

Rassegna

Le cellule progenitrici endoteliali nel diabete e nelle sue complicanze

RIASSUNTO

La rigenerazione endoteliale è un fenomeno complesso che prevede non solo la riparazione endogena attraverso migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali non lesionate adiacenti, ma anche il ruolo di cellule a provenienza midollare. Questo *subset* di cellule circolanti è in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature e partecipare alla formazione di nuovi vasi (vasculogenesi). Queste cellule vengono chiamate cellule progenitrici endoteliali (EPC). Le EPC sono state identificate quali cellule progenitrici di derivazione dal midollo osseo emopoietico dell'adulto in grado di dare origine, *in vitro* e *in vivo*, a cellule endoteliali mature e strutture vascolari tubulari. Nella malattia diabetica queste cellule sono significativamente ridotte e questa loro riduzione è implicata nell'accelerata aterogenesi tipica di questa malattia.

SUMMARY

The endothelial progenitor cells in diabetes mellitus and their role in long-term complications

The endothelial regeneration is a complex process which is determined not only by endogenous repair processes but also by bone-marrow derived cells. This subset of cells is able to differentiate into mature endothelial cells and participate to the formations of new blood vessels (vasculogenesis). These cells are defined as endothelial progenitor cells (EPCs). EPCs are identified as hematopoietic bone-marrow derived cell capable to generate mature endothelial cells and vascular structures both in vitro and in vivo too. EPCs are significantly reduced in patients with diabetes, and this phenomenon may be partly responsible for the accelerated atherogenic process so frequently observed in this disease.

Introduzione

Negli ultimi 30 anni sono state raccolte numerose evidenze cliniche e sperimentali che dimostrano come l'endotelio, lo strato di cellule che funge da barriera tra il sangue e il vaso, sia un

A. Avogaro, M. Albiero, G. Fadini

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Padova, Padova

Corrispondenza: prof. Angelo Avogaro, via Giustiniani 2, 35128 Padova

e-mail: angelo.avogaro@unipd.it

G It Diabetol Metab 2008;28:10-18

Pervenuto in Redazione il 10-07-2007

Accettato per la pubblicazione il 16-10-2007

Parole chiave: cellule progenitrici endoteliali, endotelio, diabete mellito, aterosclerosi

Key words: endothelial progenitor cells, endothelium, diabetes mellitus, atherosclerosis

vero e proprio organo in grado di produrre numerose sostanze cruciali per garantire l'omeostasi vascolare. Tutti i fattori di rischio per malattie cardiovascolari determinano, prima di indurre la lesione aterosclerotica vera e propria, una disfunzione endoteliale, termine questo adottato per indicare una ridotta capacità da parte delle cellule endoteliali di produrre sostanze vasodilatatrici. L'endotelio secerne una ragguardevole quantità di mediatori che regolano l'aggregazione piastrinica, la coagulazione, la fibrinolisi e il tono vascolare¹. Le cellule endoteliali secernono sostanze che possono indurre sia vasoconstrizione come l'endotelina-1 e il trombostano A2, sia vasodilatazione come il nitrossido (NO), la prostaciclina e il fattore iperpolarizzante endoteliale (EDHF). L'NO è il più potente vasodilatatore a oggi noto e contribuisce alla vasodilatazione endotelio-dipendente nelle arterie di conduttanza; al contrario la vasodilatazione mediata da EDHF predomina nelle piccole arterie di resistenza. L-arginina, il precursore fisiologico di NO, è trasportato all'interno delle cellule mediante trasporto facilitato utilizzando il trasportatore cationico y^{+2} . All'interno della cellula endoteliale l'arginina è soggetta a una compartimentalizzazione e solo una frazione di questo aminoacido si rende disponibile alla produzione di NO, reazione questa catalizzata da una famiglia di enzimi chiamate sintasi dell'ossido nitrico o NOS. Le NOS sono rappresentate da tre isoforme identificate come endoteliale NOS (eNOS o NOS3), neuronale NOS (nNOS) e inducibile (iNOS). L'attività di NOS è regolata dai livelli di Ca^{++} intracellulare e dalla sua fosforilazione³.

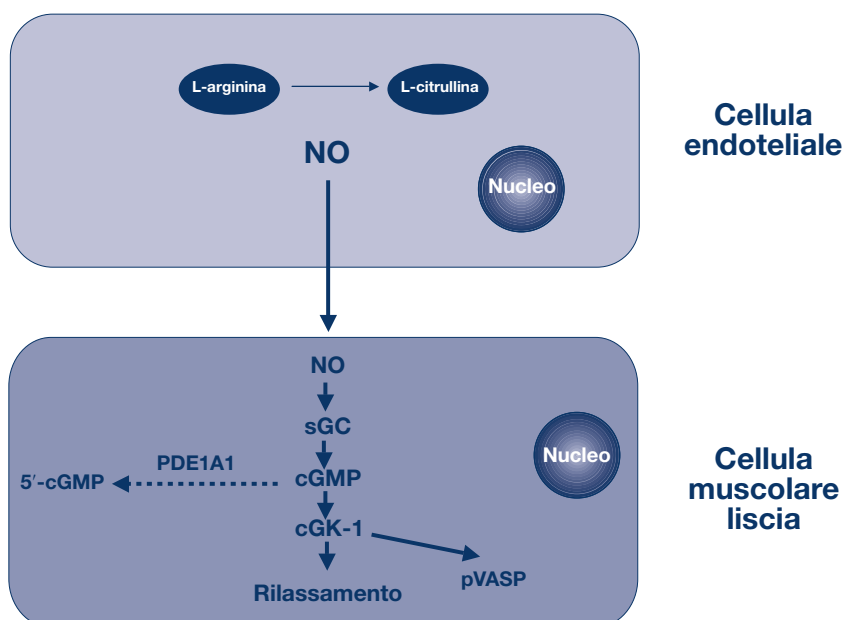
NO stimola la produzione di guanosin monofosfato ciclico (cGMP) attivando la guanilato ciclasi solubile (sGC). cGMP media la maggior parte degli effetti intracellulari di NO (Fig. 1). L'integrità del segnale NO/cGMP è cruciale in termini di vasodilatazione e di inibizione dell'aggregazione piastrinica⁴. L'invecchiamento e l'esposizione ai fattori di rischio inducono danno endoteliale e apoptosi. Quest'ultima è un evento precoce sia dello stress infiammatorio sia della lesione di tipo

meccanico quale quella che si osserva dopo rivascularizzazione. Il rilascio di $TNF\alpha$ e la conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) hanno un ruolo chiave nell'indurre apoptosi a livello endoteliale attraverso l'attivazione di caspasi-3. L'apoptosi stessa contribuisce in modo sostanziale alla disfunzione endoteliale⁵. La perdita dell'integrità endoteliale è uno stimolo potente per la trombosi e per la proliferazione delle cellule muscolari lisce.

