



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA DI BOLOGNA

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITA' DI BOLOGNA

DOTTORATO IN FISIOPATOLOGIA DELL'INSUFFICIENZA CARDIACA

Coordinatore Prof. Angelo Branzi

**CORRELAZIONE TRA I LIVELLI CIRCOLANTI DI CELLULE
STAMINALI CD34⁺ E SVILUPPO DI RISTESOSI BINARIA IN
PAZIENTI SOTTOPOSTI AD ANGIOPLASTICA CORONARICA CON
IMPIANTO DI STENT METALLICO TRADIZIONALE.**

STUDIO PROSPETTICO OSSERVAZIONALE

TESI DI DOTTORATO

Tesi di Dottorato di:
Dr. Marco Valgimigli

IL RELATORE:
Prof. Roberto Ferrari

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

INTRODUZIONE	pag 1-20
- definizione di cellula staminale	pag 1-2
- cellule staminali adulte: classificazione	pag 2
- l'interesse cardiologico	pag 3
- cellule endoteliali progenitrici (EPCs)	pag 4
• definizione e ruolo	pag 4-5
• caratterizzazione funzionale e fenotipica	pag 5-7
• fasi di attivazione delle EPCs	pag 7-10
• condizioni patologiche e livelli circolanti delle EPCs	pag 11-13
- restenosi intrastent	pag 13
• definizione e meccanismo fisiopatologico	pag 13-15
• fattori predisponenti	pag 15-16
• prevenzione	pag 16-18
- EPC e restenosi intrastent	pag 18-20
SCOPO	pag 21
METODI	pag 22-26
RISULTATI	pag 27-29
DISCUSSIONE	pag 30-35
CONCLUSIONI	pag 36
BIBLIOGRAFIA	pag 37-46
ICONOGRAFIA	pag 47-54

INTRODUZIONE

DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE

Le staminali sono cellule che godono di alcune caratteristiche peculiari: sono indifferenziate, hanno la capacità di autorigenerarsi (self renewing) oltre che di differenziarsi in numerosi tipi cellulari (1), mediante caratteristiche geniche che permettono loro di regolare il ciclo cellulare, mantenere l'integrità genomica ed eliminare fenomeni quali la senescenza e l'apoptosi, tipici di tutte le altre cellule dell'organismo.

Possono essere classificate in base all'espressione di markers di superficie (appartenenti al cluster dei CD), altrimenti detti antigeni di superficie panleucocitari, che fungono da indice di stipe o linea maturativa e ne identificano stato di maturazione ed attività funzionale.

Sono inoltre distinte in base al tipo di cellule differenziate cui possono dare origine: le cellule totipotenti creano un nuovo individuo completo, quelle pluripotenti formano i tre foglietti germinativi, ma non le strutture di sostegno, mentre le cellule multipotenti differenziandosi danno origine a numerosi tipi cellulari dell'organo dal quale sono state isolate, infine le progenitrici sono staminali committed o precursor, cioè differenziate in un solo tipo cellulare.

Un'altra classificazione possibile è in base alla differente origine: le cellule staminali embrionali sono cellule totipotenti che provengono da feti abortiti o dalla fertilizzazione in vitro, e come tali di difficile utilizzo dal punto di vista clinico-sperimentale oltre che per problemi di eticità, nonostante le maggiori potenzialità; le cellule somatiche o dell'adulto, più facilmente reperibili, sono, secondo i capisaldi della scuola ematologica, "commissionate" a produrre cellule solo ed esclusivamente del tessuto di origine. In realtà recenti studi sperimentali ne hanno evidenziato una plasticità tale da rendere più vicina quella che fino a ieri era solo una remota ipotesi: la transdifferenziazione, la possibilità in altre parole di

superare la barriera di linea e di formare tessuti differenti da quello d'origine (2). Naturalmente tale argomento è fonte di grandi controversie, esistono in merito differenti linee di pensiero, alcune delle quali ne mettono in dubbio la veridicità (3,4).

CELLULE STAMINALI ADULTE: CLASSIFICAZIONE

Come già precedentemente accennato, le prospettive cliniche sull'utilizzo di tessuto fetale presentano problematiche sia di carattere etico sia di disponibilità ed immunogenicità tali da far sì che, al momento, sia più attuabile l'impiego di cellule staminali adulte come fonte di studio clinico-sperimentale.

Attualmente in ambito cardiologico le cellule maggiormente studiate si possono classificare in:

- mioblasti scheletrici (o cellule satellite): risiedono nella membrana basale del tessuto muscolare;
- cellule staminali cardiache residenti (CSCs e cardiomioblasti);
- Cellule di derivazione midollare (bone marrow cells): cellule staminali ematopoietiche (hematopoietic stem cells: HSCs), cellule mesenchimali (mesenchymal stem cells: MSCs), cellule progenitrici multipotenti (multipotent progenitor adult cells: MPACs) cellule *endoteliali progenitrici* (*endothelial progenitor cells: EPCs*).

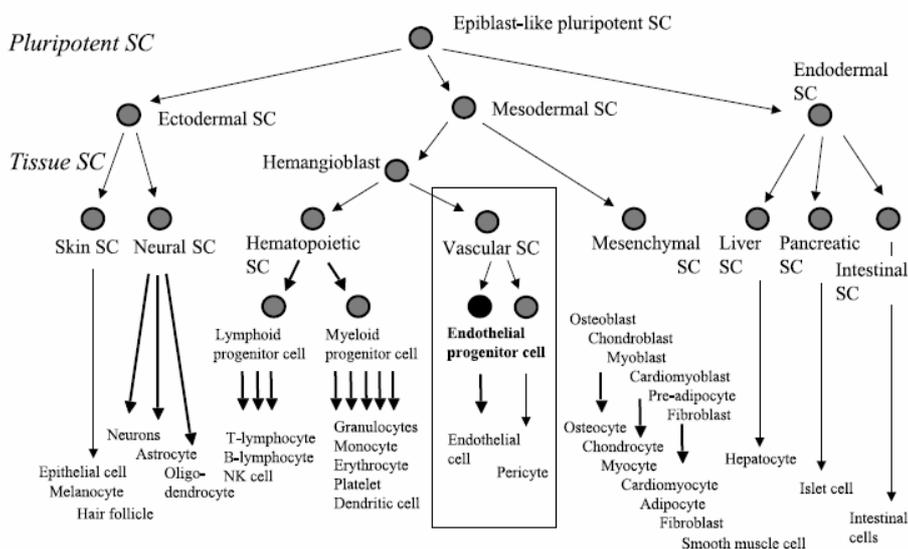


Fig.1: origine e differenziazione delle differenti linee staminali post-natali. SC: stem cell
(Asahara T and Kawamoto A, *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:c572-c579)

L'INTERESSE CARDIOLOGICO

Lo spiccato interesse verso questo ambito di ricerca, è nato quando il paradigma secondo il quale il cuore non sarebbe in grado di riparare eventuali perdite miocitarie è stato messo in discussione da una serie di evidenze sperimentali: nei pazienti sottoposti a trapianto cardiaco è stata ripetutamente confermata la presenza, nell'organo donato, di miociti con caratteri genomici tipici del ricevente (5); l'isolamento dal midollo osseo (MO) e la successiva coltura *in vitro* della linea cellulare staminale di tipo mesenchimale, ne ha confermato la potenzialità di cellula multipotente, in grado di differenziarsi in numerosi tessuti di origine mesodermica, tra cui il tessuto muscolare (6); è stato inoltre confermato che l'aspirato midollare umano conduce allo sviluppo di veri e propri cardiomiociti funzionanti qualora iniettato *in vivo* nel cuore di cavia (7); è stata descritta la capacità di cellule staminali midollari (popolazione satellite CD34⁻/low; c-Kit⁺ e Sca⁺), qualora iniettate in topi irradiati letalmente e resi ischemici per mezzo della legatura coronarica, di popolare la zona miocardica necrotica e di differenziarsi in cardiomiociti funzionanti e cellule endoteliali mature (8).

Parallelamente a queste linee di ricerca, è stata descritta l'esistenza di cellule endoteliali circolanti CD34⁺, di origine midollare, le quali parteciperebbero al processo di neoangiogenesi e vasculogenesi cardiaca. La presenza di tali precursori endoteliali circolanti è, infatti, aumentata in corso di ischemia miocardica, ad indicare come queste cellule possano costituire un tentativo di risposta compensatoria teso alla neoformazione di capillari cardiaci (9).

E' questo l'ambito in cui la nostra Scuola ha indirizzato il proprio interesse.

CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI (EPCs)

Definizione e ruolo

Le cellule endoteliali progenitrici sono cellule simili ad angioblasti embrionali, derivano dalla linea mesodermica e hanno un precursore in comune con le HSCs, l'emangioblasto(10), anche se, più recentemente Rehman et al.(11) hanno dimostrato che le EPCs presenti in colture di sangue umano, possono originare anche dalla linea monocitomacrofagica. Tali cellule, presenti all'interno del midollo osseo, nel 1997 sono state trovate anche nel circolo ematico periferico da Asahara et al.(12) successivi lavori hanno messo in luce come tali cellule siano in grado di migrare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature e quindi di determinare la formazione di nuovi vasi sanguigni (vasculogenesi) anche nel periodo post-natale (13), fenomeno fino ad allora noto solo nelle patologie neoplastiche, fungendo da elemento chiave nel meccanismo di rigenerazione tissutale post-ischemico/necrotico. Inoltre mantengono l'integrità funzionale e l'omeostasi vascolare mediante un processo di riendotelizzazione post-traumatico (14), meccanismo che ha stimolato l'interesse di diversi autori per le sue eventuali correlazioni con la restenosi post- trattamento endoluminale vascolare, che sarà trattata in maniera più approfondita successivamente. Le prime evidenze al riguardo mostravano come grafts Dacron in aorta toracica di cani venissero riendotelizzato esclusivamente da cellule midollari trapiantate (15), e come, nell'uomo ricoprivano la superficie di *devices* di assistenza ventricolare formando così superficie antirombogenica (16). Se si considera che la funzione fondamentale dell'endotelio è di prevenire eventi trombotici, ridurre l'aggregazione di leucociti e piastrine, garantire l'integrità funzionale dei vasi (17), e quindi che una sua disfunzione predisponga a vasocostrizione, trombosi ed aterosclerosi (18), si può ben capire il ruolo fondamentale che le EPCs potrebbero assumere in un prossimo futuro; ruolo ancor più rilevante se si pensa che le cellule endoteliali mature hanno un basso

potenziale proliferativo, per cui la loro capacità di sostituire l'endotelio danneggiato è molto scarsa.

In condizioni basali il numero di EPCs circolanti è estremamente esiguo e variabile; esse, infatti, risiedono prevalentemente nel midollo osseo in stretta associazione con le HSCs, lo stroma midollare e i fibroblasti, costituendo il microambiente per l'ematopoiesi. Si calcola che le CD34+ siano il 3% delle cellule del midollo osseo (capaci di ricostituire l'intera linea ematopoietica dopo terapia mieloablativa), mentre nel circolo periferico lo 0,01-0,05% di tutte le cellule mononucleate sono CD34+; è oramai confermato in letteratura che le EPCs sono il 2% di tutte le CD34+, sia nel midollo sia in periferia (9).

I dati a disposizione indicano che le EPC sono inversamente correlate all'età, probabilmente per la fisiologica riduzione dell'attività del midollo osseo, mentre gli estrogeni (19), l'esercizio fisico intenso (20) e l'ipossia inducono un incremento dei livelli ematici di EPC, così da dare una possibile spiegazione agli effetti benefici dell'attività sportiva.

Caratterizzazione funzionale e fenotipica

Sono stati identificati diversi fenotipi cellulari che possono differenziarsi in cellule endoteliali mature, creando non poca confusione nella nomenclatura e definizione del gruppo di interesse. Confusione accresciuta dal fatto che, messe in coltura, le loro condizioni di crescita possono determinare un rapido cambiamento del fenotipo cellulare, ad es. la coltura con statine può aumentare il numero di cellule endoteliali isolate dalle colonie (21), la crescita continua può determinare uno sviluppo precoce di markers delle cellule endoteliali mature. Questo spiega, almeno in parte, come gruppi di ricerca differenti non abbiano osservato gli stessi markers fenotipici per cellule coltivate mediante procedure simili (22).

Non conoscendo il *time-point* della maturazione cellulare, è difficile identificare le EPCs sulla scorta di stretti parametri predefiniti, anche perché esse esprimono con differente intensità

un'ampia varietà di markers tipici della linea endoteliale, a seconda della fase maturativa nella quale si trovano: precoce (EPC circolanti precoci) o tardiva (EPC circolanti).

Comunque la letteratura internazionale si è trovata concorde nel definire EPC quelle cellule che presentano specifiche caratteristiche fenotipiche e funzionali.

I markers di superficie che individuano il fenotipo cellulare delle EPCs sono il CD34, condiviso da molte cellule midollari staminali, il recettore del fattore di crescita vascolare (VEGRF-2/flk-1/KDR), tipico marker delle cellule endoteliali mature e il CD133 (AC133, c-kit) indice di immaturità cellulare (13) poiché compare sulla membrana cellulare molto precocemente per poi scomparire nel corso della maturazione (23). Inoltre durante il processo maturativo vi è l'acquisizione di markers fenotipici caratteristici della linea endoteliale matura, quali: CD31+, PECAM1, Von Willenbrand factor, la sintetasi dell'ossido nitrico (eNOS), caderina, E-selectina, vi è inoltre l'incorporazione di lipoproteine acetilate a basso peso molecolare (ac-LDL).

Gli aspetti funzionali di tali cellule sono dovute al fatto che presentano caratteristiche sia ematopoietiche, e quindi se coltivate con particolari fattori di crescita sono in grado di formare colonie (eCFU) (24), sia tipiche delle cellule endoteliali, e cioè la capacità di formare nuovi capillari, produrre NO e dare origine a colonie tardive di crescita con caratteristico aspetto affusolato (spindle shaped) e ad "acciottolato" (cobblestone) simile all'endotelio (25).

La "rigidità" di questa caratterizzazione rende però difficile l'individuazione di quelle tipologie cellulari che derivano da processi di transdifferenziazione, in quanto aventi caratteristiche (fenotipiche soprattutto) lievemente differenti da quelle sopraccitate. Vi sono, infatti, evidenze crescenti (11) che sottolineano come la linea mieloide/monocitica (CD14+/CD34-) possa differenziarsi (o transdifferenziarsi) nella linea endoteliale. Dimmler et al. dopo aver verificato che l'espansione in vitro di cellule CD14+, in determinate condizioni, favorisce la differenziazione in cellule endoteliali che possono, in vivo, migliorare la

vascolarizzazione (26), hanno reso noto come la popolazione CD14+CD34^{low} sia capace di svilupparsi in cellule endoteliali mature (27).

La capacità di differenziazione in cellule endoteliali mature (ECs) pare appartenga anche alla linea di derivazione mesenchimale (MSCs) (28) e in particolare alle cellule progenitrici adulte multipotenti (MAPCs), a significare che, mediante transdifferenziazione, tutte le cellule staminali derivanti dalla linea mesodermica e dal precursore comune, possono differenziarsi in ECs. Ancora più credito assume questa teoria se si considerano dati ancora più recenti secondo i quali anche le cellule staminali residenti potrebbero dare origine a ECs (29,30).

Attualmente si stanno sviluppando metodiche ancora più specifiche per una migliore caratterizzazione fenotipica delle cellule staminali, come ad esempio tecniche di tipo genomico che sfruttano i markers trascrizionali per lo switch a ECs (31).

Fasi di attivazione delle EPCs

Il meccanismo mediante il quale le EPCs sono reclutate nell'organo interessato consta di quattro fasi, tutte mediate da citochine, chemichine e fattori di crescita. Tali fasi sono: il rilascio dal midollo osseo, altrimenti detto reclutamento, la mobilizzazione nel circolo sanguigno, la localizzazione nel sito interessato (homing) ed infine la differenziazione in cellule endoteliali mature e/o cardiomiociti (32). Gli step in realtà tendono a sovrapporsi come anche l'azione dei fattori inducenti, che, nonostante vengano schematicamente classificati per fase, agiscono di concerto in ogni passaggio del processo maturativo delle cellule staminali.

