella somministrazione del training fisico controllato, al disotto del quale si perdono gli effetti ottenuti con i cicli riabilitativi precedenti.

Sarebbe interessante valutare su scala più ampia l'efficacia di protocolli di training fisico sul lungo termine, estrapolando quali siano gli elementi tra intensità, durata e contenuto del training che influenzano in modo indipendente i risultati.

6. CONCLUSIONI

Questo studio dimostra l'efficacia di un protocollo di training intensivo nel migliorare l'autonomia di marcia nel paziente claudicante, ottenendo anche la riduzione dello stress ossidativo, dello stato flogistico, e dell'attivazione piastrinica indotta da esercizio fisico massimale, e il miglioramento di performance cardiaca e perfusione periferica (dimostrata dal miglioramento dell'ABI e della portata dell'arteria femorale, e dall'aumento delle EPC).

Analizzando due diversi protocolli di frequenza del ciclo riabilitativo sul lungo termine, risulta più efficace una frequenza di cicli di training di 1/4 mesi rispetto a 1/10 mesi nel mantenimento dei risultati, sul piano clinico, emodinamico, sullo stress ossidativo e sullo stato flogistico. Si potrebbe dunque ipotizzare un effetto soglia della frequenza di somministrazione del training nel paziente arteriopatico periferico, al di sotto della quale si perderebbero in parte gli effetti dei training precedenti. Sarebbe utile analizzare questi aspetti su una scala più ampia in modo da valutare una frequenza di somministrazione del training ottimale nell'arteriopatia obliterante periferica e poter così validare protocolli univoci di intervento.

7. BIBLIOGRAFIA

1. TASC II Inter-society consensus for the management of PAD. Lars Norgren and William R Hiatt; John A Dormandy and Mark R Nehler; Kenneth A Harris and F Gerry R Fowkes; Robert B Rutherford.
2. P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, E.H.C. Tang and M. Feletou. Endothelial function and vascular disease. *Acta Physiol.* 2009, 196: 193-222
3. William R. Hiatt, MD, Judith G. Regensteiner, PhD, Melanie E. Hargarten, MS, Eugene E. Wolfel, MD, and Eric P. Brass, MD, PhD. Benefit of Exercise Conditioning for Patients With Peripheral Arterial Disease. *Circulation* 1990;81:602-609.
4. Timothy P. Murphy, MD,^a Alan T. Hirsch, MD,^{b,c} Donald E. Cutlip, MD,^d Judith G. Regensteiner, PhD,^e Anthony J. Comerota, MD,^f Emile Mohler, MD,^g David J. Cohen, MD, MSc. Claudication: Exercise vs Endoluminal Revascularization (CLEVER) study update. *J Vasc Surg* 2009;50:942-5.
5. Garg PK, Liu K, Tian L, Guralnik JM, Ferrucci L, Criqui MH, Tan J, McDermott MM. Physical activity during daily life and functional decline in peripheral arterial disease. *Circulation* 2009 Jan 20; 119 (2): 251-60.
6. Sakamoto S et al. Patients with peripheral arterial disease who complete 12-week supervised exercise training program show reduced cardiovascular mortality and morbidity. *Circ J.* 2009 Jan; 73 (1): 167-73.
7. Van Kuijk JP et al. Long-term prognosis of patients with peripheral arterial disease with or without polyvascular atherosclerotic disease. *Eur Heart J.* 2009 Dec 27
8. Taute BM, et al. Long-term outcome of patients with mild intermittent claudication under secondary prevention. *Vasa.* 2009 Nov; 38 (4):346-55
9. McDermott MM et al. Circulating blood markers and functional impairment in peripheral arterial disease. *J Am Geriatr Soc.* 2008 Aug; 56 (8): 1504-1510
10. J M Peake et al. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage *Eur J Appl Physiol* 2005; 95: 514-521

