

Opinioni a confronto

A cura di Stefano Del Prato

Dipartimento di Endocrinologia e Metabolismo, Sezione Diabetologia e Malattie del Metabolismo, Università di Pisa

Le cellule progenitrici endoteliali come fattore di rischio cardiovascolare nel paziente diabetico

Partecipanti

Gian Paolo Fadini

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Divisione di Malattie del Metabolismo, Università degli Studi di Padova

Alessandra Dei Cas

Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche, Università degli Studi di Parma

1) Le EPC: mito o realtà?

🔊 **Gian Paolo Fadini:** le cellule progenitrici endoteliali (*endothelial progenitor cells*, EPC) sono state identificate per la prima volta nel 1997 e definite come cellule circolanti nell'organismo adulto, derivate dal midollo osseo, che esprimano gli antigeni di superficie CD34 o *kinase-insert domain receptor* (KDR, anche noto come Flk-1 nel topo) e che siano in grado di proliferare e differenziare in cellule endoteliali mature *in vitro* e *in vivo* e di partecipare ai processi di neoangiogenesi *in vivo* (1). Questa scoperta ha aperto nuove prospettive nello studio delle malattie cardiovascolari, demolendo l'assioma che la neovasculogenesi, ossia la formazione *de novo* di vasi sanguigni nel contesto di un tessuto avascolare, sia limitata agli stadi della vita embrionale. Attualmente si ritiene infatti che le EPC rappresentino un pool di cellule circolanti con due funzioni principali: la partecipazione diretta nella formazione della parete vascolare e la riparazione dell'endotelio vascolare danneggiato. Negli ultimi anni si è resa disponibile una vastissima serie di evidenze cliniche e sperimentali secondo le quali le EPC rappresentano una componente integrata dell'apparato cardiovascolare, soggetta ad alterazioni fisiologiche e patologiche, con potenziali implicazioni terapeutiche. Le EPC sono coinvolte nell'angiogenesi fisiologica in corso di accrescimento corporeo, guarigione delle ferite e rigenerazione endometriale, così come in processi patologici, quali l'ischemia d'organo e la retinopatia proliferante. Il meccanismo con cui le EPC stimolano l'angiogenesi è il tipico circuito a feedback negativo: l'ischemia tissutale causa la produzione e il rilascio di fattori di crescita e chemochine (es. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *stromal cell-derived factor* (SDF)-1 α) che, a loro volta, stimolano la mobilitazione delle EPC dal midollo osseo alla circolazione periferica. Una volta in circolo, le EPC raggiungono selettivamente i tessuti ischemici e/o danneggiati grazie all'interazione chemochina/recettore (soprattutto il sistema SDF-1 α /CXCR4) e promuovono la riparazione endoteliale e/o l'angiogenesi compensatoria. L'ipotesi attualmente più accreditata è che una patologica riduzione o disfunzione delle EPC potrebbe impedire questi meccanismi di protezione dal danno e quindi favorire la comparsa e/o la progressione delle malattie cardiovascolari.

A fronte delle ampie evidenze a favore di un ruolo rilevante delle EPC nella fisiologia e patologia cardiovascola-

re, dopo oltre 10 anni di ricerche, l'identificazione e la definizione delle EPC rimangono piuttosto elusive. Le metodiche utilizzate per questo scopo sono essenzialmente due: l'analisi citofluorimetrica che fornisce dati quantitativi e la coltura cellulare che fornisce per lo più dati qualitativi. L'identificazione e la quantificazione delle EPC in citofluorimetria si basano sull'espressione di superficie di alcuni determinanti antigenici, quali i marcatori di staminalità (es. CD34, CD133, CD117) e i marcatori endoteliali (es. KDR, CD31, VECAM). Tuttavia è stato messo in luce come non esista alcuna combinazione antigenica in grado di definire inequivocabilmente le EPC; ad esempio, il marker di staminalità CD34 è anche espresso su alcuni tipi di endotelio maturo e, viceversa, il marker endoteliale KDR è espresso anche sulle cellule staminali ematopoietiche (HSC). Altrettanto controversi sono i protocolli di coltura utilizzati per l'isolamento delle EPC; ad esempio, è stato dimostrato che i protocolli più brevi e semplici favoriscono l'isolamento di macrofagi che assumono un fenotipo simil-endoteliale, ma che non differenziano in endotelio anatomicamente e funzionalmente maturo. Questi oggettivi limiti metodologici hanno in parte frenato la progressione delle conoscenze sulle EPC e smorzato l'interesse per le potenziali applicazioni cliniche, tanto che alcuni ricercatori hanno provocatoriamente cominciato a dubitare dell'esistenza delle EPC come una entità biologica ben definita. È parere di chi scrive che le difficoltà metodologiche nello studio delle EPC siano teoricamente e tecnicamente superabili (una rassegna sull'argomento è contenuta in (2)) e che la mole di dati sperimentali sul ruolo delle EPC nelle malattie cardiovascolari non sia facilmente ignorabile. Per quanto attiene al dibattito sul potenziale ruolo delle EPC come biomarker di rischio cardiovascolare, si tenga presente che la letteratura risulta ancora oggi complessivamente concorde nell'attribuire alle cellule mononucleate circolanti con fenotipo citofluorimetrico CD34⁺/KDR⁺ il nome di EPC, mentre i più rigorosi protocolli di coltura delle EPC, essendo lunghi e non applicabili su scala epidemiologica, non possono fornire un contributo diretto a questo dibattito. È infine da tenere in considerazione che, per motivi metodologici, cellule con fenotipi antigenici più semplici (es. CD34⁺), pur rappresentando una popolazione meno specifica di cellule progenitrici circolanti, potrebbero rivestire un significato clinico più solido (3).

