

RUOLO DEI PROGENITORI ENDOTELIALI NELLE MALATTIE RENALI

E. Lazzeri, M.L. Angelotti, L. Ballerini, F. Becherucci, B. Mazzinghi, E. Parente, E. Ronconi, C. Sagrinati, P. Romagnani, L. Lasagni

Centro Interdipartimentale di Nefrologia Cellulare e Molecolare, Centro di Eccellenza per il Trasferimento, la Ricerca e l'Alta Formazione DENOthe, Università degli Studi, Firenze

The role of endothelial progenitor cells in renal disease

Recent evidence suggests that injury to the renal vasculature may play an important role in the pathogenesis of both chronic and acute ischemic kidney injury. Early alterations in peritubular capillary blood flow during reperfusion have been documented and associated with loss of normal endothelial cell function. In addition, ischemia induces alterations in endothelial cells that may promote inflammation and procoagulant activity, thus contributing to vascular congestion. Reduction of the microvasculature density increases hypoxia-mediated fibrosis and alters proper hemodynamics, which may lead to hypertension. This may play a critical role in the progression of chronic kidney disease following initial recovery from ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. The turnover and replacement of endothelial cells is therefore an important mechanism in the maintenance of vascular integrity also in the kidney. It is becoming clear that impaired vascular repair mechanisms as a result of a reduced number and/or impaired function of endothelial progenitor cells may contribute to renal disease. Moreover, investigators have begun to identify potential mechanisms responsible for the loss of function of endothelial progenitors in renal disease. In allografts, persistent injury results in excessive turnover of graft vascular endothelial cells. Moreover, chronic damage elicits a response that is associated with the recruitment of both leukocytes and endothelial progenitors, facilitating an overlapping process of inflammation and angiogenesis. In conclusion, angiogenesis and endothelial cell turnover play a pivotal role in renal disease and allograft rejection. Manipulation of these processes might have important implications for the development of novel therapeutic strategies in the near future. (G Ital Nefrol 2008; 25: 537-46)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

EPC,
Ischemia/
reperfusion,
Allograft

PAROLE CHIAVE:

EPC,
Ischemia/
riperfusion,
Trapianto

✉ Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Laura Lasagni
Centro Interdipartimentale di
Nefrologia Cellulare e Molecolare
Centro di Eccellenza per il
Trasferimento la
Ricerca e l'Alta Formazione
DENOthe
Università degli Studi
Viale Pieraccini, 6
50139 Firenze
e-mail: l.lasagni@dfc.unifi.it

LE CELLULE ENDOTELIALI NEL DANNO RENALE ISCHEMICO ACUTO

Il bersaglio principale degli insulti ischemici e nefrotossici è sempre stato considerato l'epitelio tubulare, ma è divenuto sempre più evidente che nel danno renale acuto anche le cellule endoteliali subiscono una lesione precoce che causa il loro ingrossamento con conseguente restringimento del lume vascolare e alterata perfusione del tessuto (1, 2). La conseguenza più importante di questa prolungata ipoperfusione è un ritardato recupero funzionale del rene danneggiato associato a disfunzione e perdita di cellule epiteliali tubulari (1, 2).

L'ischemia renale acuta e il suo recupero sono stati studiati in modelli animali a seguito di danno da ischemia/riperfusion (I/R) ottenuto mediante legatura dell'arteria renale o infusione di composti vasoattivi. Il danno vascolare indotto dall'I/R può compromettere la funzione renale in diversi modi, come ad esempio influenzando la reattività vascolare, alterando la funzione di barriera capillare e modulando "pathways" infiammatorie e della coagulazione. Ognuno di questi fenomeni può prolungare lo stato di ipoperfusione del rene ed esacerbare il danno renale indotto dall'I/R (2) (Fig. 1). Un'alterata funzione endoteliale probabilmente media anche il processo infiammatorio caratteristico del danno indotto da I/R e documentato in numerosi

