

era positiva per Oct-4. In modo rilevante, un piccolo numero di cellule staminali cardiache c-kit^{pos}/Sca-1^{neg} era positiva per Oct-4. L'espressione di Oct-4 nelle CSCs isolate da cuori di topi e da cuori umani è stata confermata mediante rt-PCR e western blot. L'eliminazione del siero dal mezzo di coltura delle CSCs c-kit^{pos} ha permesso di selezionare *in vitro* una sottopopolazione di CSCs con aumentata espressione di Oct-4 (analizzata mediante immunocitochimica e rt-PCR). Queste cellule CSCs murine e umane Oct-4^{pos} possono essere coltivate per lunghi periodi di tempo e possono differenziarsi in miociti, cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, adipociti, osteociti, cellule nervose e cheratinociti.

Conclusioni. Nel cuore di uomini adulti e di topi abbiamo identificato una popolazione di CSCs pluripotente che esprime Oct-4 da noi proposta come la vera cellula staminale cardiaca adulta. Così è probabile che le CSCs variamente identificate precedentemente come Oct-4^{neg}/c-kit^{pos}/Sca-1^{pos} rappresentino la progenie delle cellule che abbiamo qui descritto.

P130

CORRELAZIONE TRA INFIAMMAZIONE E PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DELL'ACIDO ARACHIDONICO (F2-ISOPROSTANI). UN POSSIBILE RUOLO DI AMPLIFICAZIONE DEL DANNO CARDIOVASCOLARE NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE

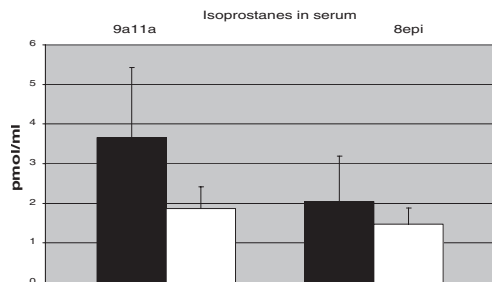
F. Carluccio (a,c,e), W. Siems (b,e), A. Distante (c,d), J. Luno (f) (a) Dipartimento di Medicina, U.O. di Nefrologia e Dialisi, Ospedale "I Veris della Ponti", Scorrano Lecce, (b) Loges-School for Physical Medicine and Rehabilitation, Bad Harzburg, Germania, (c) IFC-CNR - Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Sezione di Lecce, (d) Dipartimento Cardio-Toracico, Università di Pisa, (e) European Group for Clinical Research on Oxidative Stress, (f) Department of Nephrology, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid, Spagna

È stato già dimostrato che i pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche come l'insufficienza renale cronica (IRC), siano esposti ad un elevato rischio cardiovascolare (CV). È noto anche come nella patologia uremica coesista un alto grado di stress ossidativo risultante dalla riduzione delle capacità dei sistemi antiossidanti, incluso acido ascorbico, tocoferolo, glutazione, combinata con un incremento dei fattori pro-ossidanti, incluso lo status infiammatorio cronico. I prodotti di perossidazione lipidica come 4-idrossinonenale e malondialdeide in nostri studi precedenti correlavano con il contenuto lipidico della dieta ed è stata anche dimostrata una diretta proporzionalità dei parametri infiammatori con il grado di anemia. Gli F2-isoprostani sono prodotti di ossidazione dell'acido arachidonico la cui sovrapproduzione non è influenzata dal contenuto lipidico della dieta.

Scopo dello studio è stato valutare la relazione tra F2-isoprostani, valori di emoglobina (Hb) e infiammazione cronica.

La Proteina C Reattiva (PCR), i valori di Hb e la concentrazione di isoprostani (9a,11a-PGF2a e 8epi-PGF2a), misurati mediante HPLC, sono stati valutati in 14 pazienti non diabetici, affetti da IRC in stato uremico e confrontati con i valori di un gruppo di 18 individui non affetti da patologie croniche. Effettuata l'analisi statistica, i valori di 9a,11a-PGF2a e 8epi-PGF2a erano aumentati nei pazienti con IRC rispetto ai controlli. In particolare 3,7 nM vs 1.8 nM e 2.1 vs 1.4 nM rispettivamente.

Aumento di 9a,11a-PGF2a e 8epi-PGF2a (14 pazienti vs 18 controlli sani) (p<0,05)



Vi era inoltre una correlazione statisticamente significativa tra isoprostani e PCR; PCR ed Hb ma non tra isoprostani e grado di anemia.

In conclusione, la correlazione tra livelli ematici patologici di F2-isoprostani e PCR conferma ulteriormente il grave squilibrio fattori ossidanti/riducenti, in senso pro ossidante, che caratterizza gli stati infiammatori cronici. La stretta correlazione tra PCR ed isoprostani inoltre ipotizza un ruolo dei prodotti di ossidazione dell'acido arachidonico nell'ambito della complessa interrelazione tra anemia, infiammazione cronica, stress ossidativo e rischio cardiovascolare.