Per molti anni si è ritenuto che la rigenerazione endoteliale procedesse solamente grazie a meccanismi di riparazione endogena attraverso proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali non lesionate adiacenti. In 1997 Asahara et al. hanno dimostrato che un *subset* di cellule circolanti è in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature e partecipare alla formazione di nuovi vasi (vasculogenesi)⁶. Queste cellule vengono chiamate cellule progenitrici endoteliali (EPC). Le EPC sono state identificate quali cellule progenitrici di derivazione dal midollo osseo emopoietico dell'adulto, in grado di dare origine, *in vitro* e *in vivo*, a cellule endoteliali mature e strutture vascolari tubulari (Fig. 2). Le EPC sono un sottogruppo di cellule mononucleate del sangue periferico in grado di differenziarsi in cellule endoteliali mature e rappresentano una frazione delle cellule mononucleate circolanti⁷. Esse sono inizialmente localizzate nel midollo osseo ed esprimono i marcatori di superficie comuni ai precursori emopoietici (CD133 e CD34) ed endoteliali, quale per esempio il recettore tipo 2 per il fattore di crescita delle cellule endoteliali (VEGFR2 o KDR). Le EPC che migrano nella circolazione periferica perdono progressivamente CD133 e CD34 e iniziano a esprimere CD31, VE-caderina e vWF. È noto che le EPC mobilizzate si localizzano nei siti di ischemia, dove contribuiscono alla neovasculogenesi incorporandosi in strutture vascolari e interagendo con le cellule endoteliali residenti.

Si ritiene che le EPC vengano mobilizzate nel sangue periferico in risposta a diversi stimoli quali l'ischemia tissutale, l'esercizio

Figura 1 Rappresentazione schematica della via NO/cGMP/cGMP-dependent protein kinase (cGK-1) implicata nel rilassamento della cellula muscolare liscia. In condizioni normali NO, sintetizzato da NOS3, stimola la guanilato ciclasi solubile (sGC), aumenta il cGMP e di conseguenza la cGMP-dependent protein kinase I (cGK-1). Questa induce vasodilatazione. Questa via può essere inibita in parecchi siti. Angiotensina II e i nitrati esogeni aumentano la sintesi di radicali liberi dell'ossigeno diminuendo l'azione di cGK-1. Anche i perossinitriti inibiscono cGK-1. pVASP serve come un indice attendibile della via NO/cGMP/cGK-1. PDE1A1: fosfodiesterasi.



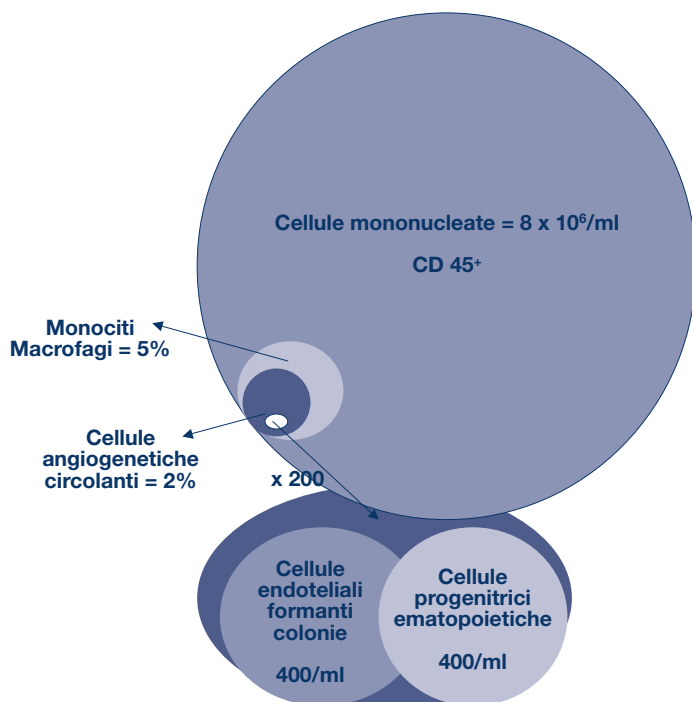


Figura 2 Relazione esistente tra cellule mononucleari circolanti e cellule progenitrici endoteliali qui chiamate cellule endoteliali formanti colonie e cellule progenitrici ematopoietiche.

fisico, citochine e fattori di crescita. Stimoli alla mobilitazione delle EPC dal midollo osseo comprendono l'ischemia tissutale, fattori di crescita, chemochine (EPO, VEGF, FGF, SDF-1 α) e farmaci (statine, agonisti PPAR- γ , estrogeni, ACE-inibitori)⁸. Una volta nel circolo sanguigno, le EPC avrebbero il ruolo di rimpiazzare l'endotelio danneggiato, contribuendo così all'omeostasi endoteliale, e di partecipare alla genesi di nuovi vasi sanguigni guidata dal gradiente di ossigeno e di mediatori pro-angiogenetici (tra i quali lo stesso VEGF e il fattore di crescita delle cellule stromali, SDF-1 α) a livello dei tessuti ischemici. In tal modo il rilascio delle EPC rappresenterebbe un meccanismo fisiologico omeostatico di regolazione a feedback negativo della vascolarizzazione dei tessuti e dell'integrità vascolare. Numerosissimi dati *in vitro* e *in vivo* hanno confermato tale modello. La somministrazione di EPC è stata in grado di incre-

mentare l'angiogenesi e di migliorare la perfusione in diversi modelli animali di ischemia miocardica e periferica⁹. Studi clinici descrittivi hanno messo in luce che la riduzione del pool di EPC circolanti si associa alla presenza dei classici fattori di rischio cardiovascolare, quali età avanzata, fumo di sigaretta, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia e diabete mellito. Nel sangue periferico le EPC sembrano svolgere un ruolo importante nell'omeostasi della parete vascolare, in quanto costituiscono un pool di cellule capaci di riparare il danno endoteliale. Le EPC potrebbero quindi servire come un *reservoir* cellulare in grado di rimpiazzare un endotelio disfunzionante, con un ruolo protettivo anche nelle fasi più precoci del processo aterogenico¹⁰ (Fig. 3). Una riduzione delle EPC circolanti potrebbe contribuire a un'insufficiente rigenerazione endoteliale, determinando di conseguenza disfunzione endo-

