



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOLOGICHE, TORACICHE E VASCOLARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI**

INDIRIZZO: SCIENZE GERIATRICHE ED EMATOLOGICHE

CICLO: XXV

TITOLO

**ESPRESSIONE E RILASCIO DI OSTEOCALCINA DA PARTE DELLE
PIASTRINE: RUOLO NELLA CALCIFICAZIONE DELLE PLACCHE
ATEROSCLEROTICHE?**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Fabrizio Fabris

Supervisore: Ch.mo Prof. Carlo Foresta

Dottorando : Luca De Toni

INDICE

ABSTRACT	pag. 2
INTRODUZIONE	pag. 4
- L'ENDOTELIO	pag. 4
- BASI INFIAMMATORIE DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE	pag. 6
- Ruolo delle piastrine	pag. 7
- PROGRESSIONE DEGENERATIVA DELLA PLACCA ATEROSCLEROTICA	pag. 9
- Formazione della placca fibrosa	pag. 9
- Il processo di calcificazione vascolare	pag. 9
- Cellule residenti nella parete del vaso	pag. 10
- Cellule circolanti	pag. 11
- SCOPO DELLA TESI	pag. 13
MATERIALI E METODI	pag. 14
- Soggetti e preparazione dei campioni.	pag. 14
- Colture cellulari	pag. 15
- Real-Time PCR	pag. 15
- Quantificazione dell'osteocalcina.	pag. 15
- Preparazione delle piastrine	pag. 16
- Citometria a flusso	pag. 16
- Saggio di binding	pag. 17
- Marcatura con mepacrina	pag. 17
- Western blot	pag. 17
- Immunofluorescenza.	pag. 18
- Colorazione di Von Kossa	pag. 19
- Analisi statistica	pag. 19
RISULTATI	pag. 21
- L'osteocalcina è contenuta nei δ -granuli delle piastrine umane e viene rilasciato dopo l'attivazione.	pag. 21
- I megacariociti umani contengono osteocalcina.	pag. 22
- Livelli di osteocalcina nei pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotide	pag. 22
- Osteocalcina e piastrine nelle lesioni aterosclerotiche umane	pag. 23
- Espressione di osteocalcina in linee megacariocitarie umane sottoposte a stimolo ipossico prolungato.	pag. 24
DISCUSSIONE	pag. 25
- CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag. 28
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag. 29
FIGURE	

ABSTRACT

Background: I meccanismi di calcificazione vascolare sono noti solo parzialmente, è però sempre più evidente il ruolo delle cellule osteogeniche circolanti e delle proteine della matrice ossea non collagenosa. Nonostante le piastrine abbiano un precursore mieloide e costituiscano un'interfaccia cellulare tra emostasi, l'infiammazione e l'aterosclerosi, un loro eventuale coinvolgimento nella modulazione della calcificazione vascolare è stato scarsamente studiato. In questo studio è stata valutata l'ipotesi di rilascio di osteocalcina (OCN) delle piastrine e la sua espressione nei vasi dei pazienti affetti da patologia occlusiva dell'arteria carotide.

Metodi: L'espressione e il rilascio di OCN sono stati determinati mediante ELISA, immunofluorescenza, citometria a flusso e Western blot, nei megacariociti e nelle piastrine umane attivate e non attivate. La co-localizzazione di OCN con aggregati piastrinici, macrofagi, ed aree di calcificazione è stato studiato in campioni di tessuto non patologico ed in reperti di carotide da endoarterectomia.

Risultati: Si è potuto evidenziare che le piastrine esprimono OCN granuli- δ CD63-positivi. In seguito ad l'attivazione con stimoli fisiologici, le piastrine rilasciano OCN nel mezzo extracellulare. Espressione di OCN nei megacariociti midollari suggerisce una specificità espressione nella linea differenziativa. Inoltre i trombociti circolanti da pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotide contengono e rilasciano significativamente più OCN rispetto alle piastrine dei controlli sani ($P < 0,0001$), nonostante simili livelli sierici della proteina. Nelle placche aterosclerotiche, ma non nei tessuti normali, il segnale per OCN risultava fortemente sovrapposto alle piastrine CD41-positive nelle aree di calcificazione precoce. Macrofagi CD68-positivi esprimenti OCN, erano presenti alla periferia delle aree calcifiche.

Conclusioni: Considerando il ruolo svolto dalle piastrine nel processo aterosclerotico, il coinvolgimento delle piastrine nel rilascio di OCN nelle lesioni aterosclerotiche, i risultati ottenuti suggeriscono l'approfondimento dell'impatto dei fattori di rischio cardiovascolare e genetici nel preconditionamento del microambiente midollare osseo.

ABSTRACT

Background: Vascular-calcification mechanisms are only partially understood, but the role of circulating calcifying cells and non-collagenous bone matrix proteins in the bone-vascular axis is emerging. Despite platelets represent a cellular interface between hemostasis, inflammation and atherosclerosis and have a myeloid precursor, a possible involvement in the modulation of vascular calcification has been scarcely investigated. We investigated the hypothesis of OC platelet release and its expression in patients with carotid artery occlusive disease.

Methods: Expression and release of OC were determined by Western blot, immunofluorescence, FACS, and ELISA in human resting and activated platelets and megakaryocytes. Co-localization of platelet aggregates, macrophages, OC, and calcifications was studied in carotid endarterectomy specimens and in normal tissues.

Results: We found that platelets express OC and co-localize with CD63 in δ -granules. Upon activation with an endogenous mechanism, platelets release OC in the extracellular medium. Expression of OC in megakaryocytes suggests a lineage specificity. Human platelets contain and release OC in circulating platelets were significantly higher in patients with carotid artery occlusive disease than in healthy controls ($P < 0.0001$), despite similar serum levels. In atherosclerotic plaques but not in normal tissues OC strongly overlapped with CD41+ platelets in the early stage of calcification. CD68+OC+ cells were present at the periphery of the calcified zone. *Conclusions:* Given the active role played by platelets in the atherosclerotic process, the involvement of OC release from platelets in atherosclerotic lesions and the impact of genetic and cardiovascular risk factors in mediating bone-marrow preconditioning should be investigated further.

INDRODUZIONE

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle arterie di grande e medio calibro e rappresenta una fra le prime cause di morte nei paesi industrializzati [Stoner, 2012]. Anatomicamente la lesione caratteristica dell'aterosclerosi è l'ateroma o placca aterosclerotica, ossia un ispessimento della tonaca intima del vaso dovuto principalmente all'accumulo di materiale lipidico e a proliferazione del tessuto connettivo. L'insorgenza delle placche si verifica preferenzialmente in alcune regioni del circolo con manifestazioni cliniche diverse a seconda del letto vascolare colpito. Le lesioni evolvono nel tempo, iniziando dalle strie lipidiche per poi divenire delle vere e proprie placche aterosclerotiche. Queste nelle fasi avanzate possono restringere il lume arterioso provocando stenosi, oppure ulcerarsi e complicarsi con una trombosi sovrapposta portando ad una occlusione dell'arteria.

Studi epidemiologici negli ultimi 50 anni, hanno evidenziato il coinvolgimento di numerosi fattori di rischio nel processo aterosclerotico, tra i quali l'ereditarietà si è dimostrata essere incidente per quasi il 50% dei casi. Dall'altra parte, studi eseguiti su popolazioni migratorie, hanno chiaramente evidenziato il coinvolgimento di alcuni fattori ambientali nell'incidenza della malattia, noti come fattori di rischio cardiovascolare (CRF) ed identificabili nel: diabete mellito, ipertensione, ipercolesterolemia, obesità e stile di vita (fumo, inattività fisica, abitudini alimentari) [Lusis, 2000].

Il processo aterogenetico, la formazione delle placche e la loro evoluzione degenerativa, sono un fenomeno estremamente complesso e multifattoriale non ancora completamente chiarito, all'interno del quale la disfunzione delle cellule endoteliali, su base infiammatoria, sembra rappresentare l'evento scatenante di prioritaria importanza [Brevetti, 2008].

L'ENDOTELIO

Le cellule endoteliali, elementi essenziali della parete dei vasi sanguigni, sono cellule poligonali estremamente appiattite ed allungate. Sono caratterizzate dalla presenza nel loro citoplasma di numerose vescicole di pinocitosi e di organelli specializzati, i corpi di Weibel-Palade, rivestiti da membrana e contenenti il fattore VIII della coagulazione di von Willebrand (vWF) [Young, 2001]. Tali cellule sono strettamente connesse le une alle

altre da complessi giunzionali a formare uno strato singolo e continuo chiamato endotelio o, unitamente alla membrana basale, tonaca intima. Esso riveste l'intero sistema vascolare e, la sua integrità strutturale e funzionale, è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi della parete vasale e della normale circolazione [Schoen, 2006].

L'endotelio vascolare è un tessuto versatile e multifunzionale, considerato un vero e proprio organo endocrino con molte proprietà sintetiche e metaboliche, partecipa attivamente delle interazioni tra sangue e tessuti. In condizioni di integrità strutturale, l'endotelio svolge numerose funzioni:

1. una barriera altamente selettiva rispetto al passaggio delle sostanze circolanti contenute nel torrente ematico, sia per la presenza di giunzioni intercellulari normalmente impermeabili alle grandi molecole quali le proteine plasmatiche, sia perché la capacità di sintesi del collagene e proteoglicani per il mantenimento della membrana basale [Kim, 2009];
2. mantiene l'equilibrio emostatico intravascolare grazie alle sue proprietà anticoagulanti e fibrinolitiche, dovute all'elaborazione di molecole quali prostaciclina e trombomodulina [Gkaliagkousi, 2011];
3. contribuisce in modo determinante alla regolazione del tono vasale in quanto produce sostanze ad azione vasodilatante (come l'ossido nitrico, NO) e sostanze ad azione vasocostrittrice (angiotensina II, endotelina), che in condizioni fisiologiche sono in equilibrio fra loro. L'NO esercita anche un ruolo protettivo nei confronti della parete vasale, inibendo la proliferazione e la migrazione delle cellule muscolari lisce, l'aggregazione piastrinica, l'adesione dei monociti circolanti, modulando quindi la flogosi e l'ossidazione. Per contro le sostanze ad azione vasocostrittrice, oltre a determinare lo spasmo vasale, sono in grado di promuovere infiammazione e danno vascolare [van Hinsbergh, 2012].
4. produce citochine modulanti la reazione infiammatoria acuta, tra cui le IL-1, IL-6 e IL-8 ed esprime sulla superficie luminale numerose molecole di adesione cellulare quali: VCAM-1, ICAM, E-selectina, P-selectina [Hursting, 2012];
5. regola la crescita cellulare mediante la produzione di fattori stimolanti (PDGF, CSF, FGF) e di fattori inibenti (eparina, TGF- β). [Pozzati, 2004; Schoen, 2006; Young, 2001]

In tutte le condizioni nelle quali le sostanze ad azione vasocostrittrice prevalgono con i propri effetti lesivi sulle sostanze ad azione vasodilatante, si verifica la condizione di “disfunzione endoteliale”, definita come un fenotipo alterato delle cellule dell’endotelio vascolare, associata a compromissione della vasoreattività ed alterazione della superficie cellulare, verso un’attività trombogena o anormalmente adesiva nei confronti delle cellule infiammatorie e dei trombociti [Theilmeier, 2002].

Tutto ciò è responsabile, almeno in parte, dell’insorgere dei fenomeni di trombosi, aterosclerosi e delle lesioni vascolari tipicamente associate ai CRF quali l’ipertensione ed il diabete.

BASI INFIAMMATORIE DELLA DISFUNZIONE ENDOTELIALE

Lo stato metabolico alterato che tipicamente si associa ai classici fattori di rischio cardiovascolare, in particolare l’iperglicemia cronica, la dislipidemia e l’insulino resistenza, è in grado di indurre una disfunzione a livello del sistema vascolare arterioso inizialmente a livello delle cellule endoteliali e coinvolgendo successivamente i leucociti infiammatori e le piastrine. In particolare, l’iperglicemia porta ad una progressiva inibizione del sistema NO-sintasi endoteliale (eNOS), inducendo precocemente un’alterata vasodilatazione endotelio-dipendente, mediata dall’ossido nitrico (NO) [Nakagami, 2005]. L’aumento dei livelli ematici di glucosio è inoltre in grado di provocare, sempre a livello endoteliale, un aumento nella produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS) [Giacco, 2010], fenomeno ulteriormente sostenuto dal rilascio di acidi grassi liberi in eccesso dal tessuto adiposo, attraverso l’attivazione della protein chinasi C (PKC) ed inibizione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) [Tripathy, 2003]. Tali eventi convergono verso una aumentata produzione di sostanze vasocostrittrici a livello endoteliale, quali l’ endotelina-1, i prostanoidei ed l’angiotensina II [De Vriese, 2000], nonché verso la formazione di prodotti di perossidazione lipidica. L’inibizione degli stimoli vasodilatanti, unito al perdurare dell’insulino resistenza, l’iperglicemia, l’ipercolesterolemia e le lipoproteine modificate, determinano una generale attivazione delle cellule endoteliali verso un fenotipo pronò all’adesione delle cellule infiammatorie. Si assiste infatti all’aumentata espressione di molecole di adesione, quali la P-selectina e vascular cell adhesion molecole-1 (VCAM-1), così come il rilascio fattori chemiotattici, tra i quali il monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), che mediano il reclutamento di monociti e linfociti circolanti, favorendo la

migrazione e la diapedesi di questi ultimi adesi all'endotelio, [Tai , 2002; Katsume , 2011; Vladykovskaya, 2012]. I monociti aderenti alle cellule endoteliali vanno incontro ad up-regolazione e rilascio di metalloproteasi di membrana-9 (MMP9), promuovendo la successiva infiltrazione di leucociti attraverso lo strato endoteliale e la membrana basale [Reel, 2011]. All'interno dell'intima infiammata, ed in seguito al rilascio del Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) da parte di quest'ultima, i monociti sottostanno ad un processo di maturazione che li porta a macrofagi attivati [Takahashi, 2001]. Parallelamente, i macrofagi manifestano un'aumentata l'esposizione in superficie dei recettori scavenger, che favoriscono l'endocitosi e l'accumulo di esteri di colesterolo nel citoplasma e la conseguente trasformazione del macrofago in cellula schiumosa [Takahashi, 2001]. I macrofagi vanno inoltre incontro a proliferazione e conseguente amplificazione della risposta infiammatoria mediante il rilascio delle citochine: tumor necrosis factor α (TNF α) ed interleuchina 1 β (IL1 β). L'accumulo localizzato di cellule schiumose nell'intima determina la formazione della stria lipidica che caratterizza la lesione precoce dell'aterosclerosi.

Nelle fasi precoci dell'aterogenesi, un ruolo importante assume la sottopopolazione dei linfociti T-CD4+, reattivo verso antigeni associati alle LDL ossidate e prodotti di perossidazione lipidica. Queste cellule amplificano l'attività infiammatoria locale producendo citochine proinfiammatorie quali interferon γ (IFN- γ) e il ligando del CD40 (CD40L), contribuendo al perpetrarsi del fenomeno infiammatorio ed alla progressione della lesione ateromastica [Ward, 2009]. Dall'altro lato, la patologia diabetica amplifica tutti questi processi patologici. Infatti l'iperglicemia, attraverso la diminuzione del NO, l'aumento dello stress ossidativo e l'attivazione del recettore per i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE), determina l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare κ B e dell'attivatore della proteina 1. Questi fattori regolano l'espressione di geni che codificano per un vasto numero di mediatori dell'aterogenesi quali, ad esempio, la già citate molecole di adesione endoteliali, MCP-1 e mediatori proinfiammatori TNF α ed IL1 [Takahashi, 2001].

Ruolo delle piastrine

Precedentemente considerato come un sistema indipendente, è oggi noto che il sistema emostatico è un determinante cruciale nell'infiammazione endoteliale, aterogenesi

e aterotrombosi [Croce, 2007; Borissoff, 2011]. Dati sperimentali ottenuti da modelli animali dimostrano come l'infusione cronica di piastrine attivate in topi dislipidemicici provochi una recrudescenza del fenomeno aterosclerotico [Gawaz, 2008]. Inoltre, in topi transgenici caratterizzati da accelerata aterosclerosi, il trattamento farmacologico con antagonisti del recettore per l'ADP è in grado di ridurre drasticamente le dimensioni delle placche, così come indurre la stabilizzazione aumentando, in proporzione, il numero delle placche fibrose [Afek, 2009]. Infine, grazie a tecniche di microscopia intravitale in modelli murini dislipidemicici, è stato possibile evidenziare una precoce adesione delle piastrine attivate nelle sedi di lesioni endoteliali prima che queste divengano anatomicamente evidenti [Theilmeyer, 2002].

Le piastrine rappresentano un'interfaccia cellulare tra l'emostasi e aterosclerosi, anche a causa del loro ruolo nell'infiammazione. Attraverso le interazioni che coinvolgono la P-Selectina, vWF, la glicoproteina Iba e le integrine $\beta 3$, le piastrine aderiscono all'endotelio attivato secernendo mediatori coinvolti nel processo aterogenico, tra le quali citochine, chemochine, fattori di crescita, molecole di adesione e fattori della coagulazione [Coppinger, 2004]. Infatti, alcune prostaglandine prodotte dal complesso delle ciclo-ossigenasi piastrinico sono in grado di modulare tanto i fenomeni trombotici quanto quelli infiammatori. D'altro canto la trombina, principale proteina mediatrice della coagulazione, può indurre l'espressione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule muscolari lisce vascolari e quelle endoteliali. Le piastrine stesse, quando attivate, possono rilasciare citochine proinfiammatorie conservate al loro interno nonché esporre sulla loro superficie un potente stimolo proinfiammatorio: il ligando del CD40 (CD154). E' stato inoltre dimostrato che le piastrine possono rilasciare un altro mediatore dell'infiammazione come la mieloid-related protein (MRP) -8/14 [Healy, 2006]. MRP-8/14 è in grado di interagire con il toll-like receptor-4 (TLR4), attivando l'immunità innata tipicamente correlata a questo recettore [Vogl, 2007] inducendo, ad esempio, l'apoptosi delle cellule endoteliali: un processo implicato nella trombosi associata alla placca [Viemann, 2007]. Considerato il ruolo chiave nel processo aterogenico, questa molecola etero-dimerica viene oggi utilizzata come un biomarker per eventi cardiovascolari sia in pazienti con pregressa sindromi coronariche acute sia in popolazioni di soggetti apparentemente sani [Morrow, 2008].