►) **Alessandra Dei Cas:** l'importanza della scoperta delle EPC risiede nel superamento del paradigma che la neovascolarizzazione post-natale fosse mediata esclusivamente dalla proliferazione e dal rimodellamento delle cellule endoteliali già differenziate provenienti da vasi preesistenti, aprendo nuove prospettive di ricerca sia diagnostiche sia terapeutiche.

Nonostante le innumerevoli ricerche volte allo studio di queste cellule, ad oggi non esiste in letteratura una definizione univoca di EPC.

Il concetto di EPC è quindi basato sulle caratteristiche che esse dovrebbero possedere, quali essere cellule non-endoteliali ad origine dal midollo osseo ematopoietico dell'adulto con capacità di espansione clonale (abilità di una singola cellula di moltiplicarsi), di staminalità (capacità proliferative e di resistenza allo stress) e di differenziazione in cellule endoteliali mature (4).

La mancanza di una chiara definizione e caratterizzazione delle EPC rappresenta uno dei problemi principali negli studi riguardanti le stesse e ha determinato il fiorire di un'ampia letteratura, a volte con risultati anche contraddittori.

Esistono due approcci differenti per la identificazione e la caratterizzazione di queste cellule: la tecnica citofluorimetrica e quella delle colture cellulari. Queste metodiche rispondono a quesiti e ad esigenze di ricerca diversi ed entrambe non sono esenti da limiti.

La tecnica citofluorimetrica si basa sull'identificazione delle EPC mediante la valutazione dell'espressione di antigeni di superficie e, come suggerisce il termine stesso, si ritiene che queste cellule debbano esprimere specifici marcatori di staminalità (es. CD34, CD133) e di differenziazione in senso endoteliale maturo (es. KDR, CD31).

La caratterizzazione delle EPC attraverso l'analisi citofluorimetrica ha il vantaggio di poter selezionare una popolazione più omogenea di cellule e identificare più sottopopolazioni cellulari contemporaneamente, ma resta complessa in quanto non esiste in letteratura un consenso sul fenotipo antigenico da utilizzare per l'identificazione delle presunte EPC, data la co-espressione di antigeni di superficie comuni, rispetto a quelli espressi sulle cellule della linea ematopoietica e sulle cellule endoteliali circolanti (CEC). Inoltre, data la rarità in circolo di queste cellule e la difficoltà della identificazione contemporanea di antigeni di superficie (es. CD34, CD133, KDR), diventa necessario

poter selezionare sottopopolazioni (es. CD34⁺/KDR⁺ e CD133⁺/KDR⁺) con un fenotipo meno restrittivo e quindi più facilmente identificabile ma, forse, inevitabilmente meno accurato. Un'altra importante restrizione della metodica citofluorimetrica è la mancanza di informazioni di tipo funzionale.

L'approccio *ex vivo* (colture cellulari da sangue periferico), al contrario, permette non solo l'identificazione e la valutazione numerica delle EPC, ma fornisce informazioni anche di tipo funzionale. Esso si basa sull'isolamento delle EPC dalla popolazione dei mononucleati (MNC) circolanti da sangue periferico e sulla valutazione della loro capacità proliferativa (capacità di formare colonie) e di differenziarsi in cellule endoteliali mature. Inoltre, è possibile eseguire saggi di funzionalità, quali la valutazione della capacità di formare strutture tubulari simil-vascolari (*tube formation assay*) e di migrare in seguito all'esposizione a sostanze chemiotattiche (*migration assay*). Tuttavia anche questa tecnica, apparentemente più completa, non è esente da limiti. La critica maggiore risiede nel fatto che le cellule sono coltivate in terreni arricchiti con fattori di crescita e con citochine e quindi non in condizioni fisiologiche. Esiste pertanto, paradossalmente, la possibilità di differenziare in senso endoteliale anche cellule che, in assenza di pressione selettiva, si differenzierebbero in altre linee cellulari. Sono stati descritti in letteratura almeno 3 protocolli di isolamento delle EPC in coltura, parzialmente diversi tra loro (5). I protocolli differiscono per quanto riguarda la morfologia delle colonie ottenute, il tempo di comparsa delle stesse, il numero di passaggi in coltura e i differenti metodi di conta (colonie verso le singole cellule). Più recentemente alcuni autori hanno suggerito che possono esistere sottopopolazioni di EPC che, sulla base del tempo di comparsa in coltura, vengono definite precoci (pochi giorni) e tardive (qualche settimana). Queste due tipologie di cellule differiscono per potenziale proliferativo (basso verso alto) e per morfologia (affusolato verso rotondeggiante). Funzionalmente le EPC precoci sembrano stimolare la formazione di strutture tubulari, mentre le tardive mostrano capacità di incorporarsi nei vasi per la neoangiogenesi (6).

È chiaro, quindi, come lo studio *ex vivo* delle EPC sia un campo ancora ampiamente da esplorare, poiché le metodiche ad oggi disponibili per la coltura di queste cellule comportano notevoli differenze. Rimane il dubbio se queste cellule derivino o meno da un precursore comune e se abbiano *in vivo* la stessa capacità di formare dei vasi. Il quadro è complicato ulteriormente poiché non sempre vi è corrispondenza di risultati con l'utilizzo in parallelo delle due metodiche esposte (7).

Da questa descrizione emerge come le EPC siano un gruppo eterogeneo di cellule con espressione di antigeni, con morfologia e, verosimilmente, con funzioni diverse. Sono quindi necessari studi volti a definire i diversi profili antigenici per la identificazione dei precursori endoteliali circolanti di derivazione o meno dal midollo osseo e di studi che ne caratterizzino le diverse funzioni.