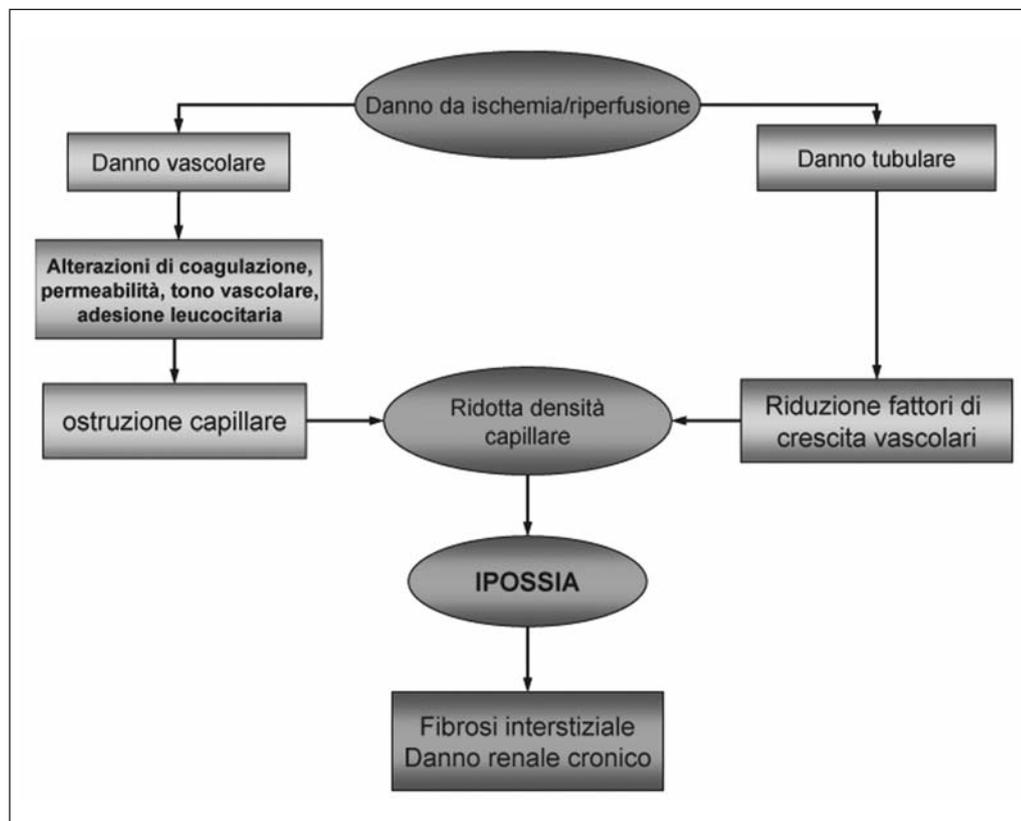


Fig. 1 - Possibile contributo del danno endoteliale alla progressione del danno renale. Il danno da I/R produce alterazioni sia delle cellule vascolari che delle cellule epiteliali tubulari. Queste alterazioni concorrono a ridurre la densità capillare peritubulare con conseguente incremento della ipossia e della fibrosi ad essa associata. Quindi, la conseguenza del danno endoteliale è una progressione dell'iniziale insulto ischemico verso un danno renale cronico.

studi (1, 2). L'adesione di monociti e macrofagi risulta evidente già due ore dopo l'I/R (3) e contribuisce all'intrappolamento degli eritrociti e all'emostasi prolungando così il ridotto flusso sanguigno renale ed esacerbando il danno tubulare. La I/R infatti incrementa l'espressione sull'endotelio capillare di una serie di molecole di adesione per i leucociti, quali la P- e la E-selectina, e molecole di adesione intercellulare. Trattamenti volti a ridurre l'interazione leucociti-endotelio inibendo queste molecole proteggono dal danno renale indotto da I/R (4).

IL DANNO VASCOLARE COME MEDIATORE DELLE ALTERAZIONI CRONICHE NELLA FUNZIONE RENALE

Dopo il danno renale acuto, se il paziente sopravvive all'insulto iniziale, generalmente si osserva un completo recupero della funzionalità renale. Comunque, vi sono sempre più conferme che il danno renale acuto ha poi effetti cronici sia in modelli sperimentali su animali, sia in diverse condizioni cliniche nelle quali sia stato eseguito un *follow-up* a lungo termine (5). Ad esempio, dati recenti suggeriscono che fino al 13% dei pazienti che hanno subito un danno renale acuto progrediscono verso l'insufficienza renale terminale entro 3 anni.

Inoltre, pazienti pediatrici dopo danno renale acuto hanno un'elevata predisposizione a sviluppare patologie renali ed ipertensione (5), mentre un danno subito nell'ambito di un trapianto (ad esempio una ritardata ripresa funzionale dell'organo) rappresenta un fattore di rischio indipendente per la sopravvivenza del trapianto e per lo sviluppo dell'ipertensione post-trapianto (5). Queste osservazioni suggeriscono quindi che danni acuti al rene predispongono a complicazioni croniche. Probabilmente i capillari peritubulari sono cronicamente compromessi dopo un'ischemia e possono contribuire alle complicazioni a lungo termine osservate dopo un iniziale recupero da un insulto acuto (6) (Fig. 1).

La malattia renale cronica che segue un danno ischemico acuto è caratterizzata dallo sviluppo della fibrosi interstiziale e dalla proteinuria (5). Vi sono evidenze emergenti che l'ipossia cronica, indotta dalla perdita di capillari peritubulari o dall'aumentata resistenza vascolare, possa risultare nello sviluppo della fibrosi interstiziale in malattie renali di diversa eziologia, rappresentando perciò una *pathway* comune di progressione della malattia. L'ipossia stimola la produzione di diversi fattori profibrogenici come ad esempio il *transforming growth factor* beta (TGF- β) (7). La fibrosi è poi progressiva, dal momento che la formazione della cicatrice interstiziale incrementa la distanza per la dif-

fusione al parenchima renale accentuando l'ipossia e la fibrosi stessa (7, 8) (Fig. 1). L'inibizione della progressione della fibrosi appare quindi di primaria importanza per preservare la funzione renale.

Un'ulteriore questione non completamente risolta è relativa al meccanismo mediante il quale si ha perdita di vasi sanguigni nel contesto dell'I/R. Chiaramente, fattori associati con il danno ischemico, quale il TGF- β , possono indurre apoptosi delle cellule endoteliali (9). È poi possibile che il "milieu" umorale post-ischemia possa promuovere la perdita di vasi e/o inibire la rigenerazione. Dopo il danno, vi è un'iniziale risposta angiogenica con incremento della proliferazione delle cellule endoteliali glomerulari e peritubulari (10). Si osserva inoltre un incremento transiente nell'espressione del VEGF (principalmente nei tubuli e nei podociti glomerulari), seguito da un successivo decremento dell'espressione di VEGF, associato con una diminuzione della proliferazione delle cellule endoteliali. A 4-8 settimane dal danno, si osserva inoltre un incremento nell'espressione di molecole antiangiogeniche, come la trombospondina-1 (11). È stato perciò proposto che l'incremento di espressione di trombospondina-1, la diminuzione dell'espressione del VEGF e la perdita di capillari contribuiscano allo sviluppo della glomerulosclerosi e della fibrosi interstiziale (11). Effettivamente la mancata persistenza dell'espressione di VEGF ha un significato fisiopatologico nella progressione dell'insufficienza renale e la sistemica somministrazione di VEGF a ratti dopo danno renale aumenta l'angiogenesi nel rene, riduce la fibrosi renale e stabilizza la funzionalità renale (12).

