

# il Diabete

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023



## – RASSEGNE

L'eterogeneità del diabete autoimmune

Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1

Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata

## – EDITORIALI

Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante

## – AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale

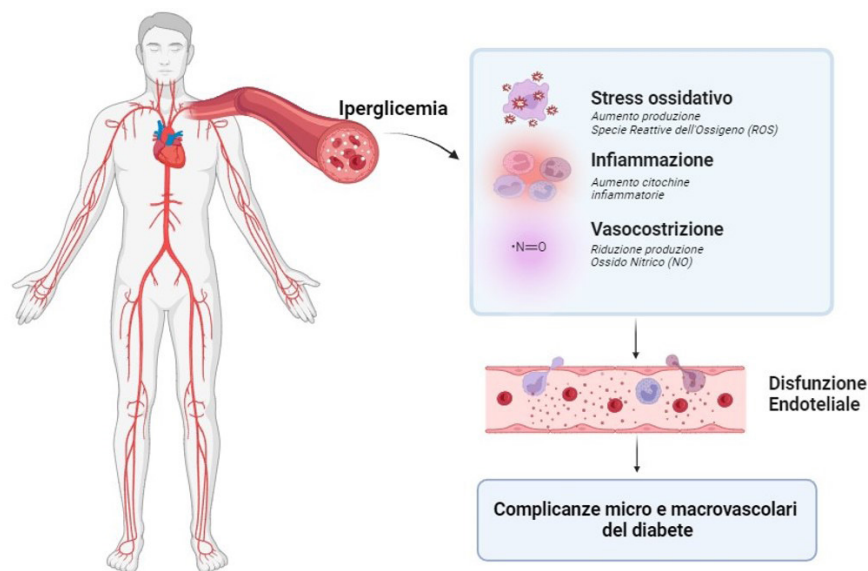
## – JOURNAL CLUB

## – MEDICINA TRASLAZIONALE

Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

## – AGGIORNAMENTO CLINICO

Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva



# il Diabete

Organo ufficiale della  
Società Italiana di Diabetologia

## Direttore Scientifico

Sebastiano Squatrito (Catania)

## Co-direttori

Massimiliano Cavallo (Terni, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Simona Frontoni (Roma)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

## Comitato di Redazione

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

## CONSIGLIO DIRETTIVO SID

### Presidente

Angelo Avogaro (Padova)

### Presidente Eletto

Raffaella Buzzetti (Roma)

### Tesoriere

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

### Segretario

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

### Consiglieri

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

## UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

## Responsabili di Redazione

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

## Sommario

**Ricordando Simona**

*di Anna Solini*

– **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO

153 **L'eterogeneità del diabete autoimmune**

*Ernesto Maddaloni, Raffaella Buzzetti*

162 **Epidemiologia e fattori di rischio del diabete di tipo 1**

*Niccolò Pellegrini, Giulia Leanza e Paolo Pozzilli*

173 **Il diabete monogenico. Una condizione clinica frequentemente trascurata**

*Antonella Marucci, Rosa Di Paola, Claudia Menzaghi e Vincenzo Trischitta*

184 – **EDITORIALI** A CURA DI SIMONA FRONTONI

**Ulcere ischemiche del piede diabetico: terapia cellulare autologa come possibile trattamento adiuvante**

*Matteo Monami*

191 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

**Efficacia della terapia cellulare in pazienti con ischemia critica ed ulcere del piede diabetico: risultati di uno studio prospettico osservazionale**

193 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

196 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**

A CURA DI CARLA GRECO E MASSIMILIANO CAVALLO

**Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito**

*Miriam Longo, Antonietta Maio, Graziella Botta, Paola Caruso, Katherine Esposito*

213 – **AGGIORNAMENTO CLINICO** A CURA DI GIUSEPPE DEFEUDIS

**Diabete mellito dopo trattamento con ocrelizumab per sclerosi multipla primariamente progressiva**

*Marco Grasso, Vera Frison, Nino Cristiano Chillelli, Alessio Filippi, Giorgia Costantini, Cristina Vilotti, Natalino Simioni*

GOLDEN CIRCLE



# il Diabete

---

Vol. 35, N. 3, ottobre 2023

## **Direzione Scientifica**

Sebastiano Squatrito, Catania

## **Direttore Responsabile**

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2023 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-326-0

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2303

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

## **Fondazione Bologna University Press**

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019

e-mail: [info@buponline.com](mailto:info@buponline.com)

[www.buponline.com](http://www.buponline.com)

*Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali*

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

## *Avvertenza ai lettori*

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

a cura di Carla Greco<sup>1</sup>, Massimiliano Cavallo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia;

<sup>2</sup>Medicina interna, Azienda Ospedaliera "Santa Maria" di Terni

## Il ruolo dei progenitori delle cellule endoteliali nel diabete mellito

### *The role of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus*

Miriam Longo<sup>1,2</sup>, Antonietta Maio<sup>1</sup>, Graziella Botta<sup>1</sup>, Paola Caruso<sup>2</sup>, Katherine Esposito<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche avanzate, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli;

<sup>2</sup>Divisione di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, AOU Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2303f>

#### ABSTRACT

*Diabetes is associated with increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone marrow-derived cells involved in endothelial health, vasculogenesis and damage repair. Both subjects with type 1 and type 2 diabetes showed a lower number of EPCs and impaired EPC function, suggesting a potential pathogenic role of these cells in both micro and macrovascular complications, as well as in sexual dysfunctions in diabetes. Several glucose-lowering drugs have been reported to potentially improve EPCs levels and bioreactivity. However, larger and longer studies are needed to better explain the mechanisms involved.*

#### KEYWORDS

*Diabetes mellitus, endothelium, EPCs, glucose control, inflammation, diabetes complications.*

#### INTRODUZIONE

Il diabete mellito è una patologia metabolica cronica ad eziologia multipla. Si caratterizza per uno stato di iperglicemia che può essere causata dall'assenza completa di insulina, nel caso del diabete di tipo 1, o da una resistenza alla sua azione, nel caso del diabete di tipo 2. Nell'ambito di una patologia così complessa, la tossicità derivante dalla cronica iperglicemia (glucotossicità) funge da trigger per molte altre alterazioni biochimiche, che contribuiscono a generare uno stato infiammatorio cronico e ad aumentare lo stress ossidativo nell'organismo. In particolare, gluco- e lipotossicità possono indurre alterazioni dell'omeostasi endoteliale dei piccoli e grandi vasi già dalle prime fasi della malattia nelle persone affette da diabete (1).

Le malattie cardiovascolari costituiscono la principale causa di morbidità e mortalità precoce nei soggetti con diabete (2-3). In particolare, i pazienti con diabete di tipo 2 presentano un rischio 2-4 volte maggiore di sviluppare malattie cardiovascolari nelle forme di malattia coronarica, insufficienza cardiaca cronica, fibrillazione atriale, ictus, e arteriopatia periferica rispetto alle persone senza diabete (4). Inoltre, il diabete è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica, che costituisce a sua volta un fattore prognostico negativo per la funzione cardiaca (4). Le patologie cardiovascolari contribuiscono attualmente a circa un quarto di tutti i decessi nei soggetti con diabete di tipo 1 con una durata della malattia compresa tra 10 e 19 anni, mentre rappresentano più della metà di tutti i decessi