PROGRESSIONE DEGENERATIVA DELLA PLACCA ATEROSCLEROTICA

Formazione della placca fibrosa

Se l'accumulo delle cellule schiumose a livello dell'intima caratterizza la formazione della stria lipidica, la deposizione di tessuto fibroso caratterizza la lesione aterosclerotica più avanzata. Le cellule muscolari lisce sintetizzano la matrice extracellulare, determinando l'evoluzione della placca: in risposta a vari fattori prodotti dai macrofagi, dalle cellule endoteliali e dalle piastrine, le cellule muscolari lisce migrano dalla tonaca media all'intima mediante la degradazione della matrice extracellulare favorita dal rilascio di MMP-9 e altre proteasi [Iyemere, 2006]. Una volta all'interno dell'intima, le cellule muscolari lisce proliferano sotto lo stimolo dei fattori di crescita rilasciati dalle componenti del vaso infiammato, producendo proteine della matrice extracellulare. Questo processo causa l'evoluzione della lesione ateromasica ricca in lipidi a placca fibrotica e infine calcifica, associata a stenosi del vaso [Renè, 2008].

Oltre ad amplificare l'effetto dei fattori pro-aterogenetici, il diabete promuove l'instabilità di placca e le relative conseguenze cliniche. Le citochine prodotte dalle cellule endoteliali sotto lo stimolo iperglicemico, determinano la diminuzione della sintesi de novo del collagene da parte delle cellule muscolari lisce. In queste ultime si assiste all'attivazione del sistema mediato da PKC, recettore per gli AGEs e il fattore di trascrizione nucleare κ B, così come precedentemente descritto per le cellule endoteliali, che ha come conseguenza l'aumentata produzione di MMP. Il risultato è l'indebolimento e potenziale rottura del cappuccio fibroso ricco di collagene. Tali lesioni ateromasiche instabili, causa di trombosi potenzialmente fatali, sono caratterizzate da un numero ridotto di cellule muscolari lisce [Libby 2001], come evidenziato da recenti studi riportanti minor numero di questa componente cellulare nei pazienti diabetici rispetto ai controlli [Fukumoto 2000]

Il processo di calcificazione vascolare

Il processo di calcificazione vascolare è definito come una deposizione di calcio e fosfato all'interno della tonaca vascolare media. Per molto tempo si è pensato che le calcificazioni vascolari fossero un processo esclusivamente passivo, dovuto alla semplice precipitazione di calcio e fosfato. Tuttavia recenti studi hanno messo in evidenza come lo sviluppo delle lesioni calcifiche sia in realtà un processo attivo, simile all'osteogenesi. Essa

infatti procede attraverso meccanismi attivi cellulo-mediati che coinvolgono l'induzione dell'osteogenesi e la perdita degli inibitori della mineralizzazione [Steitz *et al*, 2001], culminando con la deposizione di matrice extracellulare e proteine della matrice ossea da parte di cellule con fenotipo simile agli osteoblasti [Steitz *et al*, 2001; Jono *et al*, 2006; Johnson *et al*, 2006].

In particolare, la calcificazione vascolare è il risultato di una serie di processi sequenziali non ancora completamente chiariti, durante i quali prendono parte molte popolazioni cellulari residenti nella parete del vaso e circolanti nel torrente sanguigno [Jono *et al*, 2006].

Cellule residenti nella parete del vaso.

E' stato dimostrato sperimentalmente che alcune cellule vascolari di origine mesenchimale quali: cellule muscolari lisce, miofibroblasti e periciti microvascolari, possono subire una differenziazione osteogenica trasformandosi in cellule simili agli osteoblasti in seguito agli stessi stimoli cronici che sottendono ai CRF. Tali cellule vanno incontro ad una progressiva perdita dei caratteristici marcatori fenotipici originali e sviluppano caratteristiche tipiche degli osteoblasti, cominciando ad esprimere proteine associate all'osso quali osteocalcina, osteopontina, fosfatasi alcalina, etc. Le popolazioni cellulari principalmente coinvolte nel processo di differenziazione osteoblastica sono:

cellule vascolari muscolari lisce (VSMCs). Sotto diversi stimoli quali: lo stress ossidativo, cambiamenti nei livelli di pirofosfato extracellulare e l'aumento dell'espressione delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs), queste cellule possono differenziare in senso osteogenico.

Le BMPs appartengono alla famiglia delle proteine transforming growth factor- β (TGF- β) e rappresentano importanti mediatori della calcificazione vascolare. In particolare, BMP-2 è in grado di indurre l'up-regolazione di fattori di trascrizione pro-osteogenici come core-binding factor alpha1 (Cbfa1) e Osterix. Infatti Cbfa1, in associazione ad Osterix, è in grado di controllare l'espressione di diverse proteine della differenziazione osteoblastica (osteocalcina, osteopontina, Collagene di tipo I, etc.) [Steitz *et al*, 2001; Johnson *et al*, 2006]. Fattori quali lo stress ossidativi, possono indirizzare le VSMCs verso il fenotipo osteoblastico stimolando l'espressione di BMP-2 e di conseguenza di Cbfa1.

Studi su modelli *in vitro* hanno dimostrato che elevate concentrazioni extracellulari di fosfato e calcio sono in grado di stimolare la differenziazione osteogenica delle VSMCs in modo sinergico ed indipendente [Farzaneh-Far and Shanahan, 2005]. In tali cellule infatti, le elevate concentrazioni di fosfato stimolano l'uptake del fosfato stesso mediante un processo attivo mediato da Pit-1, un co-trasportatore di fosfato sodio dipendente, la cui espressione è up-regolata dalle elevate concentrazioni di calcio [Shanahan, 2005]. Successivamente, da un lato il fosfato tende a precipitare con il calcio, dall'altro induce in maniera diretta l'espressione di Cbfa1 [Giachelli, 2003]. Infine, elevati livelli di calcio e fosfato sembrano in grado di indurre *in vitro* la capacità delle VSMCs di rilasciare simili vescicole di matrice o corpi apoptotici [Farzaneh-Far, 2005] che agirebbero come sito iniziale per la cristallizzazione in apatite assumendo attivamente calcio e fosfato dall'ambiente circostante [Proudfoot, 2000; Farzaneh-Far, 2005].

Periciti. Queste cellule, strettamente associate all'endotelio della microvascolatura, sono considerate dei progenitori mesenchimali residenti [Tilton, 1991] con capacità di differenziare in osteoblasti e condrociti [Doherty and Canfield, 1999]. Nel processo di calcificazione vascolare i periciti possono essere attivati *in situ* e rilasciando noduli contenenti collagene di tipo I, osteopontina, matrix gla-protein e osteocalcina [Abedin et al, 2004]. Alternativamente, durante il processo di neoangiogenesi vascolare che si associa alla calcificazione, si assiste alla migrazione dei periciti all'interno del vaso dove differenziano in senso osteoblastico o rivestono il ruolo di trasportatori passivi di cellule osteoprogenitrici circolanti [Johnson et al, 2006].

Cellule circolanti

Se la disfunzione endoteliale rappresenta l'elemento più precoce nello sviluppo dell'aterosclerosi e patologie correlate, la rigenerazione endoteliale appare essere di fondamentale importanza per il mantenimento della funzione cardiovascolare [Endemann, 2004]. In quest'ambito, le cellule endoteliali mature detengono un ruolo inferiore a causa del loro scarso potenziale rigenerativo [Caplan, 1973]. Al contrario, le teorie più recenti vedono l'evoluzione del processo aterosclerotico, sia esso degenerativo o rigenerativo,

come il risultato della partecipazione di popolazioni eterogenee di cellule progenitrici circolanti, attive nel processo neovascolarizzazione sotteso dalla placca vascolare [Rafii S, 2003]. E' infatti noto come un'intensa attività angiogenica caratterizzi le lesioni attive, in particolare nelle zone di calcificazione dove si assiste alla formazione di vasi neoformati tra tonaca media e neointima [Kamat, 1987]. In quest'ambito, di fondamentale importanza è il ruolo delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) circolanti (Figura 2). Esse infatti, risiedendo essenzialmente nel midollo osseo, vengono mobilizzate nel torrente ematico in risposta a lesioni vascolari e contribuiscono alla rigenerazione vascolare insediandosi nella lesione e differenziandosi in cellule endoteliali mature [Asahara, 1997; Rafii S, 2003].

Oltre alle EPC, nel midollo osseo risiedono numerose altre popolazioni di cellule progenitrici con fenotipo mesenchimale capaci di dare origine ad un ampio spettro di tessuti connettivi pienamente differenziati, tra i quali gli osteoblasti [Friedenstein, 1968; Long, 1990; Long, 1995]. L'isolamento di cellule circolanti, di origine midollare, con caratteristiche funzionali pre-osteoblastico è ampiamente documentato in letteratura, seppur non esista un punto di vista univoco sulle caratteristiche fenotipiche di origine. Infatti le cellule midollari umane CD34-positive, originariamente considerate esclusivamente progenitrici della linea ematopoietico-endoteliale, possono differenziare in cellule osteoblastiche capaci di formare noduli di mineralizzazione *in vitro* [Chen, 1997; Eghbali-Fatourechi, 2005; Eghbali-Fatourechi, 2007]. Allo stesso modo, il 20% delle cellule CD34-positive isolate del sangue periferico umano esprime RNA messaggero per osteocalcina (OCN), una tipica proteina della matrice extracellulare ossea [Eipers, 2000, Matsumoto, 2006]. Recenti evidenze ascrivono alle cellule progenitrici circolanti che esprimono sulla loro superficie OCN, un ruolo attivo nella patogenesi e progressione dell'aterosclerosi. Gössl e collaboratori hanno documentato come cellule EPC OCN-positive circolanti, caratterizzate immunofenotipicamente per l'espressione dei marker CD34, CD133, KDR ed OCN ed in grado di dare origine a noduli di mineralizzazione *in vitro*, siano significativamente più rappresentate, a livello ematico, in soggetti con gradi più severi di aterosclerosi coronarica [Gössl, 2008]. Analogamente, studi condotti dal nostro gruppo hanno documentato livelli ematici di cellule EPC OCN-positive circolanti più elevati, rispetto ai soggetti di controllo, nei pazienti affetti da disfunzione erettile e in quelli caratterizzati da ipogonadismo-ipogonadotropo, due condizioni cliniche intimamente correlate alle fasi più precoci della disfunzione endoteliale ed aterogenesi [Foresta, 2009;

Foresta, 2010]. Inoltre in un recentissimo studio di Fadini e collaboratori, è stata isolata una popolazione di cellule mieloidi calcificanti (MCCs) positive per OCN e per fosfatasi alcalina ossea (BAP). I livelli di MCC si rivelavano più elevati nel sangue periferico e nel midollo osseo di pazienti con diabete di tipo 2 rispetto ai controlli; tale condizione veniva ridotta in regime controllo glicemico [*Fadini, 2011*]. Infine, lo studio istologico di placche carotidee da soggetti diabetici ha evidenziato il più alto grado di calcificazione laddove più elevato risultava l'insediamento di cellule esprimenti OCN e BAP, in colocalizzazione con il marker macrofagico CD68 [*Fadini, 2011*].

SCOPO DELLA TESI

L'evoluzione in senso rigenerativo o degenerativo di una placca aterosclerotica appare quindi il risultato di un bilancio tra fattori cellulari e biochimici che alterano il microambiente della parete del vaso, modulando lo stato infiammatorio che ha innescato l'intero processo. Recenti evidenze attribuiscono alle piastrine un coinvolgimento nella progressione calcifica della placca. E' infatti noto che le piastrine, una volta attivate, siano in grado di rilasciare osteonectina: una proteina della matrice cellulare ossea riscontrabile nelle lesioni calcifiche [*Stenner, 1986*]. Inoltre il fattore piastrinico 4 (PF4), una chemochina con ruolo pro-aterogenico rilasciata dalle piastrine attivate, è stato rinvenuto nel citoplasma delle cellule endoteliali, nei macrofagi e nelle aree di calcificazione della placca ateromastica. Il grado di deposizione di PF4, appare significativamente e positivamente correlato alla severità della lesione vascolare [*Pitsilos, 2003*]. Infine, il rinvenimento di OCN in corrispondenza di depositi di fibrina II nella placca calcifica e non associato ad alcuna componente cellulare specifica, suggerisce che questa proteina derivi da componenti ematiche quali il plasma o le piastrine [*Bini, 1999*].

Sotto l'ipotesi che le piastrine possano esprimere OCN, lo scopo di questa tesi di dottorato è lo studio del rilascio di OCN delle piastrine e la sua espressione nei pazienti con malattia occlusiva dell'arteria carotide.

MATERIALI E METODI

Soggetti e preparazione dei campioni.

Tutti i pazienti hanno sottoscritto il consenso informato per la partecipazione allo studio, approvato dal comitato etico locale e realizzato secondo i principi della dichiarazione di Helsinki. I campioni di piastrine umane isolate da sangue periferico per i saggi di Western blot, immunofluorescenza ed ELISA, sia in condizione di riposo e dopo l'attivazione, sono stati ottenuti da dieci volontari (sette maschi, tre femmine; età media 36.3 ± 3.9 anni) con anamnesi medica e chirurgica non rilevante. I partecipanti sono stati arruolati in modo consecutivo.

I donatori sono stati sottoposti a prelievo di sangue periferico (7 mL) in provette contenenti citrato trisodico 3,8% (Becton Dickinson, Milano, Italia). Il plasma ricco di piastrine (PRP) è stato ottenuto dopo centrifugazione a 160 g per 10 min a temperatura ambiente.

I campioni di biopsia del midollo osseo umano da tre pazienti caratterizzati da trombocitopenia autoimmune, esenti da coinvolgimento del midollo osseo e da trattamento farmacologico con antiaggreganti piastrinici o ormoni steroidei, sono stati usati come reperti di controllo per gli studi di immunofluorescenza.

I campioni di arteria carotidea, e corrispondenti prelievi di sangue periferico, sono stati prelevati da 19 pazienti di sesso maschile affetti patologia oclusiva dei tronchi sovra-aortici, candidati a trattamento chirurgico di endoarterectomia presso il dipartimento di Scienze Chirurgiche Vascolari e Toraciche della Clinica Universitaria di Padova (caratteristiche cliniche nella tabella 1). 28 soggetti maschi volontari con non rilevante anamnesi medica e chirurgica, sono stati arruolati come soggetti di controllo (caratteristiche cliniche nella tabella S1). I criteri di esclusione erano: il genere femminile, infezioni in fase acuta, tumori maligni. Il diabete/alterata tolleranza al glucosio è stata definita secondo i criteri ADA [*American Diabetes, 2010*]. L'ipercolesterolemia, ipertensione e obesità viscerale venivano definiti secondo parametri clinici, anamnesi/analisi serologica e farmacologica. Nel gruppo di controllo, le patologie cerebrovascolari concomitanti venivano escluse in base all'assenza di storia di ictus, attacco ischemico transitorio, o assenza di stenosi carotidea superiore al 30% su base ecografica.

Colture cellulari

Le cellule MEG-01 sono state coltivate in plastiche per coltura standard, in terreno RPMI 1640 (ATCC, Manassas, VA), supplementato con 10% FBS, in ambiente termostato a 37 ° C, umidificato e al 5% di CO₂. Ove necessario, le cellule sono state coltivate in vetrini sterili con camere da 8 pozzetti. L'ambiente ipossico è stato realizzato mediante il sistema AnaeroGen (Oxoid Ltd) che impiega sequestranti dell'ossigeno in contenitori ermetici [Potier, 2007] e protratto per 72h. Campioni coltivati in condizioni standard per il medesimo lasso di tempo, sono stati utilizzati come controllo. Al termine dello stimolo ipossico, le cellule sono state raccolte per l'analisi di espressione genica, proteica (si veda la sezione “*quantificazione dell'osteocalcina*”) e per l'immunofluorescenza.

Real-Time PCR

L'RNA totale è stato isolato dalle cellule coltivate con il kit RNeasy Mini (Qiagen, Milano, Italia) e utilizzato per la sintesi del first-strand cDNA mediante l'impiego della trascrittasi inversa Superscript III (Invitrogen, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. La Real-Time PCR quantitativa è stata eseguita come descritto in precedenza [Ferlin, 2010]. I set di coppie di primer (introne spanning) utilizzati per quantificare il livello di espressione del mRNA di β -actina (gene housekeeping) ed OCN, tramite PCR quantitativa in real time con SYBR Green (Applied Biosystems, Milano, Italia) sono dettagliati in tabella 2. I dati sono stati normalizzati per il gene housekeeping. I risultati sono riportati come media di tre diversi esperimenti indipendenti eseguiti in triplice copia.

Quantificazione dell'osteocalcina.

Livelli serici di OCN, il contenuto di OCN delle piastrine e cellule MEG-01 dopo estrazione della proteina (si veda la sezione “*Western blot*”) e la quantificazione del rilascio OCN nel surnatante dopo attivazione piastrinica, sono stati valutati mediante kit ELISA (Takara, Basilea, Svizzera) secondo le istruzioni del produttore.

Preparazione delle piastrine.

Per il saggio di western blot, il pellet di piastrine da ogni campione ematico è stato preparato dal corrispondente PRP addizionato EDTA/PBS 2% 1:5 (vol/vol), per impedire l'attivazione piastrinica spontanea, stato lavati in tampone Tyrode. Ove necessario, l'attivazione piastrinica è stata ulteriormente bloccata mediante l'uso di apyrase (Sigma Aldrich, Milano, Italia) ad una concentrazione di 1UI/mL.