La perdita di cellule endoteliali e l'alterata rigenerazione hanno un significato fisiopatologico anche nei modelli di glomerulonefrite anti membrana basale glomerulare e disfunzione renale cronica. Nel modello di glomerulonefrite acuta anti-Thy-1.1, è stato osservato che la proliferazione delle cellule endoteliali glomerulari è importante nel processo di riparazione dei capillari (13) e che la somministrazione di VEGF promuove la rigenerazione dei capillari, previene la sclerosi globale e la conseguente insufficienza renale (14). Al contrario, l'impiego di un antagonista del VEGF inibisce la rigenerazione endoteliale e accelera la progressione dell'insufficienza renale in modelli animali di glomerulonefrite mesangioproliferativa (15).

Nel complesso questi studi hanno dimostrato che la perdita progressiva di capillari può essere un fattore primario nello sviluppo dell'insufficienza renale cronica (IRC) e che la somministrazione di VEGF può attenuare sia il grado di perdita capillare che l'entità del danno interstiziale e renale. Se è quindi ipotizzabile che alcuni processi di patologia renale cronica associati con la perdita di cellule endoteliali e di capillari peritubulari possano essere attenuati indu-

cendo farmacologicamente un aumento della angiogenesi, un altro possibile approccio terapeutico è rappresentato dal trasferimento di progenitori endoteliali (EPC) nel rene.

TEST DI VERIFICA

1) Un fattore primario che contribuisce alla progressione del danno renale acuto verso una malattia renale cronica è rappresentato da:

- Un'eccessiva proliferazione delle cellule endoteliali
- La perdita progressiva di capillari peritubulari
- Una riduzione dello stato infiammatorio
- Un aumento persistente dell'espressione di fattori angiogenici
- Una riduzione dell'espressione di fattori profibrogenici.

2) Nella progressione dell'insufficienza renale si osserva:

- Una riduzione dell'espressione di molecole antiangiogeniche
- Una riduzione dell'ipossia locale
- Un incremento transiente nell'espressione del VEGF nei tubuli e nei podociti
- Una riduzione dell'espressione di TGF- β
- Una ridotta apoptosi delle cellule endoteliali.

3) In modelli animali il significato fisiopatologico della perdita di cellule endoteliali nella progressione dell'insufficienza renale è dimostrato:

- Dagli effetti positivi derivanti dalla somministrazione di VEGF
- Dagli effetti positivi derivanti dalla somministrazione di antagonisti del VEGF
- Dagli effetti negativi derivanti dalla somministrazione di VEGF
- Dagli effetti positivi derivanti dalla somministrazione di molecole antiangiogeniche
- Dall'assenza di effetto derivante dalla somministrazione di molecole angiogeniche.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

I PROGENITORI ENDOTELIALI CIRCOLANTI

Fino agli anni '90 l'endotelio vascolare era considerato un tessuto inattivo che ricopre l'interno dei vasi sanguigni. In caso di trauma si riteneva che la rigenera-

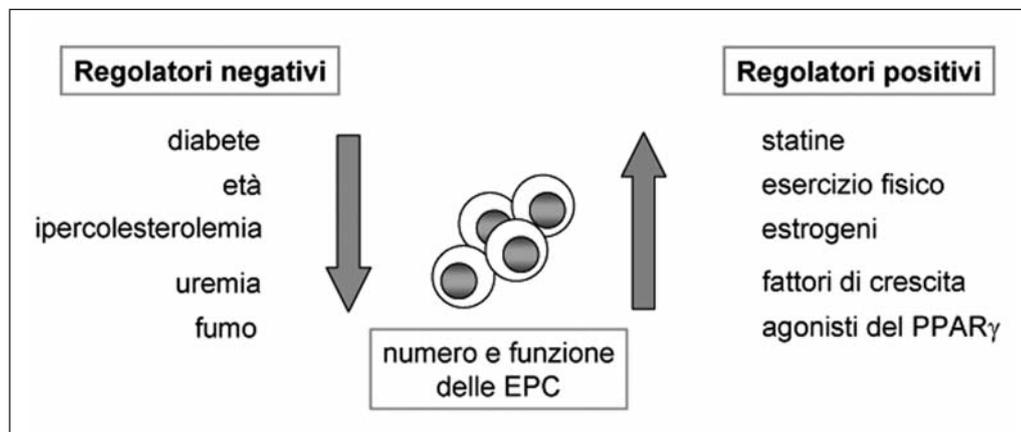


Fig. 2 - Regolazione del numero e della funzione delle EPC. Il numero e la funzione delle EPC sono regolati positivamente da alcuni fattori quali le statine, l'esercizio fisico, gli estrogeni, alcuni fattori di crescita (VEGF, EPO) e gli agonisti del PPAR γ . L'età, il fumo, il diabete mellito di tipo I e II, l'ipercolesterolemia e l'uremia sono invece regolatori negativi del numero e della funzione delle EPC.

zione dell'endotelio fosse mediata solo dalla proliferazione delle cellule endoteliali localizzate ai margini della ferita. Questa visione si è notevolmente modificata negli ultimi 10 anni. Da un lato si è scoperto che l'endotelio è una struttura altamente attiva, capace di partecipare alla regolazione della vasocostrizione, alla coagulazione, alla proliferazione delle cellule muscolari lisce, alla permeabilità vascolare e all'adesività della superficie endoteliale (attraverso l'espressione di molecole di adesione) (16). Dall'altro lato, è divenuto sempre più chiaro che progenitori endoteliali circolanti (EPC) derivati dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo, possono agire come cellule rigeneranti assieme a cellule progenitrici locali (17).

