



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI  
*Dipartimento di Scienze Cardiovascolari e Neurologiche*

**CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI**  
*Ciclo XXI*

**Aggiornamento tecnologico in clinica  
e diagnostica cardiovascolare:**  
*significato fisiopatologico dei progenitori delle  
cellule endoteliali*

Relatore:  
*prof. Giuseppe Mercurio*

Tesi di dottorato del  
*dott. Francesco Pelliccia*

Anno accademico 2007/2008

## INDICE

- La rivoluzione delle cellule staminali.....Pag. 3
- Progenitori delle cellule endoteliali circolanti (EPC).  
.....Pag. 13
  - *EPC: lo stato dell'arte*.....Pag. 13
  - *EPC: come si identificano 'in vivo'*.....Pag.19
  - *Cuore e EPC*.....Pag.31
- TEMA DI RICERCA 1: Studio delle alterazioni dei progenitori delle cellule endoteliali nella cardiopatia ischemica.....Pag. 37
  - *EPC e cardiopatia ischemica: influenza dell'età*.....Pag. 42
  - *EPC e differenze correlate al genere*..... Pag. 51
  - *EPC nell'insufficienza cardiaca di origine ischemica*.....Pag. 58
- TEMA DI RICERCA 2: Restenosi post-angioplastica versus progressione dell'aterosclerosi coronarica: studio del ruolo fisiopatologico dei progenitori delle cellule endoteliali.....Pag. 65
- TEMI DI RICERCA 3: Effetti del blocco farmacologico dei recettori dell'angiotensina II sulle sottopopolazioni di progenitori delle cellule endoteliale.....Pag. 94
- Prospettive future.....Pag.106
- Bibliografia.....Pag.107

## La rivoluzione delle cellule staminali

Una cellula staminale è una cellula del tutto indifferenziata, capace di proliferare per tempi indefiniti, in grado di dare origine a cellule esattamente identiche a se stessa (*self renewal*) e contemporaneamente ad una progenie di tipi cellulari variamente differenziati.

Tradizionalmente il concetto di staminalità è stato associato all'embrione, che per definizione è formato da cellule ancora indifferenziate, destinate a proliferare enormemente e a generare una molteplicità di tipi cellulari distinti.

In realtà, questa visione della staminalità limitata alle cellule dell'embrione appare oggi alquanto restrittiva, in quanto ci stiamo convincendo che molti tessuti degli organismi adulti contengono una o più popolazioni di cellule per molti aspetti simili alle cellule staminali dell'embrione che, pertanto, vengono chiamate cellule staminali dell'adulto.

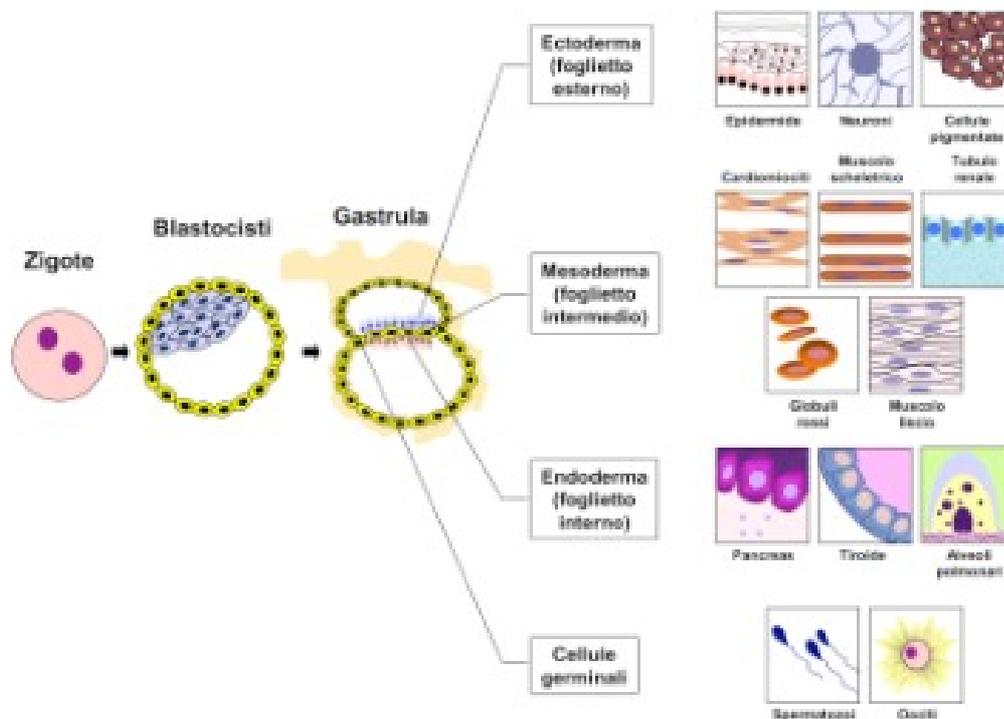
### Le cellule staminali embrionali

L'embrione è formato da un numero esiguo di cellule, in grado di esprimere un vastissimo potenziale di differenziamento, in grado di generare un intero organismo, composto da più di 200 tipi cellulari. In base a questa proprietà le cellule staminali embrionali vengono definite totipotenti. In realtà, sin dalle prime fasi del suo sviluppo, l'embrione è una struttura tutt'altro che omogenea: già pochi giorni dopo la fecondazione si riconoscono chiaramente tre foglietti (definiti rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma) che rappresentano una prima tappa del differenziamento cellulare che caratterizzerà le fasi successive dell'embriogenesi. In pratica, da ciascuno dei tre foglietti potrà originare un numero ampio, ma al tempo stesso limitato, di tipi cellulari: ad esempio, una cellula localizzata a livello ectodermico potrà generare una progenie di cellule epiteliali, neurali o pigmentate, ma non sarà mai in grado di dare origine a cellule del sangue o del muscolo, di derivazione mesodermica.

### **Figura 1. Differenziazione dei tessuti umani**

*Schema del processo di embriogenesi. Già nelle prime fasi dello sviluppo embrionale sono riconoscibili 3 foglietti (ectoderma, mesoderma ed*

endoderma) dai quali origineranno tutte le cellule che compongono un organismo adulto. La segregazione delle cellule germinali nella maggior parte dei mammiferi avviene in una struttura adiacente, non appartenente ad alcuno dei 3 foglietti.

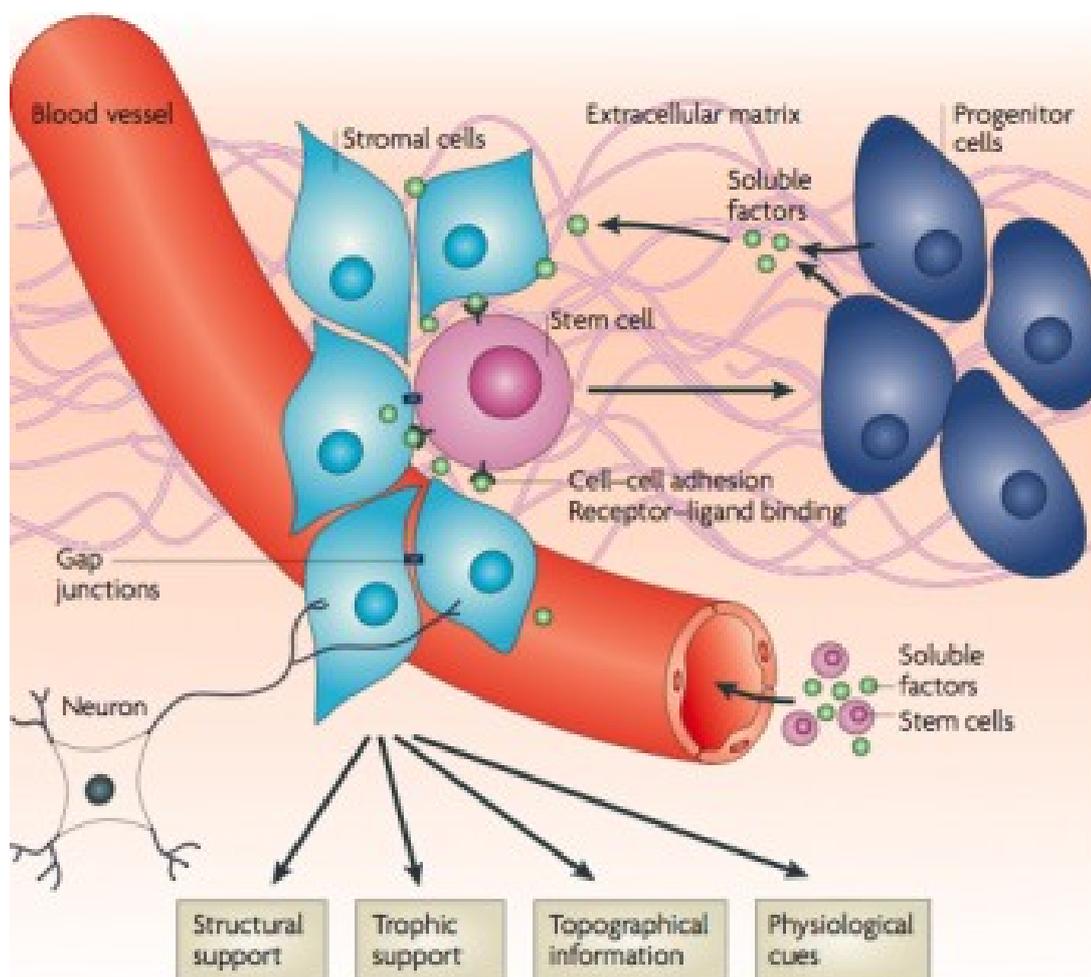


Il concetto, generalmente definito “*lineage restriction*”, per il quale nel corso dello sviluppo le cellule vedono progressivamente restringersi il proprio potenziale differenziativo, ha da sempre rappresentato un dogma centrale nella biologia dello sviluppo; ma esso è stato recentemente messo in discussione da una serie di sorprendenti evidenze sperimentali.

Nell’ultima decadiopatia ischemica, la ricerca scientifica ha concentrato la propria attenzione su come pilotare il differenziamento delle cellule staminali embrionali verso determinate linee cellulari. Questa possibilità è davvero cruciale per poter concepire efficaci approcci terapeutici intesi alla rigenerazione di tessuti ed organi del corpo umano e, nel nostro settore d’interesse, in particolare dell’apparato cardiovascolare.

**Figura 2. Le cellule staminali circolanti nel sangue**

*Schema dell'interazione tra cellule staminali e fattori solubili*



A tale proposito, tutti i 3 tipi di linee cellulari di origine embrionale sono stati utilizzati per tentare di generare colture di cardiomiociti *in vitro* (Kehat I, 2001). Dobbiamo ricordare che i cardiomiociti risultano facilmente identificabili in laboratorio, perchè iniziano a contrarsi spontaneamente dopo qualche giorno di coltura, formando particolari giunzioni intercellulari definite “*gap junctions*” ed assumendo proprietà elettrofisiologiche e farmacologiche tipiche del tessuto miocardico (Boheler KR, 2002). Questo modello sperimentale ha, tra l’altro, consentito di individuare una serie di fattori, come l’HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), l’EGF (*Epidermal Growth Factor*), il bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) e l’acido retinoico, necessari al differenziamento in senso cardiomiocitario, che potrebbero rivelarsi di estrema utilità nell’ottica di una futura terapia cellulare dell’insufficienza cardiaca.

Tralasciando le ragioni di ordine etico e legislativo, tutt'ora dibattute, dal punto di vista scientifico dovranno essere affrontati diversi problemi prima di poter contare su una transizione dell'attuale fase sperimentale ad un'applicazione clinica. In particolare sarà necessario definire una strategia per purificare popolazioni cellulari specifiche, dimostrare che i cardiomiociti differenziati in coltura sono in grado di funzionare in vivo, escludere la possibilità che l'uso di cellule di derivazione embrionale possa indurre la formazione di tumori e, infine, prevenire l'eventuale rigetto delle cellule trapiantate.

### **Le cellule staminali dell'adulto**

In molti tessuti degli organismi adulti esistono popolazioni di cellule che soddisfano, in maniera più o meno esaustiva, la definizione di cellula staminale. È ormai definitivamente confermata la nozione che alcuni tessuti, come la cute ed il fegato, possiedano un'intrinseca capacità rigenerativa, mentre altri, come il miocardio ed il sistema nervoso, possano riparare eventuali perdite di sostanze essenzialmente attraverso la formazione di una cicatrice fibrosa.

### ***Figura 3. La cellula staminale***

*Esempio alla microscopia elettronica di cellula staminale*



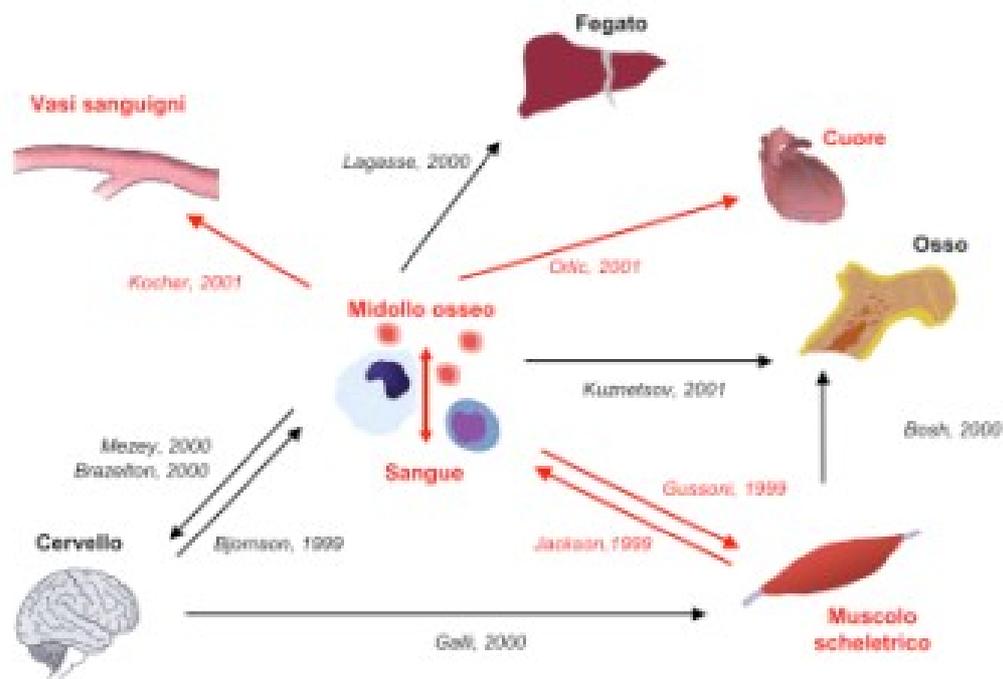
È probabile che la differenza fondamentale tra queste 2 modalità risieda nella presenza di cellule staminali residenti a livello dei diversi tessuti; in tale ambito sarà fondamentale capire se la presenza di una popolazione staminale sia peculiare di alcuni organi e tessuti oppure se, a fronte di una presenza ubiquitaria, la loro attivazione sia possibile solo in determinati contesti. In entrambi i casi, solo una conoscenza più approfondita dei meccanismi che governano la biologia delle cellule staminali sarà la preconditione necessaria per il disegno di nuove opzioni terapeutiche, volte ad indurre la migrazione di tali cellule in sede di danno oppure ad attivare gli elementi staminali residenti, di norma in quiescenza funzionale.

Sorprendentemente, oltre ad essere presenti nella maggior parte dei tessuti differenziati, le cellule staminali dell'adulto hanno recentemente rivelato una inaspettata plasticità.

***Figura 4. Plasticità delle cellule staminali dell'adulto***

*Rappresentazione sintetica di studi recenti sulla plasticità delle cellule staminali dell'adulto, riscontrabili in differenti distretti corporei e capaci di dare origine a*

molteplici tipi cellulari. In rosso sono indicati gli approcci sperimentali di terapia cellulare per le malattie cardiovascolari cui viene fatto riferimento nel testo.



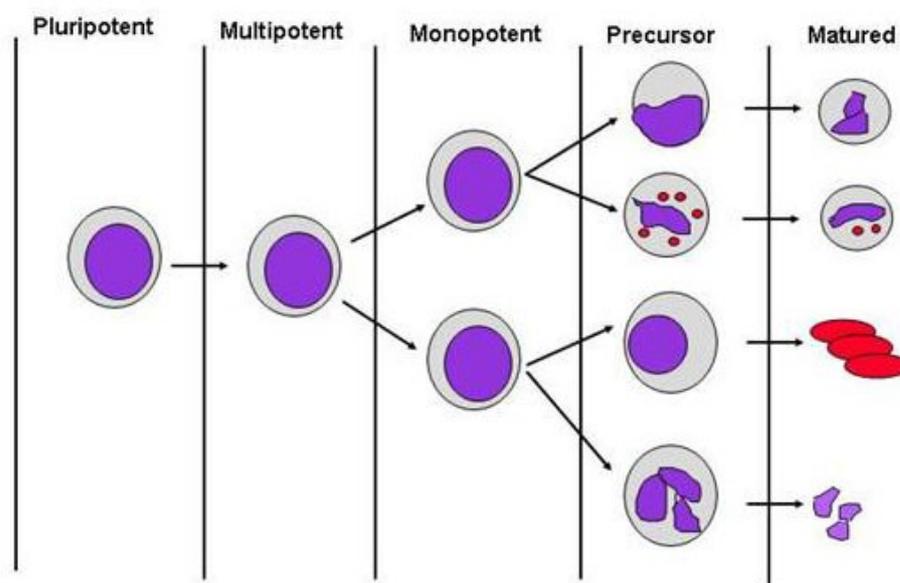
Una lunga serie di studi sperimentali ha dimostrato come elementi staminali prelevati da un tessuto adulto siano in grado di dare origine a tipi cellulari propri di un altro tessuto, sia in vitro che in vivo.

Ad esempio, le cellule staminali del midollo osseo possono essere indotte a formare cellule muscolari striate e cardiache, epatociti, osteoblasti e persino neuroni (Brazelton TR, 2000). Altresì, diverse popolazioni cellulari sono in grado di popolare il midollo osseo e contribuire all'ematopoiesi: tra queste ricordiamo i mioblasti scheletrici (progenitori delle fibrocellule muscolari fisiologicamente presenti alla periferia delle fibre e perciò chiamati anche cellule satelliti) e le cellule staminali neurali (Mezey, 2000). Queste evidenze hanno posto in discussione il concetto della "lineage restriction": è stato più volte rilevato come cellule di derivazione mesodermica possano dare origine a tipi cellulari della linea ectodermica, quali cellule con fenotipo neuronale nel caso delle cellule staminali ematopoietiche. L'inattesa plasticità delle cellule staminali dell'adulto ha generato l'ipotesi che esse potessero essere considerate equivalenti alle

cellule staminali embrionali, almeno per le finalità che si propone la terapia cellulare. In realtà, come già anticipato, è del tutto probabile che le potenzialità delle cellule staminali dell'embrione siano di gran lunga superiori a quelle dell'adulto. Queste ultime, a fini pratici, potrebbero poi rivelarsi difficili da identificare ed isolare, poiché presenti in numero limitato ed in sedi poco accessibili, nonché estesamente esposte all'azione di mutageni ambientali.

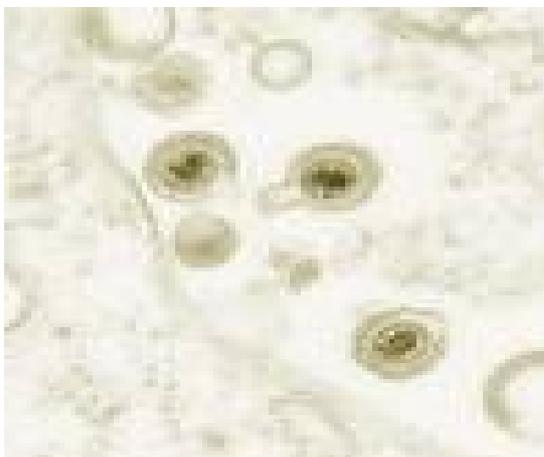
**Figura 5. Progressiva differenziazione delle cellule staminali**

*Schema del processo di progressiva differenziazione delle cellule staminali*



Il riconoscimento di cellule staminali in un numero sempre maggiore di tessuti, insieme con l'evidenza di un loro possibile ruolo nella rigenerazione di altri tessuti, anche in sedi distanti, ha fatto ipotizzare l'esistenza di una cellula staminale universale capace di circolare all'interno dell'organismo e di raggiungere i tessuti che necessitino di riparazione. Il concetto di cellula staminale universale non va necessariamente associato ad un'entità fisica, in quanto potrebbe riferirsi ad uno stato funzionale, latente in diverse popolazioni cellulari più o meno differenziate e attuato in risposta a determinati stimoli (*Blau HM, 2001*). In quest'ottica, una grande opportunità per la ricerca dei prossimi anni consiste nell'identificazione dei fattori in grado di indurre la colonizzazione dei diversi organi da parte delle ipotetiche cellule staminali circolanti.

**Figura 6. Colonizzazione di cellule staminali**  
*Fotografia elettronica di cellule staminali in via di replicazione*



Allo stato, la maggior parte degli approcci sperimentali ha utilizzato le cellule staminali del midollo osseo, principalmente per due ordini di motivi: a. il trapianto di midollo è ormai pratica clinica routinaria; b. è ormai associata la presenza di elementi staminali nel tessuto midollare, deputati a sostenere l'ematopoiesi nel corso dell'intera vita dell'organismo.

Attualmente, gli unici strumenti disponibili per l'identificazione delle cellule staminali sono i marcatori di superficie, riconoscibili mediante anticorpi specifici. Utilizzando diverse combinazioni di marcatori è possibile classificare, riconoscere ed isolare le differenti popolazioni cellulari. Tuttavia questo sistema soffre di importanti limitazioni, come il fatto che molti marcatori sono condivisi da numerosi tipi cellulari e si dimostrano, quindi, scarsamente specifici. Un esempio è rappresentato dal CD34, classicamente ritenuto il principale marcatore della cellula staminale ematopoietica, ma recentemente identificato anche sulla superficie dei mioblasti scheletrici, che rappresentano la popolazione staminale del muscolo. Questa sovrapposizione, se per un verso è confortante, perché suggerisce l'esistenza di meccanismi molecolari di funzionalità e regolazione comuni alle diverse categorie di cellule staminali, dall'altro rappresenta un limite allo studio dei fenomeni di plasticità, appunto basati sull'analisi dei profili di espressione di marcatori specifici per i diversi tessuti.

Inoltre, recenti evidenze suggeriscono che le cellule staminali ematopoietiche potrebbero non rappresentare le uniche cellule staminali presenti a livello midollare: anche tra le cellule stromali, di norma considerate elementi nutritivi e di sostegno per le cellule ematopoietiche, esistono elementi cellulari capaci di proliferare a lungo termine e dotati di ampia plasticità. Queste cellule, comunemente indicate come cellule staminali mesenchimali o stromali, potrebbero detenere l'importante proprietà di dare origine a molteplici tipi cellulari, quali fibrocellule muscolari scheletriche, epatociti, neuroni ed oligodendrociti, adipociti, condrociti ed osteoblasti (*Prockop DJ, 1997*). In base alla negatività per il CD34, tali cellule sono agevolmente distinguibili da quelle ematopoietiche.

In conclusione, appare evidente come le cellule staminali dell'adulto, fisiologicamente predisposte a conservare l'omeostasi tessutale negli organi ed apparati che vanno incontro a turn-over fisiologico, potrebbero consentire un'ampia serie di approcci di rigenerazione tessutale. Le importanti proprietà che le contraddistinguono riguardano: a. la possibilità di effettuare un trapianto con cellule autologhe, quindi senza alcun rischio di rigetto; b. la totale assenza di potenziale cancerogenico, al contrario precedentemente descritto come prova di pluripotenzialità delle cellule staminali embrionali (*Boheler KR, 2002*).

***Figura 7. Trapianto di cellule autologhe***

*Esempio di preparazione di cellule autologhe per il trapianto senza rigetto*

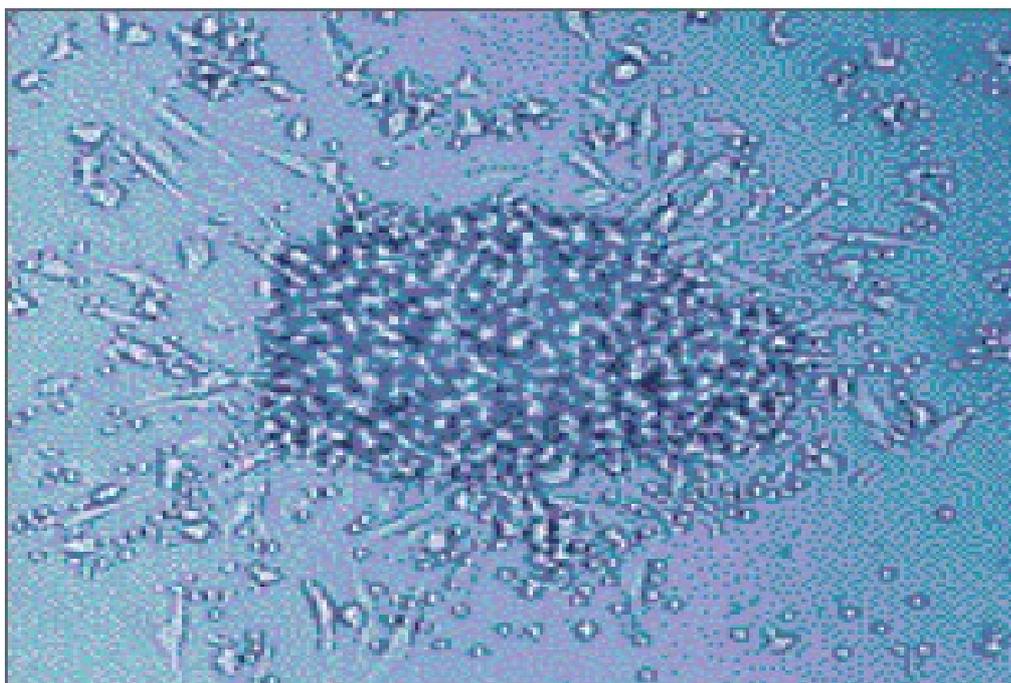


## Progenitori delle cellule endoteliali circolanti (EPC)

### EPC: lo stato dell'arte

Le EPC sono cellule endoteliali di derivazione midollare “migranti”, cioè dotate della capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature.

**Figura 8 . Micrografia di una colonia di EPC (x 200)**



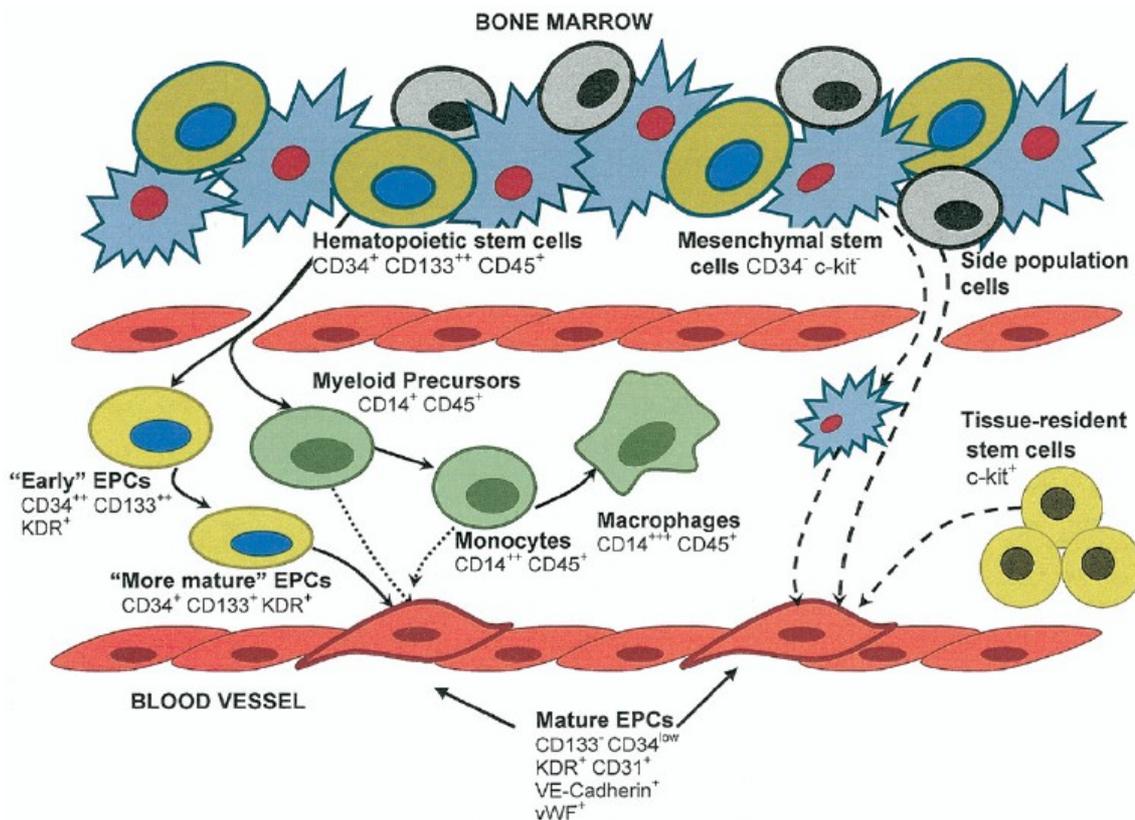
Tali cellule esprimono marker endoteliali specifici simili a quelli delle cellule endoteliali e possono essere considerate progenitori delle cellule endoteliali mature (*Bompais H, 2004*). In particolare, le EPC identificate in modelli animali di ischemia tissutale sono considerate i veri elementi responsabili della vasculogenesi, considerata fino a poco tempo fa esclusiva della vita embrionale (*Asahara T, 1997; Peichev M, 2000; Lutun A, 2002; Lin Y, 2000*).

**Caratteristiche fenotipiche.** A seguito della prima, dettagliata descrizione dell'isolamento di progenitori endoteliali (Asahara, 1997) è stato accertato come i marcatori che caratterizzano queste cellule allo stadio più precoce di differenziamento siano comuni a quelli delle cellule staminali emopoietiche, il CD34+, il CD133+, ed il vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) o Flt-1.

Cellule che esprimono questi marcatori sono residenti nel midollo osseo; il passaggio nel circolo è segnato da una diminuzione nell'espressione del CD133, mentre rimane positiva quella per il CD34 e per il Flt-1. La perdita della positività per il CD133+ e, successivamente, per il CD34 segna un ulteriore step differenziativo, fino alle cellule endoteliali mature, caratterizzate dall'espressione del CD31 (PECAM-1), VE-caderina, e von Willebrand factor (vWF).