Per gli esperimenti di attivazione di piastrine, il PRP trattato con citrato-destrosio (ACD) e apyrase (2 UI/ml), è stato centrifugato a g 700 giri/min per 7 min in assenza di freno. Il pellet di piastrine è stato poi lavato con tampone Tyrode a pH 6,3 e centrifugato una seconda volta nelle stesse condizioni. Il pellet è stato quindi risospeso in Tyrode tampone pH 7.2, addizionato di con MgCl₂ 2nM e CaCl₂ 200 mM. Per ciascun pellet lavato, sono state realizzate tre aliquote delle quali: una è stata impiegata come un campione di riposo, le altre due sono state attivate rispettivamente con Ca-ionoforo (A23187, Fluka, Milano, Italia), ad una concentrazione finale di 20 µmol/L, e collagene 2 µg/ml, per 30 min con agitazione continua a temperatura ambiente. I campioni sono stati infine centrifugati alla massima velocità per raccogliere i pellets e i supernatanti per i dosaggi ELISA. Prima della centrifugazione, una aliquota di piastrine attivate e non attivate sono state fissate in PFA/PBS 2%, risospese in tampone Tyrode e strisciate su vetrini per microscopia SuperFrost®Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germania) per il saggio di immunofluorescenza.

Citometria a flusso

L'Attivazione piastrinica è stata valutata mediante l'espressione del marcatore CD62-P (P-Selectina) dopo il trattamento di campioni con ADP (0.1 mmol/L), impiegato come attivatore piastrinico di riferimento. L'attivazione con collagene-2 induceva una rapida formazione di coagulo piastrinico, incompatibile con l'analisi di citometria a flusso. In breve, le piastrine risospese in tampone Tyrode sono state incubate con anticorpo monoclonale anti-CD62-P PE-coniugato (1:50; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) per 15 min a temperatura ambiente e al riparo dalla luce diretta. Il controllo negativo, dove le piastrine sono state incubate con anticorpo anti-mouse IgG1 isotipico PE-coniugato (BD Biosciences) alla stessa diluizione finale, è stato utilizzato per impostare la fluorescenza di fondo. Infine, i campioni sono stati analizzati con citofluorimetro FACScan (BD

Biosciences), acquisendo 50.000 eventi nella regione morfologicamente attribuibile alle piastrine. Il valore di intensità di fluorescenza sottostante il 99° percentile della curva di controllo non attivato, è stato considerato come soglia per la quantificazione dell'attivazione di piastrine.

Saggio di binding

Il pellet piastrinico non attivato è stato risospeso in tampone di binding (50 mM TrisHCl [pH 7.4], 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA e 0,1% BSA) per 15 min e incubate per 1 ora in presenza di osteocalcina biotinilata. Per l'analisi della spiazzamento, è stato aggiunto un eccesso di osteocalcina non marcata pari a 100 volte la concentrazione di OCN biotinilata. Dopo tre lavaggi in PBS freddo, i campioni sono stati incubati con streptavidina-FITC (Sigma Aldrich) per 15 min a temperatura ambiente. Come controlli negativi sono state impiegate piastrine incubate con streptavidina-FITC. Campioni sono stati poi valutati con FACScan flowcytometer (BD Biosciences).

Marcatura con mepacrina

La marcatura con mepacrina (Quinacrine; Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) è stata eseguita ad una concentrazione finale di 0,05 mM al buio per 30 minuti a 37 ° C. Per ogni campione marcato, una aliquota è stata mantenuta “fredda” per misurare l'autofluorescenza. Le piastrine positive alla marcatura con mepacrina sono state considerate come aventi un'intensità di fluorescenza superiore al 99° percentile della curva di controllo non marcato. Attivazione è stata indotta per incubazione con Ca-ionoforo, ad una concentrazione finale di 20 µmol/L per 20 min a temperatura ambiente al buio, ed è stata successivamente valutato il decadimento della fluorescenza verde mediante citometria di flusso.

Western blot

L'Estrazione delle proteine dal pellet piastrinico non attivato, è stata eseguito mediante procedura fisica (cicli di congelamento-scongelo in azoto liquido, seguita da bagno in acqua a 37 ° C) in buffer di lisi (Bio-Rad, Hercules, CA USA) contenente un inibitore delle proteasi. Campioni sono stati poi denaturati con SDS e 2-β-mercaptoetanolo, sottoposti a bollitura per 10 min e frazionato mediante elettroforesi su gel SDS-PAGE (Bio-

Rad). Come un campione di riferimento è stato impiegato una libreria commerciale da tessuto osseo (Abcam, Cambridge, UK). Dopo trasferimento su membrana in nitrocellulosa Hybond ECL (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) e saturazione con latte scremato al 5% in PBS-Tween 20 allo 0,1% (Bio-Rad), le membrane sono state incubate overnight a 4 ° C con anticorpo mouse anti-human OC (sc-74495; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:200 diluito in tampone PBS-Tween 20 allo 0,1% e latte scremato al 5%. L'immuno-reazione primaria è stata rilevata mediante incubazione con anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (1:2,000; Santa Cruz Biotechnology) e visualizzati mediante kit di chemiluminescenza enzyme-linked (ECL) con il sistema XRS Chemidoc (Bio-Rad). La β -actina (sc-47778; Santa Cruz Biotechnology), è stata utilizzata come riferimento interno.

Immunofluorescenza.

I campioni di piastrine fissate e le cellule MEG-01 fissate, sono state permeabilizzate per trattamento con Triton X-100/PBS all'1%, per 10 min a temperatura ambiente.

Le sezioni di midollo osseo, fissate in glutaraldeide ed incluse paraffina, sono stati deparaffinate, reidratati e sottoposte a smascheramento dell'antigene mediante bollitura per 15 min in tampone citrato 0.1 M (pH 7,9).

I campioni dell'arteria carotide umano congelato da pazienti sottoposti a procedura di endoarterectomy, tagliate in sezioni da 8 μ m, sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 15 min a temperatura ambiente.

Tutti i campioni sono stati successivamente saturati con normal donkey serum 5% /BSA 5% in PBS e sottoposti a doppio staining per co-incubazione con anticorpo anti-human OCN (sc-18319, 1:100; Santa-Cruz biotecnologie) e un pannello di anticorpi made in mouse: CD41 (1:200; Abbiotec LLC, San Diego, CA, USA), β -actina (1:200; Santa Cruz Biotechnology), vWF (1:200; DB-Pharmingen, Milano, Italia), CD63 (1:200; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), CD68 (1:200; Santa Cruz) e α -SMA (1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Nel controllo negativo, sono stati omessi gli anticorpi primari.

In una sessione distinta è stata eseguita un doppio staining per co-incubazione con rabbit anti-human GPRC6A (1:100, sc-67302; Santa-Cruz biotecnologie) e mouse anti-CD41 (1:200).

L'immunoreazione primaria è stato adeguatamente rilevato tramite l'uso di reagente secondario, coniugato con FITC o TexasRed. Infine, le sezioni sono state controcolorate con DAPI, montate con anti-fade buffer e analizzati con microscopio a fluorescenza Videoconfocale (VICO, Nikon, Firenze, Italia).

Per la quantificazione della collocazione CD41 e OC, è stata realizzata una matrice XY RGB per analizzare l'intensità di segnale pixel-per-pixel nei tre canali, corrispondenti a OC (rosso), CD41 (verde) e nuclei (blu). Segnali con intensità superiori a 2 deviazioni standard (DS) della media di fondo sono stati considerati positivi. I segnali RGB sono state riportati in un diagramma di Venn per rappresentare graficamente il grado di sovrapposizione tra i colori.

Per l'identificazione dei depositi di calcio, i campioni asciugati all'aria sono stati colorati Rosso Alizarina 2% (pH 4.2) per 5 min a temperatura ambiente. I vetrini sono state infine controcolorati con ematossilina, disidratati, montati e valutati con microscopio a trasmissione.

Colorazione di Von Kossa

La conferma dei depositi di calcio è stata eseguita mediante colorazione di Von Kossa. Brevemente, le sezioni sono state immerse nel di nitrato di argento al 5% in acqua e irradiate con lampada UV per 20 min. Dopo il lavaggio, i campioni sono stati trattati con tiosolfato di sodio al 2% per min. Infine le sezioni sono state disidratate, montate e valutate con microscopio a trasmissione.

Analisi statistica.

Tutte le statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (versione 19; SPSS Inc Chicago, IL, USA). Tutti gli esperimenti per il rilascio OC sono stati eseguiti in triplicato. Confronto tra le medie è stato effettuato mediante il test *t*-Student a due code non accoppiato. Le differenze tra l'OCN totale tra tutti i gruppi di pazienti sono state valutate utilizzando il test di Kruskal-Wallis. Il Test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare le medie tra i due gruppi. Le correlazioni tra le variabili continue sono state

valutate mediante test di correlazione ρ di Spearman non parametrico. Il livello di significatività è stato impostato per valori di P inferiori a 0.05.

RISULTATI

L'osteocalcina è contenuta nei δ -granuli delle piastrine umane e viene rilasciato dopo l'attivazione.

L'analisi dell'espressione proteica nelle piastrine umane attivate e non attivate è stata eseguita mediante Western blot, utilizzando anticorpi specifici OCN ed un omogenato commerciale di tessuto osseo normale in qualità come controllo positivo. Una banda specifico di circa di kDa 5, corrispondente alla Gla-proteina OCN, era rilevabile per ogni campione (Figura 1A). La valutazione della densità della banda ha evidenziato che l'attivazione riduceva significativamente contenuto OC delle piastrine (figura 1B). Espressione di OCN all'interno delle piastrine umane è stata confermata dal saggio di doppia immunofluorescenza, utilizzando la tecnologia video-confocale per ridurre l'influenza del rumore di sfondo. Il CD41 è stato utilizzato come un marcatore specifico di membrana delle piastrine [Rubenstein, 2009] e la β -actina come proteina del citoscheletro. La colorazione per OCN è apparsa come un segnale specifico con pattern punteggiato incluso nel citoplasma di piastrine (definito dal segnale omogeneo della β -actina) ed assente sulla membrana (definita dal segnale per CD41) (figura 1 C-D).

La localizzazione cellulare della proteina OCN nelle piastrine è stata valutata mediante saggio di immunofluorescenza, utilizzando il vWF come un marcatore specifico dei granuli- α [McGrath, 2010] e CD63 dei granuli- δ [Viisoreanu, 2007] (figura 1E-F). Osservate a forte ingrandimento, il segnale punteggiato per OC è apparso essenzialmente sovrapposto con lo staining per CD63, suggerendo che l'OCN sia contenuta nei granuli δ .

Per escludere qualsiasi legame specifico dell'OCN sulla membrana piastrinica, è stato eseguito un saggio di immunofluorescenza per l'espressione di GPRC6A, il recettore putativo per OCN [Pi, 2005] e nessun segnale specifico per questo antigene è stato rilevato (figura 2A). Inoltre, al fine di valutare qualsiasi legame non specifico, è stato eseguito un saggio di spiazzamento. Nessun segnale significativo, rispetto al controllo negativo, era rilevabile quando OCN biotinilata veniva impiegata come un ligando. La co-incubazione con un eccesso di OCN "fredda" (100 volte) non dava origine alcuna variazione nella risposta (figura 2B).

L'incubazione delle piastrine lavate con ADP, attivatore trombocitario di riferimento, portava ad un l'aumento medio di circa il 38% per la lo staining del CD62-P,

mediante citometria a flusso (figura 3B). Parallelamente, il dosaggio della concentrazione di OCN nel surnatante di incubazione aumentava significativamente dopo l'attivazione delle piastrine (figura 2C. Attivazione con collagene-2: 0.94 ± 0.07 ng/mL/ 10^6 piastrine; attivazione con Ca-ionoforo: 0.60 ± 0.08 ng/mL/ 10^6 piastrine; non attivate: 0.25 ± 0.02 ng/mL/ 10^6 piastrine. $P < 0,05$). Conseguentemente, l'attivazione provocava una riorganizzazione complessiva del segnale per OCN e CD63: da una punteggiatura citoplasmatica (figura 4A) a segnale continuo delineante la membrana cellulare (figura 4B). Infine, negli esperimenti di marcatura con mepacrina, nota per accumularsi preferenzialmente nei granuli- δ [Ramström, 1999], il segnale dimostrava una diminuzione significativa dopo 30 min di stimolazione con Ca-ionoforo (figura 4C). La formazione del coagulo piastrinico dopo stimolazione con collagene 2 non era compatibile con l'analisi di citometria a flusso o immunofluorescenza (dati non mostrati). Presi insieme, questi dati indicano che l'osteocalcina viene rilasciata dai granuli- δ in seguito ad attivazione piastrinica.

I megacariociti umani contengono osteocalcina.

La colorazione per OCN appariva come segnale specifico puntiforme nel citoplasma dei megacariociti maturi, evidenziabili come grandi cellule CD41-positive, dei campioni di midollo osseo umano non patologico (figura 5). Questi risultati suggeriscono che la sintesi di OCN lungo il linea di maturazione megacariociti-piastrine, rappresenti una possibile fonte di OCN trombocitaria.

Livelli di osteocalcina nei pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotide

Le piastrine circolanti ed il siero da sangue periferico, sono stati isolati in 19 pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotide e 28 controlli sani. Le caratteristiche cliniche di questi soggetti sono riassunte nella tabella 1. Livelli di OCN totale intrapiastrinica erano significativamente più elevati nel gruppo di pazienti rispetto al gruppo di controllo, sia nei soggetti con età superiore che in quelli con età inferiore ai 50 anni (Figura 6A). Sebbene l'OCN totale intrapiastrinica correlasse significativamente con l'età dei soggetti ($\rho=0.64$; $P < 0,0001$) e con il numero di fattori di rischio ($\rho=0,42$; $P=0.02$), in tutta la coorte i livelli sierici di OCN totale non mostravano alcuna differenza statistica tra i tre gruppi (dati non mostrati, $P = 0,35$).

Il rilascio di OCN dalle piastrine circolanti dopo attivazione indotta dal collagene-2, è stato valutato anche in una sottopopolazione di 8 pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotidea e 10 volontari sani esenti da trattamento farmacologico con agenti anti-aggreganti piastrinici (media età 69.0 ± 8.5 anni e 35.2 ± 3.7 , rispettivamente). Il rilascio di OCN totale si è rivelato maggiore nei pazienti con occlusione carotidea rispetto ai controlli (figura 6B).

Osteocalcina e piastrine nelle lesioni aterosclerotiche umane

Campioni di arteria carotide proveniente da tre pazienti sottoposti a endoarterectomia per patologia occlusiva, sono state sottoposte ad indagine istologica (haematoxylin ed eosina colorazione), alla colorazione per depositi di calcio (von Kossa e rosso alizarina), e ad immunofluorescenza per l'identificazione di osteocalcina (OC), piastrine (CD41), macrofagi (CD68), cellule endoteliali (CD31) e cellule muscolari lisce (α -SMA) in sezioni seriali.

Nella lesione aterosclerotica precoce (Figura 7A), lo staining per OCN e CD41 si rivelava pressoché assente, mentre si riscontrava la presenza di macrofagi CD68-positivi, in accordo con evidenze precedenti [Uzui, 2002].

Nell'area calcifica della lesione aterosclerotica precoce, era evidente una co-localizzazione (figura 7B) per OCN e CD41, marker piastrinico, proprio nei pressi della zona di accumulo di calcio. Inoltre, una sottopopolazione di macrofagi attivati CD68-positivi, esprimenti OCN, era evidenziabile perifericamente all'area calcifica.

Nel core necrotico (figura 7C) era rilevabile un forte segnale per OCN, caratterizzata da debole co-localizzazione con CD41. Le cellule macrofagiche positive per CD68 rimanevano altamente rappresentate solo nell'area periferica al core.

Per quantificare il grado di co-localizzazione tra CD41 e OCN nella lesione aterosclerotica calcifica precoce (figura 8), è stata eseguita un'analisi morfometrica computerizzata di intensità di pixel RGB. È stato rilevato che circa il 50% dello staining per CD41 si sovrapponeva con quello per OC e, viceversa, circa il 30% del segnale per OCN co-localizzava con la fluorescenza del CD41 (figura 8). È interessante notare che la doppia colorazione per CD41/OCN era evidenziabile in aree dove i nuclei erano sostanzialmente assenti, in quanto minima era la co-localizzazione per il segnale per DAPI/CD41/OC come evidenziato dal diagramma di Venn (figura 8). Né il segnale per α -

SMA (cellule muscolari lisce) né il segnale per CD31 (cellule endoteliali) ha mai dato evidenza di sostanziale co-localizzazione con OCN all'interno delle aree calcifiche (figura 9).

Le porzioni non patologiche della parete carotidea nei campioni provenienti dagli stessi pazienti sottoposti ad endoarterectomia, non ha evidenziato alcun segnale specifico per OCN o aggregazione piastrinica né nella tonaca intima né nella media; solo il segnale dei macrofagi attivati CD68-positivo era occasionalmente presente (n = 3; figura 10). L'assenza di staining specifico per OCN e piastrine in carotidi non patologiche e tessuti normali è stata confermata usando campioni autoptici di muscolo scheletrico (n = 3; rispettivamente Figura 11 pannello AI-AII e figura 11 pannello B).

Espressione di Osteocalcina in Linee Megacariocitarie Umane Sottoposte a Stimolo Ipossico Prolungato.

Colture di linea cellulare megacariocitaria umana MEG-01, sono state sottoposte a stimolo ipossico prolungato (72h) e valutate per l'espressione di OCN in relazione al controllo coltivato in condizioni standard. Come prevedibile, al termine allo stimolo, si è potuto evidenziare una significativa riduzione del pH del mezzo di coltura (Figura 12A). L'analisi dell'espressione genica e proteica di OCN da parte delle cellule MEG-01, ha evidenziato un significativo aumento della rappresentazione di questa proteina in ambiente ipossico rispetto al controllo (Figura 12B-C). Analogo comportamento hanno evidenziato anche colture primarie di osteoblasti umani, impiegate come modello cellulare di riferimento (Figura 12D). L'aumento dell'espressione proteica di OCN è stato confermato anche mediante immunofluorescenza (Figura 13).

