

Ulcera venosa: processi rigenerativi e riparativi

G. Guarnera, R. Borioni, P.E. Mollo, F. Pomella, L. Guarnera, S. Bilancini, M. Lucchi

La lesione

La cute rappresenta l'organo più esteso del corpo e, in quanto tale, svolge funzioni vitali come la protezione contro forze meccaniche e infezioni, omeostasi dei fluidi, termoregolazione. Una superficie esterna intatta permette lo svolgersi di queste funzioni. È quindi fondamentale che ogni lesione possa andare incontro prontamente ad un processo di guarigione. Una serie di condizioni cliniche di carattere cronico (diabete, patologie vascolari, lesioni da pressione) rappresentano fattori di rischio per un ritardo o un impedimento alla guarigione di una ulcera.

L'ulcera venosa è la più frequente forma di lesione ulcerativa degli arti inferiori: il primo atteggiamento terapeutico consiste nel trattamento dell'ipertensione venosa che ne è alla base attraverso la terapia compressiva (per contrastare la stasi), l'abolizione chirurgica dei reflussi, la terapia medica (per bilanciare gli effetti dell'ipertensione a livello microcircolatorio).

La rigenerazione e la riparazione

Una lesione può guarire attraverso una rigenerazione o una riparazione. La rigenerazione consiste nella sostituzione specifica del tessuto danneggiato, come avviene in alcuni organismi animali (l'axolotl o *Ambystoma mexicanum*) o nella superficie epidermica fetale^{1, 2}. Nella cute degli adulti si verifica generalmente una forma aspecifica di guarigione attraverso la fibrosi tessutale e la formazione di una cicatrice.

Il processo fisiologico di guarigione di una ulcera è complesso, chiama in causa meccanismi cellulari, biochimici e bioumorali con cellule, fattori di crescita e citochine che agiscono come componenti di una grande orchestra. Il processo può essere artificialmente suddiviso in fasi, che non si susseguono in una rigida sequenza, ma si sovrappongono nello spazio e nel tempo³. L'interruzione o l'alterata regolazione di una o più fasi porta alla cronicità della lesione e alla sua mancata guarigione.

L'emostasi

La prima fase è rappresentata dall'emostasi e dalla formazione di una matrice provvisoria; si verifica immediatamente dopo il trauma e si completa in alcune ore. Il trauma attiva la cascata coagulativa estrinseca e intrinseca (attraverso il collagene esposto). Si forma un coagulo provvisorio di fibrina in cui sono intrappolate le piastrine, che rilasciano fattori di crescita e chemochine nell'ambiente locale della lesione. Le piastrine innescano un fenomeno di vasocostrizione, per ridurre le perdite ematiche e il coagulo forma una matrice provvisoria che agisce da supporto alla migrazione di leucociti, cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali. La

vasocostrizione è seguita da una vasodilatazione durante la quale le piastrine invadono la matrice provvisoria⁴. Le piastrine influenzano l'infiltrazione di leucociti; piastrine e leucociti attivano il processo infiammatorio attraverso il rilascio di fattori di crescita e citochine pro-infiammatorie, come la IL-1beta e il tumor necrosis factor-alfa (TNF-alfa)⁵.

L'infiammazione

L'infiammazione rappresenta una fase cruciale nel processo di guarigione: un suo prolungamento porta ad una cronicizzazione della lesione. Nei tessuti e nell'essudato delle ulcere vi è una continua competizione tra segnali infiammatori e antiinfiammatori che porta alla creazione di un microambiente non appropriato a favorire la guarigione⁶. Una alterata regolazione di molte citochine pro infiammatorie, come le già citate IL-1beta e il tumor necrosis factor, prolunga la fase infiammatoria e ritarda la guarigione⁷. Inoltre l'incremento di tali citochine porta ad un innalzato livello di metalloproteasi che degradano la matrice e impediscono la migrazione cellulare⁸.