Le EPC furono inizialmente identificate come cellule mononucleate circolanti positive per i marcatori di cellula staminale ematopoietica CD34 e Flk-1 (uno dei recettori del VEGF) e capaci di assumere *in vitro* un fenotipo endoteliale, caratterizzato dall'acquisizione dell'espressione di una serie di marcatori endoteliali (CD31, E-selectina, Flk-1, cNOS e agglutinina-1 *Ulex europaeus*) (17).

Studi successivi (18) hanno consentito di stabilire che un'altra molecola, il CD133, è presente sulle EPC in uno stadio precoce del loro sviluppo. Perciò, sebbene le cellule progenitrici esprimano il CD133 nei loro stadi precoci di maturazione, questo viene successivamente perduto, mentre l'espressione del CD34 e del KDR permane. Recentemente abbiamo descritto una popolazione circolante di cellule caratterizzate dall'espressione dell'antigene monocitario CD14 e dall'espressione del CD34 a livelli evidenziabili solo con tecniche citofluorimetriche altamente sensibili (19). Queste cellule sono state denominate CD14+CD34^{low}, rappresentano lo 0.6-8.5% di tutti bianchi e costituiscono la fonte principale di EPC circolanti (19).

Nel complesso queste osservazioni suggeriscono che le EPC sono una popolazione eterogenea di cellule che circolano nel sangue a diversi stadi di maturazione,

ciascuno con un diverso potenziale di differenziare in cellule endoteliali mature. Indipendentemente dal grado di maturazione e dal fenotipo, tutte le EPC hanno la capacità di essere reclutate nei siti di danno per mantenere l'integrità vascolare. Probabilmente, il tipo cellulare predominante che media la rigenerazione è la popolazione di EPC più numerosa presente nel circolo (CD14+CD34+KDR+) essendo più rapidamente disponibile per il reclutamento (19).

Il ruolo di protezione vascolare svolto dalle EPC nell'uomo è ormai ampiamente dimostrato, in primo luogo dall'associazione fra il numero di EPC e i fattori di rischio per aterosclerosi (20). Il numero di EPC è più basso in pazienti con alto rischio di malattia coronarica (21) e l'età, il fumo, il diabete mellito di tipo I e II e l'ipercolesterolemia sono fattori che alterano il numero e/o la funzione delle EPC. Allo stesso tempo, queste condizioni sono associate con un alto rischio di aterosclerosi (22). Trattamenti con statina e agonisti del PPAR- γ portano ad un incremento del numero delle EPC circolanti e ad una migliore funzione delle EPC stesse (22) (Fig. 2).

Le EPC possono indurre rigenerazione vascolare differenziandosi in cellule endoteliali, ma anche promuovere la crescita vascolare tramite un effetto paracrino di produzione di fattori di crescita (23). In effetti le EPC che raggiungono un tessuto ischemico, tramite un meccanismo di *homing* in massima parte regolato dalla presenza di un gradiente della chemochina SDF-1 (24), è stato dimostrato che secernono molte citochine angiogeniche quali il VEGF, l'angiopoietina e l'FGF (25).

LE EPC IN DIFFERENTI STADI DELL'INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

Come è stato messo in evidenza nei paragrafi precedenti, l'IRC è caratterizzata da uno stato di disfunzione endoteliale, aterosclerosi accelerata ed elevato

TABELLA I - VALUTAZIONE DEL NUMERO DI EPC IN DIFFERENTI PATOLOGIE RENALI

Soggetti/stadio di insufficienza renale	Popolazione circolante analizzata	Numero di EPC <i>in vitro</i>
Pazienti emodializzati (34)	CD34+ ↓ CD133+ ↓	-41% vs controllo
Insufficienza renale avanzata (37)	CD34+ ↓	-45% vs controllo
Insufficienza renale avanzata - effetto di trattamento con EPO (36)	CD34+ ↑dopo trattamento con EPO	Fino a +312% vs pre-trattamento
Insufficienza renale avanzata (39)	CD34+ nessuna differenza rispetto ai controlli sani	-29% vs controllo
Malattia renale allo stadio finale (39)	CD34+, nessun incremento significativo dopo l'inizio della dialisi	-20% vs controllo +17% (dopo dialisi) vs controllo
Pazienti emodializzati (38)	CD34+ ↓ CD34+/CD133+ ↓	+26% vs controllo
Pazienti emodializzati (35)	Non analizzato	-44% vs controllo
Pazienti trapiantati (40)	CD34+ ↑	-7% vs controllo +45% vs pazienti con danno renale avanzato
Pazienti con emodialisi notturna (41)	CD34+/VE-caderina+ ↑ rispetto alla emodialisi convenzionale	Non analizzata
Pazienti con emodialisi peritoneale (42)	CD34+	+5% vs controllo

rischio cardiovascolare. Il coinvolgimento dell'endotelio è ulteriormente evidenziato da studi condotti in pazienti in emodialisi, nei quali il numero delle cellule endoteliali mature circolanti – un *marker* di danno endoteliale – risulta aumentato rispetto ai controlli sani (26) ed è predittivo di eventi vascolari successivi (27). Partendo da questi dati e dalle recenti osservazioni sul ruolo delle EPC nella rigenerazione endoteliale, sono state pertanto indagate le correlazioni fra il numero e le proprietà funzionali delle EPC e diverse patologie renali (28-36) (Tab. I).