DISCUSSIONE

L'evidenza più importante del presente studio è che le piastrine umane esprimono e rilasciano OC, un fenomeno che sembra avere luogo all'interno delle lesioni aterosclerotiche dove possono contribuire alle relative microcalcificazioni. Prove sperimentali suggeriscono che il sistema emostatico rappresenta un determinante della aterogenesi e aterotrombosi [McGrath, 2010], in questo contesto le piastrine possono rappresentare un'interfaccia cellulare tra emostasi ed aterosclerosi. Attraverso interazioni che coinvolgono P-selectina, il fattore di von Willebrand, la glicoproteina Ib α e I β 3 integrine, le piastrine aderiscono all'endotelio attivato e secernono fattori aterogenici, citochine, chemiochine, fattori di crescita, molecole di adesione e fattori di coagulazione [Coppinger, 2004]. A loro volta, questi segnali hanno l'effetto di stimolare o amplificare il reclutamento sub-endoteliale di leucociti e trombociti stessi che, in ultima analisi, contribuiscono a sostenere il processo infiammatorio che si verifica nelle lesioni aterosclerotiche. In fasi successive, le placche aterosclerotiche avanzate possono contenere grandi quantità di piastrine come risultato della neovascolarizzazione di placca alla quale può far seguito lo stravasamento di sangue ed emorragia dei vasi neoformati. E' in questo contesto che si può verificare più frequentemente la calcificazione neointimale, fenomeno dalle conseguenze cliniche molto rischiose poiché, a seconda della dimensione e del sito di formazione, le aree calcificate possono destabilizzare la placca, favorendo la rottura e la trombosi [Owen, 2011].

I meccanismi che sottendono alla calcificazione vascolare non sono completamente chiariti. Cambiamenti nel prodotto solubilità fosfato di calcio così come nella composizione della matrice extracellulare, possono determinare la precipitazione passiva di cristalli del calcio. Uno squilibrio tra promotori e inibitori della calcificazione può essere co-responsabile dell'eccesso di calcificazione vascolare dovuta a condizioni patologiche quali, ad esempio, l'insufficienza renale cronica [Neven, 2011]. Recenti indagini hanno definito un certo grado di parallelismo tra i meccanismi della calcificazione vascolare e il processo di formazione di osso. L'espressione di proteine non collagenose ossee, tra le quali la sialoproteina, l'OCN e l'osteonectina è aumentata nelle aree calcificate di lesioni aterosclerotiche. Allo stesso modo, Bini e collaboratori hanno dimostrato l'espressione di proteine della matrice ossea, quali osteonectina, osteopontina e OCN all'interno delle aree

calcifiche, assieme a lipoproteine e metalloproteinasi di matrice (MMP), in particolare nelle zone di trombo/emorragia all'interno dell'arteria carotide umana. È interessante notare come gli autori abbiano concluso che la trombo/emorragia possa contribuire alla calcificazione distrofica arteriosa nella progressione complicazione dell'aterosclerosi [Bini, 1999]. La deposizione di queste proteine ossee può non rappresentare semplicemente un epifenomeno del processo osteogenetico che si verifica nell'albero vascolare, ma può svolgere un ruolo attivo nell'indurre la calcificazione in questo particolare distretto corporeo. Infatti, recenti indagini provano che OCN, di per sé stessa, può indurre la calcificazione nelle cellule muscolari lisce di origine vascolare e nei condrociti *in vitro* e può contribuire alla calcificazione vascolare indotta dalla vitamina D in vivo. In particolare, questa attività osteogenetica diretta di OCN sembra essere accoppiata al suo effetto metabolico insulino-simile [Idelevich, 2011]. Tuttavia, l'origine dell'eccesso di OCN nelle lesioni aterosclerotiche rimane poco chiaro.

Come già accennato in apertura, la possibilità che le cellule di origine non vascolari partecipino al processo di calcificazione è supportata da una serie di studi condotti degli ultimi anni. Nel 2005, Eghbali-Fatourehchi e collaboratori hanno segnalato l'esistenza di cellule circolanti con fenotipo osteoblasto-simile, esprimenti OCN e fosfatasi alcalina (ALP), in grado di indurre la calcificazione ectopica *in vitro* e *in vivo* [Eghbali-Fatourehchi, 2005]. Parallellamente a questo tipo di cellule di origine mesenchimale, gruppi indipendenti hanno riportato l'esistenza di cellule di origine ematopoietica, le cellule progenitrici endoteliali (EPC) OCN-positivo, capaci di un'attività osteogenetica, dotate di un potenziale di calcificazione *in vitro* e maggiormente rappresentate nel sangue dei pazienti con aterosclerosi coronarica e cavernosa [Flammer, 2012]. Infine, Fadini e collaboratori [Fadini, 2011] hanno recentemente descritto l'esistenza di una popolazione molto più rappresentata di cellule esprimenti OCN e ALP ossea con simile propensione all'induzione della calcificazione, appartenenti popolazione dei monociti circolanti, e che contribuiscono alla calcificazione delle lesioni aterosclerotiche dei pazienti diabetici. Presi insieme, questi dati vedono il midollo osseo come fonte di cellule procalcifiche ed in questo studio si evidenzia come i megacariociti e le piastrine esprimano e rilascino OCN nelle lesioni aterosclerotiche del vaso, rappresentando un'altra potenziale tessera del puzzle. Quasi 20 anni fa, Thiede e collaboratori dimostrarono la presenza di mRNA per OC nei megacariociti del midollo osseo e nelle piastrine del sangue periferico, suggerendo che essi

potessero contribuire ai livelli serici di OCN [Thiede, 1994]. In questo studio, per la prima volta, si riporta che OCN è presente in granuli- δ dei megacariociti e delle piastrine e che viene rilasciata durante l'attivazione piastrinica. Considerando l'importante ruolo svolto dalle piastrine nell'aterosclerosi, si è ipotizzato che gli stessi trombociti contribuissero all'espressione di OC nelle lesioni aterosclerotiche, favorendo così la calcificazione. E' stato infatti riscontrato un notevole grado di co-localizzazione del segnale CD41-positivo (piastrine) e del segnale per OCN nei campioni di endoarterectomia carotidea in aree quasi acellulari del nucleo necrotico, dove erano presenti nuclei di microcalcificazione. E' possibile dunque speculare che l'OCN extracellulare possa parzialmente derivare da degranulazione piastrinica in situ. L'assenza del segnale per il CD31 esclude la presenza dei vasi sanguigni in quest'area, resta però possibile che i capillari consentano lo stravasamento di piastrine in una fase precedente o che una precedente trombo/emorragia abbia ivi convogliato piastrine e OCN [Owen, 2011]. Pertanto, è probabile che le piastrine contribuiscano alla deposizione di OCN favorendo la calcificazione, e che questo processo si verifichi in parallelo ad altri meccanismi di calcificazione cellulo-mediata, come quelle che riguardano le cellule muscolari lisce e i periciti [Steizl, 2001; Johnson, 2006; Doherty, 1999]

Nonostante i risultati riportati siano meramente descrittivi, i dati clinici relativi ad una popolazione di pazienti con malattia oclusiva carotidea, confrontati con una popolazione di controllo, evidenzia un aumento del contenuto medio di OCN nelle piastrine circolanti. Questo, unitamente all'assenza di correlazione statistica tra i livelli serici di OCN nelle popolazioni considerate, rafforza l'ipotesi di un aumento della capacità di rilascio di OCN da parte dei trombociti nei pazienti con patologia oclusiva carotidea. La correlazione tra il contenuto di OCN intra-piastrinico con età e altri fattori di rischio cardiovascolare, suggerisce anche un possibile effetto di questi ultimi sul metabolismo dei megacariociti nel midollo osseo. Dai dati ottenuti appare infatti che l'incremento dell'espressione di OCN piastrinica sia largamente indipendente dai livelli serici della stessa, ridimensionando l'eventuale ipotesi di una captazione della proteina dal torrente ematico da parte dei trombociti [Harrison, 1993], e deponendo a favore di uno sbilanciamento di espressione proteica dei megacariociti midollari verso un fenotipo simil-osteoblastico. A tale proposito e sulla base del modello cellulare degli osteoblasti per il quale è risaputo l'effetto dell'ipossia sull'aumento espressione delle proteine della matrice

extracellulare ossea [Hirao, 2007], si è voluto verificare un'eventuale giustificazione fisiopatologica dei risultati ottenuti valutando l'espressione di osteocalcina nei megacariociti in seguito ad ipossia prolungata. Sorprendentemente, è stato possibile riscontrare l'aumento di espressione genica e proteica di OCN nella linea cellulare umana MEG-01 in seguito ad esposizione ad ipossia per 72h, in accordo a quanto osservato nelle colture primarie di osteoblasti impiegati come modello di riferimento. Tale evidenza è in accordo con recenti studi che dimostrano come l'ipossia modifichi il pattern di espressione genica delle cellule staminali mesenchimali verso un fenotipo più tipicamente osteoblastico, pur lasciando pressoché inalterato il profilo dei marcatori di superficie [Wagegg, 2012]. Nei limiti dell'impiego di una linea tumorale umana quale modello cellulare di megacariocita e dalla natura preliminare degli studi presentati, è possibile suggerire una relazione fisiopatogenetica tra presenza di fattori di rischio cardiovascolare e l'instaurarsi di una condizione clinica di ipossia sistemica, con ricadute sulla componente staminale del midollo e conseguente spostamento di quest'ultima verso un fenotipo simil-osteoblastico. A supporto di questo paradigma vi è il crescente numero di studi pubblicati che evidenzia, nei modelli animali caratterizzati da aterosclerosi accelerata, l'effetto precipitante dell'ipossia sul decorso della patologia vascolare [Arnaud, 2011; Adeva, 2011]

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Sebbene siano necessari ulteriori conferme sperimentali, i dati ottenuti in questo studio suggeriscono che le piastrine, in quanto esponenti OCN rilasciabile a seguito di attivazione, possano essere un potenziale vettore di proteine coinvolte nel processo aterogenetico e nella sua progressione. Tale fenomeno sembra correlato alla presenza di fattori di rischio cardiovascolare che avrebbero un effetto diretto sull'espressione di OCN da parte dei megacariociti midollari. Il presente studio soffre di molte limitazioni inerenti alla sua natura descrittiva ed inferenziale: la dimostrazione che le piastrine siano causalmente responsabili della calcificazione aterosclerotica è carente e potrebbe essere affrontata in futuro studi utilizzando animali transgenici. Inoltre, ulteriori approfondimenti inerenti alla sintesi di OCN nel megacariocita o in piastrine, correlata ai fattori che regolano espressione OCN in queste cellule, apporterebbero elementi determinanti alla comprensione del multifattoriale fenomeno dell'aterosclerosi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:1161-1170.
- Adeva MM, Souto G. Diet-induced metabolic acidosis. *Clin Nutr* 2011,30: 416-421.
- Afek A, Kogan E, Maysel-Auslender S, Mor A, Regev E, Rubinstein A, et al. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc Res* 2009,77: 364–369.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010,33: S62-S99.
- Arnaud C, Poulain L, Lévy P, Dematteis M. Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011,219: 425-431.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997,275: 964-967.
- Bini A, Mann KG, Kudryk BJ, Schoen FJ. Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999,19: 1852-1861.
- Borissoff JJ, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011,364: 1746-1760.
- Brevetti G, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis.* 2008,197: 1-11.
- Caplan BA, Schwartz CJ. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 1973,17: 401-417.
- Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ESH. Osteoblast precursor cells are found in CD34-cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997,15: 368 –377.
- Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004,103: 2096-2104.
- Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 2007,14: 55– 61.

- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000,130:963-974.
- Doherty MJ, Canfield AE. Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999,9: 1-17.
- Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel DA, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005,352: 1959–1966.
- Eghbali-Fatourehchi GZ, Moedder UI, Charatcharoenwitthaya N, et al. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone* 2007,40: 1370 –1377.
- Eipers PG, Kale S, Taichman RS, et al. Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor cell development. *Exp Hematol* 2000,28: 815–825.
- Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004,15: 1983-1992.
- Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, Boscaro E, Vigili de Kreutzenberg S, Agostini C, Cabrelle A, Binotto G, Rattazzi M, Bertacco E, Bertorelle R, Biasini L, Mion M, Plebani M, Ceolotto G, Angelini A, Castellani C, Menegolo M, Grego F, Dimmeler S, Seeger F, Zeiher A, Tiengo A, Avogaro A. Widespread increase in myeloid calcifying cells contributes to ectopic vascular calcification in type 2 diabetes. *Circ Res* 2011,108: 1112-1121.
- Farzaneh-Far A, Shanahan CM. Biology of vascular calcification in renal disease. *Nephron Exp Nephrol* 2005,101: e134-138.
- Ferlin A, Pepe A, Faccioli A, Gianesello L, Foresta C. Relaxin stimulates osteoclast differentiation and activation. *Bone* 2010,46: 504-413.
- Flammer AJ, Gössl M, Widmer RJ, Reriani M, Lennon R, Loeffler D, Shonyo S, Simari RD, Lerman LO, Khosla S, Lerman A. Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis. *Eur Heart J* 2012, Epub ahead of print
- Foresta C, De Toni L, Biagioli A, Ganz F, Magagna S, Caretta N. Increased levels of osteocalcin-positive endothelial progenitor cells in patients affected by erectile dysfunction and cavernous atherosclerosis. *J Sex Med.* 2010,7: 751-757.
- Foresta C, De Toni L, Selice R, Garolla A, Di Mambro A. Increased osteocalcin-positive endothelial progenitor cells in hypogonadal male patients. *J Endocrinol Invest* 2010,33: 439-442.
- Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968,6: 230–247.

- Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost.* 2008,6: 235-242.
- Giacco F, Brownlee M Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010,107: 1058-1070.
- Giachelli CM. Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2003,14: S300-S304.
- Gkaliagkousi E, Ferro A. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci.* 2011,16: 1873-1897.
- Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2008,52: 1314-1325.
- Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993,7: 52-62.
- Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD, et al. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* 2006,113: 2278–2284.
- Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. *J Bone Miner Metab* 2007,25: 266-276.
- Hursting SD, Hursting MJ. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012,32: 1766-1770.
- Idelevich A, Rais Y, Monsonego-Ornan E. Bone Gla Protein Increases HIF-1{alpha}-Dependent Glucose Metabolism and Induces Cartilage and Vascular Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011,31: e55-71.
- Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med.* 2006,260: 192-210.
- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 2006,99:1044-1059.
- Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Metab* 2006,24:176-181.
- Kamat BR, Galli SJ, Barger AC, Lainey LL, Silverman KJ. Neovascularization and coronary atherosclerotic plaque: cinematographic localization and quantitative histologic analysis. *Hum Pathol* 1987,18: 1036-1042

- Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Che J, Adachi Y, Kishita E, Yamaguchi S, Ikeda K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Matsubara H. Early inflammatory reactions in atherosclerosis are induced by proline-rich tyrosine kinase/reactive oxygen species-mediated release of tumor necrosis factor-alpha and subsequent activation of the p21Cip1/Ets-1/p300 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011,31: 1084-1092.
- Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol*. 2009,308: 3-8.
- Libby P. Current concept of the pathogenesis of the acute coronary syndromes *Circulation* 2001,104: 365-372.
- Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG. Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 1995,95:881–887.
- Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bone related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 1990,86: 1387–1395.
- Lusis, AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000,407: 233-41.
- Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 2006,169: 1440 –1457.
- McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br J Haematol* 2010,148: 834-843.
- Morrow DA, Wang Y, Croce K, et al. Myeloid-related protein 8/14 and the risk of cardiovascular death or myocardial infarction after an acute coronary syndrome in the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction (PROVE IT-TIMI 22) trial. *Am Heart J* 2008,155: 49 –55.
- Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Curr Diabetes Rev* 2005,1: 59-63.
- Neven E, D'Haese PC. Vascular calcification in chronic renal failure: what have we learned from animal studies? *Circ Res* 2011,108: 249-264.
- Owen DR, Lindsay AC, Choudhury RP, Fayad ZA. Imaging of atherosclerosis. *Annu Rev Med* 2011,62: 25-40.
- Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, Mays RW, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2005,280: 40201-40209.
- Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, Khalapyan TZ, Wolfe ML, Fairman R, Mitchell M, Carpenter J, Golden MA, Cines DB, Sachais BS. Platelet

factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 2003,90: 1112-1120.

- Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H, Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003,9: 702-712.

- Pozzati A, Abrignani MG. Patogenesi dell'aterosclerosi nel diabete mellito. *Ital Heart J* 2004;5(Suppl 4): 7S-11S.

- Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000,87: 1055-1062.

- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003,9: 702-712.

- Ramström AS, Fagerberg IH, Lindahl TL. A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets. *Platelets* 1999,10: 153-158.

- Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC. Diverse patterns of cyclooxygenase-independent metalloproteinase gene regulation in human monocytes. *Br J Pharmacol* 2011,163:1679-1690.

- Renè R, Packard S, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008,54: 24-38.

- Rubenstein DA, Yin W. Glycated albumin modulates platelet susceptibility to flow induced activation and aggregation. *Platelets* 2009,20: 206-215.

- Schoen FJ. Vasi sanguigni. In: *Le basi patologiche delle malattie, Robbins e Cotran; Elsevier Masson, 7a edizione, 2006; pp. 511-554.*

- Shanahan CM. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005,14: 361-367.

- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of *Cbfa1* and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 2001,89:1147-1154.

- Stenner DD, Tracy RP, Riggs BL, Mann KG. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986,83:6892-6896.

- Stoner L, Sabatier MJ. Use of ultrasound for non-invasive assessment of flow-mediated dilation. *J Atheroscler Thromb* 2012,19: 407-421.

