

## Il release citochinico dopo treadmill test quale possibile marker del rischio evolutivo dell'arteriopatia periferica

R. CORDOVA, R. MARTINI, A. D'ERI, G. SALMISTRARO, M. MUSSAP<sup>1</sup>, M. PLEBANI<sup>1</sup>, G. M. ANDREOZZI

RELEASE OF CYTOKINES AFTER TREADMILL TEST AS POSSIBLE MARKER OF EVOLUTIVE RISK IN OCCLUSIVE PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE (PAD)

Unità Operativa di Angiologia,  
Dipartimento #Medicina di Laboratorio,  
Azienda Ospedaliera Università, Padova

**PAD is associated with low-grade inflammation, as determined by leukocytes activation, increased levels of fibrinogen, C-reactive protein and cytokines (interleukin-6 [IL-6], interleukin -1[IL-1].**

**Objective is to assess the role of the cytokines release as possible phlogistic marker of evolutive risk in PAD. In 20 patients males with intermittent claudication and 8 healthy males like control group, serum levels of interleukin 1 and interleukin 6 were measured at rest, during and after the performance of a treadmill-walking test (treadmill speed 2,5 km/h with slope of 15%).**

**Exercise is characterized by release of interleukin IL-1, responsible of coagulative activation in patients and in control group; IL-6, responsible of leukocytes recruitment and of adhesion process, is only increased in claudicant but not in control.**

**This behaviour, beyond confirming the different role of the two cytokines in the inflammatory process, emphasizes the presence of a faster and intense phlogistic activation in patients than in healthy one.**

### Introduzione

La storia naturale delle arteriopatie obliteranti periferiche (AOP) segnala che nel 70% dei casi la claudicazione intermittente (CI) rimane stabile nel tempo e soltanto il 30% dei pazienti mostra una progressione della malattia verso la claudicazione invalidante (CIn) e l'ischemia critica con alto rischio di amputazione<sup>1,2,3,4</sup>. Di questi ultimi il 22,5% stabilizza la propria disabilità con una autonomia di marcia alquanto ridotta, ed il 7,5% evolve verso stadi più avanzati con ridottissima capacità deambulatoria o verso l'ischemia critica<sup>5</sup>. È stimato che in Europa l'evoluzione dalla CI a quadri con elevato rischio di amputazione coinvolge ogni anno da 300 a 500 individui per milione di abitanti, e si manifesta nel 7-9% dei casi entro il primo anno dalla diagnosi, mentre negli anni successivi interessa il 2-3% dei casi<sup>6</sup>.

In base a questi dati è verosimile ipotizzare che la CI possa esprimersi clinicamente con due modalità differenti, la prima abbastanza benigna, la seconda alquanto aggressiva, con elevato rischio di amputazione e di eventi cardiovascolari fatali e non fatali.

Comunicazione presentata al XXIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Angiologia e Patologia Vascolare (Roma, 27-30 novembre 2002).

Tra le cause che possono condizionare il rischio di progressione della AOP, la disfunzione endoteliale ha un ruolo predominante<sup>7</sup>, e con essa la presenza di uno stato infiammatorio cronico con aumento delle citochine, della proteina reattiva C, di molecole di adesione che inducono il reclutamento e l'adesione leucocitaria<sup>8,9</sup>. Tuttavia il meccanismo con cui l'infiammazione condiziona la disfunzione endoteliale non è ancora completamente definito. Infatti, anche se l'associazione tra alcune infezioni croniche (herpes, helicobacter, clamidia pneumoniae)<sup>10,11</sup> con una ats aggressiva sembra essere dimostrata, non altrettanto chiaro appare il meccanismo con cui si realizza il peggioramento ats nei pazienti che non presentano infezioni o infiammazioni croniche.

Il nostro gruppo, basandosi sul presupposto che la CI rappresenti un modello clinico spontaneo sovrapponibile al modello sperimentale dell'ischemia riperfusione, con la deambulazione assimilabile alla fase di ischemia e la fase di recupero assimilabile a quella della riperfusione, sta valutando il ruolo dell'attivazione flogistica "funzionale" quale possibile marker delle AOP a rischio di progressione. In questo studio riferiamo i risultati sul comportamento del release citochinico.

### Casistica

Lo studio è stato condotto su 20 pazienti maschi con claudicazione intermittente (intervallo di marcia assoluta [ACD] 161,50±42,71 mt, età 60,65±5,35, indice di massa corporea [BMI] 27,58 ±4,44), utilizzando come gruppo controllo 8 soggetti maschi, esenti da patologia cardiovascolare (età 59,38±6,84, BMI 28,68 ±4,16).