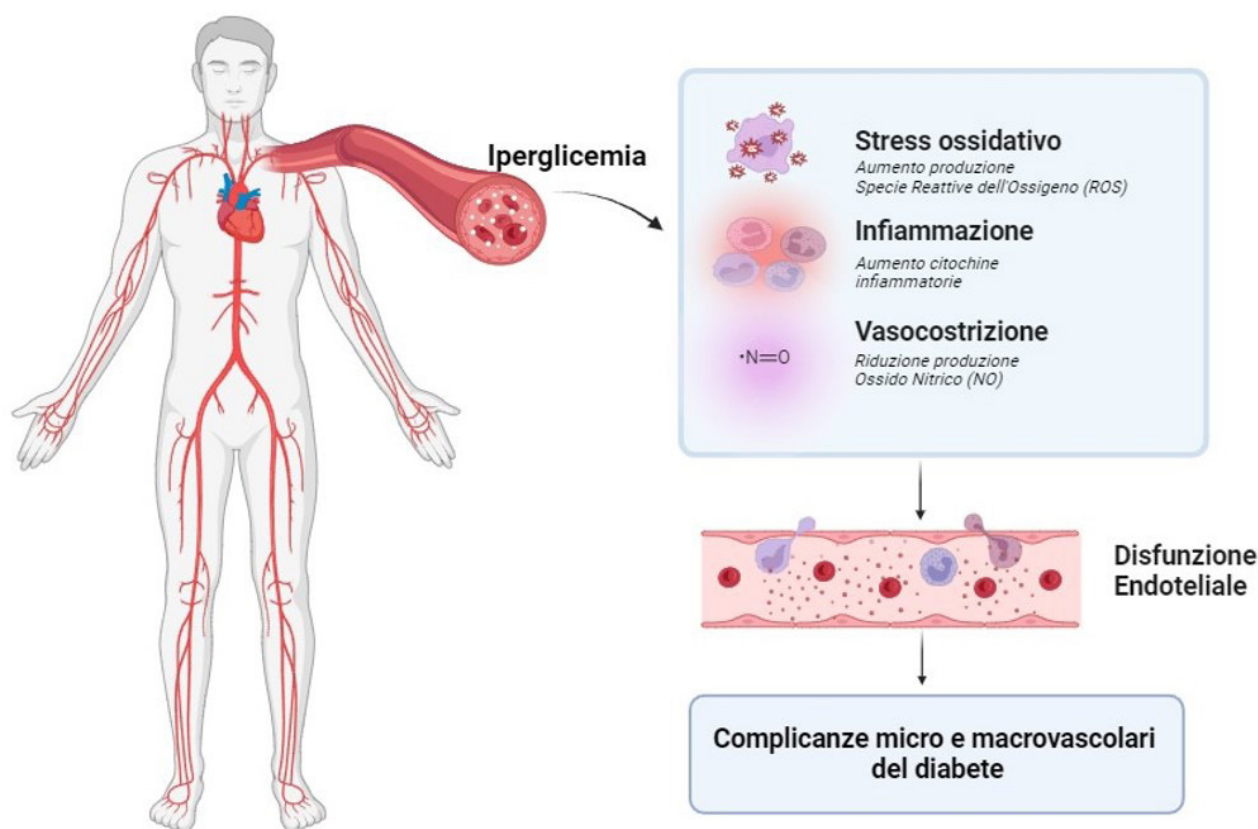
in quelli con una durata superiore a 20 anni (5-6). Inoltre, il rischio cardiovascolare nel diabete peggiora all'aumentare della prevalenza di fattori di rischio noti, quali ipertensione, dislipidemia, fumo, sovrappeso e obesità. L'insieme di più fattori di rischio contribuisce allo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico subclinico che vede come principali mediatori il TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, leptina, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), la proteina C reattiva (PCR) e il fibrinogeno. Queste citochine infiammatorie innescano diversi pathways infiammatori con accumulo di lipidi a carico delle pareti vascolari e conseguente sviluppo di disfunzione endoteliale e malattie cardiovascolari (7-8). Numerosi studi hanno dimostrato che la disfunzione dell'endotelio vascolare gioca un ruolo centrale nella fisiopatologia delle malattie cardiovascolari nel diabete (9).

## DISFUNZIONE ENDOTELIALE COME PRIMUM MOVENS DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE

La salute vascolare dipende da un equilibrio tra i meccanismi di danno e quelli di riparazione endoteliale. In seguito ad una lesione vascolare, la riparazione dell'endotelio danneggiato avviene ad opera delle cellule endoteliali residenti e alla proliferazione e migrazione di cellule progenitrici endoteliali (EPC) nel sito del danno (10-11). Le EPC sono cellule mononucleate derivanti dal midollo osseo. Esse svolgono l'importante ruolo di mantenere la fisiologica integrità vascolare, rimpiazzando cellule endoteliali danneggiate e svolgendo un ruolo protettivo nelle fasi più precoci del processo aterogenetico e di altre malattie cardiovascolari. La disfunzione endoteliale trova terreno fertile per svilupparsi all'interno di un milieu infiammatorio cronico (12). Le cellule endoteliali, attraverso la produzione di chemochine, citochine e di fattori di trascrizione intracellulari, partecipano al reclutamento, adesione e diapedesi dei leucociti all'interno della parete vascolare nei processi infiammatori (13). La produzione enzimatica di ossido nitrico (NO) da parte della NO sintetasi endoteliale (eNOS) costituisce un elemento critico nel regolare l'omeostasi endoteliale. L'aumento dello stress ossidativo può causare un'alterazione di eNOS e lo sviluppo di disfunzione endoteliale (14) (Fig. 1). La riduzione di NO, normalmente prodotto dalle cellule endoteliali, determina la progressione della lesione attraverso una più marcata proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce e un'aumentata attivazione piastrinica che conduce ad un maggiore rischio di trombosi (15). La disfunzione endoteliale può, pertanto, ridurre la perfusione vascolare, produrre fattori che riducono la stabilità di placca e aumentare la risposta trombotica in caso di rottura della stessa (16). Lo stato di iperglicemia cronica attiva una serie di meccanismi molecolari che hanno un importante impatto sulla funzione e sulla sopravvivenza delle cellule endoteliali. In particolare, l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e l'aumento dello stress ossidativo possono compromettere la funzionalità delle cellule endoteliali. Sebbene queste ultime siano dotate di potenti sistemi antiossidanti, la produzione prolungata di ROS dovuta all'iperglicemia cronica può determinare il fallimento dei meccanismi protettivi e condurre a uno stato di intenso stress ossidativo, promuovendo l'apoptosi e determinando un'alterazione del turnover cellulare (17). La morte e la senescenza delle cellule endoteliali sono responsabili della compromissione strutturale del monostrato endoteliale, lasciando una superficie luminale altamente pro-aterogena (18).

Le alterazioni metaboliche associate al diabete possono influenzare la fisiopatologia delle EPC a diversi livelli, ivi compreso il numero di cellule progenitrici disponibili ed il grado di mobilità e differenziazione in cellule della linea endoteliale (19). Il rilascio di EPC dal midollo osseo in risposta a stimoli mobilizzanti dipende da complesse interazioni che avvengono nel microambiente midollare. L'ischemia tissutale è considerata lo stimolo più forte per la mobilizzazione delle EPC, attraverso l'attivazione di sistemi di rilevamento dell'ipossia, come il fattore inducibile dall'ipossia (HIF)-1 (20). L'HIF-1 attivo si lega a specifiche regioni del DNA e promuove la trascrizione di geni sensibili all'ossigeno che codificano per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di derivazione stromale (SDF)-1, e l'eritropoietina (20). I fattori di crescita codificati consentono alle EPC di subire la migrazione transendoteliale e di passare nel sangue periferico dove vengono reclutate secondo gradienti ipossici attraverso l'espressione di SDF-1 indotta da HIF-1 (21). La mobilizzazione delle EPC dal midollo osseo dopo il danno ischemico risulta essere difettosa nei modelli murini con diabete rispetto ai controlli (22). Tale incapacità è stata associata a downregulation di HIF-1  $\alpha$  e al difettoso rilascio di fattori stimolanti il midollo, come VEGF e SDF-1, conducendo, infine, a un'angiogenesi compensatoria insufficiente

**Figura 1** ♦ Meccanismi alla base della disfunzione endoteliale nel diabete



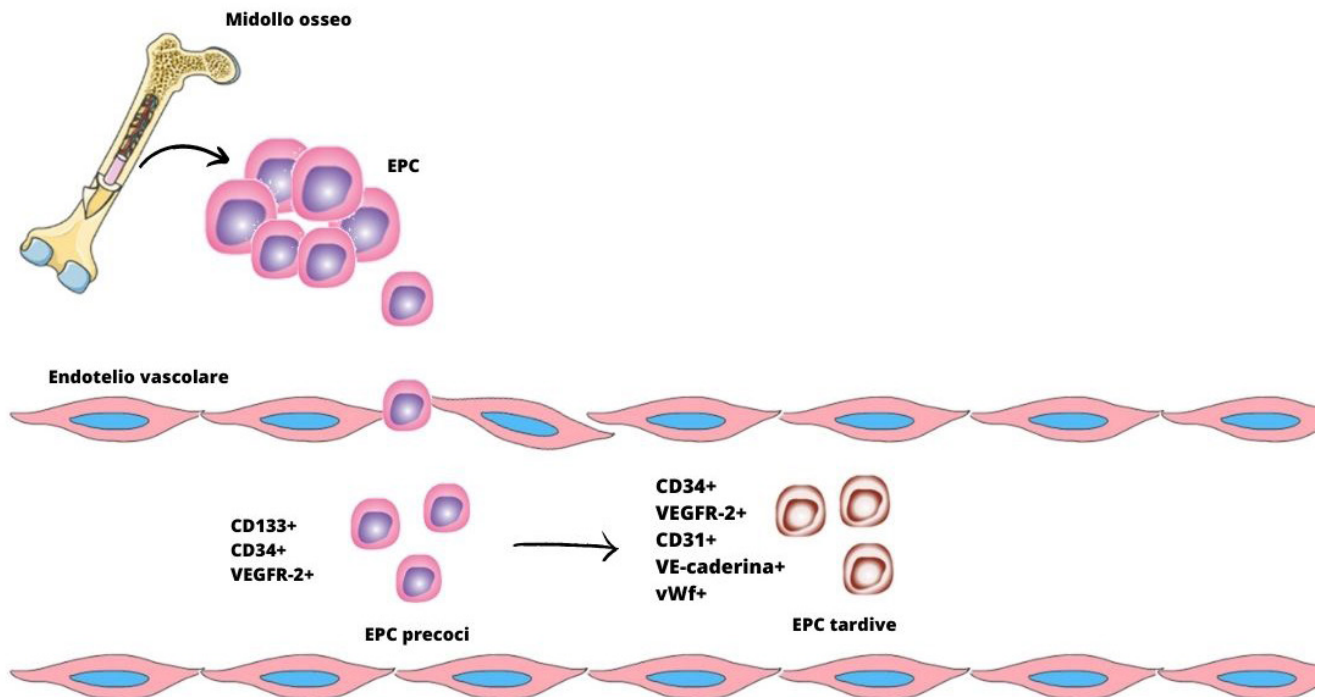
(21). Pertanto, un disequilibrio nei meccanismi di turnover endoteliale e una riduzione nella produzione e mobilitazione delle EPC potrebbero costituire i trigger che minano l'integrità dell'endotelio ed innescano l'aterogenicità del sistema vascolare a lungo termine (18). È stata osservata una correlazione tra i livelli circolanti di EPC e il grado di disfunzione endoteliale, al punto da definire la riduzione del numero di EPC come potenziale fattore predittivo di futuri eventi cardiovascolari (23).