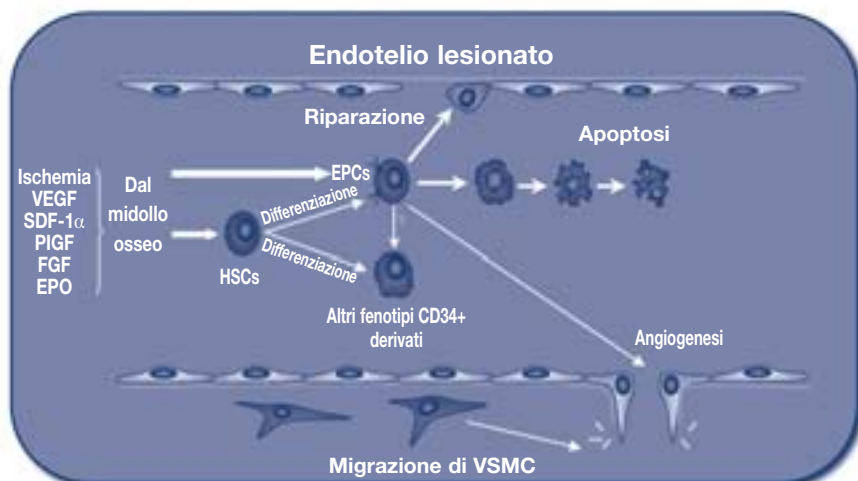


Figura 3 Quadro d'insieme del rilascio e dei principali meccanismi d'azione delle cellule progenitrici endoteliali.

teliale. Queste ipotesi sono state confermate dall'osservazione di una significativa correlazione tra il numero di EPC circolanti e la funzione endoteliale, determinata con la reattività flusso-mediata dell'arteria brachiale. Molti modelli animali sperimentali e qualche dato preliminare sull'uomo confermano il ruolo delle EPC in eventi quali la riendotelizzazione presso siti di danno o denudamento vascolare e la neoangiogenesi in presenza di ischemia tissutale¹¹.

Le EPC rappresentano un fattore fortemente protettivo nei confronti delle malattie cardiovascolari, agendo sia a uno stadio precoce del processo aterogenetico, sia nello stadio finale delle manifestazioni cliniche, quando il ridotto apporto ematico a un organo o a un tessuto ha già compromesso la sua integrità funzionale e anatomica.

La correlazione negativa tra rischio cardiovascolare globale e numero di EPC circolanti viene rafforzata dall'osservazione che l'esposizione ad alcuni farmaci, in grado di modificare favorevolmente il rischio cardiovascolare, determina una modulazione positiva del numero e della funzione delle EPC. Tali evidenze hanno stimolato l'ideazione di alcuni protocolli di neovasculogenesi terapeutica mediante l'utilizzo di cellule progenitrici, che hanno dato buoni risultati per quanto riguarda l'ischemia miocardica e degli arti inferiori.

EPC, iperglicemia, diabete e insulino-resistenza

Per quanto riguarda il diabete, la gravità clinica della malattia vascolare oclusiva nei soggetti diabetici è stata in parte attribuita a un alterato sviluppo dei vasi collaterali¹². È stato dimostrato che le EPC provenienti da pazienti diabetici mostrano un'alterata proliferazione, adesione e incorporazione all'interno delle strutture vascolari¹³. Pertanto, una riduzione delle EPC potrebbe rappresentare un meccanismo attraverso cui i soggetti affetti da diabete hanno una ridotta capacità di formare vasi collaterali. I meccanismi implicati nelle alterazioni quali/quantitative delle EPC nel diabete mellito non sono al momento del tutto noti e i dati in letteratura sono esigui. Uno studio recente non ha dimostrato aumento dell'apoptosi in EPC di soggetti diabetici. Loomans et al. hanno anche citato risultati preliminari di analisi con DNA microarray secondo i quali le alterazioni di espressione genica delle EPC isolate da diabetici tipo 1 ricordano quelle tipiche del diabete in generale, dell'iperglicemia e delle condizioni di elevato stress ossidativo¹⁴.

Uno studio anatomo-clinico si è focalizzato sulla ricerca delle alterazioni metaboliche che modificano la funzione proangiogenetica delle EPC nel diabete mellito, ma non è giunto a conclusioni definitive: nessun effetto è stato osservato quando le EPC erano trattate con alto glucosio, mentre un effetto paradossale di esaltata differenziazione si osservava quando le EPC erano esposte a livelli sopra-fisiologici di insulina¹⁵. Un lavoro più recente ha dimostrato che la coltura in alto glucosio per 7 giorni era in grado di ridurre il numero di EPC che si possono ottenere dal sangue di un donatore sano e tale effetto veniva attribuito ad aumento dell'apoptosi e riduzione della capacità proliferativa¹⁶. Oltre a tali alterazioni quantitative,

sono state identificate anche alterazioni qualitative: ridotta attività migratoria, ridotta attività dell'enzima eNOS e minore produzione di MMP-9. Tali dati forniscono alcune possibili spiegazioni degli effetti negativi dell'iperglicemia sulle EPC.