Le difformità osservate, tuttavia, non dovrebbero forse essere viste soltanto come discrepanze, ma andrebbero integrate per ottenere una visione completa su quelli che sono i complessi meccanismi nel mantenimento dell'omeostasi e dell'integrità vascolare.

2) Quali sono le evidenze a favore e contro il ruolo delle EPC come marcatore di rischio cardiovascolare?

🔊 **Gian Paolo Fadini:** dal momento che le EPC svolgono funzioni protettive all'interno dall'apparato cardiovascolare, è intuitivo che una riduzione o disfunzione di queste cellule possa in qualche modo promuovere lo sviluppo o la progressione delle malattie cardiovascolari (8). Molti studi clinici hanno infatti messo in evidenza che la presenza di uno qualsiasi dei classici fattori di rischio per malattia cardiovascolare (ipertensione arteriosa, dislipidemia, diabete mellito, fumo, obesità) si associa a riduzione o disfunzione delle EPC circolanti rispetto ai soggetti di controllo senza questi fattori. I meccanismi molecolari alla base di tali alterazioni sono stati in parte chiariti. Ad esempio, l'eccesso di angiotensina-II o di aldosterone riduce la generazione di EPC, il fumo e un eccesso di *low density lipoproteins* (LDL) agiscono diminuendo le EPC tramite un meccanismo infiammatorio e pro-apoptotico, mentre l'iperglicemia riduce sia la mobilitazione sia la sopravvivenza delle EPC in circolo (9, 10). Sono state inoltre dimostrate correlazioni inverse tra il livello delle EPC circolanti e altri biomarker surrogati di rischio cardiovascolare, quali la proteina C reattiva, l'omocisteina e le LDL ossidate. Il nostro gruppo di ricerca ha chiarito come non

solo i fattori di rischio si associno singolarmente a diminuzione delle cellule progenitrici circolanti (CD34⁺), ma come l'associazione di multipli fattori di rischio cardiometabolico negli stessi pazienti si associ a una riduzione progressiva e sinergica del loro livello circolante (3). Abbiamo inoltre dimostrato che i pazienti con malattia vascolare aterosclerotica manifestano un'ulteriore diminuzione dei livelli di EPC (CD34⁺/KDR⁺ e CD34⁺) rispetto ai pazienti senza segni di aterosclerosi conclamata, a parità di fattori di rischio (11). Una lieve ma significativa riduzione delle EPC circolanti si osserva anche in soggetti apparentemente sani, ma che presentano un elevato spessore intima-media a livello della carotide, indicando che le alterazioni delle EPC sono un evento precoce e precedono lo sviluppo clinico dell'aterosclerosi (12). Infatti, si può a ragione ritenere che il livello delle EPC circolanti rispecchia in maniera sorprendente la storia naturale e la fisiopatologia della malattia aterosclerotica, dalla comparsa dei fattori di rischio allo sviluppo delle sindromi cliniche (8). Le EPC si configurano, quindi, come un nuovo prototipo di biomarcatore di rischio cardiovascolare che non solo rispecchia la gravità della malattia, ma ha anche un ruolo nel suo sviluppo e nella progressione. Ad ulteriore supporto di tale scenario, la letteratura propone tre studi longitudinali che dimostrano come il basso livello delle EPC circolanti rappresenti un predittore indipendente di eventi cardiovascolari in diverse popolazioni di pazienti. Werner et al. nel 2005 hanno per la prima volta mostrato che il livello basale delle EPC CD34⁺/KDR⁺ predice negativamente lo sviluppo di un evento cardiovascolare maggiore a distanza di 12 mesi in una popolazione di oltre 500 pazienti sottoposti a coronarografia, indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali e da altri potenziali marcatori di rischio, tra cui la frazione di eiezione del ventricolo sinistro (13). Quasi contemporaneamente, Schmidt-Lucke et al. dimostravano che il livello basale di EPC CD34⁺/KDR⁺ è un predittore negativo indipendente di eventi cardiovascolari e/o di progressione dell'aterosclerosi in una popolazione di 120 pazienti con diverso profilo di rischio durante un periodo di 10 mesi (14). Più recentemente Maruyama et al. hanno evidenziato il significato prognostico del basso livello di cellule CD34⁺ circolanti nei confronti di eventi cardiovascolari in una popolazione di 216 pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi, durante un periodo di 23 mesi (15). Complessivamente questi studi, condotti su un numero cumulativo di quasi 1000 pazienti, confermano che il basso livello di cellule progenitrici circolanti (indipendentemente dal fenotipo CD34⁺/KDR⁺ o CD34⁺) rappresenta un biomarcatore di rischio cardiovascolare in soggetti a medio-alto rischio. Rimane ancora da definire quale sia la capacità discriminatoria del livello delle EPC nell'identificazione dei soggetti che andranno incontro a un evento cardiovascolare in un determinato periodo di tempo. In altri termini, non è ancora chiaro se la quantificazione delle EPC di un singolo individuo sia in grado di riclassificare il rischio stimato e di modificare di conseguenza gli atteggiamenti preventivi e terapeutici.

►) **Alessandra Dei Cas:** la stratificazione del rischio cardiovascolare, ad oggi, si è focalizzata sulla determinazione della propensione al danno vascolare trombotico, infiammatorio o cellulo-mediato da parte di fattori in grado di causare stress a livello vascolare, quali il fumo, l'ipertensione, l'iperglicemia e la dislipidemia, ecc.

Al contrario, la valutazione della biologia delle EPC offre un possibile strumento per determinare la capacità riparativa endogena vascolare fornendo, quindi, informazioni fisiopatologiche. Infatti, il rilascio di citochine e fattori pro-angiogenici da parte dei tessuti ischemici, quali il SDF-1, il VEGF e il gradiente di ossigeno, stimola la proliferazione e differenziazione delle EPC a livello del midollo osseo, la loro mobilitazione in circolo e il richiamo per gradiente nei tessuti danneggiati, dove mediano i processi riparativi dell'endotelio.