Reclutamento

Lo step iniziale dipende dall'attività della metallo-proteinasi 9 (MMP-9) che favorisce la trasformazione del recettore di superficie (recettore di membrana Kit-mKitL) in recettore solubile (KitL). Topi con deficit di MMP9^{-/-} o trattati con inibitori di tale citochina hanno una ridotta mobilizzazione delle EPCs (33).

Il G-CSF è ampiamente utilizzato in ambito ematologico, assieme al fattore di crescita granulocitario (GM-CSF), per l'espansione e la raccolta di cellule ematopoietiche e nel trapianto di midollo osseo (34); recenti studi sperimentali su animali ne hanno dimostrato l'utilità nel miglioramento della funzione ventricolare sinistra (35,36).

Un altro fattore di crescita essenziale è il VEGF (attivato anche da MMP-9): feti di ratti con deficit allelico di VEGF non hanno uno sviluppo corretto (37), mentre la somministrazione di VEGF produce un miglioramento della capacità funzionale ed un incremento del numero di EPCs (38). Esistono isoforme circolanti multiple, la più frequente è VEGF165, il cui effetto biologico è permesso dal suo legame con recettori tirosinchinasici di superficie (VEGFR1-2 detto anche Flk-1 o KDR) e dall'attivazione di MMP-9.

Molti altri fattori sono implicati in questo processo, tutti attualmente utilizzati come agenti mobilizzatori di cellule staminali e che ne migliorano la funzionalità; degni di nota sono lo stromal derived factor-1 (SDF-1), elemento chiave anche nella mobilizzazione e ritenuto l'elemento che protegge le EPCs dall'apoptosi (39); il fattore di crescita fibroblastico (FGF), il fattore di crescita placentare, che ha vari ruoli nella cascata di attivazione delle cellule staminali (40), tra i quali l'*up-regulation* dell'attività delle MMP-9, e ancora l'eritropoietina (41) e la sintetasi costitutiva endoteliale dell'ossido nitrico (eNOS), la cui assenza produce un deficit funzionale e numerico di cellule staminali nei topi (42).

Il rilascio in circolo di questi fattori, soprattutto il VEGF, è indotto da svariati stimoli, ma sicuramente il più potente è l'ischemia tissutale, la cui relazione con le EPC sarà descritta più dettagliatamente di seguito

Ciò che rimane poco chiaro è invece il reale meccanismo utilizzato da questi mediatori. Recentemente sono comparsi in letteratura trial clinici sull'uomo atti ad evidenziare efficacia e sicurezza di tali fattori, i cui risultati contraddittori evidenziano la necessità di ulteriori approfondimenti (43,44, 45).

Mobilizzazione

Anche questo meccanismo è caratterizzato dalla perfetta integrazione dell'attività di più agenti; in primo luogo le integrine, in particolare le $B2$ (CD18-11) e le $\alpha4B1$, che permettono l'interazione cellula-cellula, essenziale nei processi di neovascolarizzazione; il deficit delle prime riduce la capacità migratoria delle cellule staminali su piastra, mentre la deplezione delle seconde riduce l'homing cellulare solo cardiaco, a evidenziare come le molecole d'adesione siano tessuto specifiche (46). La riendotelizzazione invece, avviene per mezzo delle vitronectine e rispettivi recettori ($\alpha VB3$ e $\alpha VB5$) che mediano l'adesione delle EPCs al vaso danneggiato; studi in vivo hanno dimostrato che l'inibizione delle vitronectine blocca il processo di reendotelizzazione.

Oltre ai fattori già descritti per il reclutamento (soprattutto l'onnipresente VEGF), inducono la mobilizzazione delle EPCs anche gli inibitori dell'HMG-CoA che, sia *in vitro* sia *in vivo*, aumentano la capacità funzionale delle EPCs (47), agendo sul mRNA dell'eNOS attraverso una via di traduzione comune a vari fattori di crescita, tra cui il VEGF, FGF ed estrogeni (48). Alcuni studi hanno evidenziato una riduzione delle EPCs indotta dalla proteina C reattiva; si suppone che ciò dipenda dall'inibizione di e-NOS, studi sperimentali, infatti, hanno mostrato che topi eNOS^{-/-} avevano anche un ridotto numero di EPCs (42), ad evidenza del ruolo essenziale di eNOS nella fase di mobilizzazione. L'attivazione del trasduttore transmembrana della sintasi di NO è implicato anche nei meccanismi che fanno dell'eritropoietina e degli estrogeni dei potenti stimoli di mobilizzazione delle EPCs e di formazione di nuove colonie.

Homing

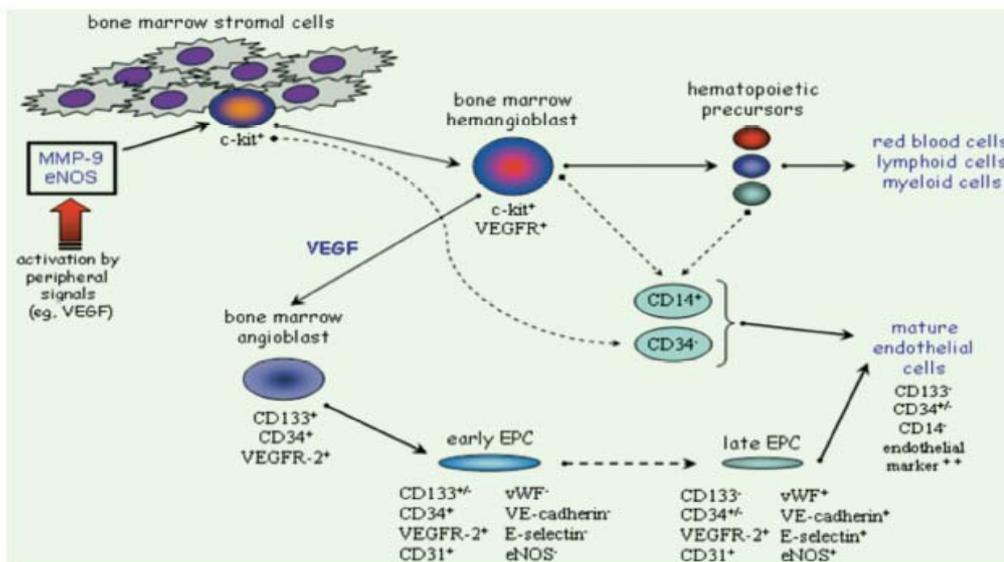
Considerando il numero esiguo di EPCs, il fenomeno di chemiotassi è fondamentale per richiamare un numero adeguato di cellule nel tessuto interessato. Lo stromal derived factor 1 (SDF-1), il più importante fattore chemotattico conosciuto, interagisce con le EPCs mediante

il legame col recettore di superficie CXCR-4 (49) e prende parte anche al processo di differenziazione.

Queste ultime due fasi del processo di maturazione sono essenziali non solo perché determinano il numero di EPCs circolanti, ma anche perché le rendono funzionalmente attive.

Differenziazione

La cascata genetica che regola la maturazione delle EPC a cellule endoteliali pronte per essere integrate nell'endotelio (50), è in gran parte sconosciuta. Non è ben chiaro quando un'EPCs diventi cellula endoteliale matura; si suppone con ragionevolezza che la perdita di CD133/CD14 e l'espressione di markers specifici come il fattore di Von Willebrand, che indicano maturità cellulare, avvengano durante la migrazione dalla periferia al monostrato endoteliale. Studi *in vitro* hanno individuato l'apoptosi come stimolo alla maturazione delle EPCs, ma sono dati ancora da interpretare (51). Non è nemmeno nota la vita media di una cellula staminale né il suo destino quando non incorporata nell'endotelio. Rimane rilevante comunque il ruolo di fattori di crescita già descritti in precedenza, come il VEGF e i suoi recettori, il cui incremento è parallelo alla migrazione delle EPCs nei siti di danno vascolare (52).



Hristov, Weber *J Cell Mol Med* 2004(8);4:498-508

Condizioni patologiche e livelli circolanti delle EPCs

E' oramai noto che il numero e l'attività funzionale delle EPCs sono ridotti in soggetti con fattori di rischio cardiovascolare (47) secondo Hill et al.(25) i loro livelli ematici e la loro capacità di formare colonie è inversamente correlata al Framingham risk factor score, così da essere considerate dei surrogati di marker biologici per la valutazione della funzione vascolare e del rischio cumulativo cardiovascolare; recentemente è stato descritto l'aumento dei livelli ematici di EPCs associato ad una riduzione del rischio di morte per cause cardiovascolari ed eventi cardiovascolari maggiori (53); in pazienti affetti da diabete mellito si è riscontrata, *in vitro*, una riduzione della capacità di migrare e formare capillari, oltre che una diminuzione del numero di EPCs (54,55) ancora più significativa in pazienti diabetici con ateropatia periferica (56), ad evidenziare come la riduzione delle EPCs può favorire la patogenesi di complicanze vascolari e quindi a mettere in risalto la correlazione cellule staminali-vasoprotezione.

Soggetti coronaropatici sottoposti a trapianto cardiaco, hanno un ridotto numero di EPCs (57) L'insufficienza renale cronica inibisce di più del 50% la capacità funzionale delle EPCs (58). Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che in pazienti affetti da scompenso cardiaco, l'incremento della classe funzionale NYHA si associa ad una riduzione del numero delle EPCs, indipendentemente non solo dall'eziologia dello scompenso, ma anche dall'età e terapia medica, in maniera inversamente proporzionale al TNF α , ipotizzando così un ruolo dell'assetto neuro-ormonale nella capacità funzionale e numerica di tali cellule (59).

Traumi vascolari severi come l'ischemia acuta degli arti inferiori, interventi di by-pass aortocoronarico o estesi danni vascolari post-traumatici (ustioni) inducono un rapido e consistente incremento del numero di cellule esprimenti VEGFR-AC133, VE e caderina, in stretta correlazione con VEGF (52). Precedenti studi effettuati mediante trapianti di cellule eterologhe, omologhe o autologhe di derivazione midollare marcate geneticamente, già evidenziavano come le EPCs, quando stimolate, si mobilitavano dal midollo andando a

localizzarsi nei tessuti e venivano incorporate in foci di neovascolarizzazione (60); essa però, non è mai risultata efficace probabilmente a causa dello scarso numero di EPCs (61). Questi risultati ottenuti su modelli animali sono stati poi confermati anche in ambito clinico. Ancora più rilevante, infatti, è lo studio di Shintani et al (9): in corso di infarto miocardico acuto ST sopralivellato vi è un'impennata dei livelli di CD34+ ematici, con picco attorno alla settima giornata dall'evento acuto, anche in questo caso correlato con VEGF.

Resi noti questi risultati, molti gruppi di ricerca hanno approfondito l'argomento e apportato il loro contributo (31) per cui, attualmente, la letteratura è ricca di esperienze, spesso contrastanti, che creano non poca confusione nella definizione di tempi di mobilizzazione, ruoli e funzioni delle EPCs; ad esempio sono stati pubblicati lavori che nonostante confermino l'importante mobilizzazione staminale in corso di necrosi miocardica, ne evidenziano il picco in tempi più brevi (6-48 ore dall'evento acuto) rispetto a quelli descritti dal pionieristico lavoro di Shintani (52,62).

Questa serie di evidenze scientifiche, ha comunque messo in luce un'importante correlazione tra cellule staminali e neoangiogenesi nell'individuo adulto: l'incremento di EPCs in corso di eventi vascolari traumatici potrebbe costituire un tentativo di risposta compensatoria teso alla formazione di nuovi capillari cardiaci (63). Se inizialmente la necrosi pareva il solo stimolo capace di indurre mobilizzazione delle EPCs, in realtà più recentemente sono stati portati avanti studi che hanno evidenziato che anche la sola ischemia può indurre tale fenomeno, ad evidenziare come questa possa rappresentare un potente trigger per la crescita e il rimodellamento vascolare post-natale, mediato nell'adulto dalle stesse cellule che inducono neoangiogenesi nell'epoca pre-natale (64,65) Il nostro gruppo ha eseguito uno studio preliminare che ha confermato l'elevazione delle cellule CD34+ circolanti in corso di infarto miocardico acuto, ed ha osservato che tale elevazione, con picco intorno alla 7°-10° giornata, si verifica altresì nei pazienti affetti angina instabile. Ciò a supporto del ruolo della risposta midollare all'ischemia, che come la necrosi induce la mobilizzazione e guida l'homing delle

EPCs dal midollo verso il sito di danno vascolare. Un'ulteriore conferma viene da un interessante lavoro del 2004 (66), che confronta i livelli circolanti di EPCs in pazienti con angina stabile ed instabile in assenza di necrosi miocardica; in quest'ultimo gruppo i valori di cellule staminali sono statisticamente aumentate rispetto a quelli del gruppo angina stabile ed hanno proprietà funzionali alterate, suggerendo come effettivamente non solo il numero, ma anche la qualità di queste cellule giochi un ruolo significativo nella patogenesi e nel complicato equilibrio della placca aterosclerotica. Tale risultato, tra l'altro, evidenzia una parziale discrepanza con i dati presenti in letteratura, secondo i quali l'aterosclerosi correla negativamente con il numero di EPCs circolanti, supportando il possibile ruolo della deplezione del pool cellulare nella formazione della lesione endoteliale. Nel follow-up a 3 mesi, il numero delle EPCs si era ridotto del 50%, in accordo con chi descrive un aumento delle EPCs tempo-dipendente, anche dopo un singolo episodio di ischemia indotta dall'esercizio (64).

RESTENOSI INTRASTENT

Definizione e meccanismo fisiopatologico

Come già precedentemente accennato, l'endotelio mantiene l'omeostasi vascolare: inibisce la funzione piastrinica e la trombosi, controlla la permeabilità della parete vasale, lega ed inattiva mitogeni e inibisce la crescita delle cellule muscolari lisce. La risposta riparativa che segue ad un danno endoteliale iatrogeno attiva una cascata di eventi che esita nel rimodellamento vasale (67) e nell'ispessimento neointimale (68,69), ovvero nella restenosi della parete vasale. Entrambi questi meccanismi giocano un ruolo negativo sull'omeostasi endoteliale, nonostante nascano come tentativo riparativo da parte dell'organismo stesso.

Il rimodellamento vasale è stato ampiamente descritto come conseguenza di procedure di angioplastica con solo pallone (67), mentre è virtualmente assente nelle procedure che utilizzano stent (70), strumento nato appunto per impedire la restenosi da rimodellamento. Al

contrario l'elemento preponderante della restenosi successiva al posizionamento di stent è l'iperplasia intimale (69).

La "cascata riparativa" che porta alla restenosi inizia subito dopo il gonfiaggio del pallone da angioplastica o il posizionamento dello stent, per la presenza di zone di endotelio denudate, rottura della placca, spesso con dissezione della tonaca media e occasionalmente anche dell'avventizia, stiramento dell'intera arteria. Uno strato di piastrine e fibrina si deposita nel sito di danno; le piastrine attivate danno il via alla cascata coagulativa e legano leucociti circolanti favorendone l'adesione alle cellule endoteliali, questi ultimi migrano all'interno del tessuto richiamate da chemochine rilasciate dalle cellule muscolari lisce (SMC: smooth muscular cell) e macrofagi residenti.

A questo punto le cellule implicate rilasciano fattori di crescita che stimolano la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media alla neointima, la quale si trova ora composta dalle suddette cellule, matrice extracellulare e macrofagi. La fase successiva è caratterizzata da un'intensa produzione di matrice extracellulare, il maggior componente della placca restenotica matura (71), composta dai vari sottotipi di collagene e proteoglicani (72).