Un gruppo di ricerca ha individuato nella via di trasduzione del segnale che coinvolge PI3-K/Akt (PKB) un sistema alterato nelle EPC che presentano ridotte proprietà pro-angiogenetiche e un potenziale bersaglio terapeutico per migliorare la funzione delle EPC¹⁷. Gli stessi autori hanno successivamente mostrato che l'alto glucosio riduce il numero di EPC che si possono ottenere in coltura da un donatore sano non attraverso una eccessiva apoptosi, ma tramite l'attivazione della MAP chinasi p38 e dei segnali a valle¹⁶. Tale dato è coerente con molte altre osservazioni sperimentali secondo cui p38MAPK è coinvolta nella patogenesi delle complicanze croniche del diabete mellito. Appaiono invece particolarmente discordanti i dati a proposito dell'apoptosi delle EPC in coltura. Peraltro, è stato dimostrato che le EPC isolate da donatori sani sono caratterizzate da un profilo di espressione genica tipico delle cellule staminali, con *upregulation* di cosiddetti *stemness genes* quali superossido dismutasi, catalasi e altri prodotti genici che conferiscono protezione nei confronti dello stress ossidativo^{18,19}. Ciò renderebbe le EPC effettivamente più resistenti all'apoptosi rispetto ad altre cellule circolanti e alle cellule endoteliali mature. D'altra parte non è noto se tale resistenza allo stress ossidativo, che caratterizza le EPC isolate da individui sani, persista anche nelle EPC isolate da individui affetti da diabete mellito o in presenza di altri fattori di rischio per malattia cardiovascolare. I rapporti esistenti tra stress ossidativo ed EPC non sono quindi a tutt'oggi del tutto chiariti: alcuni studi hanno dimostrato che le EPC presentano un profilo di enzimi antiossidanti particolarmente ricco rispetto ad altri fenotipi cellulari: ciononostante la continua esposizione all'iperglicemia può portare a un depauperamento di questi enzimi con conseguente apoptosi cellulare e ridotta capacità sia angiogenetica sia vasculogenetica delle EPC. A tale proposito due recenti lavori hanno dimostrato che un attivatore naturale della transchetolasi, la benfotiamina, un potente antiossidante, è in grado di ristabilire il numero e la funzione di EPC in corso di ischemia attraverso una modulazione della via PI3K/Akt²⁰.

Un altro gene probabilmente coinvolto nella biologia delle EPC è il regolatore del ciclo cellulare p21cip1: Bruhl et al. hanno dimostrato che l'espressione di p21cip1 correla con i livelli di EPC circolanti in animali singoli e doppi *knock-out*²¹. La riduzione e disfunzione delle EPC nei pazienti diabetici sono state chiamate in causa per spiegare l'elevata incidenza e la gravità della patologia aterosclerotica associata al diabete mellito. Un lavoro del nostro gruppo di ricerca ha rafforzato tale ipotesi, mostrando che pazienti diabetici affetti da arteriopatia periferica presentano livelli di EPC circolanti significativamente ridotti rispetto a diabetici senza complicanze vascolari periferiche²². Inoltre, l'entità di riduzione delle EPC correla con la gravità della malattia aterosclerotica. Nostri dati suggeriscono inoltre che le EPC siano anche funzionalmente alterate in presenza di complicanze diabetiche macroangiopatiche²³. Questi risultati supportano la tesi che la riduzione delle EPC sia coinvolta nella patogenesi o nella fisiopatologia

delle complicanze vascolari del diabete mellito (Fig. 4). Alterazioni delle EPC circolanti potrebbero anche rivestire un ruolo patogenetico nelle complicanze microangiopatiche del diabete. Alcuni studi hanno messo in luce disfunzione delle EPC in individui affetti da insufficienza renale cronica, mentre un unico studio ha dimostrato il miglioramento della funzione nervosa periferica dopo trapianto di EPC nel ratto diabetico^{24,25}. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che pazienti diabetici tipo 2 affetti da retinopatia avanzata (non proliferante severa o proliferante) hanno un'esaltata differenziazione endoteliale delle cellule progenitrici circolanti, fatto che potrebbe correlarsi all'eccesso di angiogenesi retinica²⁶.

Risulta evidente che i dati sulle alterazioni molecolari che coinvolgono le EPC sono stati ricavate da modelli *in vitro*, mentre non è ancora stato eseguito uno studio estensivo dell'espressione genica delle EPC, *in vivo*, nell'organismo diabetico. Inoltre, dati completi sulla regolazione genica delle EPC esposte a condizioni di coltura in grado di riprodurre sperimentalmente le alterazioni metaboliche tipiche del diabete mellito non sono ancora disponibili. L'identificazione di specifici geni la cui espressione risulta alterata nelle EPC diabetiche rappresenterebbe un valido contributo alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici che alterano le proprietà angiogenetiche delle EPC nel diabete mellito e potrebbe individuare eventuali bersagli terapeutici.

L'insulino-resistenza influisce negativamente sull'equilibrio danno/riparazione. Ciò potrebbe essere secondario anche agli effetti negativi di questa condizione sulla biologia dell'EPC o attraverso una loro ridotta dismissione midollare o a una loro aumentata apoptosi o a un ridotto attecchimento a livello del vaso da riparare o a una ridotta efficacia di chemochine a potenziale vasculogenetico.

Nel paziente insulino-resistente si è osservato un numero ridotto di EPC in pazienti diabetici, con sindrome metabolica o insulino-resistenti²⁷. Il decremento dei livelli di EPC correla con il numero di componenti della sindrome stessa. Le EPC circolanti sono correlate all'indice HOMA, un parametro surrogato di insulino-resistenza. In un modello animale di ischemia-riperfusion, le EPC mostrano una curva di mobilitazione entro 7 giorni mentre nei ratti diabetici vi è una totale incapacità da parte del midollo di mobilitare queste cellule²⁸. Come conseguenza, gli animali diabetici mancano di un aumento compensatorio della densità capillare. Il difettoso rilascio di EPC da parte del

midollo è associato a ridotti livelli di *stromal derived factor* (SDF)-1 α e di VEGF e all'incapacità di aumentare i livelli di HIF-1 α . Molti fattori endogeni sono implicati nella liberazione midollare di EPC: oltre a SDF-1 α e VEGF anche le metalloproteinasi di matrice (MMP)-9 hanno un'importanza cruciale²⁹. È stato dimostrato come NO agisce come un fattore di crescita per cellule staminali *in vitro* e regola l'angiogenesi in risposta all'ischemia; NO aumenta l'attività di MMP-9 e ha un ruolo cruciale nella dismissione di EPC in risposta all'esercizio e a VEGF. Anche se non vi è una chiara dimostrazione, è possibile che l'insulino-resistenza, attraverso una minore disponibilità di NO, sia responsabile di una ridotta capacità midollare di rilasciare EPC in circolo e di ridurre quindi il potenziale rigenerativo vascolare³⁰.