- Tai LK, Okuda M, Abe J, Berk BC. Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species– dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002,22: 1790–1796.
- Takahashi T, Hato F, Yamane T, Fukumasu H, Suzuki K, Ogita S, Nishizawa Y, Kitagawa S. Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. *Circ Res.* 2001,88: 422-429.
- Theilmeyer G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood.* 2002,99: 4486-4493.
- Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Thompson DD, Nishimoto SK. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 1994,135: 929-937.
- Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microsc Tech* 1991,19: 327-344.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 2003,52: 2882–2887.
- Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* 2002,106: 3024-3030.
- van Hinsbergh VW Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012,34: 93-106.
- Viemann D, Barczyk K, Vogl T, et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood* 2007,109: 2453–2460.
- Viisoreanu D, Gear A. Effect of physiologic shear stresses and calcium on agonist-induced platelet aggregation, secretion, and thromboxane A2 formation. *Thromb Res* 2007,120: 885-892.
- Vladykovskaya E, Sithu SD, Haberzettl P, Wickramasinghe NS, Merchant ML, Hill BG, McCracken J, Agarwal A, Dougherty S, Gordon SA, Schuschke DA, Barski OA, O'Toole T, D'Souza SE, Bhatnagar A, Srivastava S. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2012;287: 11398-11409.
- Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007,13: 1042–1049.

- Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schönbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgereit F. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One*. 2012,7: e46483. doi: 10.1371/journal.pone.0046483

- Ward JR, Wilson HL, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I. Translational mini-review series on immunology of vascular disease: inflammation, infections and Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Clin Exp Immunol* 2009,156: 386-394.

- Watson KE, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF- β 1 and 25-hydrocholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994,93: 2106-2113.

- Yang H, Curinga G, Giachelli CM. Elevated extracellular calcium levels induce smooth muscle cell matrix mineralization in vitro. *Kidney Int* 2004,66: 2293-2299.

- Young B, Heath JW. Il sistema circolatorio. In: *Istologia e Anatomia Microscopica*, testo atlante, Wheather; CEA, terza edizione, 2001; pp.144-156.

- Fukumoto H, Naito Z, Asano G et al. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 2000,7: 132-137.

TABELLA 1
Caratteristiche cliniche della popolazione

Caratteristiche	CerVD-/età<50 (n=18)	CerVD-/età>50 (n=10)	CerVD+/ (n=19)
Età (anni)	35±7	58±7	73±7
Sesso maschile (%)	100	100	100
Iperlipidemia (%)	5	60	72
Diabete/intoll. al glucosio (%)	0	0	17
Iperensione (%)	5	50	83
Obesità viscerale (%)	0	10	38
Terapia con antiaggreganti (%)	0	20	100
Terapia con anti-Vit K (%)	0	0	11

CerVD+: presenza di patologia cerebrovascolare

CerVD-: assenza di patologia cerebrovascolare

TABELLA 2
Sequenze dei primers per l'analisi di espressione genica

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
<i>β-actin</i>	5'-CACTCTTCCAGCCTTCC-3'	5'-CGGACTCGTACTCCTGCTT-3
OCN	5'-TGACATCTGGTTCTGTCTTCT-3'	5'-GTTCCACAGGGAAATAG-3'

Expression of Osteocalcin in Circulating Platelets

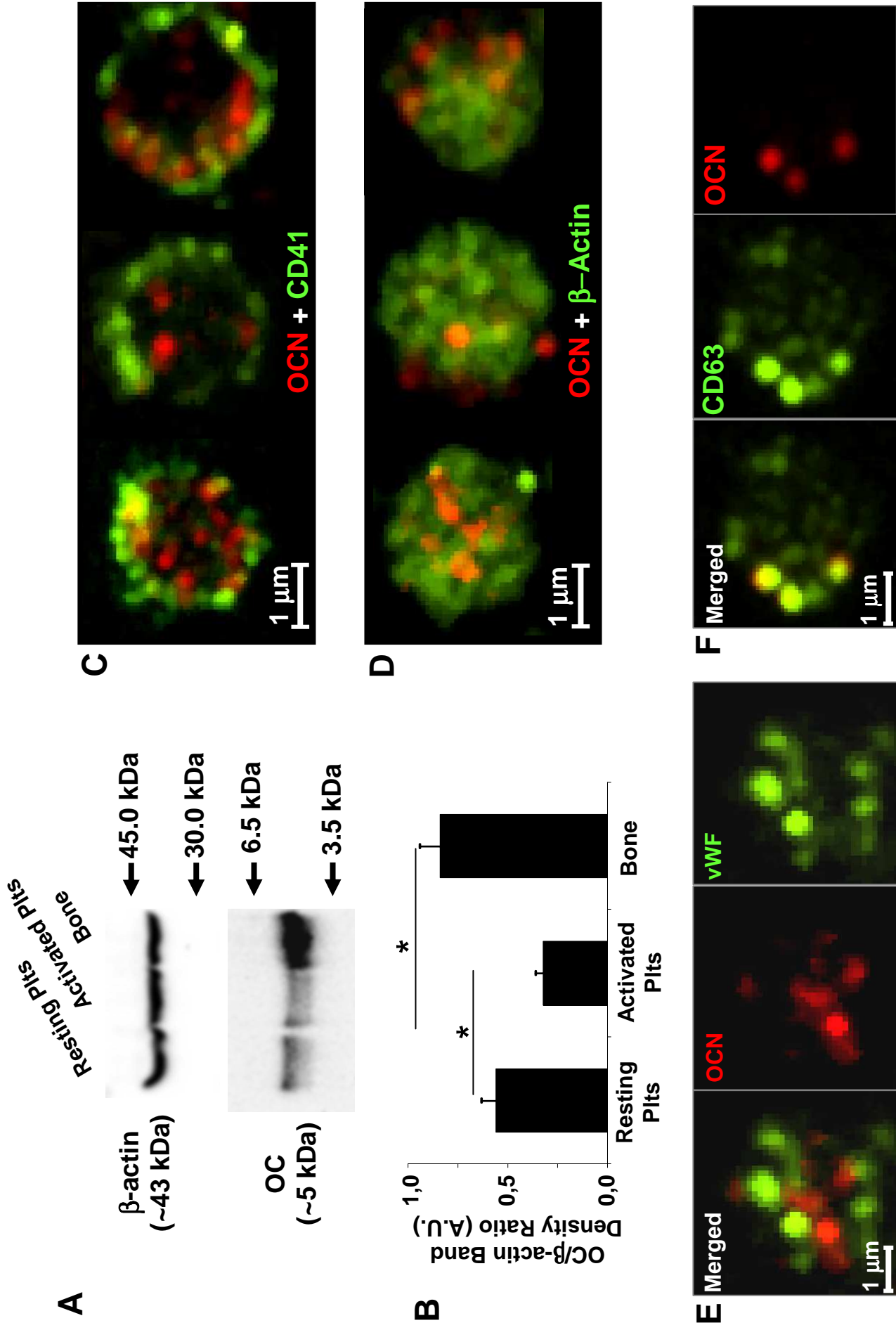


Figura 1

Figura 1-Espressione dell'osteocalcina nelle piastrine circolanti

A) Analisi Western blot per l'espressione di osteocalcina (OCN) nelle piastrine non attivate ed attivate con Ca²⁺-ionoforo; il lisato proteico da una libreria commerciale di tessuto osseo è stato utilizzato come controllo. La b-actina è stata utilizzata come controllo interno.

B) Analisi della densità della banda. Risultati sono riportati come rapporto delle densità delle bande OCN/ β -actina. Significatività: * = $P < 0.05$

C-D) test di immunofluorescenza doppia colorazione per la valutazione della localizzazione della osteocalcina all'interno della piastrina. Doppia colorazione per osteocalcina (rosso) e CD41 (verde nel pannello C) come marcatore di membrana e con b-actina come marcatore del citoscheletro (verde nel pannello D).

E-F) doppia colorazione per osteocalcina (rosso) e vWF come marcatore per i granuli- α (verde nel pannello E) e CD63 come marcatore dei granuli- δ (verde nel pannello F).

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplice copia. Barra di scala: 1 μ m.

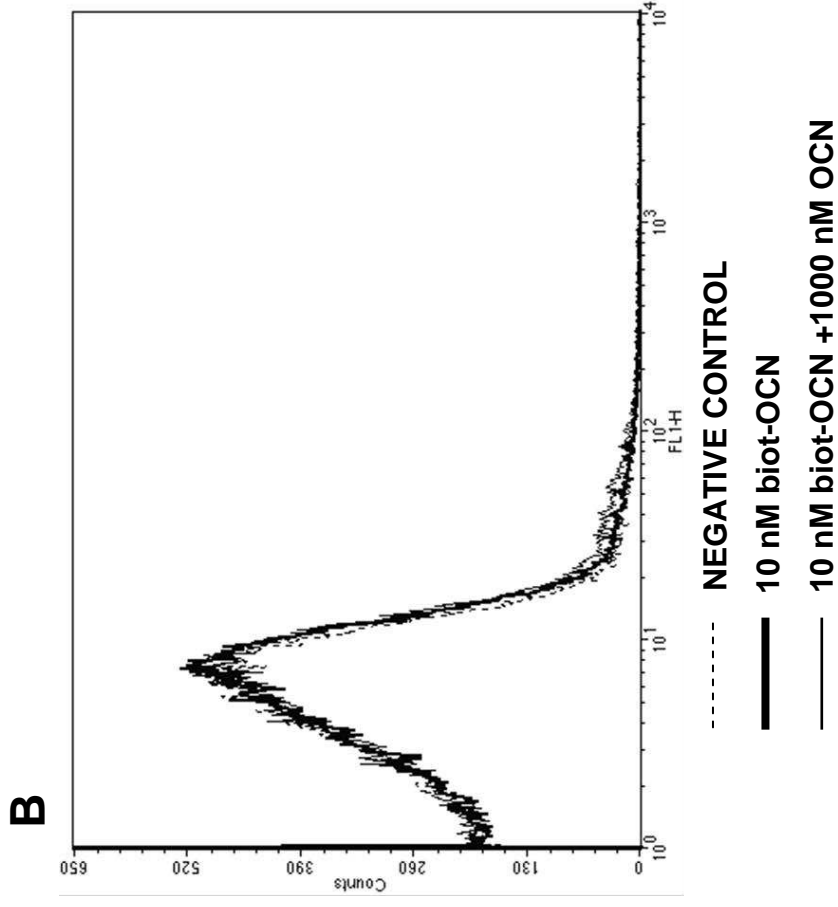
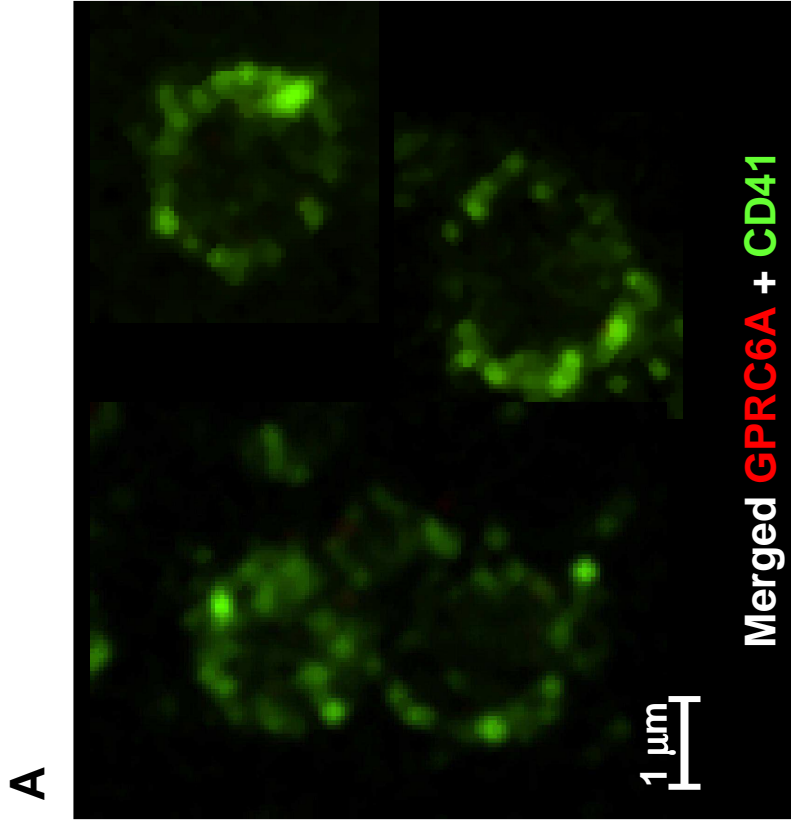


Figura 2

Figura 2- Valutazione del legame dell'osteocalcina alla superficie cellulare delle piastrine non attivate

- A) Il legame specifico di OCN alle piastrine è stato valutato per l'espressione del suo recettore putativo GPRC6A, mediante saggio di doppia immunofluorescenza. GPRC6A (rosso) è apparso assente rispetto all'espressione di CD41 (verde).
- B) Il legame aspecifico di OCN alle piastrine è stata valutata mediante citometria a flusso, analizzando lo spiazzamento dell'OCN biotinilata (10 nM, linea spessa-continua) da parte di OCN "fredda" a concentrazione più elevata (1000 nM, linea sottile continua). Nel controllo negativo (linea sottile-discontinua), è stato valutato solo il segnale di fondo della streptavidina-FITC

Osteocalcin is Released by Activated Platelets

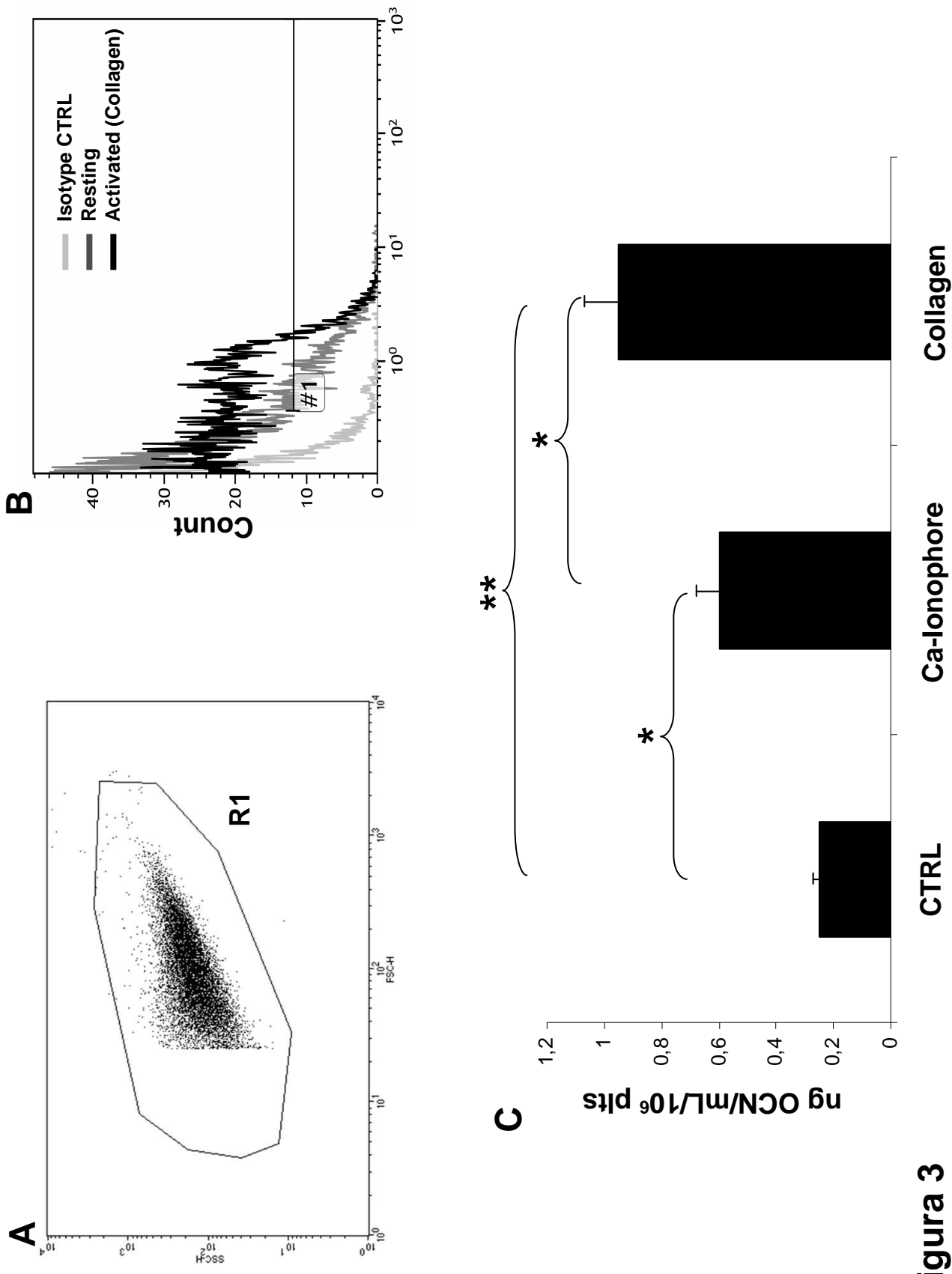


Figure 3

Figura 3- Rilascio di osteocalcina dalle piastrine

Analisi del rilascio di osteocalcina comunicato dopo l'attivazione piastrinica. Il ricco di piastrine (n = 3) è stato stimolato con ADP 0.1 mM. L'analisi di citometria a flusso (pannello A e B) ha rivelato che le piastrine, morfologicamente raggruppate nel gate R1 (pannello A), venivano attivate mediamente per il 38% come evidenziato dallo staining con anticorpo anti-CD62-P (P-Selectina) coniugato con Phycoeritrina (PE; eventi nel dominio #1, pannello B, tratteggio nero) rispetto alle piastrine resting (18%, tratteggio grigio)

La stimolazione con Ca-ionoforo o collagene-2 portava ad un aumento significativo nei livelli di OCN nei supernatante, quantificati mediante saggio ELISA (pannello C) rispetto al controllo (CTRL), nel quale era stato omesso qualsiasi stimolo. Significatività: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0.01$.

