

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE NEFROLOGICHE ED UROANDROLOGICHE**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D2

Settore Scientifico disciplinare: MED/14

**Progenitori endoteliali nei pazienti con Chronic Kidney Disease
- Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) in fase uremica: effetti
del trattamento con vitamina D.**

Presentata da: Dott. ELENA DELLA BELLA

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Sandro Mattioli

Chiar.mo Prof. Gaetano La Manna

Esame finale anno 2012

INDICE DEI CONTENUTI

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 L'insufficienza renale cronica.....	3
1.2 Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder.....	8
1.2.1 Deficit di vitamina D.....	9
1.2.2 Alterato metabolismo del calcio.....	11
1.2.3 Ritenzione di ioni fosfato.....	12
1.2.4 Iperparatiroidismo secondario.....	13
1.2.5 FGF-23 e Klotho.....	14
1.3 Conseguenze della CKD-MBD.....	15
1.3.1 Malattia dell'osso.....	15
1.3.2 Complicanze cardiovascolari.....	16
1.4 Progenitori di cellule endoteliali.....	18
1.4.1 Coinvolgimento delle EPC nella CKD.....	21
1.4.2 Coinvolgimento delle EPC nella malattia cardiovascolare.....	22
2. SCOPO DELLA TESI.....	25
3. MATERIALI E METODI.....	27
3.1 Pazienti.....	27
3.2 Analisi citofluorimetrica delle EPC da sangue periferico.....	30
3.3 Colture cellulari.....	32
3.4 Immunofluorescenza.....	34
3.5 Colorazione istochimica con Alizarin Red S.....	35
3.6 Test di formazione di capillari su Matrigel.....	36
3.7 Test ELISA.....	36

3.8 Analisi statistica.....	37
4. RISULTATI.....	38
4.1 Pazienti.....	38
4.2 Analisi delle EPC circolanti e analisi multivariata.....	38
4.3 Colture cellulari.....	43
4.4 Immunofluorescenza.....	44
4.5 Test di formazione di capillari su Matrigel.....	45
4.6 Colorazione con Alizarin Red.....	46
4.7 Test ELISA su sovrinatante delle colture cellulari.....	47
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	50
6. BIBLIOGRAFIA.....	58

1. INTRODUZIONE

1.1 L'insufficienza renale cronica

L'insufficienza renale cronica (*Chronic Kidney Disease – CKD*) rappresenta la perdita progressiva e irreversibile della funzionalità renale, sia escretoria che endocrina. La CKD può essere determinata da qualsiasi importante causa di disfunzione renale, come malattie primitive renali (es. glomerulonefriti, nefropatie ereditarie) o altre condizioni patologiche quali diabete mellito e ipertensione, che portano ad un danneggiamento progressivo dell'organo. Quale sia la causa primaria dell'insufficienza, la malattia progredisce con un deficit quantitativo della massa nefronica funzionante fino ad arrivare all'insufficienza terminale (fase uremica). Nonostante non tutte le patologie presentino la stessa velocità di evoluzione, tutte le nefropatie croniche possono esitare in CKD. Nelle fasi avanzate di CKD, se non si dispone di valutazioni precedenti, può essere difficile precisare la diagnosi e in alcuni casi può rimanere ad etiologia sconosciuta. Si stima che in Italia circa il 12% della popolazione soffra di patologie renali e che un individuo adulto su dieci abbia una funzione renale ridotta rispetto alla norma. Negli ultimi dieci anni nel nostro paese si è assistito ad un incremento di circa il 61% dei pazienti in dialisi; secondo i dati presentati dalla Società Italiana di Nefrologia, a livello nazionale il numero dei pazienti dializzati è circa di 50000 e circa 15000 hanno subito il successivo trapianto.

Il rene ha un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo: regola infatti l'equilibrio elettrolitico, l'equilibrio acido-base ed elimina cataboliti tossici come le sostanze azotate, urea e acido urico. È inoltre coinvolto nella regolazione pressoria e ha importanti funzioni endocrine, producendo calcitriolo, eritropoietina, renina e prostaglandine. Con la diminuzione del numero di nefroni funzionanti che si realizza nella CKD, si assiste quindi ad una perdita progressiva di tutte queste funzionalità. Inizialmente si innesca un meccanismo di ipertrofia compensatoria, con aumento del diametro glomerulare e della lunghezza dei tubuli prossimali. Questo

processo permette di mantenere l'omeostasi dell'organismo e la funzionalità degli altri organi, fino a quando la perdita nefronica non sia tale da rendere insufficiente la compensazione messa in atto.