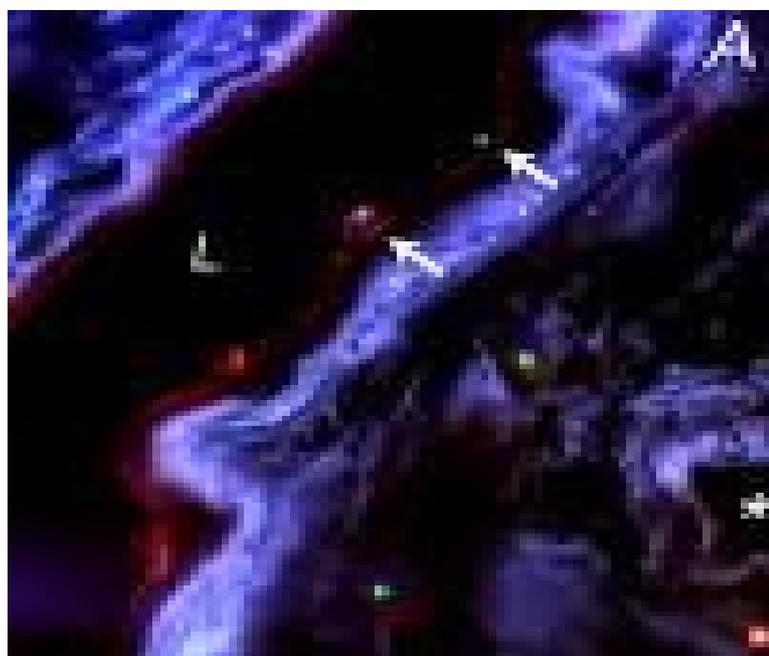
**Figura 9. Progressiva maturazione delle EPC**

Schema del processo di maturazione delle EPC caratterizzato dalla positività per combinazioni di antigeni diverse



**Le attuali evidenze.** A seguito dei lavori originari di Asahara et al (Asahara, 1997), che per primi avevano isolato le EPC e dimostrato il loro contributo alla rivascolarizzazione post-natale, è stato confermato il ruolo cruciale delle EPC nel mantenimento della funzione endoteliale dei vasi sanguigni attraverso un continuo processo di re-endotelializzazione e neovascolarizzazione (Heiss C, 2005).

**Figura 10. Incorporazione delle EPC**  
*Evidenza di EPC nell'endotelio vascolare danneggiato*



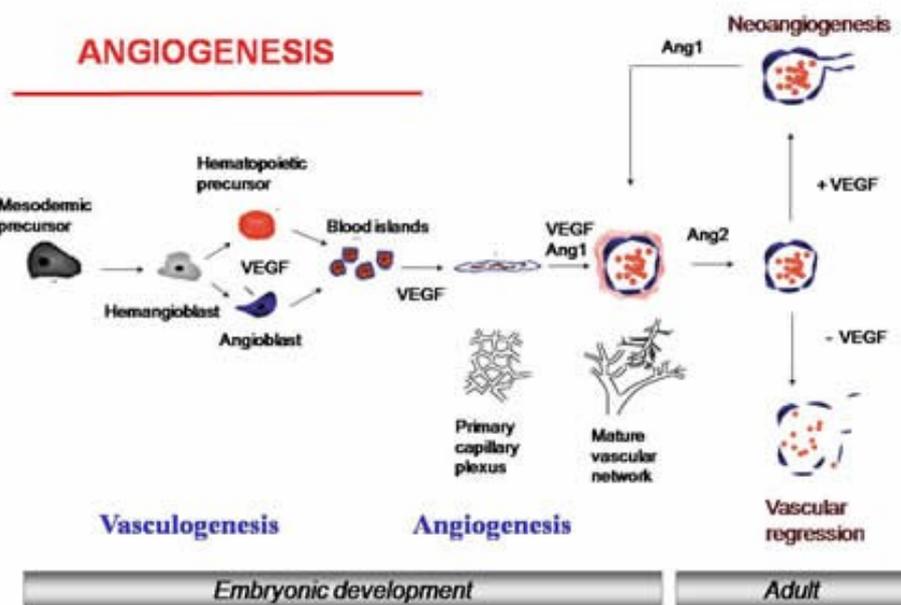
Studi sperimentali condotti su differenti modelli di danno e riparazione cardiovascolare hanno sempre dimostrato come le EPC siano effettivamente responsabili della riparazione endoteliale e vascolare (Kong D, 2004). Le ricerche si sono basate su varie sottopopolazioni di EPC le quali, infatti, esprimono una varietà di marker endoteliali di superficie e sono riscontrabili nei siti di neovascolarizzazione e di “denudamento” endoteliale.

Le cellule progenitrici endoteliali in circolo sono state inizialmente identificate attraverso l'espressione del CD 34 (un marker di superficie comune alle cellule staminali ematopoietiche ed alle cellule endoteliali mature) e il recettore 2 per il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGFR2). Successivi studi

hanno utilizzato altri marcatori, come il marker di cellule staminali CD133 e hanno, comunque, mostrato che le EPC possiedono la proprietà fondamentale di costituire un nuovo vaso sanguigno o ripararne uno già esistente (*Rauscher FM, 2003*). A questo proposito appare di grande importanza lo studio di Wojakowski e colleghi che formula l'ipotesi per la quale le EPC circolanti sarebbero importanti nel meccanismo di riparazione del miocardio (*Wojakowski, 2004*).

**L'angiogenesi.** La crescita di nuovi condotti sanguigni nell'uomo si verifica attraverso l'arteriogenesi e l'angiogenesi (o vasculogenesi; *Cermeliet P, 2000*). L'arteriogenesi è definita dalla crescita di vasi collaterali; l'angiogenesi dalla crescita di nuovi capillari attraverso lo sviluppo di vasi pre-esistenti mediante migrazione e proliferazione di cellule endoteliali mature.

**Figura 11. Il processo di angiogenesi**  
Schema del processo di neo-angiogenesi

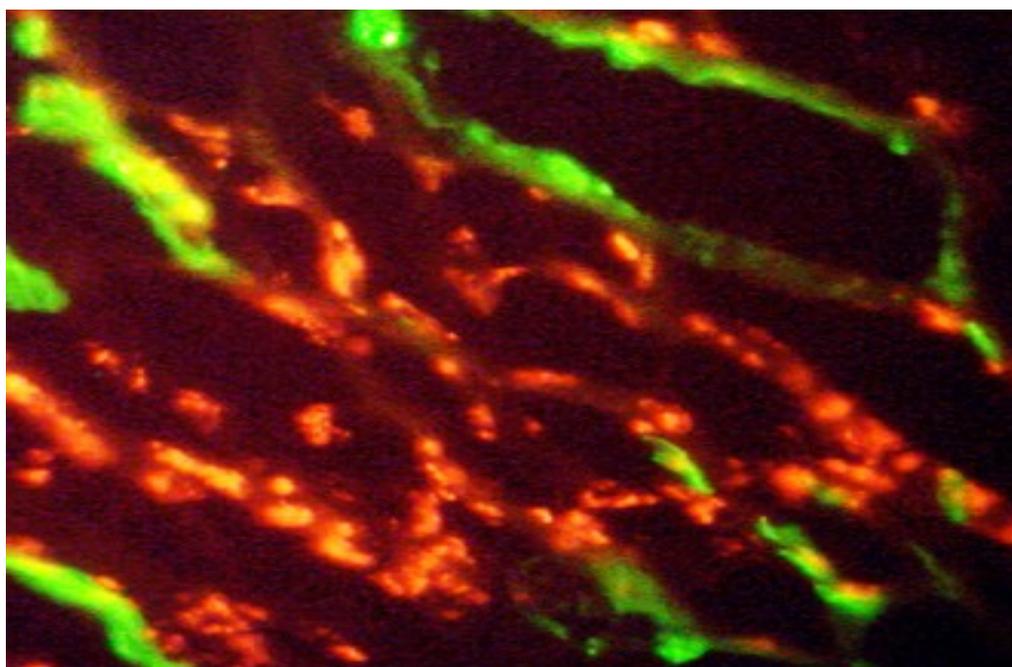


Il concetto di angiogenesi è stato originariamente descritto da Sabin (*Sabin FR, 1920*) che per primo ha studiato la formazione embrionale “de novo” di vasi sanguigni e ha assegnato il termine “angioblasti” ai progenitori delle cellule endoteliali. In condizioni fisiologiche l'ipossia tissutale determina la formazione di nuovi capillari a partire da quelli preesistenti. L'angiogenesi è pertanto un

processo che si verifica continuamente nel corpo umano ed è regolato da molteplici modulatori, ad azione attivatoria e/o inibitoria, normalmente in equilibrio tra loro (*Distler O, 2002*). Molecole chiave nell'induzione dell'angiogenesi sono il vascular endothelial growth factor (VEGF) ed il basic fibroblast growth factor (bFGF). Il VEGF è coinvolto in molti aspetti dell'angiogenesi, quali la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule endoteliali (*Hebbar M, 2000*). Lo stesso ruolo, anche se non esclusivamente indirizzato alle cellule endoteliali, è stato attribuito al bFGF (*Hebbar M, 2000*).

**Figura 12. Neoangiogenesi**

*La diffusione di EPC contribuisce allo sviluppo di nuovi vasi sanguigni*



**La neoangiogenesi**

**Prospettive.** Le EPC sembrano partecipare alla rigenerazione o alla riparazione del danno di strutture vascolari e di tessuti extravascolari (ad esempio lo stesso miocardio). Non è ancora stato definito il range di normalità riguardo al numero di EPC circolanti dei soggetti sani. Viceversa, è stata studiata l'influenza di alcune condizioni patologiche sul numero di tali cellule, quali farmaci e fattori di crescita.

L'infarto acuto del miocardio, ad esempio, è stato associato al rapido incremento di EPC; traumi vascolari, quali l'impianto di by pass coronarici, hanno prodotto una rapida, ma transitoria mobilitazione di tali cellule.

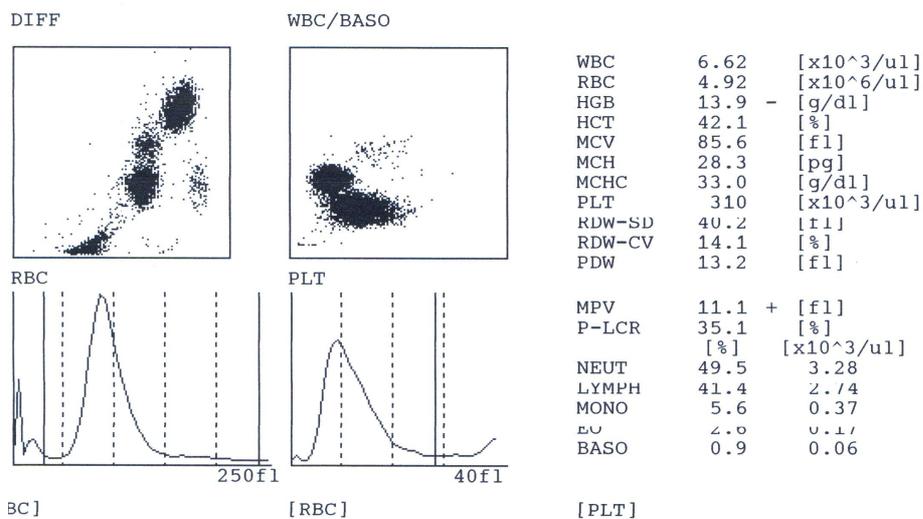
Le prospettive al riguardo di un'applicazione clinica di queste cellule sono limitate dall'esiguo numero di elementi circolanti e dalle difficoltose procedure di isolamento. Sono, dunque, allo studio diversi approcci sperimentali, tra i quali una mobilitazione VEGF-indotta e la transfezione di vettori virali codificanti il gene del VEGF, il principale fattore angiogenetico conosciuto. Altri studi sono necessari per chiarire il ruolo fisiologico delle EPC e la conoscenza dei fattori che determinano il loro numero e la velocità di turn-over, nonché dei meccanismi che ne regolano l'adesione, la tras migrazione e la differenziazione in vitro e in vivo.

### EPC: come si identificano 'in vivo'

In primo luogo occorre effettuare un prelievo venoso di sangue in K1 EDTA e centrifugarlo per la separazione dei globuli rossi, dei globuli bianchi e del plasma. Più in dettaglio, dopo aver eseguito l'esame emocromocitometrico completo, il campione viene diluito con una soluzione isotonica di tampone fosfato (PBS), per poi separare la frazione delle cellule mononucleate. Infatti al fine di garantire un arricchimento ed una purezza ottimali per l'isolamento ed il recupero delle EPC, gli eritrociti ed i neutrofili sono allontanati mediante centrifugazione e per gradiente di densità, utilizzando una soluzione di Ficoll-Histopaque.

#### Figura 13. Identificazione delle cellule mononucleate

L'analisi dell'emocromo consente l'isolamento della popolazione di monociti



Il sangue intero diluito viene poi depositato in provetta in 3 ml di Ficoll e centrifugato ad una velocità di 1600 giri/minuto per 20 minuti. Successivamente viene aspirato l'anello delle mononucleate, che è localizzato nell'interfase compresa tra gli eritrociti ed i neutrofili precipitati sul fondo della provetta ed il plasma sovrastante. Dopodiché, le cellule sono oggetto di lavaggi in soluzione isotonica di PBS ed infine concentrate attraverso centrifugazione (5 minuti a 1600 giri/minuto). Tutte le prove sono ripetute in doppio, ottenendo un'ottima

riproducibilità dei dati sperimentali acquisiti ed analizzati; inoltre i campioni pervenuti in laboratorio vengono processati in cieco.

L'analisi immunofenotipica è realizzata utilizzando la tecnica della citofluorometria a flusso, che consente una separazione fisica dei campioni freschi vitali. Le determinazioni analitiche eseguite sono volte a quantificare, in percentuale e in numero assoluto, le diverse popolazioni cellulari isolate.

**Citofluorimetria a flusso.** Si tratta di una moderna metodica di laboratorio che permette di valutare parametri fisici e chimici di particelle biologiche o cellule contenute in una sospensione. Il vasto successo di questa tecnica dipende dal fatto che essa, oltre a garantire l'analisi citologica qualitativa e quantitativa, permette di separare fisicamente da una sospensione eterogenea sottopopolazioni di cellule sulla cui membrana sia presente una struttura riconosciuta da un anticorpo monoclonale specifico. Questa procedura è chiamata "*cell sorting*" e permette di ottenere popolazioni cellulari con una purezza superiore al 95%.

**Figura 14. Citofluorimetro**

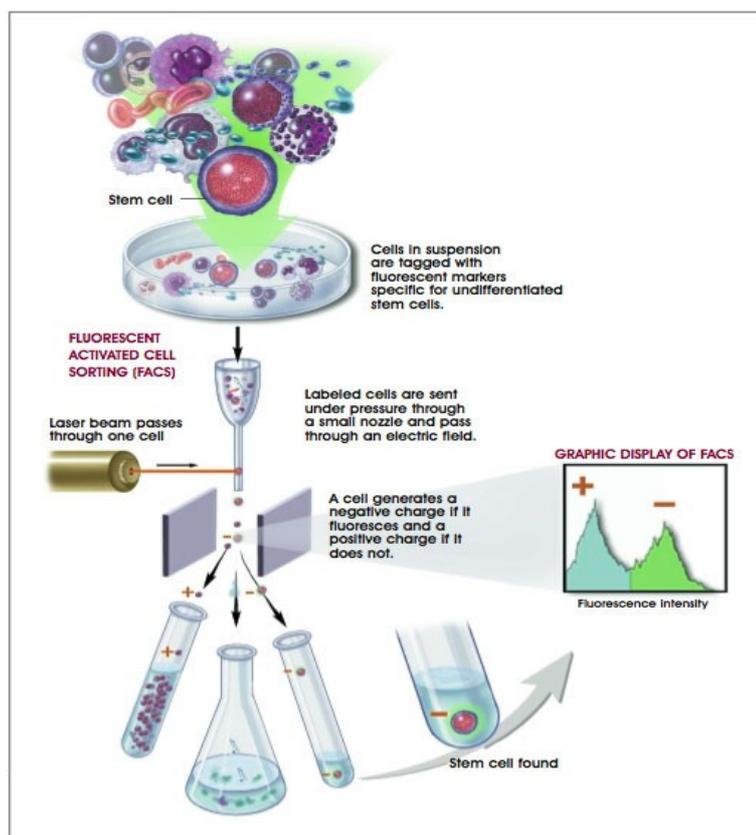


La sequenza tecnica prevede l'introduzione sotto gas di un campione, contenente una popolazione eterogenea di cellule o altre particelle, in una camera di flusso dove le particelle sono diluite e allineate tramite un sistema fluido (flusso laminare). Nel flusso coesistono una corrente più interna ed una camicia esterna (sheath), composta da soluzione salina isotonica, che confina

la sospensione cellulare nel centro del flusso. La pressione di spinta e la diluizione del campione determinano una velocità di conta più o meno costante (regolata tra le 200 e le 2000 cellule/sec).

**Figura 15. La fluorescenza**

*Schema del procedimento delle cellule staminali in base alla identificazione di specifici marker con la tecnica della fluorescenza*



Il flusso laminare attraversa ortogonalmente un raggio di luce monocromatica prodotto da una sorgente laser o da speciali lampade. Le deflessioni del raggio e l'emissione di fotoni provocate dall'interazione raggio-particelle vengono registrate e convertite da fotomoltiplicatori in segnali elettrici, che sono poi amplificati di un fattore lineare o logaritmico in base al tipo di parametro o di analisi. L'impulso amplificato viene inviato ad un circuito elettronico che lo converte da analogico in digitale. I valori continui degli impulsi sono convertiti in un numero prefissato di valori discreti a seconda del numero di canali di cui

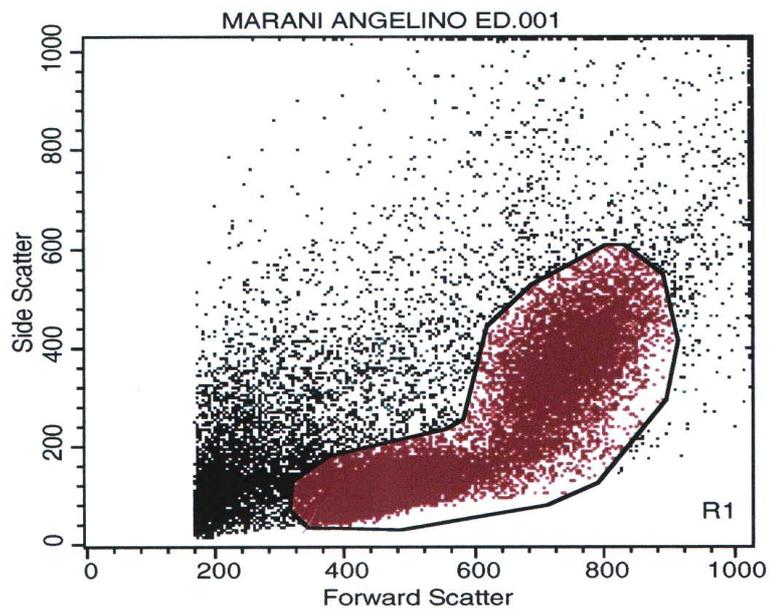
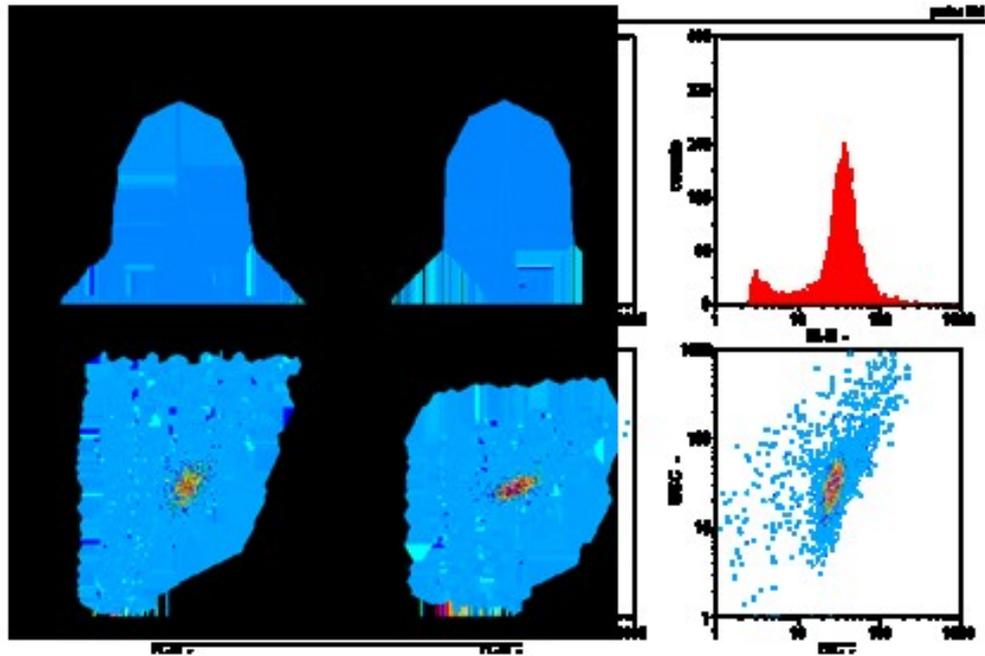
l'apparecchio dispone. Il citofluorimetro è in grado di misurare l'intensità di due tipi di segnali luminosi prodotti dall'interazione della luce col preparato biologico: "scattering" e fluorescenza.

**Scattering.** Il termine "light scattering" indica l'insieme dei fenomeni derivanti dall'interazione del raggio sorgente con la cellula e cioè diffrazione, riflessione e rifrazione. La diffrazione della luce, detta "forward scatter", dipende dalle dimensioni della particella ed è misurata da un fotodiode posto di fronte alla sorgente luminosa. La rifrazione e la riflessione della luce dipendono dalla struttura della particella: nel caso di una cellula, dalla complessità della membrana, del nucleo e del citoplasma.

Questo parametro è detto "side scatter" o "right scatter" ed è rilevato da un fotomoltiplicatore, posto ortogonalmente rispetto al fotodiode. La combinazione dei segnali di scattering permette di creare un particolare diagramma di dispersione noto come citogramma, che rappresenta la distribuzione delle popolazioni presenti nel campione in esame, risolvendo fino a 4-5 popolazioni di cellule in base alle loro caratteristiche fisiche.

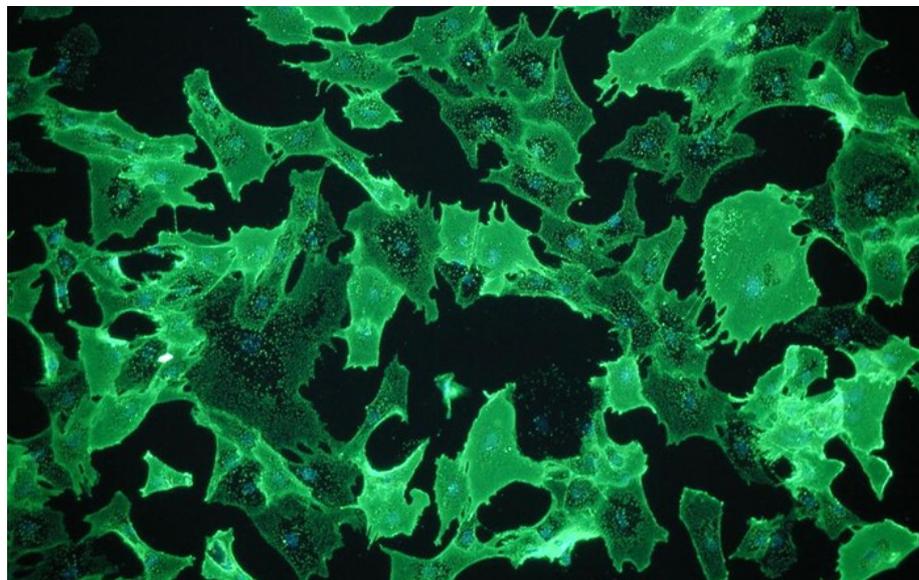
**Figura 16. Generazione di un citogramma in base alla misura dei segnali di scatter.**

*In un campione contenente diverse popolazioni cellulari e' possibile studiarne una sola: questa operazione, detta "gating", consiste nel delimitare la regione di interesse all'interno del citogramma selezionando uno o piu' parametri.*



**Fluorescenza.** Il secondo tipo di segnale luminoso rilevato da un citofluorimetro è la fluorescenza. Questa è un fenomeno dovuto a molecole dette fluorocromi che, quando colpite (eccitate) da una luce di una data lunghezza d'onda, emettono luce di lunghezza d'onda maggiore. Cio' permette, usando dei filtri ottici, di separare la luce di eccitazione da quella di emissione.

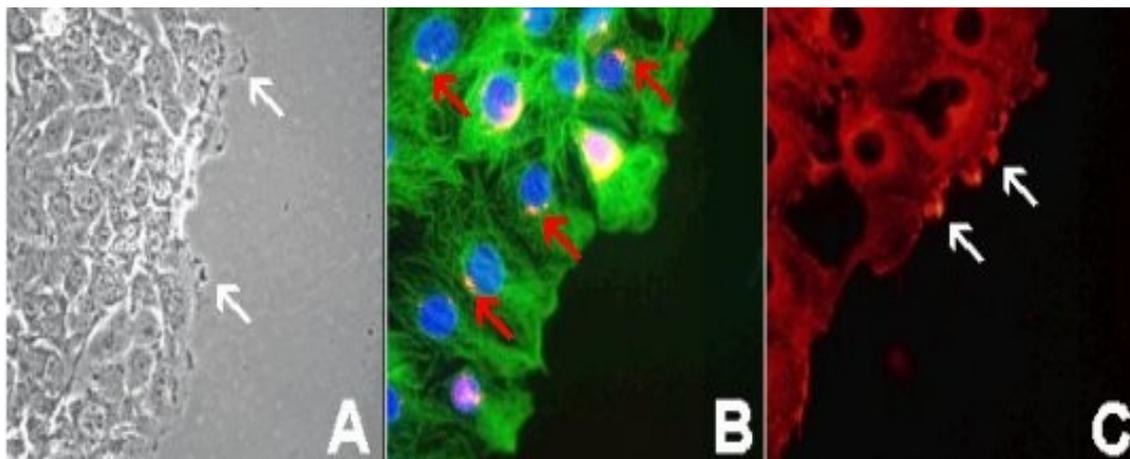
**Figura 17. Il fenomeno della fluorescenza**



Poichè ogni fluorocromo possiede una precisa lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione (colore), per poter osservare il segnale emesso il citofluorimetro deve essere dotato di un gruppo di filtri di eccitazione e di emissione compatibili con le caratteristiche del fluorocromo scelto. La fluorescenza misurata da un citofluorimetro è solitamente quella emessa dalle cellule marcate con specifici anticorpi direttamente o indirettamente coniugati con fluorocromi, o colorate con coloranti fluorescenti che si legano a determinate strutture cellulari.

La misura di questo parametro fornisce precise informazioni sulle popolazioni cellulari analizzate. I segnali di fluorescenza vengono misurati come impulsi di ampiezza proporzionale al numero di molecole di fluorocromo presenti sulla cellula. I dati ottenuti da tutti i segnali possono essere visualizzati sotto forma di istogrammi lineari o logaritmici.

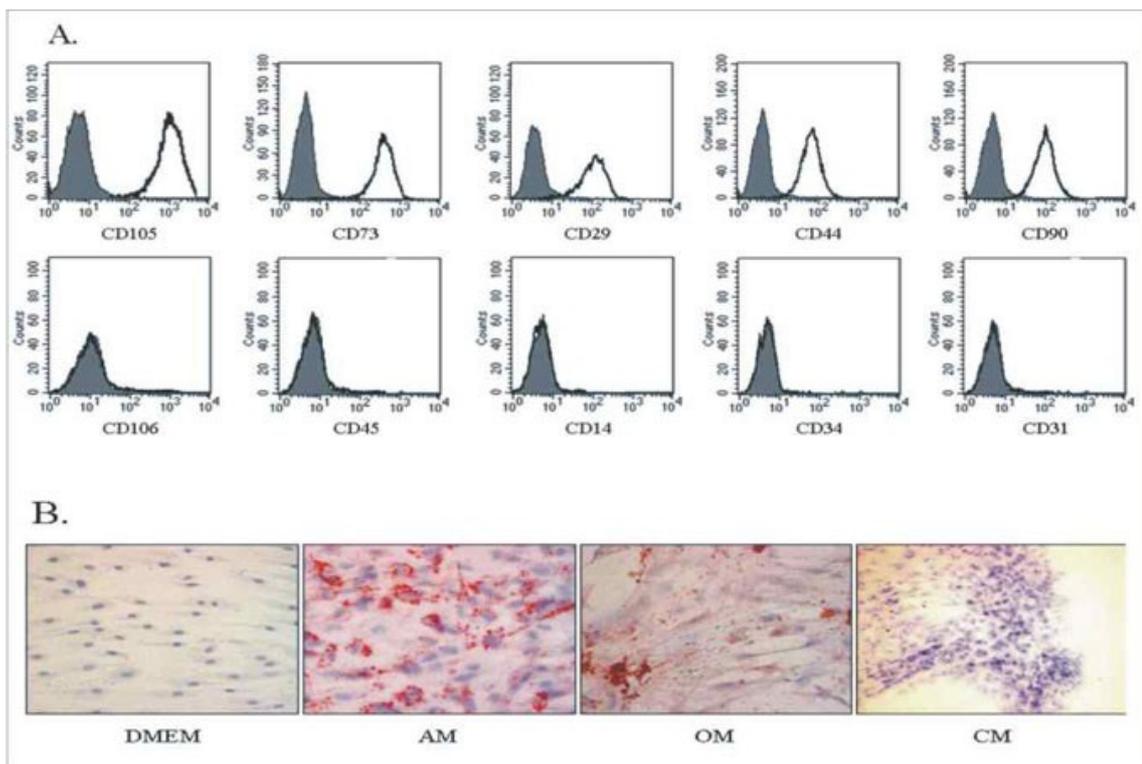
**Figura 18. Esempi di progenitori di cellule endoteliali (EPC)**  
*Le frecce identificano gruppo di EPC*



***Gli anticorpi monoclonali.*** In ogni paziente, l'analisi immunofenotipica è stata condotta con 10 microlitri di un pannello di anticorpi monoclonali (anti-CD 45, anti-Cd 34, anti-CD 133) marcati con fluorescina isotiocianato, R-phicoeritrina o peridinin-chlorophyll-protein per 20 minuti a temperatura ambiente.

Sono state usate appropriate finestre di analisi per contare il numero totale di EPC, le quali poi sono state definite come CD45-, CD 34+, CD 133+ e CD 105+.

**Figura 19. Esempio di analisi immunofenotipica**



**Antigene CD 45.** L'antigene CD 45 è detto anche LCA (leucocyte common antigen), in quanto espresso sulla superficie di tutte le cellule leucocitarie ed impiegato come marker di queste.

**Antigene CD 34.** L'antigene CD 34 viene espresso sulla superficie di una popolazione cellulare staminale morfologicamente ed immunologicamente eterogenea, il cui elemento unificante è rappresentato dalla capacità di generare aggregati clonati derivati sia da progenitori ontogeneticamente primitivi che orientati. Ciò è supportato dal fatto che tale antigene ha una specificità di stadio maturativo, ma non di filiera cellulare differenziata, in quanto è espresso, indipendentemente dalla diversa linea progenitrice, solo da cellule ontogeneticamente immature mentre scompare in quelle mature.

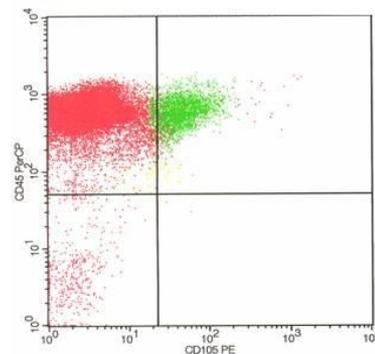
Dal punto di vista biochimico la glicoproteina CD 34 è di tipo transmembranoso ed ha un peso molecolare di 105-120 KDa. Viene di norma espressa in una percentuale variabile tra lo 0,01% e lo 0,1% delle cellule immature di sangue periferico, in percentuale variabile compresa tra l'1,0% e il 3,0% delle cellule di sangue midollare e in una percentuale compresa tra lo 0,1% e lo 0,4% delle cellule di sangue cordonale. Pertanto, le cellule CD 34+ sono riconosciute staminali per antonomasia, anche se tale antigene permane in linee cellulari

progenitrici e di progenitori più o meno orientati verso linee di maturazione ben definite.