#### **EPC: IDENTIFICAZIONE, CLASSIFICAZIONE E RECLUTAMENTO**

Le EPC sono state identificate per la prima volta nel 1997 da Asahara et al. come un sottogruppo di cellule mononucleate del sangue periferico con la capacità di differenziarsi in cellule endoteliali e di prendere parte ai processi di neoangiogenesi. Queste cellule sono caratterizzate da marcatori di linee ematopoietiche (CD34 e CD133) ed endoteliali (KDR, CD31 e vWf) (24-25). Esse derivano dal midollo osseo e possono essere mobilitate nella circolazione periferica in risposta a molti stimoli (26). Da un punto di vista funzionale le EPC condividono alcune proprietà tipiche sia delle cellule ematopoietiche che di quelle endoteliali. Una proprietà tipica delle cellule di origine ematopoietica è la loro capacità di dare origine ad unità formanti colonie (CFU), mentre la capacità di formare vasi capillari e produrre NO rientra nelle caratteristiche funzionali tipiche delle cellule endoteliali (27). Nel sangue periferico sono state identificate due sottopopolazioni di EPC: precoci e tardive (28). Le prime, quelle precoci, derivano dal midollo osseo e sono immediatamente immesse nel sistema circolatorio, si caratterizzano per i markers di superficie CD133/CD34/VEGFR-2, hanno una limitata capacità proliferativa e presentano un picco di crescita in terreni di coltura a 2-3 settimane. Le EPC tardive risultano invece positive ai markers CD34/VEGFR-2/CD31/VE-caderina e/o il fattore di von Willebrand (vWf); compaiono dopo 2-3 settimane di coltura e presentano una maggiore capacità proliferativa fino a 12 settimane (28) (Fig. 2).



**Figura 2** ♦ Rilascio e migrazione delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) in diversi stadi di maturazione a livello vascolare



Le EPC costituiscono le principali determinanti dei processi di omeostasi e riparazione endoteliale. La loro capacità di promuovere la rivascularizzazione di tessuti ischemici e danneggiati è stata esaminata sia in modelli animali che in cellule umane in coltura (29-30). Le EPC costituiscono un pool circolante di cellule in grado di formare un cerotto cellulare nei siti di lesione endoteliale, contribuendo così direttamente all'omeostasi e alla riparazione dell'endotelio vascolare. I livelli di EPC circolanti possono essere influenzati dall'età e dalla presenza di numerosi fattori di rischio cardiovascolari quali il fumo, la dislipidemia e il diabete. In particolare, è stato dimostrato che il numero e le proprietà funzionali delle EPC sono inversamente proporzionali ai fattori di rischio cardiovascolari (31).

Il rilascio di EPC dal midollo osseo è regolato da una varietà di fattori di crescita, enzimi, ligandi e recettori di superficie (32). La fase iniziale di attivazione delle EPC dipende dall'attività della metallo-proteinasi 9 (MMP-9) che favorisce la trasformazione del recettore di superficie (recettore di membrana Kit-mKitL) in recettore solubile (sKitL) (33). Topi con deficit di metallo proteinasi 9 (MMP9<sup>-/-</sup>) o trattati con inibitori di tale citochina mostrano una ridotta mobilitazione di EPC circolanti (34). L'attivazione della forma solubile del recettore è seguita dal distacco delle cellule progenitrici primarie cKit<sup>+</sup> dalle nicchie dello stroma del midollo osseo e dalla loro successiva migrazione verso la zona vascolare. Questa traslocazione attiva le cellule da uno stato quiescente ad uno stato proliferativo (35). Il VEGF, fattore di crescita endoteliale attivato anche da MMP-9, è considerato uno dei mediatori predominanti della mobilitazione delle EPC dal midollo osseo in seguito al danno tissutale (36-37). Molti altri fattori sono implicati nel processo di reclutamento, tutti attualmente utilizzati come agenti mobilizzanti di cellule staminali capaci di migliorarne anche la funzionalità; i più importanti sono costituiti dallo SDF-1 (ritenuto anche come il fattore che protegge le EPC dall'apoptosi), il fattore di crescita fibroblastico (FGF), il fattore di crescita placentare (PFC), l'eritropoietina e l'eNOS (38). L'assenza di quest'ultima nei modelli murini produce un deficit funzionale e numerico di cellule staminali endoteliali (34). Il rilascio in circolo di questi fattori, soprattutto il VEGF, può essere indotto da svariati stimoli, tra i quali il più potente è, come abbiamo visto, costituito dall'ischemia tissutale. I processi coinvolti nel reclutamento delle EPC sembrano essere simili a quelli del reclutamento di cellule staminali ematopoietiche (39). Le EPC stimulate verso la circolazione periferica si stabili-

scono, infatti, specificamente nei siti ischemici per stimolare processi di angiogenesi compensatoria. Una volta che le EPC sono state mobilitate dal midollo osseo alla circolazione periferica, iniziano a migrare verso l'area lesa attraverso un preciso processo di reclutamento definito "homing" (40). La direzione di questa migrazione è determinata secondo un gradiente di fattori angiogenici, come il VEGF-A, rilasciato dal tessuto ischemico. Le cellule arrivate in sede di danno possono partecipare alla rigenerazione vascolare e alla neovascolarizzazione (41). Entrambe le forme di EPC, precoci e tardive, contribuiscono ai processi di neovascolarizzazione in modi diversi. Le EPC precoci sembrano avere effetti paracrini attraverso il rilascio di citochine angiogeniche e proinfiammatorie (tra cui VEGF, HGF, fattore stimolante le colonie di granulociti macrofagi, MMP-9) (42) promuovendo l'angiogenesi, la sopravvivenza e la proliferazione di un numero maggiore di EPC dal midollo osseo al sito di danno endoteliale. D'altra parte, le EPC tardive producono una serie di segnali paracrini (ad es. MCP-1, IL-8 e MMP-2) (43) che favoriscono l'angiogenesi, e sembrano differenziarsi più velocemente in cellule endoteliali mature per essere successivamente incorporate nell'endotelio danneggiato (44). Dal momento che le EPC vengono reclutate soprattutto in risposta al danno vascolare, i livelli circolanti di queste cellule nel sangue periferico potrebbero essere utilizzati come biomarcatore di rischio cardiovascolare.

## LO STUDIO DELLE EPC

Per lo studio delle EPC vengono principalmente utilizzate due metodiche: la citofluorimetria e le colture cellulari. La citofluorimetria permette la misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o chimiche di cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto (45). La quantizzazione delle EPC mediante citofluorimetria si basa sull'uso di specifici anticorpi diretti contro antigeni di superficie, quali i marcatori di staminalità (es. CD34, CD133, CD117) e i marcatori endoteliali (es. KDR, CD31, VECAM) (46). Tuttavia, ad oggi, non esiste ancora una combinazione antigenica riconosciuta a livello internazionale in grado di definire i singoli fenotipi di EPC.

Lo studio delle EPC può avvenire anche mediante coltura cellulare in vitro. Le cellule mononucleate da sangue periferico, ottenute in seguito a centrifugazione mediante gradiente di densità con Ficoll-Paque, vengono lavate con PBS, seminate su piastre precedentemente coartate con fibronectina e coltivate in mezzo di crescita (FBS, VEGF e altri fattori di crescita). Tra i vari protocolli proposti, due sono i più importanti. Il primo consiste nel re-impiantare, dopo 48 ore, le cellule non adese in un terreno di fibronectina per 3 giorni. Questa procedura viene chiamata CFU-assay in riferimento alla capacità delle cellule di formare colonie CFU-EC (colony forming units-endothelial cells). L'altra procedura è più lunga, ha una durata di 14-28 giorni e consiste nel monitorare lo sviluppo e la morfologia delle cellule endoteliali cambiando il terreno ogni 2-3 giorni. Si può dedurre che la citofluorimetria venga utilizzata per quantificare il numero di cellule, la coltura cellulare per studiarne le caratteristiche funzionali (45). Ad ogni modo, la citofluorimetria risulta essere la tecnica maggiormente usata per la quantizzazione delle EPC nei trial clinici, anche se il fenotipo antigenico delle EPC circolanti è ancora molto dibattuto.