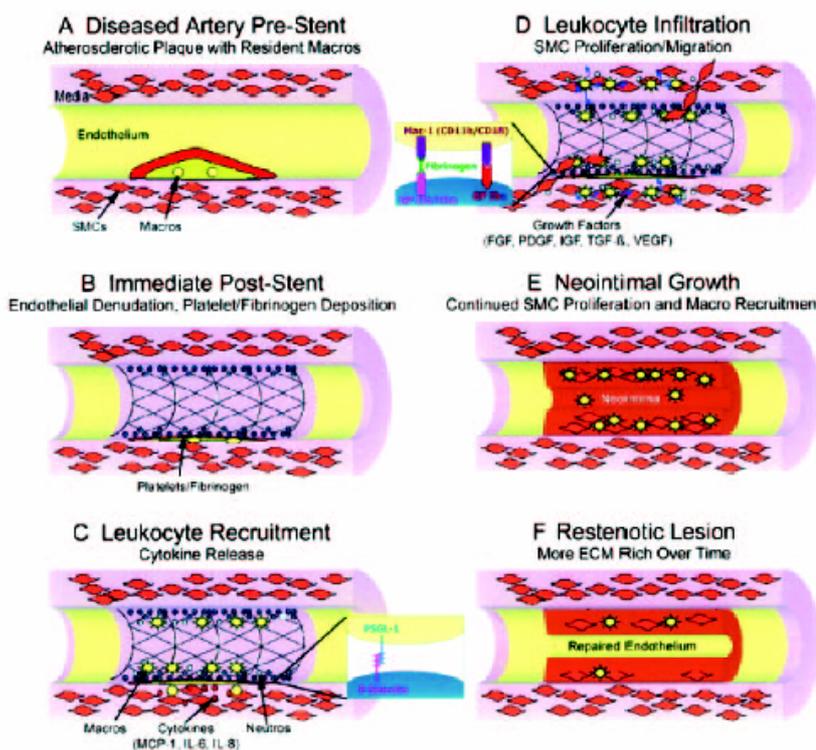


Fig.1. Schema di una cascata di restenosi. A, vasi aterosclerotici pre intervento. B, immediatamente dopo il posizionamento di stent c'è denudamento dell'endotelio e deposito di fibrinogeno/fibrina. C e D, chemiotassi dei leucociti, proliferazione e migrazione delle SMC nei giorni successivi. E, ispessimento neointimale nelle settimane successive con continua proliferazione delle SMC e reclutamento dei monoliti. F, modificazioni a lungo termine (settimane, mesi) con predominanza delle SMC (Costa MA, Simon DI *Circ* 2005;111:2257-2273)

Se i vasi sono stati sottoposti solamente allo stress da *balloon*, in questo periodo, che generalmente dura più di tre mesi, la riorganizzazione ed involuzione della matrice extracellulare diventa preponderante e porta all'involuzione dei vasi stessi, con degradazione e risintesi proteica e rimodellamento negativo (73). Dopo posizionamento di stent invece, studi sperimentali hanno suggerito come la migrazione e proliferazione delle cellule muscolari lisce e monocito-macrofagiche diventi il meccanismo chiave nella formazione neointimale post-traumatica che avviene lungo l'asse longitudinale dello stent stesso (74). In entrambi i casi in ogni modo lo scopo finale di questo processo, regolato da fini meccanismi su base infiammatoria, è la riendotelizzazione della maggior parte della superficie danneggiata.

Fattori predisponenti

La percentuale di restenosi intrastent può raggiungere il 60% (75,76) dei casi di posizionamento di stent e dipende da fattori correlati al paziente, alla procedura e alla lesione stessa. Quelli paziente-correlati sono essenzialmente il diabete mellito (77) e la storia di restenosi (78), anche se negli ultimi anni stanno assumendo sempre più rilevanza i fattori genetici (79). Per quanto riguarda la procedura diventano essenziali il numero degli stent posizionati (80), la lunghezza del segmento da loro rivestito e l'espansione, perché maggiore è la pressione a cui viene sottoposto il vaso, sia in acuto che in cronico, maggiore risulta essere il trauma (71,81); inoltre dalla letteratura risultano importanti predittori di restenosi il minimo diametro del lume post-procedurale e l'area del minimo lume in sezione, calcolata con la sonda intravascolare (82). Ovviamente ha un ruolo importante la struttura dello stent utilizzato (83). Le caratteristiche lesione-correlate che influenzano la percentuale di restenosi sono prima di tutto i vasi di piccolo calibro (84) e le lesioni lunghe (85), poi l'occlusione totale cronica del vaso (86), la lesione ostiale, quella calcificata e la malattia su graft venoso; un altro importante, indipendente predittore di restenosi è la persistenza della placca dopo il posizionamento di stent (87), strettamente correlata con la proliferazione neo-intimale, a

significare che la rimozione della placca prima del posizionamento di stent potrebbe ridurre la percentuale di restenosi.

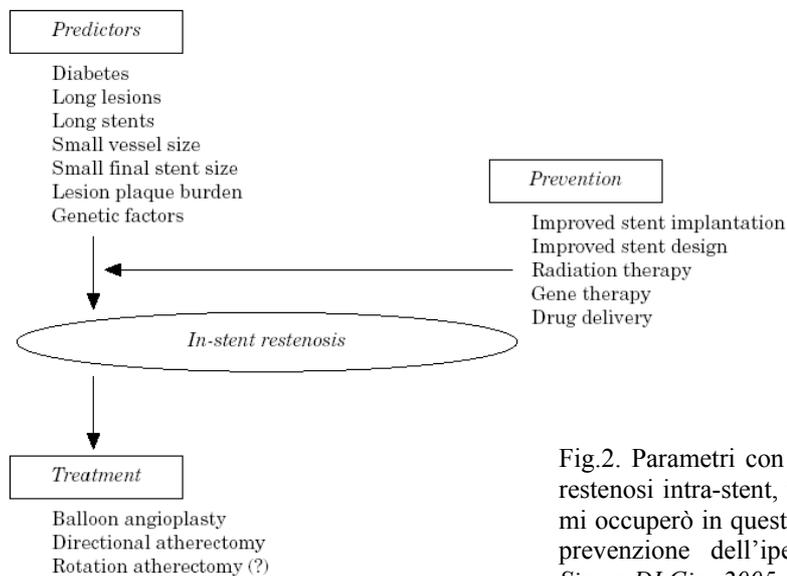


Fig.2. Parametri con maggior impatto sullo sviluppo di restenosi intra-stent, modalità di trattamento (di cui non mi occuperò in questa sede) e possibile approccio per la prevenzione dell'iperplasia neointimale (Costa MA, Simon DI Circ 2005;111:2257-2273)

Prevenzione

Alla luce di ciò, la restenosi intrastent può essere considerata, a ragion veduta, il problema di maggior rilevanza all'utilizzo delle tecniche di intervento sulle coronarie. Nessuna delle modalità messe a punto ha dato i risultati sperati sia a breve che a lungo termine, anche se alcune metodiche hanno sicuramente ricevuto una maggior spinta a fronte di dati sia sperimentali che clinici, incoraggianti. Le tecniche d'impianto di stent sono quelle che hanno riscosso maggior successo, con particolare riguardo al *design* del materiale utilizzato, e alla possibilità di rilasciare sostanze agenti sull'endotelio; sono inoltre state messe a punto tecniche di radioterapia intraluminale (brachiterapia)(88) i cui studi, effettuati anche sull'uomo (89,90), hanno evidenziato un riduzione del numero delle cellule muscolari lisce e dell'ispessimento neointimale, ma con un aumento della percentuale di fibrosi indotta dalle radiazioni ed un'accentuata proliferazione intimale ai margini della zona irradiata (91). Pertanto, nonostante questa metodica sia utilizzata in quanto discreta come sicurezza ed efficacia, l'attenzione del mondo scientifico si è rivolta prevalentemente agli stent.

La struttura dello stent influenza il diametro finale di stenosi che è il maggior determinante di restenosi, ad esempio gli stent concentrici increstati inducono meno iperplasia che quelli tubulari, invece quelli che ricoprono con molto metallo la superficie vasale favoriscono la reazione endoteliale al materiale stesso (83).

Di recente immissione sul mercato sono gli stent a rilascio di farmaci antiproliferativi, a fronte dell'evidenza della loro evidente superiorità sulle altre terapia preventive e sugli stessi stent metallici, soprattutto nei pazienti ad alto rischio cardiovascolare. Gli agenti farmacologici vengono incorporati nella struttura polimerica dello stent, ciò permette loro di avere un'elevata concentrazione solo nella zona interessata, riducendo così l'incidenza di eventuali effetti negativi sistemici, oltre alla possibilità di essere incorporati come profarmaci, resi poi attivi solo una volta posizionato lo stent.

Attualmente sono due le molecole maggiormente utilizzate in associazione agli stent: la rapamicina (sirolimus) e il paclitaxel (taxolo). La rapamicina è un potente immunosoppressivo. Legando specifiche proteine citosoliche attive nella cascata di restenosi, ha un effetto citostatico e di inibizione della migrazione e proliferazione cellulare, con conseguente riduzione dell'ispessimento neointimale (92,,93,94). Il taxolo ha una spiccata attività antitumorale, quindi antiproliferativa e inducendo il blocco della mitosi cellulare, porta a risultati simili a quelli del sirolimus (95,96). Tali caratteristiche al tempo stesso limitano, o quanto meno rallentano, la rigenerazione endoteliale, da qui la necessità della doppia terapia antiaggregante piastrinica prolungata nel tempo per ridurre al minimo l'incidenza di trombosi subacute indotte da una mancata riendotelizzazione completa del vaso.

Nel complesso equilibrio riparativo endoteliale trovano un ruolo di spicco citochine e fattori di crescita che mediano parte di questo processo. In particolare vale la pena citare l'ossido nitrico (NO) di derivazione endoteliale, che partecipa alla "guarigione" dell'endotelio attenuando l'infiammazione e inibendo la proliferazione e migrazione delle SMC (97). Anche

il vascular endothelial growth factor (VEGF), come già accennato in precedenza, ha attirato l'attenzione nell'ambito della rigenerazione endoteliale/neoangiogenesi (98); è considerato il più potente regolatore endogeno dell'integrità endoteliale in quanto agisce sia nella fase di riparazione di un danno che in quella di prevenzione dell'eventuale progressione della malattia (99). In questa fine regolazione giocano un ruolo importante anche i recettori solubili del VEGF (100), che hanno la capacità di inibirne l'attività (101). E' stato sperimentalmente dimostrato che i livelli di VEGF e dei suoi recettori solubili sono aumentati nei processi aterosclerotici e di lesioni restenotiche (100). L'inibizione del VEGF da parte dei suoi recettori sembra ridurre la formazione neointimale (102).

EPC E RESTENOSI INTRA-STENT

Nell'ipotesi che le cellule staminali progenitrici possano effettivamente essere markers/predittori di danno vascolare e che quest'ultimo funga da trigger per la mobilitazione e homing delle EPCs nella zona di endotelio disfunzionale, promuovendone la riendotelizzazione, sono stati intrapresi diversi studi sperimentali su animali e successivamente sull'uomo, che hanno nella maggior parte dei casi rafforzato tale tesi.

Già da anni è nota in letteratura la capacità delle EPCs (trapiantate) di ricostituire l'endotelio di vasi danneggiati da procedure vascolari invasive come l'angioplastica (103). Più recentemente, sfruttando la capacità dell'ossido nitrico-sintetasi (eNOS) di inibire il fenomeno di iperplasia intimale, sono state trasfettate, in conigli in condizioni di sofferenza vascolare, EPCs esprimenti eNOS umano; a due settimane dall'evento acuto si è riscontrata una quasi completa riendotelizzazione in presenza di una marcata inibizione dell'iperplasia neointimale, oltre ad una drammatica riduzione degli eventi trombotici.(104) Da questi dati preliminari è scaturito l'interesse per la correlazione tra EPCs e restenosi intrastent, nell'ipotesi che in una qualche maniera le EPCs possano far parte di quella catena riparativa attivata dalla disfunzione endoteliale che, passando attraverso i meccanismi di iperplasia neointimale e

rimodellamento vasale, porta alla restenosi. Tale interesse è motivato dal fatto che nell'era dell'angioplastica e degli stent medicati e non, la restenosi intrastent è un problema sempre più pressante e insoluto; in questo contesto le cellule staminali, notoriamente correlate con i fattori di rischio per malattie cardiovascolari e con l'aterosclerosi, potrebbero giocare un ruolo protettivo sull'endotelio, effetto sul quale eventualmente agire per arginare il processo patologico.

George et al.(105) hanno descritto una down-regulation e soprattutto una compromissione funzionale (ridotta capacità di aderenza alla fibronectina) del pool circolante delle EPCs in pazienti con diffusa restenosi intrastent sintomatici per angina instabile, a significare come la compromissione di tali cellule possa provocare un difetto di endotelizzazione ed un'aumentata iperplasia neointimale.

In un altro lavoro che ha dato risultati in linea, sono state utilizzate cellule progenitrici vascolari di coesprimenti c-Kit+, tipico marker di immaturità, e *smooth muscle α -actina*. Esse sono state cercate nel tessuto coronarico aterectomizzato di pazienti affetti da restenosi intrastent e post-angioplastica e da lesioni aterosclerotiche primitive; ad evidenza del loro ruolo nella genesi della restenosi, c-Kit+ erano presenti in tutti i tessuti che presentavano restenosi, di contro, erano totalmente assenti nelle lesioni primitive, e la loro densità era inversamente correlata al tempo intercorso tra il posizionamento di stent e l'aterectomia. Inoltre le cellule mononucleate periferiche messe in coltura, erano di numero molto ridotto e con deficit funzionali nei pazienti con restenosi, soprattutto se confrontati con i soggetti sani, mettendo in luce il loro ruolo vasculoprotettivo (106) Uno studio pubblicato precedentemente aveva già messo in luce il coinvolgimento di cellule primariamente extravascolari nella formazione dell'iperplasia neointimale, con una prevalenza di *smooth muscle cells actine+* (107); nello stesso anno Werner et al.(108) hanno dimostrato, in topi splenectomizzati e sottoposti a legatura delle carotidi, una riduzione dell'iperplasia intimale ed un'aumentata riendotelizzazione dopo infusione venosa di cellule mononucleate (isolate dalla milza o

differenziate in vitro in EPCs). Tale è stato l'entusiasmo per questi risultati che sono stati sperimentati stent a rilascio di EPC. I device erano messi in coltura con EPC le quali formavano su di essi monostrati confluenti che permettevano loro di rimanere in situ dopo il posizionamento degli stent in strutture che mimavano il tessuto vascolare; dopo 7 giorni, le EPCs erano migrate dagli stent alla struttura vascolare e proliferando avevano riendotelizzato la superficie (109). Si è passati quindi alla sperimentazione sull'uomo, con impianto di stent che catturano EPC, con interessanti risultati di sicurezza ed efficacia (110).

Dati più recenti supportano l'ipotesi secondo la quale le CD34+ circolanti mobilizzate in corso di trauma vascolare dovuto a posizionamento di stent, sono predittive del rischio di restenosi intrastent e le loro modificazioni post-procedurali correlano con il late lumen loss. Questo lavoro (111) evidenzia, al contrario di quelli precedentemente descritti, come l'aumento delle cellule mononucleate dosate nel circolo periferico post-procedura, si correla con l'aumentato rischio di restenosi oltre che col diametro di restenosi. A supporto, sono state descritte correlazioni dirette tra numero di monociti circolanti, impianto di stent e volume neointimale intra-stent al follow-up (112). Entrambi i gruppi ipotizzano la maturazione dei monociti a cellule muscolari lisce, elemento chiave nel processo di iperplasia neointimale.

Dati discordanti quindi, che creano una certa confusione sul reale ruolo delle cellule endoteliali progenitrici: vasoprotettrici o addirittura promotrici di iperplasia neointimale?