**Antigene CD 133.** La maggior parte delle cellule staminali del tutto indifferenziate esprime invece l'antigene di superficie CD 133, co-espresso nel 63,0 – 75,0% delle CD 34+, quale indice di staminalità assoluta.

**Antigene CD 105.** L'antigene CD 105 (noto anche come endogлина) è anch'esso transmembranoso, con un peso molecolare di 180 KDa. Il dominio extracellulare è funzionalmente legato al riconoscimento delle integrine e di altri recettori di adesione cellulare. Questa glicoproteina è largamente espressa sulle linee cellulari del sistema vascolare endoteliale e dei tessuti connettivali; risulta essere la glicoproteina di membrana più espressa in assoluto sulla superficie delle cellule endoteliali vascolari in vivo ed in coltura, delle cellule mesenchimali e delle cellule sincizio-trofoblastiche placentari. Per quanto riguarda il sangue periferico, il CD 105 è inoltre espresso sui monociti, sui macrofagi, sulle progenitrici ematopoietiche CD 34+, sui pro-eritroblasti e sui pre-linfociti B.

**Figura 20. Identificazione delle cellule positive per l'antigene 105**



**La misurazione delle EPC: cosa dicono le linee guida.** Al momento non esistono criteri internazionali standardizzati per la definizione delle EPC. Questa limitazione le differenzia dai progenitori delle cellule ematopoietiche circolanti che sono state ormai definite rigidamente in base alla espressione dell'antigene CD34.

I criteri della *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) definiscono come HPC le cellule che risultano positive per il CD34 e

che esprimono anche l'antigene leucocitario CD45 a una intensità più bassa rispetto ai leucociti maturi (*Sutherland, 1996*).

Le EPC circolanti sono attualmente definite dalla assenza di espressione dell'antigene CD45 e dal fatto che differiscono dalle HPC perché hanno la simultanea espressione del recettore per il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR2) e di almeno un marker di immaturità (CD34 and/or CD133). In accordo con i criteri ISHAGE, la misurazione delle EPC circolanti viene attualmente effettuata come segue.

In primo luogo, le cellule sono analizzate usando una strategia di 'gating' sequenziali al fine di identificare quelle negative per l'antigene CD45. La popolazione di cellule risultante viene quindi identificata dalla espressione duale di KDR e CD34 (CD45- CD34+ KDR+) o CD133 (CD45- CD133+ KDR+). Successivamente, le cellule sono analizzate usando una strategia di 'gating' sequenziali al fine di identificare le cellule positive, oltre che all'antigene CD45, anche ad altri antigeni.

**Figura 21. Metodologia di conteggio delle EPC**

(A) I quadranti sono definiti usando isotopi di controllo.

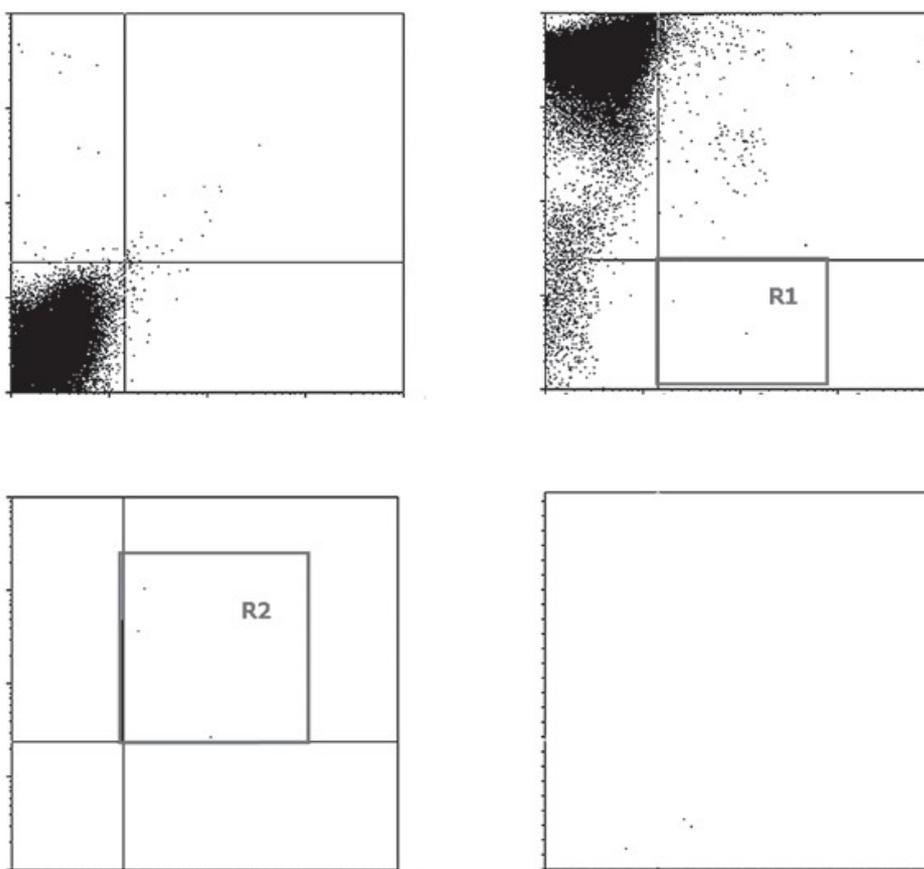
(B) Le cellule CD34+/CD45- sono identificate in R1.

(C) Le cellule CD34+/VEGFR2+ sono identificate in R2.

(D) Le cellule R1 × R2 sono visualizzate come 'scatter' in modo tale da evidenziare le caratteristiche di queste cellule

*EPC (endothelial progenitor cell) = progenitori delle cellule endoteliali*

*VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) = recettore 2 per il fattore di crescita endoteliale vascolare*



**Figura 22. Conta dei progenitori ematopoietici (in accordo con i criteri della Int. Soc. of Hematotherapy and Graft Engineering)**

(A) Le cellule CD45+ sono isolate in R1

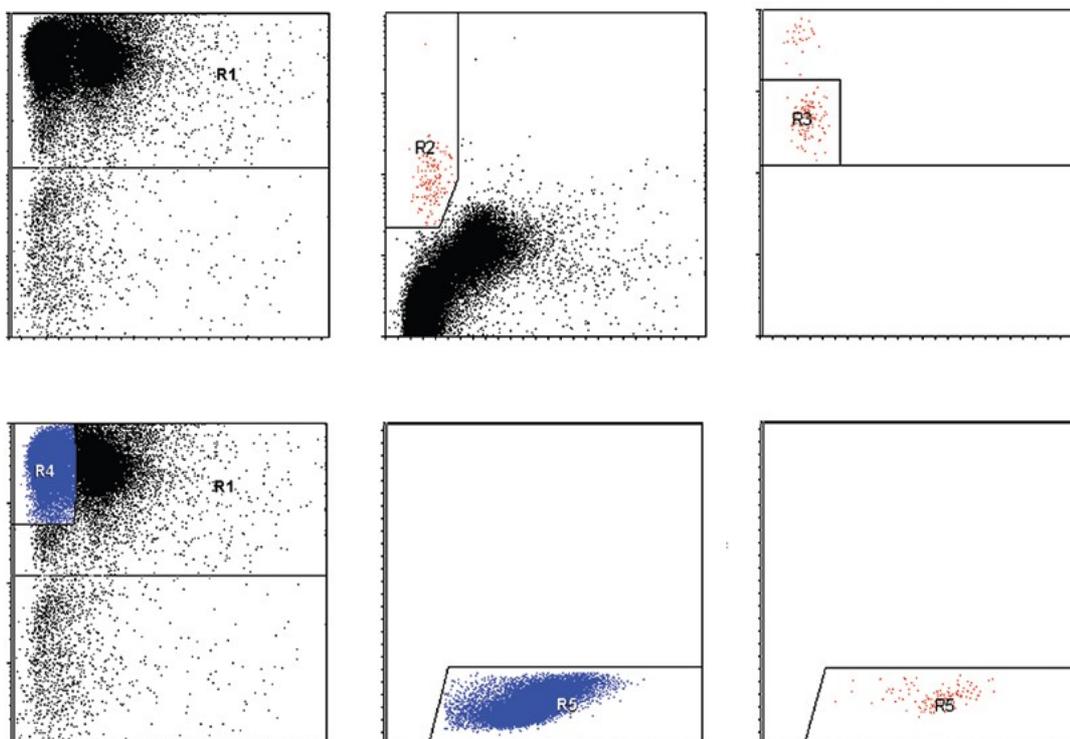
(B) Le cellule CD34+ cells sono isolate in R2

(C) Le cellule CD45dim derivanti da R1 × R2 sono isolate in R3.

(D) R4 definisce la popolazione di linfociti

(E) Le cellule sono visualizzate nello 'scatter'

(F) Le cellule derivate da R1 × R2 × R3 sono altrettanto visualizzate nello 'scatter', e le cellule che si collocano in R5 sono considerate cellule CD34+/CD45dim.

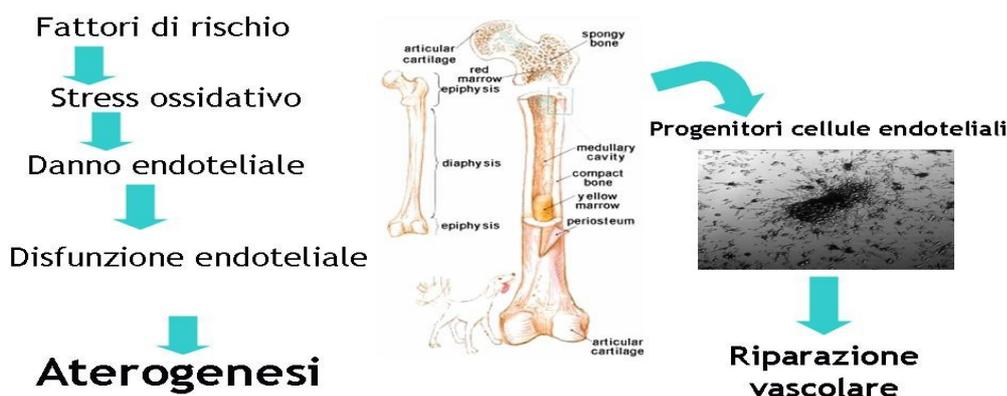


## Cuore e EPC

Le EPC hanno un ruolo ben definito da anni in numerose situazioni extra-cardiache caratterizzate da un'anomala neoformazione di vasi, quali la retinopatia diabetica o l'angiogenesi tumorale. Diversi studi hanno dimostrato un'associazione fra gli alti livelli di EPC ed il rischio di sviluppare determinati tumori, come ad esempio il mieloma multiplo. Inoltre, studi su animali hanno mostrato che le EPC derivate dal midollo osseo partecipano attivamente alla angiogenesi tumorale, favorendo di conseguenza la crescita neoplastica.

### Figura 23. Fattori di rischio e EPC

*Effetti dei fattori di rischio sul processo di eterogenesi e ruolo riparativo delle EPC*



Hill JM et al. *N Engl J Med.* 2003;13:593-600.

Negli ultimi anni, invece, l'attenzione è stata concentrata sull'importanza che le EPC rivestono nell'apparato cardiovascolare. Ciò in conseguenza, principalmente, del ruolo cruciale svolto dall'endotelio nella biologia cardiovascolare (*Drexler H*). Invero, l'insulto endoteliale è implicato nella genesi dell'aterosclerosi, nella trombosi e nell'ipertensione; inoltre, l'equilibrio tra danno e riparazione endoteliale è di preminente importanza per la riduzione degli eventi cardiovascolari (*Endermann, 2004*). Le cellule endoteliali mature possiedono limitate capacità rigenerative (*Caplan 1973; Dimmeler 2004*); questo limite spiega l'interesse crescente nelle EPC, specialmente, nel loro presunto ruolo nel mantenimento dell'integrità endoteliale, della funzione e della neovascolarizzazione postnatale (*Rafili 2003*).

Un crescente numero di studi si sta indirizzando alla valutazione del possibile utilizzo delle EPC nel contesto clinico. D'altro canto, un'evidenza scientifica crescente segnala la ridotta disponibilità e il deterioramento della funzione delle EPC in presenza di fattori di rischio o di malattia cardiovascolare in atto.

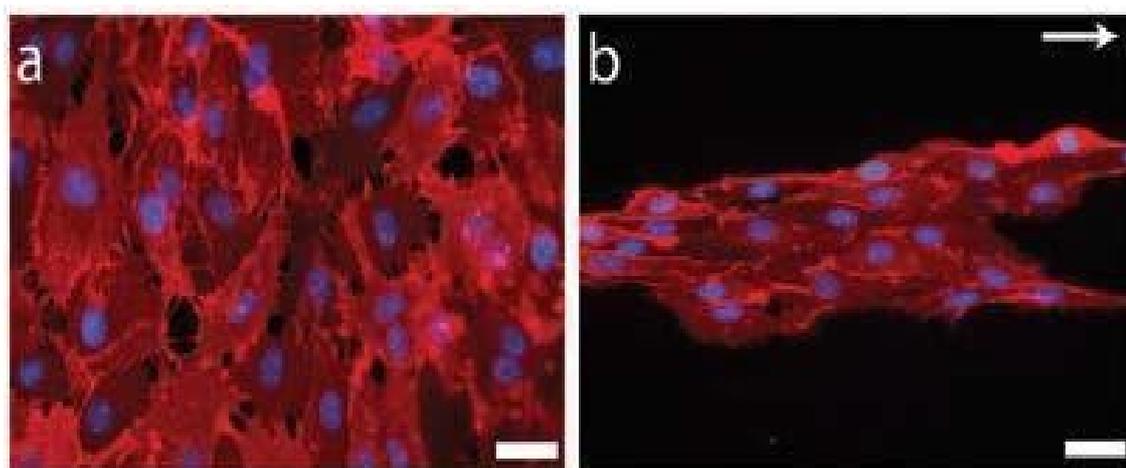
**Fattori fisiologici e EPC.** A causa della rarità delle EPC e della difficoltà nella loro identificazione, disponiamo di informazioni limitate circa il range di normalità e le caratteristiche funzionali dei differenti tipi di tali cellule nella specie umana. I dati presenti in letteratura suggeriscono che l'età può incidere sulla disponibilità e sulla funzionalità delle EPC (*Rauscher 2003; Scheubel 2003; Edelberg 2002*). L'invecchiamento è associato con un numero particolarmente ridotto di EPC circolanti nei pazienti con malattia coronarica. Tra gli altri, Vasa (*Vasa 2001*) ha riscontrato una depressione correlata con l'età nelle cellule circolanti CD34/KDR-positive in un gruppo misto di persone sane e di coronaropatici. Scheubel e al. (*Scheubel 2003*) hanno descritto una perdita dipendente dall'età delle EPC nel corso dell'angina stabile. Inoltre, il numero di EPC mobilitate a seguito di bypass aorto-coronarico è risultato significativamente ridotto nei pazienti più anziani.

**Fattori di rischio cardiovascolare e EPC.** Un'evidenza crescente suggerisce che i fattori di rischio cardiovascolare influiscono sul numero e le proprietà delle EPC. In individui sani e in pazienti coronaropatici è stata rilevata una correlazione significativa inversa tra numero ed attività funzionale delle EPC e fattori di rischio cardiovascolare (*Vasa 2001; Hill 2003*). Il numero delle EPC correla con la funzione endoteliale e, pertanto, si dimostra un predittore migliore dello score combinato di Framingham (*Hill 2003*).

**Lipidi.** Molteplici studi hanno segnalato, consistentemente, una associazione tra il dismetabolismo lipidico e la biologia delle EPC umane: Il numero di EPC formanti colonie è significativamente ridotto negli individui in salute, ma con livelli elevati di colesterolo sierico (*Hill 2003*). Nei coronaropatici il colesterolo-LDL correla inversamente con il numero di EPC circolanti (*Vasa 2001*). In aggiunta, le caratteristiche funzionali delle EPC isolate, come la proliferazione, la migrazione, l'adesione e la capacità vasogenica in vitro, risultano deteriorate nei pazienti con ipercolesterolemia (*Vasa 2001; Chen 2004*). L'esposizione di

EPC in colture alle LDL ossidate induce un deterioramento dose-dipendente della loro attività funzionale, ne accelera la percentuale di senescenza - possibilmente attraverso una inattivazione della telomerasi - e può condurre fino al 70% di riduzione del numero delle EPC (*Wang 2004; Imanishi 2004*). Le LDL ossidate danneggiano la differenziazione delle EPC VEGF-indotta attraverso la disattivazione dell'Akt (*Imanishi 2003*). Infine, i livelli plasmatici del colesterolo HDL e dei trigliceridi correlano positivamente con il numero delle unità formanti colonie EPC, ma non con il numero dei progenitori CD34/CD133 positivi (*Pellegatta 2006*).

**Figura 24. EPC ed endotelio**



**Iperensione.** Tra i diversi fattori di rischio, l'ipertensione sembra essere il più potente predittore del deterioramento della capacità migratoria delle EPC (*Vasa 2001*). L'angiotensina II diminuisce l'attività telomerasica nelle EPC ed accelera la senescenza delle stesse attraverso un incremento dello stress ossidativo. Pareri contrastanti esistono circa gli effetti dell'angiotensina II sulla proliferazione delle EPC in vitro. Nonostante l'angiotensina II abbia inibito la proliferazione delle EPC in uno studio, ha avvantaggiato la proliferazione VEGF-indotta delle EPC in un altro (*Imanishi 2004; Imanishi 2005*). L'angiotensina II potenzia inoltre la formazione della rete VEGF-indotta EPC, probabilmente attraverso un upregulation del KDR (*Imanishi 2005*).

**Diabete Mellito.** È questo un altro importante fattore di rischio cardiovascolare nel quale è stato descritto il deterioramento indotto dall'ischemia della

neovascolarizzazione (*Waltenberger 2001, Abaci 1999*). Il numero di EPC risulta ridotto sia nel diabete di tipo 1 che in quello di tipo II (*Loomans 2004; Tepper 2002*). Inoltre, la proliferazione delle EPC, l'adesione e le capacità angiogeniche sono compromesse nel corso di tale patologia (*Loomans 2004; Tepper 2002; Pistrosch 2005*), tanto da poter ritenere che la marcata disfunzione delle EPC possa svolgere un ruolo nella patogenesi delle complicazioni vascolari tipiche dei pazienti diabetici.

Le EPC possono facilitare l'angiogenesi mediante la secrezione paracrina di fattori angiogenici al fine di mobilitare i progenitori ossei ed attivare le cellule endoteliali mature (*Rehman 2003; Iba 2002*). Le colture EPC dei pazienti con diabete tipo I non solo ha evidenza di ridotta capacità angiogenica, ma contiene altresì un inibitore per la formazione del tubo in vitro (36). Stranamente, il diabete non era associato con una apoptosi accelerata in questo studio. Tepper et al. (*Tepper 2002*) hanno dimostrato un'incapacità delle cellule endoteliali mature di incorporarsi entro i tubuli nei diabetici tipo II. In entrambi gli studi il numero ridotto e la disfunzione delle EPC sono risultati correlati inversamente con i livelli di emoglobina A1c.

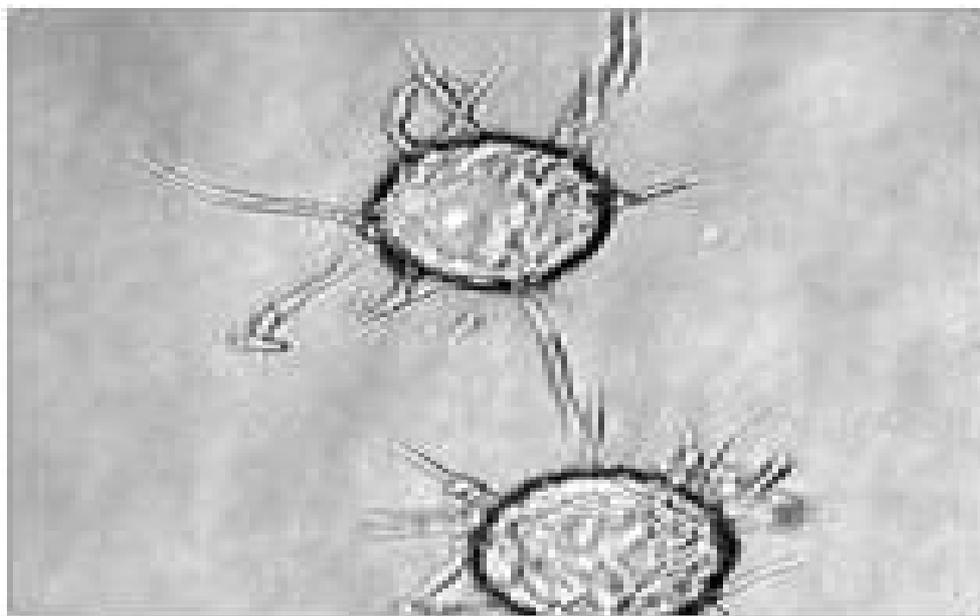
Maggiore evidenza dell'impatto negativo dell'iperglicemia sulle EPC è stata documentata da Kränkel et al. (*Kranke 2005*). Essi hanno dimostrato come la coltura di cellule mononucleate periferiche provenienti da donatori sani in iperglicemia fosse associata con una significativa riduzione nel numero delle EPC, un'inibizione della produzione di NO e dell'attività della metalloproteinasi-9 e con un deterioramento della capacità migratoria ed integrativa delle cellule.

**Altri fattori di rischio.** Il fumo è un predittore significativo di una riduzione dei progenitori endoteliali circolanti ed in coltura (*Vasa 2001*). Il numero di EPC circolanti correla inversamente con il numero di sigarette consumate (*Kondo 2004*). Inoltre le EPC dei fumatori accaniti muoiono prematuramente durante la fase precoce della coltura (*Kondo 2004*). Analogamente, la cessazione del fumo è associata con un aumento del numero delle EPC; questi cambiamenti sono più accentuati in coloro che hanno fumato di meno (*Kondo 2004*). Tuttavia, se si reinizia a fumare, il numero delle EPC diminuisce rapidamente ai livelli osservati prima dell'interruzione (*Kondo 2004*). Infine, gli effetti della

nicotina sulla attività e funzione delle EPC sembra essere dose-dipendente: quantità più basse di nicotina hanno un'influenza positiva sul numero delle EPC, sulla proliferazione, migrazione, e sulla vasculogenesi in vitro, con un picco di effetto ad una concentrazione nicotinic di 10.8 mol/l, simile a quella trovata nel sangue dei fumatori (*Wang 2004*). Tuttavia citotossicità è stata osservata a concentrazioni nicotiniche più alte (*Wang 2004*).

L'omocisteina sembra ridurre il numero e danneggiare l'attività delle EPC estratte dal sangue umano periferico (*Chen 2004*). La dimetilarginina asimmetrica (ADMA), un inibitore endogeno della NO sintasi, contribuisce alla disfunzione endoteliale e all'inibizione dell'angiogenesi ed è un biomarker di eventi cardiaci avversi futuri o di morte (*Schnabel 2005*). I livelli circolanti di ADMA correlano inversamente con il numero di cellule progenitori e l'ADMA inibisce, almeno in vitro, la funzione delle EPC (*Thum 2005*).

**Figura 25.** Le cellule EPC alla microscopia elettronica



**Altri disordini.** Un numero ridotto di EPC si riscontra nei pazienti con disfunzione erettile (*Foresta 2005*), in quelli con stenosi intrastent (*George 2003*) e nei pazienti trapiantati con vasculopatia (*Simper 2003*). Il numero di EPC non sembra essere associato di per sé con il grado di aterosclerosi

cerebrovascolare (*Taguchi 2004*). Tuttavia i livelli di EPC sono significativamente diminuiti nei pazienti dopo stroke (*Ghani 2005*) ed in quei pazienti aterosclerotici (compresi quelli senza stroke clinico) in cui siano state riconosciute, per mezzo di tomografia ad emissione di positroni (PET), aree di infarto cerebrale (*Taguchi 2004*). In studi successivi il numero di EPC si è dimostrato correlato con il flusso sanguigno regionale in aree dell'encefalo cronicamente ipoperfuse (*Taguchi 2004*).

## TEMA DI RICERCA 1

### **Studio delle alterazioni dei progenitori delle cellule endoteliali nella cardiopatia ischemica: l'influenza di età, genere e funzione ventricolare sinistra**

#### ***Il ruolo delle EPC nell'aterosclerosi coronarica***

Le EPC svolgono un ruolo ben definito in numerose situazioni extra-cardiache caratterizzate da un'anomala neoformazione di vasi, quali la retinopatia diabetica o l'angiogenesi tumorale. Diversi studi hanno dimostrato un'associazione fra alti livelli di EPC ed il rischio di sviluppare determinati tumori, come ad esempio il mieloma multiplo. In più, studi su animali hanno mostrato che le EPC derivate dal midollo osseo partecipano attivamente alla angiogenesi tumorale, favorendo la crescita neoplastica.

Negli anni più recenti, l'attenzione è stata concentrata sul ruolo che le EPC rivestono nell'apparato cardiovascolare.

L'apoptosi delle cellule dell'intima e della media è un fenomeno distruttivo per la parete vascolare arteriosa che contribuisce a promuovere lo sviluppo di aterosclerosi e trombosi (*Andreotti, 2005*). Per contro, la capacità della parete arteriosa di tutelarsi, contrastando l'apoptosi e di auto-ripararsi in maniera rapida e completa a seguito di un'eventuale lesione, sta emergendo come possibile elemento cruciale nella prevenzione dei disturbi aterotrombotici.

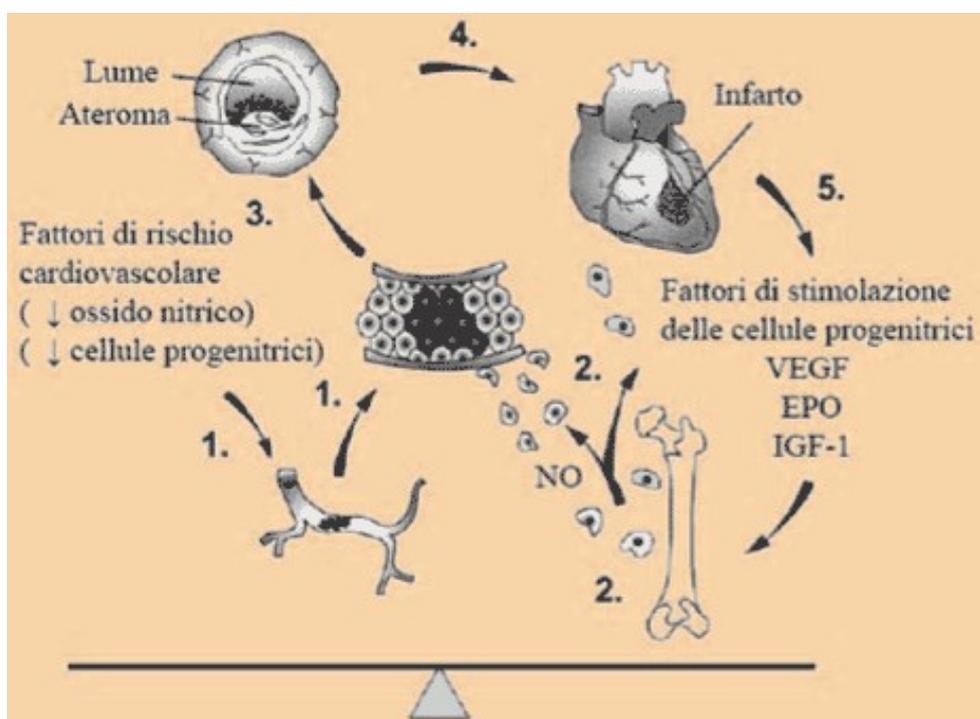
Il recupero dell'endotelio disfunzionale è stato messo in relazione al numero di EPC circolanti (*Hill JM, 2003*), essendo queste in grado di differenziarsi e di riendotelizzare le aree vascolari danneggiate da insulti chimici, meccanici o autoimmuni (*Szmitko PE, 2003*). Il numero di EPC, a sua volta, dipende dalla capacità del midollo osseo o di altri tessuti di produrre e immettere nel sangue le cellule staminali/progenitrici. Questo processo avviene in risposta a fattori di crescita, quali il VEGF, l'eritropoietina e l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (*Conti E, 2004*).

Esperienze recenti indicano che la mobilitazione di EPC dal midollo osseo richiede la nitrossido-sintasi endoteliale (*Andreotti, 2005*). È possibile, quindi, che il nitrossido (tipicamente ridotto negli stati aterotrombotici o in presenza dei

tradizionali fattori di rischio cardiovascolare) e i fattori che stimolano i progenitori cellulari contribuiscano a rallentare il processo aterotrombotico promuovendo il recupero della parete vascolare lesa.

**Figura 26. Equilibrio fra danno e rigenerazione cardiovascolare.**

*I fattori di rischio cardiovascolare (associati a riduzione di NO e di cellule progenitrici) possono determinare danno cellulare e apoptosi (1). La biodisponibilità di cellule staminali potrebbe essere implicata nel recupero della parete vascolare lesa (2), arginando l'aterotrombosi (3) e le sue conseguenze (4). L'infarto miocardico induce la produzione di fattori di stimolo midollari (5), che presumibilmente sono coinvolti nel recupero del tessuto lesa. EPO indica eritropoietina, IGF-1, insulin-like growth factor-1; NO, ossido nitrico; VEGF, fattore di crescita endoteliale vascolare.*



Diverse evidenze concordemente testimoniano come la rigenerazione vascolare sia un efficace meccanismo di prevenzione dell'aterotrombosi. Tra questi: a. una relazione diretta tra funzione endoteliale e numero di cellule progenitrici endoteliali circolanti (*Andreotti, 2005*); b. una maggiore incidenza di morte per cause cardiovascolari tra i pazienti con malattia coronarica che presentano bassi livelli di EPC circolanti (*Werner, 2005*); c. un effetto protettivo del VEGF contro la restenosi arteriosa; d. la correlazione in studi prospettici tra

ridotti livelli circolanti di IGF-13 o insufficienza renale (quadro caratterizzato da ridotta sintesi di IGF-1 e di eritropoietina) e successivi eventi ischemici cardiovascolari; e. l'assenza di benefici clinici dopo somministrazione di analoghi della somatostatina (inibitori dei fattori di crescita) in pazienti affetti da cardiopatia ischemica (*Conti, 2004*). Poiché il danno e l'ischemia tessutale possono determinare un aumento delle concentrazioni plasmatiche di vari fattori di crescita, è probabile che gli elevati livelli circolanti di questi fattori durante la fase acuta di malattia aterotrombotica rappresentino una reazione secondaria al danno tessutale piuttosto che elementi causali per l'insorgenza della malattia stessa. In futuro rimane da chiarire se la stimolazione del potenziale rigenerativo individuale possa effettivamente ridurre l'incidenza di malattie aterotrombotiche.

**Angina cronica stabile.** Nonostante che i numeri dei progenitori cellulari CD34-/CD45- e CD133-/CD34- e delle EPC nei pazienti con cardiopatia ischemica cronica severa siano simili a quelli dei soggetti di controllo, la capacità funzionale in vitro delle MNC del midollo osseo è significativamente ridotta ed il trapianto delle stesse dai pazienti con cardiopatia ischemica nell'arto superiore ischemico di topi nudi ha mostrato una abilità marcatamente ridotta a ristabilire la perfusione tissutale (*Heeschen 2004; Massa 2005*).