L'osservazione comune a questi studi è un'alterata funzione delle EPC coltivate *in vitro* e un ridotto numero di cellule CD34+ nel sangue periferico. Alcuni dati apparentemente discordanti sui livelli di EPC in pazienti in dialisi (28, 29, 32) trovano spiegazione nell'esclusione di pazienti affetti da malattie sottostanti - altre dal danno renale terminale - note per essere associate con una diminuzione del numero e della funzione delle EPC (32) e nei trattamenti dei pazienti con eritropoietina (32).

La terapia dialitica e il trapianto sembrano indurre un effetto positivo sulla biologia delle EPC (33, 34). Questo potrebbe indicare che specifiche tossine uremiche sono responsabili dell'alterazione del numero e della funzione delle EPC osservata nell'insufficienza

renale. La potenziale importanza di rimuovere le tossine uremiche è dimostrata dal fatto che sia l'emodialisi notturna che la dialisi peritoneale ad alta efficienza sono associate con un normale numero ed una normale biologia delle EPC (35, 36).

Nell'analisi di questi dati deve essere posta molta cautela. La presenza concomitante di altre patologie quali il diabete mellito, la malattia coronarica, l'iperlipoproteinemia può esercitare una forte influenza sulla funzione e sul numero delle EPC (20-22). È spesso difficile separare questi effetti da quelli derivati dall'uremia di per sé. Inoltre, altri fattori confondenti sono rappresentati dai trattamenti terapeutici a cui sono sottoposti i pazienti con insufficienza renale avanzata, quali blocco dei recettori dell'angiotensina, statine, eritropoietina e tiazolidinedioni, tutti noti agenti stimolanti delle EPC nell'uomo (26, 32, 33).

I potenziali meccanismi responsabili della disfunzione uremica delle EPC sono stati recentemente studiati. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato un effetto del siero uremico come causa di disfunzione delle EPC o alterata differenziazione delle MNC ad EPC (32). Questo ha indotto la ricerca verso l'identificazione di specifiche tossine uremiche coinvolte. Sostanze candidate sono l'ormone paratiroideo (PTH), IL-6,

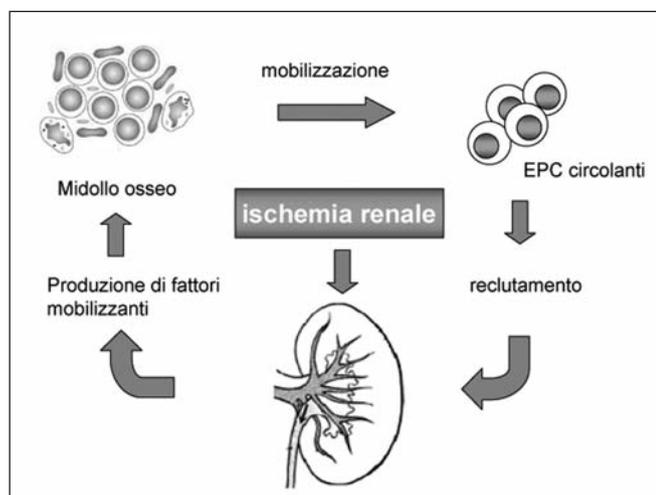


Fig. 3 - Modello di mobilizzazione e migrazione di EPC a seguito di danno renale ischemico. Dopo un insulto ischemico le EPC vengono rapidamente mobilizzate dal midollo osseo ed entrano in circolo. La produzione di fattori chemiotattici nel rene danneggiato (ad esempio SDF-1) crea un gradiente capace di reclutare le EPC dal circolo all'organo.

l'omocisteina, il p-cresolo e altri.

In pazienti con iperparatiroidismo primario la diminuzione dei livelli di PTH dopo paratiroidectomia è seguita da un incremento dei progenitori ematopoietici (37). Inoltre, sono stati descritti effetti diretti del PTH sui livelli di eritropoietina (38). Quest'ultima è un potente stimolo alla formazione e al rilascio di EPC dal midollo osseo. La paratiroidectomia inoltre, incrementa i livelli di eritropoietina in pazienti con iperparatiroidismo secondario. L'infiammazione è ormai ritenuta una caratteristica del danno renale cronico e potenzialmente può contribuire alla disfunzione uremica delle EPC. In pazienti con artrite reumatoide, lo stato infiammatorio - determinato dai livelli di IL-6 - è inversamente correlato con il numero delle EPC (39). Infatti, esperimenti *in vitro* (40) supportano l'ipotesi che citochine pro-infiammatorie alterino la funzione e differenziazione delle EPC. Inoltre, la proliferazione delle EPC, la migrazione e l'espressione di NOS endoteliale è inibita nelle cellule endoteliali infiammatorie isolate da pazienti con vasculiti e coinvolgimento renale (41).

Altre tossine uremiche possono avere un ruolo; ad esempio, l'omocisteina inibisce la differenziazione e la funzione delle EPC (42) e il p-cresolo ha un impatto negativo sulla migrazione delle EPC e la riparazione della ferita (43).

Il contributo delle EPC ai meccanismi rigenerativi del rene non è stato ancora ben delineato. Le EPC sembrano supportare i meccanismi riparativi delle strutture endoteliali, mesangiali e tubulari. Se trapiantate, le EPC si integrano localmente, e migliorano la funzionalità renale in un modello di ischemia renale acuta nel

ratto (44). Il *turnover* delle cellule endoteliali glomerulari è notevolmente aumentato in conseguenza di un danno e alcuni studi condotti su modelli animali hanno messo in evidenza che le EPC contribuiscono a questo processo (45, 46). La partecipazione di cellule del donatore nel *turnover* delle cellule endoteliali glomerulari, è stato anche dimostrato in ratti con trapianto di midollo soggetti a nefrectomia unilaterale e iniezione di anti-Thy-1.1. La maggior parte degli animali in quest'ultimo studio muoiono 8-11 settimane dopo la nefrectomia per IRC. Sebbene cellule endoteliali derivate dal donatore siano individuate nei glomeruli di questi animali, il numero totale di EPC circolanti appare diminuito nell'IRC (46). In ratti con trapianto di midollo, 7 giorni dopo un'iniezione di anti-Thy-1.1 si osserva un incremento di più di 4 volte nel numero di cellule endoteliali glomerulari derivate dal midollo (47). In un modello di glomerulonefrite nel ratto, l'iniezione di cellule mononucleate di midollo nell'arteria renale migliora il danno endoteliale e l'attivazione cellulare mesangiale (48). Progenitori di derivazione midollare sono inoltre coinvolti nel *turnover* e nella riparazione del mesangio (49).