## EPCS E COMPLICANZE MACROVASCOLARI DEL DIABETE

Il diabete mellito è associato ad un aumentato rischio di disfunzione endoteliale e di malattie cardiovascolari (47). L'integrità dell'apparato vascolare è definita dall'equilibrio tra danno vascolare (conseguente alla disfunzione endoteliale) e riparazione endoteliale. Il diabete si associa ad una compromissione dei processi di riparazione del danno endoteliale e dei meccanismi di angiogenesi post-ischemica compensatoria. Esiste una forte correlazione tra i livelli circolanti di EPC, valutati mediante citofluorimetria, e lo spessore carotideo medio-intimale (CIMT), l'estensione del circolo collaterale coronarico e la funzione endoteliale, suggerendo l'importanza di queste cellule come potenziali biomarcatori di rischio cardiovascolare indipendente (48-49).

A conferma del ruolo protettivo indiretto delle EPC sul sistema cardiovascolare, una riduzione del loro numero è stata associata ad un aumento di incidenza di eventi cardiovascolari in diverse popolazioni, inclusi pazienti con diabete e sindrome metabolica (49-50). Uno studio condotto da Vasa et al., ha dimostrato che il numero e la funzione delle EPC

circolanti in pazienti con precedente malattia coronarica risultavano inversamente associate con i fattori di rischio cardiovascolare (51). Molti studi hanno mostrato che le EPC sono ridotte in numero e appaiono disfunzionali in pazienti con diabete di tipo 1 e 2. In particolare, sono stati osservati livelli circolanti di EPC del 30-50% più bassi negli individui con il diabete, rispetto a soggetti sani di pari età (52). La deplezione di EPC nel diabete sembra persistere per lungo tempo, ed è peggiore nei pazienti con complicanze avanzate del diabete. In uno studio su 51 pazienti con diabete di tipo 2 e 17 controlli sani, i livelli di CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> risultavano correlare negativamente con la gravità dell'arteriopatia periferica (PAD) (53). Inoltre, i pazienti con diabete e PAD mostravano ulteriore compromissione della funzione delle EPC rispetto ai pazienti senza PAD. Oltre ad una riduzione dei livelli circolanti, il diabete è associato anche ad una disfunzione delle EPC. Infatti, uno studio cross-sectional su 74 giovani con diabete di tipo 1 senza complicanze ha messo in evidenza anomalie della funzione endoteliale, un aumento dello spessore medio intimale e una riduzione della conta di EPC associati ad alti livelli di marcatori infiammatori e protrombotici (hsCRP, IL-6 e PAI-1), quando confrontati ai controlli sani (54). Inoltre, i livelli circolanti delle EPC CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> risultano già ridotti in giovani soggetti con diabete di tipo 1, quando confrontati ai controlli sani, soprattutto in quelli con controllo glicemico subottimale, una lunga durata di malattia e la presenza di segni iniziali di macroangiopatia (55). Questo conferma come anomalie dei meccanismi di riparazione endoteliale siano già comuni in giovani adulti con diabete di tipo 1 prima dello sviluppo di un danno vascolare clinicamente manifesto. Infine, suggerisce la possibilità di utilizzare la riduzione dei livelli circolanti di EPC come un potenziale nuovo approccio per identificare le persone con diabete a rischio di malattie cardiovascolari fin dalla giovane età.

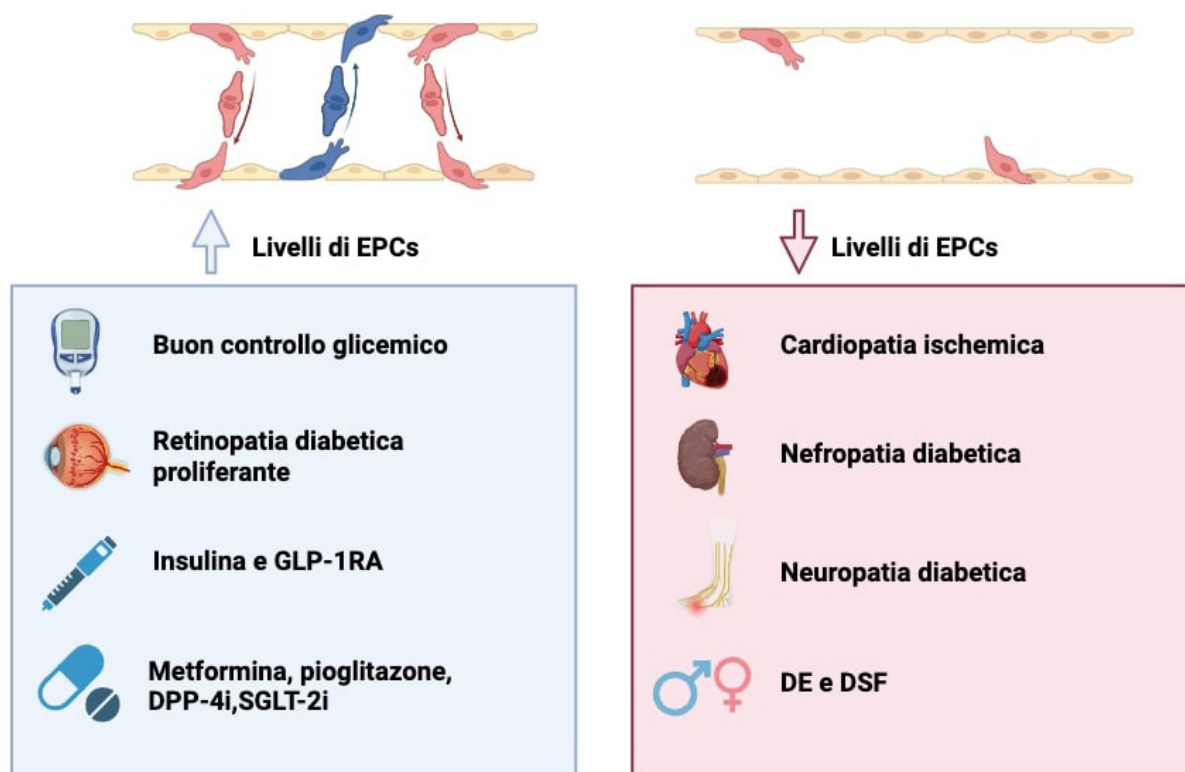
## **EPCS E COMPLICANZE MICROVASCOLARI DEL DIABETE**

Le complicanze microvascolari del diabete comprendono la retinopatia, la nefropatia e la neuropatia diabetica. Esse si sviluppano come conseguenza di danni strutturali e funzionali alla microcircolazione degli organi bersaglio. Le caratteristiche morfologiche tipiche includono ispessimento della membrana basale dei piccoli vasi, perdita di copertura pericitica, rarefazione capillare, eccesso di deposizione dei componenti della matrice extracellulare (ECM) con conseguente ridotta perfusione, alterazioni atrofiche e fibrosi (56). Tali complicanze possono interferire in modo significativo con la qualità di vita dei pazienti e contribuire alla maggiore morbilità e alla mortalità dei pazienti con diabete. Il diabete di tipo 2, infatti, è la principale causa di cecità e di amputazione non traumatica nel mondo. Anche se la patogenesi delle anomalie vascolari dipende largamente da un danno intracellulare innescato dall'iperglicemia e dallo stress ossidativo, la compromissione dei processi di riparazione endoteliale nel diabete, soprattutto attraverso la diminuzione dei pool e della migrazione di cellule rigenerative vascolari di derivazione midollare, potrebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo delle microangiopatie diabetiche (2). In uno studio osservazionale prospettico su una coorte di 187 pazienti affetti da diabete di tipo 2 seguiti per circa 4 anni, i soggetti con retinopatia o neuropatia, così come quelli con aterosclerosi asintomatica, mostravano livelli più bassi di EPC CD34<sup>+</sup> (precursori indifferenziati delle EPC) e di CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> rispetto a quelli senza complicanze (57). Inoltre, indipendentemente da fattori confondenti quali l'età, il sesso, il livello di HbA<sub>1c</sub> e la durata del diabete, bassi livelli delle cellule CD34<sup>+</sup> risultavano fattori predittivi indipendenti di esordio o della progressione della nefropatia, della retinopatia e della microangiopatia diabetica (57). Anche nel diabete di tipo 1 di lunga durata, i livelli circolanti di EPC sembrano correlare con il grado di complicanze, come mostrato nello studio sui pazienti con diabete di tipo 1 da almeno 50 anni, definiti come medalists del Joslin Diabetes Center (58). I medalists del Joslin Diabetes Center senza complicanze legate al diabete presentano infatti livelli normali di EPC circolanti, suggerendo quindi un importante ruolo dei livelli di EPC nello sviluppo delle complicanze microvascolari del diabete.