Il rilascio di EPC rappresenterebbe, quindi, un meccanismo omeostatico per il mantenimento dell'integrità vascolare e la valutazione del numero e della funzione delle EPC sarebbe in grado di fornire informazioni riguardo ai meccanismi fisiopatologici alla base del processo aterosclerotico e di offrire interventi terapeutici specifici.

Inoltre, la premessa che una deplezione delle EPC sia antecedente allo sviluppo della aterosclerosi suggerisce che un monitoraggio del numero delle EPC possa costituire un valido strumento per identificare i soggetti a rischio di eventi cardiovascolari. Ciò è supportato da numerose evidenze, riportate in singoli studi trasversali, di una correlazione inversa tra fattori di rischio cardiovascolare, CAD e numero e funzione delle EPC in diverse popolazioni (16).

Tuttavia, esistono in letteratura anche studi che hanno mostrato risultati opposti. In un recente lavoro il numero di EPC tardive *ex vivo*, valutato con due metodi differenti, aumentava in maniera proporzionale alla severità della CAD, misurata con tecnica angiografica (17). In un ampio studio di popolazione il numero di EPC in coltura si ridu-

ceva con l'avanzare dell'età, ma risultava direttamente correlato alla presenza dei singoli fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione, trigliceridi, emoglobina glicata (HbA_{1c})) e del *Framingham risk score* (18).

Questa differenza nei risultati può essere parzialmente giustificata dai diversi metodi di identificazione (citofluorimetria o colture cellulari) delle EPC e dai fenotipi antigenici utilizzati (CD34⁺, CD133⁺ o la combinazione CD133⁺/KDR⁺ o CD34⁺/KDR⁺), che rendono non sempre possibile il confronto tra i diversi studi. Il termine EPC è stato infatti applicato a differenti popolazioni cellulari progenitrici e abbiamo già discusso come non sempre vi sia una correlazione tra risultati utilizzando diversi criteri di determinazione (vedi sezione precedente). Inoltre, la bassa prevalenza di queste cellule in circolo, già in condizioni fisiologiche, può rendere ancora più difficoltosa una loro esatta individuazione e conta.

Di difficile interpretazione è come, in presenza di cardiopatia ischemica cronica, il numero di EPC correli in modo inverso con la presenza di fattori di rischio cardiovascolare, diversamente da quanto si osserva in corso di eventi acuti, quali angina instabile e infarto miocardico acuto (IMA), dove il numero di EPC è risultato, in alcuni studi, aumentato. Il ridotto numero e la diminuzione della funzione delle EPC in presenza di fattori di rischio cardiovascolare trovano una possibile interpretazione nel ridotto potenziale rigenerativo imputabile allo stress ossidativo e allo stato infiammatorio in condizioni croniche, indotto dai fattori di rischio cardiovascolare a livello del midollo osseo. Tale interpretazione non varrebbe invece nei quadri di infiammazione acuta (es. angina instabile, IMA), eventi in grado di indurre una rapida mobilitazione delle EPC. È stato infatti ipotizzato che lo stato infiammatorio che accompagna gli eventi acuti possa indurre la mobilitazione di molti precursori a livello del midollo osseo, *in primis* della linea mieloide, ma anche delle EPC; tuttavia, la precisa spiegazione fisiopatologica rimane non chiara. In questa ottica il numero di EPC circolanti potrebbe rappresentare un marker di stratificazione del rischio, in funzione della stabilità o meno del processo aterosclerotico.

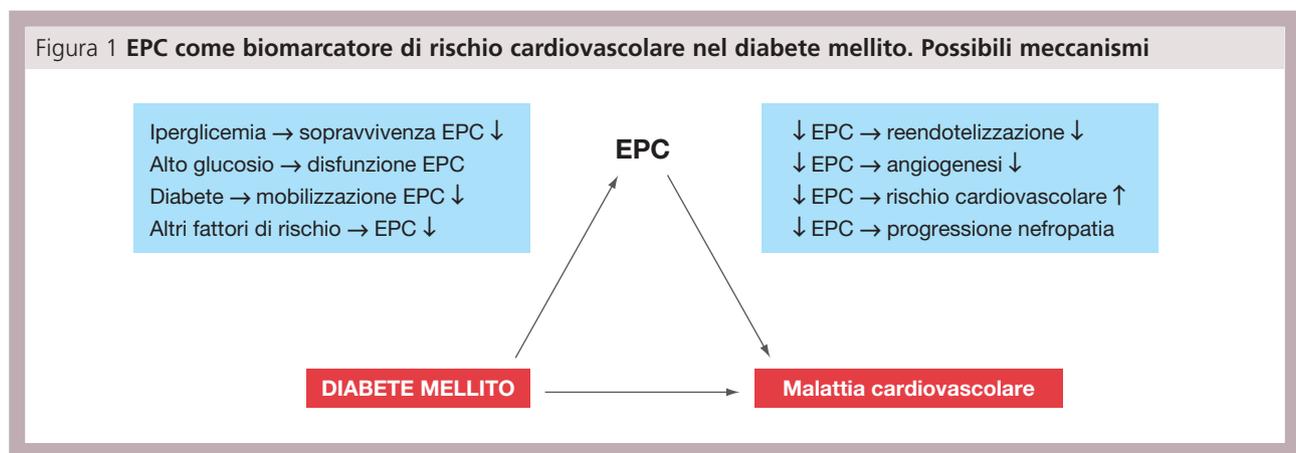
Un'ulteriore chiave di lettura potrebbe risiedere nell'assunto che anche le EPC non sono esenti dai processi di senescenza cellulare. Quest'ultima, che si accompagna a condizioni di rischio cardiovascolare e quindi di aumentato stress ossidativo cronico, potrebbe essere alla base del precoce invecchiamento cellulare delle EPC e quindi di una alterazione nel numero e/o nella funzione. A supporto di questa ipotesi, un nostro lavoro in fase di pubblicazione ha evidenziato una lunghezza telomerica leucocitaria, quale marcatore di senescenza cellulare, ridotta nei soggetti con un più basso numero di EPC, anche in funzione della presenza di aterosclerosi subclinica.