Esperienze negative al riguardo derivano da un grosso trial, il primo randomizzato, atto alla valutazione degli effetti dell'infusione intracoronarica di cellule staminali periferiche, mobilizzate mediante G-CSF, sulla funzione ventricolare sx e sulla restenosi intrastent in corso di infarto miocardico; l'arruolamento è stato sospeso precocemente per l'elevata percentuale di restenosi intrastent (113). In linea con i dati sperimentali sopradescritti questo studio si propone di aggiungere un altro tassello alla ricerca della correlazione delle cellule staminali progenitrici con l'ischemia miocardica e soprattutto del loro ruolo in rapporto alla restenosi intrastent

SCOPO

Lo scopo di questo studio è duplice: in primo luogo verificare se vi è una correlazione significativa tra il danno endoteliale e la mobilizzazione delle EPCs, al fine di capire se il danno endoteliale possa fungere da meccanismo di mobilizzazione cellulare; in secondo luogo valutare l'eventuale correlazione tra EPCs e proliferazione neointimale intesa come restenosi intrastent. A tal scopo abbiamo utilizzato come modello di danno endoteliale quello prodotto dalla procedura interventistica invasiva di angioplastica coronarica con posizionamento di stent, procedura questa, notoriamente complicata da restenosi intrastent nei mesi successivi.

Tale progetto si articola in due fasi distinte:

1. Valutazione della mobilizzazione delle CD34+ ed EPC nei 14 giorni successivi la procedura di angioplastica coronaria (gruppo di studio) o di coronarografia (gruppo controllo).
2. follow-up coronarografico (ai soli pazienti appartenenti al gruppo di studio), a distanza di almeno 4 mesi dall'arruolamento nel protocollo di studio per la valutazione dell'eventuale restenosi intrastent ed analisi dei livelli circolanti di CD34+ ed EPC mediante prelievo di sangue venoso periferico, per la comparazione di tali livelli in rapporto alla restenosi.

METODI

DISEGNO DELLO STUDIO

Studio Prospettico Unicentrico, svolto dall'U.O. di Cardiologia-UTIC, Cattedra di Cardiologia dell'Università di Ferrara, presso l'Azienda Ospedaliera di Ferrara, in collaborazione con l'U.O. di Ematologia, Cattedra di Ematologia dell'Università di Ferrara, presso l'Azienda Ospedaliera di Ferrara.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della n.s. Azienda Ospedaliera e per ciascun paziente è stato ottenuto il consenso informato.

CRITERI DI INCLUSIONE

Sono stati arruolati pazienti ricoverati c/o l'Unità Operativa di Cardiologia di età > 18 anni, affetti da cardiopatia ischemica cronica (valutata mediante test da sforzo e/o miocardioscintigrafia risultati positivi per ridotta riserva coronarica, secondo le attuali linee guida dell'ACC/AHA) con un quadro coronarografico tale da porre indicazione a PTCA+/- stenting (secondo le attuali linee guida dell'ACC/AHA).

CRITERI DI ESCLUSIONE

Sono stati esclusi dal protocollo di studio quei pazienti con diagnosi di sindrome coronarica acuta aventi markers di citonecrosi miocardica positivi secondo i parametri del laboratorio analisi del n.s. Ospedale (troponina I, CK-MB, CPK), scompenso cardiaco cronico (Frazione di eiezione ventricolare sinistra all'esame ecocardiografico <40%), recenti interventi chirurgici o traumi (entro 3 mesi), istus nei 2 mesi precedenti, insufficienza renale od epatica,

presenza di qualunque malattia ematologia in atto o pregressa a chiaro sfondo neoplastico/displastico, assenza di consenso valido scritto da parte del paziente eleggibile.

ARRUOLAMENTO

Nel corso dello studio sono stati selezionati 54 pazienti, di questi 4 hanno rifiutato il consenso e uno non è rientrato nei criteri di inclusione. Dei rimanenti 49 pazienti, 14 non sono stati sottoposti a follow-up coronarografico, 10 per rifiuto volontario e 4 per controindicazioni cliniche.

Dei 49 pazienti 19 erano affetti da angina stabile, 23 da angina instabile e 7 avevano avuto negli ultimi 15 giorni un IMA non-Q.

Durante le procedure di riperfusione percutanea è stata somministrata eparina e.v. in accordo con la pratica standard. La restante terapia antiaggregante era a discrezione del medico curante, anche se, generalmente, la somministrazione dell'acido acetilsalicilico (100 mg) veniva intrapresa nei giorni precedenti la procedura; il clopidogrel (75 mg/die), se non somministrato da almeno 5 giorni, era praticato con bolo di 300 mg, e quando non continuato per i mesi successivi, veniva comunque imbricato con la ticlopidina. Per evitare *bias* dovuti al materiale utilizzato, tutti gli stent posizionati erano metallici.

Il successo procedurale era definito dal diametro finale di stenosi della lesione trattata <30%, in assenza di complicanze maggiori (morte intra-ospedaliera, infarto miocardico, by-pass coronarici in emergenza).

Il follow-up è stato eseguito ad almeno 4 mesi dalla dimissione con lo scopo di:

- valutazione di eventuali eventi avversi maggiori come morte, infarto miocardico, necessità di rivascolarizzazione coronarica;
- studio coronarografico, al fine di quantificare il grado di restenosi post-procedurale;

- rivalutazione delle cellule progenitrici endoteliali circolanti CD34+ mediante un prelievo di sangue venoso periferico.

QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE CD34+

La quantificazione delle CD34+ è avvenuta in ogni momento dello studio mediante un prelievo di sangue venoso periferico (da vena antecubitale). Al fine di evidenziare l'andamento temporale di tali cellule è stata eseguita una cinetica intensiva di campionamento in corrispondenza dell'inizio della procedura (tempo zero), dopo 4, 12, 24, 48 ore ed in terza, quinta, settima, decima e quattordicesima giornata, di una parte della popolazione indagata; in considerazione dei risultati preliminari, l'analisi temporale è stata successivamente effettuata al tempo zero, dopo 48 ore, in quinta, settima, decima e quattordicesima giornata.

Il trattamento con statine è stato sospeso o non intrapreso per almeno due settimane prima e durante i 15 giorni in cui i pazienti erano sottoposti ai prelievi seriati, in considerazione dell'importante stimolo indotto da questi farmaci non solo alla mobilitazione delle EPCs (47,114), ma anche alla riendotelizzazione post-traumatica (115) e alla riduzione della proliferazione neointimale (116). La quantificazione delle cellule CD34+ nel sangue periferico è stata eseguita, in accordo con le procedure standard (117) mediante analisi citofluorimetrica con Calibur Flow Cytometer (Becton Dickson) con anticorpi monoclonali sia verso il CD45 marcato con isotocianato di fluorescina –(FITC), sia anticorpi monoclonali CD34 marcati con fitocoeritina-(PE) (Becton Dickson). Il metodo di acquisizione è stato basato sulle linee guida internazionali ISHAGE (118) per determinare l'espressione fenotipica di cellule CD34 e CD45 mediante antigeni specifici marcati ed anche in base alle loro caratteristiche morfologiche.

QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI PROGENITRICI (EPC_S)

Le EPCs sono state dosate in corrispondenza del tempo zero e dei picchi di mobilitazione noto in letteratura (9,52,62,64).

Analisi citofluorimetrica per quantificazione EPCs

Cellule CD34+ purificate con micropiastre immunomagnetiche (Miltenyi Biotech) come coesprimenti i tre antigeni marcati con Peridinin Chlorophyll anti-CD34 (Becton Dickson), PE- (fitocoeritrina) anti-CD133 (Miltenyi Biotech) e anticorpi coniugati anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology). Successivamente è stato utilizzato un secondo reagente, come metodo di conferma, con anticorpi di coniglio o maiale con FITC (Dako). (fig.1)

Analisi funzionale come unità formanti colonie (e-CFU)

Le colture cellulari (e-CFU) sono state ottenute attraverso diversi passaggi: inizialmente le cellule mononucleate periferiche sono state isolate per gradiente di densità e successivamente sospese in terreni di crescita Medium 199 (GIBCO BRL Life Technologies) con aggiunta del 20% di siero bovino fetale, penicillina e streptomina su una piastra coperta di fibronectina umana (Becton Dickson). Dopo 48 ore le cellule non aderenti sono state nuovamente sospese mediante centrifugazione e riposizionate in terreni di coltura analoghi. Ogni tre giorni il terreno di crescita veniva cambiato e dopo sette giorni le colonie venivano contate.

Conta delle colonie: una colonia di cellule endoteliali (e-CFU) è considerata un insieme di cellule piatte e sottili che circondano un gruppo di cellule rotondeggianti. In assenza delle cellule piatte non si può definire una colonia (25). A conferma che queste colonie affusolate (spindle shaped) fossero veramente cellule endoteliali veniva eseguita una marcatura con anticorpi monoclonali verso antigeni CD31 (Becton Dickson), VEGFR-2 e fattore VIII (Dako) (Fig 1).

VALUTAZIONE CORONAROGRAFICA

La valutazione angiografica è stata effettuata, in accordo con i metodi standard, mediante analisi quantitativa coronarica, utilizzando un algoritmo automatico predeterminato in uso al laboratorio (CASS II System, PieMedical, Maastricht, The Netherlands). Le caratteristiche quantitative standard hanno incluso il diametro di riferimento vasale prossimale e distale, la lunghezza della lesione, il diametro luminale minimo (MLD) e sono state valutate sia durante la procedura basale, che nel follow-up. Il *Late loss* è stato calcolato come la differenza tra MLD dopo la procedura e quello dopo il follow-up. La restenosi angiografica era definita come il diametro di restenosi >50%.

ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono state descritte come medie \pm DS. Le differenze tra due o più gruppi sono state valutate rispettivamente con Test t di Student e ANOVA; è stata eseguita analisi post Hoc (Bonferroni) per valutarne la significatività.

Le variabili categoriche sono state descritte in termini di numero e % e valutate con Test di Fischer e Chi quadro come appropriato. La correlazione lineare di Pearson è stata usata per evidenziare ogni associazione fra le variabili esaminate. Ogni valore di $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

L'analisi statistica è stata eseguita con STATISTICA 6.1 (Statsoft Inc.).

RISULTATI

CARATTERISTICHE BASALI DELLA POPOLAZIONE

Sono stati inclusi 49 pazienti di cui 33 maschi e 16 femmine, con età media di 66 anni (da 38 a 84), affetti da angina stabile (38%), instabile (46%) o pregresso infarto miocardico non-Q (14%) con successiva documentata normalizzazione degli indici di citonecrosi miocardica (tab 1). Erano tutti ad elevato rischio cardiovascolare, il 70% ipertesi e il 64% affetto da dislipidemia e con familiarità per malattie cardiovascolari, il 16% erano fumatori al momento dell'inclusione e il 20% diabetici; meno del 50% aveva precedenti cardiologici (tab 1). 12 pazienti sono andati incontro a necrosi peri-procedurale (definito come aumento dei valori di CK-MB al di sopra del valore massimo di normalità indicato dal laboratorio analisi dell'Ospedale, cioè > 5,0 ng/ml). Trenta pazienti hanno positivamente la troponina (>0,15 ng/ml, limite massimo di normalità) dopo la procedura.

Nel periodo di tempo in cui sono stati sottoposti a follow-up (mediana 338 giorni, range 133-826 giorni), 8 sono stati ricoverati per angina instabile, 9 stabile, 2 per infarto miocardico e 2 per scompenso cardiaco.

Analizzando le caratteristiche cliniche dei 35 pazienti sottoposti a follow-up, 25 maschi e 10 femmine con età media di 66 anni, suddivisi in due sottogruppi distinti dalla presenza o assenza di restenosi intrastent, non si sono evidenziate significative disomogeneità eccetto per la presenza di ipertensione arteriosa, presente in tutti i pazienti con restenosi (tab 2) e nel 65% dei pazienti senza restenosi ($p=0,042$); entrambi erano ad elevato rischio cardiovascolare con malattia plurivasale, spesso già precedentemente rivascolarizzata. Al gruppo con restenosi appartengono 9 pazienti (7 maschi), mentre a quello senza restenosi 26 (18 maschi).

L'analisi delle caratteristiche emodinamiche del gruppo di follow-up, ha evidenziato come il vaso target sia nel 37% la coronaria interventricolare anteriore (IVA), nel 34% la circonflessa

(Cx) e nel 25% la coronaria destra (CDx), il 2% dei pazienti è stato trattato su lesioni localizzate in by-pass. Solo l'11% dei pazienti con restenosi intrastent aveva trattato l'IVA, rispetto al 42% dei soggetti in cui non si è verificata restenosi ($p < 0,009$). La lunghezza della lesione non è risultata significativa nel discriminare la restenosi, mentre lo è la lunghezza dello stent ($p = 0,0263$) (tab 3).

CORRELAZIONE FRA CD34+ ED EPCS

L'analisi citofluorimetrica delle EPCs come coesprimenti i tre antigeni CD34+, VEGFR+, AC133, è stata eseguita all'ingresso e a quelli ritenuti essere dalla letteratura i picchi di mobilizzazione (9,52,62,64): quarantottesima ora e decima giornata. Al tempo zero e in corrispondenza del picco di mobilizzazione è stata osservata una stretta correlazione tra CD34+ ed EPC (fig.3), tale da poter considerare le CD34+, numericamente più facili da analizzare, il "surrogato" delle EPC ($r = 0,85; p = 0,014$).

La correlazione tra CD34+ ed EPCs valutate come e-CFU era significativa solo all'ingresso ($r = 0,85; p = 0,013$).

CD34+ E CORRELAZIONI

Si è osservata una differenza statisticamente significativa tra CD34+ basali ($p < 0,0008$) e al picco ($p < 0,002$) tra fumatori e non fumatori, con un incremento delle cellule nel primo gruppo, mentre solo un trend in crescita nei pazienti ipertesi. Non è stata osservata nessuna correlazione con i rimanenti fattori di rischio, età, sesso, precedenti cardiologici e frazione d'eiezione ventricolare sinistra. Non si è evidenziato inoltre, nessun rapporto significativo con la terapia farmacologica, nemmeno antiaggregante, né con la conformazione e la lunghezza della lesione trattata.

Nemmeno i livelli di troponina I post-procedurale erano correlati alle CD34+.

CINETICA DI MOBILIZZAZIONE DELLE CD34+

L'analisi preliminare con cinetica intensiva (tempo zero, 4, 12, 48 ore, 3°, 5°, 7°, 10° e 14° giornata) ha permesso di selezionare il timing corretto di prelievi. E' stata quindi eseguita in tutti i pazienti una cinetica regolare così organizzata: tempo zero, 48 ore, 5°, 7°, 10° e 14° giornata, al fine di consolidare i dati preliminari.

Analizzando l'andamento temporale delle CD34+ di tutti i pazienti nel loro insieme, si è evidenziato un picco in decima giornata (fig. 4), tanto più marcato quando sono stati presi in considerazione solo i pazienti con positivizzazione dei livelli di CK-MB come da necrosi miocardica postprocedurale ($p < 0,005$) (fig. 5); mentre analizzando i pazienti il cui CK-MB è rimasto nei limiti, dopo la procedura, non si è evidenziato nessun picco significativo.

CORRELAZIONE CD34+ CON RESTENSI INTRASTENT

Le CD34+ sia basali che al picco non correlavano con la restenosi intrastent, valutata come *late lumen loss* (Fig 6); inoltre i livelli di CD34+, in ogni momento della cinetica di mobilizzazione e durante il follow-up, non differivano in modo significativo nei pazienti con restenosi binaria rispetto ai quelli che non la presentavano (fig. 7).

Considerando solo i pazienti che sono andati incontro a necrosi periprocedurale, non è comunque risultata significativa la correlazione tra le CD34+ e la restenosi intrastent, sia valutando la variabile dicotomica che quella continua.

Ai pazienti sottoposti a follow-up è stato eseguito un prelievo di sangue venoso periferico, utilizzato per la valutazione delle CD34+. Anche in questo caso non si è rilevata nessuna correlazione tra i livelli circolanti di CD34+ e la restenosi intrastent.