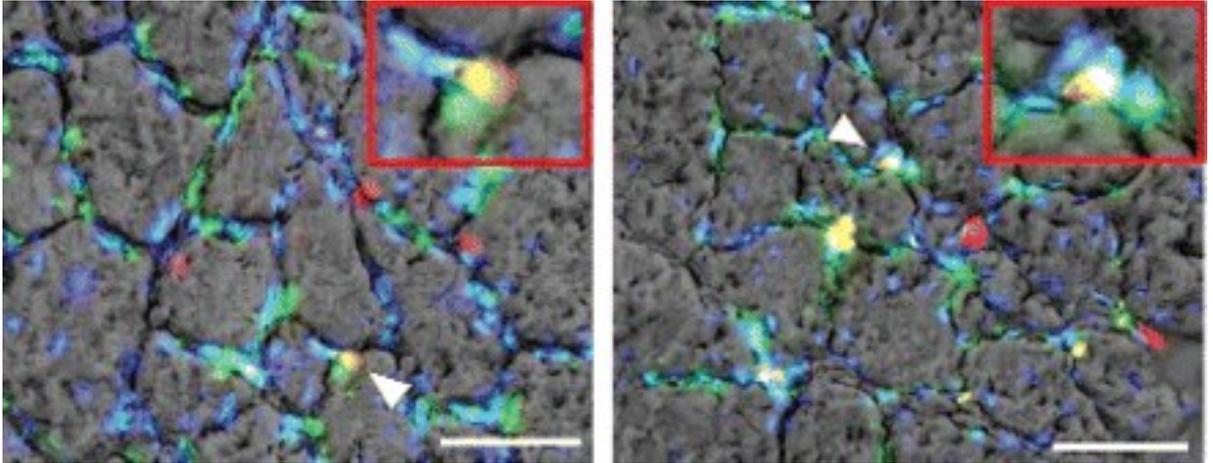
**Sindromi coronariche acute.** Nei pazienti con angina instabile, è stato osservato un aumento delle unità formanti colonie EPC, ma nessun cambiamento nelle proprietà adesive; tuttavia, il numero di EPC era ridotto di circa il 50% dopo la stabilizzazione clinica (*George 2004*). Correlazioni sono state anche notate tra i livelli di proteina C-reattiva (PCR) ed il numero di EPC circolanti, ma non con la loro capacità adesiva, suggerendo che l'infiammazione sistemica può giocare un ruolo nella mobilitazione delle EPC nei pazienti con angina instabile (*George 2004*). Al contrario, la PCR ha mostrato di inibire la proliferazione, la sopravvivenza, la differenziazione e la funzione delle EPC, suggerendo un possibile ruolo nello sviluppo della malattia cardiovascolare (*Verna 2004*). Nell'infarto miocardico il numero di EPC circolanti è marcatamente aumentato dalla fase precoce della malattia con livelli di picco al settimo giorno (*Massa 2005, Shintani 2001*). Successivamente, il numero di

EPC si riduce e diviene simile a quello dei soggetti di controllo entro 60 giorni (*Shintani 2001*). I livelli plasmatici di VEGF (un fattore di crescita associato con l'angiogenesi) sono strettamente correlati con il numero di EPC circolanti, con livelli di picco al giorno 7 (*Shintani 2001*). Questi dati mostrano il ruolo importante per il VEGF nella mobilitazione delle EPC nelle sindromi coronariche acute. Tuttavia, dato che la maggior parte dei pazienti con infarto miocardico acuto sono trattati con farmaci mobilizzanti le EPC, come statine o inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, il fattore primario che guida l'elevazione periferica delle EPC nell'infarto miocardico è incerto. Nel ratto, il numero e la funzione delle EPC erano depresse dopo infarto miocardico negli animali trattati con placebo, mentre il trattamento o con un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina o una statina era associato ad una stimolazione significativa del numero e dell'attività delle EPC (*Thum 2006*). Inoltre, le cellule staminali mesenchimali, che possiedono anche la potenzialità di differenziarsi in cellule endoteliali, sono diminuite al settimo giorno dopo ST Elevation Myocardial Infarction (STEMI) (*Wang 2006*).

Il ruolo funzionale delle cellule del midollo osseo nell'infarto miocardico può essere attribuito non soltanto alle loro proprietà angiogeniche e di rilascio di fattori di crescita e citochine, ma anche alla loro abilità a ristabilire la popolazione di cellule progenitrici cardiache tramite homing selettivi per aree specifiche di danno miocardico e tramite conversione a cellule con fenotipo cardiaco (*Mouquet 2005*). Le cellule ematopoietiche di derivazione dal midollo osseo possono generare cardiomiociti (anche se a bassa frequenza) entro il miocardio infartuato in alcuni modelli animali (*Nygren 2004*), nonostante altri non riescano a dimostrare la transdifferenziazione delle cellule staminali ematopoietiche nei miociti cardiaci dopo infarto miocardico (*Murry 2004*).

### **Figura 27. Identificazione delle EPC**

*Effetti dei fattori di rischio sul processo di eterogenesi e ruolo riparativo delle EPC*



## **EPC e cardiopatia ischemica: influenza dell'età**

La ricerca sulle cellule staminali sostiene la nozione che uno dei meccanismi in gioco nelle alterazioni vascolari proprie dell'età avanzata sia l'esaurimento delle cellule (Rauscher 2003), in particolare delle EPC (Scheubel 2003). La rarefazione di questa componente del midollo osseo parrebbe indurre uno squilibrio tra la sofferenza vascolare e la capacità di riparazione, con innesco dell'aterogenesi (Asahara, 1997). Come s'è detto, diversi studi hanno dimostrato che il numero delle EPC circolanti correla inversamente con i fattori di rischio per la malattia coronarica, quali fumo, familiarità, ipertensione, diabete mellito ed età (Vasa 2001; Tepper 2002; Hill 2003).

Tuttavia, il possibile legame tra EPC ed età permane poco noto, con risultati scientifici ancora scarsamente coerenti (Heiss 2005). Ciò potrebbe dipendere dal fatto dalla mancanza di criteri uniformi per l'identificazione delle EPC (Leor 2006) e dalla assenza di studi preliminari sulle differenti popolazioni di EPC presenti nei pazienti anziani. Nondimeno, l'opinione attuale è che esista una diminuzione associata alla senescenza nelle cellule staminali con potenziale rigenerativo, importante nello sviluppo della malattia cardiovascolare nell'anziano (Rauscher 2003).

In accordo con le premesse, scopo della nostra indagine è stato quello di indagare la numerosità delle EPC nel sangue periferico dei pazienti anziani per confrontarlo con quello di pazienti più giovani portatori di malattia coronarica.

### **Pazienti e Metodi**

Abbiamo studiato 30 pazienti consecutivi di  $\geq 65$  anni (21 uomini e 9 donne; età media:  $72 \pm 8$  anni; range: 65-82 anni) e 30 pazienti confrontabili per sesso di età  $< 65$  anni (21 uomini e 9 donne; età media:  $51 \pm 7$  anni; range: 40-64 anni). Sono stati inclusi nello studio i pazienti con storia di angina tipica da sforzo, test da sforzo positivo (ECG, scansione nucleare o ecocardiogramma da stress), ed indicazione all'esame coronarografico. I criteri di esclusione sono stati infarto miocardio acuto ( $< 3$  mesi), angina instabile, aumento dei markers di necrosi

miocardica oltre il limite superiore di normalità prima dell'esame coronarografico, un incremento degli enzimi epatici, frazione di eiezione ventricolare sinistra  $\leq 30\%$ , insufficienza renale con creatinina  $\geq 2$  mg/dL o storia di malattia epatica o muscolare. Inoltre sono stati esclusi i pazienti con chirurgia recente, malattia immunitaria, immunosoppressione/depressione, o trapianto d'organo.

Come popolazione di riferimento è stato selezionato un gruppo di 10 soggetti normali >65 anni, osservati per sospetto di cardiopatia ischemica, ma risultati normali all'esame coronarografico (6 uomini e 4 donne; età media:  $70 \pm 5$  anni; range: 65-80 anni). Nessuno dei controlli era affetto da malattia cardiaca o non cardiaca (cancro, malattia infiammatoria, patologia renale).

## **Risultati**

***Caratteristiche cliniche di base.*** I pazienti anziani e i giovani sono risultati ben confrontabili per età, sesso, fattori di rischio cardiovascolare e presentazione clinica (tutti presentavano angina stabile), funzione ventricolare sinistra, funzione renale e terapia medica al momento dell'esame coronarografico (Tabella 1/A).

***Angiografia coronarica quantitativa.*** Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi di soggetti in quanto a lesioni, sia significative che non significative: paragonabile era l'anatomia coronarica, il numero dei vasi malati, il numero di stenosi coronariche significative, i tipi di lesione e le caratteristiche delle stenosi (es. diametro minimo luminale, lunghezza e severità) (Tabella 1/B).

***Campioni sanguigni e citometria a flusso.*** L'analisi ematologica (Tabella 1/C) ha dimostrato nei 2 gruppi di pazienti una comparabile conta dei globuli bianchi e dei monociti; Inoltre, il numero assoluto di cellule CD34+/KDR+/CD45-, CD133+/KDR+/CD45-, CD105+/CD45-/CD34- e CD14+/CD45+ nei pazienti anziani non differiva da quella registrata nei pazienti giovani, nonché nel gruppo di controllo.

## **Discussione**

I risultati del nostro studio indicano che i numeri delle maggiori sottopopolazioni di EPC non sono diminuiti nei pazienti anziani con malattia coronarica rispetto ai pazienti più giovani con profilo di rischio simile.

**Il ruolo delle EPC.** Le EPC sono una popolazione eterologa di cellule di derivazione dal midollo osseo con proprietà simili a quelle degli angioblasti embrionali a differenti stadi di maturazione, le quali giocano un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi dell'endotelio nell'adulto (*Asahara 1997*). Conseguente che il numero delle EPC circolanti può determinare la capacità di riparazione del danno vascolare ed essere visto come un indice dello "stato di salute vascolare" (*Leor 2006*).

Il concetto popolare è che le EPC circolanti sono protettive e che la loro alterazione può rendere conto della disfunzione endoteliale e dell'aterosclerosi, comunemente osservata negli individui anziani (*Rauscher 2003*). Il ruolo delle EPC in relazione all'invecchiamento, tuttavia, permane materia di dibattito: a causa delle difficoltà nella loro identificazione, sono disponibili informazioni limitate sul numero delle EPC normalmente presente negli anziani (*Shantsila E 2007*). Inoltre, gli studi sin qui condotti sulle EPC negli anziani hanno considerato solo la popolazione di cellule staminali positive per i markers endoteliali (*Hill 2003; Heiss 2005*), ma non le altre sottopopolazioni di EPC che promuovono la vasculogenesi e lo sviluppo microvascolare (es. le cellule CD14+).

**EPC e malattia coronarica negli anziani.** I livelli delle EPC sono più bassi nella malattia coronarica e i modelli animali hanno mostrato che un decremento nel pool endogeno di progenitori cellulari può accelerare il corso dell'aterosclerosi (*Silvestre 2003; George 2005*). Si pensa ai fattori di rischio, ad iniziare dall'invecchiamento, come a determinanti del deterioramento aterosclerotico in cui siano implicate quantità e funzione delle EPC (*Vasa 2001; Tepper 2002; Hill 2003*). L'esposizione cronica a tali fattori di rischio e il danneggiamento delle cellule endoteliali che ne consegue richiede la loro continua sostituzione e, nello stesso tempo, influenza la mobilitazione, l'integrazione nei siti di danno vascolare e la capacità angiogenica delle EPC (*Shantsila 2007*).

Un ruolo nella diminuzione delle EPC è stato chiarito solo per alcuni fattori di rischio. Sono stati descritti i meccanismi molecolari che sottendono la riduzione delle cellule progenitori nell'ambito dell'iperlipidemia (*Imanishi 2004*) e dell'iperglicemia (*Krankel 2005*), mentre il ruolo dell'età rimane non definito.

In questo nostro studio abbiamo voluto verificare se il solo fenotipo età, in assenza di altre differenze nelle condizioni cardiovascolari, fosse associato a un declino nel numero delle EPC. I risultati hanno rivelato che l'età di per sé non è responsabile di modificazioni apprezzabili del numero dei sottotipi più rilevanti di EPC.

**Età ed EPC.** Il lavoro sperimentale ha proposto che il solo meccanismo plausibile per i cambiamenti vascolari nell'età avanzata è l'esaurimento nel numero delle EPC che può produrre un disequilibrio tra il danno vascolare e la sua riparazione portando perciò all'aterosclerosi (*Ross 1993*). Rauscher FM et al. in un modello di aterosclerosi nel topo hanno fornito la prima evidenza sperimentale che l'insulto cronico è associato all'esaurimento età correlato delle cellule di riparazione vascolare di derivazione dal midollo osseo (*Rauscher 2003*). In modo similare, nell'ambito clinico, l'età è stata inizialmente associata con un numero ridotto di EPC circolanti nei pazienti con malattia coronarica (*Scheubel 2003*). L'alterazione delle EPC può anche essere il risultato della loro senescenza accelerata ed apoptosi (*Hoffmann 2001*). I livelli ridotti di citochine angiogeniche e di mobilizzazione sono stati correlati con il deterioramento età dipendente della mobilizzazione delle EPC 'in vivo'. Invero, il fattore di crescita endoteliale vascolare e la produzione di ossido nitrico si è visto diminuire con l'età (*Aicher 2003*), e questi fattori giocano ruoli sinergici nella proliferazione e sopravvivenza delle EPC (*Aicher 2003*).

Esiste la possibilità, tuttavia, che la progressiva riduzione età-dipendente nelle EPC possa accelerare lo sviluppo dell'aterosclerosi solo in presenza di fattori di rischio (per es, l'ipercolesterolemia) (*Shantsila 2007*). In accordo a quanto detto, la riduzione progressiva delle EPC nei pazienti anziani potrebbe essere ascritta più correttamente all'inzieme di molteplici fattori di rischio che influiscono sulla mobilizzazione e sull'integrazione delle EPC nei siti di danno vascolare, piuttosto che come pura conseguenza dell'età.

Questo concetto moderno è supportato dai dati del nostro studio, così che non abbiamo trovato una differenza significativa nel numero totale di cellule staminali circolanti e nel pool di progenitori tra pazienti giovani e anziani e i controlli della maggior parte delle sottopopolazioni di EPC. I numeri di cellule positive per i markers endoteliali CD34, CD133 e CD105 erano comparabili nei pazienti anziani e giovani, così come non è stata trovata nessuna differenza nei numeri di cellule CD14+/CD45+ le quali sono associate con la neoangiogenesi (Rehman 2003; Guven 2006).

Queste scoperte confermano ed estendono le osservazioni recenti di Heiss et al. che hanno trovato una percentuale aumentata di cellule CD34+ negli anziani, ma, a causa del decremento nel numero di cellule mononucleate nei soggetti anziani, il numero totale di staminali circolanti non era significativamente differente (Heiss 2005). In aggiunta, i nostri risultati forniscono la prima evidenza che le persone anziane non risentono di alcun decremento nella sottopopolazione di EPC che hanno mostrato promuovere la vasculogenesi e lo sviluppo microvascolare (Rehman 2003; Guven 2006). Perciò, le nostre scoperte cambiano la convinzione corrente secondo cui l'età è associata con un declino progressivo nel numero delle EPC. Le implicazioni cliniche di questi nuovi dati appaiono rilevanti da un punto di vista terapeutico. Piuttosto che testare farmaci potenzialmente pericolosi per aumentare i livelli di EPC negli anziani (Dong 2007), i medici dovrebbero massimizzare i loro sforzi nel ridurre il peso dei fattori di rischio cardiovascolare, che giocano un ruolo più dimostrato nello sviluppo della malattia coronarica rispetto alle cellule staminali.

**Tabella 1/A. Fattori di Rischio, Caratteristiche Cliniche e Terapia Medica nei Pazienti Giovani ed Anziani**

	<b>Anziani</b>	<b>Giovani</b>	
	<b>≥65 anni</b>	<b>&lt; 65 anni</b>	<b>P</b>
	<b>(n=30)</b>	<b>(n=30)</b>	
<b><i>Fattori di rischio</i></b>			
Diabete mellito	6 (20%)	5 (17%)	NS
Iperensione sistemica	17 (57%)	15 (50%)	NS
Colesterolo totale >190 mg/dL	18 (60%)	17 (57%)	NS
Fumo	5 (17%)	7 (23%)	NS
Familiarità	6 (20%)	8 (27%)	NS
Precedente infarto miocardico	5 (17%)	6 (20%)	NS
<b><i>Caratteristiche Cliniche</i></b>			
CCS classe anginosa I o II	19 (63%)	21 (70%)	NS
CCS classe anginosa III o IV	11 (37%)	9 (30%)	NS
Frazione d'eiezione ventricolare sn (%)	56±10	52±11	NS
Creatinina (mg/dL)	1.2±0.5	1.0±0.4	NS
<b><i>Terapia medica</i></b>			
Aspirina	27 (90%)	25 (83%)	NS
Ticlopidina/clopidogrel	9 (30%)	8 (27%)	NS
Beta-Bloccanti	19 (63%)	24 (80%)	NS
ACE inibitori	14 (47%)	17 (57%)	NS
Calcio antagonisti	10 (33%)	13 (43%)	NS
Ipolipemizzanti	26 (87%)	25 (83%)	NS

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

CCS: Canadian Cardiovascular Society.

**Tabella 1/B. Caratteristiche Angiografiche Coronariche Quantitative di base e Caratteristiche Procedurali nei Pazienti Giovani ed Anziani**

	<b>Anziani ≥65 anni (n=30)</b>	<b>Giovani &lt;65 anni (n=30)</b>	<b>P</b>
<b>Lesioni coronariche non significative</b>			
N. di lesioni non significative/paziente	3.1±2.4	3.0±2.9	NS
▪ Pazienti con stenosi massima ≤20%	8 (27%)	7 (23%)	NS
▪ Pazienti con stenosi massima >20% <50%	18 (60%)	20 (67%)	NS
Vasi con stenosi non significative			NS
• 1-vaso	13 (43%)	11 (37%)	NS
• 2- o 3-vasi	15 (50%)	14 (47%)	NS
Arteria discendente anteriore	19 (63%)	21 (70%)	NS
Arteria circonflessa	10 (33%)	11 (37%)	NS
Arteria coronaria destra	12 (40%)	10 (33%)	NS
Diametro vasale di riferimento (mm)	3.19±0.49	3.07±0.51	NS
Diametro minimo luminale (mm)	1.90±0.44	1.92±0.39	NS
Diametro della stenosi (%)	32.2±10.3	31.1±10.8	NS
Lunghezza della lesione (mm)	13.5±7.8	15.5±9.8	NS
<b>Lesioni coronariche significative</b>			
N. di stenosi significative/paziente	1.39±0.51	1.44±0.57	NS
Vasi con ≥1 stenosi >50%			
• 1-vaso	20 (67%)	19 (63%)	1.000
• 2- o 3-vasi	10 (33%)	11 (37%)	1.000
Arteria discendente anteriore	17 (57%)	15 (50%)	0.307
Arteria circonflessa	7 (23%)	9 (30%)	0.770
Arteria coronaria destra	12 (40%)	13 (43%)	1.000
Diametro minimo luminale (mm)	0.56±0.27	0.53±0.29	0.680
Diametro della stenosi (%)	85.2±9.8	88.3±11.0	0.254
Lunghezza della lesione (mm)	11.1±5.1	13.1±4.6	0.116

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

**Tabella 1/C. Numeri delle EPC nei Due Gruppi di Pazienti e nei Soggetti di Controllo**

	<b>Anziani ≥65 anni (n=30)</b>	<b>Giovani &lt;65 anni (n=30)</b>	<b>Controlli &gt;65 anni (n=10)</b>	<b>P</b>
--	--	---	---	----------

Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /mL)	5.21±1.41	5.62±1.51	5.76±1.35	NS
Monociti (10 <sup>3</sup> /mL)	0.55±0.15	0.51±0.19	0.56±0.15	NS
CD34+/KDR+/CD45- (cellule/μL)	1.22±0.60	1.34±0.75	1.05±0.44	NS
CD133+/KDR+/CD45- (cellule/μL)	0.53±0.29	0.56±0.38	0.46±0.25	NS
CD105+/CD45-/CD34- (cellule/μL)	1.53±0.82	1.67±0.86	1.48±0.94	NS
CD14+/CD45+ (cellule/μL)	0.67±0.51	0.55±0.46	0.48±0.39	NS

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

## **EPC e differenze correlate al genere**

Differenze legate al genere, i cui meccanismi sono, ad oggi, solo parzialmente conosciuti, determinano differenze nello sviluppo, corso e prognosi della cardiopatia ischemica (*Vitale 2007*). Recentemente è emerso l'interesse per le EPC quali possibile fattore di rischio vascolare, evidentemente in relazione alla loro importanza per la funzione endoteliale e la progressione della malattia aterosclerotica (*Ghani 2005*).

Le EPC, intese come elemento attivo di riparazione del danno vascolare, potrebbero rendere conto della più lenta progressione verso la disfunzione endoteliale e l'aterosclerosi delle donne in premenopausa (*Vitale 2007*). Questo concetto è, al momento, largamente speculativo per la limitatezza delle informazioni disponibili circa il range normale di EPC nelle donne e negli uomini (*Fadini 2008; Hoetzer 2007*). Nessuna informazione è, altresì, disponibile sul numero delle EPC in donne e uomini con malattia coronarica, né se vi sia differenza tra donne in postmenopausa con e senza cardiopatia ischemica.

Muovendo da queste considerazioni, abbiamo considerato l'ipotesi che la cardiopatia ischemica nelle donne possa associarsi a specifiche modificazioni delle concentrazioni delle sottopopolazioni di EPC coinvolte nella riparazione vascolare. A questo scopo abbiamo confrontato, in relazione con le sottopopolazioni di EPC, donne normali in postmenopausa, donne con cardiopatia ischemica ed uomini di età confrontabili.

### **Pazienti e Metodi**

Abbiamo studiato 71 pazienti consecutivi di mezza età con cardiopatia ischemica (30 donne e 41 uomini; età media:  $57 \pm 5$  anni; range: 50-64 anni).

È stato selezionato un gruppo di controllo di 40 soggetti normali di mezza età venuti all'osservazione per sospetto di angina pectoris (20 donne in postmenopausa e 20 uomini; età media:  $58 \pm 6$  anni; range: 51-64 anni). I controlli sono stati sottoposti ad un work-up completo diagnostico, includente ecocardiografia, test da sforzo e coronarografia, con evidenza angiografica di

coronarie normali. Tutti i soggetti di controllo erano non-obesi, normotesi, non assumevano terapia medica e non presentavano malattie cardiache e non cardiache, quali cancro, malattie infiammatorie e renali. Le donne erano in menopausa da almeno 1 anno (range da 1 a 10 anni) e non avevano mai assunto la terapia ormonale sostitutiva o l'avevano sospeso almeno 1 anno prima dell'inizio dello studio.

## **Risultati**

***Caratteristiche cliniche di base.*** Le donne e gli uomini con cardiopatia ischemica sono risultati ben confrontabili per età, fattori di rischio cardiovascolare, presentazione clinica (tutti presentavano angina stabile), funzione ventricolare sinistra e terapia medica al momento della coronarografia (Tabella 1/D).

***Angiografia coronarica quantitativa.*** Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi: l'anatomia coronarica, il numero dei vasi malati, il numero di stenosi coronariche significative, i tipi di lesione e le caratteristiche delle stenosi (per es., il diametro minimo luminale, la lunghezza e la severità) è risultata comparabile in donne e uomini (Tabella 1/E).

***Prelievi sanguigni e citometria a flusso.*** L'analisi ematologica ha mostrato che donne e uomini con cardiopatia ischemica avevano simile conta dei globuli bianchi, mononucleati, e numeri assoluti di cellule CD34+/KDR+/CD45-, CD133+/KDR+/CD45-, CD105+/CD45-/CD34- e CD14+/CD45+ . Nei soggetti di controllo, di contro, sono stati osservati valori superiori di tutte le sottopopolazioni di EPC nelle donne normali in postmenopausa rispetto agli uomini normali raggruppati per età. Inoltre, i numeri assoluti di popolazioni EPC erano significativamente più alti nelle donne normali in postmenopausa rispetto alle donne in postmenopausa con cardiopatia ischemica (Tabella 1/F).

## **Discussione**

I risultati del nostro studio indicano che i numeri di sottopopolazioni di EPC non sono differenti tra le donne in postmenopausa e gli uomini coetanei con cardiopatia ischemica, mentre sono significativamente aumentati nelle donne normali in postmenopausa in confronto agli uomini di pari età.

**EPC e menopausa.** La menopausa rappresenta un fattore di rischio per la cardiopatia ischemica, poiché l'esaurimento della secrezione di estrogeni ha un effetto dannoso sulla funzione e sul metabolismo cardiovascolari (*Vitale 2007*). La menopausa determina o aggrava molti fattori di rischio tradizionali, quali la re-distribuzione del grasso corporeo da un pattern ginoide ad uno androide, una ridotta tolleranza al glucosio, anomalie nei lipidi plasmatici, aumento della pressione sanguigna, aumento del tono simpatico, disfunzione endoteliale ed infiammazione vascolare. Nonostante questi molteplici fattori di rischio, esistono chiare differenze di genere nell'epidemiologia, sintomi, diagnosi e progressione della cardiopatia ischemica nelle donne in postmenopausa, a riprova di un impatto differente dei fattori di rischio nei 2 sessi (*Rosano 2007*).

Nel nostro studio ci siamo concentrati sul quesito se il solo fenotipo 'genere femminile' senza altre differenze nelle condizioni cardiovascolari sia associato o meno a differenze nel numero delle EPC. I nostri risultati hanno dimostrato che il 'genere femminile' è associato ad un incremento nei numeri delle sottopopolazioni più rilevanti di EPC nella popolazione normale. Questa differenza fenotipica tra donne e uomini scompare quando l'aterosclerosi si sviluppa clinicamente, supportando perciò la nozione secondo cui un meccanismo potenziale per la disfunzione endoteliale e la progressione a cardiopatia ischemica possa essere costituito dal decremento nel numero delle EPC, con conseguente incapacità a mantenere e riparare il monostrato endoteliale (*Quyyumi 2004*).

I nostri risultati non concordano con quelli di Fadini e al. (*Fadini 2008*) che, recentemente, hanno dimostrato livelli maggiori di EPC nelle donne fertili rispetto agli uomini, ma non differenti tra donne sane in postmenopausa e uomini coetanei. Di contro, i nostri risultati confermano ed estendono le osservazioni recenti di Hoetzer e al. (*Hoetzer 2007*), che hanno riportato la

capacità di formare colonie e l'attività migratoria delle EPC essere marcatamente più cospicua nelle donne di mezza età rispetto agli uomini.

I livelli più alti di EPC nelle donne sane rispetto agli uomini sembrano rappresentare un meccanismo di genere di protezione cardiovascolare. L'evidenza che le differenze nelle EPC sono presenti nelle donne sane, ma non in quelle con cardiopatia ischemica, suggerisce che le cellule staminali diventano incapaci di giocare un ruolo protettivo quando l'aterosclerosi si è già sviluppata.

Nel loro insieme, le evidenze scientifiche che si stanno rendendo disponibili suggeriscono che le modificazioni numeriche e funzionali delle EPC possono contribuire alle differenze nella funzione endoteliale e negli eventi cardiovascolari correlate al genere (*Stauffer 2005*).

**Tabella 1/D. Fattori di rischio, Caratteristiche Cliniche, e Terapia Medica nelle Donne e negli Uomini con Cardiopatia Ischemica**

	<b>Cardiopatia Ischemica</b>		<i>P</i>
	<b>Donne (n=30)</b>	<b>Uomini (n=41)</b>	
<b><i>Fattori di rischio</i></b>			
Diabete mellito	5 (17%)	6 (15%)	NS
Ipertensione sistemica	15 (50%)	22 (54%)	NS
Colesterolo totale >190 mg/dL	18 (60%)	20 (49%)	NS
Fumo	6 (20%)	7 (18%)	NS
Familiarità	8 (27%)	8 (20%)	NS
Pregresso infarto miocardico	5 (17%)	7 (18%)	NS
<b><i>Caratteristiche cliniche</i></b>			
CCS classe anginosa I o II	20 (67%)	28 (68%)	NS
CCS classe anginosa III o IV	10 (33%)	13 (32%)	NS
Frazione d'eiezione ventricolare sn (%)	54±9	55±10	NS
Creatinina (mg/dL)	1.1±0.4	1.2±0.5	NS
<b><i>Terapia Medica</i></b>			
Aspirina	28 (93%)	38 (93%)	NS
Ticlopidina/clopidogrel	10 (33%)	15 (37%)	NS
Beta-Bloccanti	20 (67%)	39 (80%)	NS
ACE inibitori	17 (57%)	20 (49%)	NS
Calcio antagonisti	9 (30%)	16 (39%)	NS
Ipolipemizzanti	24 (80%)	35 (85%)	NS

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

CCS: Canadian Cardiovascular Society.

**Tabella 1/E. Caratteristiche Angiografiche Coronariche Quantitative di Base e Caratteristiche Procedurali nelle Donne e negli Uomini con Cardiopatia Ischemica**

	<b>Cardiopatia Ischemica</b>		<b>P</b>
	<b>Donne (n=30)</b>	<b>Uomini (n=41)</b>	
<b><i>Lesioni coronariche significative</i></b>			
N. di stenosi significative/paziente	1.55±0.71	1.49±0.68	NS
Vasi con ≥1 stenosi>50%			
• 1-vaso	16 (53%)	21 (51%)	NS
• 2- o 3-vasi	13 (43%)	20 (49%)	NS
Arteria discendente anteriore	15 (50%)	22 (54%)	NS
Arteria circonflessa	8 (27%)	13 (32%)	NS
Arteria coronaria destra	13 (43%)	17 (41%)	NS
Diametro minimo del lume (mm)	0.51±0.29	0.59±0.28	NS
Diametro della stenosi (%)	89.5±10.8	86.4±11.9	NS
Lunghezza della lesione (mm)	14.9±7.1	15.7±6.6	NS
I valori sono espressi come media ± deviazione standard.			

**Tabella 1/F. Numeri di EPC nelle Donne e negli Uomini con Cardiopatia Ischemica e nelle Donne e negli Uomini Normali**

	<u>Coronary artery disease</u>		<i>P</i>	<u>Normal controls</u>		<i>P</i>
	<b>Donne</b> <b>(n=30)</b>	<b>Uomini</b> <b>(n=41)</b>		<b>Donne</b> <b>(n=20)</b>	<b>Uomini</b> <b>(n=20)</b>	
			<i>donne</i> <i>versus</i> <i>uomini</i>			<i>donne</i> <i>versus</i> <i>uomini</i>
Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /mL)	5.51±1.91	5.92±1.81	NS	5.61±1.11	5.75±1.25	NS
Monociti (10 <sup>3</sup> /mL)	0.65±0.25	0.61±0.29	NS	0.66±0.23	0.58±0.18	NS
CD34+/ KDR+/CD45- (cellule/μL)	1.32±0.70	1.44±0.85	NS	1.71±0.56 *	1.20±0.48	0.004
CD133+/KDR+ /CD45- (cellule/μL)	0.63±0.27	0.66±0.31	NS	0.82±0.27 *	0.59±0.21	0.005
CD105+/CD45- /CD34- (cellule/μL)	1.63±0.52	1.77±0.76	NS	1.93±0.51 *	1.51±0.54	0.02
CD14+/CD45+ (cellule/μL)	0.69±0.49	0.65±0.49	NS	0.97±0.41 *	0.58±0.31	0.002

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

\* P<0.05 versus i valori corrispondenti nelle donne con cardiopatia ischemica

## **EPC nell'insufficienza cardiaca di origine ischemica**

Il legame tra EPC e disfunzione del ventricolo sinistro (VS) permane poco conosciuto, anche perché gli studi precedenti hanno prodotto risultati opposti a questo riguardo (*Valgimigli 2004; Kissel 2007; Theiss 2007; Michowitz 2007*). Possibili spiegazioni includono la mancanza di criteri uniformi per identificare precisamente le EPC (*George 2003; Leor 2006*), e la mancata valutazione, negli studi precedenti, delle differenti sottopopolazioni di EPC nello scompenso cardiaco.