In conclusione, studi di fisiopatologia vascolare applicata alle EPC e la messa a punto di una metodica unica riproducibile, sensibile e specifica sono necessari per poter proporre le EPC quali potenziali validi marcatori surrogati e prognostici di patologia cardiovascolare.

3) Il livello delle EPC è un valido marcatore di rischio anche nella popolazione diabetica?

🗣️ **Gian Paolo Fadini:** sono state condotte numerose indagini sul livello delle EPC circolanti in pazienti affetti da diabete mellito tipo 1 (DMT1) e tipo 2 (DMT2) e per entrambi i tipi di diabete è stata dimostrata una severa riduzione delle EPC rispetto ai soggetti non affetti dalla malattia (10). Il dato risulta essere più solido per il DMT2 in quanto gli studi sono più abbondanti e con numerosità campionaria più elevata. È da notare che non solo le EPC CD34⁺/KDR⁺ e le cellule progenitrici CD34⁺ circolanti risultano essere ridotte nel diabete mellito, ma è stato evidenziato che molti altri possibili fenotipi delle EPC (es. CD133⁺/KDR⁺, CD117⁺/CD31⁺, ecc.) sono diminuiti rispetto ai soggetti non diabetici (19). Per questo motivo si può ritenere che il diabete mellito rappresenti, ad oggi, la condizione clinica per cui la riduzione delle EPC è stata dimostrata in maniera più estesa e dettagliata. Nei pazienti diabetici la diminuzione del livello di EPC correla con la durata della malattia e con il grado di compenso glicometabolico. Inoltre, una collaborazione tra i gruppi di ricerca di Padova e Pisa ha permesso di dimostrare che una lieve ma significativa riduzione delle EPC CD34⁺/KDR⁺ e delle cellule CD34⁺ precede lo sviluppo del DMT2, in quanto è già riscontrabile in soggetti affetti da alterazioni minori del metabolismo dei carboidrati (alterata glicemia a digiuno, IFG e ridotta tolleranza al glucosio, IGT) (20). Infine, la presenza, la gravità e la numerosità delle complicanze della malattia diabetica determinano un ulteriore decremento delle EPC, dato che completa uno scenario secondo cui il

livello di EPC rispecchia la storia naturale della malattia diabetica (21). Questo dato è particolarmente vero per quanto riguarda le complicanze vascolari, in quanto abbiamo evidenziato come il livello delle EPC si riduca progressivamente e linearmente al progredire delle complicanze macroangiopatiche a livello carotideo e degli arti inferiori nei pazienti con DMT2. Come idealmente richiesto a un buon biomarker di rischio, le alterazioni a carico delle EPC nei pazienti diabetici scompensati sono reversibili dopo ottimizzazione del controllo glico-metabolico. Nonostante questa mole di dati sulle alterazioni delle EPC associate al diabete mellito, le evidenze scientifiche sul significato prognostico del basso livello di EPC circolanti nei pazienti diabetici sono scarse. Anche se molti dei pazienti inclusi negli studi longitudinali precedentemente citati erano diabetici, non esiste alcuno studio di questo tipo che abbia valutato se il livello delle EPC è un predittore negativo indipendente di eventi cardiovascolari nella popolazione diabetica. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che un basso livello di cellule progenitrici CD34⁺ è un predittore indipendente di eventi cardiovascolari nei pazienti affetti da sindrome metabolica (22). Inoltre, uno studio recente su 85 pazienti con DMT2 mostra che il basso livello di cellule CD34⁺ si associa alla progressione della nefropatia diabetica, ma non sono stati forniti dati sugli eventi cardiovascolari (Figura 1) (23).



») **Alessandra Dei Cas:** l'impatto negativo del diabete mellito sul numero e sulla funzione delle EPC è stato ampiamente documentato *ex vivo* in modelli animali e in pazienti con DMT1 e DMT2, suggerendo che l'iperglicemia rappresenti il momento fondamentale nell'alterazione della biologia delle EPC in corso di diabete. I meccanismi implicati coinvolgono la riduzione della mobilizzazione dal midollo osseo, della proliferazione e della sopravvivenza una volta in circolo, oltre che un'alterata capacità proliferativa, di adesione, di migrazione e di incorporazione nelle strutture vascolari.

Dal punto di vista fisiopatologico l'iperglicemia agirebbe inducendo apoptosi e favorendo la senescenza cellulare, effetti mediati da una alterazione della via fosfatidilinositol 3-chinasi/Akt, da una attivazione della via *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) e da una ridotta biodisponibilità di ossido nitrico (NO). A conferma dei meccanismi fisiopatologici sovraesposti, in pazienti affetti da DMT1 e DMT2 il numero e la funzione delle EPC sono risultati inversamente correlati al grado di compenso metabolico (HbA_{1c}) (24).

Ancora una volta, anche per i pazienti diabetici, così come già per quelli ischemici, alcuni dati della letteratura appaiono contrastanti. Infatti, in un studio condotto in pazienti diabetici di neodiagnosi, senza complicanze e con HbA_{1c} <7,5%, i livelli di EPC non differivano da quelli dei controlli sani (25).