DISCUSSIONE

In linea con i dati della letteratura (9), questo studio evidenzia come le EPCs, presenti in minima parte nel sangue periferico, siano strettamente correlate con il numero, decisamente maggiore, di CD34+ circolanti, mediante quantificazione citofluorimetrica dei markers CD34+, VEGFR-2 e AC133. Si può quindi ritenere che la quantificazione citofluorimetrica dell'antigene CD34+, sebbene non specifico, possa fungere da "surrogato" clinico delle EPCs. Tale correlazione non si è verificata per le Unità formanti colonie (e-CFU). Questa discrepanza potrebbe essere determinata dalle condizioni *in vitro* utilizzate per la quantificazione e l'isolamento delle EPCs. Tali cellule vengono distinte in "precoci" o "tardive" in base alla presenza o assenza, rispettivamente, dell'antigene AC133. L'analisi citofluorimetrica viene eseguita su sangue fresco, quantificando solo le EPCs precoci (50), mentre la conta delle colture cellulari, eseguita dopo sette giorni di crescita in piastre, potrebbe identificare entrambi gli stati di maturazione cellulare. Le EPCs tardive inoltre, potrebbero avere capacità differenziative verso la linea endoteliale più lenta, spiegando così l'assenza di correlazione fra colonie e CD34+ in decima giornata.

Nella popolazione analizzata non si è evidenziata una correlazione significativa delle CD34+ in rapporto all'età e ai fattori di rischio (25,47), né differenze legate al sesso (19). E' stato tuttavia documentato un incremento dei livelli di CD34+ nei fumatori e un trend in crescita negli ipertesi, ma il numero dei soggetti è effettivamente ridotto per avere dati consistenti e concrete ipotesi in merito. Da segnalare, che alcuni studi hanno evidenziato come le condizioni basali delle EPCs periferiche non siano predittive della mobilizzazione (119). E' oramai noto come il forte stimolo ischemico-necrotico e infiammatorio mobilizzi le EPCs (9,52), soprattutto alla luce della loro azione vasculogenica, con formazione di neo-capillari atti a rivascularizzare il territorio danneggiato. Più recentemente si è evidenziato un aumento

in circolo di tali cellule anche in presenza di stimoli di minore entità, come lo stress-test non solo in pazienti ischemici (66), ma anche in soggetti sani (120), probabilmente con lo scopo di far fronte, mediante riendotelizzazione, a possibili danni endoteliali.

I dati presentati in questo studio evidenziano come il solo danno endoteliale, qui rappresentato dalla rivascolarizzazione percutanea, non sia uno stimolo tale da indurre una significativa mobilizzazione delle cellule staminali, a meno che, tale evento non esiti in una necrosi miocardica (valutata come aumento al di sopra dei limiti superiori di norma il CK-MB), solo in questo caso si ha un incremento tale delle CD34+, da risultare statisticamente significativo. Il picco di mobilizzazione spontanea è attorno alla decima giornata, in accordo con Shintani et al. (9). L'analisi della cinetica "stretta" non ha mostrato differenze sostanziali; in letteratura però, negli ultimi anni sono apparsi lavori che parlano di un picco precoce, tra le 12 e le 48 ore dall'evento traumatico (52,62,64). La diversità nel momento di massima mobilizzazione potrebbe dipendere dalla quantificazione in numero assoluto (62) delle cellule staminali; l'analisi eseguita nel corso di questo studio, che esprime le CD34+/10⁶ leucociti, evita il fattore confondente di incremento dei leucociti come risposta infiammatoria allo stress.

Negli ultimi anni in letteratura si è sviluppato l'interesse per la correlazione tra CD34+ e la restenosi intrastent. Essendo quest'ultima la risposta ad un danno provocato dall'apposizione di un corpo estraneo, lo stent, sull'endotelio vasale, alla luce delle nuove conoscenze, si è supposto che l'iperplasia neointimale non fosse indotta solo dalla proliferazione di sostanze già presenti in situ e dalla migrazione di cellule mature, ma in un qualche modo fosse collegata alla presenza di cellule staminali progenitrici. I primi studi su modelli animali avevano verificato la presenza di precursori delle cellule muscolari lisce (SMC) nell'intima formatasi dopo danno vascolare, inoltre è stato dimostrato come, in animali di piccola taglia sottoposti a stress vascolare e trattati con cellule mononucleate non ancora differenziate o con EPCs, vi fosse una più rapida riendotelizzazione ed una riduzione dell'iperplasia neointimale (104,108).

Su modelli umani invece, esiste notevole disaccordo sul ruolo delle cellule staminali in questo processo. I nostri dati non hanno evidenziato nessuna correlazione tra i livelli di CD34+ pre e post-procedurali e il *late lumen loss*, come non è apparsa alcuna differenza dei livelli di CD34+ con e senza restenosi.

Secondo George et al., all'aumentare dei livelli di CD34+ circolanti, corrisponde una riduzione della restenosi intrastent (105). Questo lavoro ha valutato la funzionalità (adesività) e il numero delle EPC, mediante Unità formanti colonie (e-CFU), in 16 pazienti con angina instabile da restenosi intrastent; esso mostrava una differenza significativa nel numero di EPCs, valutate mediante un unico prelievo al momento della diagnosi, tra pazienti con restenosi focale e generalizzata, ma nessuna con il gruppo controllo di lesioni *de novo*. Le cellule coltivate sono state tipizzate secondo antigeni di superficie quali flk-1, tipico della "linea staminale vascolare" e Tie-2, anch'esso caratteristico della filiera derivante dall'emangioblasto, ma che viene perso nel corso della maturazione delle EPC. Non è stata eseguita la caratterizzazione fenotipica mediante citofluorimetria come ulteriore metodo di tipizzazione cellulare, come invece abbiamo effettuato nel lavoro descritto. I nostri dati, confermati dalla letteratura, non identificano un rapporto diretto tra le e-CFU e le CD34+, al contrario, è statisticamente significativa la correlazione tra caratterizzazione fenotipica delle EPC e CD34+. Le EPCs sono presenti in circolo in numero molto limitato, motivo per il quale nel nostro studio, una volta confermata la stretta correlazione EPC-CD34+, le CD34+, numericamente più facilmente identificabili, sono state utilizzate come surrogato delle EPC; basare la propria analisi esclusivamente sui bassi livelli circolanti delle cellule progenitrici, ulteriormente ridotti in particolari condizioni fisiologiche e soprattutto patologiche, come la presenza di molti fattori di rischio cardiovascolari, potrebbe dare un ruolo troppo rilevante alle caratteristiche individuali ed alle tipiche variazioni giornaliere di tali cellule, presenti in ogni soggetto, modificando sostanzialmente il dato statistico.

George ha eseguito un tipico studio retrospettivo, caso-controllo, a differenza del nostro gruppo, che ha correlando la restenosi intrastent al numero delle EPC circolanti al momento del posizionamento dello stent e nei 15 giorni successivi, oltre che al follow-up, ha svolto uno studio osservazionale prospettico e considerato quindi nell'analisi, il tipo di procedura svolta e materiali utilizzati, anatomia delle lesioni coronariche, terapia e caratteristiche cliniche dei pazienti.

Secondo altri autori invece, il numero delle cellule progenitrici circolanti in corso di danno vascolare, è direttamente proporzionale alla restenosi (111), ciò supportato dall'ipotesi che le cellule muscolari lisce, elemento chiave nella formazione dell'iperplasia intimale, possano derivare da progenitrici circolanti (112,121), esprimenti marker di staminalità (122), e reso forte dalla sospensione del primo grande trial randomizzato in cui pazienti infartuato ricevevano G-CSF come mobilizzatore di cellule staminali, per migliorare la funzione ventricolare sinistra, interrotto per l'elevata percentuale di restenosi intrastent (113).

Di particolare interesse il lavoro di Shoher per la somiglianza con il nostro. Una popolazione composta da 17 pazienti che, come la nostra, era affetta da angina stabile e instabile, è stata sottoposta a posizionamento di stenting diretto ed eseguito un follow-up coronarografico nei mesi successivi, con lo scopo di valutare la correlazione tra restenosi intrastent e livelli circolanti di EPC basali, dosati cioè durante la prima procedura. Disegno dello studio molto simile al nostro, con una differenza sulla caratterizzazione delle cellule staminali. Shoher et al. hanno isolato mediante citofluorimetria cellule $CD34^{high}-CD45^{low}$, $CD34+$ come marker di linea, presente quindi ad elevati livelli, e $CD45$ a bassi livelli per identificare cellule con elevato grado di immaturità; non hanno definito ulteriori antigeni identificativi di linea né hanno messo in coltura le cellule per la valutazione delle colonie, perché secondo loro le cellule che promuovono l'iperplasia intimale non sono EPCs ma cellule muscolari lisce (SMC) progenitrici, caratterizzate appunto dall'elevata espressione di $CD34+$ (come le EPCs) e da bassi livelli di $CD45$, che si differenziano in SMC quando stimulate da un danno

endoteliale. E' stata evidenziata una correlazione positiva tra livelli di CD34+ post-procedurale e late lumen loss e una differenza statisticamente significativa dei livelli di CD34+ tra i pazienti con e senza restenosi; tali risultati però, come anche per lo studio di George, derivano dall'analisi statistica eseguita su di un piccolo numero di soggetti, elemento questo statisticamente confondente, perché da troppa importanza alla variabilità individuale.

I nostri dati si basano su analisi condotta su 49 pazienti in toto e 35 sottoposti a follow-up angiografico, ciò non elimina ma sicuramente riduce il rischio di errore statistico.

Inoltre le correlazioni e i confronti sono stati eseguiti su almeno dieci rilevazioni di CD34+ per paziente nel corso del primo periodo e almeno un prelievo nel follow-up, numeri questi, che ci hanno permesso una maggiore affidabilità dei risultati, secondo i quali non c'è un ruolo significativo delle EPCs nel meccanismo di restenosi intrastent. A tal proposito risulta interessante l'ipotesi del gruppo di Shober secondo la quale l'incremento delle CD34+ è in realtà solo l'epifenomeno di meccanismi del tutto indipendenti da loro: in presenza di danno endoteliale viene indotto lo stimolo proliferativo alle cellule monocitomacrofagiche che come già detto sono CD34+ ed effettivamente fanno parte della cascata riparativa, di conseguenza aumentano anche i livelli di EPCs perché derivanti dalla stessa filiera, ma non assumono nessun ruolo nel processo di riparazione endoteliale (112).

Le esperienze ed evidenze scientifiche riportate mostrano come in realtà siamo ben lungi da certezze riguardanti il ruolo, scopo e utilizzo delle cellule staminali. La ricerca al riguardo continua ad essere florida e prolifica ma certo ci vorrà tempo perché tutto questo possa portare a risultati concreti che possano realmente influire sulla pratica clinica.

Limiti dello studio

Nonostante il lavoro appena presentato sia stato condotto su un numero di casi decisamente superiore rispetto ai lavori sullo stesso argomento con cui ci siamo confrontati, si può comunque affermare che l'esiguità del campione costituito rimane un limite. Inoltre sono stati arruolati pazienti con esiti di infarto miocardico non-Q; anche se già Troponina I negativi, la cinetica di mobilitazione delle CD34+ indica che il calo di tali cellule, dopo l'incremento e picco indotti dal danno vascolare, è probabilmente più lento che la riduzione nei limiti fisiologici della Troponina I, questo potrebbe avere creato un *gap* nella valutazione della mobilitazione delle CD34+ ed EPC.

Non è stata valutata la capacità adesiva delle EPCs per poter valutare eventualmente la correlazione restenosi intrastent-funzionalità cellulare, dati questi, presenti in letteratura.

Non sono stati considerati, nell'analisi descritta, i fattori di crescita e le citochine, elementi fondamentali nel meccanismo fisiopatologico del rimodellamento vasale post angioplastica e nella restenosi intrastent; il loro dosaggio è attualmente in corso; i campioni derivanti da prelievi di sangue periferico eseguiti in tutta la popolazione in studio, sono stati svolti con la stessa tempistica delle CD34+.

CONCLUSIONI

L'analisi del nostro modello clinico ha evidenziato la presenza di una mobilitazione delle cellule endoteliali progenitrici (EPCs) e delle cellule CD34+ in corso di danno miocardico, ma non di danno vascolare. Inoltre, secondo questi dati, il numero delle cellule CD34+ ed EPCs non è correlato con la presenza di restenosi intrastent, valutata sia come variabile continua (late lumen loss) che come restenosi binaria.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire quale sia il reale ruolo di tali cellule nel processo riparativo endoteliale successivo a danno vascolare e le loro implicazioni cliniche e terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Cai J, Wiess ML, Rao MS. In search of “stemness”. *Exp hematol* 2004 Jul;32(7):585-98.
2. Graaf T, Differentiation, plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002;99(9):3089-3101.
3. Murry C, Soonopa MH, Reinecke H, Field LJ, et al. Bone Marrow-derived hematopoietic stem cells generate cardiomyocytes at low frequency fusion through cell fusion but not transdifferentiation. *Nature* 2004 Apr 8; 428(6983),664-668.
4. Balsam L, Amy JW, Robbins C. Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature* 2004 Apr 8;428(6983),668-672.
5. Taylor DA, Hruban R, Rodriguez ER, Glodschmidt-Clermont PJ. Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair. Does it happen and if so to what degree?. *Circulation* 2002; 106: 2-4.
6. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate into a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Mooran MA, Simonetti DW, Craig s, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284; 143-147.
8. Jackson KA, Maika SM, Wang H, Pocius J, Harley CJ, Mjesky MW, Entman ML, Micheal LH, Hirschi KK, Goodtall MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
9. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-2779.
10. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Damacco F, Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathway. *Curr Mol Med* 2;537-543,2002.
11. 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;107:1164-1169.
12. Asashara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation putative progenitor cells for angiogenesis. *Scienze* 1997;275:964-7.

13. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Raffi S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursor. *Blood* 2000;95:952-958.
14. Asahara T, Chen K, Circulating endothelial progenitor cells incorporate into reendothelialization after vascular injury. *Circulation* 1997;99;suppl I:7251-7301.
15. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ispida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998 Jul 15;92(2):362-7.
16. Rafii Q, Oz MC, Seldomridge JA, et al. Characterization of hematopoietic cells arising on the textured surface of left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg* 1995;60;1627-32.
17. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am J Cardiol* 2000 Oct 19;86(8B):3J-8J.
18. Verma S, Anderson TJ, Fundamentals of endothelial function for clinical cardiologist. *Circ* 2002;105:546-549.
19. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig Gestrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003;107:3059-3065.
20. Steiner S, Niesser A, Ziegler S, Richter B, Sidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increased the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 181 (2005) 305-310.
21. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uccida S, Masuda H, Hawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilized bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J clin Invest* 2001;108:339-405.
22. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Simari RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003 Nov 28;93(11):1023-5.
23. Urbich C, Dimmler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Research* 2004;95:343-353.
24. Handegritenger R, Gordon Pr, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N/Y acad Sci.* 2003;996:141-151.
25. Hill JM, Zalos G, Halcox JPI et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *New Eng J Med* 2003;348:593-600.
26. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003 Nov 18;108(29):2511-6.

27. Romagnani P, Dimmler S, Marra F, Genuini G, Maggi E, Romagnani S. CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitor. *Circ Res* 2005 Aug 19;97(4):314-22.
28. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;22(3):377-84.
29. Beltrami AP, Cesselli D, Damiani D, Beltrami CA et al. In the adult human heart resides a population of non-blood borne multipotent cardiac progenitor cells. *Circulation* 2004;110(suppl III):239.
30. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003 Sep 19;114(6):763-76.
31. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004 Nov 16(20):3213-20.
32. Papayannopolus T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic/stem cells mobilization. *Blood* 2004;103:1580-1585.
33. Heissing B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002 May 31;109(5):625-37.
34. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999 Apr;5(4):434-8.
35. Orlic et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improve function and survival PNAS 2001;98:10344-49.
36. Sugano Y et al. G-CSF attenuate early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc research* 2005;65:446-456.
37. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeys S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996 Apr 4;380(6573):435-9.
38. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999 Jul 15;18(14):3964-72.

39. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Lo sordo DW, Isner JM, Asashara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex-vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003;107:1322-1328.
40. Hattori K, Heissing B, Wu Y et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002;8:841-849
41. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004 Feb 1;103(3):921-6.
42. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Dimmler S, Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9:1370-1376.
43. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Ferrari R et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiography safety profile. *Heur Heart J* 2005 Sep;26(18):1838-45.
44. Kang H, Kim H, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with G-CSF on left ventricular function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-56.
45. Jorgensen E, Ripa RS, Yonghozong W, Karstup J. In stent neointimal hyperplasia after stem cells mobilization induced by G-CSF in patient with PCI treated acute ST elevation myocardial infarction (STEMMI trial). *Int J Cardiol* 2005 Jul.
46. Hattori K, Dias S, Hackett NR, Lyden D, Tetano M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenesis and hematopoietic stem cells. *J Exp* 2001 May 7;193(9):1005-14.
47. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001 Jun 19;103(24):2885-90.
48. Walter DH, Dimmler S, Zeiher AM. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med* 2004 Nov;4(4):385-93.
49. Mohle R, Bautz F, Rafii S et al. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998;91:4523-4530.
50. Hristov M, Wewbwe C, Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 2004;8:498-508.

51. Hristov M, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood* 2004;104:2761-2766.
52. Gill M, Dia S, Hattori K et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001;88:167-174.
53. Werner N, Kisiol S, Schiegl T, Ahlers P, Talenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
54. Tepper OM, Gailiano RD, Capla JM et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002;106:2781-6.
55. Loosman CJ, Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes* 2004;53:195-9.
56. Ladini GP, Liorin M, Facco M, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1449-57.
57. Simpler D, Shaohua W, Wang MD, Deb A, Holmes D, McGregor C, Frantz R, Sudhir S, Kushwaha MD, Noel M, Calice MD. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy in blood of endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation* 2003;107:143-149.
58. Choi JH, Kim KL, Huh E et al, Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1-9.
59. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castaldi G, Ferrari R. Cd34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004 Sep ;110(10):1209-12.
60. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002 Jun;8(6):607-12.
61. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RE, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000 Oct 27;87(9):728-30.
62. M.Massa, V.Rosti, M.Ferraio, R.Campanelli, I.Ramajoli, R.Rosso, G.M De Ferrari, M.Ferlini, L.Goffredo, A.Bertoletti, C.Clersy, A.Pecci, R.Moratti, L.Gavazzi.

- Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2004.
63. Quaini F, Urbanek K, Feltrami AP, Finato CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002 Jan 3;346(1):5-15.
 64. Adams V, Lenk K, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1-8.
 65. Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal V, Temm CJ, Mahenthiran J. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2314-8.
 66. George J, Goldstein E, Abashidze V, Deutsch V, Shimilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* (2004)25, 1003-1008.
 67. Mintz G, Popma J, Pichard A, Kent K, Salter L, Wong C, Hong M, Kovach J, Leon M. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:35-43.
 68. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-74.
 69. Hoffmann R, Mintz GS, Dussaillant GR et al. Patterns and mechanisms of in-stent restenosis: A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:1247-54.
 70. Costa MA, Sabate M, Kay IP, de eyter PJ, Kozuma K, Serrano P, de Valk V, Albertal M, Lightart JM, Disco C, Foley DP, Serruys PW. Three-dimensional intravascular ultrasonic volumetric quantification of stent recoil and neointimal formation of two new generation tubular stents. *Am J Cardiol* 2000;85:135-139.
 71. Schwarz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *Am J Coll Cardiol* 1992;19:267-274.
 72. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary artery. *Am J Pathol* 1994;144:962-974.
 73. Strauss BH, Robinson R, Batchelor WB, Chisholm RJ, Ravi G, Natarajan MK, Logan RA, Mehta SR, Levy DE, Ezrin AM, Keeley FW. In vivo collagen turnover following experimental balloon angioplasty injury and the role of matrix metalloproteinases. *Circ Res* 1996;79:541-550.

74. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix change in stented human coronary arteries. *Circulation* 2004;110:940-947.
75. Serruys PW, de Jaeger P, Kiemeneij F, et al. For the Benestent Study Group. A coparison of ballon-expandable-stent implantation with ballon angioplasty in patiens with coronary heart desease. *N Engl J Med* 1994;331:489-95.
76. Fenton SH, Fischman DL, Savage MP, et al. Long-term angiographic and clinical outcome after implantation of ballon expandible stents in aortocoronary saphenus vein grafts. *Am J Cardiol* 1994;74:1187-91.
77. Abizaid A, Kornowski R, Mintz GS at al. The influence of diabetes mellitus on acute and late clinical outcome following coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:584-9.
78. Mittal S, Weiss DL, Hirshfeld JW, Kolansky DM, Herrmann HC. Restenotic lesion have a worse outcome after stenting. *Circulation* 1996;94:1-331.
79. Castrati A, Schoming A, Seyfarth M, et al. PI^A polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 1999;97:147-54.
80. Castrati A, Schoming A, Elezi S, wt al. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1428-36.
81. Fernandez-Aviles F, Alonso JJ, Duran JM et al, High pressure increases late loss after coronary stenting. *Am J Coll Cardiol* 1997;29:369A.
82. Hayase M, Oshima A, zidar JP et al. Comparison of ultrasound vs angiographic guidance for stenting in the CRUISE study. *Circulation* 1997;96:1-222.
83. Roger C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995;91:1995-3001.
84. Elezi S, Kastrati A, Neumann FJ, Hadamitzky M, Dirschinger J, Schomig A. Vessel size and long-term outcome after coronary stent placement. *Circulation* 1998;98:1875-80.
85. Castrati A, Elezi S, Dirschinger J, Hadamitzky M, Neumann FJ, Schoming A. Influence of lesion-lenght on restenosis after coronary stent placement. *Am J Cardiol* 1999;83:1617-22.
86. Sirnes PA, Golf S, Myreng Y et al. Stenting in cronic coronary occlusion (SICCO): a randomized, controlled trial of adding stent implantation after succesful angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1444-51.
87. Prati F, Di Mario C, Moussa I et al. In-stent neointimal proliferation correlates with the amount of residua claque burden outside the stent. *Circulation* 1999;99:1011-14.

88. Waksman R, Robinson KA, Croker IR et al. Intracoronary radiation before stent implantation inhibits neointima formation in stented porcine coronary arteries. *Circulation* 1995;92:1383-63.
89. Terstein PS, Massulo V, Jani S, et al. A double-blind randomized trial of catheter-based radioterapy to inhibit restenosis following coronary stenting. *N Eng J Med* 1997;336:1697-703.
90. Terstein PS, Massulo V, Jani S, et al. Two-years follow-up after catheter-based radioterapy to inhibit coronary restenosis. *Circulation* 1999;99:243-7.
91. Costa MA, Sabate M, van der Giessen WJ et al. Late coronary occlusion after intercoronary brachytherapy. *Circulation* 1999;100:789-92.
92. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulator of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:253-262.
93. Sousa JE, Costa MA, Farb A, Abizaid A, Sousa A, Seixas AC, Silva LM, Feres F, Pinto I, Mattos LA, Birmani R. Vascular healing 4 years after the implantation of sirolimus-eluting stent in humans: a histopathological examination. *Circulation* 2004;110:e5-e6.
94. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubam MB, Marks AR. Rapamycin inhibit vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 1996;98:2277-2283.
95. Rowinsky EK, Donehower RC. Paclitaxel (Taxol). *N Eng J Med* 1995;332:1004-10114.
96. Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, Oberhoff M, Herdeg C, Kuttner A, Wild DH, Brehm BR, Reissen R, Koveker G, Karsch KR. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and mitigation in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation* 1997;96:636-645.
97. vaon der Leyen H, Gibbson G, Morishita R, Lewis N, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke J, Dzau V. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Accd Sci U.S.A.* 1995;92:1137-1141.
98. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
99. Baumgartner I, Isner JM,. Somatic gene therapy in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 2001;63:427-448.
100. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Masatsugu K, Beker AE, Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)expression in human coronary atherosclerotic lesion: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998 ;98 ;2108-2116.

101. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:324-328.
102. Ohtani K, Egashira K, Haisa K-I, Zhao Q, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Yonemitsu Y, Sueishi K, Sata M, Shibuya M, Sunagawa K. Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cell. *Circulation* 2004;110:2444-2452.
103. Griese DP, Ehsan A, Melo LG et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic graft: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710-2715.
104. Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Illasaca M, Perrella MA, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004;109:1769-1775.
105. George J, Herz I, Goldstein E, Keren G, et al. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cell in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:e57-e60.
106. Hibbert B, Chen YX, O'Brien ER. c-Kit+ immunopositive vascular progenitor cells populate human coronary in-stent restenosis but not primary atherosclerotic lesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H518-H524, 2004.
107. Skowasch D, Jab A, Andriè R, Dinkelbach S, Ludertiz B, Bauriedel G. Presence of bone-marrow and neural-crest-derived cells in intimal hyperplasia at the time of clinical in-stent restenosis. *Cardiovascular Research* 60 (2003)684-691
108. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Talenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ res* 2003;93:e17-e24.
109. Shirota T, Yasui H, Shimokawa H, Matsuda T. Fabrication of endothelial progenitor cell (EPC)-seeded intravascular stent devices and in vitro endothelialization on hybrid vascular tissue. *Biomaterials* 24(2003)2295-2302.
110. Aoki J, Serreyus PW, van Beusekom E, Ong ATL, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, de Feyter PJ, Davis R, Rowland S, Kutryk MJB. Endothelial progenitor cell capture by stent coated with antibody against CD34. The HEALING-FIM registry. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1574-9.
111. Shoher A, Hoffmann R, Oprèe N, Knarren S, Iofina E, Hutschenreuter G, Hanrath P, Weber C. Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2005;96:1116-1122.
112. Fukada D, Shimada K, Tanaka A, Kawarabayashi T, Yoshijama M, Yoshikawa J. Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:18-23.

113. Kang H, Kim H, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilised with G-CSF on left ventricular function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363:751-56.
114. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001;108:399-405.
115. Walter DH, Ritting K, Bahlmann F et al. Statin therapy accelerates reendothelialization. A novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-3024.
116. Indolfi C, Coppola A, Stabile E, et al. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:214-21.
117. Barnett D, Granger V, Kraan J et al Reduction of intra- and inter-laboratory variation on CD34+ cells identify population of functional endothelial precursor. *Blood* 2000;95:952-958.
118. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I, The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and graft engineering. *J Hematother*.1996 Jun5(3):213-2.
119. Pereira D, Kanaganayagam G, Marber M. Stem cells in unstable angina: the dynamic duo. *Eur Heart J* 2004 Jun;25(12):999-1000.
120. Steinar S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Woltz M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increased the number of endothelial progenitor cell in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005;181:305-310.
121. Yet ET, Zhang S, Wu HD, Korbinger M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003;108:2070-2073.
122. Simpler D, Staboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Calice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002;106:1199-1204.

Variabili	Pazienti tot n. 49	Pazienti in follow-up n. 35
<i>Caratteristiche</i>		
Età (anni)	66±10	66±9
Sesso maschile	33 (69%)	25 (71%)
FE (%)	57±8	58±7
Pregresso IMA	16(33%)	12 (34%)
Pregressa PTCA	14 (29%)	11 (31%)
Pregresso BPAC	3 (6%)	3 (8%)
Multivasali	34 (69%)	35 (100%)
<i>Fattori di rischio</i>		
Ipertensione arteriosa	34 (70%)	26 (74%)
Fumo attivo	8 (16%)	4 (11%)
Familiarità	31 (64%)	21 (60%)
Diabete mellito	10 (20%)	8 (22%)
Dislipidemia	31 (64%)	23 (65%)
<i>Patologia</i>		
Angina stabile	19 (38%)	15 (42%)
Angina instabile	23 (46%)	16 /45%)
IMA non-Q	7 (14%)	4 (11%)

Tabella 1: caratteristiche cliniche di tutta la popolazione analizzata.

FE: frazione d'eiezione; IMA: infarto miocardico acuto; PTCA:

angioplastica coronarica transluminale per cutanea; BPAC: by-pass aorto-coronarico

Variabili	Pz follow-up n. 35	Restenosi sì n. 9	Restenosi no n. 26	P value
<i>Caratteristiche</i>				
Età (anni)	66±9	69±5	65±9	N.S.
Sesso maschile	25(71%)	7 (77%)	18 (69%)	N.S.
FE(%)	58±7	63±5	57±7	N.S.
Pregresso IMA	12 (34%)	3 (33%)	9 (34%)	N.S.
Pregressa PTCA	11 (31%)	3 (33%)	8 (30%)	N.S.
Pregresso BPAC	3 (8%)	2 (22%)	1 (4%)	N.S.
Multivasali	35 (100%)	9 (100%)	26 (100%)	N.S.
<i>Fattori di rischio</i>				
Ipertensione arter	26 (74%)	9 (100%)	17 (65%)	0,04165
Fumo attivo	4 (11%)	1 (11%)	3 (11%)	N.S.
Familiarità	21 (60%)	6 (66%)	15 (57%)	N.S.
Diabete mellito	8 (22%)	2 (22%)	6 (23%)	N.S.
Dislipidemia	23 (65%)	7 (77%)	16 (61%)	N.S.
<i>Patologia</i>				
Angina stabile	15 (42%)	4 (44%)	11 (42%)	N.S.
Angina instabile	16 (45%)	4 (44%)	12 (46%)	N.S.
IMA non-Q	4 (11%)	1 (11%)	3 (11%)	N.S.
Multivasali	35 (100%)	9 (100%)	26 (100%)	N.S.

Tabella 2: caratteristiche cliniche dei pazienti sottoposti a follow-up coronarografico.

P value: pazienti con restenosi vs pazienti senza restenosi; IMA: infarto miocardico acuto; PTCA: angioplastica coronarica transluminale per cutanea; BPAC: by-pass aorto-coronarico; FE: frazione d'eiezione.

Variabili	Pazienti tot n. 35	Restenosi sì n. 9	Restenosi no n. 26	p value
<i>Vaso target</i>				
IVA	13 (37%)	1 (11%)	11 (42%)	0,009
Cx	12 (34%)	4 (44%)	8 (30%)	N.S.
CDx	9 (25%)	4 (44%)	5 (19%)	N.S.
By-pass	1 (2%)	0 (0%)	1 (3%)	
Multivasali	35 (100%)	9 (100%)	26 (100%)	N.S.
Lunghezza lesione	15±12	23±10	14±5	N.S.
Lunghezza stent (mm)	20±6	26±10	18±6	0,0263
Diametro stent (mm)	3±1	3,4±2	2,7±0,2	N.S.
<i>QCA</i>				
RVD (mm)	2,5±0,5	2,3±0,6	2,6±0,5	N.S.
MLD pre (mm)	0,8±0,5	0,7±0,5	2,6±0,5	N.S.
MLD post (mm)	2±0,5	1,8±0,8	2,1±0,4	N.S.
MLD follow-up (mm)	1,6±0,6	0,8±0,4	1,±0,2	<0,0001
Late lumen loss (mm)	0,42±0,5	1±0,7	0,2±0,3	<0,0001
Diametro stenosi (%)	36±23	69±12	25±13	<0,0001

Tabella 3: caratteristiche angiografiche dei pazienti che sono stati sottoposti a follow-up coronarografico.

P value: pazienti con restenosi vs pazienti senza restenosi; IVA: coronaria interventricolare anteriore; Cx: coronaria circonflessa; CDx: coronaria destra; MLD: minimal lumen diameter (minimo diametro luminale); QCA= angiografia coronarica quantitativa; RVD= diametro del vaso di riferimento.