Abbiamo voluto verificare se i numeri delle più comuni sottopopolazioni di EPC nel sangue periferico siano differenti nei pazienti con malattia coronarica con o senza disfunzione VS.

### **Pazienti e Metodi**

Abbiamo studiato 68 pazienti consecutivi (37 uomini, età  $60 \pm 18$  anni) con cardiopatia ischemica.

È stato selezionato un gruppo di controllo costituito da 20 soggetti normali (13 uomini e 7 donne; età media:  $58 \pm 9$  anni; range: 45-80 anni). I controlli, esaminati per il sospetto di angina pectoris, sono stati sottoposti ad un work-up diagnostico completo, comprendente ecocardiografia, stress test e coronarografia. Nessuno dei controlli è risultato affetto da malattia cardiaca o non cardiaca, come cancro, malattie infiammatorie, e renali.

### **Risultati**

All'ingresso nello studio, la frazione o d'eiezione VS stimata all'ecocardiogramma è risultata  $\leq 45\%$  in 22 pazienti e  $>45\%$  nei rimanenti 46 pazienti. I pazienti con e senza disfunzione VS sonerano stati equilibrati tra loro in relazione ad età, sesso, classe anginosa e fattori di rischio cardiovascolari al momento dello studio. All'ecocardiografia, le dimensioni telediastoliche VS erano simili nei 2 gruppi (Tabella 1/G). Egualmente, i 2 gruppi avevano una

comparabile estensione e localizzazione della cardiopatia ischemica e non differivano quanto al trattamento medico (Tabella 1/H).

L'analisi ematologica (Tabella 1/I) ha mostrato che i 2 gruppi avevano simili conta dei bianchi e delle cellule monucleate. Il numero assoluto di cellule CD34+/KDR+/CD45- e CD133+/KDR+/CD45- erano significativamente ( $P<0.05$ ) più alte nei pazienti con disfunzione VS rispetto ad i pazienti con funzione normale od ai controlli sani. All'opposto, le cellule CD14+/CD45+ erano significativamente ( $P=0.005$ ) più basse nei primi pazienti rispetto ai secondi, mentre non erano state notate differenze significative tra i gruppi nel numero di cellule positive per il CD105.

L'analisi di regressione lineare ha svelato una sottile ma significativa correlazione negativa tra la frazione VS ed i numeri sia di cellule CD34+/KDR+/CD45- ( $r=0.46$ ,  $P<0.05$ ) che di CD133+/KDR+/CD45- ( $r=0.50$ ,  $P<0.05$ ), mentre vi era una correlazione negativa, non significativa, tra la frazione d'eiezione VS, le cellule CD105+/CD45-/CD34- ( $r= -0.17$ , NS) e le cellule CD14+/CD45+ ( $r=0.24$ , NS).

## **Discussione**

I presenti risultati indicano che le sottopopolazioni di EPC hanno un comportamento discordante nei pazienti con disfunzione VS ischemica: in particolare, le cellule positive per i markers endoteliali CD34 e CD133 risultano aumentate e le cellule che promuovono la vasculogenesi e lo sviluppo microvascolare significativamente ridotte.

***Il significato delle EPC nella disfunzione VS.*** La relazione tra EPC e disfunzione VS rimane materia di discussione. A causa delle difficoltà nelle loro identificazione, informazioni limitate sono disponibili circa il range normale di EPC nello scompenso cardiaco (*Wang 2006*). Inoltre, la maggior parte degli studi precedenti sono stati inficiati dalla loro natura retrospettiva e dalla mancanza di criteri uniformi per identificare precisamente le EPC. La ricerca si è concentrata principalmente sulle cellule positive per i markers endoteliali CD34, una molecola di adesione espressa sulla cellula staminale ematopoietica (*Fina 1990*) e CD133, un antigene di superficie proposto come il marker più

appropriato per le EPC in quanto non espresso dall'endotelio maturo (*Salven 2003*). Di contro, pochi dati esistono sul significato fisiopatologico delle altre sottopopolazioni di cellule progenitrici/staminali. In particolare, nessuno studio precedente ha valutato nei pazienti con disfunzione VS le altre sottopopolazioni di EPC, quali quelle che promuovono la vasculogenesi e lo sviluppo microvascolare (es. CD14+) (*Rehman 2003*).

In base a tali premesse, abbiamo indirizzato la nostra attenzione verso la sottopopolazione di cellule staminali circolanti putative mesenchimali CD45 e CD34 negative, ma esprimenti l'antigene CD105 (*Heiss 2005*), quali quelle maggiormente coinvolte nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni (*Reyes 2002*). Abbiamo, inoltre, studiato l'altra popolazione cellulare angiogenica di cellule CD34- CD14+ (*Guyen 2006*), esprimenti alcuni markers associati con i monociti/macrofagi maturi, ma non CD34 o CD133, pertanto senza capacità progenitrice endoteliale.

***EPC, cardiopatia ischemica e scompenso cardiaco.*** È stato dimostrato negli anni passati che le EPC circolanti sono coinvolte nei processi di rimodellamento VS che conducono allo scompenso cardiaco (*Aicher 2003*). Più di recente, i pazienti con cardiomiopatia ischemica e non ischemica hanno rivelato popolazioni più rade di EPC rispetto ai controlli sani (*Kissel 2007*). Di conseguenza, l'incremento complessivo del numero e della funzione delle cellule staminali è stato proposto come un approccio terapeutico per migliorare la funzione VS nei pazienti con insufficienza cardiaca di origine ischemica (*Schachinger 2004*).

I risultati presenti sembrano contraddire questa ipotesi. Infatti, non abbiamo potuto dimostrare una diminuzione della maggior parte delle EPC circolanti, ma solo della sottopopolazione coinvolta nella neoangiogenesi. Questi dati estendono i risultati precedentemente ottenuti da Valgimigli e al (*Valgimigli 2004*) e da Theiss e al (*Theiss 2007*) che avevano riscontrato numeri relativamente più alti di cellule del sangue periferico CD34+/KDR+/CD45- nell'insufficienza cardiaca da lieve a moderata e forniscono la prima evidenza che i pazienti con disfunzione VS possono subire un decremento nelle cellule angiogeniche.

Una implicazione clinica di questa informazione è il suggerimento alla ricerca futura di sviluppare trattamenti per l'implementazione dell'angiogenesi cellulo-mediata nella disfunzione VS di natura ischemica [Shantsila 2007], piuttosto che testare potenziali e pericolose strategie per accrescere il pool complessivo di EPC [Dong 2007].

**Tabella 1/G. Caratteristiche cliniche, elettrocardiografiche ed ecocardiografiche nei pazienti con e senza disfunzione ventricolare sinistra**

<b>Caratteristiche</b>	<b>Disfunzione VS (n=22)</b>	<b>Normale funzione VS (n=46)</b>	<b>P</b>
Età (anni)	61±11	60±16	NS
Uomini	15 (68%)	30 (65%)	NS
Classe CCS	2.4±0.7	2.2±0.6	NS
Classe funzionale NYHA			
II	10 (45%)	10 (22%)	<0.01
III o IV	12 (55%)	-	
Iperensione sistemica	10 (45%)	17 (37%)	NS
Ipercolesterolemia	13 (59%)	25 (54%)	NS
Diabete	5 (23%)	9 (20%)	NS
Fumo	5 (23%)	11 (24%)	NS
Pregresso infarto miocardico	13 (59%)	20 (44%)	NS
<b>Ecocardiografia</b>			
Diametro telediastolico VS (mm)	54±9	53±8	NS
Diametro telesistolico VS (mm)	38±8	23±7	NS
Frazione d'eiezione VS (%)	35±9	60±12	<0.0001
Wall motion score index	1.64±0.21	1.11±0.14	<0.0001

I valori sono espressi come media (± DS) o numero (%).

CCS: Canadian Cardiovascular Society; VS: ventricolo sinistro; NYHA: New York Heart Association.

**Tabella 1/H. Dati dell'angiografia coronarica quantitativa, e trattamento medico nei due gruppi di pazienti**

<b>Caratteristiche</b>	<b>Disfunzione VS (n=22)</b>	<b>Normale funzione VS (n=46)</b>	<b>P</b>
Estensione della malattia			
▪ Malattia del singolo vaso	9 (41%)	17 (37%)	NS
▪ Malattia multivasale	13 (59%)	29 (63%)	NS
Vasi malati			
▪ Coinvolta la DA	14 (64%)	32 (69%)	NS
▪ Coinvolta la CX	11 (50%)	23 (50%)	NS
▪ Coinvolta la CD	13 (59%)	28 (61%)	NS
Farmaci:			
▪ ACE-inibitori	16 (73%)	35 (76%)	NS
▪ Aspirina	3 (14%)	7 (15%)	NS
▪ Beta-bloccanti	14 (64%)	33 (72%)	NS
▪ Diuretici	19 (86%)	30 (65%)	NS
▪ Calcio-antagonisti	3 (14%)	7 (15%)	NS
▪ Statine			

I valori sono espressi come media ( $\pm$  DS) o numero (%).

ACE: Enzima di conversione dell'angiotensina; DA: discendente anteriore; Cx: left circumflex artery; CD: coronaria destra.

**Tabella 1/I. Numeri di cellule progenitrici endoteliali nei pazienti con e senza disfunzione ventricolare sinistra e nei controlli sani**

<b>Caratteristiche</b>	<b>Disfunzione VS (n=22)</b>	<b>Normale funzione VS (n=46)</b>	<b>Controlli sani (n=20)</b>	<b>P ANOVA</b>
Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /mL)	5.75±1.92	5.99±1.71	5.16±1.85	NS
Monociti (10 <sup>3</sup> /mL)	0.65±0.35	0.59±0.29	0.55±0.25	NS
CD34+/ KDR+/CD45- (cellule/μL)	1.59±0.36 *	1.31±0.51	1.29±0.39	<0.05
CD133+/KDR+/CD45- (cellule/μL)	0.66±0.31 *	0.46±0.35	0.41±0.35	<0.05
CD105+/CD45-/CD34- (cellule/μL)	1.67±0.52	1.55±0.66	1.58±0.65	NS
CD14+/CD45+ (cellule/μL)	0.52±0.31 *	0.75±0.46	0.82±0.38	<0.05

I valori sono espressi come media (± DS).

ANOVA: analisi della varianza; VS: ventricolo sinistro

\*p<0.05, di paragone con i pazienti con frazione ventricolare sinistra normale ed i controlli sani

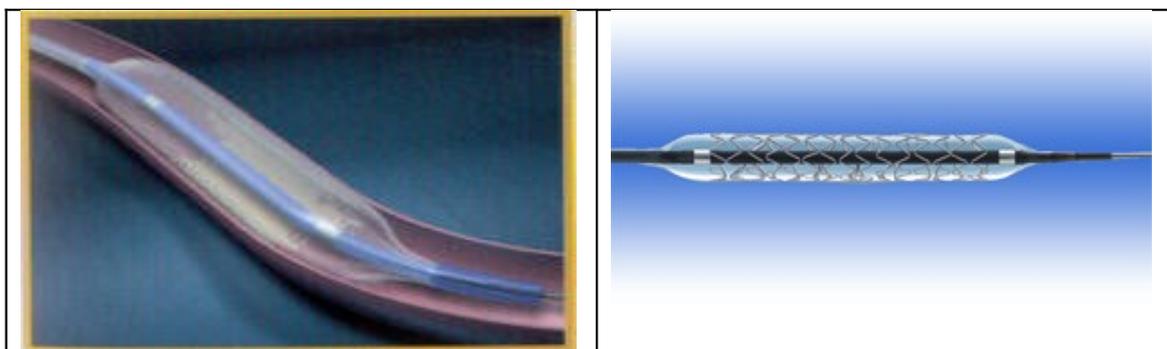
## TEMA DI RICERCA 2

### **Restenosi post-angioplastica versus progressione dell'aterosclerosi coronarica: studio del ruolo fisiopatologico dei progenitori delle cellule endoteliali**

#### **Il 'Background della ricerca'**

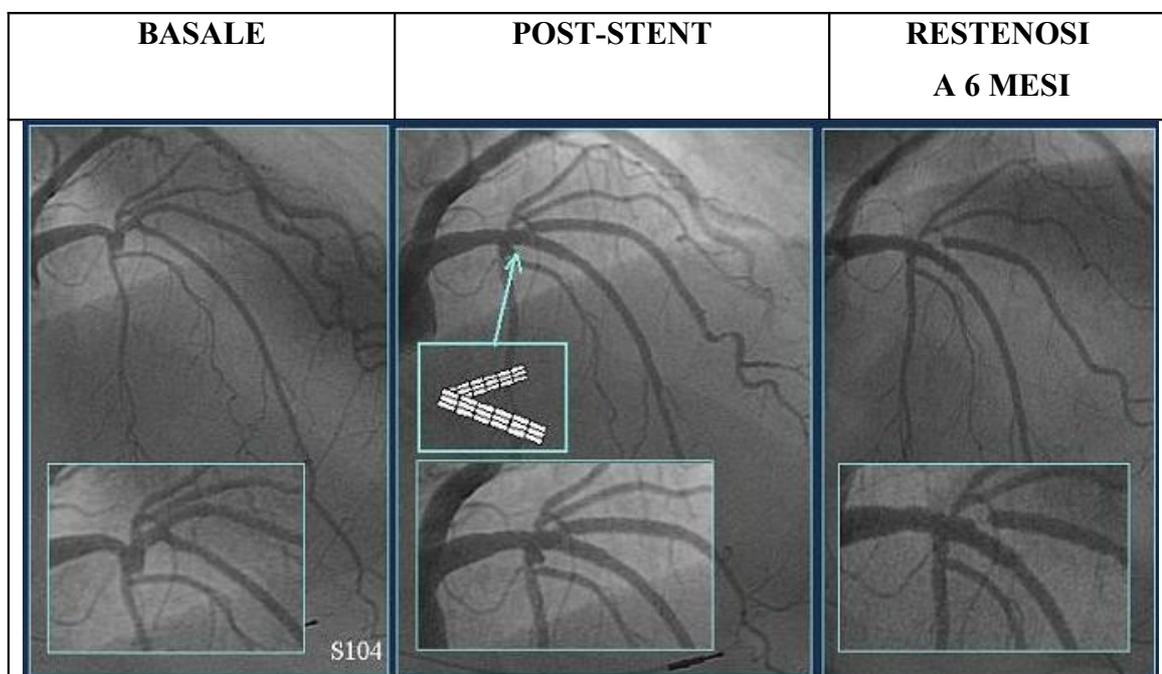
**Angioplastica coronarica e stent.** La dilatazione delle arterie coronariche stenotiche mediante angioplastica percutanea con o senza successivo impianto di stent è un trattamento ormai di comune impiego nei pazienti con cardiopatia ischemica cronica o acuta. L'introduzione di tale tecnica ha radicalmente modificato il comportamento in corso di sindromi estremamente diffuse come l'infarto miocardico acuto, l'angina pectoris stabile ed instabile.

**Figura 28.** Il pallone per angioplastica coronarica



**Restenosi coronarica post-angioplastica.** Il principale limite delle metodiche di rivascolarizzazione coronarica percutanea è rappresentato dalla restenosi, che ancora oggi, dopo oltre 25 anni dall'esecuzione del primo intervento e nonostante i notevoli progressi tecnologici conseguiti, continua a rappresentare il fattore condizionante il beneficio clinico a medio termine della procedura.

**Figura 29. Esempio di angioplastica coronarica con impianto di stent**



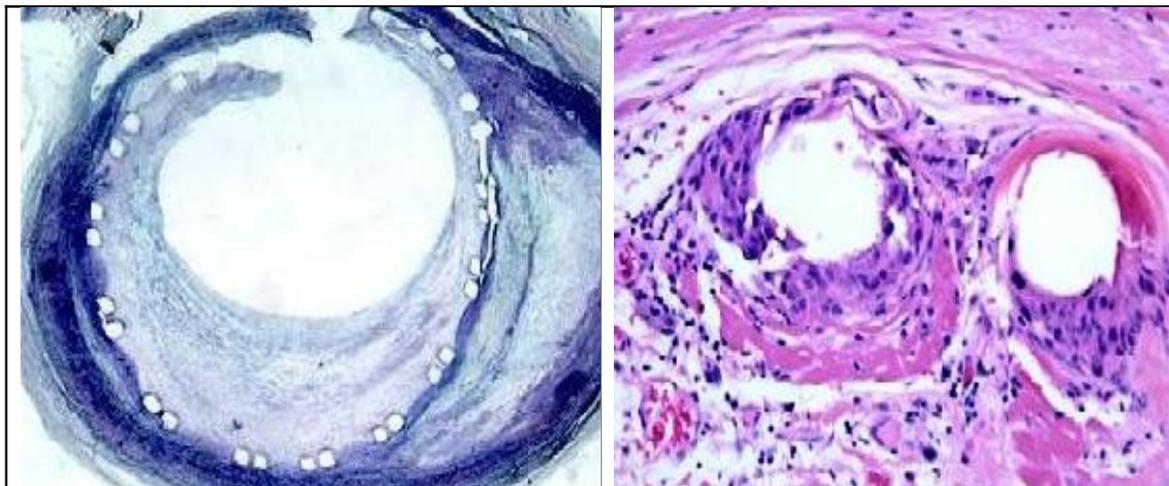
La restenosi è un fenomeno progressivo che inizia nelle primissime ore dopo l'intervento, si completa nei 3-6 mesi successivi ed è ascrivibile al variabile intrecciarsi di tre meccanismi patogenetici principali:

- 1) il ritorno elastico precoce (*recoil*), (*Fischell TA, 1988; Rozenman Y, 1993*)
- 2) il rimodellamento avventiziale (*Mintz GS, 1996; Currier JW, 1996*),
- 3) la proliferazione neointimale (*Hoffmann R, 1996*).

L'impianto di stent è in grado di eliminare le due componenti meccaniche del processo (*recoil* e rimodellamento), ma non la proliferazione intimale, che, al contrario, risulta particolarmente accentuata rispetto ad altre tecniche di trattamento percutaneo.

La restenosi intra-stent oscilla tra il 10 ed il 50% dei casi e rappresenta la limitazione principale dell'efficacia a lungo termine dello stent coronarico. In circa il 50-60% dei casi, la comparsa di restenosi all'interno dello stent si accompagna a recidiva di ischemia, la quale potrà richiedere un nuovo intervento di rivascolarizzazione.

**Figura 30. Quadro istologico di restenosi intra-stent**



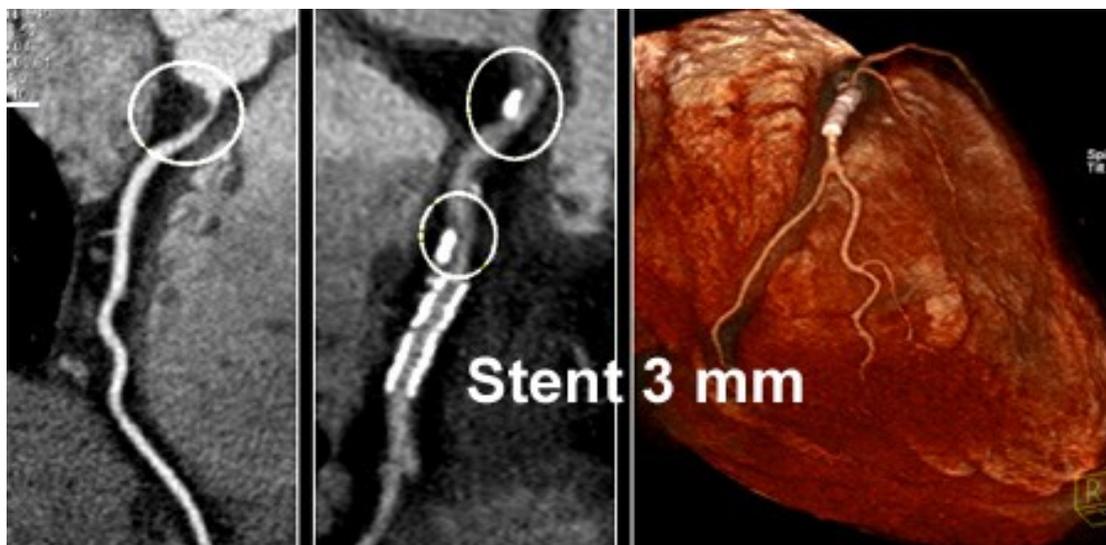
Varie situazioni clinico-demografiche sono state ripetutamente individuate in differenti studi come condizioni favorevoli lo sviluppo di restenosi intra-stent. Il diabete mellito, l'insufficienza renale cronica in trattamento dialitico (*Dambrin G, 1998*), il sesso femminile e l'età avanzata (*Antoniucci D, 1998*) rappresentano le condizioni più frequentemente citate. Di queste tuttavia solo il diabete è segnalato in quasi tutte le casistiche. Inoltre, la maggiore ricorrenza di restenosi è probabilmente ascrivibile alla coesistenza di :

- Fattori angiografici sfavorevoli, quali lesioni coronariche diffuse e calcifiche, specie negli anziani e/o nei dializzati
- Trattamento di vasi di piccolo calibro, caratteristica più facilmente riscontrabile nel sesso femminile
- Morfologia e sede della lesione (specie nelle lesioni di tipo B2 e di tipo C)
- Fattori procedurali (inadeguata espansione dello stent)

Va tuttavia osservato che solo una parte delle restenosi può essere prevista sulla base di modelli matematici che fanno riferimento a queste variabili (*Kasaoka S, 1998*), mentre la maggior parte di esse si sviluppa in situazioni con rischio non particolarmente elevato. Come spiegazione viene ipotizzato che alcuni fattori individuali assumono un ruolo rilevante nel condizionare la risposta locale all'impianto dello stent. La quasi totalità di tali fattori, al di là delle

condizioni cliniche già citate, è sconosciuta, ma diverse, importanti segnalazioni segnalano la rilevanza del problema.

**Figura 31. Studio di uno stent coronarico mediante cardio-T.C.**



Il riconoscimento dei fattori individuali potrebbe rappresentare un elemento decisivo per una precisa quantificazione del rischio di restenosi e potrebbe migliorare i criteri di selezione dei pazienti da avviare a trattamento percutaneo.

**EPC e restenosi coronarica.** Il danno vascolare indotto dalla procedura di angioplastica con impianto di stent coronarico stimola un processo di riparazione e rimodellamento arterioso che coinvolge la migrazione e la proliferazione di cellule muscolari lisce vascolari con conseguente iperplasia neointimale (*Pauleto P, 1994*). Infatti, la

compromissione dell'integrità endoteliale porta a una concomitante riduzione nella produzione di mediatori vasoprotettivi, quali l'ossido nitrico e la prostaciclina e a un aumento delle sostanze vasocostrittrici e dei fattori di crescita, con conseguente aumento del tono vascolare, incremento dell'adesione piastrinica, esaltata infiammazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce della tonaca media. La perdita di cellule endoteliali costituisce uno dei fattori che contribuisce maggiormente alla riparazione patologica dei

vasi sanguigni danneggiati. Ciò spiega perché abbia iniziato a diffondersi la convinzione che le EPC, ovvero proprio i progenitori di tali cellule, svolgano un ruolo decisivo nel processo di restenosi coronarica.

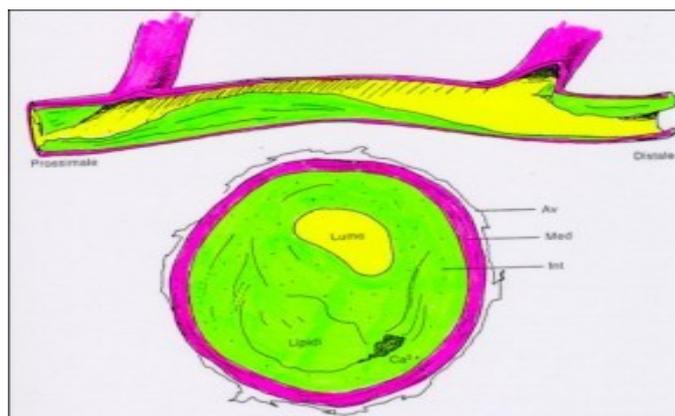
**Aterosclerosi coronarica.** L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica delle **arterie** di grande e medio calibro. Anatomicamente, la lesione caratteristica dell'aterosclerosi è l'**ateroma** o placca aterosclerotica, ossia un ispessimento dell'intima delle arterie dovuto principalmente all'accumulo di materiale lipidico e a proliferazione del **tessuto connettivo**.

**Figura 32. Aterosclerosi coronarica: Gli aspetti istologici**



Le lesioni, che hanno come caratteristica specifica la componente lipidica più o meno abbondante, si evolvono con il tempo: iniziano nell'infanzia come strie lipidiche (a carattere reversibile) e tendono a divenire vere e proprie placche aterosclerotiche, che nelle fasi avanzate possono restringere il lume arterioso oppure ulcerarsi e complicarsi con una trombosi sovrapposta, che può portare ad una occlusione dell'arteria.

**Figura 33. Schema di aterosclerosi coronarica**  
*Rappresentazione schematica del processo di aterosclerosi*



### Gli obiettivi della ricerca

Gli studi sul legame tra EPC e aterosclerosi hanno prodotto risultati conflittuali. Invero, è già materia di dibattito se l'estensione e la severità della malattia coronarica siano associate con un numero ridotto (*Scheubel 2003; Heiss 2005*) o, piuttosto, aumentato (*George 2003*) di EPC. Rimane non chiaro se queste cellule esercitino effetti favorevoli o sfavorevoli sui siti di PCI (*Kipshidze 2004*). Si deve notare, tuttavia, che molti studi sin qui condotti hanno preso in considerazione l'intera popolazione di EPC (*George 2003*), mentre l'attuale evidenza indica che tra le cellule circolanti esistono popolazioni con markers fenotipici distinti e, potenzialmente, con ruoli distinti (*Guyen 2006*). Inoltre, nessuno studio precedente si è focalizzato sulla relazione tra EPC e successiva evoluzione dell'aterosclerosi coronarica: lo sviluppo di lesioni "de novo" e di restenosi post-PCI, fisiopatologicamente dissimili, non sono state esaminate a confronto e nel tempo.

Per sopperire a questo limite, il nostro studio ha inteso testare l'ipotesi secondo cui le sottopopolazioni di EPC circolanti al momento del PCI siano differenti tra i pazienti che hanno successivamente mostrato progressione dell'aterosclerosi coronarica e quelli che hanno sviluppato restenosi intra-stent.

### Pazienti e Metodi

**Popolazione studiata.** Sono stati inclusi tutti i pazienti sottoposti a PCI elettivo ed un successivo PCI singolo o multivasale tra il 1° Giugno 2005 e il 31 Maggio 2006. I criteri di inclusione sono stati la presenza di angina da sforzo tipica, test

da sforzo positivo, ed indicazione per PCI all'esame coronarografico. I pazienti venivano considerati candidati ideali solo se una rivascolarizzazione completa delle stenosi clinicamente rilevanti era fattibile tramite PCI e se gli stessi potevano essere sottoposti a controllo angiografico ad 8 mesi.

I criteri di esclusione sono stati: 1) morte intraospedaliera dopo PCI; 2) infarto miocardico durante il follow-up, per escludere una potenziale trombosi subacuta dello stent (*Glaser 2005*); 3) angina instabile; 4) aumento della CK-MB, troponina I, mioglobina o degli enzimi epatici sopra il limite superiore di normalità prima del PCI; 5) frazione d'eiezione VS  $\leq 30\%$ ; 6) insufficienza renale con creatinina  $\geq 2$  mg/dL; 7) trattamento con statine al riferimento. Inoltre, sono stati esclusi i pazienti con chirurgia recente, malattie immunologiche, immunosoppressione/depressione, o trapianto d'organo. I pazienti con storia di by-pass aorto-coronarico ed i pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote sono stati esclusi, perché generalmente tali pazienti hanno una malattia diffusa che complica la misura angiografica dei segmenti vasali non dilatati (*Dens 2003*). I 487 pazienti con stent medicato (DES) sono stati altresì esclusi per evitare gli effetti che tali farmaci possono esercitare sull'iperplasia intimale e sulla guarigione endoteliale (*Inoue 2007*).

Sulla base di quanto detto, 155 pazienti (età  $60 \pm 11$  anni, 87 uomini) rispondenti ai criteri di inclusione sono stati valutati per questo studio.

**Gruppo di controllo.** E' stata selezionata una coorte di controlli sani comparabile con la popolazione in studio in termini di età, sesso e body mass index. Il gruppo di controllo consisteva di 20 soggetti normali (14 uomini, età media:  $61 \pm 12$  anni) indirizzati alla disamina cardiologica per la presenza di dolore toracico atipico. Essi sono stati sottoposti ad un work-up diagnostico completo, includente ecocardiografia, test da sforzo e coronarografia, risultata normale. Nessuno dei controlli risultava affetto da malattie cardiache o non cardiache, come cancro, malattie infiammatorie o renali.

**Disegno della ricerca.** I pazienti selezionati sono stati sottoposti il giorno prima della programmata procedura di angioplastica coronarica a prelievo ematochimico con immediato esame fluorocitometrico.

Successivamente, tutti i pazienti hanno ricevuto un 'carico' di clopidogrel (300 mg per os in unica soluzione) almeno 6 ore prima della procedura interventistica.

Da protocollo, tutti i pazienti erano in terapia cronica con aspirina (100 mg al dì) e statina (simvastatina alle dosi di 20 o 40 mg al dì, oppure atorvastatina alle dosi di 10, 20 o 40 mg al dì) al momento del prelievo ematochimico e della coronarografia.