11. G.M. Andreozzi, et al. Effectiveness and costs of a short-course supervised training program in claudicants: proposal for a shared protocol with aerobic working load. *Int Angiol.* 2008 Oct; 27 (5): 401-7
12. G.M. Andreozzi, A. Leone, R. Laudani, G. Deinite, R. Martini. Acute impairment of the endothelial function by maximal treadmill exercise in patients with intermittent claudication, and its improvement after supervised physical training. *Int Angiol.* 2007, 26: 12-17.
13. Rajagopalan S, McKay I, Ford I, Bachoo P, Greaves M, Brittenden J. Platelet activation increases with the severity of peripheral arterial disease: implication for clinical management. *J Vasc Surg.* 2007 Sep, 46 (3) : 485-90
14. Collins P, Ford D, Ball D, Macaulay E, Greaves M, Brittenden J. A preliminary study on the effects of exercising to maximum walking distance on platelets and endothelial function in patients with intermittent claudication. *Eur J Endovascular Surg.* 2006 Mar, 31 (3) : 266-73
15. H. Ficicilar, Ali M Zergeroglu, Demet Tekin, Gulriz Ersoz. The effects of acute exercise on plasma antioxidant status and platelet response. *Thrombosis Research* 111 (2003) 267-271.
16. AS Kestin, PA Ellis, MR Barnard, A Errichetti, BA Rosner and AD Michelson. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation.* 1993;90: 1502-1511.
17. JS Wang, CJ Jen, HC Kung, LJ Lin, TR Hsiue and HI Chen Different effects of strenuous exercise and moderate exercise on platelets function in men. *Circulation* 1994; 90:2877-2885
18. Jong-Shyan Wang, Yu-San Li, Jin-Chung Chen, Yu-Wen Chen. Effects of exercise training and deconditioning on platelets aggregation induced by altering shear stress in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:454-460
19. Ulrich Laufs, Nikos Werner, Andreas Link, Matthias Endres, Sven Wassmann, Kristina Jurgens, Eckart Mische, Michael Bohm and George Nickenig. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004; 109:220-226
20. Fiorito C., Rienzo M, Crimi E, Rossiello R, Balestrieri ML, Casamassini A, Muto F, Grimaldi V, Giovane A, Farzati B, Mancini FP, Napoli C. Antioxidants increase number of progenitor endothelial cells through multiple gene expression pathways. *Free Rad Res.* 2008 Aug; 42 (8):754-762

21. Witkowski S, Lockard MM, Jenkins NT, Obisesan TO, Spangerburg EE, Hagberg JM. Relation of circulating progenitor cells to vascular function and oxidative stress with long term training and short detraining in older man. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Sep 1
22. Pietro Delva, Sergio De Marchi and Manlio Prior, Maurizio Degan, Alessandro Lechi, and Maristella Trettene, Enrico Arosio. Endothelial progenitor cells in patients with severe peripheral arterial disease. *Endothelium*. 2008, 15:1-7
23. Rutten JH, Mattace-Raso FU, Steyerberg EW, Lindemans J, Hofman A, Wieberdink RG, Breteler MM, Wittteman JC, van den Meiracker AH. Amino-terminal pro-B-type natriuretic Peptide improves cardiovascular and cerebrovascular risk prediction in the population: the Rotterdam study. *Hypertension* 2010 Mar; 55 (3): 785-791).
24. Conraads VM, De Maeyer C, Beckers P, Possemiers N, Martin M, Van Hoof V, Vrints CJ. Exercise-induced biphasic increase in circulating NT-proBNP levels in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008 Aug; 10 (8): 793-5
25. Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Buttà C, Casuccio A, Giarrusso L, Miceli G, Licata G, Pinto A. Metabolic and anti-inflammatory effects of a home-based programme of aerobic physical exercise. *Int J Clin Pract*. 2013
26. Fakhry F, van de Luijckgaarden KM, Bax L, den Hoed PT, Hunink MG, Rouwet EV, Spronk S. Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J Vasc Surg*. 2012 Oct;56(4): 1132-42.
27. Mika P, Wilk B, Mika A, Marchewka A, Nizankowski R. The effect of pain-free treadmill training on fibrinogen, haematocrit, and lipid profile in patients with claudication. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011
28. Casillas JM, Troisgros O, Hannequin A, Gremeaux V, Ader P, Rapin A, Laurent Y. Rehabilitation in patients with peripheral arterial disease. *Ann Phys Rehabil Med*. 2011 Oct;54(7):443-61.
29. Lanza GA, Sestito A, Iacovella S, et al. Relation between platelet response to exercise and coronary angiographic findings in patients with effort angina. *Circulation* 2003;107:1378-82.
30. Lanza GA, Andreotti F, Sestito A, et al. Platelet aggregability in cardiac syndrome X. *Eur Heart J* 2001;22:1924-30.

31. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:195-202.
32. Sestito A, Sciahbasi A, Landolfi R, et al. A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100): reproducibility and effects of sex and age. *Cardiologia* 1999;44:661-5.
33. Zatti M, Faccini G, Hulpe M, Bertozzo L, Pasini F. Metodo modificato per lo studio della malondialdeide plasmatica nei soggetti normali, nei diabetici e negli ipercolesterolemici. *Biochimica clinica* 1992;16:90.
34. Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Diagnostic accuracy of B type natriuretic peptide and amino terminal proBNP in the emergency diagnosis of heart failure. *Heart* 2005;91:606 –12
35. Sandra Erbs, MD; Robert Ho llriegel, MD; Axel Linke, MD; Ephraim B. Beck, MD; Volker Adams, PhD; Stephan Gielen, MD; Sven Mobius-Winkler, MD; Marcus Sandri, MD; Nicolle Krankel, PhD; Rainer Hambrecht, MD; Gerhard Schuler, MD. Exercise Training in Patients With Advanced Chronic Heart Failure (NYHA IIIb) Promotes Restoration of Peripheral Vasomotor Function, Induction of Endogenous Regeneration, and Improvement of Left Ventricular Function. *Circ Heart Fail.* 2010;3:486-494.
36. Giancarla Scalone, Ilaria Coviello, Lucy Barone, Chiara Pisanello, Alfonso Sestito, Gaetano A Lanza, Filippo Crea. Brief low-workload myocardial ischaemia induces protection against exercise-related increase of platelet reactivity in patients with coronary artery disease. *Heart* 2010;96:263-268.
37. Dominick J. Angiolillo, MD, PhD; Masafumi Ueno, MD; Shinya Goto, MD, PhD. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circ J* 2010; 74: 597–607
38. Aaron Aaron J. Marcus, M. Johan Broekman, et al. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *Journal Pharmacol Exp Ther* 305:9–16, 2003.
39. Gennady G. Yegutkin¹, Sergei S. Samburski¹, Stefan P. Mortensen², Sirpa Jalkanen¹ and Jose Gonzalez-Alonso. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol* 579.2 (2007) pp 553–564.

40. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C & Levi R (2003). Heterologous cell–cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1, 2497–2509.
41. Coppola A, Coppola L, Dalla Mora L, Limongelli FM, Grassia A, Mastrolorenzo L, Gombos G & Lucivero G (2005). Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol* 98, 1414–1419.
42. El-Sayed MS (2002). Exercise and training effects on platelets in health and disease. *Platelets* 13, 261–266.
43. Steen VM, Holmsen H & Aarbakke G (1993). The platelet-stimulating effect of adrenaline through alpha 2-adrenergic receptors requires simultaneous activation by a true stimulatory platelet agonist. Evidence that adrenaline per se does not induce human platelet activation in vitro. *Thrombosis Haemostasis* 70, 506–513.
44. Gear AR, Suttitanamongkol S, Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska RK, Raha S & Camerini D (2001). Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood* 97, 937–945.
45. Niels van Royena, Jan J. Piekb,1, Ivo Buschmanna, Imo Hoefera, Michiel Voskuilb, Wolfgang Schapera. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular Research* 49 (2001) 543–553
46. Matthias Heil, Wolfgang Schape. Influence of Mechanical, Cellular, and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis) *Circ Res.* 2004;95:449-458.
47. Thomas Mueller, Benjamin Dieplinger, Werner Poelz, Georg Endler, Oswald F. Wagner, and Meinhard Haltmayer. Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide as Predictor of Mortality in Patients with Symptomatic Peripheral Arterial Disease: 5-Year Follow-Up Data from the Linz Peripheral Arterial Disease Study. *Clinical Chemistry* 55:1 Proteomics and Protein Markers 68–77 (2009)
48. Fabien Le Grand and Michael A Rudnicki. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 2007, 19:628–633

49. Michaela Kuhn,¹ Katharina Völker,¹ Kristine Schwarz,¹ Javier Carbajo-Lozoya,² Ulrich Flögel,³ Christoph Jacoby,³ Jörg Stypmann,⁴ Martin van Eickels,⁵ Stepan Gambaryan,^{6,7} Michael Hartmann,¹ Matthias Werner,¹ Thomas Wieland,² Jürgen Schrader,³ and Hideo A. Baba⁸. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase-A system function as stress -responsive regulator of angiogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, Volume 119, Number 7, July 2009.
50. Linden MD, Whittaker P, Frelinger III AL, Barnard MR, Michelson AD, Przyklenk K. Preconditioning ischemia attenuates molecular indices of platelet activation-aggregation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2670–7.
51. Jong-Shyan Wang. Intense exercise increases shear-induced platelet aggregation in men through enhancement of von Willbrand factor binding, glycoprotein IIb/IIIa activation, and P-selectin expression on platelets *Eur J Appl Physiol* (2004) 91: 741–747.
52. Eric J. Heilmann, Sourav K. Kundu, Reynaldo Sio, Carmen Garcia, Ramon Gomez and Douglas J. Christie. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100TM system. *Thrombosis Research*, Vol.87, No.1, pp.159-164.1997
53. Wong SHY et al. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-tiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* 1987;33:214-20.
54. Carbonneau MA. et al. Free and bound malondialdehyde measured as tiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.* 1991;37:14223-9.
55. Yeo KT, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of the Roche NT-pro_BNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay. *Clin Chim Acta* 2003; 338:107-115.