### **EPC e retinopatia diabetica**

L'iperglicemia altera la microcircolazione retinica provocando un aumento della permeabilità capillare, fuoriuscita di proteine dai vasi e una progressiva riduzione del flusso sanguigno nella retina. L'ischemia retinica e il rilascio di

**Figura 3** ◆ Condizioni associate ad una riduzione o ad un aumento dei livelli circolanti di EPC nel diabete



Abbreviazioni: DE, disfunzione erettile; DPP-4i, inibitori della dipeptidil-peptidasi 4; DSF, disfunzione sessuale femminile; GLP-1RA, analoghi recettoriali del glucagon-like peptide 1; SGLT-2i, inibitori del cotrasportatore di sodio-glucosio 2.

fattori angiogenici stimolano la formazione di nuovi vasi sanguigni e microaneurismi, con sviluppo e progressione della retinopatia diabetica (59). In condizioni di ipossia, le cellule retiniche rilasciano fattori neurotrofici che possono stimolare la mobilizzazione delle EPC e potenziano le loro caratteristiche angiogeniche (60). In uno studio osservazionale prospettico su pazienti con diabete di tipo 2 e PAD, la presenza di retinopatia avanzata o proliferativa era associata ad un maggior numero di cellule KDR<sup>+</sup> e ad un più alto potenziale clonogenico delle EPC in vitro (61). Allo stesso modo, Asnaghi et al. hanno messo in evidenza che le EPC di pazienti con diabete di tipo 1 con retinopatia proliferativa presentavano un maggiore potenziale clonogenico (62). Da queste premesse sembra che il ruolo delle EPCs sia diversificato nelle varie fasi della retinopatia diabetica, differendo notevolmente dalle altre complicanze del diabete. L'eccesso di EPC potrebbe contribuire ai processi di angiogenesi retinica patologica, come già mostrato in modelli sperimentali (Fig. 3). 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 (61). Sono necessari studi più ampi e di più lunga durata per meglio definire il ruolo delle EPC nella retinopatia avanzata.

#### **EPC e nefropatia diabetica**

Il diabete è una delle principali cause di insufficienza renale, che a sua volta costituisce un fattore prognostico sfavorevole per eventi cardiovascolari (63). Pazienti con insufficienza renale cronica presentano una riduzione dei livelli circolanti di EPC (64), sebbene non siano stati condotti studi specifici in pazienti con malattia renale cronica diabetica. Se da un lato non sono state evidenziate alterazioni nelle colture cellulari delle EPC di pazienti con diabete di tipo 1 con nefropatia rispetto a quelli senza (65), Dessapt et al. hanno trovato livelli più bassi di CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> in pazienti

con microalbuminuria rispetto a quelli senza (66). Infine, il trapianto di rene sembra in grado di ripristinare il pool di EPC endogene, dotate di maggiori proprietà angiogeniche (67). Infatti, le cellule renali sono disposte a produrre l'eritropoietina (EPO) e la dimetil arginina asimmetrica (ADMA) che possono influenzare i livelli di EPCs. Nei pazienti con malattia renale cronica, in particolare, l'ADMA si accumula e inibisce eNOS, riducendo così la biodisponibilità di NO e di conseguenza la mobilizzazione e la funzione delle EPC (68). Inoltre, nei pazienti con danno renale cronico, vi è una ridotta biodisponibilità di EPO che a sua volta riduce il numero e la funzione delle EPC (68). Inoltre, il fenotipo CD34<sup>+</sup> è risultato predittivo di progressione di albuminuria nel diabete di tipo 2 (69). Tali cellule potrebbero avere un ruolo nel rallentare la progressione della nefropatia diabetica e il loro livello può rappresentare un marker prognostico per la progressione di questa complicanza (69). La relazione tra sviluppo di nefropatia diabetica ed alterazioni nel numero di EPC necessita di ulteriori studi nel futuro.

### **EPC e neuropatia diabetica**

Nella neuropatia diabetica, l'iperglicemia impatta negativamente sulle cellule neurali causando una microangiopatia dei vasa nervorum. Le EPC sembrano svolgere un ruolo importante nell'omeostasi del microcircolo nei neuroni e nei nervi e il loro esaurimento o la loro disfunzione potrebbe accelerare la progressione della neuropatia diabetica. Non sono noti, al momento, studi clinici che hanno valutato la relazione tra EPC e neuropatia diabetica. Naruse et al. hanno dimostrato come l'iniezione intramuscolare di EPC derivate dal sangue del cordone ombelicale umano migliorava il supporto vascolare nervoso, ripristinando la velocità di conduzione del nervo sciatico e il flusso sanguigno in modelli murini con diabete di tipo 1 (70). Nella sindrome del piede diabetico, che è una complicanza tardiva del diabete, si osserva una riduzione della sintesi locale di VEGF e disfunzione endoteliale (71). Questi cambiamenti possono contribuire ad una risposta angiogenica anomala. L'angiogenesi compromessa porta all'ischemia tissutale. Una conseguenza dell'ischemia di lunga durata è lo sviluppo di ferite che non guariscono e nei casi più gravi necrosi, per i quali l'unica terapia efficace è l'amputazione (71). Questa è un'area di notevole interesse, tenuto conto che un approccio terapeutico con EPC potrebbe rappresentare un potenziale trattamento per la neuropatia diabetica (70, 72), che attualmente è una condizione molto disabilitante a lungo termine.

## **EPC E SESSUALITÀ**

### **EPC e disfunzioni sessuali femminili**

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) il benessere sessuale è uno stato di benessere fisico, emotivo, mentale e sociale in relazione alla vita sessuale (73). La sessualità nelle persone con diabete può essere interessata da problematiche o vere e proprie disfunzioni che ricadono sulla salute e sul benessere psichico del singolo individuo e della coppia. Le disfunzioni sessuali femminili (DSF) costituiscono un gruppo eterogeneo di disordini, caratterizzati da un disturbo clinicamente significativo che può verificarsi in una o più fasi della risposta sessuale nella donna. Il diabete, soprattutto quando non ben compensato ed associato ad altri fattori di rischio, sembra impattare negativamente sulla funzione sessuale femminile, influenzando significativamente la qualità della vita delle donne affette (74). Diverse evidenze scientifiche riportano una più alta prevalenza di DSF nelle donne con diabete rispetto alle donne sane. Di recente è stata messa in evidenza una riduzione dei livelli circolanti di EPC associata ad una peggiore funzione sessuale durante le tre fasi del ciclo mestruale in un gruppo di giovani donne con diabete di tipo 1, quando confrontate a donne di pari età sane (75). In particolare, livelli significativamente più bassi di cellule CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> nella fase ovulatoria e di cellule CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> nella fase ovulatoria e nella fase luteinica sono state osservate nelle donne diabetiche rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che la mobilizzazione ciclica delle EPC durante il ciclo mestruale che normalmente si osserva nelle donne sane è invece depressa nelle donne con diabete, anche nel contesto di una normale variazione ciclica degli ormoni ipofisari e ovarici circolanti. Infine, il numero di EPC risultava predittivo del punteggio finale del Female Sexual Function Index (FSFI), suggerendo per la prima volta una possibile relazione tra angiogenesi e funzione sessuale nelle giovani donne in età fertile. Resta da

chiarire se queste disfunzioni possano essere correlate all'aumento del rischio cardiovascolare delle giovani donne con diabete di tipo 1 (75).

### **EPC e disfunzione erettile**

La disfunzione erettile (DE) rappresenta la forma più frequente di disfunzione sessuale maschile ed è definita come la persistente incapacità di raggiungere o mantenere l'erezione del pene per un rapporto sessuale di successo (76). In questo contesto i livelli circolanti di EPC potrebbero essere coinvolti nei meccanismi che associano il diabete alla DE, in quanto la loro diminuzione nel sangue periferico può rappresentare un segno precoce di disfunzione endoteliale (77). Soggetti con diabete di tipo 2 e DE presentano, infatti, una ridotta riserva di EPC ed un'alterazione della loro funzione endoteliale (78). Anche nell'ambito del diabete di tipo 1 sono stati osservati ridotti livelli di EPC in soggetti con DE rispetto a controlli sani di pari sesso ed età. In particolare, uno studio cross-sectional su 118 pazienti con diabete di tipo 1 ha messo in evidenza una conta significativamente inferiore di cellule CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> nei pazienti con DE rispetto a pazienti diabetici di pari età senza DE (79). Inoltre, i livelli circolanti di EPC CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> e di quelle CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> mostravano una correlazione positiva con i livelli di testosterone e lo score totale dell'IIEF-5, suggerendo che i livelli circolanti di queste cellule possono avere un ruolo importante nella funzione sessuale maschile nel diabete di tipo 1 ed un loro basso livello possa essere espressione di lesione endoteliale precoce. Inoltre, sia gli studi clinici che quelli pre-clinici suggeriscono che gli androgeni regolano la funzione endoteliale e svolgono un ruolo importante nello sviluppo e maturazione delle EPC (80). La correlazione positiva tra i livelli di testosterone e le EPC dimostrata in questo studio può fornire un'ulteriore prova del coinvolgimento degli androgeni nel mantenimento della funzione endoteliale e nel meccanismo di riparazione vascolare, ma sono necessarie ulteriori ricerche per comprendere i meccanismi con cui il testosterone regola l'omeostasi vascolare.