Dopo mobilitazione, per partecipare alla riparazione vascolare, le EPC devono raggiungere la sede della lesione, ancorarsi, integrarsi con il letto endoteliale preesistente, proliferare e differenziarsi. Le EPC di animali e soggetti diabetici mostrano anche una ridotta capacità funzionale e una ridotta capacità di formare neovasi. Pertanto si può concludere che nell'insulino-resistenza esiste una ridotta dismissione di EPC in circolo e una loro diminuita capacità funzionale: ciò potrebbe spiegare almeno in parte la ridotta capacità rigenerativa dei vasi e l'aumentata propensione in questi pazienti alla lesione aterosclerotica.

Si ritiene che l'esaurimento o il depauperamento delle EPC sia un meccanismo mediante il quale tali fattori di rischio sono alla base dell'elevata incidenza di danno vascolare e malattia aterosclerotica.

Le EPC del diabetico presentano inoltre una ridotta funzione in termini di adesione, proliferazione, capacità nel formare strutture tubulari. Le cause di un ridotto numero di EPC potrebbero essere una ridotta mobilitazione midollare, una ridotta proliferazione e una ridotta sopravvivenza¹³. Come precedentemente ricordato le EPC vengono liberate da parte del midollo osseo sotto l'influenza di alcuni stimoli quali VEGF e HIF. È stato dimostrato che l'espressione di fattori angiogenetici è ridotta soprattutto a livello cardiaco in risposta a sindrome coronarica acuta. Questa ridotta stimolazione midollare potrebbe essere la causa del deficit di vasi collaterali nella malattia diabetica (Fig. 4). Come precedentemente ricordato, un ruolo importante nel rilascio di EPC da parte del midollo è legato alla via di traduzione del segnale che coinvolge PI3K/Akt e NO. Dal momento che il diabete è caratterizzato da un'alterazione di questa via e da

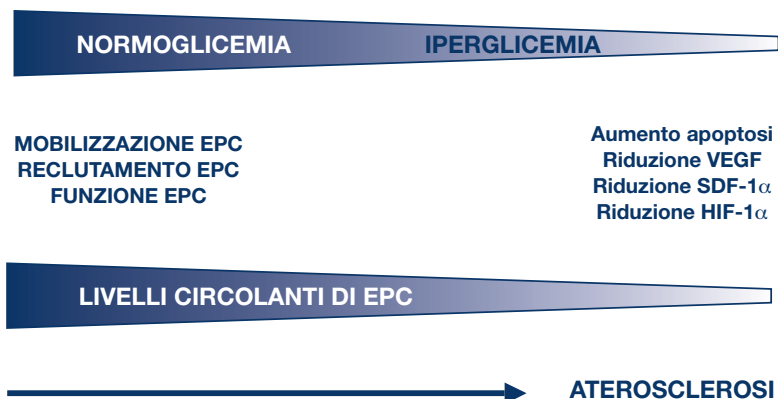


Figura 4 Effetti dell'iperglicemia sulle funzioni delle EPC e sulle citochine deputate al loro rilascio/stimolo. VEGF: vascular endothelial growth factor; HIF: hypoxia inducible factor; SDF: stromal derived factor.

una ridotta biodisponibilità di NO, uno degli effetti positivi legati all'infusione di insulina potrebbe essere legato allo "sblocco" di questo segnale emodinamico.

È noto che, *in vivo*, l'iperglicemia induce stress ossidativo e produzione di ROS. Krankel et al. hanno recentemente dimostrato che l'iperglicemia inibisce la proliferazione, la funzione delle EPC in coltura con una concomitante riduzione della sintesi di NO e di MMP-9 necessaria alla dismissione in circolo di queste cellule da parte del midollo³¹. Un altro possibile *link* tra diabete e alterazioni quantitative e qualitative delle EPC potrebbe essere legato alla presenza di insulino-resistenza. In uno studio *in vitro* la presenza di elevati livelli di insulina riduce la comparsa di cellule endoteliali da cellule CD34⁺. Inoltre abbiamo osservato che i pazienti con sindrome metabolica presentano ridotti livelli di CD34⁺KDR⁺ EPC rispetto ai pazienti senza sindrome²⁷. Vi è inoltre un progressivo calo delle EPC CD34⁺ all'aumentare del numero di componenti della sindrome stessa. È stato recentemente osservato, in un modello animale, che un'alterazione del segnale PI3K/Akt/NO sembra giocare un ruolo negativo anche nella mobilitazione di EPC che fisiologicamente si ha in corso di ulcera ischemica diabetica³². La ossigenoterapia iperbarica e la somministrazione di SDF-1 α sono state in grado di ristabilire una guarigione dell'ulcera attraverso un aumentato rilascio di EPC da parte del midollo. Questi dati, ancorché sperimentali, lasciano intravedere delle promettenti nuove terapie per la cura dell'ulcera diabetica.

EPC e vasculopatia diabetica

Una delle peculiarità della malattia vascolare nel diabetico è quella di una ridotta propensione alla formazione di circoli collaterali che sono insufficienti a sopperire all'ischemia che spesso si instaura in questi pazienti. È stato dimostrato, in modelli animali, che una difettosa collateralizzazione è secondaria a una riduzione delle EPC³³. D'altra parte la somministrazione di EPC era in grado di ripristinare questo deficit. Come precedentemente descritto è stato recentemente dimostrato che i livelli di EPC sono cruciali per la propensione alla guarigione delle ulcere diabetiche³². Per trasferire la pratica sperimentale alla pratica clinica, il nostro gruppo ha determinato i livelli di EPC in pazienti con e senza vasculopatia periferica: i nostri dati hanno non solo confermato una significativa riduzione delle EPC nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti normali, ma anche un'ulteriore, significativa riduzione in coloro che presentavano ulcere agli arti inferiori. Assolutamente interessante poi è stata l'osservazione di una correlazione tra livelli di EPC e rapporto pressorio caviglia/braccio. Successivamente abbiamo dimostrato una correlazione tra livelli di EPC e aterosclerosi carotidea e presenza di arteriopatia obliterante agli arti inferiori: una più grave aterosclerosi carotidea si associava a una più marcata riduzione dei livelli di EPC e con un più alto grado di ostruzione alle arterie periferiche³⁴. Questi dati suggeriscono che la misurazione dei livelli di EPC può dare sicuramente delle stime aggiuntive sull'estensione del danno vascolare non solo nel paziente diabetico ma anche nel paziente non diabetico. A tal proposito è stato dimostrato come i livelli di EPC predicano la mortalità a

breve termine nel postinfarto nella popolazione generale³⁵. Sul piano terapeutico la somministrazione di EPC appare come il logico approccio. Huang et al. hanno trapiantato cellule midollari arricchite da EPC in arti sede di ischemia critica di diabetici³⁶. Rispetto alla terapia tradizionale il trattamento con EPC migliorava gli *score* arteriografici e l'indice caviglia/braccio e riduceva sia la dimensione delle ulcere sia la necessità di amputazione. Alla luce del consistente numero di soggetti diabetici privi di un'opzione terapeutica chirurgica o endoluminale di rivascularizzazione, la terapia con EPC sembra avere buone possibilità future come approccio terapeutico.