Nel loro insieme queste scoperte sostengono l'ipotesi che le EPC giochino un ruolo significativo nella rigenerazione renale in particolare nel *turnover* dell'endotelio glomerulare e rappresentino un potenziale strumento terapeutico (Fig. 3).

TEST DI VERIFICA

4) Le EPC sono:

- Una popolazione omogenea di cellule circolanti
- Una popolazione eterogenea di cellule circolanti
- Cellule endoteliali distaccatesi dai vasi sanguigni
- Una popolazione di cellule circolanti caratterizzate solo dall'espressione del marcatore CD34
- Una popolazione di cellule circolanti coinvolte nella rigenerazione vascolare senza effetti paracrini.

5) Il numero delle EPC presenti in circolo:

- È più alto nei pazienti ad alto rischio di malattia coronarica
- È ridotto da trattamenti farmacologici con statine
- È maggiore nei soggetti diabetici
- Correla con i fattori di rischio per aterosclerosi
- Non è modificato dall'età.

6) Nell'insufficienza renale:

- a. La terapia dialitica riduce il numero delle EPC circolanti
- b. Le tossine uremiche incrementano il numero delle EPC
- c. Il trattamento con EPO ha effetti negativi sul numero e la funzione delle EPC
- d. Non vi è coinvolgimento delle EPC
- e. Vi è una alterazione del numero e della funzione delle EPC.

EPC E TRAPIANTO RENALE

A seguito del trapianto, l'organo subisce un esteso danno endoteliale, come dimostrato da un aumento del numero di cellule endoteliali CD146+ presenti in circolo in pazienti dopo trapianto renale (50). Il CD146 è un marcatore di cellula endoteliale matura e probabilmente è rappresentativo delle cellule endoteliali distaccatesi in conseguenza del danno. I pazienti con rigetto vascolare acuto hanno il numero più elevato di cellule endoteliali CD146 circolanti e tutti i soggetti trapiantati hanno comunque numeri significativamente più alti dei soggetti sani di controllo. È comunque probabile che le cellule staminali del ricevente, comprese le EPC, migrino nel trapianto per facilitare l'angiogenesi e la rigenerazione delle cellule endoteliali (51).

Diversi studi hanno dimostrato che le EPC del ricevente migrano nei trapianti umani e hanno la capacità di differenziare in cellule endoteliali (52, 53). Dopo trapianto cardiaco umano, questo processo avviene rapidamente ed è molto esteso e, dopo una mediana di 53 giorni, più del 20% delle cellule endoteliali del donatore sono rimpiazzate da cellule endoteliali del ricevente. Questo processo inizia già 4 giorni dopo il trapianto (54) e rende l'endotelio all'interno del trapianto chimerico, formato cioè da cellule endoteliali che sono di derivazione sia del donatore che del ricevente. Nel trapianto renale umano, similmente a quanto dimostrato nel trapianto cardiaco, le cellule endoteliali del rene del donatore vengono rimpiazzate da cellule endoteliali del ricevente, e questo meccanismo riparativo è ancora più prominente dopo rigetto vascolare acuto (55), mentre nel corso del rigetto cronico è evidente che le cellule del ricevente infiltrano il trapianto renale (56). Nell'insieme tutti questi studi indicano che EPC circolanti del ricevente possono essere reclutate nel trapianto renale e che questo processo di riparazione è più evidente se vi è distruzione dell'endotelio capillare che avviene in associazione con rigetto acuto e nel corso del processo di rigetto cronico (52, 53, 55, 56).

Non è ancora stato chiarito se il chimerismo endote-

liale che si instaura nell'organo trapiantato sia un fattore che contribuisce al successivo danno del trapianto stesso. Studi sempre più numerosi indicano che la mobilitazione delle EPC può essere benefica per la funzione del trapianto, mantenendo la tolleranza al trapianto e limitando il danno tissutale ipossico susseguente. Ma è anche possibile che questa compensazione riparativa e il conseguente chimerismo delle cellule endoteliali, alterando le proprietà immunologiche del trapianto, possa essere un fattore coinvolto nello sviluppo del rigetto cronico. Sarà perciò importante comprendere come un eccessivo *turnover* endoteliale e forse la neoangiogenesi, sebbene potenzialmente protettivi dopo danno acuto, possano essere di significato fisiopatologico per lo sviluppo del rigetto cronico.

Il rigetto cronico è associato con l'espressione di molecole di adesione, chemochine e fattori di crescita (57) che hanno la capacità di mediare il reclutamento delle EPC. Perciò, si potrebbe affermare che nel contesto del rigetto cronico possa instaurarsi un'eccessiva angiogenesi. Infatti, come precedentemente discusso, nel trapianto si ha neovascolarizzazione, e le cellule endoteliali del ricevente rappresentano più del 20% del numero totale di cellule endoteliali presenti in un organo rigettato (52).