### **CONTROLLO GLICEMICO E TERAPIA DEL DIABETE**

È ormai noto che per prevenire le complicanze micro e macrovascolari, un controllo glicemico ottimale è assolutamente necessario e auspicabile nei pazienti con diabete (81). L'iperglicemia è un importante fattore di rischio per disfunzione endoteliale e per lo sviluppo di aterosclerosi (82). Tuttavia, i primi segni di disfunzione endoteliale possono iniziare già nelle prime fasi della patologia, in pazienti con normale glicemia a digiuno ma ridotta tolleranza ai carboidrati. Infatti, la riduzione dei livelli circolanti di CD34<sup>+</sup> (il fenotipo più "precoce" di EPC) e di CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> è stata dimostrata già in fase precoce nella storia naturale del diabete in soggetti con ridotta tolleranza ai carboidrati sottoposti ad un carico orale con 75 g di glucosio (OGTT) (83). Inoltre, l'esposizione prolungata e ripetuta ad alti livelli di glicemia dopo 1 ora dal pasto costituisce un fattore di rischio per la progressione di placche ateromasiche e malattia cardiovascolare (84). Lo stato di infiammazione e di scarso compenso glicemico indotto dall'iperglicemia, soprattutto se per lungo tempo, possono influenzare negativamente la salute dell'endotelio, determinando così un aumento del rischio di malattia cardiovascolare (22).

In particolare, una correlazione inversa tra i valori di glicemia o HbA<sub>1c</sub> e i livelli di EPC è stata osservata nei pazienti con diabete (85). Allo stesso tempo, diversi studi, in prevalenza osservazionali, hanno mostrato che un miglioramento del controllo glicemico era associato ad un incremento dei progenitori cellulari. Il miglioramento dei valori glicemici può addirittura riportare i livelli di EPC verso i valori normali, purché venga effettuato in maniera costante per almeno 6 mesi (86). In particolare, il miglioramento del controllo glicemico in vivo risultava associato ad un aumento dei livelli di EPC e ad un miglioramento della loro funzionalità, con una forte correlazione tra diminuzione di HbA<sub>1c</sub> e miglioramento della capacità funzionale (87). Questi risultati sono stati confermati in uno studio osservazionale longitudinale su 190 bambini con diabete di tipo 1 e 34 controlli sani, in cui la riduzione dei livelli di HbA<sub>1c</sub> correleva con l'aumento delle EPC (55). Tuttavia, al fine di prevenire il danno vascolare, è importante non solo ridurre i livelli di HbA<sub>1c</sub>, ma anche prevenire e migliorare la variabilità glicemica che è espressione dell'andamento delle medie della glicemia, in termini di frequenza ed ampiezza delle relative oscillazioni. In uno studio osservazionale prospettico di

6 mesi condotto su 106 pazienti con diabete di tipo 1, l'uso della terapia insulinica intensiva mediante microinfusore, risultava associata ad una riduzione dei principali indici di variabilità glicemica e ad un aumento dei livelli di EPC, rispetto alla terapia insulinica multi-iniettiva (88). Il miglioramento dei principali indici di variabilità glicemica, testimoniato da una riduzione del MAGE e della deviazione standard, e l'aumento dei livelli circolanti di cellule EPC è stato ulteriormente confermato nel follow-up di 2 anni nella stessa casistica di pazienti (89). L'ottimizzazione della gestione clinica del controllo glicemico e dei principali indici di variabilità glicemica nei pazienti con diabete costituisce il primo passo per salvaguardare la salute endoteliale e migliorare il numero e il potenziale angiogenico delle EPC (90).

### **Metformina e EPC**

Secondo le linee guida nazionali ed internazionali, la metformina costituisce il farmaco di prima scelta per il trattamento del diabete di tipo 2. Il suo uso è stato associato ad un miglioramento del controllo glicemico e dei livelli circolanti di progenitori endoteliali. In uno studio su 47 pazienti con diabete di tipo 2, l'uso di metformina e glicazide era associato ad un miglioramento nel numero e nella funzione delle EPC circolanti CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> (91). Tale reperto è stato ulteriormente confermato anche in soggetti con diabete di nuova diagnosi, in cui l'uso della metformina per 16 settimane induceva un notevole aumento dello stesso fenotipo di EPC (92). Infine, un trattamento volto a correggere più fattori di rischio cardiovascolare comprendente metformina, statine, aspirina e bloccanti del recettore dell'angiotensina per 90 giorni si è dimostrato efficace nel determinare un aumento del numero di EPC rispetto ai soggetti non sottoposti a terapia (93). Diversi meccanismi potrebbero essere alla base delle proprietà positive della metformina sul numero e la funzionalità delle EPC: in primis l'aumento della produzione e della biodisponibilità di NO. I pazienti con diabete hanno una ridotta espressione di eNOS e un ridotto rilascio di NO (94). Aumentare la biodisponibilità di NO può migliorare la sopravvivenza e la funzione delle EPC (94). In uno studio di Chakraborty et al., il trattamento con metformina in una casistica di pazienti affetti da diabete di tipo 2 mostrava un aumento del livello di NO (95). Inoltre, la metformina sembra ridurre lo stress ossidativo. Quest'ultimo gioca un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza delle EPC. Le EPC di soggetti sani mostrano, infatti, una maggiore espressione degli enzimi antiossidanti intracellulari quali catalasi, glutatione perossidasi e superossido dismutasi rispetto alle EPC di pazienti con diabete (96). Questo suggerisce che le EPC nei pazienti diabetici siano più suscettibili allo stress ossidativo (96). È stato dimostrato che la metformina riduce i marcatori dello stress ossidativo nei pazienti con diabete di tipo 2 (97).

### **Sulfaniluree ed EPC**

Le sulfaniluree sono agenti ipoglicemizzanti molto efficaci, ampiamente utilizzati nel passato per i pazienti con diabete di tipo 2, tuttavia, sono associate ad aumentato rischio di ipoglicemie. Pochi studi hanno valutato l'effetto del trattamento con sulfaniluree sulle EPC circolanti. Uno studio condotto su 33 soggetti con diabete di tipo 2 di nuova diagnosi, in seguito a trattamento con gliclazide per 12 settimane ha rilevato un significativo aumento del numero di EPC circolanti (CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>). Non è chiaro se questo sia un effetto diretto del farmaco o solo una conseguenza del miglioramento del controllo glicemico (98).

### **Pioglitazone ed EPC**

Il trattamento con l'agonista recettoriale PPAR- $\gamma$  pioglitazone, appartenente alla classe dei tiazolidinedioni, può modulare l'espressione di diversi geni, coinvolti nei processi di gluco- e lipotossicità (99). In un modello murino di diabete di tipo 2, il trattamento con pioglitazone sembra aumentare le EPC circolanti, diminuire l'apoptosi delle EPC in vitro e aumentare la neoangiogenesi (100). Negli studi clinici l'uso del pioglitazone risulta più efficace della metformina nell'aumentare i livelli di EPC, in particolare il fenotipo CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>, e la loro migrazione dopo due mesi di trattamento, un effetto questo probabilmente indipendente dal controllo glicemico (101). Inoltre, in uno studio condotto su 14 soggetti con ridotta tolleranza al glucosio il pioglitazone ha mostrato di migliorare la vitalità delle EPC in vitro (102). L'effetto benefico del pioglitazone sulle EPC può dipendere in parte dall'aumentata produzione di NO (103). Inoltre, l'attivazione di PPAR- $\gamma$  induce la riprogrammazione dei macrofagi verso il fenotipo anti-infiammatorio, favorendo

così la mobilitazione di cellule staminali ed EPC nel torrente circolatorio (104-105). È stato inoltre dimostrato che il trattamento con pioglitazone aumenta l'adiponectina che ha effetti antinfiammatori (106), aumenta l'attività delle telomerasi, le proteine stabilizzanti i telomeri e riduce l'espressione dei markers di senescenza delle EPC (107).

### **Incretine ed EPC**

La classe delle incretine è ampiamente utilizzata per il trattamento del diabete di tipo 2. Essa comprende gli analoghi recettoriali del GLP-1 (GLP-1RA) e gli inibitori della dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-4i). Un esiguo numero di studi ha dimostrato l'abilità di alcuni DPP-4i di aumentare i livelli di progenitori cellulare in soggetti con diabete. In particolare, sitagliptin e vildagliptin sono risultati più efficaci di glimepiride e glibenclamide, rispettivamente, nel migliorare i livelli delle EPC, aumentando l'espressione della CXCL12, chemochina utile nei meccanismi di reclutamento delle EPC (108-109). Inoltre, la combinazione terapeutica di saxagliptin e metformina è risultata associata ad un aumento funzionale delle EPC circolanti CD34<sup>+</sup> ed un miglioramento dei parametri metabolici, della funzione renale, della rigidità arteriosa e della pressione arteriosa sistolica in una casistica di 21 pazienti con diabete di tipo 2 (110). Per quanto riguarda gli effetti dei GLP-1RA sulla salute endoteliale, i dati sono ancora limitati, ma molto promettenti. In esperimenti in vitro, il trattamento con GLP-1 sembra migliorare la capacità di proliferazione e differenziazione dei fenotipi di EPC CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> (111). Inoltre, la somministrazione del GLP-1 sembra ridurre la senescenza delle cellule endoteliali indotta da specie reattive dell'ossigeno (112). Negli uomini, la terapia con dulaglutide per 12 settimane apportava un miglioramento nel numero e nella funzione delle EPC CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> rispetto alla sola metformina, in un trial condotto su 60 pazienti con diabete di tipo 2 (113). Gli effetti benefici dei GLP-1RA sulle EPC rispetto alla metformina, è confermato anche da un recente studio cross-sectional condotto su 154 soggetti con diabete di tipo 2 in cui gli individui trattati con liraglutide o dulaglutide da almeno 12 mesi mostravano un maggiore numero dei fenotipi di EPC CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>, e CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> rispetto a quelli trattati con metformina (114). Inoltre, il numero delle cellule CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> risultava fattore predittivo indipendente di score più alti ai test cognitivi (114). Diversi meccanismi possono essere coinvolti negli effetti benefici dei GLP-1RA e DPP-4i sul numero e la funzione delle EPC. Il GLP-1 sembra stimolare la produzione di NO, ridurre i pathway infiammatori e migliorare lo stress ossidativo (115). La somministrazione di GLP-1RA durante un pasto in soggetti con diabete di tipo 2 ha ridotto i principali marcatori di stress ossidativo (116). Tali proprietà antinfiammatorie e antiossidanti degli agonisti del GLP-1 e degli inibitori della DPP-4 possono contribuire ad aumentare la sopravvivenza e la funzione delle EPC.