Nella CKD le capacità di concentrazione e di diluizione delle urine si riducono progressivamente con la diminuzione della filtrazione glomerulare. Il bilancio del sodio può essere mantenuto fino a bassi livelli di funzione renale grazie ai meccanismi di compensazione. Quando la funzione del rene scende sotto il 30% si può manifestare un'incapacità a ritenere sodio, mentre nelle fasi più avanzate è l'eliminazione a diventare insufficiente, favorendo l'insorgenza o il peggioramento di complicanze cardiovascolari quali ipertensione e scompenso cardiaco. Il rene ha il compito di mantenere la concentrazione plasmatica di potassio, regolato principalmente dall'aldosterone. Questa capacità può essere mantenuta fino a livelli avanzati di CKD, ma con la progressione dell'insufficienza renale l'iperkaliemia diventa manifesta, soprattutto a causa di eccessiva introduzione con la dieta. La ridotta escrezione di fosfati e il ridotto riassorbimento di bicarbonato provocano uno stato di acidosi metabolica, compensata inizialmente dai meccanismi di ventilazione polmonare e dal tamponamento di protoni da parte dell'osso, fattore che contribuisce allo sviluppo di alterazioni ossee. La ridotta escrezione di fosfati si associa anche ad una diminuita concentrazione ematica di calcio, che porta allo sviluppo di iperparatiroidismo secondario. Si ha una diminuzione dell'escrezione di cataboliti azotati, come urea, creatinina, acido urico e acido guanidinsuccinico che, ad eccezione della sola creatinina, possono avere diversi effetti tossici.

La progressione della malattia allo stadio terminale è detta fase uremica, nel quale si possono riscontrare quindi le seguenti alterazioni:

- ritenzione idrica massiva;
- ipernatriemia (edemi periferici, edema polmonare, ipertensione, scompenso cardiaco congestizio);
- iperkaliemia (aritmie cardiache);

- acidosi metabolica (dispnea, debolezza muscolare, neuropatie periferiche, disturbi del ritmo e della contrattilità cardiaca);
- alterazioni del metabolismo calcio-fosforo, con riduzione della calcemia e iperfosfatemia (iperparatiroidismo secondario);
- deficit nella secrezione degli ormoni renali.

Le alterazioni provocate dall'insufficienza renale possono causare danni severi ad altri organi e apparati.

Effetti significativi si osservano sul sistema cardiovascolare: l'ipertensione è presente in circa l'80% dei pazienti in fase uremica e contribuisce a sua volta all'aggravamento della nefropatia. Lo stato ipertensivo viene indotto principalmente dalla ritenzione di sodio e dall'ipersecrezione di renina. La ritenzione idrosalina contribuisce anche all'insorgenza di scompenso cardiaco, insieme all'ipertensione e alle alterazioni aterosclerotiche. La pericardite, invece, è una manifestazione tipica dell'uremia terminale ed è dovuta principalmente alla presenza di sali di calcio o di cristalli di acido urico tra i foglietti pericardici. Esistono anche diverse alterazioni a livello del sistema emopoietico. È riscontrabile anemia di tipo ipoproliferativo, normocitico e normocromico, dovuta principalmente alla ridotta produzione di eritropoietina a livello renale. Esistono tuttavia altri fattori che possono contribuire all'insorgenza di anemia, rappresentati da ridotta sopravvivenza eritrocitaria per emolisi subclinica dovuta alla presenza delle tossine uremiche; inibizione dell'eritropoiesi da parte dei metaboliti tossici; osteite fibrosa che, riducendo lo spazio midollare, riduce la nicchia eritroide; deficit di ferro e folati da inadeguato apporto con la dieta. Si possono avere anche effetti negativi sui leucociti con riduzione dell'attività fagocitica dei neutrofili, linfopenia e ridotta funzionalità linfocitica.