### Disegno dello studio

Tutti i pazienti, dopo aver reso il consenso informato e preso confidenza con lo strumento, hanno eseguito un treadmill test a carico costante di 2,5 km/h con pendenza del 15%, sino al raggiungimento del dolore da claudicazione.

Nei soggetti del gruppo controllo il treadmill test, con il medesimo carico, è stato interrotto dopo sei minuti.

Prima del test, subito dopo lo stop e dopo 15 minuti di riposo su lettino, dalla vena cubitale sono stati eseguiti i prelievi per il dosaggio del pattern infiammatorio, rilevato mediante il dosaggio della interleuchina 1- $\beta$  (indicatore rapido dell'attivazione leucocitaria, che innesca i meccanismi procoagulanti) e della interleuchina 6 (responsabile del reclutamento leucocitario e dell'avvio del processo di adesione).

L'analisi statistica delle misure ottenute è stata eseguita utilizzando il test T di Student per dati appaiati e non appaiati, a due code, confrontando le differenze dei valori delle due citochine nei soggetti sani e nei claudicanti nelle varie fasi dello studio. La medesima analisi è stata eseguita anche confrontando i valori dei pazienti con quelli del gruppo di controllo.

Infine, per la IL-6 è stata eseguita l'analisi della varianza correlando i valori ottenuti prima dell'esercizio, allo stop e durante la fase di recupero, con l'intervallo assoluto di claudicazione.

### Risultati

*Interleuchina 1- $\beta$*  - I valori medi della IL-1 $\beta$  nel gruppo controllo sono stati 2,51±0,57 pg/ml prima del test, 3,34±0,63 (p=0,0163) alla fine dell'esercizio, e 3,14±0,80 (p=0,0590) dopo 15 minuti di recupero. Poco significativa la differenza tra i valori allo stop e dopo riposo (p=0,03).

Nei claudicanti i valori medi di 3,86±1,27 pg/ml prima del treadmill, aumentavano significativamente allo stop per dolore al polpaccio (5,97±2,18, p=0,0004) con ulteriore ma non significativo aumento dopo il riposo (7,18±2,88, ns).

L'analisi statistica tra gruppo controllo e claudicanti ha mostrato differenze significative sia tra i valori prima del test (p=0,0005) che dopo esercizio (p=0,0020) che dopo recupero (p=0,0006).

Considerando separatamente i claudicanti allo stadio 2A e quelli allo stadio 2B, que-

Table I. – Clinics Characteristics of Control Group and Patients.

Healthy Controls							Patients						
No of case	AGE	BMI	Dia-betes	ACD	Fon-taine's Stage	Ruther-ford's stage	No of case	AGE	BMI	Dia-betes	ACD	Fon-taine's stage	Ruther-ford's stage
1	50	34,9	no	no limits	–	–	3	68	29,29	no	120	2ndA	stable cl.
2	55	30,1	no	no limits	–	–	4	67	18,6	no	120	2ndA	stable cl
3	53	22,7	no	no limits	–	–	5	62	30,1	no	120	2ndA	stable cl
4	55	25,7	no	no limits	–	–	2	66	25,4	no	130	2ndA	stable cl
5	68	25,6	no	no limits	–	–	1	56	27,27	no	140	2ndA	stable cl
6	66	27,2	no	no limits	–	–	10	55	33,15	no	150	2ndA	stable cl
7	64	29,7	no	no limits	–	–	9	58	34,9	no	160	2ndA	stable cl
8	64	33,5	no	no limits	–	–	14	66	30,1	no	180	2ndA	stable cl
							8	62	22,7	no	200	2ndA	stable cl
							15	55	25,7	no	220	2ndA	stable cl.
							11	51	25,6	no	240	2ndA	stable cl.
							12	53	27,2	no	70	2ndB	disabling
							17	66	29,7	no	75	2ndB	disabling
							18	62	33,5	no	85	2ndB	disabling
							6	61	34,7	no	90	2ndB	disabling
							19	66	27,8	no	90	2ndB	disabling
							20	60	27,3	no	100	2ndB	disabling
							21	67	22,9	no	100	2ndB	disabling
							7	55	22,7	no	110	2ndB	disabling
							13	57	22,9	no	110	2ndB	disabling
							16	56	22,7	no	110	2ndB	disabling
mean	59,38	28,68					Mean	60,42	27,34		129,52		
SD	6,84	4,16					SD	5,31	4,45		46,98		