EPC e cardiomiopatia diabetica

Il diabete predispone allo sviluppo di una specifica cardiomiopatia e all'insufficienza cardiaca. La depressione della funzione contrattile inizia a stadi molto precoci del coinvolgimento cardiaco e, molto spesso, questa si può rilevare già durante l'esecuzione di un'attività fisica moderata. La causa più accreditata è un difettoso reclutamento contrattile secondario probabilmente a una ridotta perfusione microcircolatoria^{37,38}. Le alterazioni microcircolatorie sono indubbiamente presenti già in fasi precoci della malattia e comprendono tra le altre la presenza di aree di fibrosi, microaneurismi, deposito di collagene e di prodotti avanzati di glicazione. Nella cardiomiopatia diabetica è stato inoltre dimostrato un precoce e progressivo declino nell'espressione di VEGF che riduce la densità dei capillari, si associa a un'aumentata fibrosi e altera la contrattilità miocardica³⁹. Ratti con cardiomiopatia diabetica presentano ridotti livelli di EPC mentre il successivo ripristino di una normale espressione di VEGF riporta i livelli di EPC nella norma con conseguente ripristino della densità capillare. Questi dati suggeriscono che la cardiomiopatia diabetica può essere considerata una complicanza microvascolare della malattia diabetica la cui patogenesi è determinata da una riduzione del numero di EPC. Un altro elemento importante nello sviluppo della cardiomiopatia è l'eccessiva produzione di radicali liberi: questa condizione porta a una rapida senescenza dei progenitori cardiomiocitari⁴⁰. La precoce senescenza delle cellule staminali cardiache (CSC) e il deficit contrattile del cuore diabetico possono essere prevenute eliminando l'espressione genica di una proteina correlata allo stress, la p66Shc, che è stato dimostrato essere potentemente iperespressa nei pazienti diabetici di tipo 2⁴¹. p66shc avrebbe pertanto un ruolo importante non solo nell'indurre stress ossidativo, ma anche nel determinare un depauperamento di EPC con conseguente ipoperfusione a livello del microcircolo coronarico.

EPC e nefropatia diabetica

Il diabete è la principale causa di dialisi nei Paesi occidentali. La nefropatia diabetica si associa a un elevatissimo rischio per patologia cardiovascolare: non sorprende pertanto che i livelli di EPC in questi pazienti siano qualitativamente e quantitativamente alterati. I meccanismi del perché vi siano queste alterazioni è

in larga parte sconosciuto, ma sicuramente un ruolo eziologico lo svolgono le tossine uremiche, dal momento che sia la dialisi sia il trapianto di rene sono in grado di ristabilire il pool endogeno di EPC. Nessuno studio che abbia dimostrato una relazione tra riduzione di EPC e nefropatia diabetica per sé è attualmente disponibile. La disfunzione endoteliale e del microcircolo sono un evento patogenetico precoce in corso di nefropatia diabetica e potrebbero essere parzialmente dipendenti da un difetto di EPC. Alcuni autori hanno suggerito che le EPC sono pluripotenti e ritengono la capacità di trans-differenziarsi in vari fenotipi; a tal proposito è stato dimostrato come cellule di derivazione midollare che condividono alcuni marcatori con le EPC siano in grado di prendere parte alla rigenerazione renale^{24,42}. Il nostro gruppo ha dimostrato che i reni possono dare origine a EPC in alcune specifiche condizioni⁴³. Nel loro complesso questi dati suggeriscono che la riduzione delle EPC può essere uno dei meccanismi di alterata riparazione glomerulare e di progressione della malattia renale nel diabete. A tal proposito Bussolati e Camussi hanno recentemente ipotizzato come, in corso di insufficienza renale acuta, la trans-differenziazione o fusione di cellule staminali può modificare il microambiente inducendo de-differenziazione e proliferazione delle cellule tubulari sopravvissute o permettendo l'espansione di foci di cellule staminali residenti⁴⁴. Parallelamente al decremento di precursori endoteliali, il diabete induce un aumento di progenitori di miofibroblasti i quali, grazie alla secrezione di matrice extracellulare, possono contribuire alla progressiva glomerulosclerosi tipica della nefropatia diabetica in fase avanzata⁴⁵.

Le relazioni esistenti tra funzione renale ed EPC sono ulteriormente complesse dal momento che l'eritropoietina prodotta dal rene è uno dei più importanti regolatori della mobilitazione e differenziazione delle EPC. È stato dimostrato che la regolazione tra ipossia ed eritropoietina dipendente dal sistema del HIF-1 α è alterata nel paziente diabetico. La presenza sia di microangiopatia sia di una progressiva fibrosi tubulo-interstiziale altera l'azione biologica dell'eritropoietina, mentre la produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'iperglicemia stabilizzano l'HIF-1 α , riducendo la risposta biologica all'eritropoietina stessa. Inoltre, il nostro gruppo ha dimostrato che la mobilitazione di EPC nel diabete è alterata per la presenza di una sottoregolazione di HIF-1 α . Un'altra connessione tra nefropatia diabetica e livelli di EPC è rappresentata dalla dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno dell'NO che si accumula nei pazienti con nefropatia cronica⁴⁶. Dal momento che NO gioca un ruolo importante nel rilascio di EPC, si può ipotizzare che ADMA, attraverso l'inibizione di NOS e la conseguente riduzione dell'attività biologica di NO, sia in grado di ridurre i livelli di EPC circolanti. Per questi motivi la nefropatia diabetica è contraddistinta da una ulteriore, profonda riduzione di EPC con un ulteriore aumento del rischio per malattia cardiovascolare.