L'infezione

Una elevata carica batterica rappresenta un fattore favorente lo sviluppo e la cronicità della lesione. Un ruolo fondamentale della fase infiammatoria consiste proprio nel ridurre tale carica in modo che possa essere tollerata e abbattuta dai tessuti sani⁶. Alcune specie particolarmente virulente possono organizzarsi in comunità autonome, finemente organizzate, e dar vita a formazione di biofilm, che ostacolano la risposta dell'ospite e l'azione degli antimicrobici, ritardando o impedendo la guarigione⁹.

Le proteasi

La ritardata guarigione di una ulcera è in parte da attribuirsi all'alterata regolazione del rapporto tra proteasi e loro inibitori, conseguenza dell'incremento delle citochine pro infiammatorie e/o dell'aumentata carica batterica. E' stato dimostrato che le metalloproteasi di matrice, come la collagenasi e la gelatinasi, sono presenti in maggior concentrazione nell'essudato delle lesioni croniche rispetto a quanto avviene nelle lesioni acute¹⁰.

Le fasi dell'infiammazione

La fase infiammatoria, attivata già durante l'emostasi, può essere divisa in una fase precoce che vede protagonisti i neutrofili e in una fase tardiva con la comparsa dei monociti e la loro trasformazione in macrofagi. I neutrofili vengono reclutati precocemente nel sito della lesione, sono presenti nei giorni 1-2 e svolgono l'importante funzione di fagocitosi, secrezione di proteasi per abbattere la carica batterica e degradare i tessuti devitalizzati e rilascio di mediatori che attraggono altre cellule immunitarie¹. Una volta svolto il loro ruolo nel processo riparativo, i neutrofili vanno incontro ad apoptosi. I monociti iniziano a migrare nella lesione e a differenziarsi in macrofagi dal terzo giorno. Il loro numero rimane stabile sino circa al

quinto giorno, quando cominciano gradualmente a diminuire, sino a livelli stazionari, fino al giorno 14. Durante questo periodo, i macrofagi rimuovono i neutrofili degradati e secernono varie citochine, fattori di crescita e altri mediatori¹¹.

I macrofagi rivestono un ruolo chiave nel passaggio dalla fase infiammatoria a quella proliferativa, in quanto stimolano fibroblasti, cheratinociti e cellule endoteliali a differenziarsi, proliferare e migrare, portando a deposizione di nuova matrice extracellulare, ripitelizzazione e neovascolarizzazione della lesione^{12, 13}.

I fenotipi dei macrofagi

I macrofagi presenti in una ulcera, sia residenti sia differenziatisi dai monociti, non costituiscono una popolazione omogenea di cellule, ma esistono come multipli fenotipi che possono essere classificati in linea di massima come fenotipi M1 e M2. I monociti possono essere classicamente attivati per formare i macrofagi M1 o alternativamente per formare i macrofagi M2. I macrofagi M1 si differenziano nel fenotipo M2 attraverso stimoli locali che intervengono nell'evoluzione della lesione¹⁴ (Fig. 1).

Nei primi stadi della riparazione tissutale, i macrofagi M1 esercitano una attività fagocitica, battericida e pro-infiammatoria; in un secondo tempo, i macrofagi M2 sono coinvolti nella sintesi di mediatori anti-infiammatori, nella produzione di matrice extracellulare, nella proliferazione di fibroblasti e nella neovascolarizzazione¹⁵. I macrofagi M2 inoltre hanno la funzione di fagocitosi di neutrofili (efferocitosi), batteri e detriti per prevenire ulteriori danni nel sito della lesione nelle fasi più avanzate di guarigione.

Una alterazione nell'attivazione dei fenotipi e in particolare una mancata transizione da M1 a M2 porta ad un prolungamento della fase infiammatoria e alla cronicizzazione dell'ulcera. Nelle ulcere croniche, i macrofagi sono in prevalenza M1, che non sono in grado di fagocitare i neutrofili consumati e questo porta al reclutamento di un maggior numero di macrofagi e a un aumento dell'infiammazione¹⁶.