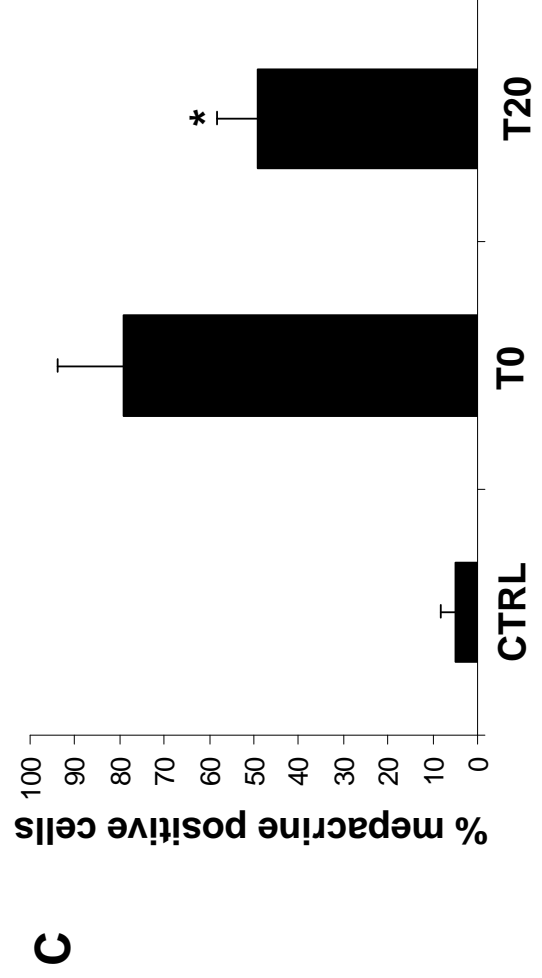
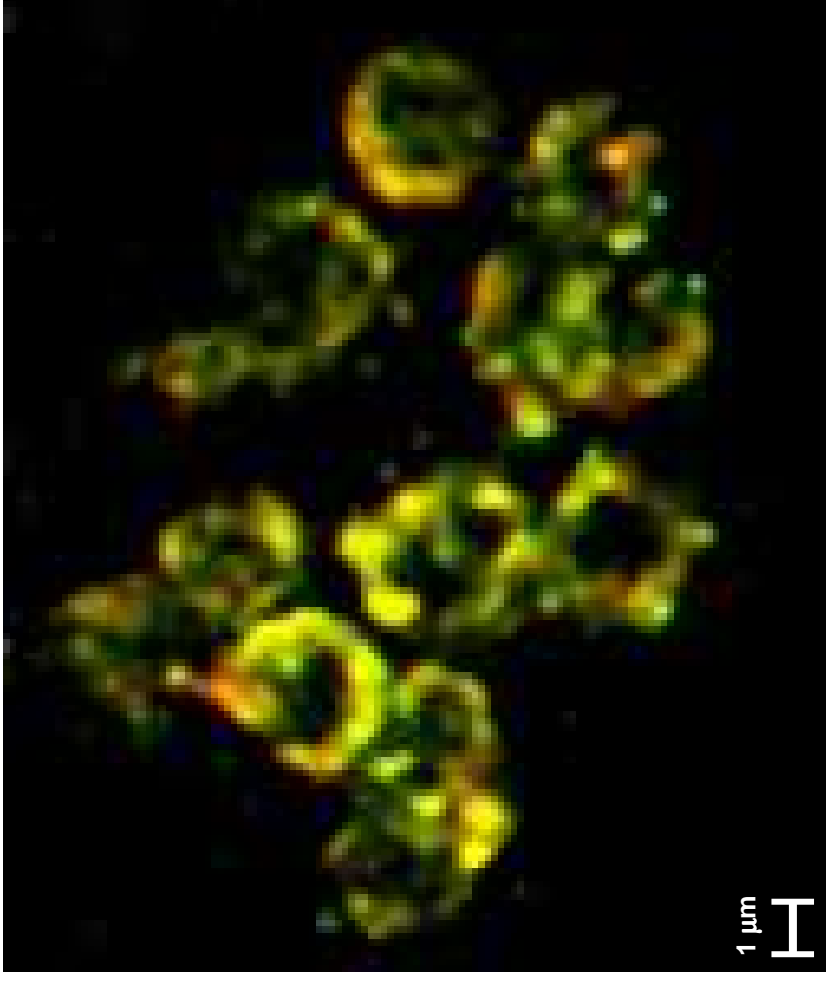
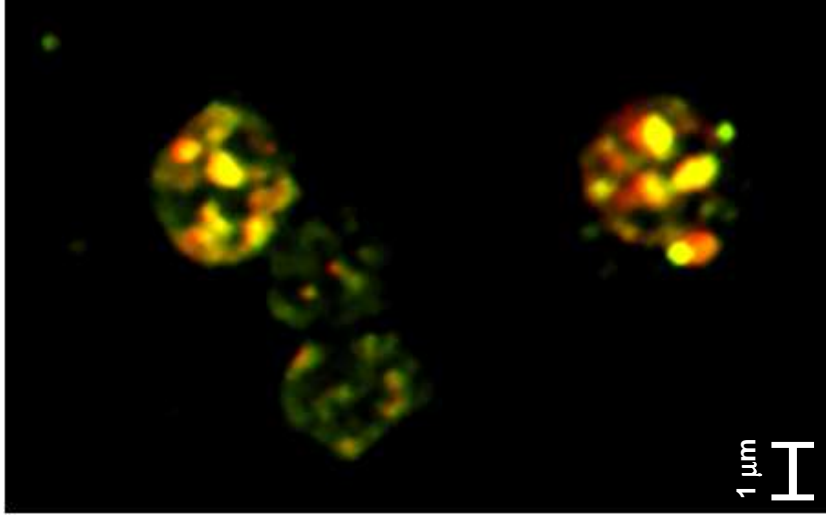


Figura 4

Figura 4- Pattern di localizzazione dell'osteocalcina nelle piastrine attivate e rilascio di mepacrina.

A-B) Doppia immunofluorescenza per la localizzazione di osteocalcina (OCN, rosso) e CD63 (verde) come marcatore dei granuli-d, all'interno delle piastrine non attivate (pannello A) e attivate con Ca-ionoforo (pannello B). Barra di scala: 1mm.

C) La stimolazione con Ca-ionoforo (pannello C, T20 = 20 min Ca-ionoforo) induceva da una significativa riduzione del segnale di fluorescenza per la mepacrina nelle piastrine marcate in condizioni resting (pannello C, T0 = condizioni iniziali). Significatività: * = $P < 0.05$

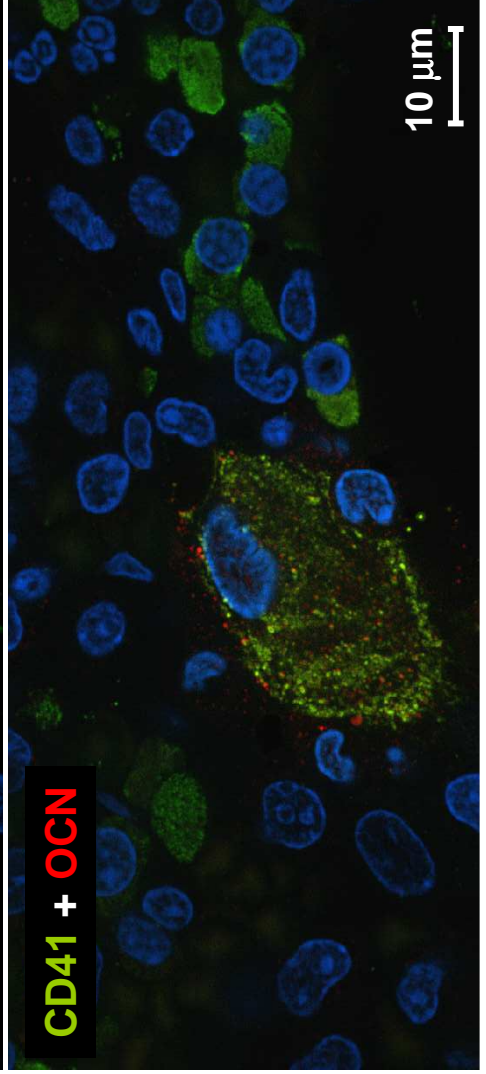
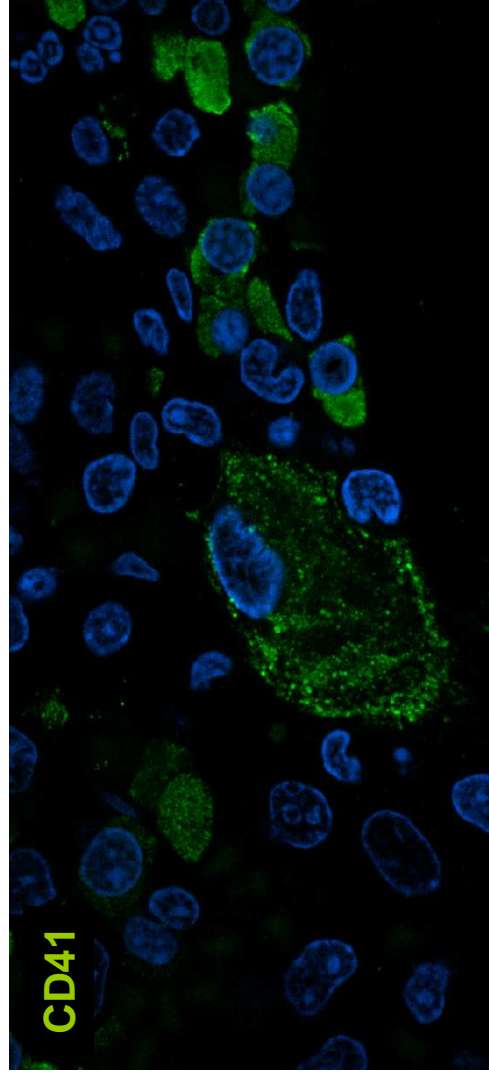
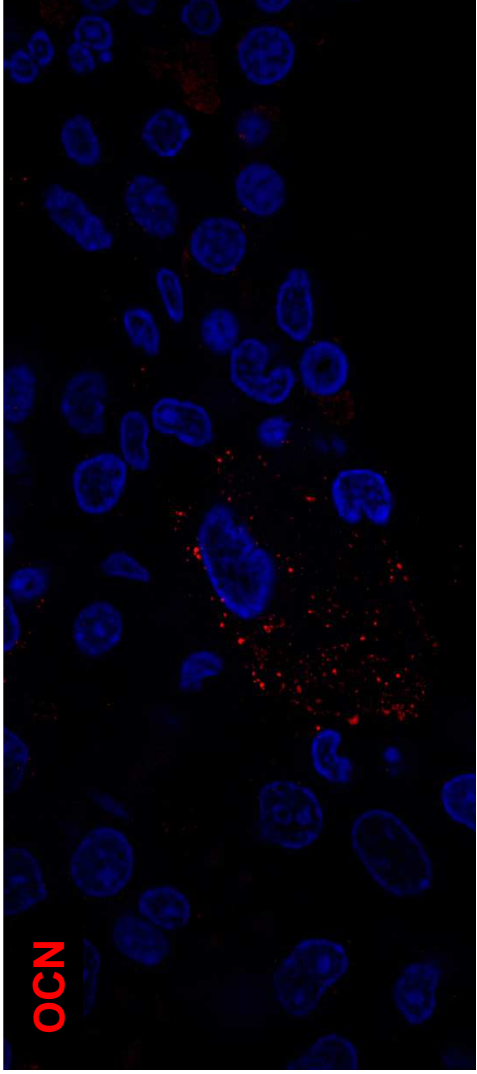


Figure 5

Figura 5- L'osteocalcina nel midollo osseo umano

Saggio di doppia immunofluorescenza per il pattern di localizzazione di osteocalcina (OC, rosso) nel midollo osseo sano. Il CD41 (verde) è stato utilizzato come marcatore fenotipico per i megacariociti. Colorazione di contrasto dei nuclei è stata realizzata con DAPI (blu). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Barra di scala: 10 μm

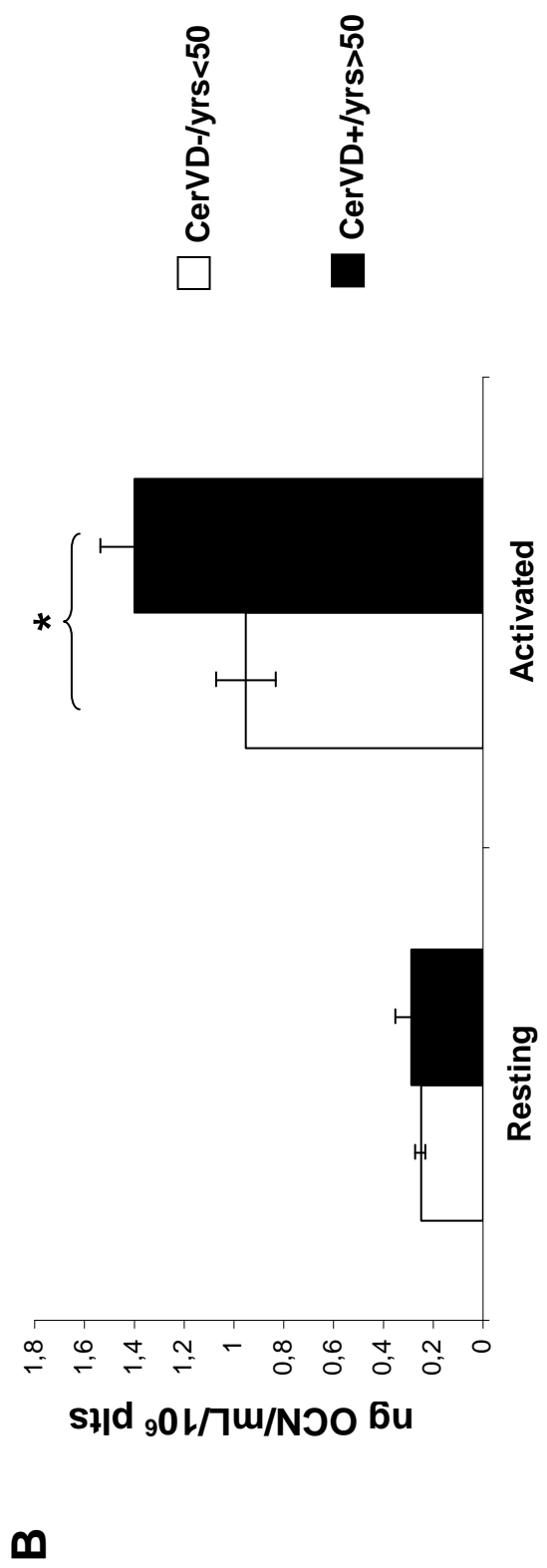
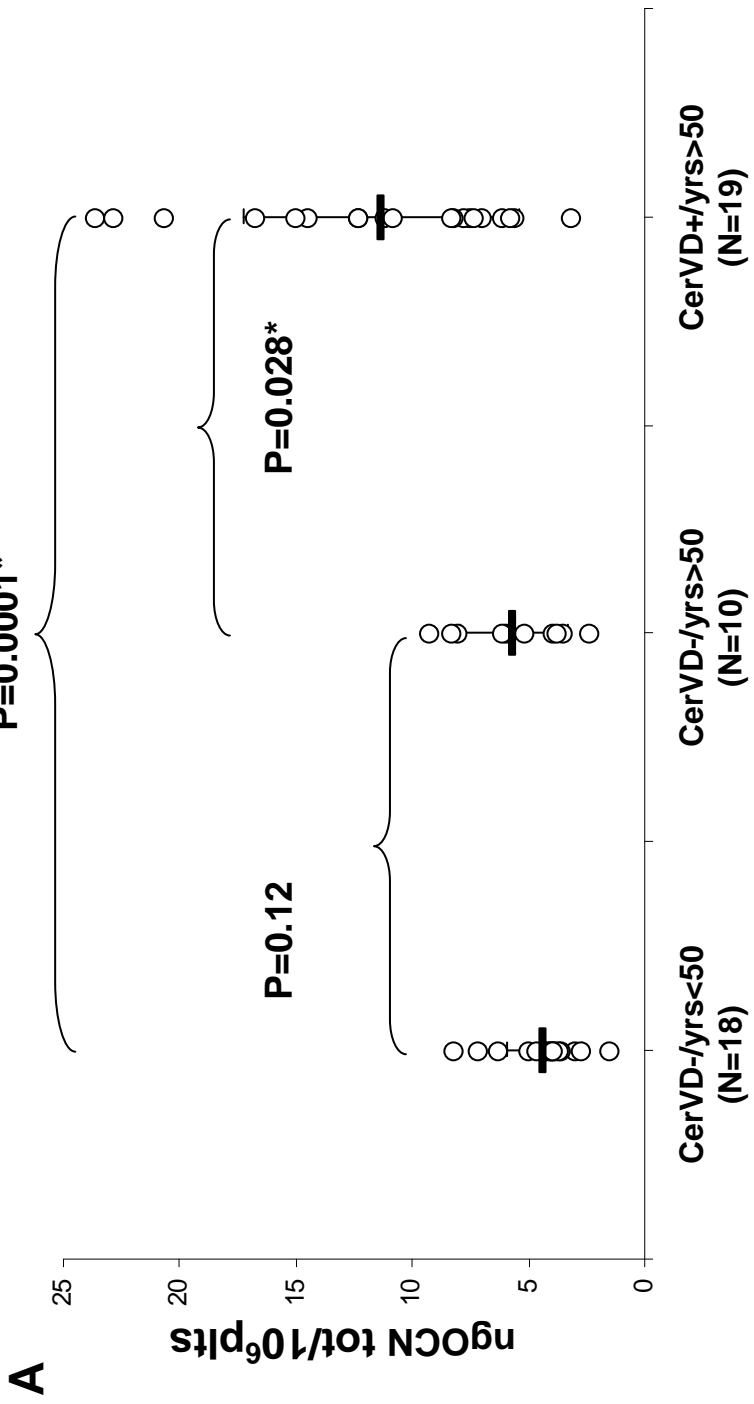


Figura 6

Figura 6- Livelli di osteocalcina intrapiastrinica in soggetti con occlusione dell'arteria carotide

A) Quantificazione dell'osteocalcina intrapiastrinica (OCN) in 19 pazienti con patologia occlusiva dell'arteria carotidea (CerVD /yrs > 50) e 28 controlli suddivisi per età: inferiore ai 50 anni (CerVD-/yrs < 50) e superiore ai 50 anni (CerVD- /yrs > 50).