EPC e retinopatia diabetica

L'iperglicemia è estremamente dannosa per il microcircolo retinico: essa infatti induce un'aumentata permeabilità capillare, fuoriuscita di proteine dai vasi verso il tessuto extravasco-

lare e una progressiva riduzione del flusso ematico della retina. La conseguente ischemia retinica e il parallelo rilascio di fattori angiogenetici stimola la proliferazione di neovasi e sfocia nella classica retinopatia proliferante. Recentemente si è cercato di chiarire i rapporti esistenti tra iperglicemia, ipossia retinica e neovascolarizzazione. In animali cellule di provenienza midollare sono mobilitate e reclutate nelle sedi di neovascolarizzazione in risposta a VEGF e SDF-1 α ⁴⁷. Pertanto nella eziopatogenesi della retinopatia diabetica non sembrano essere coinvolte solamente le cellule endoteliali presenti nei vasi retinici ma anche le EPC. Ciò appare in contrasto con i processi paradossalmente antitettici di danno vascolare che spesso si osservano nello stesso paziente e cioè la presenza di retinopatia diabetica e di retinopatia proliferante: la prima caratterizzata da una riduzione e la seconda da un aumento di EPC. Un paziente diabetico può quindi presentare un quadro vascolare caratterizzato da una eccessiva angiogenesi e da una ridotta angiogenesi. Per chiarire questo punto estremamente importante chiamato anche il "paradosso angiogenetico del diabete" abbiamo determinato *in vivo* nel paziente diabetico i livelli di CD34+KDR⁺²⁶. Mentre le cellule CD34+KDR⁺ e la differenziazione in senso endoteliale erano significativamente ridotte nei pazienti con arteriopatia obliterante, le cellule genericamente CD34⁺ erano ridotte nei pazienti con retinopatia diabetica; questo gruppo invece evidenziava una maggiore clonicità e una maggiore differenziazione in senso endoteliale. Asnaghi et al. hanno dimostrato che EPC in coltura ottenute da pazienti diabetici di tipo 1 e retinopatia proliferante presentavano un maggiore potenziale clonogenico⁴⁸. Nel complesso questi dati supportano l'ipotesi che le EPC possano svolgere un ruolo nell'eziopatogenesi della retinopatia diabetica proliferante.

A tale proposito la perdita di periciti nella retinopatia diabetica è un evento precoce che può indurre attivazione endoteliale e proliferazione vascolare retinica: precursori perivascolari CD34⁺ sono stati infatti evidenziati nel sangue periferico. In base a tale ipotesi la deplezione di progenitori CD34⁺ può portare a perdita di periciti, mentre un'aumentata differenziazione endoteliale può indurre un'angiogenesi retinica anormale⁴⁹. Pertanto, una differente regolazione delle EPC, forse in associazione a un diverso gradiente della tensione di ossigeno e all'accumulo dei fattori di crescita, può chiarire come mai l'ischemia periferica non è in grado di stimolare l'angiogenesi periferica quanto invece è in grado di fare l'ischemia retinica. Il fatto che le EPC possano essere implicate nella proliferazione vascolare a livello retinico deve indurci a una certa prudenza quando tentiamo di espandere il pool delle EPC stesse per migliorare il profilo cardiovascolare del paziente. Per esempio, l'uso della stessa eritropoietina, un fattore angiogenetico, può teoricamente peggiorare una retinopatia proliferante.

Conclusioni

A conferma dell'ipotetico ruolo dei bassi livelli di EPC nelle malattie cardiovascolari, due recenti studi di follow-up in pazienti coronaropatici e non hanno messo in luce che la ridu-

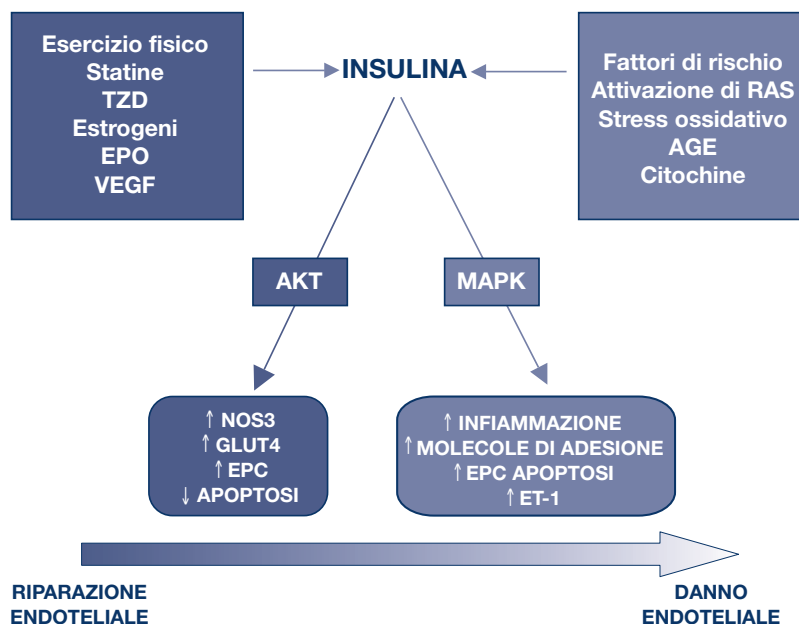


Figura 5 Rappresentazione schematica dei molteplici effetti dell'insulina in termini di danno e riparazione endoteliale.

zione delle EPC nel sangue periferico rappresenta un fattore predittivo indipendente di eventi cardiovascolari avversi⁵⁰. Inoltre, uno studio osservazionale ha dimostrato che la ridotta capacità di mobilitare le EPC dopo infarto miocardico acuto si associa, in maniera indipendente dagli altri parametri clinici, allo sviluppo di disfunzione ventricolare post-infartuale³⁵. I dati incoraggianti di questi studi preliminari osservazionali hanno stimolato l'inizio di trial clinici terapeutici di rivascolarizzazione mediante angiogenesi terapeutica con trapianto di EPC per l'infarto miocardico acuto e la cardiopatia ischemica cronica. Alla luce di queste premesse si può ritenere che l'esposizione a fattori di rischio porta a una riduzione dei meccanismi endogeni di riparazione: ciò influisce negativamente sul rapporto vascolare insulto-protezione con conseguente accelerazione del processo aterosclerotico (Fig. 5).