In particolare, l'ulcera venosa costituisce una malattia infiammatoria cronica, in cui l'ipertensione venosa e l'aumentata shear stress causa un danno endoteliale e l'attivazione dei leucociti (neutrofili, monociti e macrofagi) che rimangono intrappolati nell'arto. In una ulcera venosa cronica, circa l'80% delle cellule presenti ai bordi della lesione sono macrofagi, che contengono grandi quantità di ferro (derivante dalla fagocitosi di eritrociti stravasati nel tessuto). Tali alti livelli di ferro portano ad una alterazione del fenotipo macrofagico, che permane M1 e alti livelli di M1 portano a loro volta ad una aumentata produzione di TNF che ritarda la guarigione dell'ulcera¹⁷.

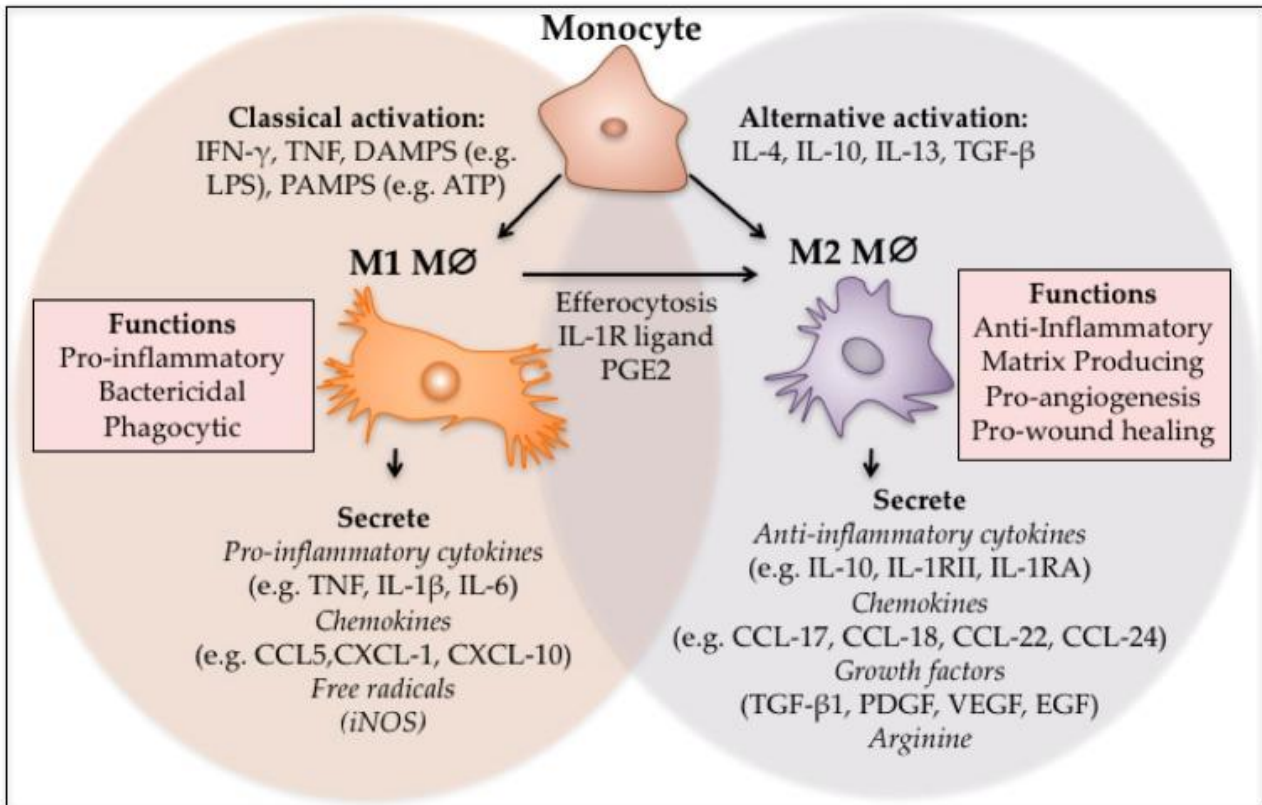


Fig. 1: Fenotipi dei macrofagi e loro funzioni durante il processo di riparazione tissutale. (Da: Hesketh M, Sahin KB, West ZE e Murray RZ: Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. Int J Mol Sci 2017; 18: 1545-55.