B) Quantificazione dell'OCN rilasciata dalle piastrine, dopo stimolazione con collagene-2, in 8 pazienti con malattia occlusiva dell'arteria carotide esente da terapia con antiaggreganti piastrinici, (CerVD /yrs > 50, barre nere) e 10 controlli con età inferiore a 50 anni (CerVD- / yrs < 50, barre bianche).

Significatività: * = $P < 0.05$.

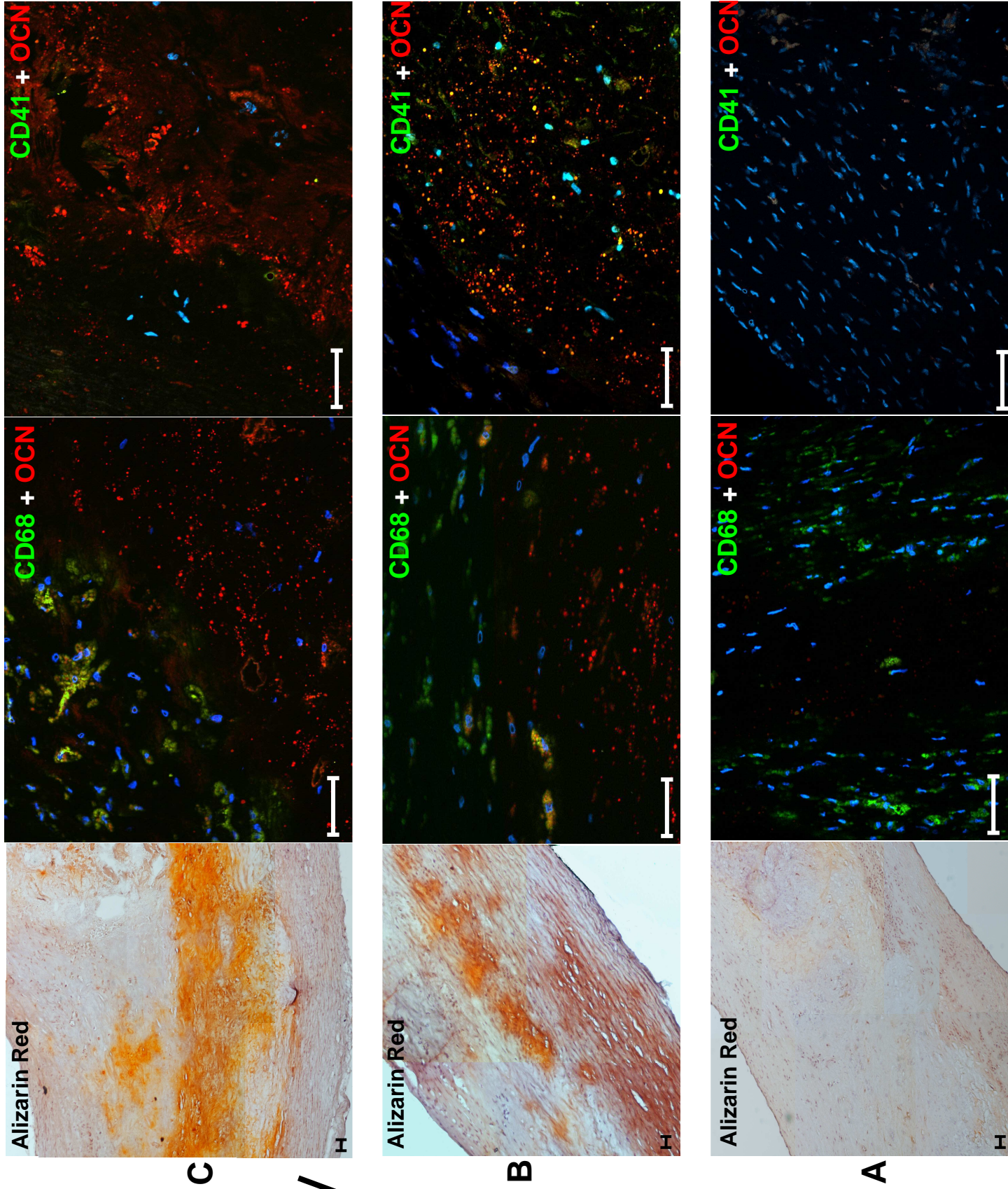


Figura 7

Figura 7- Pattern di espressione di osteocalcina (OCN) nella lesione aterosclerotica carotidea di pazienti sottoposti a endoarterectomia.

In ogni pannello viene rappresentata la colorazione con rosso alizarina e saggi di immunofluorescenza doppia per OCN (rosso), macrofagi (CD68, verde) e piastrine (CD41, verde). Il pannello A si riferisce alla lesione aterosclerotica precoce. Il pannello B si riferisce all'area calcifica precoce. Il pannello C si riferisce alla regione del nucleo necrotico. La colorazione di contrasto dei nuclei è stata eseguita con DAPI (blu). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. Barra di scala bar: 50 mm.

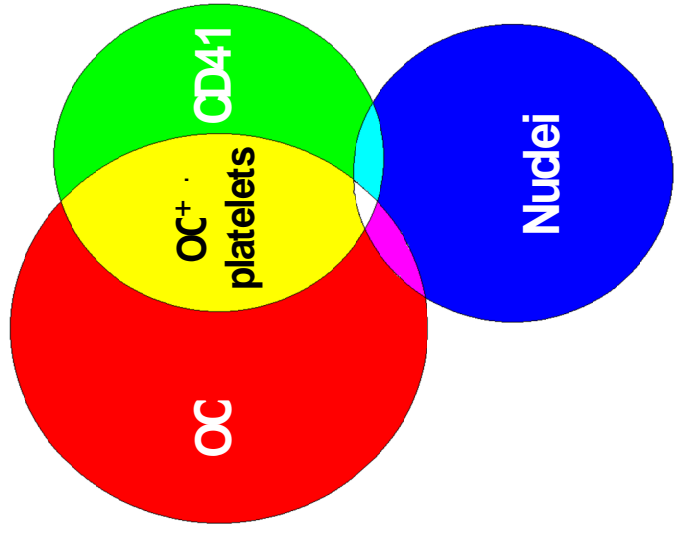
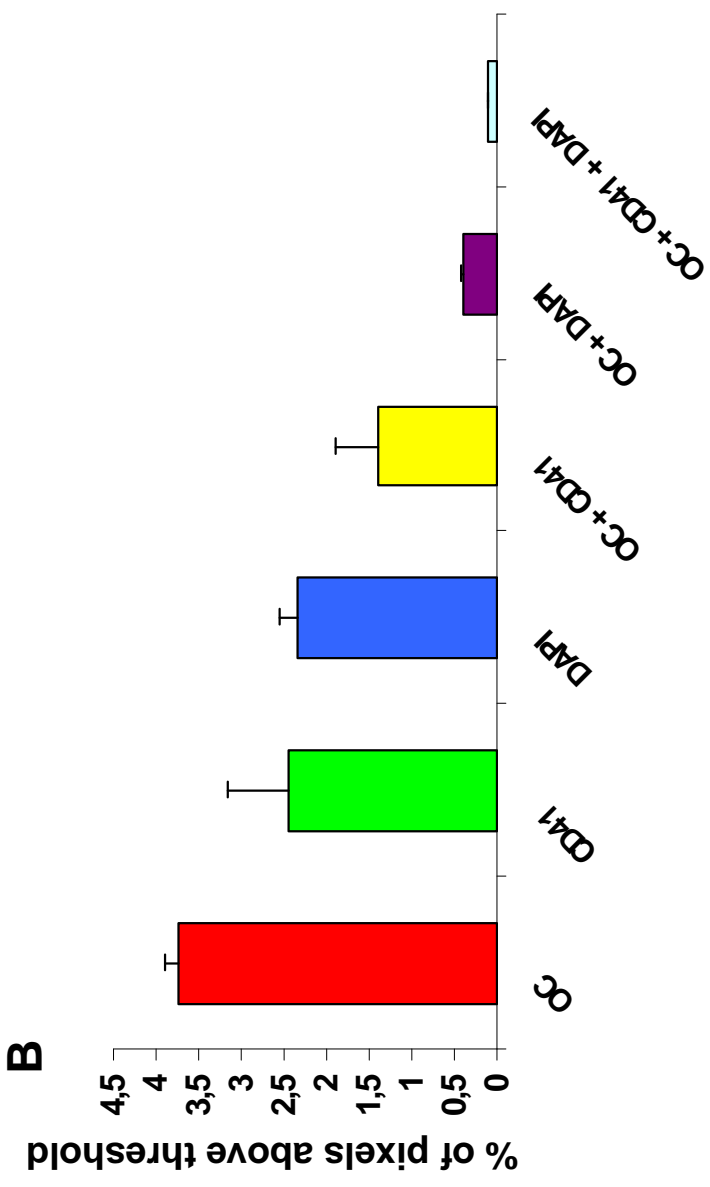
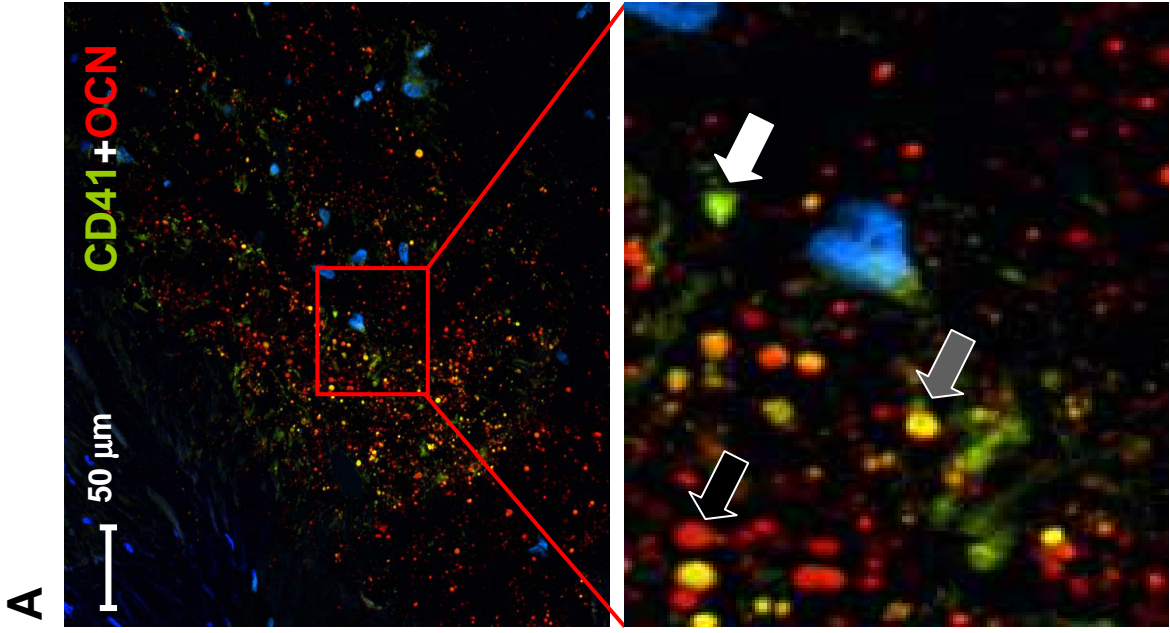


Figure 8

Figura 8- Analisi di colocalizzazione tra osteocalcina ed aggregati piastrinici nella placca calcifica precoce

Campo microscopico ad alto ingrandimento per la visualizzazione di placca aterosclerotica carotidea (pannello A) dove la colorazione rossa per OCN (freccia nera) e la colorazione verde per CD41 (freccia bianca) frequentemente co-localizzano in aree di sovrapposizione (freccia grigia).

B) analisi morfometrica dei livelli di co-espressione tra osteocalcina (OCN, rosso), CD41 (green) e DAPI (blu). I risultati di tre esperimenti indipendenti sono segnalati come la percentuale dei pixel con intensità del colore superiore 2 a volte la deviazione standard media del fondo. Il diagramma di Venn rappresenta graficamente il grado di co-localizzazione tra i colori.

Barra di scala: 50 mm

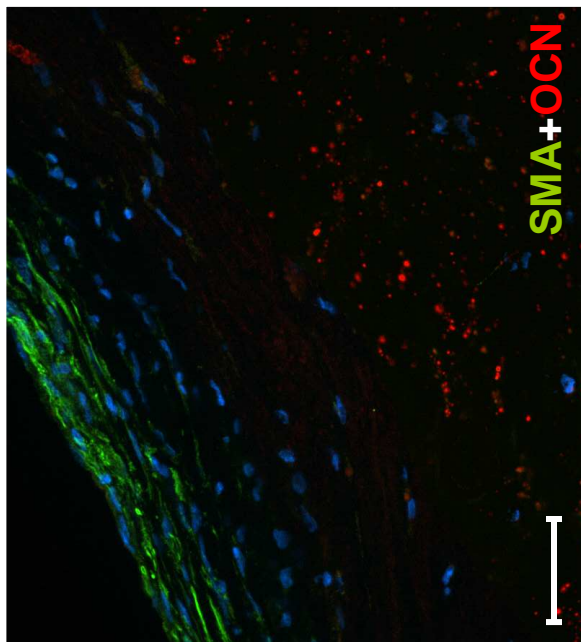
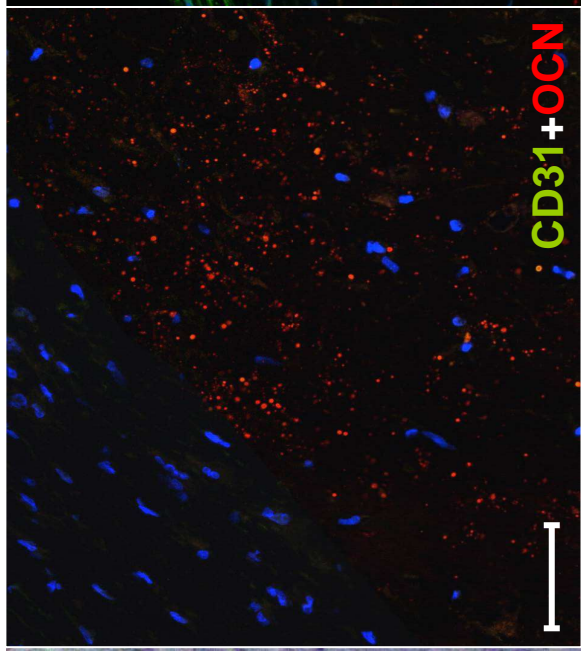
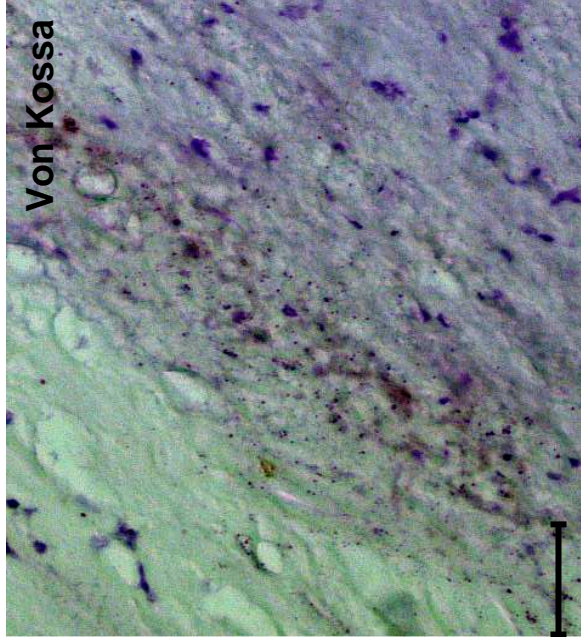


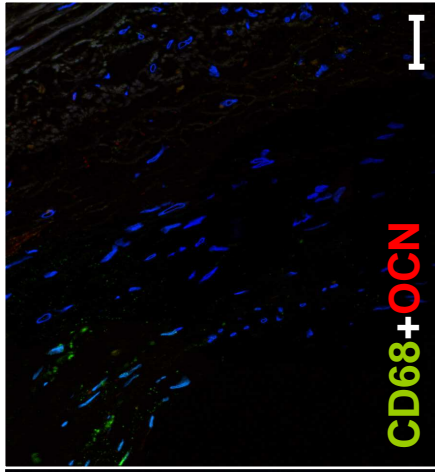
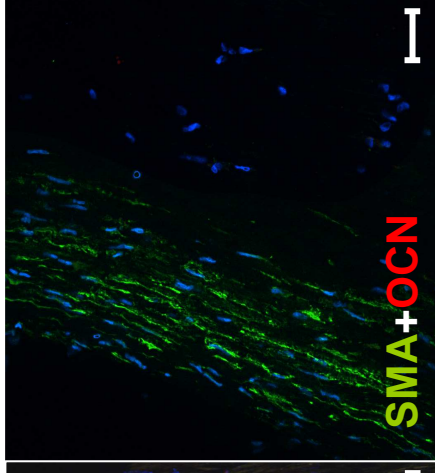
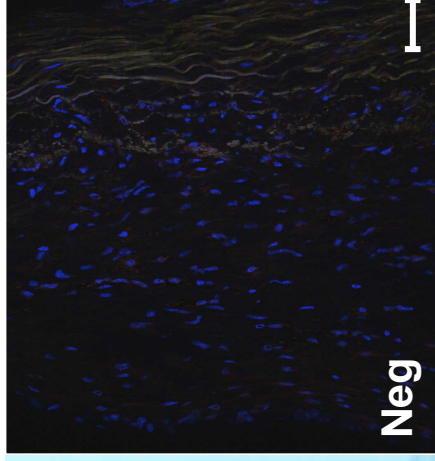
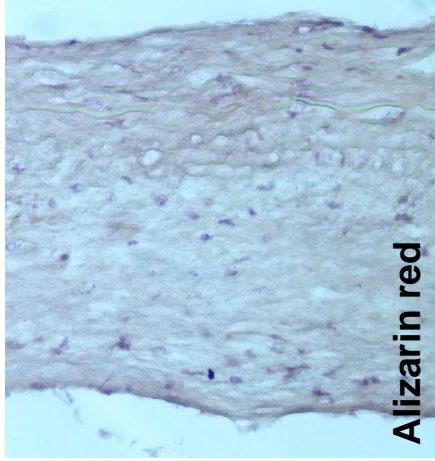
Figura 9

50 μ m

Figura 9- Pattern di espressione dell'osteocalcina in arteria carotide aterosclerotica di pazienti sottoposti a edoarterectomia.