È verosimile che la discrepanza di questi risultati possa riflettere l'eterogeneità della condizione diabetica. Risulta infatti difficile condurre studi in pazienti diabetici con caratteristiche omogenee per durata di malattia, compenso metabolico, fattori di rischio cardiovascolari, grado di complicanze e trattamento farmacologico.

La biologia delle EPC, inoltre, sembra differire tra complicanze micro (retinopatia diabetica proliferante) e macrovascolari. In presenza di complicanze macrovascolari il numero di EPC risulta ridotto, come in pazienti con arteriopatia periferica nei quali il numero delle EPC correla inversamente con la severità delle lesioni (21). Al contrario, in pre-

senza di retinopatia proliferante il numero di EPC risulta aumentato, probabilmente per uno stimolo neoangiogenetico. È stato inoltre dimostrato che EPC prelevate da pazienti con retinopatia diabetica proliferante sopravvivono più a lungo in coltura e possiedono una maggiore capacità proliferativa e differenziativa rispetto a quelle prelevate da soggetti con aterosclerosi periferica (26). In realtà, questo apparente effetto benefico nella retinopatia proliferante sarebbe annullato dalla deposizione di prodotti avanzati della glicazione (AGE) a livello della membrana basale che determinerebbero una ridotta capacità di adesione e di incorporazione delle EPC a livello endoteliale. Inoltre, un recente lavoro, condotto in un modello animale di diabete mellito, dimostra come le EPC (CD34⁺) prelevate da volontari sani fossero in grado di incorporarsi a livello dei vasi retinici, a differenza di quelle prelevate da pazienti diabetici, suggerendo un difetto funzionale delle EPC nel diabete (27). Questa diversa risposta delle EPC, che si osserva in corso di retinopatia diabetica proliferante e che differisce dalle altre complicanze, è denominata “paradosso diabetico”. Questo “paradosso” potrebbe complicare ulteriormente il possibile utilizzo delle EPC quali marcatori di rischio cardiovascolare nel diabete.

A nostro avviso, sono quindi necessari studi che valutino se differenti fenotipi di cellule progenitrici endoteliali si comportano in modo differente in funzione delle diverse condizioni cliniche proprie dei pazienti diabetici e studi che ne valutino la funzione in quanto, allo stato attuale, il numero assoluto di EPC potrebbe non riflettere il loro ruolo di marcatori di rischio cardiovascolare nel paziente diabetico.

In conclusione, la valutazione delle EPC nella stratificazione del rischio cardiovascolare nel paziente diabetico, oltre a presentare i limiti descritti nella precedente sezione, deve correggere per gli altri fattori determinanti tra cui, *in primis*, il grado di compenso metabolico, la durata di malattia, la presenza o meno di complicanze micro e macrovascolari, la concomitanza di altri fattori di rischio cardiovascolare (quali la dislipidemia e l'ipertensione) e le terapie in atto.

4) La modulazione del livello delle EPC è in grado di ridurre il rischio cardiovascolare nel paziente diabetico?

■) **Gian Paolo Fadini:** ad oggi sono state identificate diverse strategie terapeutiche in grado di modulare favorevolmente il livello e/o la funzione delle EPC circolanti. Alcuni studi sono stati condotti in pazienti diabetici e con farmaci anti-iperlipemizzanti. Per quanto riguarda le misure terapeutiche non farmacologiche, l'abolizione del fumo di sigaretta, l'attività fisica aerobica regolare e alcuni interventi dietetici si sono dimostrati efficaci nell'aumentare il livello di EPC in diverse popolazioni di pazienti, anche se non sono disponibili studi su coorti selezionate di pazienti diabetici (8). Per quanto riguarda gli interventi farmacologici, le statine, gli ACE-inibitori, i glitazonici e la terapia insulinica intensiva hanno mostrato efficacia nell'aumentare il livello delle EPC anche in gruppi di pazienti diabetici tipo 2. Pertanto, farmaci comunemente usati nel trattamento multifattoriale del diabete e dotati di effetti pleiotropici cardiovascolari hanno come bersaglio anche le EPC. Dal momento che questi approcci farmacologici sono utilizzati nei pazienti ad alto rischio, come i diabetici, per la prevenzione degli eventi cardiovascolari, si potrebbe dedurre che la modulazione del livello delle EPC sia in grado di ridurre il rischio cardiovascolare nel paziente diabetico. Tuttavia, con i dati attualmente disponibili in letteratura, non è possibile discernere gli effetti della modulazione delle EPC dalla ampia gamma di altri effetti pleiotropici cardiovascolari esercitati da molti di questi composti, soprattutto le statine e i glitazonici. Infatti, non sono disponibili dati clinici a supporto dell'ipotesi che l'azione cardiovascoloprotettiva di tali trattamenti sia mediata, in parte o in toto, dalle EPC. Unica eccezione degna di nota è costituita da uno studio di confronto simvastatina vs ezetimibe in cui, a parità di riduzione del colesterolo LDL, la statina (dotata di effetti pleiotropici), ma non l'ezetimibe (privo di tali effetti) ha dimostrato efficacia sulle EPC (28).

Per rispondere definitivamente a questa domanda sarà necessario attendere studi su larga scala mediante i quali si possa desumere se il beneficio di un determinato intervento terapeutico varia in base alla risposta in termini di modulazione del livello delle EPC oppure in base al livello basale di EPC. In tal caso si identificherebbe un razionale clinico dell'utilizzo del livello di EPC per stratificare il rischio, per monitorare l'efficacia della terapia e per il *decision-making* terapeutico.