L'angiogenesi è stata dimostrata nelle lesioni intimali proliferanti caratteristiche della vasculopatia cronica da trapianto (CAV). Un'analisi dell'espressione di marcatori di cellule endoteliali nelle lesioni della CAV in rigetti di trapianto cardiaco umano ha dimostrato che molti vasi (circa il 90%) presentano evidenze di neovasi soprattutto nella porzione centrale della neointima (58). Inoltre, questi nuovi vasi sono attivati esprimendo molecole di adesione e MHC di classe II, suggerendo così che la risposta angiogenica di per sé può promuovere il reclutamento leucocitario e l'attivazione (58).

Usando un modello di rigetto cronico del trapianto cardiaco in ratti Fisher è stato anche dimostrato che l'angiogenesi è presente nelle lesioni della vasculopatia cronica da trapianto in associazione con un infiltrato mononucleato (59). Trattando i riceventi con TNP-470, un derivato sintetico della fumagallina che è ben noto inibire la proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo*, si interrompe la progressione della CAV se somministrato dopo il suo esordio. Al contrario, non ne previene lo sviluppo se somministrata nel periodo immediatamente post-trapianto (60), suggerendo che l'angiogenesi è funzionale nella progressione della CAV ma non è associata con il suo esordio.

Tutti questi dati suggeriscono che i mediatori che governano il reclutamento delle cellule mononucleate nell'intima dei grandi vasi facilitano anche il reclutamento delle EPC e quindi l'angiogenesi nelle lesioni. Inoltre, le EPC migrano nei *siti* di danno vascolare in risposta a citochine derivate dalle cellule T e dai mono-

citi, chemochine e fattori di crescita che sono noti essere presenti nelle lesioni intimali. Perciò, è possibile che il danno endoteliale cronico induca una risposta che è associata con il reclutamento delle cellule T, dei monociti e delle EPC. Il reclutamento delle EPC è fisiologico per riparare i vasi danneggiati e per promuovere l'angiogenesi. Poiché la reazione neovascolare è per se stessa pro-infiammatoria, una volta presente nelle lesioni della CAV, il processo si auto mantiene. Questo spiega perché l'inibizione dell'angiogenesi nella CAV è terapeutico per limitare la progressione della malattia.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Molti dati hanno dimostrato che le EPC circolanti mantengono l'integrità vascolare e rigenerano i tessuti danneggiati. Le EPC sono reclutate nel rene nella fase di guarigione dell'infiammazione renale, e un difetto in questo processo può portare ad una persistente morte cellulare e allo sviluppo delle malattie croniche. Studi preliminari indicano che l'aumento della rigenerazione EPC-dipendente mediante somministrazione di VEGF o mediante trasferimento diretto di EPC nel rene possono accelerare la guarigione e limitare la progressione della patologia. Al contrario, nei trapianti, la progressiva infiammazione facilita il persistente reclutamento delle EPC che può portare ad una accentuata risposta angiogenica, soprattutto all'interno delle lesioni intimali proliferanti dei grandi vasi con vasculopatia cronica da trapianto.

In studi futuri sarà importante comprendere come un eccessivo turnover e l'angiogenesi siano protettivi dopo un danno acuto, ma siano patologici in stati di patologia cronica.

TEST DI VERIFICA

7) Nei meccanismi rigenerativi renali il contributo delle EPC è stato dimostrato soprattutto:

- Nel turnover delle cellule endoteliali glomerulari
- Nella rigenerazione delle strutture tubulari
- Nella rigenerazione mesangiale
- Nella rigenerazione dei capillari peritubulari
- Non è stato dimostrato.

8) Nel trapianto renale umano le cellule endoteliali dell'organo vengono rimpiazzate da cellule endoteliali del ricevente. Questo processo:

- Sostituisce completamente l'endotelio dell'organo con cellule del ricevente
- Non contribuisce in alcun modo allo sviluppo del rigetto

- Non è mediato dalle EPC
- È più evidente se vi è un rigetto acuto o nel corso di rigetto cronico
- Non coinvolge più dell'1% del numero totale delle cellule endoteliali.

9) Nella CAV l'angiogenesi:

- È associata con il suo esordio
- Non è associata con l'infiltrato mononucleato
- È funzionale alla sua progressione
- Non è presente
- È terapeutica per limitare la progressione della malattia.