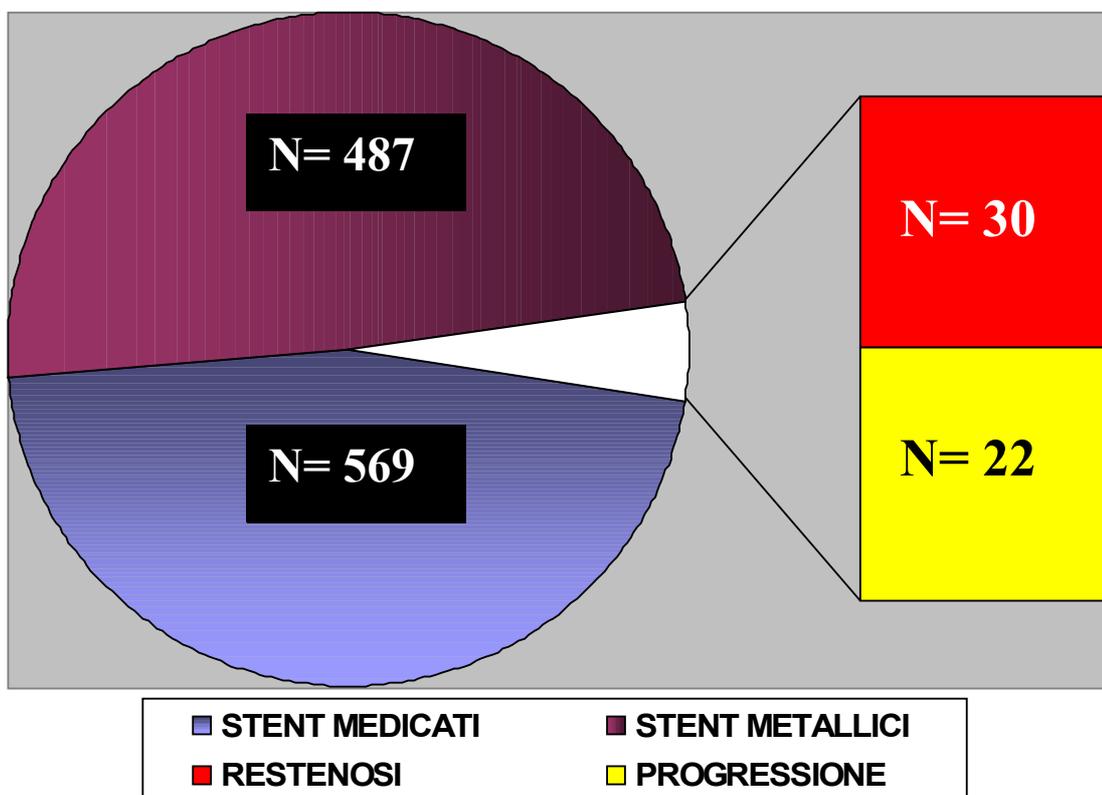
Tutti i pazienti sono stati seguiti clinicamente nei mesi successivi all'angioplastica coronarica e sono stati poi sottoposti a coronarografia tra 6 e 8 mesi dopo la procedura.

#### Figura 34. I gruppi di pazienti inclusi nello studio

*Schema dei vari sottogruppi di pazienti selezionati per lo studio.*

*Sono stati inizialmente esclusi i pazienti sottoposti a impianto di stent medicato.*

*Tra i pazienti sottoposti a PCI con impianto di stent metallico sono stati selezionati 30 pazienti con evidenza di restenosi e 22 pazienti con evidenza di progressione dell'aterosclerosi al follow-up*



**Coronarografia e angioplastica coronarica.** La coronarografia diagnostica e la successiva angioplastica coronarica sono state eseguite, a discrezione dell'operatore, per via femorale o radiale, utilizzando cateteri guida 5, 6 o 7F, con le tecniche tradizionali. (AVE, Minneapolis, MN, USA).

Quando possibile, si è adottata la tecnica del "direct stenting" con l'impiego di atmosfere di gonfiaggio media e con l'utilizzo successivo di palloni corti a diametro maggiore per la postdilatazione, allo scopo di ottimizzare i risultati procedurali.

Il trattamento farmacologico preprocedurale prevedeva un bolo di eparina non frazionata di 5000 UI associato, ove non controindicata, a 325 mg di aspirina *per os* o 250 mg i.v. Boli addizionali di eparina venivano praticati durante la procedura allo scopo di mantenere "l'activated clotting time" (ACT) tra 300 e 350 s abitualmente e tra 200 e 300 s in caso di associato impiego di inibitori della glicoproteina IIb/IIIa. L'utilizzo intraprocedurale di tali farmaci, in particolare l'abciximab alla dose di 0.25 mg/kg i.v. in bolo seguito da 0.125 mg/kg/min (max 10/min) per 12 ore, è stato praticato non routinariamente, ma sulla base del dato clinico (diabete) e/o angiografico (lesione complessa, B2-C, con trombo, piccoli vasi con malattia diffusa, non utilizzo di stent, dissezione non coperta, malattia multivasale).

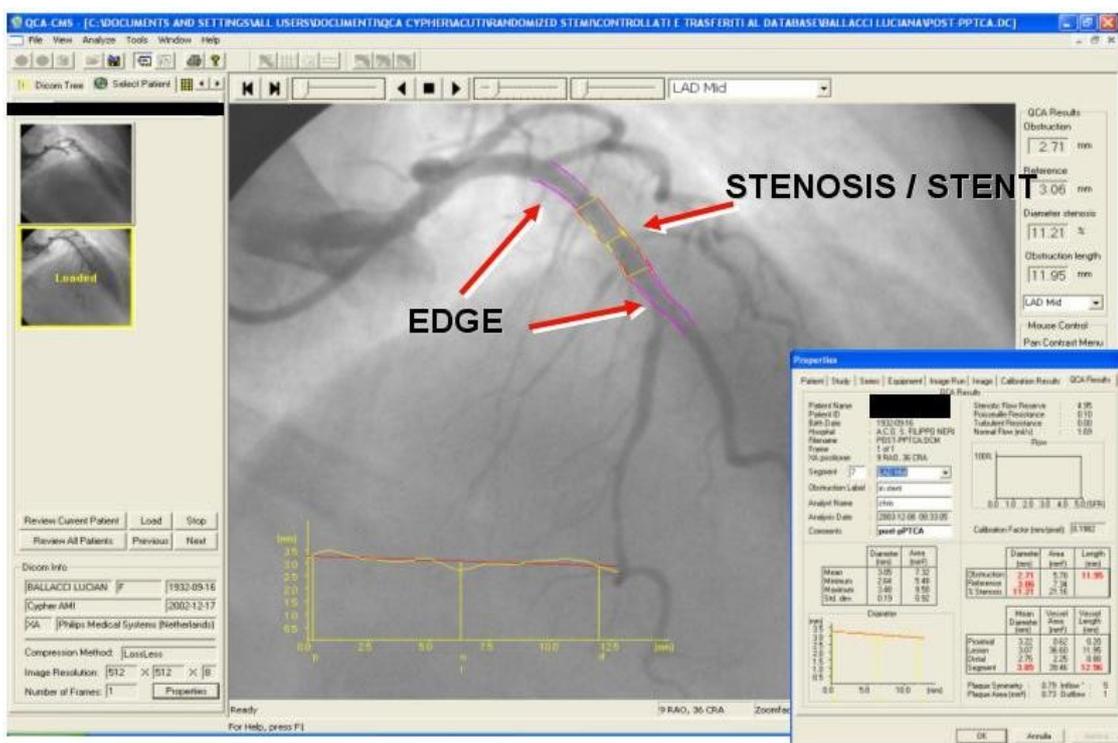
Al termine della procedura l'introdotto arterioso radiale veniva rimosso immediatamente senza il ricorso a uno specifico sistema di emostasi, mentre quello femorale con l'impiego di device (Angio-Seal, St. Jude Medical), oppure con compressione manuale appena possibile, ovvero dopo la verifica di ACT <170s, oppure di tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) < 50 s.

**Analisi angiografica quantitativa.** Le sequenze angiografiche sono state esaminate da due cardiologi esperti ed un tecnico di radiologia medica ed i segmenti coronarici angiograficamente indenni che non risultavano sovrapposti ad altri rami, sono stati selezionati tramite una decisione di consenso prima dell'analisi.

L'analisi di ogni sequenza angiografica è stata effettuata su due *frame* telediastolici di due cicli cardiaci differenti. Le sequenze registrate sono state analizzate con un software dedicato che permette di individuare automaticamente i bordi coronarici.

### Figura 35. QCA= Angiografia coronarica quantitativa

Rappresentazione schematica del processo di elaborazione delle immagini coronarografiche



Per ogni analisi è stato selezionato un segmento prossimale di 1 cm. Le misurazioni quantitative angiografiche di ogni lesione considerata sono state ottenute sia all'interno dei bordi dello stent (misure intra-stent), sia all'interno dei

bordi dello stent più i 5 mm prossimali e i 5 mm distali allo stent (misure intrasegmento).

**Definizione degli endpoint** Sono stati considerati end-point clinici e angiografici.

*Endpoint clinici:* sono stati determinati e rivalutati ad ogni aggiornamento dello studio. L'evento morte è stato definito come qualsiasi causa di morte durante tutto il periodo di studio. L'infarto del miocardio è stato definito come qualsiasi evento clinico (periprocedurale o presentazione clinica ricorrente) nel quale vi era un'evidenza clinica di necrosi (CK-MB superiore al triplo dei valori normali), ed in più è stato distinto in infarto-Q e infarto non-Q, basandosi sullo sviluppo di onde Q in due o più derivazioni consecutive in un tracciato a 12 derivazioni. Il "*Target Lesion Revascularization*" (TLR) è stato definito come qualsiasi intervento percutaneo o di bypass effettuata sulla lesione trattata dopo la procedura iniziale. Il "*Target Vessel Revascularization*" (TVR) è stato definito come qualsiasi intervento percutaneo o di bypass effettuato sul vaso trattato in qualsiasi momento dopo la procedura iniziale, e il "*Target Vessel Failure*" (TVF) è stato definito come il TVR o l'exitus o l'infarto miocardico. Per quanto concerne gli Eventi Cardiaci Avversi Maggiori (MACE) sono stati definiti come il TLR o l'exitus del paziente o l'infarto cardiaco. Infine, la trombosi intrastent è stata definita come un'occlusione trombotica o una stenosi della sede d'impianto dello stent, o in assenza di un'angiografia, come un sopraslivellamento del tratto ST di origine ischemica, nel territorio di irrorazione del vaso trattato.

*Endpoint angiografici:* sono stati definiti al tempo 0 della procedura, a 4 mesi e a 12 mesi nel follow-up angiografico. La lunghezza della lesione è stata misurata come la lunghezza del restringimento della coronaria con percentuale di stenosi >20% (quindi contenente sia la lesione emodinamicamente ostruttiva e trattata e la porzione adiacente di placca non determinante stenosi critica). Il diametro minimo del lume ("*minimal luminal diameter*") è stato definito come il più piccolo diametro a livello della stenosi. Il beneficio immediato (*acute gain*) è stato definito come il diametro minimo del lume immediatamente dopo la procedura meno il diametro minimo del lume basale. Il danno tardivo è stato

definito, invece, come il diametro minimo del lume immediatamente dopo la procedura meno il diametro minimo del lume a 8 mesi di distanza. La percentuale del diametro di stenosi è stata definita come  $(1 - \text{diametro minimo del lume} / \text{diametro del vaso di riferimento}) \times 100$ . La restenosi angiografica binaria è stata definita come una stenosi superiore al 50% del diametro al follow-up. L'esito di una lesione acuta (*acute lesion success*) è stato definito come il risultato di una stenosi inferiore al 50% del diametro del vaso trattato.

## Risultati

**Popolazione dei pazienti.** Il follow-up coronarico angiografico ha mostrato progressione delle stenosi coronariche in  $\geq 1$  segmento senza evidenza di ristenosi intrastent in 22 pazienti (gruppo di progressione) e ristenosi significativa, binaria, intrastent, senza progressione di aterosclerosi coronarica in 30 pazienti (gruppo ristenosi). I rimanenti 102 pazienti non hanno avuto né progressione dell'aterosclerosi coronarica né ristenosi intrastent (gruppo stabile).

**Caratteristiche di base cliniche ed angiografiche.** I tre gruppi di pazienti erano ben raggruppati in accordo all'età, sesso, e fattori di rischio cardiovascolare ed erano simili per quanto concerne la presentazione clinica (tutti i pazienti erano affetti da angina stabile come da disegno dello studio), funzione VS, funzione renale, e terapia medica al momento del PCI (Tabella 2-A). Nessuna differenza è stata notata tra i gruppi per quanto riguarda sia i siti di PCI che le lesioni non trattate, come l'anatomia coronarica, il numero dei vasi malati, il numero di stenosi coronariche significative, i tipi di lesione e le caratteristiche delle stenosi (per es., il diametro minimo luminale, lunghezza e severità) che erano simili tra i tre gruppi (Tabella 2-B). Nello specifico, non vi erano differenze significative nella severità delle lesioni o nella localizzazione delle stesse tra i tre gruppi.

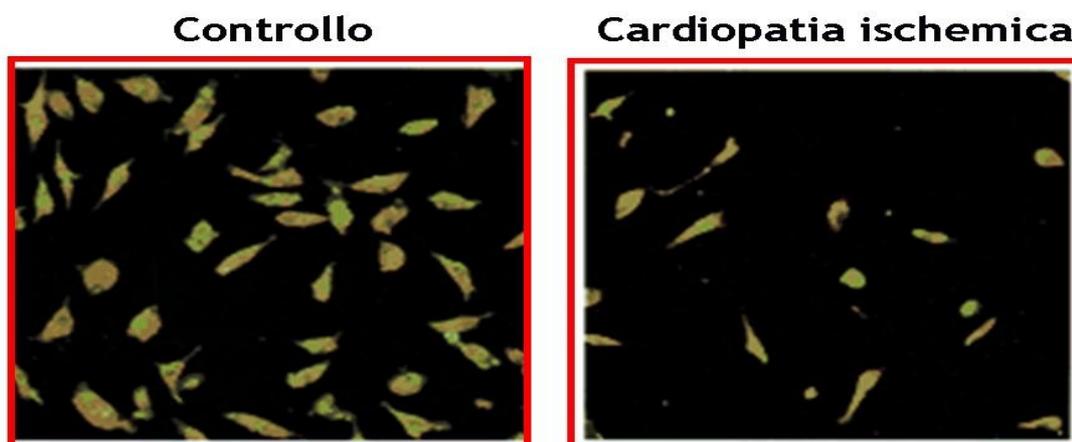
**Caratteristiche procedurali ed outcome.** Le caratteristiche procedurali (includenti il tempo totale di ischemia), i tipi di stent, il loro diametro e lunghezza, erano simili tra i tre gruppi di pazienti (Tabella 2-B). Non vi sono

state complicazioni maggiori intraospedaliere (morte o bisogno di rivascolarizzazione urgente).

**Caratteristiche di follow-up angiografico.** Le risultanze del follow-up coronarico quantitativo angiografico a livello dei siti di precedente PCI sono mostrate in Tabella 2-C. Una progressione significativa dell'aterosclerosi coronarica a livello delle lesioni non trattate tramite PCI è stata indicata dallo sviluppo di stenosi coronariche significative, abbinate ad una riduzione significativa del diametro luminale minimo e ad una maggiore lunghezza e diametro percentuale delle stenosi. Nel gruppo progressione, lo sviluppo di una malattia nuova o progressiva in vasi non trattati si è avuta in 10 pazienti (46%), mentre 10 pazienti (46%) hanno sviluppato una progressione nella stessa arteria ma in un segmento separato (>5 mm) dal PCI originario, e 2 pazienti (9%) hanno avuto una progressione sia nei vasi trattati che in quelli non trattati. Di contro, non è stata notata nessuna differenza significativa nella progressione dell'aterosclerosi coronarica tra il gruppo ristenosi ed il gruppo stabile. Similmente, la differenza nell'instent luminal loss è stata minima tra i pazienti del gruppo progressione e quelli del gruppo stabile.

**Campioni sanguigni e citometria a flusso.** L'analisi delle cellule staminali (Tabella 2-D) ha mostrato che i tre gruppi avevano conta simile dei globuli bianchi e delle cellule mononucleate. Di contro, il numero assoluto di cellule CD34+/KDR+/CD45- e CD133+/KDR+/CD45- misurato nel gruppo progressione era significativamente ( $p<0.05$ ) più basso che nel gruppo ristenosi, ma simile a quello dei gruppi stabile e di controllo. Inoltre, i pazienti del gruppo progressione avevano un numero di cellule CD14+/CD45+ simile a quello dei gruppi stabile e di controllo, ma significativamente ( $p<0.05$ ) più alto che nel gruppo ristenosi. In modo analogo, le cellule CD105+/CD45-/CD34- non risultavano differenti tra i gruppi progressione, stabile e di controllo, ma erano più basse nei pazienti del gruppo ristenosi anche se la differenza non era statisticamente significativa.

**Figura 36. Riduzione del numero di EPC in pazienti con cardiopatia ischemica rispetto ai soggetti di controllo**



## Discussione

I risultati del nostro studio indicano che le sottopopolazioni di cellule progenitrici/staminali circolanti, determinate al momento del PCI risultano differenti nei pazienti con ristenosi successiva, a paragone dei pazienti con progressione di aterosclerosi coronarica o di quelli con malattia stabile. È interessante osservare che la progressione della malattia coronarica non è risultata associata con livelli differenti di EPC rispetto ai pazienti con malattia stabile e perfino ai controlli normali.

***Il ruolo emergente delle cellule progenitrici/staminali.*** L'opinione corrente considera le EPC circolanti protettive e diversi studi hanno suggerito che le loro alterazioni rispecchino e predicano la progressione della malattia e gli eventi cardiovascolari futuri (*Leor 2006*). La maggior parte degli studi precedenti, tuttavia, sono stati ostacolati dalla loro natura retrospettiva e dalla mancanza di criteri uniformi per identificare precisamente le EPC. La ricerca si è focalizzata sulle cellule positive per i markers endoteliali CD34, una molecola di adesione espressa sulla cellula staminale ematopoietica (*Fina 1990*) e sulla CD133, una antigene di superficie proposto come il marker più appropriato per le EPC in quanto non espresso dall'endotelio maturo (*Salven 2003*). Di contro, pochi dati esistono sul significato fisiopatologico delle altre sottopopolazioni di cellule progenitrici/staminali. Sulla scorta di questi dati, abbiamo valutato la sottopopolazione di cellule staminali mesenchimali putative circolanti che sono

CD45 e CD34 negative ma esprimono l'antigene CD105 (*Wang 2006*), che sembra essere coinvolto nello sviluppo dei nuovi vasi sanguigni (*Reyes 2002*). Inoltre, abbiamo studiato una seconda popolazione cellulare angiogenica di cellule CD34- CD14+ (*Güven 2006*), che esprimono determinati markers associati con i monociti/macrofagi maturi ma non esprimono CD34 o CD133 e, pertanto, non hanno capacità progenitrice endoteliale. Queste cellule, denominate angiogeniche, rilasciano grandi quantità di fattori di crescita angiogenici, includenti i fattori di crescita endoteliali vascolari.

**La relazione delle EPC con la progressione aterosclerotica.** Lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche implica l'insulto endoteliale, l'attivazione piastrinica, l'adesione dei leucociti, e la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce vascolari (*Dens 2003*). Per questa ragione, è stato sostenuto un ruolo nell'aterogenesi per le EPC (*Leor 2006; Smidt-Lucke 2005*). I risultati del nostro studio dimostrano che non vi è associazione significativa tra il numero delle EPC e lo sviluppo susseguente di stenosi coronariche 'de novo' o di progressione di lesioni coronariche pregresse non significative. Invero, il numero di sottopopolazioni di EPC misurate al momento del PCI index, non differiscono tra quelle dei pazienti che mostravano malattia progressiva e quelli che non avevano né progressione aterosclerotica coronarica né ristesosi intra-stent.

Questi nuovi dati differiscono dai precedenti sul ruolo putativo delle EPC nell'aterogenesi, che avevano descritto relazioni positive o negative delle EPC nella progressione (*Smidt-Lucke 2005*), estensione (*Scheubel 2003; Heiss 2005; George 2003; Lambiase 2004*), severità (*Kunz 2006*) ed outcome della cardiopatia ischemica (*Werner 2005*). Si dovrebbe considerare, tuttavia, che tutti gli studi clinici precedenti sono stati trasversali settoriali, e nessuno ha investigato prospettivamente l'evoluzione dell'aterosclerosi coronarica subclinica (*Glaser 2005*).

Il nostro studio, viceversa, ha permesso una valutazione seriale del processo aterosclerotico coronarico con l'angiografia coronarica quantitativa (*Berry 2007*). A parte le considerazioni metodologiche, ci sono spiegazioni alternative per i nostri dati. Molteplici studi hanno dimostrato una forte associazione tra il

numero e la funzione delle EPC circolanti ed i fattori di rischio per malattia coronarica, come età, allenamento fisico, fumo, diabete, ipertensione e dislipidemia (Scheubel 2003); fino ad ora non si può dire se si tratta di una mera associazione o di un fattore attivo nel determinismo dell'aterogenesi (George 2003). I nostri risultati sono in accordo con queste osservazioni precedenti, interrogandosi sull'ipotesi che le EPC circolanti siano casualmente correlate 'di per se' all'aterogenesi coronarica.

***Relazione delle EPC con la restenosi intrastent.*** Nel nostro studio, I pazienti che hanno sviluppato successivamente restenosi intra-stent avevano livelli più alti di cellule CD34+/KDR+/CD45- e CD133 positive circolanti rispetto ai gruppi progressione e stabile. Invero, si dovrebbe considerare che la progressione dell'aterosclerosi coronarica e la restenosi intra-stent non condividono caratteristiche istologiche comuni, essendo la seconda causata solo da esuberante iperplasia delle cellule muscolari lisce senza alcuna significativa componente lipidica o di cellule schiumose. In verità, vi è la possibilità che i progenitori mobilizzati dal midollo osseo si differenzino in cellule muscolari lisce, aggravando perciò la severità della restenosi (Simper 2002). Questo concetto è supportato dai risultati di due studi recenti che dimostrano che la restenosi angiografica degli stent metallici è associata ad un aumento delle cellule circolanti CD34+ dopo PCI (Schober 2005; Inoue 2007). Le presenti evidenze estendono queste osservazioni e dimostrano che l'outcome del PCI è altresì associato con il pattern di base delle EPC, avendo trovato livelli più alti di cellule circolanti CD34+/KDR+/CD45- e CD133 positive in quei pazienti che hanno successivamente sviluppato una restenosi. Ancora, i nostri risultati segnalano un legame tra le cellule progenitrici/staminali che promuovono lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni e la guarigine del danno dopo angioplastica (Urbich 2003). In effetti, il numero base di cellule CD105+/CD45-/CD34- e CD14+/CD45+, che abbiamo precedentemente mostrato promuovere la vasculogenesi e lo sviluppo microvascolare (Guven 2006; Wang 2006), era più basso nei pazienti con restenosi successiva, ma non in altri gruppi. Perciò, potrebbe derivare che l'angiogenesi non giochi un ruolo significativo nella

progressione dell'aterosclerosi, mentre sembra esser coinvolta nel fenomeno della restenosi intrastent.

### **Implicazioni future**

Se i risultati del nostro studio troveranno conferma nelle esperienze future, si potrebbe modificare radicalmente l'approccio alla restenosi coronarica, sia dal punto di vista prognostico che terapeutico.

In primo luogo, infatti, le EPC sembrano costituire un promettente indice predittivo di restenosi intra-stent a medio termine. Quindi, il loro dosaggio potrebbe essere inserito nella "routine" della valutazione clinica di ogni paziente prima di una procedura interventistica per stimare la probabilità di andare incontro a restenosi. In secondo luogo, un nuovo approccio terapeutico alla prevenzione della restenosi potrebbe essere diretto proprio alle EPC. Il numero di cellule staminali nel sangue periferico può infatti essere modificato con opportuni farmaci, quali le statine e le molecole che interferiscono sull'asse renina-angiotensina-aldosterone.

**TABELLA 2/A. Principali Caratteristiche Cliniche nei Tre Gruppi di Pazienti**

	<b>Gruppo Progressione (n=22)</b>	<b>Gruppo Restenosi (n=30)</b>	<b>Gruppo Stabile (n=103)</b>	<b>p</b>
Uomini	14 (64%)	18 (60%)	60 (58%)	NS
Donne	8 (36%)	12 (40%)	33 (32%)	NS
Età (a)	60±8	62±10	59±9	NS
<i>Fattori di rischio</i>				
Diabete mellito	3 (14%)	5 (17%)	14 (14%)	NS
Iperensione Sistemica	12 (54%)	15 (50%)	46 (45%)	NS
Ipercolesterolemia	11 (50%)	14 (45%)	45 (44%)	NS
Abitudini tabagiche	6 (27%)	7 (23%)	28 (27%)	NS
Familiarità	5 (23%)	7 (23%)	27 (26%)	NS
Precedente infarto miocardico	4 (18%)	7 (23%)	23 (22%)	NS
<i>Caratteristiche cliniche</i>				
CCS classe anginosa I o II	14 (63%)	18 (59%)	70 (68%)	
CCS classe anginosa III o IV	8 (36%)	12 (41%)	33 (32%)	
Frazione d'eiezione ventricolare sinistra (%)	53±11	56±10	50±12	NS
Creatinina (mg/dL)	1.1±0.4	1.0±0.3	1.2±0.5	NS
<i>Terapia medica alla dimissione</i>				
Aspirina	20 (91%)	28 (93%)	94 (91%)	NS
Beta-Bloccanti	15 (68%)	22 (73%)	79 (77%)	NS
ACE inibitori	8 (36%)	10 (33%)	46 (45%)	NS
Calcio antagonisti	9 (41%)	14 (47%)	37 (36%)	NS
Ipolipemizzanti	22 (100%)	29 (97%)	94 (91%)	NS

I valori sono espressi come n (%) o media ± DS. CCS, Canadian Cardiovascular Society.

**TABELLA 2/B. Risultanze Angiografiche Coronariche Quantitative al Livello Base e Caratteristiche Procedurali nei Tre Gruppi di Pazienti**

	<b>Gruppo Progressione (n=22)</b>	<b>Gruppo Ristenosi (n=30)</b>	<b>Gruppo Stabile (n=103)</b>	<b>p</b>
<b><i>Lesioni coronariche non significative</i></b>				
Numero di lesioni non significative/pazienti	3.6±3.1	4.1±2.9	3.9±3.7	NS
▪ Pazienti con stenosi massima ≤20%	6 (27%)	7 (23%)	33 (32%)	NS
▪ Pazienti con stenosi massima >20% <50%	16 (73%)	23 (77%)	70 (68%)	NS
Vasi con lesioni non significative				
• 1-vaso	10 (45%)	13 (43%)	52 (50%)	NS
• 2- o 3-vasi	12 (55%)	18 (60%)	51 (49%)	NS
Arteria discendente anteriore	18 (82%)	27 (90%)	88 (85%)	NS
Arteria circonflessa	11 (50%)	16 (53%)	42 (41%)	NS
Arteria coronaria destra	11 (50%)	12 (41%)	56 (54%)	NS
Diametro vasale di riferimento (mm)	2.99±0.41	3.03±0.59	2.98±0.45	NS
Diametro minimo luminale (mm)	1.94±0.37	1.95±0.29	1.96±0.35	NS
Diametro della stenosi (%)	35.1±11.2	35.6±9.8	34.2±10.5	NS
Lunghezza della lesione (mm)	14.3±6.9	16.9±8.8	16.1±7.1	NS
<b><i>Lesioni coronariche significative</i></b>				
No. di stenosi/paziente	1.18±0.43	1.26±0.36	1.22±0.38	NS
Vasi con ≥1 stenosi >50%				
• 1-vaso	15 (68%)	19 (64%)	70 (68%)	NS
• 2- o 3-vasi	7 (32%)	11 (37%)	33 (32%)	NS
Arteria discendente anteriore	12 (55%)	18 (60%)	66 (64%)	NS
Arteria circonflessa	8 (36%)	12 (40%)	32 (31%)	NS
Arteria coronaria destra	10 (45%)	15 (50%)	50 (48%)	NS
Diametro minimo luminale (mm)	0.59±0.23	0.56±0.31	0.51±0.33	NS
Diametro della stenosi (%)	80.3±8.4	81.5±10.1	82.8±9.2	NS
Lunghezza della lesione (mm)	13.1±4.5	14.4±5.5	15.9±4.9	NS
<b><i>Caratteristiche PCI</i></b>				
No. di stent/paziente	1.15±0.39	1.23±0.42	1.21±0.49	NS
Stenting diretto	15 (68%)	19 (63%)	75 (73%)	NS
Lunghezza totale dello stent (mm)	18.18±5.55	20.03±4.11	19.92±4.77	NS
Diametro dello stent (mm)	3.05±0.41	3.13±0.39	3.19±0.44	NS
Diametro minimo luminale dopo-PCI (mm)	2.29±0.33	2.36±0.39	2.34±0.43	NS
Guadagno acuto (mm)	1.70±0.37	1.80±0.32	1.83±0.36	NS

I valori sono espressi come n (%) o media ± DS. PCI, percutaneous coronary intervention.

**TABELLA 2/C. Risultanze Angiografiche Coronariche Quantitative nei Segmenti Stentati ad 8 mesi di follow-up nei Tre Gruppi di Pazienti**

	<b>Gruppo Progressione (n=22)</b>	<b>Gruppo Restenosi (n=30)</b>	<b>Gruppo Stabile (n=103)</b>	<b>p</b>
--	---	--	---------------------------------------	----------

<b>Segmenti non stentati</b>				
Numero di nuove stenosi >50%	28	0	0	
Nuove stenosi >50%/paziente	1.27	-	-	
Tipo di nuove stenosi coronariche				
▪ Lesioni <i>De novo</i>	10 (45%)	-	-	
▪ Progressione di lesioni pregresse	18 (82%)	-	-	
Localizzazione				
▪ Arteria discendente anteriore	12 (55%)	-	-	
▪ Arteria circonflessa	7 (32%)	-	-	
▪ Arteria coronaria destra	9 (41%)	-	-	
Diametro vasale di riferimento (mm)	3.02±0.47	3.12±0.69	3.01±0.47	NS
Diametro minimo luminale (mm)	0.55±0.24	1.91±0.44	1.89±0.33	<0.001
Diametro della stenosi (%)	81.8±8.7	38.7±6.9	37.2±9.5	<0.001
Lunghezza della lesione (mm)	15.1±4.9	13.8±5.7	16.9±6.1	NS
<b>Segmenti stentati</b>				
Grado di restenosi intrastent				
▪ Pazienti con restenosi ≤20%	6 (48%)	0	46 (45%)	-
▪ Pazienti con restenosi >20% <50%	6 (36%)	0	36 (35%)	-
▪ Pazienti con restenosi >50%	0	30 (100%)	0	-
Diametro minimo luminale (mm)	2.18±0.49	0.72±0.37	2.14±0.39	<0.001
Diametro della stenosi (%)	27.8±7.1	76.3±10.4	28.9±8.5	<0.001
Late lumen loss (mm)	0.11±0.09	1.08±0.21	0.20±0.10	<0.001

I valori sono espressi come n (%) o media ± DS.