### **SGLT-2i ed EPC**

Gli inibitori del cotrasportatore sodio glucosio (SGLT-2i) sono farmaci innovativi per il miglioramento del controllo glicemico, promuovendo l'escrezione urinaria di glucosio. SGLT-2 è espresso soprattutto a livello renale. Le evidenze sugli effetti degli SGLT-2i sulle EPC sono ancora molto limitate. Il trattamento con SGLT-2 per almeno 6 mesi comporta un miglioramento del controllo glicemico ed un aumento dei livelli di EPC, potenziando l'espressione di aldeide deidrogenasi, enzima dotato di proprietà benefica sui vasi (117). Ad ogni modo le evidenze sono ancora esigue e i meccanismi ancora poco conosciuti (118).

### **Insulina ed EPC**

L'insulina costituisce il farmaco di scelta nel diabete di tipo 1 e una delle strategie terapeutiche nel diabete di tipo 2. Gli effetti dell'insulina sulle EPC derivano soprattutto da studi preclinici e alcuni studi clinici, e sono alquanto contrastanti. Il trattamento con insulina in modelli animali con diabete di tipo 1 era associato ad un miglioramento della mobilitazione e della funzione delle EPC (119). Tuttavia, la somministrazione di insulina in modelli murini non mostrava alcun effetto sulla produzione e mobilitazione di EPC dal midollo osseo (120). Studi in vitro hanno riportato che le EPC CD34<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>, isolate da sangue periferico di soggetti con diabete di tipo 2, trattate per 6 giorni con insulina mostravano un aumento della mobilitazione, della produzione di NO e della capacità di formare colonie (121-122).



Inoltre, la terapia con insulina glargine o insulina NPH per 4 mesi aumentava significativamente la differenziazione ex vivo delle EPC nei pazienti con diabete di tipo 2, rispetto al trattamento ipoglicemizzante orale (123). L'insulina potrebbe avere effetti benefici sulle EPC, stimolando la produzione di NO, migliorando i markers di stress ossidativo e il controllo glicemico dei pazienti con diabete (124).

## CONCLUSIONI

Il diabete è una patologia metabolica cronica associata ad un aumentato rischio cardiovascolare. Lo stato di cronica (o persistente) iperglicemia induce l'espressione di molte chemochine e interleuchine infiammatorie, aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno, riduce la disponibilità di NO, risultando in uno stato di disfunzione endoteliale a livello vascolare. L'alterazione dell'omeostasi endoteliale, in cui i meccanismi di danno non sono adeguatamente compensati dall'attivazione dei processi di riparo sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo delle complicanze del diabete. Le EPC sono cellule di derivazione ossea deputate al mantenimento della salute endoteliale, vasculogenesi e riparo endoteliale. Soggetti con diabete di tipo 1 e 2 presentano ridotti livelli di EPC e alterazioni nella loro funzione. In questo contesto, le EPC potrebbero avere un ruolo patogenetico nello sviluppo delle complicanze micro e macrovascolari, così come nelle disfunzioni sessuali nel diabete. Il miglioramento del controllo glicemico e della variabilità glicemica sembrano impattare positivamente sul numero e la funzionalità delle EPC. Molti farmaci normalmente usati nella terapia del diabete sembrano capaci di migliorare il numero e/o la funzionalità delle EPC. Ulteriori studi clinici di maggiore durata e su casistiche più ampie sono necessari per meglio esaminare i meccanismi di legame tra salute endoteliale e diabete mellito.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brøns C, Grunnet LG. Mechanisms in endocrinology: Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: a causal mechanism or an innocent bystander?. *Eur J Endocrinol* 176: R67-R78, 2017.
2. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, et al. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* 34(Suppl 2): S285-S290, 2011.
3. McEwen LN, Karter AJ, Waitzfelder BE, et al. Predictors of mortality over 8 years in type 2 diabetic patients: Translating Research Into Action for Diabetes (TRIAD). *Diabetes Care* 35(6): 1301-1309, 2012.
4. Marx, Nikolaus et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes. *European heart journal*, ehad192. 25 Aug. 2023.
5. Secrest AM, Washington RE, Orchard TJ. Mortality in Type 1 Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, et al. eds. *Diabetes in America*. 3rd ed. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (US); August 2018.
6. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, et al. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes* 59: 3216-3222, 2010.
7. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.
8. Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D, Esposito K. Cooling down inflammation in type 2 diabetes: how strong is the evidence for cardiometabolic benefit?. *Endocrine* 55: 360-365, 2017.
9. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 108: 1527-1532, 2003.
10. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation* 109: 1750-1755, 2004.
11. Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res* 79: 193-199, 2010.
12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874, 2002.
13. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb* 25(1): 27-39, 2018.

14. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?. *Int J Mol Sci* 20: 3775, 2019.
15. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85: 342-350, 2001.
16. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, et al. Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98: 17-24, 1998.
17. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117: 2417-2426, 2004.
18. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, et al. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1728-1730, 2002.
19. Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4748-4753, 2000.
20. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858-864, 2004.
21. Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, et al. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia* 45: 1172-1181, 2002.
22. Fadini GP. A reappraisal of the role of circulating (progenitor) cells in the pathobiology of diabetic complications. *Diabetologia* 57: 4-15, 2014.
23. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999-1007, 2005.
24. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
25. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. Characterization of endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1-2, 2005.
26. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension* 45: 321-325, 2005.
27. Quirici N, Soligo D, Caneva L, et al. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115: 186-194, 2001.
28. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 93: 1023-1025, 2003.
29. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87: 728-730, 2000.
30. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8: 498-508, 2004.
31. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593-600, 2003.
32. Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 11: 18-25, 2007.
33. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185-1189, 2003.
34. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370-1376, 2003.
35. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637, 2002.
36. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Endothelial Progenitors in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1263: 85-115, 2020.
37. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 176: 1248-1264, 2019.

38. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor<sub>1</sub> effects on ex-vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107: 1322-1328, 2003.
39. Pitchford SC, Furze RC, Jones CP, et al. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 4, 62-72, 2009.
40. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, et al. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362-1368, 2002.
41. Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228, 1999.
42. Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP et al. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1675-H1682, 2009.
43. Yoon CH, Hur J, Park KW et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 112: 1618-1627, 2005.
44. Spring H, Schüler T, Arnold B, et al. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18111-18116, 2005.
45. 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.
46. Longo M, Di Meo I, Caruso P, et al. Circulating levels of endothelial progenitor cells are associated with better cognitive function in older adults with glucagon-like peptide 1 receptor agonist-treated type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 200: 110688, 2023.
47. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 34: 2436-2443, 2013.
48. Tokgozoglu L, Yorgun H, Gurses KM, et al. The association between circulating endothelial progenitor cells and coronary collateral formation. *Atherosclerosis* 219: 851-854, 2011.
49. Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. *PLoS* 5: e11488, 2010.
50. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Agostini C et al. Low CD34<sup>+</sup> cell count and metabolic syndrome synergistically increase the risk of adverse outcomes. *Atherosclerosis* 207: 213-219, 2009.
51. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: E1-E7, 2001.
52. Fadini GP, Ciciliot S, Albiero M. Concise Review: Perspectives and Clinical Implications of Bone Marrow and Circulating Stem Cell Defects in Diabetes. *Stem Cells* 35: 106-116, 2017.
53. 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.
54. Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 52: 1464-1473, 2009.
55. Hortenhuber T, Rami-Mehar B, Satler M et al. Endothelial progenitor cells are related to glycemic control in children with type 1 diabetes over time. *Diabetes Care* 36: 1647-1653, 2013.
56. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625, 2005.
57. Rigato M, Bittante C, Albiero M, et al. Circulating Progenitor Cell Count Predicts Microvascular Outcomes in Type 2 Diabetic Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 100: 2666-2672, 2015.
58. Hernandez SL, Gong JH, Chen L, et al. Characterization of circulating and endothelial progenitor cells in patients with extreme-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care* 37: 2193-2201, 2014.
59. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 49: 3075-3084, 2006.