ACD  $\geq$  120 mt. Fontaine's stage 2nd A; Rutherford's classification Stable Claudication  
 ACD < 120 mt. Fontaine's stage 2nd B; Rutherford's classification Disabling Claudication  
 No statistical difference between Patients and Controls whitin age ( $p=0,60$ ) and BMI ( $p=0,46$ )

sti ultimi, oltre al significativo aumento dei valori basali rispetto allo stadio 2A, hanno mostrato un ulteriore significativo aumento durante la fase di riposo che non era presente nello stadio 2A (tab. II)

*Interleuchina 6* - I valori medi di IL-6 nel gruppo controllo sono stati  $1,88 \pm 0,29$  pg/ml prima del treadmill,  $1,89 \pm 0,24$  alla fine dell'esercizio, e  $1,91 \pm 0,27$  dopo il tempo di riposo, senza alcuna differenza statisticamente significativa.

Nei claudicanti la media di IL-6 è stata si  $2,67 \pm 1,10$  pg/ml prima del test, aumentava al momento dello stop ( $4,21 \pm 1,77$   $p=0,0016$ ),

con ulteriore significativo aumento durante la fase di recupero ( $5,18 \pm 2,75$ ,  $p=0,0003$ ). La differenza tra i valori allo stop e quelli dopo riposo è stata poco significativa ( $p=0,1844$ ).

L'analisi statistica e gruppo di controllo ha mostrato differenze significative a tutti i tempi dello studio, con  $p=0,0052$  prima del test,  $p=0,0010$  allo stop,  $p=0,0026$  dopo riposo).

Considerando separatamente lo stadio 2A e lo stadio 2B si evince un comportamento nettamente differente; entrambi aumentano in modo significativo i valori di IL-6 durante l'esercizio, ma nella fase di recupero lo stadio 2A rimane stabile o aumenta in modo non

Table II. – Mean, SD and P values of IL-1 $\beta$  changes measured before treadmill test, at stop of exercise and after 15 minutes recovery.

	Healthy Controls			case n.	All Claudicants			Case n.	Stable Cl. 2nd A			case n.	Disabling Cl. 2nd B		
	bef	stop	recov		bef	stop	recov		bef	stop	recov		bef	stop	recov
1	3,3	3,9	3,7	3	3,80	5,50	6,90	3	3,80	5,50	6,90	12	5,25	11,19	12,10
2	2,1	2,8	2,2	4	4,4	5,1	7,3	4	4,4	5,1	7,3	17	5,60	8,40	11,40
3	2,4	3,5	3,5	5	2,40	3,90	6,90	5	2,40	3,90	6,90	18	5,20	9,70	11,65
4	3,5	4	3,9	2	3,20	5,20	5,20	2	3,20	5,20	5,20	6	4,40	7,60	8,90
5	1,9	4,2	4,3	1	3,35	4,60	4,95	1	3,35	4,60	4,95	19	6,20	8,20	10,70
6	2,3	2,9	2,5	10	3,30	4,80	4,00	10	3,30	4,80	4,00	20	4,85	6,90	9,90
7	2,4	2,7	2,5	9	2,04	3,60	4,20	9	2,04	3,60	4,20	21	4,60	6,90	9,90
8	2,2	2,7	2,5	14	2,6	5,6	5,7	14	2,6	5,6	5,7	7	4,65	7,20	8,10
				8	2,25	3,40	3,80	8	2,25	3,40	3,80	13	4,5	5,8	6,4
				15	1,90	3,30	3,20	15	1,90	3,30	3,20	16	4,20	5,20	6,20
				11	2,4	3,20	3,40	11	2,4	3,20	3,40				
				12	5,25	11,19	12,10								
				17	5,60	8,40	11,40								
				18	5,20	9,70	11,65								
				6	4,40	7,60	8,90								
				19	6,20	8,20	10,70								
				20	4,85	6,90	9,90								
				21	4,60	6,90	9,90								
				7	4,65	7,20	8,10								
				13	4,5	5,8	6,4								
				16	4,20	5,20	6,20								
Mean	2,51	3,34	3,14		3,86	5,97	7,18		2,88	4,38	5,05		4,95	7,71	9,53
SD	0,57	0,63	0,80		1,27	2,18	2,88		0,79	0,92	1,48		0,62	1,77	2,10
P values	Controls vs. Patients			Before 0,0005; Stop 0,0020; Recovery 0,0006											
	Controls during exercise			Before vs. stop 0,0163; Before vs. Recovery 0,0590; Stop vs. Recovery 0,0300											
	Patients during exercise			Before vs. stop 0,0004; Before vs. Recovery NS; Stop vs. Recovery NS											
	Stable Claudication 2nd A			Before vs. stop 0,0005; Before vs. Recovery 0,0003; Stop vs. Recovery NS											
	Disabling Claudic. 2nd B			Before vs. stop 0,0001; Before vs. Recovery NS; Stop vs. Recovery 0,0509											

significativo, mentre lo stadio 2B mostra un ulteriore aumento statisticamente significativo (tab. III).