P131

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI PORCINE PER IL RIVESTIMENTO DI DISPOSITIVI CARDIACI ARTIFICIALI AUTOLOGHI

E. Briganti (a), P. Losi (a), M.C. Barsotti (b), D. Spiller (a), S. Sbrana (c), R. Di Stefano (b), A. Balbarini (d), G. Soldani (a)

(a) Laboratorio di Biomateriali, Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Massa, (b) Laboratorio di Ricerca Cardiovascolare, Dipartimento Cardio Toracico, Università di Pisa, Pisa, (c) Laboratorio di Ematologia e Citometria a Flusso, Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Massa, (d) Unità di Angiologia, Dipartimento Cardio Toracico, Università di Pisa, Pisa

Background. Una strategia promettente per limitare la trombogenicità e l'iperplasia neointimale in seguito all'impianto di dispositivi cardiovascolari artificiali, quali protesi vascolari e valvole cardiache, consiste nel rivestimento

della superficie sintetica a contatto con il sangue con cellule endoteliali (ECs). Sono state fino ad oggi utilizzate ECs mature isolate da vasi sanguigni, dall'omento, dal grasso e dalla vena del cordone ombelicale; tuttavia le procedure di isolamento sono traumatiche e la scarsa resa e bassa capacità replicativa delle cellule isolate limita la loro applicazione nell'ambito del *tissue engineering*. Nel 1997, Asahara e colleghi hanno dimostrato per la prima volta la possibilità di isolare cellule progenitrici endoteliali (EPCs) da sangue periferico; da allora numerosi studi ne hanno evidenziato molteplici applicazioni cardiovascolari.

Scopo. Determinare la possibilità di isolare con successo EPCs da sangue venoso periferico di maiale ed espanderle *in vitro* in breve tempo mediante una metodica semplice ed a basso costo. Tali cellule potranno essere impiegate come sorgente autologa di ECs per la realizzazione di dispositivi cardiovascolari *tissue engineered* da sperimentare nel modello animale di maiale.

Metodi. Cellule mononucleate da sangue venoso periferico (PBMCs) di maiale sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità (Histopaque 1,077 g/ml). Il recupero e la vitalità delle cellule sono stati valutati mediante conta cellulare e test di esclusione del Trypan Blue rispettivamente.

Le PBMCs sono state seminate in piastre pre-trattate con fibronectina umana e mantenute nel terreno di coltura EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium-2), costituito da EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2) supplementato con 2% di FBS, hEGF, VEGF, IGF-1, acido ascorbico, GA-1000, hFGF-b, idrocortisone, eparina (Clonetics), a 37°C e 5% CO₂. Tre giorni dopo l'isolamento, le cellule non aderenti sono state eliminate ed è stato aggiunto terreno di coltura fresco. Successivamente il terreno è stato cambiato ogni tre giorni.

Le EPCs sono state tipizzate tramite analisi citofluorimetrica ed immunocitochimica utilizzando markers di cellule endoteliali mature: von Willebrand Factor (vWF), CD31, Dil-acLDL e Lectina da Bandeiraea simplicifolia (BS I).

Risultati. Il recupero delle PBMCs è stato di circa il 50% rispetto al valore medio riportato nella formula leucocitaria di sangue porcino e la vitalità è risultata di circa il 98%. Dopo tre giorni dall'isolamento sono stati osservati numerosi piccoli cloni di cellule con morfologia simil-endoteliale; le cellule hanno continuato a replicarsi fino a raggiungere la confluenza al 21° giorno dall'isolamento. Le cellule sono state mantenute in coltura fino al quarto passaggio conservando la tipica morfologia endoteliale. Dall'analisi citofluorimetrica è emerso che: il 94% delle cellule sono risultate vWF(+), il 97% CD31(+), il 78% Dil-acLDL(+)/BSI(+). Il fenotipo endoteliale delle cellule isolate è stato confermato dall'analisi immunocitochimica.

Conclusioni. Questo studio ha consentito di individuare le condizioni ottimali per l'isolamento, differenziamento e mantenimento in coltura delle EPCs porcine. Tali cellule endoteliali, ottenibili tramite un semplice prelievo di sangue venoso periferico, saranno utilizzate per la sperimentazione nel modello animale di maiale di dispositivi *tissue engineered* autologhi.

P132

CARDIOVASCULAR EFFECTS OF CAFFEINE DURING COGNITIVE TASKS

A. Sciarilli (a), G. Renda (a), M. Zimarino (a), G. Committeri (b), M. Zurro (a), A. Tatasciore (a), F. Santarelli (a), J. Pizzicannella (a), G. Galati (a), R. De Caterina (a)

(a) Department of Cardiology, "G. d'Annunzio" University, Chieti, (b) Department of Psychology, "G. d'Annunzio" University, Chieti, Italy

Background and Aim. The effects of caffeine assumed with coffee drinking on the cardiovascular apparatus are complex and incompletely characterized. We tested the interaction of caffeine with emotional responses during demanding cognitive tasks.

Methods. We recruited 29 male healthy volunteers (age range=23-31 years), habitual moderate caffeine consumers with normal trait anxiety score, avoiding coffee and other caffeine-containing drinks and foods for the 24 h preceding the study.

Each subject underwent 2-h ambulatory blood pressure (BP) and heart rate (HR) monitoring at 6 min intervals. After baseline evaluations, each participant was administered, in a single-blinded fashion, a 40 mL volume of a decaffeinated coffee preparation spiked with either 3 mg/kg caffeine (about two cups of espresso coffee), or the corresponding vehicle (placebo). After 30 min from coffee assumption, participants were submitted to a low intensity task of selective attention (Categorical Search Task), to more demanding tasks of selective attention and interference (Flanker Tasks) and to a classic interference task (Stroop Test). The same protocol was repeated 24 h later, after the alternative drinking.

Results. Systolic BP increased 1 h after caffeine drinking (*P<0.05 vs placebo), coincident with the demanding Flanker interference tests (see Figure; ΔBP=difference in systolic and diastolic BP between caffeine and placebo). Diastolic BP increased after about 30 min from coffee consumption (*P<0.05). Both systolic and diastolic BP showed no changes after placebo. HR was similar in the two settings throughout the duration of the study.

Conclusions. During cognitive tasks coffee consumption produces an early increase in diastolic and a later increase in systolic BP.