**TABELLA 2/D. Cellule Progenitrici Endoteliali nei Tre gruppi di Pazienti e nei Soggetti di Controllo.**

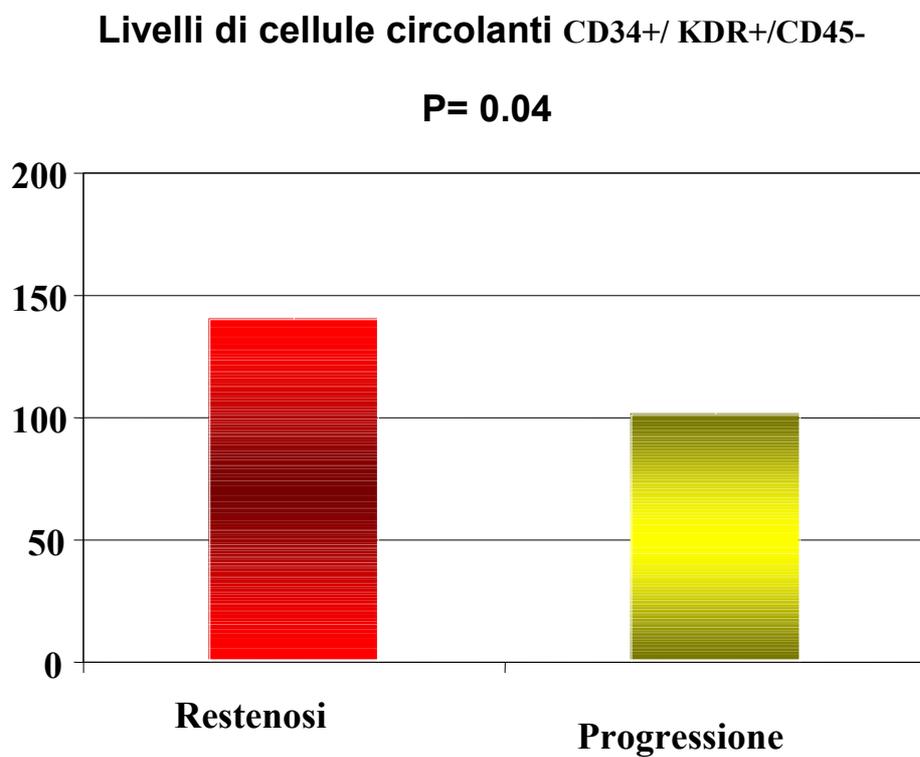
	<b>Gruppo Progressione (n=22)</b>	<b>Gruppo Restenosi (n=30)</b>	<b>Gruppo Stabile (n=103)</b>	<b>Gruppo di Controllo (N=20)</b>	<b>ANOVA P</b>
Globuli Bianchi (10 <sup>3</sup> /mL)	6.95±0.91	6.75±1.21	6.51±1.41	6.76±1.30	NS
Monociti (10 <sup>3</sup> /mL)	0.56±0.21	0.54±0.27	0.53±0.27	0.59±0.21	NS
CD34+/ KDR+/CD45- (cellule/μL)	1.03±0.53	1.41±0.64 *	1.07±0.46	0.95±0.44	<0.05
CD133+/KDR+/CD45 - (cellule/μL)	0.33±0.19	0.63±0.23 *	0.41±0.32	0.36±0.15	<0.001
CD105+/CD45-/CD34 - (cellule/μL)	1.61±0.72	1.70±0.66	1.38±0.94	1.92±0.97	NS
CD14+/CD45+ (cellule/μL)	0.51±0.52	0.72±0.56 *	0.28±0.54	0.62±0.67	<0.05

I valori sono espressi come media ± DS.

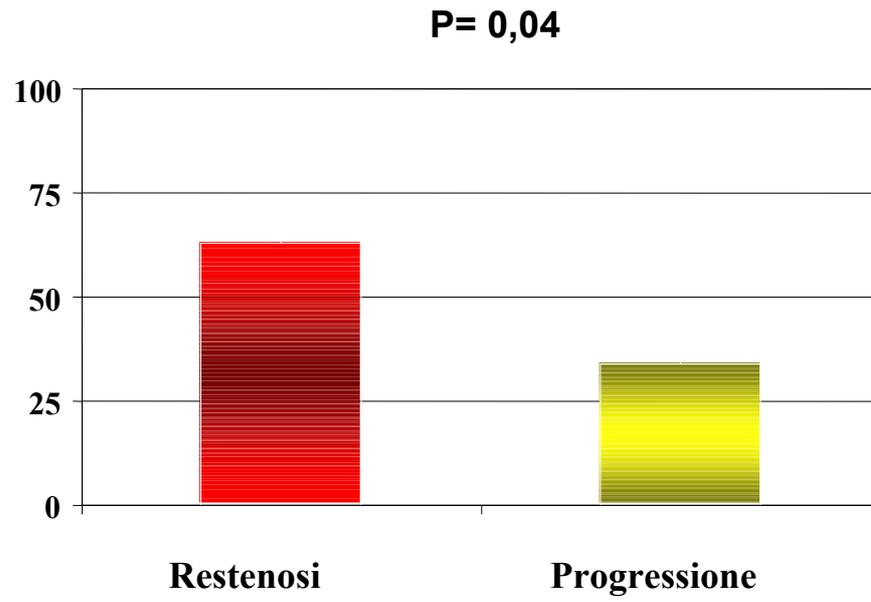
\* p<0.05 per il confronto tra il gruppo Restenosi versus i gruppi Progressione, Stabile, e Controllo.

**Figura 37. Livelli di cellule circolanti positive per CD34+ e CD133+**

Istogrammi dei livelli di cellule circolanti CD34+/KDR+/CD45- (pannello superiore) e CD133+/KDR+/CD45- (pannello inferiore)



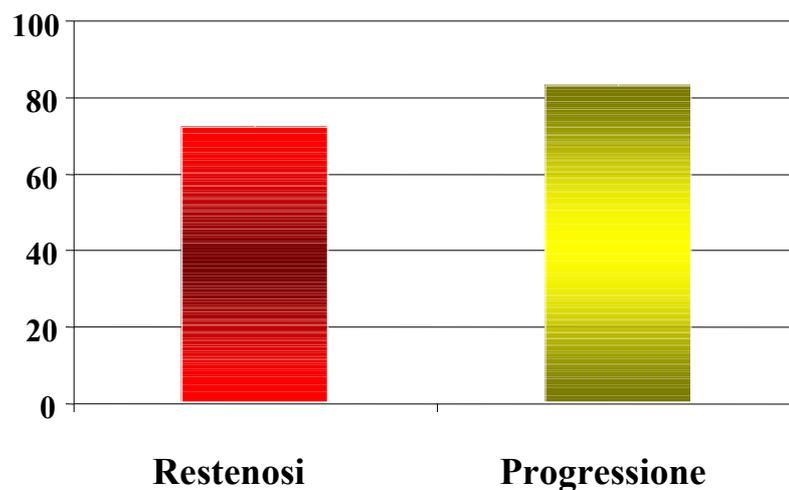
**Livelli di cellule circolanti CD133+/KDR+/CD45-**



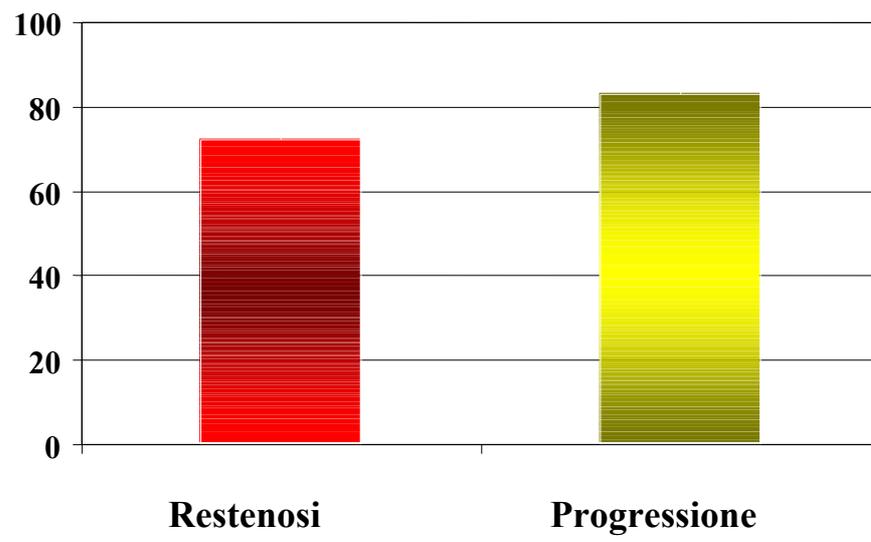
**Figura 38. Livelli di cellule circolanti positive per CD105+ e CD14+**

Istogrammi dei livelli di cellule circolanti CD105+/CD45-/CD34- (pannello superiore) e CD14+/CD45+ (pannello inferiore)

**Livelli di cellule circolanti CD105+/CD45-/CD34-  
P= 0,002**



**Livelli di cellule circolanti CD14+/CD45+  
P= 0,04**



### **Casi clinici esemplificativi**

Un paziente rappresentativo del gruppo con restenosi coronarica è mostrato nella **FIGURA A**. Si tratta di un uomo di 46 anni, non diabetico, iperteso, dislipidemico, con storia di angina pectoris da sforzo ed evidenza alla coronarografia di una aterosclerosi prevalentemente monovasale riguardante la discendente anteriore. Per tale motivo è stato sottoposto ad angioplastica coronarica con impianto di due stent non medicati (AVE, Medtronic) di 3.0 x 24 mm (a monte) e di 3.0 x 20 mm (a valle).

All'angiografia coronarica di controllo eseguita 6 mesi dopo la procedura iniziale è stata riscontrata una marcata restenosi intra-stent che ha determinato una stenosi diffusa pari al 90%.

La **FIGURA B** descrive invece i quadri angiografici di un paziente rappresentativo del gruppo senza restenosi. Si tratta di un uomo di 72 anni, diabetico, ex-fumatore, dislipidemico, giunto alla nostra osservazione per angina da sforzo e risultato affetto da una aterosclerosi coronarica bivasale con interessamento dell'arteria circonflessa e della arteria coronaria destra. Per tale motivo è stata effettuata angioplastica coronarica con impianto diretto di uno stent Zeta 3.5 x 33 mm sulla circonflessa e di uno stent Driver 3.5 x 30 mm sulla coronaria destra. Al controllo angiografico a 6 mesi veniva registrata la pervietà dei due stent senza evidenza di restenosi.

La citofluorometria effettuata nei due pazienti ha messo in evidenza quadri sostanzialmente diversi.

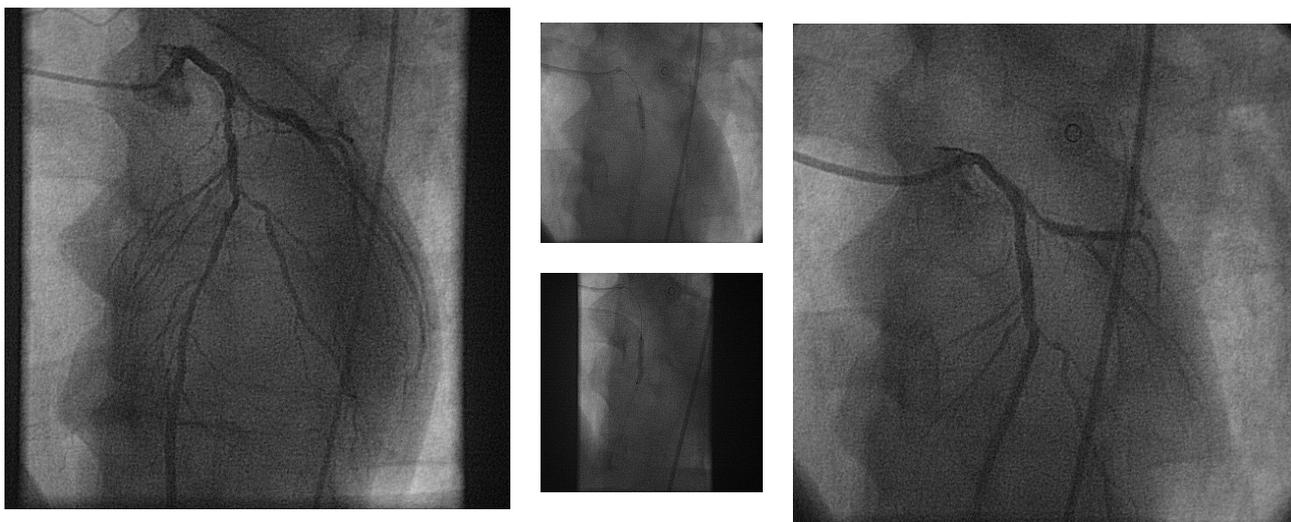
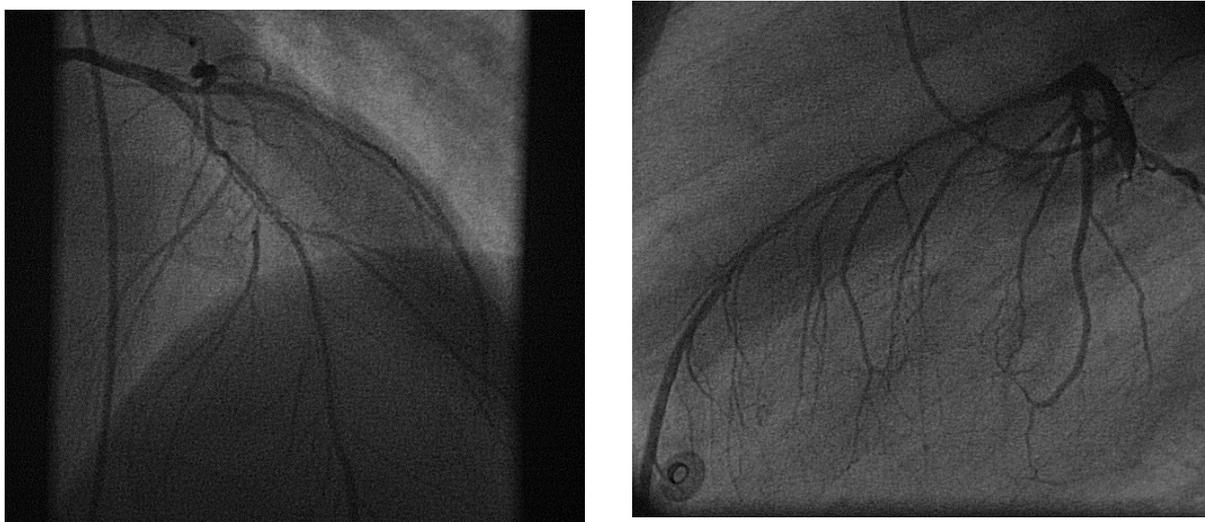
Nel paziente con restenosi, è stata visualizzata e quindi conteggiata una quantità decisamente superiore di CD34+/KDR+/CD45- e CD133+/KDR+/CD45-, mentre nel paziente senza restenosi la concentrazione di cellule CD34+/KDR+/CD45- e CD133+/KDR+/CD45- è risultata decisamente scarsa (**FIGURA C-pannello superiore**).

Un comportamento opposto è stato riscontrato negli altri dati citofluorometrici (**FIGURA C-pannello inferiore**): il paziente con restenosi ha evidenziato una minore quantità di cellule CD14+/CD45+, mentre il paziente senza restenosi aveva una elevata concentrazione di CD14+/CD45+.

**FIGURA A. Paziente con restenosi intra-stent**

*Uomo di 49 anni, normoglicemico, iperteso, dislipidemico*

*Procedura: Impianto 'diretto' di stent (AVE 3.0x24 + 3.0x20) sull'arteria discendente anteriore*

**Angioplastica coronarica percutanea****Angiografia coronarica a 6 mesi**

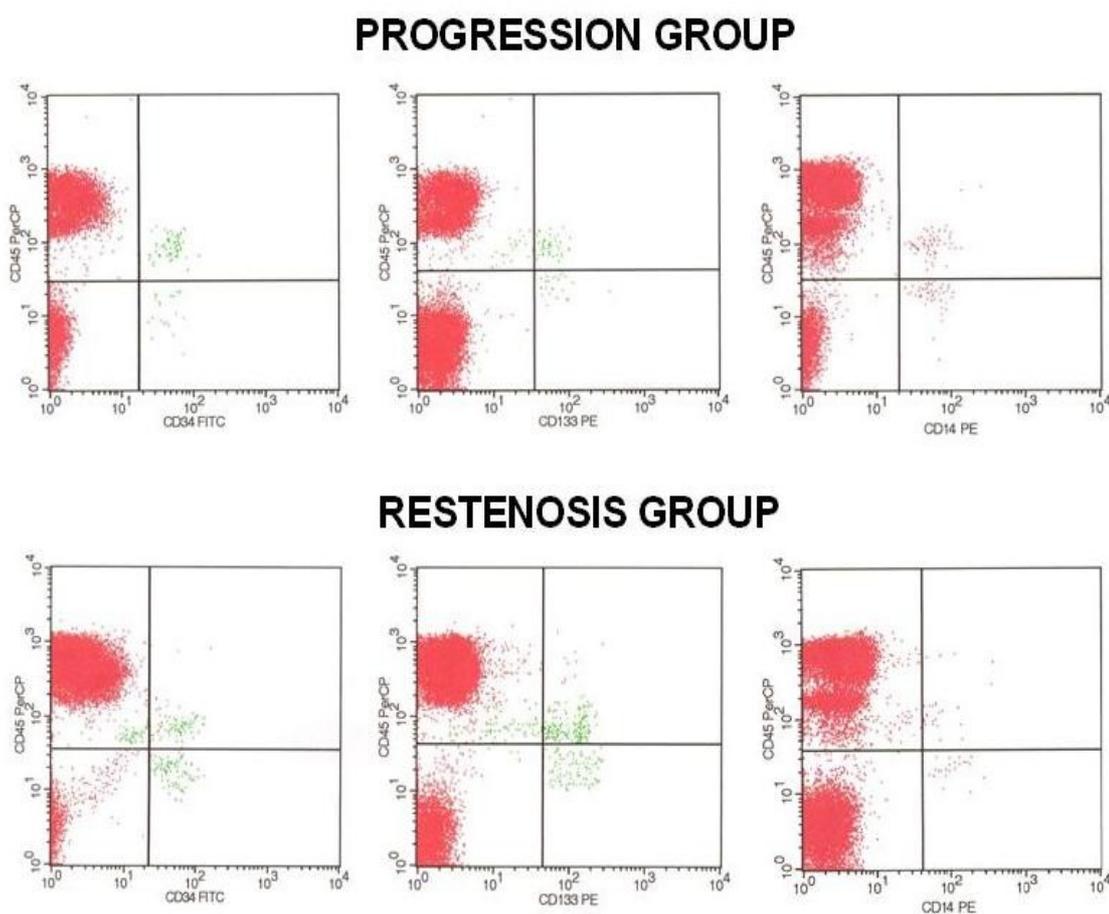
**FIGURA B. Paziente senza restenosi intra-stent**

*Uomo di 72 anni, diabetico, ex-fumatore, dislipidemico*

**Circonflessa: impianto diretto di stent (Zeta 3.5 x 23 mm)****Coronaria destra: impianto diretto di stent (Driver 3.5 x 30 mm)****Coronarografia di controllo a 6 mesi**

### FIGURA C. Citofluorometria: restenosi versus progressione della aterosclerosi

*I citogrammi ad immunofluorescenza al momento dell'intervento coronarico percutaneo mostrano cellule circolanti CD34+/KDR+/CD45-, CD133+/KDR+/CD45-, e CD14+/CD45+ di un paziente con progressione dell'aterosclerosi coronarica ma senza evidenza di restenosi intrastent ad 8 mesi di follow-up (pannello superiore) e di un paziente con restenosi intrastent ma senza progressione dell'aterosclerosi coronarica al controllo angiografico (pannello inferiore).*



## TEMA DI RICERCA 3

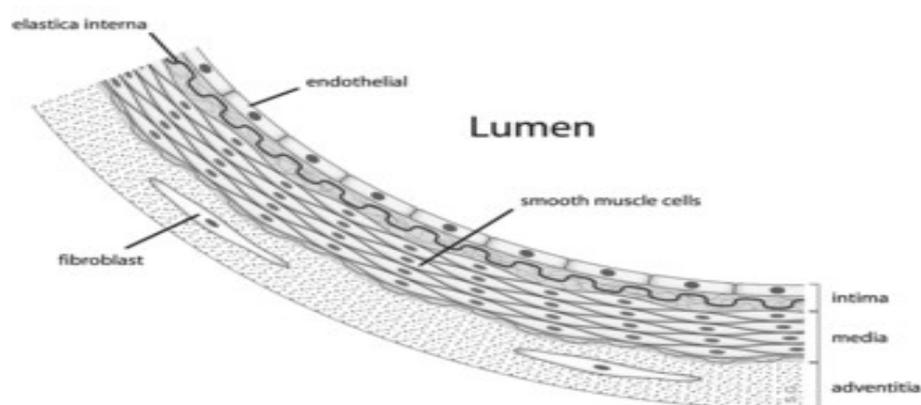
### Effetti del blocco farmacologico dei recettori dell'angiotensina II sulle sottopopolazioni di progenitori delle cellule endoteliali

#### Il 'Background della ricerca'

**La relazione tra disfunzione endoteliale, sistema renina angiotensina (RAAS) e EPC.** L'angiotensina II, il principale effettore del sistema RAAS è implicato nello sviluppo delle patologie vascolari. L'angiotensina II esercita i propri effetti attraverso due recettori: il tipo 1 e il tipo 2. In particolare i recettori di tipo 1 mediano la maggior parte degli effetti deleteri dell'angiotensina II, quali la vasocostrizione e il danno endoteliale (Unger 2003).

La disfunzione endoteliale costituisce una fase precoce del processo patogenetico dell'aterosclerosi e numerosi studi prospettici hanno dimostrato che una alterata vasodilatazione endotelio-dipendente predice gli eventi coronarici.

Figura 39. Rappresentazione schematica dell'endotelio vasale



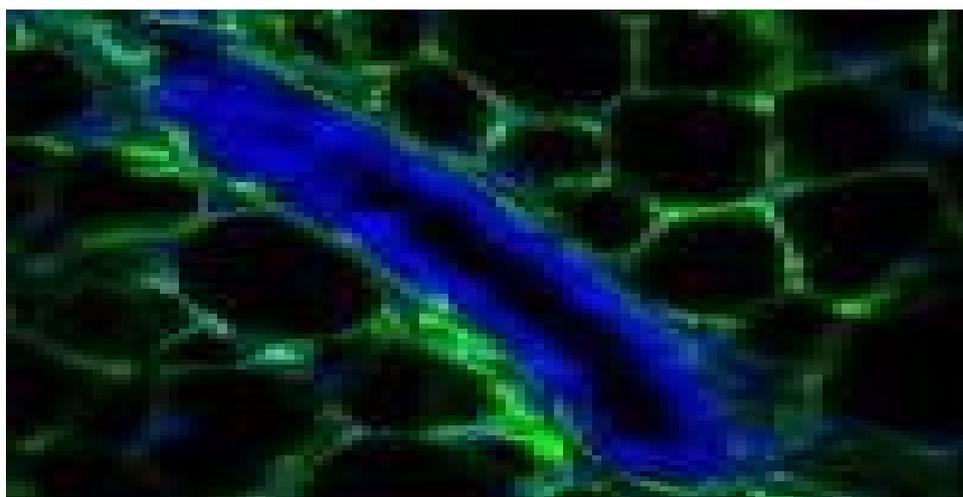
Nonostante i numerosi studi condotti sull'argomento, i meccanismi con cui il blocco del RAAS attraverso il telmisartan esercita i propri benefici effetti non sono stati del tutto chiariti. Non vi è dubbio che l'aumento della produzione

endoteliale di ossido nitrico svolga un ruolo importante, ma è verosimile che altri fattori siano coinvolti. Proprio alla ricerca di meccanismi finora inesplorati, l'attenzione dei ricercatori è stata negli ultimi tempi rivolta allo studio delle sottopopolazioni di cellule staminali preposte alla riparazione endoteliale (*Rosenzweig 2005*).

Giova ricordare che le EPC sono presenti nella circolazione sanguigna e rappresentano un gruppo di cellule staminali in grado di assicurare il mantenimento dell'integrità vascolare sostituendo le cellule endoteliali danneggiate o comunque inefficaci, come si verifica dopo un'angioplastica coronarica (*Pelliccia 2005; Pelliccia 2006*), con effetto protettivo verso l'aterosclerosi. Appare, dunque, cruciale la presenza nel sangue di un numero di EPC circolanti significativo. D'altra parte, appare cruciale, in caso di patologia cardiovascolare, ricorrere a farmaci che siano anche in grado di stimolare la replicazione di tali sottopopolazioni cellulari.

#### **Figura 40. Livelli di cellule circolanti positive per CD105+ e CD14+**

Integrazione delle EPC nell'endotelio vascolare



***L'importanza di interferire con le EPC.*** Le EPC sono mobilitate nella circolazione sistemica in risposta a stimoli specifici (Mobilization) e reclutate nel sito di riparazione vascolare o neovascolarizzazione (Homing), dove si differenziano nelle cellule tipo-endoteliali (Differentiation) e proliferano

(Proliferation). Recentemente, si è visto che i fattori di rischio cardiovascolare correlano inversamente con il numero di EPC (*Hill 2003*). La terapia statinica è stata suggerita per promuovere la mobilitazione delle EPC dopo l'insulto vascolare, portando ad una accelerata reindotelizzazione e ridotta formazione neointimale (*Dimmeler 2001*). Gli altri fattori, come gli estrogeni e l'attività fisica, sono stati dimostrati promuovere la quantità e la qualità delle EPC, presumibilmente causando effetti vascolari protettivi. Perciò, è clinicamente rilevante capire i meccanismi molecolari che regolano la cinetica delle EPC.

**Cellule staminali e RAAS.** Il RAAS è un sistema ormonale circolante che regola la pressione sanguigna ed il flusso. Il RAAS è coinvolto nel mantenimento della proliferazione cellulare e nel rimodellamento d'organo in vari tessuti oltre quelli del sistema cardiovascolare (*Paul 2006*). Dati recenti suggeriscono che un RAAS locale nel midollo osseo contribuisce alla regolazione dei processi ematologici sia normali che maligni (*Haznedaroglu 2003*). E' stato dimostrato che l' Ang II e i peptidi dell'angiotensina promuovono la proliferazione cellulare dei progenitori ematopoietici ed il recupero ematopoietico dopo terapia radiante e chemioterapia (*Rodgers 2000*). Murohara ed i suoi colleghi hanno dimostrato che il recettore AT I dell'Ang II gioca ruoli importanti nell'angiogenesi associata con ischemia e con il tumore (*Sasaki 2002; Egami 2003*). Studi recenti suggeriscono che lo stato redox intracellulare sia un modulatore critico del bilanciamento tra autorinnovamento e differenziazione nel processo di divisione delle cellule progenitrici e che gli antiossidanti possano preservare la loro stemness (*Noble 2003*).

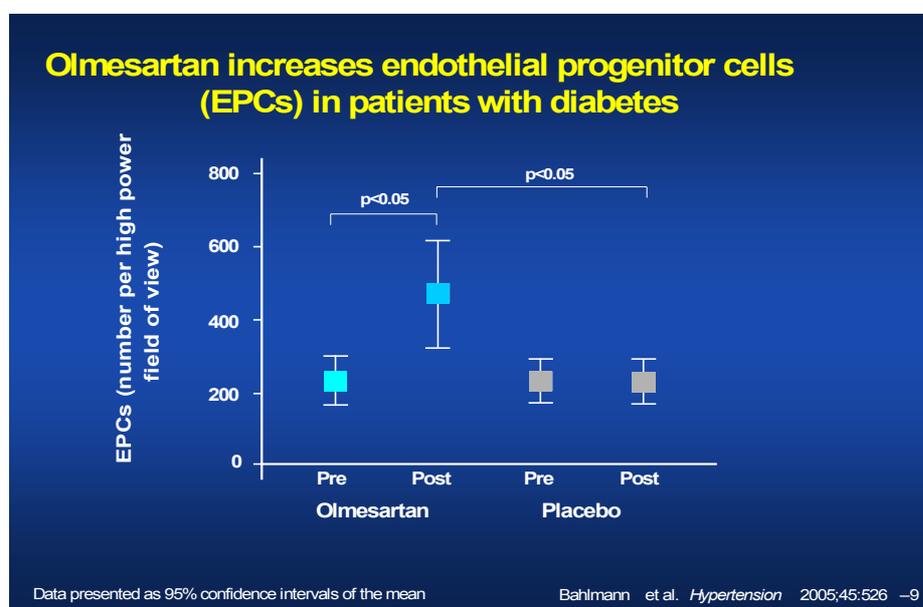
**Blocco del RAAS e EPC.** Questa proprietà è stata a tutt'oggi dimostrata con il ramipril, un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina, che incrementa il numero e migliora la capacità funzionale delle EPC nei pazienti con cardiopatia ischemica, in modo indipendente dall'influenza sulla pressione sanguigna (*Min 2004*).

Sono, però, soprattutto i sartani i farmaci per i quali è stata documentata la capacità di influenzare i livelli di EPC. Il losartan, a livello sperimentale in uno studio condotto sui ratti, ha mostrato di aumentare il numero e la funzione di

EPC, suggerendo la possibilità di ottenere effetti di giovamento simili anche nell'uomo (Yao *EH*).

Anche il valsartan ha dimostrato di ridurre la senescenza accelerata dall'angiotensina II delle EPC attraverso una up-regulation dell'attività telomerasica (Imanishi 2005). La precoce terapia con olmesartan, infine, è stata in grado di controbilanciare tutte le componenti che conducono allo sviluppo di aterosclerosi e di eventi clinici maggiori che possono insorgere anche anni dopo che l'aterotrombosi ha prodotto i suoi effetti dannosi.

**Figura 41. Effetti di olmesartan sui livelli di EPC**



Bahlmann e coll., studiando gli effetti di olmesartan sui progenitori delle cellule endoteliali, hanno riscontrato un aumento significativo del numero di progenitori delle cellule endoteliali indotto dal farmaco nei pazienti con diabete rispetto al basale. Nessun effetto è stato osservato con il placebo (Bahlmann *et al. Hypertension* 2005;45:526-9).

**Telmisartan e EPC.** Come dimostrano i risultati di numerosi studi, tra cui i recenti DETAIL (Diabetics Exposed to Telmisartan And enalapril) e TRENDY (Telmisartan versus Ramipril in renal ENdothelium Dysfunction), telmisartan è in grado di migliorare la vasodilatazione endotelio-dipendente a differenza dei

diuretici e dei beta-bloccanti nei pazienti ipertesi (*Morimoto 2006*) e costituisce quindi un farmaco in grado potenzialmente di prevenire lo sviluppo di danno d'organo a livello vascolare.

### **Gli obiettivi della ricerca: Lo studio PET**

Lo studio PET (*Progenitori Endoteliali e Telmisartan*) è stato ideato al fine di valutare in modo randomizzato gli effetti del telmisartan sulle sottopopolazioni di cellule progenitrici endoteliali. Esiste infatti la possibilità che le EPC costituiscano un target terapeutico, in quanto la loro stimolazione persistente attraverso un intervento farmacologico potrebbe, almeno teoricamente, riparare l'insulto endoteliale e prevenire la progressione dell'aterosclerosi nei pazienti a rischio. Invero, studi sperimentali e clinici hanno rivelato che il numero delle EPC può essere aumentato dalle statine, EPO umano ricombinante e ACE-inibizione. L'antagonismo del recettore dell'angiotensina II ha aumentato il numero delle EPC nell'ipertensione. Rimane non noto se questo effetto si verifichi anche nei pazienti coronaropatici.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se il Telmisartan, un antagonista del recettore dell'angiotensina II con evidenza di attività PPAR $\gamma$ , possa modificare il numero delle sottopopolazioni di EPC ed a sua volta incidere sulla funzione endoteliale dei pazienti coronaropatici.

### **Pazienti e Metodi**

**Popolazione studiata.** Abbiamo esaminato 40 pazienti con cardiopatia ischemica (27 uomini e 13 donne; età media: 57 $\pm$ 5 anni; range: 50-64 anni) destinati all'esame coronarografico.

Da ultimo, i pazienti trattati con inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina potevano non essere selezionati.

**Protocollo dello studio.** Lo studio è stato disegnato randomizzato, in parallelo e controllato con placebo. Dopo la coronarografia ed una valutazione basale di tutti i criteri di inclusione ed esclusione, i pazienti ritenuti arruolati sono stati sottoposti a conteggio del numero assoluto di EPC e stati sottoposti ad una valutazione basale della dilatazione flusso-mediata (FMD) dell'arteria brachiale. Essi sono stati successivamente randomizzati a ricevere, in cieco, telmisartan (80 mg, b.d.s.) o un placebo equivalente (b.d.s.) per 4 settimane, aggiunto alla terapia di già in atto. I pazienti sono stati sottoposti ad una rivalutazione delle EPC e della FMD brachiale al termine dello studio.