L'analisi della varianza tra intervallo assoluto di claudicazione e concentrazione di IL-6 ha mostrato una significativa correlazione inversa ( $r=0,70$ ) con i valori misurati durante il recupero, e correlazioni meno significative con i valori misurati a riposo ( $r=0,66$ ) o al momento dello stop ( $r=0,59$ ).

### Considerazioni

In questo studio l'esercizio fisico ha sempre innescato una risposta infiammatoria, che si manifesta con gradualità peculiari. Il release della IL-1 $\beta$ , responsabile dell'attiva-

zione coagulativa, si è manifestato significativamente sia nel claudicante sia nei controlli, confermando il ruolo di prima sentinella della IL-1 $\beta$ , inquadrabile nella fisiologica attivazione del sistema microcircolatorio di difesa<sup>12</sup>. Al contrario, la IL-6, citochina responsabile del reclutamento e dell'adesione leucocitaria, è aumentata soltanto nel gruppo dei claudicanti ma non nei controlli. Questo differente comportamento, oltre a confermare il ruolo differente delle due citochine nella risposta infiammatoria, sottolinea la presenza di una più rapida ed intensa attivazione flogistica nel claudicante rispetto al sano, come se nei pazienti claudicanti vi fosse, in varia misura, uno stato di preesistente attivazione (primed leukocyte) più o meno latente.

Table III. – Mean, SD and P values of IL-6 changes measured before treadmill test, at stop of exercise and after 15 minutes recovery.

	Healthy Controls			All Claudicants			Stable Cl. 2nd A			Disabling Cl. 2nd B					
	case n.	bef	stop	recov	case n.	bef	stop	recov	Case n.	bef	stop	recov	case n.	bef	stop
1	1,7	1,9	1,7	3	2,80	3,90	5,10	3	2,80	3,90	5,10	12	3,50	4,70	8,50
2	2,1	2	2	4	4,20	6,30	7,30	4	4,20	6,30	7,30	17	3,90	4,20	9,60
3	1,8	1,8	1,9	5	2,20	3,50	3,80	5	2,20	3,50	3,80	18	3,60	5,35	9,90
4	1,7	1,6	1,8	2	1,80	3,70	3,10	2	1,80	3,70	3,10	6	2,90	5,70	7,30
5	2,3	2,2	2,4	1	1,50	3,10	2,80	1	1,50	3,10	2,80	19	4,35	8,10	9,10
6	2,2	2,2	2,2	10	1,90	2,80	2,30	10	1,90	2,80	2,30	20	5,30	8,60	9,40
7	1,7	1,8	1,7	9	1,40	1,80	2,60	9	1,40	1,80	2,60	21	2,70	4,30	3,20
8	1,5	1,6	1,6	14	1,45	3,30	2,80	14	1,45	3,30	2,80	7	2,10	3,20	3,70
				8	1,50	2,30	4,46	8	1,50	2,30	4,46	13	2,40	3,50	4,20
				15	2,00	2,85	2,20	15	2,00	2,85	2,20	16	2,97	4,60	4,90
				11	1,70	2,65	2,45	11	1,70	2,65	2,45				
				12	3,50	4,70	8,50								
				17	3,90	4,20	9,60								
				18	3,60	5,35	9,90								
				6	2,90	5,70	7,30								
				19	4,35	8,10	9,10								
				20	5,30	8,60	9,40								
				21	2,70	4,30	3,20								
				7	2,10	3,20	3,70								
				13	2,40	3,50	4,20								
				16	2,97	4,60	4,90								
Mean	1,88	1,89	1,91		2,67	4,21	5,18		2,04	3,29	3,54		3,37	5,25	6,98
SD	0,29	0,24	0,27		1,10	1,77	2,75		0,82	1,17	1,55		0,97	1,81	2,69
P values	Controls vs. Patients			Before 0,0052; Stop 0,0010; Recovery 0,0026											
	Controls during exercise			Before vs. stop NS; Before vs. Recovery NS; Stop vs. Recovery NS											
	Patients during exercise			Before vs. stop 0,0016; Before vs. Recovery 0,0003; Stop vs. Recovery 0,1844											
	Stable Claudication 2nd A			Before vs. stop 0,0089; Before vs. Recovery 0,0105; Stop vs. Recovery NS											
	Disabling Claudic. 2nd B			Before vs. stop 0,0105; Before vs. Recovery 0,0008; Stop vs. Recovery 0,1044											

Ma il dato più rilevante, a nostro avviso, è la tendenza ad un ulteriore aumento che si registra durante nella fase di recupero, con amplificazione dell'attivazione leucocitaria, che sembra essere proporzionale al grado di compromissione della AOP.