Infine, si noti che sono state individuate anche modalità terapeutiche più complesse per contrastare la riduzio-

ne/disfunzione delle EPC. L'evidenza che le EPC sono coinvolte nella riparazione vascolare durante e dopo ischemia d'organo ha stimolato lo sviluppo di trial clinici di autotrapianto di cellule staminali midollari arricchite in EPC in pazienti con sindromi coronariche acute o croniche o con ischemia cronica degli arti inferiori (29, 30). Anche se di dimensioni limitate, tali studi hanno dato risultati incoraggianti, ma non esistono lavori condotti specificamente in popolazioni di pazienti diabetici.

«) **Alessandra Dei Cas:** abbiamo già discusso come il numero di EPC e la loro funzione siano compromessi nei pazienti con diabete mellito e come ridotti livelli di EPC possano riflettere una scarsa protezione verso il rischio e quindi la mortalità per eventi cardiovascolari. Molecole in grado di modulare il numero e la funzione delle EPC possono, quindi, potenzialmente proteggere contro l'insorgenza e la progressione della patologia cardiovascolare stessa. È ipotizzabile come modifiche nello stile di vita, quali la cessazione dell'abitudine al fumo di sigaretta e una attività fisica moderata, risultate in grado di aumentare il numero delle EPC e di migliorarne la funzione, possano giocare un importante ruolo nel ridurre il rischio cardiovascolare anche nei pazienti diabetici, pur in assenza di dati definitivi. Anche il miglioramento del compenso glicemico, ottenuto con ipoglicemizzanti orali o insulina, si associa a un incremento del numero delle EPC, suggerendo un loro possibile ruolo positivo sul profilo cardiovascolare. I *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)- γ agonisti, farmaci insulino-sensibilizzanti, hanno dimostrato di migliorare il numero e la funzione delle EPC mediante un incremento della biodisponibilità di NO e una riduzione dello stress ossidativo e dello stato infiammatorio. Topi trattati con pioglitazone mostravano un aumentato numero e attività migratoria di EPC e una diminuita apoptosi. Il trattamento per 12 settimane con rosiglitazone in pazienti diabetici determinava un miglioramento della funzionalità delle EPC in coltura (25), anche se sono necessari ulteriori studi a conferma di questi risultati.

Anche farmaci comunemente impiegati nella patologia diabetica sono risultati in grado di migliorare la mobilitazione e la funzione delle EPC; tra questi, le statine che determinano un incremento della biodisponibilità di NO e posseggono proprietà anti-infiammatorie e antiossidanti (31). Studi recenti hanno dimostrato che gli ACE-inibitori e i sartani sono in grado di aumentare il numero e la funzione delle EPC in modelli animali, indipendentemente dall'azione anti-ipertensiva, suggerendo un altro loro potenziale meccanismo di azione benefico sul sistema cardiovascolare (32).

Tuttavia, la quasi totalità degli studi volti a identificare sostanze in grado di modulare il numero e la funzione delle EPC è stata condotta *ex vivo* o in modelli animali. Sono quindi necessarie evidenze sull'uomo in grado di dimostrare che la modulazione del numero delle EPC sia efficace nel ridurre il rischio cardiovascolare che accompagna la patologia diabetica. Inoltre, un incremento nel numero delle EPC non necessariamente si traduce in un beneficio clinico, in quanto è noto come la condizione di diabete si associ a una disfunzione delle stesse. Sono necessari studi approfonditi che valutino non solo i possibili effetti positivi nel modulare il numero e la funzione di queste cellule, ma anche i possibili effetti collaterali, quali quello ipotizzabile nella retinopatia proliferante e, non ultimo, il rischio di angiogenesi tumorale.

5) Esistono risvolti terapeutici pratici attuali?

«) **Gian Paolo Fadini:** in assenza di evidenze definitive che confermino il significato prognostico negativo del basso livello di EPC circolanti in termini di rischio cardiovascolare nei pazienti diabetici, non è raccomandabile l'introduzione di tale biomarcatore nella pratica clinica. Sarà necessario, inoltre, verificare se la misurazione del livello delle EPC nei singoli pazienti diabetici sia in grado di migliorare la stratificazione del rischio e promuovere un migliore approccio di prevenzione mediante interventi farmacologici o modificazioni dello stile di vita.

Al momento, la determinazione del livello delle EPC circolanti dovrebbe essere limitata ai protocolli di ricerca clinica che abbiano l'obiettivo di verificare con maggiore certezza la validità di tale nuovo biomarcatore. Nel caso in cui i promettenti dati sperimentali e i dati clinici finora disponibili in popolazioni non selezionate continuino ad essere confermati anche nei pazienti diabetici, l'utilizzo delle EPC come biomarker di benessere dell'apparato cardiovascolare potrebbe essere introdotto nella pratica clinica diabetologica. Diverrà allora più impellente considera-

re anche opportunità terapeutiche più invasive, quali il ripristino dei livelli di EPC mediante protocolli di autotrapianto cellulare.

►) **Alessandra Dei Cas:** la scoperta delle EPC ha rivoluzionato la visione dei meccanismi coinvolti nel danno vascolare, aprendo nuove prospettive terapeutiche. L'utilizzo delle EPC, sebbene concettualmente considerato "panacea" nelle patologie cardiovascolari ischemiche, presenta numerose problematiche.

Un primo quesito è in quale momento, nel *continuum* del processo aterosclerotico, sia opportuna una terapia con le EPC. Infatti, negli stadi precoci dell'aterosclerosi, nonostante sia descritta una riduzione del numero delle EPC, la correzione dei fattori di rischio cardiovascolari è verosimilmente la scelta più opportuna ed efficace, anche se meno affascinante, nell'arrestare il danno endoteliale, per la dimostrata influenza positiva sul numero e sulla funzione delle EPC. Forse, negli stadi più avanzati del processo aterosclerotico, cioè quando l'integrità endoteliale non può più essere ricostituita, potrebbe risultare utile un potenziamento delle capacità rigenerative dell'endotelio come strategia additiva alla modificazione dei singoli fattori di rischio tradizionali.