Fig 1A

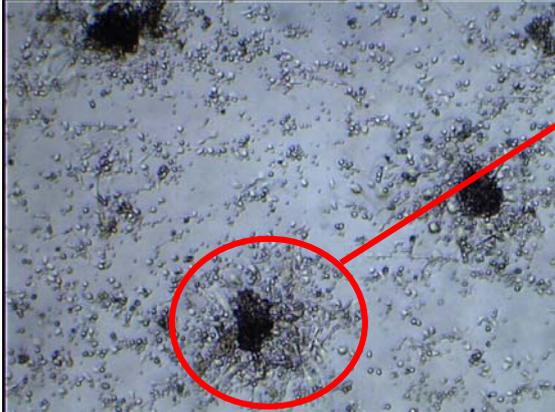


Fig 1B

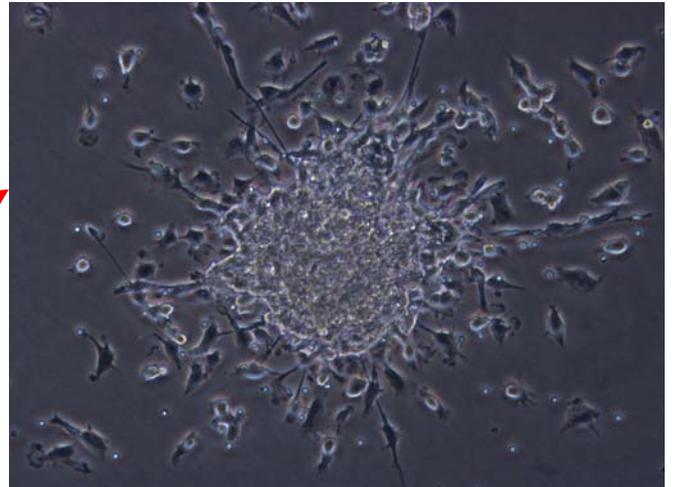


Fig 1C

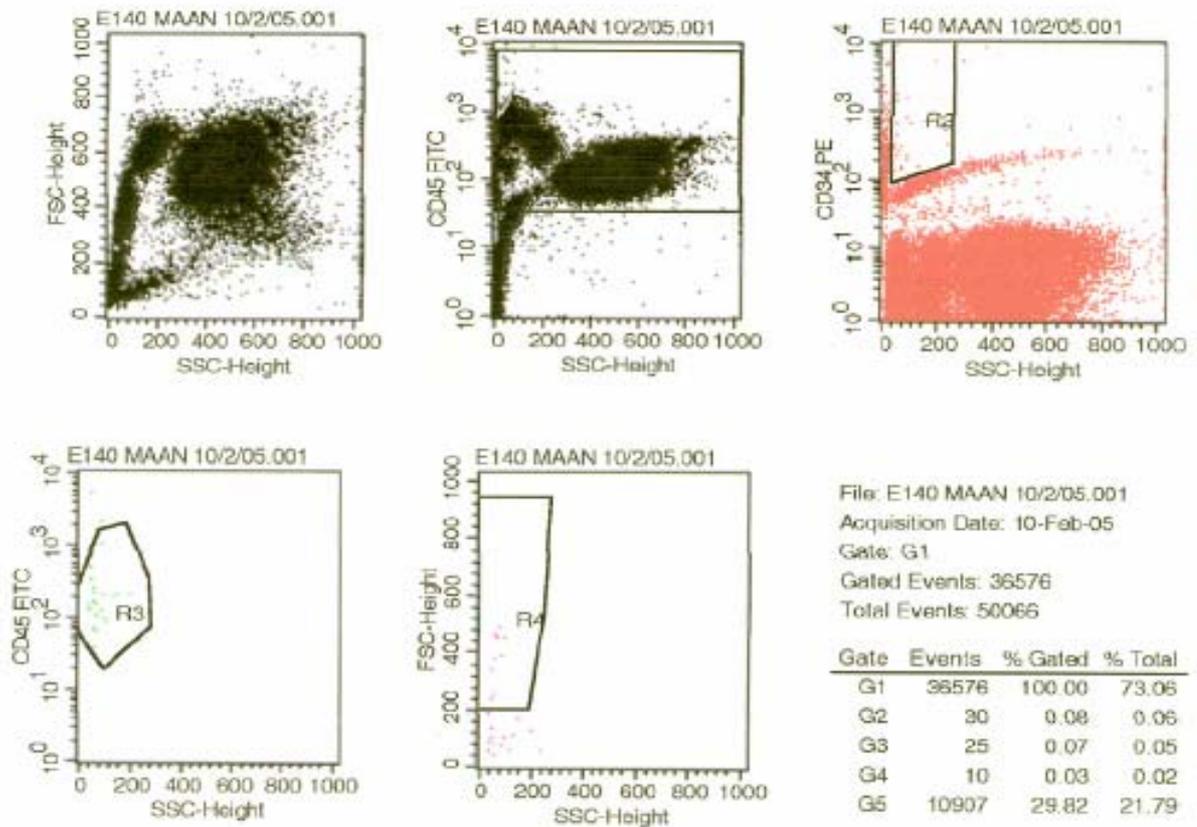


Fig1A. Immagini al microscopio elettronico a contrasto di fase di colonie di EPC. **B.** particolare (x32) di una singola e-CFU, caratterizzata da cellule piatte e sottili che circondano un cluster centrale di cellule rotondeggianti. **C.**Analisi citofluorimetrica delle EPCs. Dopo il gating delle CD34+ come cellule con basso scatter laterale (SSC), le EPC sono state identificate come cellule CD34+ co-esprimenti gli antigeni AC133 e VEGFR-2.

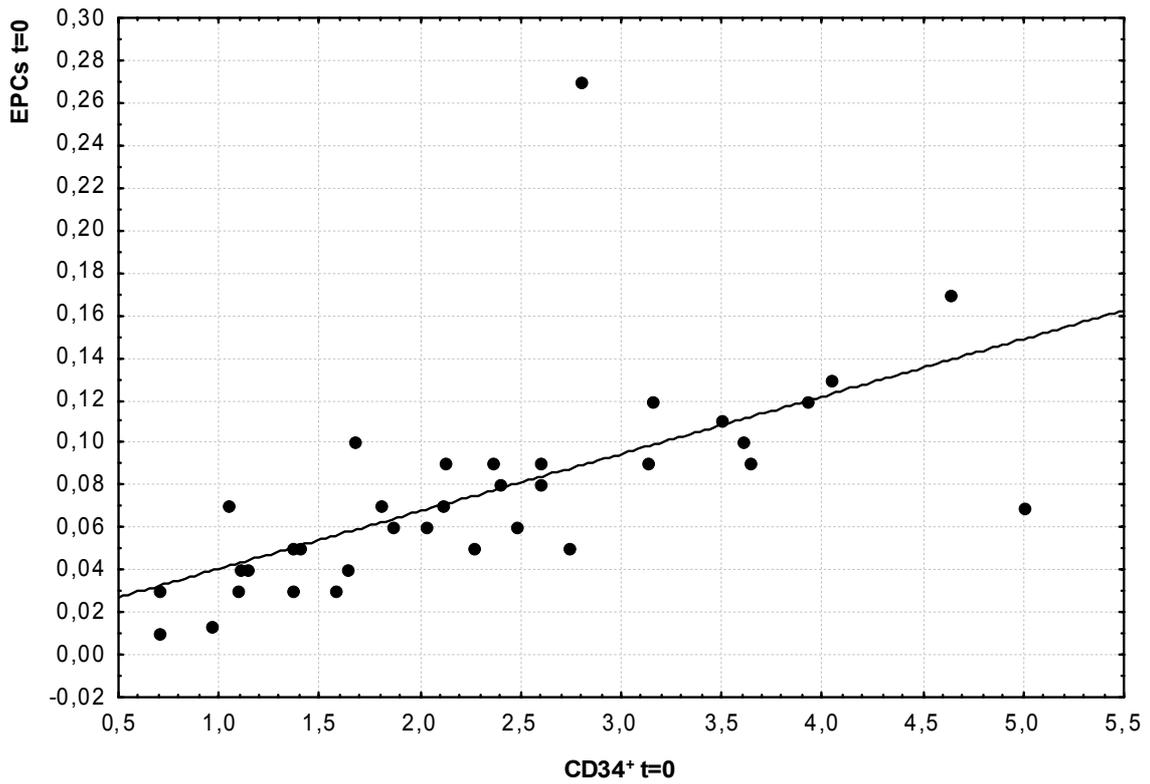


Fig. 2A: Correlazione fra cellule CD34+ ed EPCs valutate mediante triplice marcatura (CD34+ AC133 VEGFR-2) con analisi citofluorimetrica FACS in prima giornata.

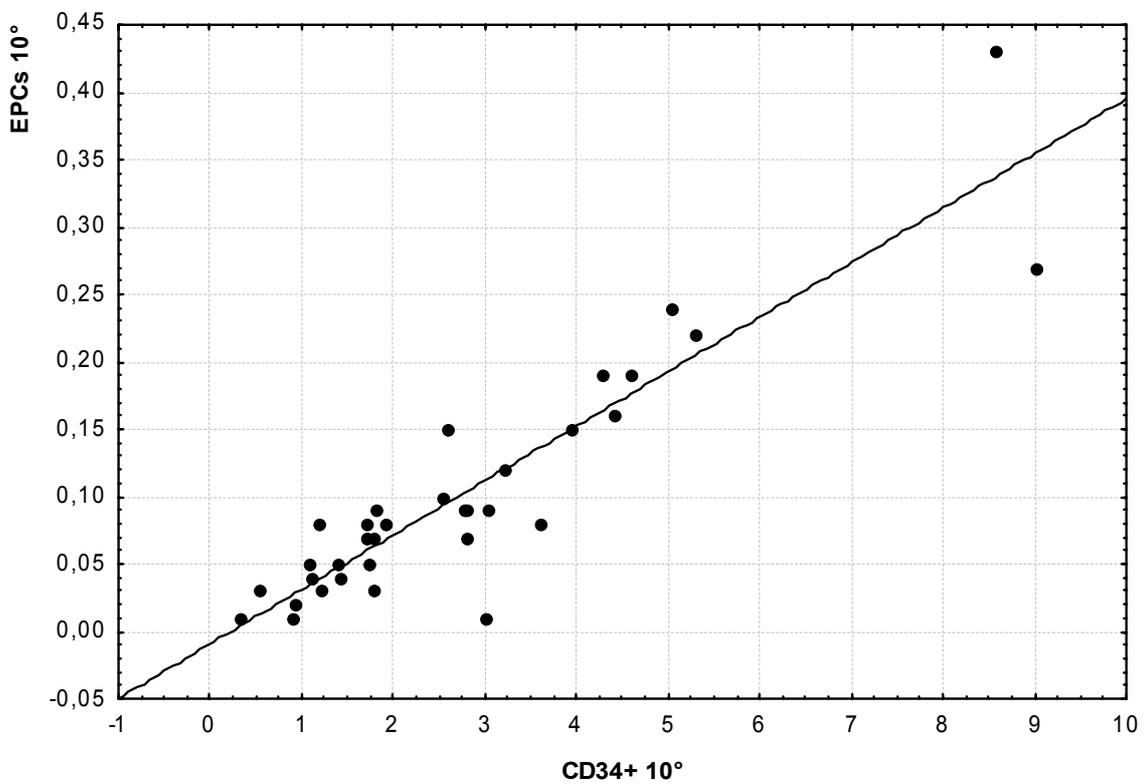


Fig. 2B: correlazione fra CD34+ ed EPCs in 10° giornata (picco).

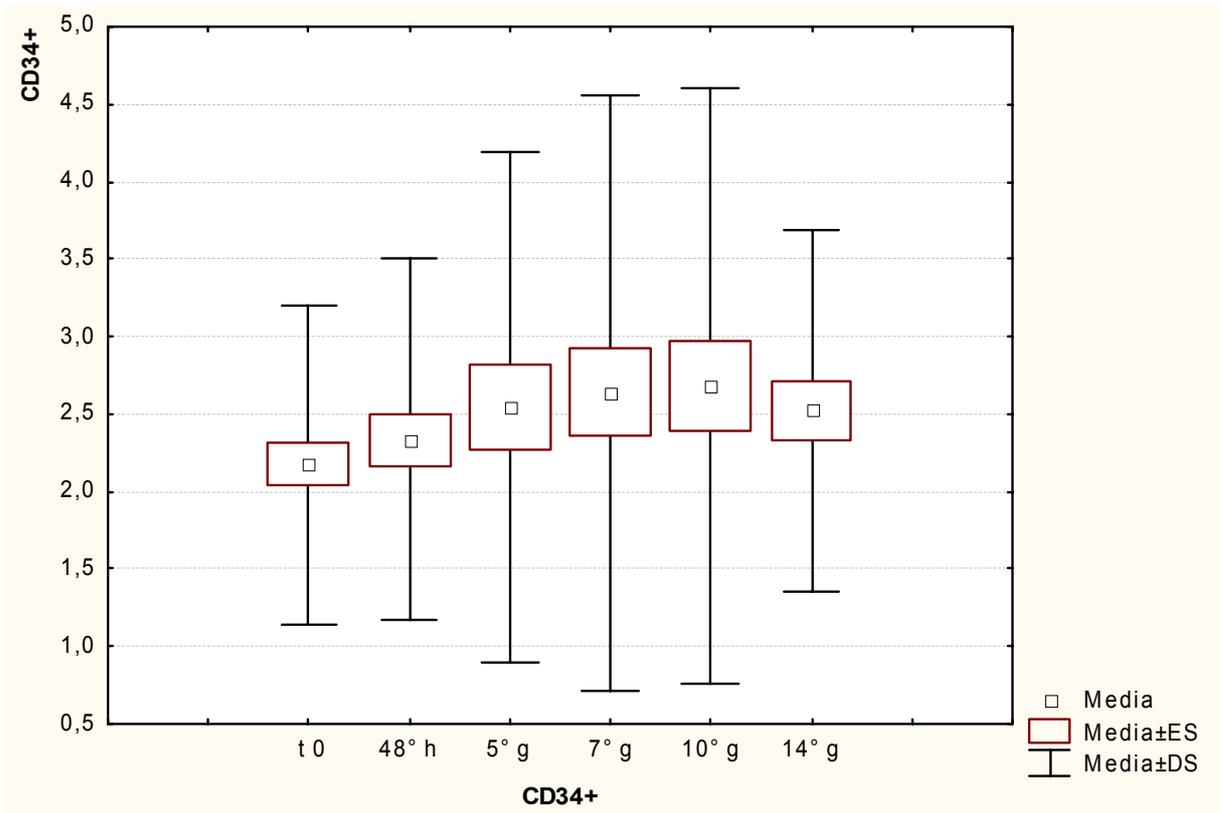


Fig. 3: andamento temporale delle Cd34+ in tutti i pazienti osservati.