Nella regione core necrotico della parete carotidea, erano rilevabili depositi di calcio (Von Kossa). Indagini di immunofluorescenza doppia sono state eseguite su sezioni seriali di campioni congelati per valutare eventuali co-localizzazioni tra osteocalcina (OCN, rosso), cellule endoteliali (CD31, verde), o μ cellule muscolari lisce (SMA, verde).

Barra di scala: 50 mm



50 μ m

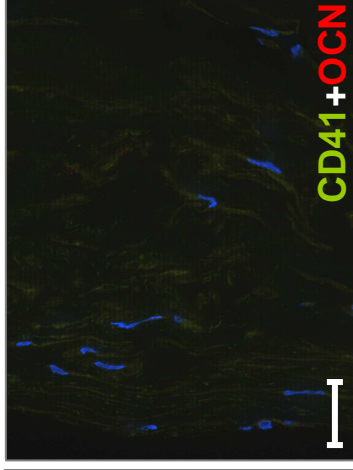
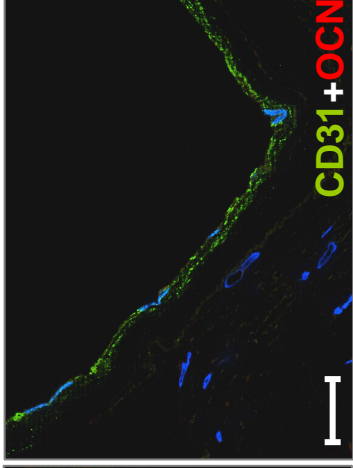
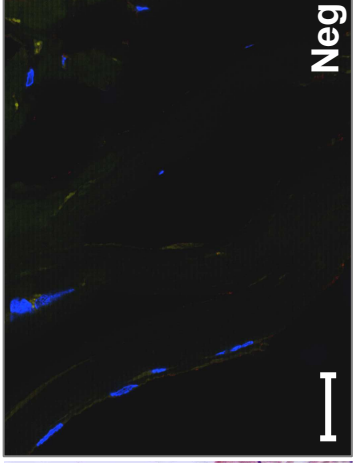
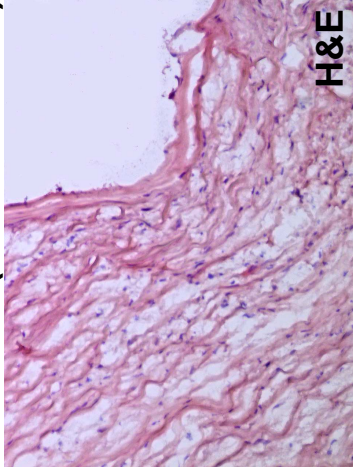


Figura 10

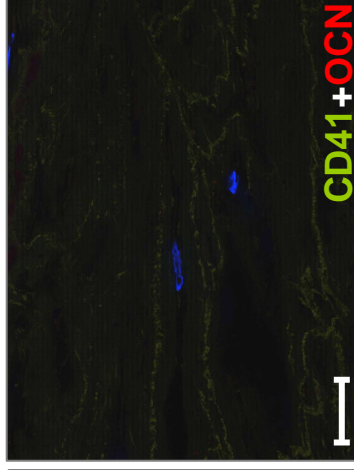
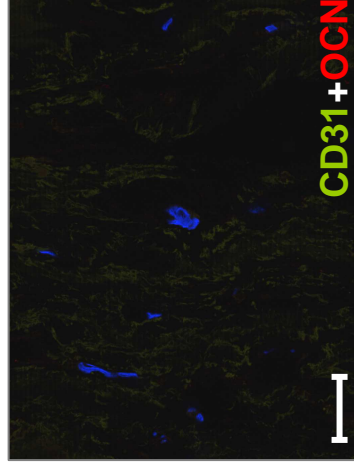
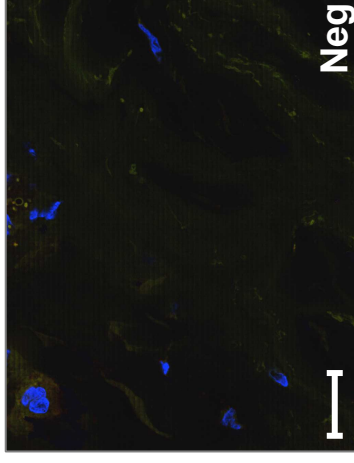
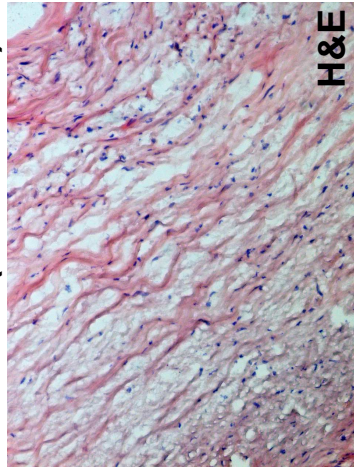
Figura 10- Espressione di osteocalcina nella carotide normale.

La deposizione di calcio è stata valutata mediante colorazione con rosso alizarina. Una doppia immunofluorescenza per osteocalcina (OCN, rosso) e CD68 (macrofagi attivati, verde) o actina muscolo liscio (SMA, cellule muscolari lisce, verde) è stata eseguita su esemplari sani dell'arteria carotide. Nel controllo negativo sono stati omessi gli anticorpi primari. Barra di scala: 50 mm

Panel A-I (Carotid Lumen)



Panel A-II (Carotid Wall)



Panel B (Skeletal Muscle)

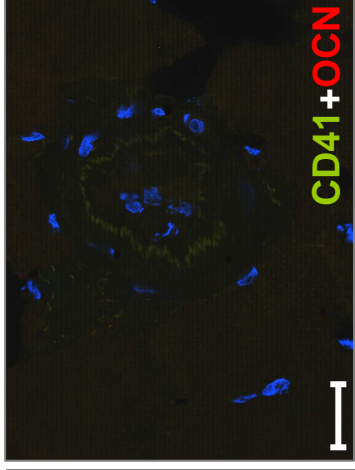
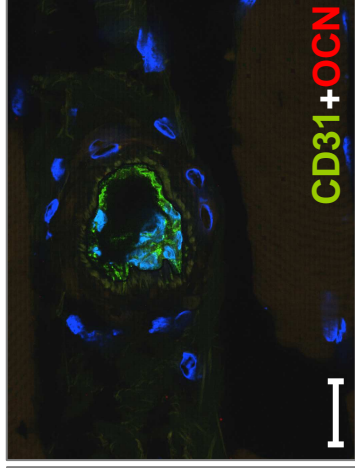
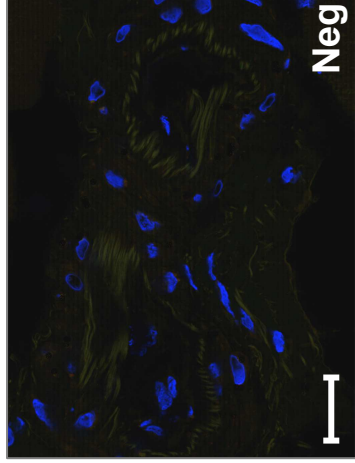
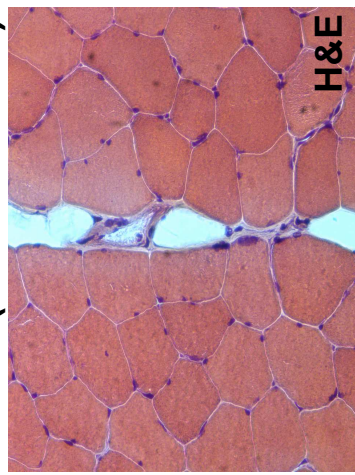


Figure 11

20 μ m

Figura 11- Espressione dell'osteocalcina nella carotide normale e muscolo scheletrico.

La morfologia dei tessuti è stata valutata mediante colorazione con ematossilina-eosina (H&E). La doppia immunofluorescenza per osteocalcina (OCN, rosso) e CD31 (cellule endoteliali, verde) o CD41 (piastrine, verde) è stata eseguita su campioni di arteria carotide sana (pannelli A-I e A-II), concentrandosi sul lume, sulla parete del vaso (pannello A-I e II-A, rispettivamente) e sul muscolo scheletrico normale (pannello B). Nel controllo negativo sono stati omessi gli anticorpi primari.

Barra di scala: 20 mm

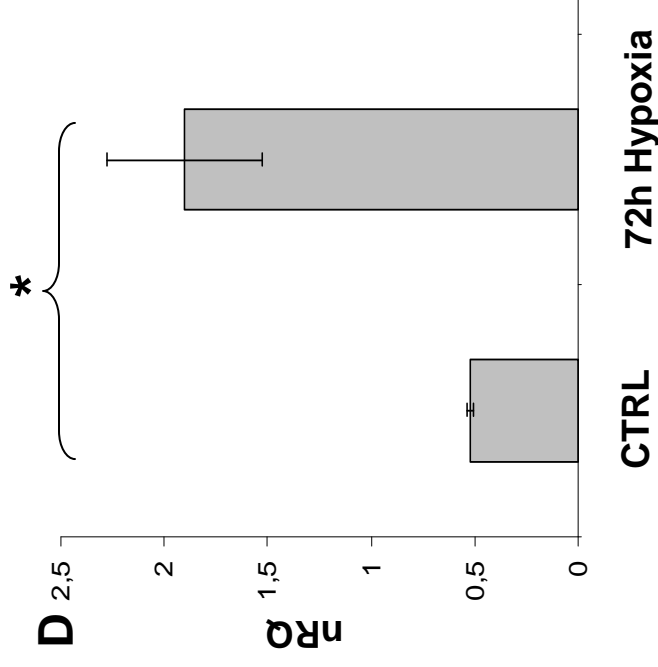
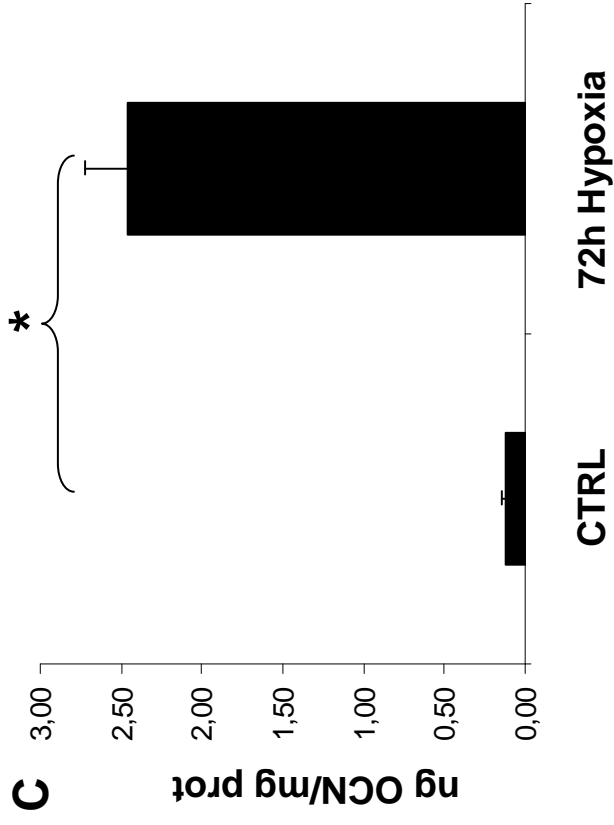
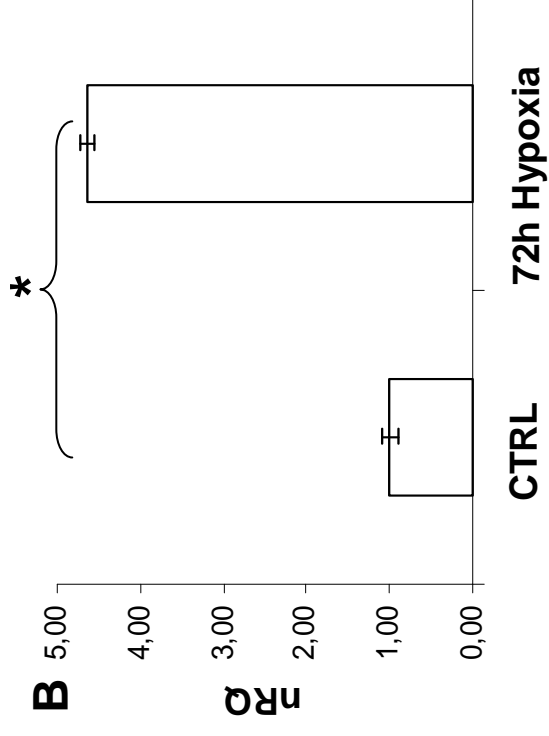
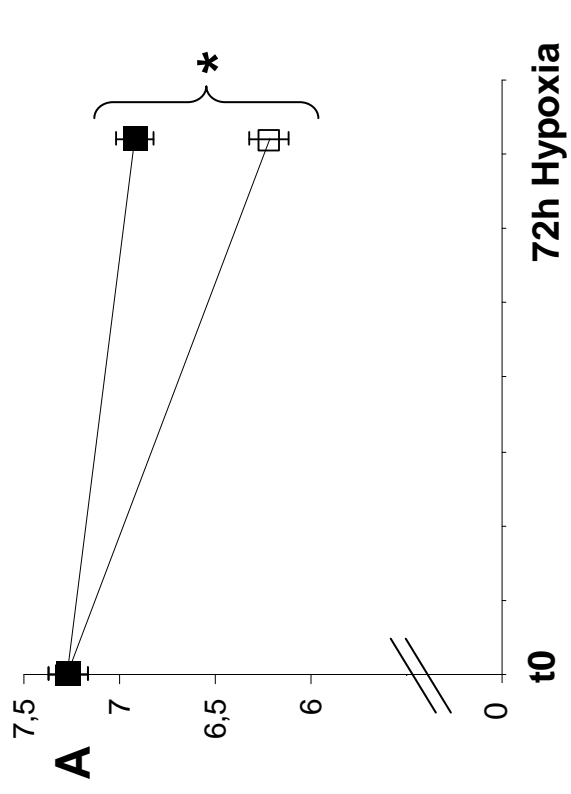
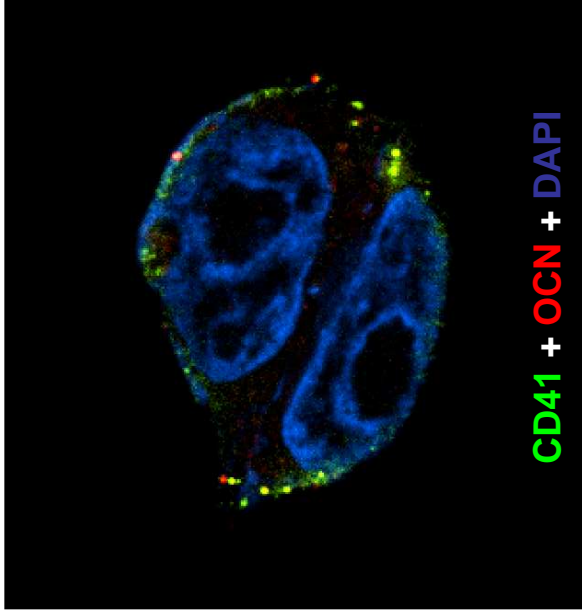


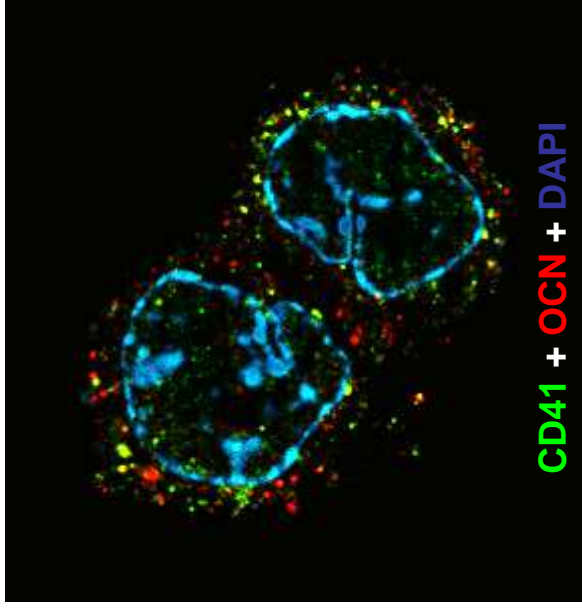
Figura 12

Figura 12- Effetto dell'ipossia prolungata sul profilo di espressione delle cellule MEG-01.

Variazioni di pH nel mezzo di coltura in seguito allo stimolo ipossico prolungato (72h-ipossia) per 72 ore (A). Corrispondenti variazioni del profilo di espressione genica (B) e proteica (C) dell'osteocalcina, rispetto al controllo coltivato in condizioni standard ed a osteoblasti umani utilizzati come modello di riferimento (D). Significatività: * = $P < 0,05$.



CTRL



72h Hypoxia

Figura 13

Figura 13 - Effetto dell'ipossia prolungata sul profilo di espressione proteica di OCN nelle cellule MEG-01

Saggio di immunofluorescenza doppia per l'analisi del pattern di espressione di osteocancina (OCN, rosso) e CD41 (verde) in cellule MEG-01 sottoposte a stimolo ipossico prolungato (72h- ipossia). La controcolorazione dei nuclei è stata eseguita con DAPI (blue).