60. Liu X, Li Y, Liu Y, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) mobilized and activated by neurotrophic factors may contribute to pathologic neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 176: 504-515, 2010.
61. Fadini GP, Sartore S, Baesso I, et al. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 29: 714-716, 2006.
62. Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia* 49: 1109-1111, 2006.
63. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 356: 147-152, 2000.
64. Choi JH, Kim KL, Huh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1246-1252, 2004.
65. Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M et al. Endothelial progenitor cells in long-standing asymptomatic type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 118: c309-c314, 2011.
66. Dessapt C, Karalliedde J, Hernandez-Fuentes M et al. Circulating vascular progenitor cells in patients with type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 33: 875-877, 2010.
67. Herbrig K, Gebler K, Oelschlaegel U, et l. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 6: 2922-2928, 2006.
68. Thum T, Tsikas D, Stein S, 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* 46: 1693-1701, 2005.
69. 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.
70. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, et al. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 54: 823-1828, 2005.
71. Drela E, Stankowska K, Kulwas A, Rość D. Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome. *Adv Clin Exp Med* 21: 249-254, 2012.
72. Jeong JO, Kim MO, Kim H et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation* 119: 699-708, 2009.
73. WHO, 2006; Convened International Technical Consultation on Sexual Health, p. 4, chapter 3.
74. Basson R, Berman J, Burnett A, et al. Report of the international consensus development conference on female sexual dysfunction: definitions and classifications. *J Urol* 163: 888-893, 2000.
75. Maio A, Maiorino MI, Longo M, et al. Change in Circulating Levels of Endothelial Progenitor Cells and Sexual Function in Women With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 18; 107: e3910-e3918, 2022.
76. NIH Consensus Conference. Impotence. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA* 270: 83-90, 1993.
77. Dimmeler S, Zeiher AM, Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med* 82: 671-677, 2004.
78. Murata M, Tamemoto H, Otani T, et al. Endothelial impairment and bone marrow-derived CD34(+)/133(+) cells in diabetic patients with erectile dysfunction. *J Diabetes Investig* 3: 526-533, 2012.
79. Maiorino MI, Bellastella G, Petrizzo M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in type 1 diabetic patients with erectile dysfunction. *Endocrine* 49: 415-421, 2015.
80. Foresta C, Zuccarello D, De Toni L et al. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Clin Endocrinol* 68: 284-289, 2008.
81. König M, Lamos EM, Stein SA, Davis SN. An insight into the recent diabetes trials: what is the best approach to prevent macrovascular and microvascular complications? *Curr Diabetes Rev* 9: 371-381, 2013.
82. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963-974, 2000.
83. Fadini GP, Pucci L, Vanacore R, et al. Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia* 50: 2156-2163, 2007.
84. Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation* 120: 1266-1286, 2009.

85. Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A, Fadini GP: Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors* 38: 194-202, 2012.
86. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Mariano V et al. Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: a randomized crossover trial comparing detemir versus glargine. *Diabetes Obes Metab* 13: 718-725, 2011.
87. Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, et al. Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord* 10: 5, 2010.
88. Maiorino MI, Casciano O, Della Volpe E, et al. Reducing glucose variability with continuous subcutaneous insulin infusion increases endothelial progenitor cells in type 1 diabetes: an observational study. *Endocrine* 52: 244-252, 2016.
89. Longo M, Scappaticcio L, Bellastella G, et al. Alterations in the Levels of Circulating and Endothelial Progenitor Cells Levels in Young Adults with Type 1 Diabetes: A 2-Year Follow-Up from the Observational METRO Study. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13: 777-784, 2020.
90. Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes. *Pharmacol Ther* 170: 98-115, 2017.
91. Chen LL, Liao YF, Zeng TS, et al. Effects of metformin plus gliclazide compared with metformin alone on circulating endothelial progenitor cell in type 2 diabetic patients. *Endocrine* 38: 266-275, 2010.
92. Liao YF, Chen LL, Zeng TS, et al. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. *Vasc Med* 15: 279-285, 2010.
93. Reinhard H, Jacobsen PK, Lajer M, et al. Multifactorial treatment increases endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 53: 2129-2133, 2010.
94. Hamed S, Brenner B, Roguin A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. *Cardiovasc Res* 91: 9-15, 2011.
95. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* 93: 56-62, 2011.
96. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, et al. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2021-2027, 2004.
97. Skrha J, Prázný M, Hilgertová J, et al. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 63: 1107-1114, 2007.
98. Chen LL, Yu F, Zeng TS, et al. Effects of gliclazide on endothelial function in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 659: 296-301, 2011.
99. Betteridge DJ. CHICAGO, PERISCOPE and PROactive: CV risk modification in diabetes with pioglitazone. *Fundam Clin Pharmacol* 23: 675-679, 2009.
100. Gensch C, Clever YP, Werner C, et al. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 192: 67-74, 2007.
101. Wang CH, Ting MK, Verma S, et al. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 152: 1051.e1-1051.e10518, 2006.
102. Spigoni V, Picconi A, Cito M, et al. Pioglitazone improves in vitro viability and function of endothelial progenitor cells from individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One* 7: e48283, 2012.
103. Yu X, Chen P, Wang H, et al. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction in those with impaired glucose regulation among the first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Med Princ Pract* 22: 156-160, 2013.
104. Agarwal R. Anti-inflammatory effects of short-term pioglitazone therapy in men with advanced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F600-F605, 2006.
105. Mori Y, Itoh Y, Obata T, et al. Effects of pioglitazone vs glibenclamide on postprandial increases in glucose and triglyceride levels and on oxidative stress in Japanese patients with type 2 diabetes. *Endocrine* 29: 143-148, 2006.
106. Esposito K, Maiorino MI, Di Palo C, et al. Effects of pioglitazone versus metformin on circulating endothelial microparticles and progenitor cells in patients with newly diagnosed type 2 diabetes--a randomized controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 13: 439-445, 2011.

107. Werner C, Gensch C, Pöss J, et al. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis. *Atherosclerosis* 216: 23-34, 2011.
108. Fadini GP, Boscaro E, Albiero M et al. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes Care* 33: 1607-1609, 2010.
109. Dei Cas A, Spigoni V, Cito M et al. Vildagliptin, but not glibenclamide, increases circulating endothelial progenitor cell number: a 12-month randomized controlled trial in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16: 27, 2017.
110. Dore FJ, Domingues CC, Ahmadi N, et al. The synergistic effects of saxagliptin and metformin on CD34+ endothelial progenitor cells in early type 2 diabetes patients: a randomized clinical trial. *Cardiovasc Diabetol* 17: 65, 2018.
111. Xiao-Yun X, Zhao-Hui M, Ke C, et al. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation. *Med Sci Monit* 17: BR35-BR41, 2011.
112. Oeseburg H, de Boer RA, Buikema H, et al. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1407-1414, 2010.
113. Xie D, Li Y, Xu M, et al. Effects of dulaglutide on endothelial progenitor cells and arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 21: 200, 2022.
114. Longo M, Di Meo I, Caruso P, et al. Circulating levels of endothelial progenitor cells are associated with better cognitive function in older adults with glucagon-like peptide 1 receptor agonist-treated type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 200: 110688, 2023.
115. Chai W, Dong Z, Wang N, et al. Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism. *Diabetes* 61: 888-896, 2012.
116. Ceriello A, Esposito K, Testa R, et al. The possible protective role of glucagon-like peptide 1 on endothelium during the meal and evidence for an “endothelial resistance” to glucagon-like peptide 1 in diabetes. *Diabetes Care* 34: 697-702, 2011.
117. Hess DA, Terenzi DC, Trac JZ et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin increases circulating provascular progenitor cells in people with type 2 diabetes mellitus. *Cell Metab* 30: 609-613, 2019.
118. Fadini GP: SGLT-2 inhibitors and circulating progenitor cells in diabetes. *Cell Metab* 31: 883, 2020.
119. Dong L, Kang L, Ding L, et al. Insulin modulates ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization and neovascularization in diabetic mice. *Microvasc Res* 82: 227-236, 2011.
120. Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117: 1249-1259, 2007.
121. Humpert PM, Djuric Z, Zeuge U, et al. Insulin stimulates the clonogenic potential of angiogenic endothelial progenitor cells by IGF-1 receptor-dependent signaling. *Mol Med* 14: 301-308, 2008.
122. Hamed S, Brenner B, Aharon A, et al. Nitric oxide and superoxide dismutase modulate endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 8: 56, 2009.
123. Oikonomou D, Kopf S, von Bauer R, et al. Influence of insulin and glargine on outgrowth and number of circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes patients: a partially double-blind, randomized, three-arm unicenter study. *Cardiovasc Diabetol* 13: 137, 2014.
124. Siegelhaar SE, Kulik W, van Lenthe H, et al. A randomized clinical trial comparing the effect of basal insulin and inhaled mealtime insulin on glucose variability and oxidative stress. *Diabetes Obes Metab* 11: 709-714, 2009.