RIASSUNTO

Dati recenti suggeriscono che il danno vascolare renale può giocare un ruolo importante nella patogenesi sia del danno renale ischemico acuto che cronico. Durante la riperfusione sono state documentate precoci alterazioni nel flusso sanguigno pericapillare che si associano con la perdita della normale funzione delle cellule endoteliali. Inoltre, l'ischemia induce alterazioni delle cellule endoteliali che possono promuoverne l'attività infiammatoria e procoagulante, contribuendo così alla congestione vascolare. La riduzione della densità capillare a sua volta incrementa la fibrosi mediata dall'ipossia e altera l'emodinamica dell'organo contribuendo così allo sviluppo dell'ipertensione. Questa può avere un ruolo critico nella progressione del danno renale cronico che segue l'iniziale recupero da un danno renale acuto indotto dall'ischemia/riperfusione. Il ricambio e il rimpiazzo delle cellule endoteliali è perciò un importante meccanismo per il mantenimento dell'integrità vascolare anche nel rene. È ormai sempre più chiaro che meccanismi alterati di rigenerazione vascolare legati ad un ridotto numero e/o ad una ridotta funzione dei progenitori endoteliali (EPC) possono contribuire alla patogenesi delle patologie renali. Inoltre, studi recenti hanno consentito di comprendere i potenziali meccanismi responsabili della disfunzione delle EPC in corso di uremia. Infine nei trapianti, il persistere del danno induce una risposta che è associata al reclutamento sia dei leucociti, sia delle EPC, facilitando così un processo concomitante di infiammazione e angiogenesi. In conclusione, l'angiogenesi e il ricambio delle cellule endoteliali sono importanti nelle malattie renali e nel rigetto del trapianto e la manipolazione di questi processi potrà avere importanti implicazioni per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2002; 62: 1539-49.
2. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2199-210.
3. De Greef KE, Ysebaert DK, Persy V, Vercauteren SR, De Broe ME. ICAM-1 expression and leukocyte accumulation in inner stripe of outer medulla in early phase of ischemic compared to HgCl₂-induced ARF. *Kidney Int* 2003; 63: 1697-707.
4. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 812-6.
5. Basile DP. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor predisposing to progressive nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13: 1-7.
6. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F887-99.
7. Basile DP. The transforming growth factor beta system in kidney disease and repair: recent progress and future directions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 21-30.
8. Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 989-96.
9. Choi ME, Ballermann BJ. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 1995; 270: 21144-50.
10. Kang DH, Joly AH, Oh SW, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1434-47.
11. Kang DH, Anderson S, Kim YG, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 601-11.
12. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1448-57.
13. Iruela-Arispe L, Gordon K, Hugo C, et al. Participation of glomerular endothelial cells in the capillary repair of glomerulonephritis. *Am J Pathol* 1995; 147: 1715-27.
14. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001; 159: 599-608.
15. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, et al. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 1999; 104: 913-23.
16. Marsden PA, Goligorsky MS, Brenner BM. Endothelial cell biology in relation to current concepts of vessel wall structure and function. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 931-48.
17. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
18. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-12.
19. Romagnani P, Annunziato F, Liotta F, et al. CD14+ CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Circ Res* 2005; 97: 314-22.
20. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600.
21. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7.
22. Urbich C, Dimmeler S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int* 2005; 67: 1672-6.
23. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 733-42.
24. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858-64.
25. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-9.
26. Koç M, Bihorac A, Segal MS. Circulating endothelial cells as potential markers of the state of the endothelium in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 704-12.
27. Koc M, Richards HB, Bihorac A, Ross EA, Schold JD, Segal MS. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2005; 67: 1078-83.
28. Eizawa T, Murakami Y, Matsui K, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin* 2003; 19: 627-33.
29. Choi JH, Kim KL, Huh W, et al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1246-52.
30. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 921-6.
31. Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, et al. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int* 2003; 64: 1648-52.
32. Herbrig K, Pistrosch F, Oelschlaegel U, et al. Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 840-9.
33. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, et al. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 2004; 66: 641-6.
34. de Groot K, Bahlmann FH, Bahlmann E, Menne J, Haller H, Fliser D. Kidney graft function determines endothelial progenitor cell number in renal transplant recipients. *Transplantation* 2005; 79: 941-5.
35. Chan CT, Li SH, Verma S. Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of impaired endothelial progenitor cell biology in end-stage renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F679-84.
36. Steiner S, Schaller G, Putteringer H, et al. History of cardiovascular disease is associated with endothelial progenitor cells in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 520-8.
37. Kotzmann H, Abela C, Heindl J, et al. Effect of successful parathyroidectomy on hematopoietic progenitor cells and parameters of red blood cells in patients with primary hyperparathyroidism. *Horm Metab Res* 1997; 29: 387-92.
38. Ureña P, Eckardt KU, Sarfati E, et al. Serum erythropoietin and erythropoiesis in primary and secondary hyperpa-

- rathyroidism: effect of parathyroidectomy. *Nephron* 1991; 59: 384-93.
39. Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 157-63.
 40. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109: 2058-67.
 41. Holmén C, Elsheikh E, Stenvinkel P, et al. Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3110-20.
 42. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 233-9.
 43. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1302-8.
 44. Arriero M, Brodsky SV, Gealekman O, Lucas PA, Goligorsky MS. Adult skeletal muscle stem cells differentiate into endothelial lineage and ameliorate renal dysfunction after acute ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F621-7.
 45. Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2003; 163: 553-62.
 46. Ikarashi K, Li B, Suwa M, et al. Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 2005; 67: 1925-33.
 47. Rookmaaker MB, Verhaar MC, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Progenitor cells in the kidney: biology and therapeutic perspectives. *Kidney Int* 2004; 66: 518-22.
 48. Uchimura H, Marumo T, Takase O, et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 997-1004.
 49. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1401-9.
 50. Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, et al. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76: 1-4.
 51. Rosenzweig A. Circulating endothelial progenitors—cells as biomarkers. *N Engl J Med* 2005; 353: 1055-7.
 52. Pober JS. Is host endothelium a silver lining for allografts? *Lancet* 2001; 357: 2-3.
 53. Bolli R. Regeneration of the human heart—no chimera? *N Engl J Med* 2002; 346: 55-6.
 54. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
 55. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 2001; 357: 33-7.
 56. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2001; 345: 93-7.
 57. Denton MD, Davis SF, Baum MA, et al. The role of the graft endothelium in transplant rejection: evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatr Transplant* 2000; 4: 252-60.
 58. Atkinson C, Southwood M, Pitman R, Phillipotts C, Wallwork J, Goddard M. Angiogenesis occurs within the intimal proliferation that characterizes transplant coronary artery vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 551-8.
 59. Karnovsky MJ, Russell ME, Hancock W, Sayegh MH, Adams DH. Chronic rejection in experimental cardiac transplantation in a rat model. *Clin Transplant* 1994; 8: 308-12.
 60. Denton MD, Magee C, Melter M, Dharnidharka VR, Sayegh MH, Briscoe DM. TNP-470, an angiogenesis inhibitor, attenuates the development of allograft vasculopathy. *Transplantation* 2004; 78: 1218-21.