Proliferazione

La fase della proliferazione (che si verifica circa 3-10 giorni dopo la lesione) ha lo scopo di realizzare la copertura della superficie della lesione, la formazione del tessuto di granulazione, il ripristino del network vascolare.

Riepitelizzazione

La riepitelizzazione inizia alcune ore dopo il trauma e la durata è strettamente condizionata dalle dimensioni, dalla profondità e dalla carica batterica della lesione. Nelle ulcere a spessore parziale, il processo di riepitelizzazione avviene in circa 8-10 giorni¹⁸ ed è assicurato dai cheratinociti presenti ai bordi dell'ulcera e dalle cellule staminali epiteliali.

Le cellule staminali

Le cellule staminali epiteliali occupano tre distinte nicchie: il bulbo del follicolo pilifero, la base della ghiandola sebacea e lo strato basale dell'epidermide¹⁹. Anche cellule adipocitiche locali progenitrici possono avere un ruolo nel processo riparativo²⁰. Una compromissione della funzione locale e sistemica delle cellule staminali e progenitrici riveste una parte considerevole nella patologia delle lesioni croniche.

I cheratinociti

I cheratinociti vanno incontro ad una modificazione del loro citoscheletro, modificano la loro forma, perdono i contatti intercellulari e migrano lungo il coagulo di fibrina preformato, strisciando con movimenti lamellipodiali per diffondersi sulla ferita (fenomeno dello “shuffling”)²¹. Una volta arrivati al centro della ferita attraverso un meccanismo di inibizione da contatto si ferma il flusso migratorio, si stabiliscono dei contatti di aderenza intercellulari e la lesione si chiude come attraverso uno zip.

Perché si possa verificare una adeguata riepitelizzazione è necessaria la formazione di un tessuto di granulazione (costituito da macrofagi, fibroblasti, vasi sanguigni) e di una appropriata matrice extracellulare che favorisca la migrazione dei cheratinociti, in un microambiente umido con un corretto bilanciamento delle proteasi e dei loro inibitori.

L'angiogenesi

Il ripristino di un sistema vascolare cutaneo è legato ad una complessa cascata di eventi cellulari, umorali e molecolari, a livello del letto della lesione, per garantire una perfusione nutritiva. Il primo passo nella formazione di nuovi vasi è rappresentato dal legame dei fattori di crescita con i loro recettori sulle cellule endoteliali dei vasi preesistenti, con la conseguente attivazione di una cascata di segnali intracellulari¹. Le cellule endoteliali attivate secernono enzimi proteolitici che dissolvono la lamina basale e consentono così la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali nella ferita, a guisa di germoglio (fenomeno dello “sprouting”). Questi germogli neocostituiti formano piccoli canali tubulari che si interconnettono ad altri. Il pattern del processo di neovascolarizzazione ha un andamento circolare, con un anello interno di vasi organizzati circolarmente attorno ai margini della ferita e connessi con vasi ad orientamento radiale, che formano un ponte tra il network vascolare fisiologico e i vasi neoformati¹⁶ (Fig 2). Con il progredire del processo di riepitelizzazione, l'anello interno scompare e i vasi a direzione radiale si interconnettono tra di loro per formare un nuovo network vascolare dermico.

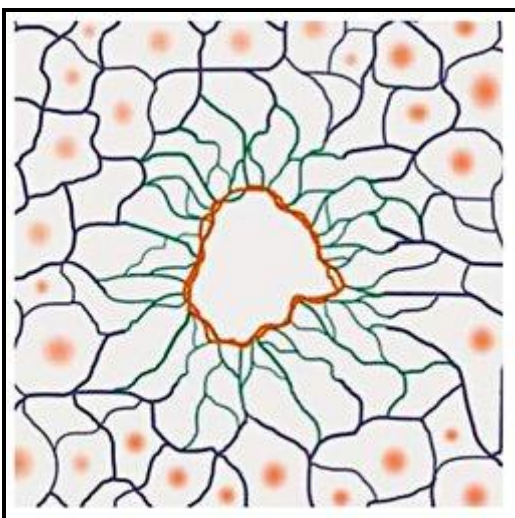


Fig. 2: Schema di neovascolarizzazione durante la fase proliferativa. (Da: Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. Eur Surg Res 2017; 58: 81-94).