Rimane, tuttavia, il problema di quale sia l'approccio migliore per potenziare questa capacità rigenerativa delle EPC. In studi condotti su modelli animali sia la somministrazione autologa, sia quella eterologa si sono mostrate in grado di promuovere la neovascolarizzazione in numerose condizioni cliniche. Tuttavia, l'utilizzo di EPC di derivazione autologa in condizioni di diabete non ha sortito i risultati sperati, verosimilmente per la disfunzione di queste cellule. Per ovviare a questi limiti, l'approccio eterologo risulterebbe quindi migliore in condizioni di diabete, anche se le esperienze rimangono limitate a modelli animali.

Un altro problema è rappresentato dalla bassa prevalenza di EPC in circolo, rendendo quindi necessario l'utilizzo di fattori in grado di espanderne il numero sia *in vitro* sia *in vivo*.

Un'opzione potrebbe essere l'impiego di agenti mobilizzanti le cellule dal midollo osseo *in vivo*, come l'eritropoietina (che è risultata in grado di aumentare il numero, la proliferazione e la migrazione delle EPC), il *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), il VEGF, le statine e gli estrogeni che hanno dimostrato effetti favorevoli sulla mobilizzazione delle stesse.

Nell'uomo sono stati condotti trial randomizzati controllati che hanno utilizzato il G-CSF per la mobilizzazione di cellule progenitrici di origine midollare in pazienti affetti da IMA. I risultati sono stati contrastanti e non vi è ancora una chiara evidenza che la somministrazione di G-CSF possa accelerare la ripresa della funzione ventricolare a medio e lungo termine. Non vi è attualmente la reale prova sull'uomo che una terapia che promuove la mobilizzazione di queste cellule dal midollo osseo possa prevenire o arrestare lo sviluppo del processo aterosclerotico e non vi sono dati che possano mostrare un effetto benefico di questi modulatori in pazienti con disfunzione delle EPC mediata dalla presenza di fattori di rischio cardiovascolare, fra i quali il diabete. A dimostrazione, l'impiego di G-CSF si è dimostrato in grado di aumentare la neovascolarizzazione in un modello animale di diabete e di ischemia periferica, anche se questo fenomeno era attenuato rispetto a quello osservato nei controlli, suggerendo una ridotta funzione di queste cellule in condizione di diabete.

Nonostante le prospettive terapeutiche offerte dalle EPC, le informazioni e le conoscenze nel campo presentano dei limiti, in quanto la vera biologia di queste cellule non è ancora del tutto conosciuta e la popolazione delle EPC è eterogenea e non ancora ben definita. Rimane quindi ancora da identificare quale sia la popolazione di EPC fenotipicamente caratterizzabile, inconfutabilmente in grado di mediare i processi riparativi dell'endotelio. Inoltre, anche le tecniche di isolamento delle EPC non sono standardizzate e gli effetti a lungo termine non sono noti.

Non da ultimo, l'utilizzo di nuove terapie si accompagna quasi sempre, inevitabilmente, a nuovi effetti collaterali. In modo semplicistico, ma reale, si può pensare ai rischi di promuovere la crescita e l'angiogenesi tumorale e di aggravare la retinopatia diabetica.

Bibliografia

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
2. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, et al. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis* 197: 496-503, 2008.
3. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur*

- Heart J 27: 2247–2255, 2006.
4. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 14: 318–322, 2004.
 5. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106: 1525–1531, 2005.
 6. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: 71–77, 2000.
 7. George J, Shmilovich H, Deutsch V, et al. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 12: 331–335, 2006.
 8. Fadini GP, Agostini C, Sartore S, Avogaro A. Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 194: 46–54, 2007.
 9. Fadini GP, Agostini C, Boscaro E, Avogaro A. Mechanisms and significance of progenitor cell reduction in the metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 7: 5–10, 2009.
 10. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 30: 1305–1313, 2007.
 11. Fadini GP, Miorin M, Facco M, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 45: 1449–1457, 2005.
 12. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, et al. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 37: 2277–2282, 2006.
 13. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999–1007, 2005.
 14. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, 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* 111: 2981–2987, 2005.
 15. Maruyama S, Taguchi A, Iwashima S, et al. Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 74: 1603–1609, 2008.
 16. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: Limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 257–266, 2006.
 17. Güven H, Shepherd RM, Bach RG, et al. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 48: 1579–1587, 2006.
 18. Xiao Q, Kiechl S, Patel S, et al. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis – Results from a large population-based study. *PLoS ONE* 2: e975, 2007.
 19. Egan CG, Lavery R, Caporali F, et al. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 51: 1296–1305, 2008.
 20. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 50: 2156–2163, 2007.
 21. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2140–2146, 2006.
 22. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C, et al. Low CD34+ cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* 2009 Apr 5. [Epub ahead of print].
 23. Makino H, Okada S, Nagumo A, et al. Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med* 26: 171–173, 2009.
 24. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 195–199, 2004.
 25. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 183: 163–167, 2005.
 26. Fadini GP, Sartore S, Baesso I, et al. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 29: 714–716, 2006.
 27. Caballero S, Sengupta N, Afzal A, et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes* 56: 960–967, 2007.
 28. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, et al. Simvastatin versus ezetimibe: Pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 111: 2356–2363, 2005.
 29. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: A collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 50: 1761–1767, 2007.
 30. Huang P, Li S, Han M, et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells improves critical limb ischemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2155–2160, 2005.
 31. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103: 2885–2890, 2001.
 32. Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: A new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 45: 526–529, 2005.