## **Risultati**

**Caratteristiche di base.** Tutti i pazienti con cardiopatia ischemica assegnati a telmisartan ovvero a placebo sono stati ben bilanciati rispetto ad età, sesso e fattori di rischio cardiovascolari; simile era la presentazione clinica nei 2 gruppi (angina stabile), come pure funzione ventricolare sinistra, funzione renale e terapia medica al momento della coronarografia (Tabella 3/A). Non è stata rilevata nessuna differenza tra i 2 gruppi nelle lesioni significative, nell'anatomia coronarica, nel numero dei vasi malati, delle stenosi coronariche significative, nei tipi di lesione e nelle caratteristiche delle stenosi (es. diametro minimo del lume, lunghezza e severità) (Tabella 3/B). In particolare, non vi erano differenze significative nella severità della lesione o nella sua localizzazione tra donne e uomini con coronaropatia.

**Pressione sanguigna e compliance.** La pressione arteriosa è diminuita comparabilmente in entrambi i gruppi di trattamento (sistolica da  $134\pm 5$  a  $129\pm 4$  mmHg nel gruppo telmisartan; da  $133\pm 5$  a  $125\pm 6$  mmHg nel gruppo placebo. Diastolica da  $85\pm 4$  a  $80\pm 3$  mm Hg dopo telmisartan,  $P<0.05$ ; da  $86\pm 4$  a  $79\pm 3$  mm Hg,  $P<0.05$  dopo placebo). La compliance al trattamento è stata del 95% nel gruppo telmisartan ove un paziente si è ritirato dallo studio per effetti collaterali gastrointestinali e dell'85% nel gruppo placebo ove tre pazienti si sono ritirati dallo studio a causa dell'insorgenza di cefalea (un paziente), nausea (un paziente) ed indisponibilità a continuare lo studio (un paziente).

**Funzione endoteliale.** A livello di baseline, sono stati riscontrati valori simili di FMD tra i pazienti assegnati al gruppo telmisartan e quelli assegnati al gruppo placebo ( $5.5 \pm 2.9\%$  vs.  $5.3 \pm 3.5\%$ , NS). Dopo 4 settimane, la funzione endoteliale è migliorata significativamente nei pazienti che ricevevano telmisartan (FMD  $10.4 \pm 3.9\%$ ,  $P=0.0015$  vs. baseline), ma è rimasta immutata nel gruppo placebo (FMD:  $5.9 \pm 2.8\%$ ;  $P=0.32$  vs. baseline; telmisartan vs. placebo,  $P=0.002$ ). Nessuna risposta significativa è stata osservata dopo stimolo endotelio-indipendente con trinitrato di glicerina sublinguale ( $P=0.32$ ).

**Campioni di sangue e citometria a flusso.** L'analisi cellulare (Tabella 3/C) ha mostrato numeri assoluti di EPC simili al livello basale nel gruppo telmisartan ed in quello placebo. Dopo 4 settimane di trattamento, le cellule CD34+/KDR+/CD45- si sono incrementate significativamente nel gruppo telmisartan (da  $1.18 \pm 0.34$  a  $1.44 \pm 0.41$  cellule/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ), ma non nel gruppo placebo (da  $1.12 \pm 0.29$  a  $1.11 \pm 0.36$  cellule/ $\mu\text{L}$ ). Analogamente, le cellule CD133+/KDR+/CD45- sono aumentate significativamente con il telmisartan (da  $0.46 \pm 0.25$  a  $0.76 \pm 0.31$  cellule/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ), ma non con il placebo (da  $0.44 \pm 0.28$  a  $0.41 \pm 0.27$  cellule/ $\mu\text{L}$ ). Inoltre, le cellule CD14+/CD45+ si sono cospicuamente accresciute dopo telmisartan (da  $0.65 \pm 0.39$  a  $0.92 \pm 0.28$  cellule/ $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) e sono rimaste immutate dopo placebo (da  $0.69 \pm 0.40$  vs.  $0.65 \pm 0.31$  cellule/ $\mu\text{L}$ ). Infine, le cellule CD105+/CD45-/CD34- sono rimaste simili nei 2 gruppi. Una significativa correlazione positiva è stata riscontrata tra il miglioramento nella FMD e l'incremento nei numeri assoluti delle cellule CD34+/KDR+/CD45- e delle cellule CD133+/KDR+/CD45- ( $r = 0.58$ ,  $P = 0.01$ , e  $r = 0.51$ ,  $P = 0.02$ , rispettivamente).

## Discussione

I risultati di questo studio indicano che il blocco del recettore dell'angiotensina II con il telmisartan incrementa il numero di EPC rigenerative nei pazienti normotesi con cardiopatia ischemica e che tale effetto si muove in parallelo con un miglioramento significativo della funzione endoteliale.

**Antagonismo del RAAS e EPC.** La somministrazione di ramipril, un inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina, aumenta il numero e migliora la capacità funzionale delle EPC nei pazienti con cardiopatia ischemica, indipendentemente da ogni effetto sulla pressione sanguigna. Inoltre, il trattamento con antagonisti recettoriali dell'angiotensina II, olmesartan o irbesartan, incrementa significativamente il numero di EPC ed il valsartan riduce la senescenza accelerata dipendente dall'angiotensina II delle EPC attraverso un up-regulation dell'attività telomerasica. Dopo le statine e l'eritropoietina, l'antagonismo del RAAS rappresenta il terzo approccio in medicina cardiovascolare per incrementare il numero delle EPC. I così detti effetti pleiotropici degli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II attirano un interesse crescente nella comunità scientifica, includendo la loro azione antidiabetica e antinfiammatoria. Si è perfino ipotizzato che gli effetti sussidiari degli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II non correlati alla loro azione principale, che è l'abbassamento della pressione sanguigna, possano contribuire ai loro effetti giovievoli cardiovascolari. A questo riguardo, abbiamo indicato che l'effetto degli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II sulle EPC nei pazienti con cardiopatia ischemica siano indipendenti dall'azione di riduzione della pressione sanguigna, come documentato dal comparabile abbassamento della stessa raggiunto con telmisartan e placebo, aggiunti alla preesistente terapia con beta-bloccanti e/o calcio-antagonisti. L'azione stimolante rigenerativa delle EPC potrebbe perciò contribuire agli effetti sussidiari cardiovascolari degli antagonisti dell'angiotensina II in questi pazienti, così come in altre popolazioni con alto profilo di rischio cardiovascolare. Invero, il trattamento con antagonisti recettoriali dell'angiotensina II ha indotto un aumento del numero delle EPC in confronto con i soggetti sani, in maniera analoga a quanto precedentemente mostrato con statine e eritropoietina.

**Tabella 3/A. Fattori di rischio, caratteristiche cliniche e terapia medica nei pazienti con malattia coronarica assegnati al trattamento con telmisartan (n=20) o placebo (n=20)**

	<b>Telmisartan (n=20)</b>	<b>Placebo (n=20)</b>	<b>P</b>
<b><i>Fattori di rischio</i></b>			
Diabete mellito	4 (20%)	5 (25%)	NS
Ipertensione sistemica	7 (35%)	6 (30%)	NS
Colesterolo totale >190 mg/dL	12 (60%)	11 (55%)	NS
Abitudini tabagiche correnti	6 (30%)	7 (35%)	NS
Storia familiare	7 (35%)	6 (30%)	NS
Precedente infarto miocardico	5 (25%)	4 (20%)	NS
<b><i>Caratteristiche cliniche</i></b>			
CCS classe anginosa I o II	12 (60%)	13 (65%)	NS
CCS classe anginosa III o IV	8 (40%)	7 (35%)	NS
Frazione di eiezione VS (%)	51±7	53±9	NS
Creatinina (mg/dL)	1.2±0.5	1.0±0.4	NS
<b><i>Terapia farmacologica</i></b>			
Aspirina	19 (95%)	17 (85%)	NS
Ticlopidina/clopidogrel	6 (30%)	7 (35%)	NS
Beta-Bloccanti	15 (75%)	16 (80%)	NS
Calcio antagonisti	9 (45%)	7 (35%)	NS
Ipolipemizzanti	15 (75%)	17 (85%)	NS

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

CCS: Canadian Cardiovascular Society; VS: ventricolo sinistro

**Tabella 3/B. Risultanze quantitative angiografiche coronariche a livello basale nei pazienti con malattia coronarica assegnati a trattamento con telmisartan (n=20) o placebo (n=20)**

	<b>Telmisartan (n=20)</b>	<b>Placebo (n=20)</b>	<b>P</b>
<b><i>Lesioni coronariche significative</i></b>			
Numero di stenosi significative/paziente	1.57±0.65	1.44±0.68	NS
Vasi con ≥1 stenosi >50%			
• 1-vaso	11 (55%)	10 (50%)	NS
• 2- o 3-vasi	9 (45%)	10 (50%)	NS
Arteria discendente anteriore	14 (70%)	13 (65%)	NS
Arteria circonflessa sinistra	6 (30%)	7 (35%)	NS
Arteria coronaria destra	9 (45%)	10 (50%)	NS
Diametro minimo luminale(mm)	0.55±0.23	0.58±0.27	NS
Diametro della stenosi (%)	85.5±9.9	84.8±8.9	NS
Lunghezza della lesione (mm)	15.7±6.1	16.9±5.8	NS

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

**Tabella 3/C. Numeri delle cellule progenitrici endoteliali nei pazienti con malattia coronarica assegnati a trattamento con telmisartan (n=20) o placebo (n=20)**

	Telmisartan (n=20)		Placebo (n=20)		P-value ANOVA
	Livello basale	4-settimane	Livello basale	4- settimane	
Globuli bianchi (10 <sup>3</sup> /mL)	5.35±1.81	5.49±1.76	5.87±1.55	5.99±1.89	NS
Monociti (10 <sup>3</sup> /mL)	0.55±0.35	0.60±0.39	0.59±0.29	0.51±0.34	NS
CD34+/KDR+/CD45- (cellule/μL)	1.18±0.34	1.44±0.41 *	1.12±0.29	1.11±0.36	0.013
CD133+/KDR+/CD45- (cellule/μL)	0.46±0.25	0.76±0.31 *	0.44±0.28	0.41±0.27	0.0001
CD105+/CD45-/CD34- (cellule/μL)	1.67±0.52	1.78±0.49	1.59±0.66	1.62±0.58	NS
CD14+/CD45+ (cellule/μL)	0.65±0.39	0.92±0.28 *	0.69±0.40	0.65±0.31	0.048

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

ANOVA, analisi della varianza; VS, ventricolo sinistro.

\*p<0.05, come comparazione con corrispondenti valori basali e con i pazienti del gruppo placebo

## Prospettive future

***Il trapianto di EPC.*** Viste le evidenze sperimentali che indicano che le EPC sono richiamate nei siti di danno e partecipano alla riparazione dei tessuti lesionati con la neovascolarizzazione a livello miocardico (Shintani 2001), periferico (Takahashi 1999) e cerebrale (Zhang 2002) si è diffusa tra i ricercatori l'ipotesi che possa realizzarsi la rigenerazione tissutale con l'impiego di cellule staminali in generale e di EPC in particolare.

Molti studi pre-clinici hanno dimostrato l'efficacia terapeutica delle EPC nei disordini ischemici e nel danno vascolare nei modelli animali (Kalka 2000; Asahara 1999).

Lo sviluppo della strategia ottimale per una terapia a base di cellule staminali rappresenta una difficile sfida. Sono necessari studi ulteriori per scoprire i meccanismi che regolano la mobilitazione, la migrazione, la differenziazione e il reclutamento delle EPC. Visto che molteplici fattori fisiologici e patologici sono coinvolti nella regolazione delle EPC, devono essere sviluppati regimi ottimali di attivazione, stimolazione, trattamento e probabilmente modificazione genetica. E' anche necessario il miglioramento e la standardizzazione dei metodi di cultura delle EPC.

In aggiunta, fonti alternative di progenitori endoteliali, quali il sangue del cordone ombelicale, sono attualmente oggetto di ricerca. Nonostante vi siano ancora molte domande senza risposta, i primi studi clinici mostrano alcuni risultati promettenti. Una migliore comprensione della biologia delle EPC ci aiuterà ad aumentare il potenziale terapeutico delle EPC così come ad utilizzare queste cellule come strumento terapeutico nella pratica clinica.

## Bibliografia

Abaci A, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 1999;99: 2239–42.

Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem cell and progenitor cells. *Nat*

Akiyama T et al. Angiographic and clinical outcome following coronary stenting of small vessels. A comparison with coronary stenting of large vessels. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1610-8.

Andreotti F, Becker RC. Atherothrombotic disorders: new insights from hematology. *Circulation* 2005; 111: 1855-63.

Antoniucci D et al. Restenosis after coronary stenting in current clinical practice. *Am HeartJ* 1998; 135: 510-8.

Aronson D et al. Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 528-35.

Asahara T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967

Asahara T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85: 221–8.

Bahlmann FH, et al. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45: 526–529.

Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int* 2003; 64: 1648–1652.

Barragan P et al. Coronary artery stenting without anticoagulation, aspirin, ultrasound guidance, or high balloon pressure: prospective study of 1051 consecutive patients. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1997; 42: 367-73.

Bauters C et al. Predictors of restenosis after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1291-8.

Bauters C et al. Six-month angiographic outcome after successful repeat percutaneous intervention for in-stent restenosis. *Circulation* 1998; 97: 318-21.

Berry C, L'Allier PL, Grègoire J, et al. Comparison of intravascular ultrasound and quantitative coronary angiography for the assessment of coronary artery disease progression. *Circulation* 2007; 115: 1851-7.

Betriu A et al. Randomized comparison of coronary stent implantation and balloon angioplasty in the treatment of de novo coronary artery lesions (START): a four-year follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1498-509.

Blau HM, et al. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-841.

Boheler KR, et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002; 91: 189-201.

Bompais H et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004; 103: 2577-84.

Brazelton TR, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779.

Buffon A et al. Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1512-21.

Buttner HJ et al. Rotational ablation with adjunctive low pressure balloon dilatation in diffuse 43 in-stent restenosis: immediate and follow-up results. (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 (Suppl A): 141A.

Caplan BA, et al. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 1973;17:401-17.

Cattelaens N et al. Directional atherectomy for treatment of stent restenosis-feasibility and histopathological findings in 28 patients. (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1998; 31 (Suppl A): 142A.

Cermeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.

Chen JZ, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:233-9.

Chen JZ, et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004;107: 273- 80.

Chevalier B et al. Treatment of in-stent restenosis: short and midterm results of a pilot randomized study between balloon and cutting balloon. (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (Suppl A): 62A.

Colombo A et al. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation* 1995; 91: 1676-88.

Colombo A et al. Preliminary observations regarding angiographic pattern of restenosis after rapamycin-eluting stent implantation. *Circulation* 2003; 107: 2178-80

Colombo A et al. Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation* 2003; 108: 788-794

Conti E, et al. Insulinlike growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation* 2004; 110: 2260-5.

Currier JW et al. Restenosis after PTCA: have we been aiming at the wrong target? *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 516-20.

Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H; LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359: 995–1003.

Dales JP et al. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome. *Int J Oncol* 2004; 24: 1197-204.

Dambrin G et al. Mid-term clinical outcome of coronary stenting in haemodialysis and not haemodialysis patients. (abstr) *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl):500.

de Feyter PJ et al. Reference chart derived from post-stent-implantation intravascular ultrasound predictors of 6-month expected restenosis on quantitative coronary angiography. *Circulation* 1999; 100: 1777-83.

Dens JA, Desmet WJ, Coussement P, et al. Long term effects of nisoldipine on the progression of coronary atherosclerosis and the occurrence of clinical events: the NICOLE study. *Heart* 2003; 89: 887-92.

Dieker HJ, French JK, Joziassse IC, et al. Antiplatelet therapy and progression of coronary artery disease: a placebo-controlled trial with angiographic and clinical follow-up after myocardial infarction. *Am Heart J* 2007; 153: 66. e1-8.

Dimmeler S, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells *via* the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391–397.

Dimmeler S, et al. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis. *J Mol Med* 2004;82:671–7.

Dirschinger J et al. Influence of balloon pressure during stent placement in native coronary arteries on early and late angiographic and clinical outcome: a randomized evaluation of high-pressure inflation. *Circulation* 1999; 100: 918-23.

Distler O et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002; 4: R11.

Dong XX, Hui ZJ, Xiang WX, Rong ZF, Jian S, Zhu CJ. Ginkgo biloba extract reduces endothelial progenitor-cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 49: 111-5.

Drexler H, et al. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:51– 60.

Edelberg JM, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore agingimpaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 2002;90:e89–e93.

Egami K, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003; 112: 67–75.

Elezi S et al. Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation* 1998; 98: 1875-80.

Endemann DH, et al. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1983–92.

Fadini GP, et al. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2006; 27: 2247-55.

Fadini GP, et al. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 997-1004.

Farb A et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999; 99: 44-52.

Fina L, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-26.

Fischell TA et al. Coronary artery vasoconstriction routinely occurs after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A quantitative arteriographic analysis. *Circulation* 1988; 78: 1323-34.

Fischman DL et al. A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; 331: 496-501.

Fliser D, Buchholz K, Haller H; for the EUTOPIA investigators (European Trial on Olmesartan and Pravastatin in Inflammation and Atherosclerosis). Anti-inflammatory effects of angiotensin II subtype 1-receptor blockade in hypertensive patients with micro-inflammation. *Circulation* 2004; 110: 1103–1107.

Foresta C, et al. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2005;17:288 –90.

Fuchs S, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1726-1732.

Fukuda D, Sata M. The renin-angiotensin system: A potential modulator of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res* 2007; 30: 1017–1018

George J et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: e57-e60.

George J, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004;25:1003– 8.

George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, et al. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2636-41.

Gershlick A et al. Inhibition of restenosis with a paclitaxel-eluting, polymer-free coronary stent: the European evaluation of pacliTaxel Eluting Stent (ELUTES) trial. *Circulation* 2004; 109: 487-93

Ghani U, et al. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 2005;36:151–3.

Glaser R, Selzer F, Faxon DP, et al. Clinical progression of incidental, asymptomatic lesions discovered during culprit vessel coronary intervention. *Circulation* 2005; 111; 143-9.

Goldberg SL et al. Comparison of aggressive versus nonaggressive balloon dilation for stent deployment on late loss and restenosis in native coronary arteries. *Am J Cardiol* 1998; 81: 708-12.

Goldberg SL et al. Predictors of the occurrence and type of in-stent restenosis. (abstr) *Circulation* 1997; 96 (Suppl I): I-434.

Groszek E, Grundy SM. The possible role of the arterial microcirculation in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Chronic Dis*, 1980; 33: 679-684.

Guven H, 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* 2006; 48: 1579-87.

Haznedaroglu IC, et al. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 867–880.

Hebbar M et al. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheum.* 2000; 43: 889-93.

Heeschen C, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004;109: 1615–22.

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiological stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340–1346.

Heiss C et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1441-8.

Hill JM, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593– 600.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348: 593–600.

Ho JW et al. Clinicopathological and prognostic implications of endoglin (CD105) expression in hepatocellular carcinoma and its adjacent non-tumorous liver. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 176-81.

Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, et al. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol* 2007; 99: 46-8.

Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, et al. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli. *Circ Res* 2001;89: 709–15.

Hoffmann R et al. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis. A serial intravascular study. *Circulation* 1996; 94: 1247-54.

Hristov M, et al. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease—past, present and future. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 1–7.

Iba O, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002;106:2019 –25.

Imanishi T, et al. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005;23: 97–104.

Imanishi T, et al. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells. *Hypertens Res* 2004;27:101– 8.

Imanishi T, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:407–13.

Inoue T, Sata M, Hikichi Y, et al. Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation*. 2007; 115: 553-61.

Iwaguro H, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;105:732– 8.

Kalka C, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3422–7.

Kang HJ et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004; 363: 751-6.

Kasaoka S et al. Angiographic and intravascular ultrasound predictors of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1630-5.

Kastrati A et al. Increased risk of restenosis after placement of gold-coated stents: results of a randomized trial comparing gold-coated with uncoated steel stents in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 101: 2478-83.

Kastrati A et al. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 1428-36.

Kastrati A et al. Prognostic value of the modified American College of Cardiology/American Heart Association stenosis morphology classification for long-term angiographic and clinical outcome after coronary stent placement. *Circulation* 1999; 100: 1285-90.

Kehat I, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-414.

Kip KE et al. Coronary angioplasty in diabetic patients. The National Heart, Lung, and Blood Institute Percutaneous Coronary Angioplasty Registry. *Circulation* 1996; 94: 1818-25.

Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 733-9.

Kissel CK, Lehmann R, Assmus B, Aicher A, Honold J, Fischer-Rasokat U, et al. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2341-9.

Kondo T, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1442–7.

Kong D et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004; 110: 2039-2046.

Kornowski R et al. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1997; 95: 1366-9.

Kornowski R et al. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 224-30.

Krankel N, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:698 –703.

[Kunz GA](#), [Liang G](#), [Cuculi F](#), et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. [Am Heart J](#) 2006; 152: 190-5.

Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, et al. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation* 2004; 109: 2986-92.

Lau KW et al. Angiographic restenosis rate in patients with chronic total occlusions and subtotal stenosis after initially successful intracoronary stent placement. *Am J Cardiol* 1999; 83: 963-5.

Laufs U, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109: 220–226.

Leon MP et al. A clinical trial comparing three antithrombotic drug regimens after coronary artery stenting. *N Engl J Med* 1998; 339: 1665-71.

Leor J, Marber M. Endothelial progenitors. A new tower of Babel? *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1588-90.

Liistro F et al. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* 2002; 105; 105: 1883-6

Lin Yet al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 200; 105: 71-7.

Lincoff AM et al. Complementary clinical benefits of coronary-artery stenting and blockade of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors. *N Engl J Med* 1999; 341: 319-27.

Llavadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399–405.

Loomans CJM, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction. A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes* 2004;53:195–9.

Losordo DW, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115: 3165–3172.

Loubeyre C et al. Direct stenting in acute coronary syndromes. Preliminary results of a randomized study. (abstr) *Circulation* 2000; 102 (Suppl II): II-755.

Luttun A et al. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 88-96.

Marzocchi A et al. Results of coronary stenting for unstable versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1314-8.

Massa M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199 – 206.

Mehran R et al. Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation* 1999; 100: 1872-8.

Mehran R et al. PTCA alone versus stent alone therapy for focal in-stent restenosis: acute and long term results. (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (Suppl A): 26A.

Mehran R et al. Vessel size and lesion length influence late clinical outcomes after native coronary artery stent placement. (abstr) *Circulation* 1997; 96 (Suppl): I-274.

Menasche P. Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 351-357.

Mezey E et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782.

Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. *Heart* 2007; 93: 1046-50.

Min TQ, et al. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004; 18: 203-9.

Minhajati R et al. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch* 2006; 448: 127-34.

Mintz GS et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94: 35-43.

Mocini D, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am Heart J* 2006; 151: 192-7.

Moreno PR et al. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*; 113: 2245-2252.

Morice MC et al. A randomized comparison of sirolimus eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002; 346: 1773-80

[Morimoto S, et al.](#)  Renal and vascular protective effects of telmisartan in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2006; 29(8): 567-72.

Moses JW et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003; 349: 1315-23

Mouquet F, Pfister O, Jain M, et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res* 2005;97: 1090–2.

Moussa I et al. The discrepancy between quantitative coronary angiography and intravascular ultrasound in determining true vessel size: a homogeneous or selective phenomenon? (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (Suppl A): 76A.

Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 936-42.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664–8.

Narins CR et al. Prevention of in-stent restenosis. *Semin Interv Cardiol* 1998; 3: 91-103.

Noble M, et al. Redox state as a central modulator of precursor cell function. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 251–271.

Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol* 2007; 119: 344-8.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494 – 501.

Orlic D, et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 221-229

Park SJ et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med* 2003; 348: 1537-45

Pasceri V, et al. Randomised trial of atorvastatin for reduction of myocardial damage during coronary intervention. Results from the ARMYDA study. *Circulation* 2004;110:674-8

Paul M, et al. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747–803.

Pauleto P, et al. Smooth muscle proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *Cli Sci* 1994; 87: 467-479

Peichev M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC-133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.

- Pellegatta F, et al. In vitro isolation of circulating endothelial progenitor cells is related to the high density lipoprotein plasma levels. *Int J Mol Med* 2006;17:203–8.
- Pelliccia F, et al. Abnormal neo-angiogenesis evaluated by CD105 expression of endothelial precursor cells is associated with restenosis after PCI. *Am J Cardiol* 2006; 98: 23M.
- Pelliccia F, et al. Mobilization of stem cell into peripheral blood is impaired in patients with restenosis after PCI. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (Supplement B): 23B.
- Pelliccia F, et al. Safety and efficacy of short-term celecoxib before elective percutaneous coronary intervention for stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2006; 98: 1461-3.
- Pistrosch F, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2005;183:163–7.
- Popma JJ, Leon MB, Moses JW, et al. Quantitative assessment of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in native coronary arteries. *Circulation* 2004; 110: 3773-80.
- Prati F et al. In-stent neointimal proliferation correlates with the amount of residual plaque burden outside the stent: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 1999; 99: 1011-4.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
- Quyyumi AA, Hill JM. Circulating endothelial progenitor cells as novel biological determinants of vascular function and risk. *Can J Cardiol* 2004; 20 (Suppl B): 44B–8B.
- Rafii S, et al. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9: 702–12.
- Rauscher FM, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003;108: 457–63.
- Rehman J, et al. Peripheral blood ‘endothelial progenitor cells’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164 –9.
- Reiber JH, et al. Assessment of short-, medium-, and long-term variations in arterial dimensions from computer-assisted quantitation of coronary cineangiograms. *Circulation* 1985; 71: 280-8.

Reimers B et al. Long-term clinical follow-up after successful repeat percutaneous intervention for stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 186-92.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-46.

Ribichini F et al. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation* 1998; 97: 147-54.

Rodgers KE, et al. Effect of angiotensin II on hematopoietic progenitor cell proliferation. *Stem Cells* 2000; 18: 287-294.

Romani AA. The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. *J Surg Oncol* 2006; 93:446-55.

Rosano GM, et al. Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric* 2007; 10 (Suppl 1): 19-24.

Rosenson RS, Reasner CA. Therapeutic approaches in the prevention of cardiovascular disease in metabolic syndrome and in patients with type 2 diabetes. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19: 480-487.

Rosenzweig A. Circulating endothelial progenitors – cells as biomarkers. *N Engl J Med* 2005; 353: 1055-7.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-5.

Rozenman Y et al. Clinical and angiographic predictors of immediate recoil after successful coronary angioplasty and relation to late restenosis. *Am J Cardiol* 1993; 72: 1020-5.

Rubartelli P et al. Stent implantation versus balloon angioplasty in chronic coronary occlusions: results from GISSOC trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 90-6.

Saad RS et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2005; 36: 955-61.

Sabin FR. Studies on the origin of blood vessels and of red blood corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Carnegie Inst Washington Contrib Embryol* 1920; 9: 215-262.

Salven P, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; 101: 168-72.

Sasaki K, et al. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109: 603–611.

Sata M, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403–409.

Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1008–1014.

Savage MP et al. Efficacy of coronary Stenting versus balloon angioplasty in small coronary arteries. Stent Restenosis Study (STRESS) Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1998 ; 31: 307-11

Schächinger V, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9.

Schafer A, et al. telmisartan improves vascular function and reduces platelet activation in rats with streptozocin-induced diabetes mellitus. *Pharmacol res* 2007; 56:217-23.

Schiller NB, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2: 358-67.

Schmidt-Lucke C, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predict future cardiovascular events. Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981–7.

Schnabel R, et al. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:e53–9.

Schober A et al. Peripheral CD 34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*, 2005; 96: 1116-1122.

Schofer J et al. Restenosis after stenting of matched occluded and non-occluded coronary arteries. Should there be a difference? *Eur Heart J* 1999; 20: 1175-81.

Serruys PW et al. A comparison of balloon expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary disease. *N Engl J Med* 1994; 331: 489-95.

Shantsila E, et al. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 741-52.

Sharma SK et al. Predictors of restenosis after rotational atherectomy for in-stent restenosis. (abstr) *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl): 396.

Sharma SK et al. Rotational atherectomy achieves a higher acute luminal gain vs PTCA in the treatment of diffuse in-stent restenosis: insight from the randomized ROSTER trial. (abstr) *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (Suppl A): 49A.

Shintani S, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2776 –9.

Shomig A et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334: 1084-9.

Silvestre JS, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation* 2003; 108: 2839-42.

Simper D, et al. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of non cardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation* 2003;107:143–9.

Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002; 106: 1199-204.

Skowasch D et al. Presence of bone-marrow- and neurt-crest-derived cells in intimal hyperplasia at the time of clinical in-stent restenosis. *Cardiovascular Research*, 2003; 60: 684-691.

Sousa JE et al. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation* 2001; 103: 192-5

Stauffer BL, Hoetzer GL, Van Guilder GP, Smith DT, Desouza CA. Gender differences in endothelial tissue-type plasminogen activator release in middle-aged adults. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1547–9.

Stone GW et al. A polymer-based paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 221-31.

Strehlow K, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059–3065.

Sutherland DR *et al.* The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother* 1996; 5: 213–226

Szmitko PE, et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* 2003; 107:3093-100.

Taguchi A, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004;109:2972–5.

Takahashi T, et al. Ischemia- and cytokine induced mobilization of bone-marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5:434–8.

Tepper OM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetes exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002;106:2781– 6.

Theiss HD, David R, Engelmann MG, Barth A, Schotten K, Naebauer M, et al. Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *Eur Heart J* 2007; 28: 1258-64.

Thum T, et al. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2006;70:50–60.

Thum T, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1693–701.

Tomita S, Mickle DA, Weisel RD et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132-1140.

[Unger T](#). Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. [J Hypertens Suppl](#). 2003 Jul;21(6):S3-7.

Urbich C, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003;108: 2511-6.

Yao E-H, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect. *Hypertens Res* 2007; 30: 1119–1128.

Valgimigli M, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004: 110: 1209-13.

[Van Belle E](#), et al. ACE inhibition accelerates endothelial regrowth in vivo: a possible explanation for the benefit observed with ACE inhibitors following arterial injury. [Biochem Biophys Res Commun](#). 1997; 231: 577-81

Vasa M, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1–7.

Verma S, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function. *Circulation* 2004;109:r91–100.

[Vitale C](#), et al. In patients with coronary artery disease endothelial function is associated with plasma levels of C-reactive protein and is improved by optimal medical therapy. [Ital Heart J](#) 2003; 4: 627-32.

Vitale C, et al. Gender-specific characteristics of atherosclerosis in menopausal women: risk factors, clinical course and strategies for prevention. *Climacteric* 2007; 10 (Suppl 2): 16-20.

von Dahl J et al. Clinical and angiographic predictors of recurrent restenosis after percutaneous transluminal rotational atherectomy for treatment of diffuse in-stent restenosis. *Am J Cardiol* 1999; 83: 862-7.

Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 2001;49:554–60.

Walter DH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105: 3017-24.

Wang X, et al. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol* 2004;44:881–9.

Wang X, et al. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol* 2004;27:243–55.

Wang Y, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 2006; 92: 768-74.

Waters D, et al. Advantages and limitations of serial coronary arteriography for the assessment of progression and regression of coronary atherosclerosis: implications for clinical trials. *Circulation* 1993; 87 (suppl II): 38-47.

Werner N, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007.

Yao E-H, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension *via* an antioxidant effect. *Hypertens Res* 2007; 30: 1119–1128.

Zhang H et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*, 2005; 105: 3286-3294.

Zhang ZG, et al. Bone marrow–derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002; 90:284–8.