Infatti, nei pazienti allo stadio 2A, nei quali il compenso clinico è ancora soddisfacente ed il danno endoteliale meno rilevante, la risposta infiammatoria all'esercizio tende ad esaurirsi con esso. Al contrario i pazienti con claudicazione invalidante (stadio 2B) portatori di un più elevato danno endoteliale, l'attivazione flogistica non si esaurisce con lo sforzo, ma perdura ed aumenta ulteriormente durante la fase di recupero.

Questo comportamento, tuttavia, non è univoco nei diversi stadi della claudicazione intermittente. Infatti, i pazienti 3, 4 e 8 dello stadio 2A mostrano un comportamento simi-

le quello descritto per lo stadio 2B, e, viceversa, i pazienti 7 e 13 del gruppo della claudicazione invalidante, hanno mostrato una tendenza analoga a quella dei claudicanti stabili.

L'attivazione infiammatoria indotta dall'esercizio fisico, quindi, sembra non correlata con lo stadio clinico della claudicazione, ma essere espressione di una individuale attitudine fisiopatologica del paziente, che potrebbe essere correlata con la tipologia aggressiva dell'AOP.

Un'ulteriore riprova di questa ipotesi è data dalla più significativa correlazione inversa tra la distanza assoluta di claudicazione ed i livelli di IL-6 misurati durante la fase di recupero, piuttosto che prima dell'esercizio o al momento del dolore al polpaccio.

Ulteriori approfondimenti chiariranno se la misura del release citochinico dopo eser-

cizio al treadmill potranno trovare applicazione routinaria in clinica.

### Bibliografia

1. Coran AG, Warren R. *Arteriographic changes in femoropopliteal arteriosclerosis obliterans. A five years follow-up study.* N Engl J Med 1966;274-643.
2. Jelnes R, Gaardsting O, Hougaard Jensen K, Backgaard N, Tomnesen KH, Schroeder T et al. *Fate in intermittent claudication: outcome and risk factors.* Br Med J 1986 293:1137-1140.
3. Leng GC, Lee AJ, Fowkes FG, Whiteman M, Dumba J, Housley E, et al. *Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease in the general population.* Int J Epidemiol 1996 25:1172-1181.
4. Brevetti G, Martone VD, Perna S, Cacciatore F, Corrado S, Di Donato A, Di Iorio A. *Intermittent claudication and risk of cardiovascular events.* Angiology 1998 49:843-848.
5. Dormandy JA, Murray GD. *The fate of the claudicant: a prospective study of 1969 claudicants.* Eur J Vasc Surg 1991 5:131-133.
6. *European Working Group on Critical Leg Ischaemia. 2nd European Consensus Document on Critical Leg Ischaemia.* Circulation 1991 84(4):1-26.
7. Brevetti G, Martone VD, de Cristofaro T, Corrado S, Silvestro A, Di Donato AM, Bucur R, Scopacasa F. *High levels of adhesion molecules are associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with peripheral arterial disease.* Thromb Haemost. 2001 Jan;85(1):63-6.
8. Edwards AT Blann AD, Suarez-Mendez VJ, Lardi AM, McCollum CN. *Systemic responses in patients with intermittent claudication after treadmill exercise.* Br J Surg 1994 81 (12):1738-41.
9. Hickman P, McClaren M, Hill H, McCullom P, Belch J. *Exercise causes endothelial damages in claudicants but not in healthy controls.* Br J Surg 1994 81:616 verificare.
10. Shah PK. *Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection.* Cardiol Rev. 2000 Jan-Feb;8(1):31-9. Review.
11. Liuba P, Karnani P, Pesonen E, Paakkari I, Forslid A, Johansson L, Persson K, Wadstrom T, Laurini R. *Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice.* Circulation. 2000 Aug 29;102(9):1039-44.
12. Andreozzi GM. *Flow Dynamics and Pathophysiological Mechanisms of Diseases of Lower Limbs Arteries.* in Salmasi M & Strano A (eds) Angiology in Practice, 251-270, Kluwer Ed, London, 1996.