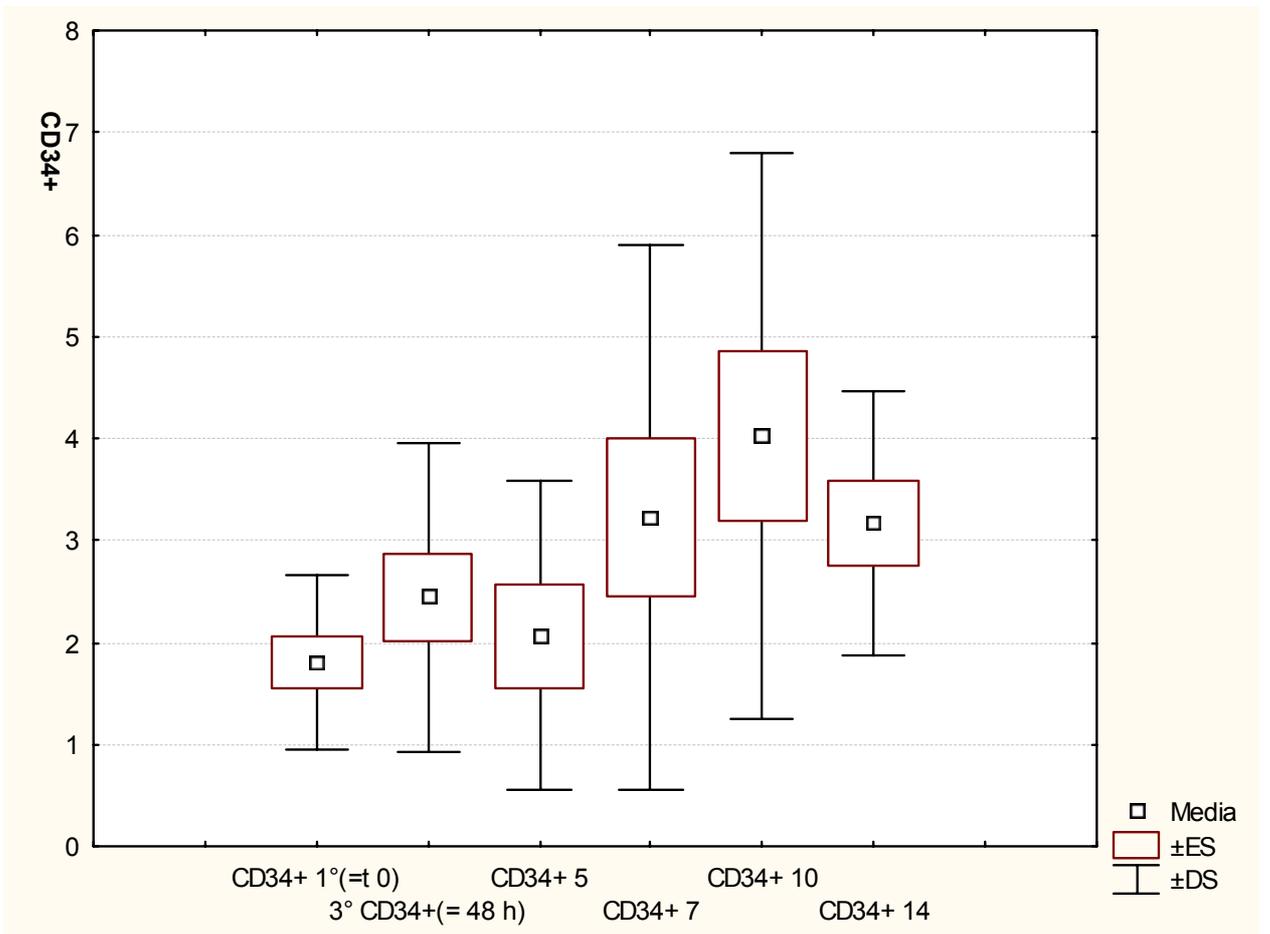


Fig. 4: andamento temporale delle CD34+ solo nei pazienti con CK-MB positivo per necrosi.

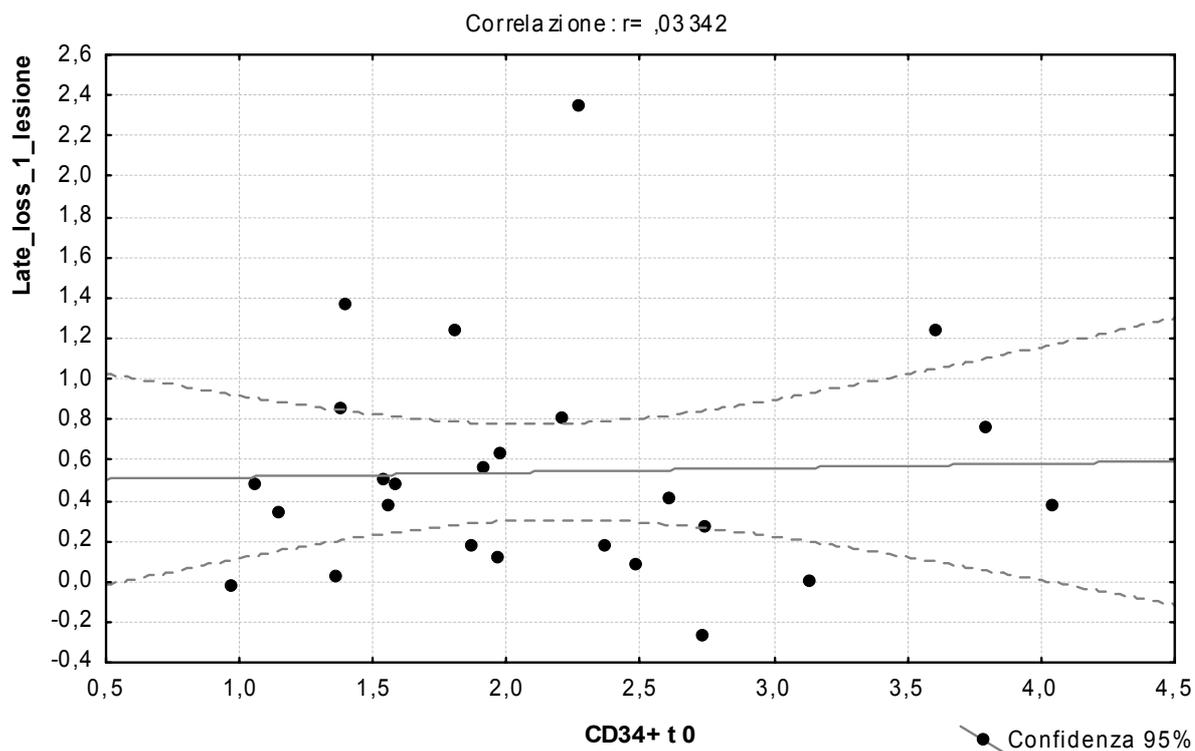


Fig. 5A: Correlazione CD34+ in 1° giornata e *late lumen loss*

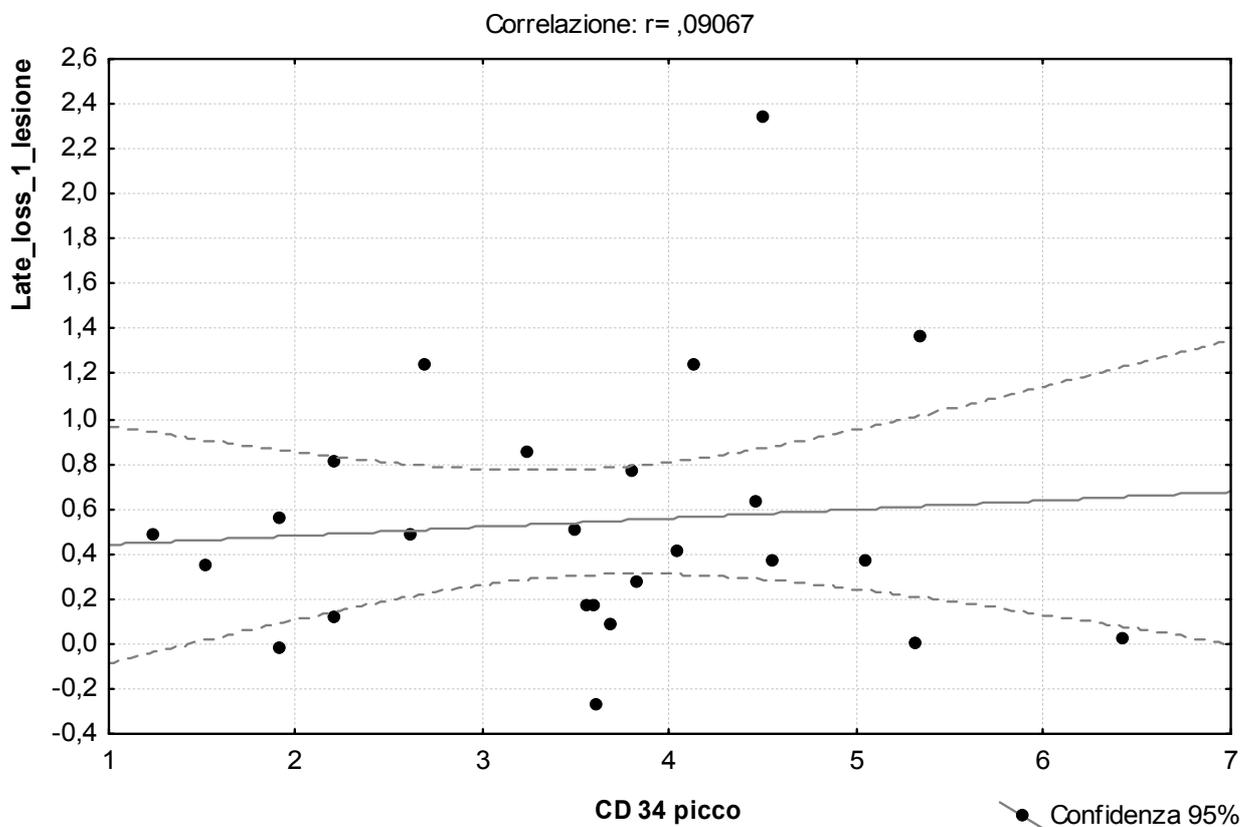


Fig. 5B: Correlazione tra Cd34+ al picco e *late lumen loss*

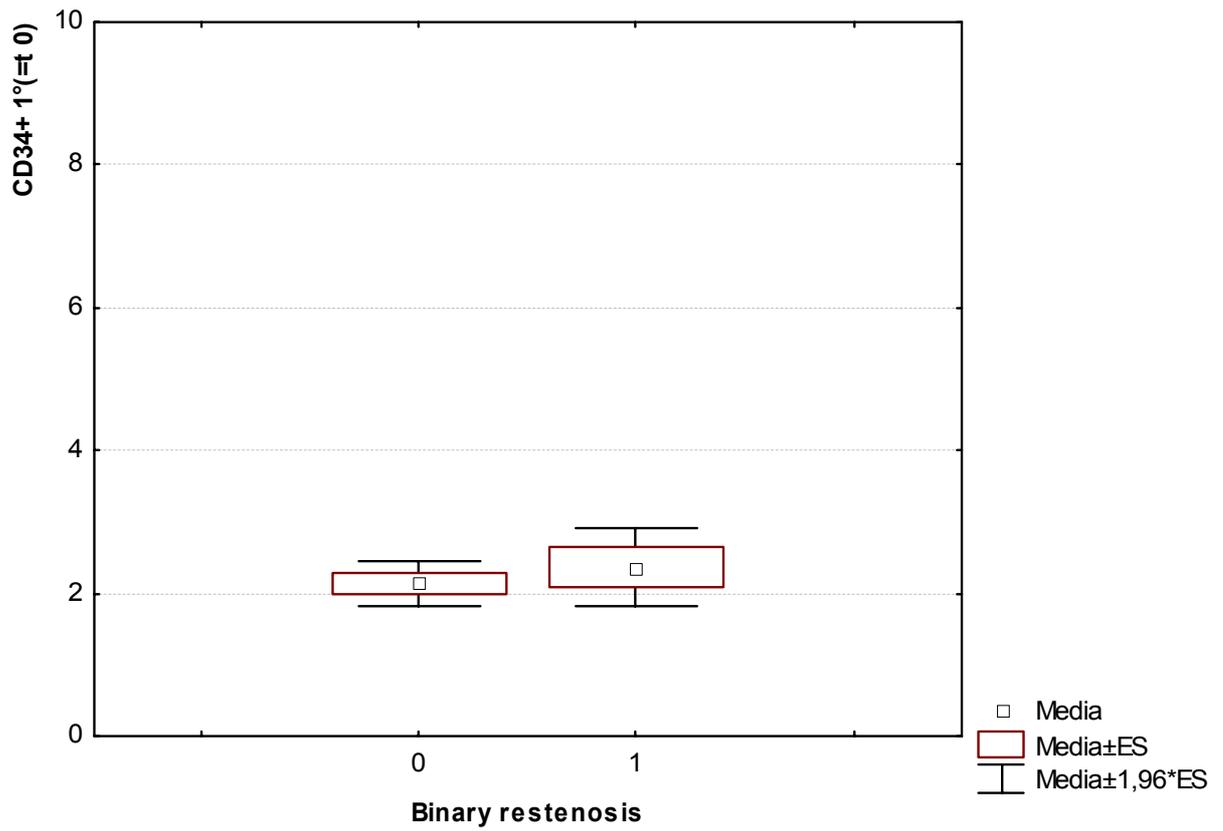


Fig. 6A: associazione tra le CD34+ al tempo zero e la restenosi binaria.

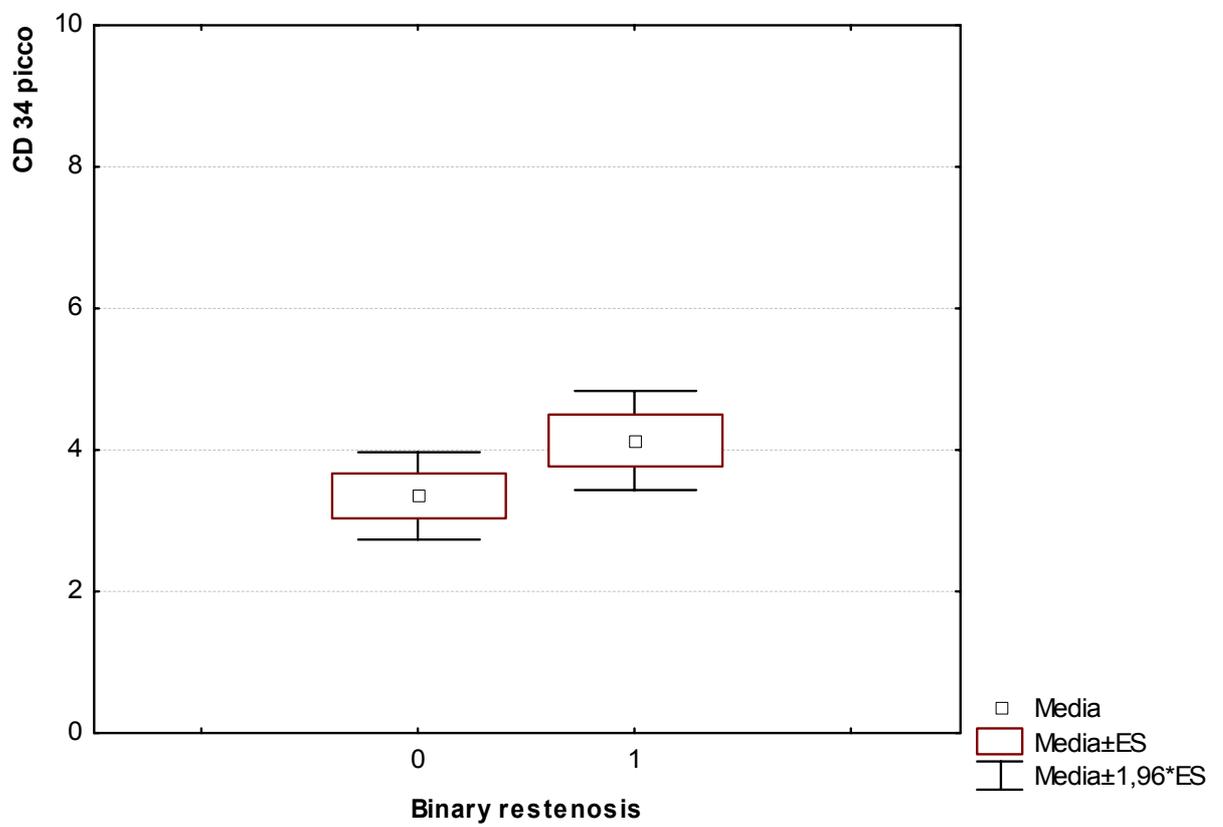


Fig. 6B: associazione tra le Cd34+ al picco e la restenosi binaria.