Bibliografia

1. Robinson SD, Harding SA, Cummins P, Din JN, Sarma J, Davidson I et al. *Functional interplay between platelet activation and endothelial dysfunction in patients with coronary heart disease*. Platelets 2006;17:158-62.
2. Li C, Huang W, Harris MB, Goolsby JM, Venema RC. *Interaction of the endothelial nitric oxide synthase with the CAT-1 arginine transporter enhances NO release by a mechanism not involving arginine transport*. Biochem J 2005;386(Pt 3):567-74.
3. Marletta MA. *Nitric oxide synthase structure and mechanism*. J Biol Chem 1993;268:12231-4.
4. Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D. *Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation*. Progr Clin Biol Res 1987;249:65-76.
5. Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, Rivera A, Orosz Z, Ungvari Z. *Vasculoprotective effects of anti-tumor necrosis factor- α treatment in aging*. Am J Pathol 2007;170:388-98.
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T

et al. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science 1997;275(5302):964-7.

7. Schatteman GC, Dunnwald M, Jiao C. *Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292:H1-18.
8. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M et al. *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res 1999;85:221-8.
9. Khurana R, Simons M. *Endothelial progenitor cells: precursors for angiogenesis*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery 2003;15:250-8.
10. Werner N, Nickenig G. *Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy?* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:257-66.
11. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. *Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells*. Blood 2005;106:1525-31.
12. Duh E, Aiello LP. *Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox*. Diabetes 1999;48:1899-906.
13. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR et al. *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. Circulation 2002;106:2781-6.
14. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC et al. *Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes*. Diabetes 2004;53:195-9.
15. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S et al. *PPAR γ -agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells*. Atherosclerosis 2005;183:163-7.
16. Seeger FH, Haendeler J, Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Urbich C et al. *p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells*. Circulation 2005;111:1184-91.
17. Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurc C, Shibata R et al. *Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis*. J Clin Invest 2005;115:2119-27.

18. Tao J, Yang Z, Wang JM, Wang LC, Luo CF, Tang AL et al. *Shear stress increases Cu/Zn SOD activity and mRNA expression in human endothelial progenitor cells.* J Hum Hypertens 2007;21:353-8.
19. Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH et al. *High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms.* Diabetes 2007;56:1559-68.
20. Marchetti V, Menghini R, Rizza S, Vivanti A, Feccia T, Lauro D et al. *Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling.* Diabetes 2006;55:2231-7.
21. Bruhl T, Heesch C, Aicher A, Jadidi AS, Haendeler J, Hoffmann J et al. *p21Cip1 levels differentially regulate turnover of mature endothelial cells, endothelial progenitor cells, and in vivo neovascularization.* Circ Res 2004;94:686-92.
22. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F et al. *Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus.* J Am Coll Cardiol 2005;45:1449-57.
23. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M et al. *Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:2140-6.
24. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W et al. *Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1246-52.
25. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H et al. *Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy.* Diabetes 2005;54:1823-8.
26. Fadini GP, Sartore S, Baesso I, Lenzi M, Agostini C, Tiengo A et al. *Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox.* Diabetes Care 2006;29:714-6.
27. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A et al. *Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk.* Eur Heart J 2006;27:2247-55.
28. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A et al. *Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hind-limb ischaemia-reperfusion injury in rats.* Diabetologia 2006;49:3075-84.
29. Thum T, Fraccarollo D, Galuppo P, Tsikas D, Frantz S, Ertl G et al. *Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells.* Cardiovasc Res 2006;70:50-60.
30. Geffner ME, Kaplan SA, Bersch N, Lippe BM, Scott ML, Bergman RN et al. *Diminished in vitro responsiveness of circulating erythroid progenitor cells to insulin as an indicator of insulin resistance.* J Clin Endocrinol Metab 1985;60:103-8.
31. Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K et al. *Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:698-703.
32. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG et al. *Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1alpha.* J Clin Invest 2007;117:1249-59.
33. Waltenberger J. *Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications.* Cardiovasc Res 2001;49:554-60.
34. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A et al. *Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population.* Stroke 2006;37:2277-82.
35. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A et al. *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.* N Engl J Med 2005;353:999-1007.
36. Huang P, Li S, Han M, Xiao Z, Yang R, Han ZC. *Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes.* Diabetes Care 2005;28:2155-60.
37. Scognamiglio R, Avogaro A, Negut C, Piccolotto R, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A. *Early myocardial dysfunction in the diabetic heart: current research and clinical applications.* Am J Cardiol 2004;93(8A):17A-20A.
38. Scognamiglio R, Negut C, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Avogaro A. *Effects of different insulin regimes on postprandial myocardial perfusion defects in type 2 diabetic patients.* Diabetes Care 2006;29:95-100.
39. Yoon YS, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC et al. *Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor.* Circulation 2005;111:2073-85.
40. Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padinruegas ME et al. *Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene.* Circ Res 2006;99:42-52.
41. Pagnin E, Fadini G, de Toni R, Tiengo A, Calo L, Avogaro A. *Diabetes induces p66shc gene expression in human peripheral blood mononuclear cells: relationship to oxidative stress.* J Clin Endocrinol Metab 2005;90:1130-6.
42. Herbrig K, Pistrosch F, Foerster S, Gross P. *Endothelial progenitor cells in chronic renal insufficiency.* Kidney Blood Press Res 2006;29:24-31.
43. Fadini GP, Miotto D, Baesso I, Facco M, Miorin M, Tiengo A et al. *Arterio-venous gradient of endothelial progenitor cells across renal artery stenosis.* Atherosclerosis 2005;182:189-91.
44. Bussolati B, Camussi G. *Stem cells in acute kidney injury.* Contrib Nephrol 2007;156:250-8.
45. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D et al. *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney.* Am J Pathol 2005;166:545-55.
46. Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD et al. *Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine.* J Am Coll Cardiol 2005;46:1693-701.
47. Butler JM, Guthrie SM, Koc M, Afzal A, Caballero S, Brooks HL et al. *SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy.* J Clin Invest 2005;115:86-93.
48. Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, Pastore MR, Ramoni A, Maestroni A et al. *Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy.* Diabetologia. 2006;49:1109-11.
49. Lee IG, Chae SL, Kim JC. *Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy.* Eye 2006;20:546-52.
50. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U et al. *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair.* Circulation 2005;111:2981-7.