Il rimodellamento

Il rimodellamento è l'ultima fase del processo di riparazione e si verifica dal 21° giorno fino a 1 anno dal trauma. La formazione del tessuto di granulazione si interrompe per apoptosi delle cellule. Il tessuto originale viene sostituito da una cicatrice, che è acellulare, non ha follicoli piliferi né ghiandole sebacee e ha un tipo di collagene differente da quello della cute sana. Il collagene di tipo III, prodotto nella fase proliferativa, viene sostituito dal collagene di tipo I, più resistente. Questo tipo di collagene è disposto in piccoli fasci paralleli, diversi da quelli orientati a canestro della cute sana. Successivamente entrano in gioco i miofibroblasti che provocano una contrazione della ferita e quindi un accorciamento della lunghezza della cicatrice rispetto alla ferita originale. La cicatrice precocemente ha una colorazione rossa dovuta all'intenso network capillare nella sede della lesione. Quando la riepitelizzazione è completa, i capillari regrediscono, cosicché una cicatrice matura è avascolare e acellulare.

Una alterazione del processo di riparazione tissutale con persistenza della fase infiammatoria porta alla formazione di una cicatrice anomala, ipertrofica (con sottili fibre collagene organizzate in noduli) o cheloide (con spesse fibre collagene). Nelle ferite normali si attivano segnali che bloccano il processo riparativo quando si è verificata la riepitelizzazione. Nelle ferite croniche tali segnali sono assenti o inefficaci, vi è una eccessiva secrezione di fattori di crescita con produzione continua di tessuto di granulazione e formazione di una cicatrice eccessiva^{7, 22}.

Le implicazioni terapeutiche

La conoscenza delle fasi e dei protagonisti del processo riparativo consente di orientare in modo mirato il nostro intervento terapeutico. Il fisiologico evolversi delle fasi, in caso di ulcera cronica, è bloccato alla fase infiammatoria. Il primo trattamento consiste nella correzione delle condizioni fisiopatologiche alla base del ritardo del processo riparativo. Nel caso dell'ulcera venosa è necessario il trattamento dell'ipertensione venosa attraverso la compressione, l'abolizione dei reflussi venosi, la terapia medica che contrasti gli effetti di tale ipertensione a livello micro- circolatorio.

A livello locale è fondamentale una accurata preparazione del letto dell'ulcera, l'abbattimento della carica batterica attraverso il debridement, il controllo dell'edema. In tale contesto, negli ultimi tempi hanno svolto un ruolo importante le medicazioni tecnologicamente avanzate, che interagiscono con la lesione creando un microambiente favorevole alla riepitelizzazione. Peraltro, a fronte di un largo utilizzo vi è da registrare una limitata evidenza clinica⁶.

Sono altresì di ampio uso sostanze biologicamente attive come i fattori di crescita, applicati topicamente sotto forma di gel piastrinico, concentrato centrifugato di fattori di crescita, colonie di granulociti e macrofagi²³.

Di recente sono comparsi in Letteratura diversi studi con l'utilizzo di prodotti cellulari, come cheratinociti umani coltivati in vitro o cellule staminali da midollo o da tessuto adiposo^{24, 25}.

Una prospettiva terapeutica di grande interesse nell'ischemia critica non rivascularizzabile è rappresentata dalle cellule mononucleate autologhe da sangue periferico, che agiscono inducendo un maggior reclutamento di macrofagi nella lesione e una loro polarizzazione da stato infiammatorio M1 a quello antiinfiammatorio M2²⁶.

Di fronte ad un danno tissutale, soprattutto se esteso, l'obiettivo terapeutico deve essere quello di riparare il danno restituendo funzionalità e ottenendo una cicatrice di qualità esente da fenomeni di fibrosi marcata. In questa ottica si pongono i prodotti di ingegneria tissutale sotto forma di equivalenti cutanei, cute e derma omologhi, sostituti dermici. I limiti legati all'impiego della cute autologa (danno cutaneo permanente a livello del sito donatore, potenzialmente fonte di dolore e oggetto di infezione, limitata estensione dell'area disponibile, scarsa compliance del paziente, specie se anziano) hanno favorito lo sviluppo, il perfezionamento e l'ampio utilizzo di sostituti dermici. Tali prodotti riproducono le funzioni strutturali, biomeccaniche e biochimiche della matrice extracellulare e quindi costituiscono un substrato idoneo per una rapida colonizzazione da parte delle cellule dell'ospite²⁷.

Conclusioni

La complessità del processo riparativo tissutale, con l'intervento e l'interazione di numerose componenti cellulari e bioumorali, implica una profonda conoscenza della fisiopatologia di tale processo e necessita del ricorso a presidi terapeutici combinati e diversificati nel tempo, contestualmente all'evoluzione della lesione.

Il trattamento dell'infezione e dell'edema, lo stimolo dell'angiogenesi, la ricostruzione di una matrice extracellulare adeguata e la promozione della migrazione epiteliale appaiono le tappe fondamentali del nostro agire terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 2012; 49: 35-43.
2. Lorenz HP, Longaker MT, Perkoča LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS. Scarless wound repair: a human fetal skin model. *Development* 1992; 114: 253-9.
3. Epstein HF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-46.
4. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound healing: biologic features and approaches to maxime healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72-140.
5. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83: 835-70.
6. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6: 265sr6.
7. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 514-25.
8. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1996; 4: 321-5.
9. Watnick P, Kolter R: Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182: 2675-9.

10. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinases levels and activity compared to surgical wound fluids *J Invest Dermatol* 1996; 107: 743-48.
11. Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 2011; 216: 753-62.
12. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314-21.
13. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 643-53.
14. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1545-55.
15. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair. *Am J Pathol* 2011; 178: 19-25.
16. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res* 2017; 58: 81-94.
17. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, et al. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 985-97.
18. Rittiè L, Sachs DL, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ. Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelization of human wounds. *Am J Pathol* 2013; 182: 163-71.
19. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 207-17.
20. Schmidt BA, Horsley V. Intra-dermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development* 2013; 140: 1517-27.
21. Iacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E117-123.
22. Verhaegen PD, van Zuijlen PP, Pennings NM, et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar and normal skin: an objective histopathological analysis. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 649-56.
23. Lacci KM, Dardik A. Platelet-Rich Plasma: Support for Its Use in Wound Healing. *Yale J Biol Med* 2010; 83: 1-9.
24. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-43.
25. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; doi:10.1126.
26. Willenborg S, Eming SA. Macrophages-sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014; 12: 214-21, 214-23. doi: 10.1111/ddg.12290.
27. Guarnera G, Borioni R, Fratticci L, et al. Attualità in tema di debridement e innesti di matrice dermica. *Atti Accademia Lancisiana* 2018; 62.

<http://www.attidellaaccademialancisiana.it/206/19/246/autore/Giorgio-GuarneraAttualita-in-tema-di-debridement-e-innesti-di-matrice-dermica>.

Prof. Giorgio Guarnera, Prof. Raoul Borioni, Chirurgia Vascolare Aurelia Hospital, Roma.

Dott. Pierluigi Edgard Mollo, Servizio di Angiologia Medica, Casa di Cura INI, Divisione Città Bianca, Veroli, Frosinone.

Dott.ssa Federica Pomella, Servizi Ambulatoriali Specialistici, Branca Angiologia, ASL Frosinone.

Dott. Luca Guarnera, "Sapienza" Università di Roma.

Dott. Salvino Bilancini, Dott. Massimo Lucchi, Angiologia Medica, Centro J.F. Merlen, Frosinone.

Per la corrispondenza: gguarnera@tiscali.it