Le alterazioni ossee, centrali nella progressione della CKD, sono dovute soprattutto alla ridotta produzione di vitamina D attiva e all'iperparatiroidismo secondario. Sono riscontrabili osteite fibrosa, osteomalacia, osteosclerosi e osteoporosi. Un'altra complicanza importante è la presenza di calcificazioni

metastatiche che possono colpire organi, arterie di medio e grosso calibro e zone periarticolari.

La CKD può indurre anche alterazioni gastrointestinali, neurologiche, dell'emostasi e in generale metaboliche, comprendendo alterazioni del metabolismo glucidico, proteidico e lipidico. Sono anche importanti le modificazioni a carico del sistema endocrino, soprattutto a causa dell'aumentata emivita degli ormoni peptidici.

I pazienti con insufficienza renale negli stadi precoci sono solitamente asintomatici; tipicamente, la disfunzione renale viene rivelata da esami di laboratorio di routine. Possono essere presenti dei sintomi aspecifici, malgrado possano già essere aumentati sia i livelli di azoto ureico che la creatininemia. Nicturia e astenia spesso le prime manifestazioni di uremia. Con la progressione della malattia, si possono riscontrare anoressia, nausea, vomito, stomatite, alitosi, ulcere ed emorragie.

Per diagnosticare la CKD, il primo provvedimento è solitamente quello di determinare se l'insufficienza renale è acuta, cronica oppure acuta ma instauratasi su una cronica. La progressione fino all'insufficienza dell'organo è comune quando la concentrazione della creatinina sierica è superiore a 1,5 - 2 mg/dl. Ottenere una diagnosi precisa diviene sempre più difficile man mano che il paziente si avvicina all'insufficienza renale terminale. Lo strumento per la diagnosi definitiva è la biopsia renale, ma non è indicata quando l'ecografia mostra reni piccoli e fibrotici.

Generalmente sono caratteristici l'acidosi di grado moderato (contenuto plasmatico di CO₂: 15-20 mmol/l) e l'anemia. La diuresi non risponde rapidamente a variazioni dell'assunzione di liquidi e l'osmolarità urinaria è solitamente stabile, vicina a quella plasmatica (da 300 a 320 mOsm/kg). I reperti dell'analisi delle urine dipendono dalla natura dell'affezione sottostante, ma nell'insufficienza renale avanzata di qualsiasi origine sono spesso evidenti grandi cilindri (specialmente cerei).

Le complicanze della CKD possono causare riduzioni acute della funzione renale che sono potenzialmente reversibili con la terapia. Gli ACE inibitori, e forse i bloccanti dei recettori dell'angiotensina, diminuiscono il tasso di riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR) nella nefropatia diabetica.

Il trattamento dietetico dovrebbe ricevere un'attenzione meticolosa a mano a mano che la CKD evolve verso la fase terminale. Molti sintomi uremici (fatica, nausea, vomito, crampi, confusione) diminuiscono marcatamente quando il catabolismo proteico e la produzione di urea sono ridotti. Tuttavia, le restrizioni dietetiche possono ridurre l'assunzione di vitamine, così ai pazienti è consigliata l'assunzione di integratori. La correzione dell'ipercolesterolemia può rallentare il tasso di progressione della malattia di base e ridurre il rischio coronarico. L'assunzione di liquidi dovrebbe essere limitata solo nei casi in cui non si riesca a mantenere una concentrazione sierica di sodio da 135 a 145 mmol/l. Talvolta, una disfunzione tubulare renale o una terapia diuretica vigorosa possono rendere necessario un supplemento di potassio. Nell'insufficienza renale precoce, un regime dietetico con apporto di fosforo inferiore a 1 g/die è sufficiente per ritardare l'iperparatiroidismo secondario.

Un'acidosi di grado modesto (pH 7,30-7,35) non richiede terapia, mentre l'acidosi metabolica cronica (pH < 7,3) è trattata con bicarbonato di sodio, la cui dose aumentata gradualmente finché la sintomatologia non regredisce (contenuto di CO₂: circa 20 mmol/l).

Sideremia, capacità ferro legante e ferritina sono tenute sotto stretto controllo.

L'insufficienza cardiaca congestizia, il più delle volte dovuta a ritenzione di sodio e liquidi da parte del rene, risponde alla restrizione di sodio ed ai diuretici. Se la funzionalità del ventricolo sinistro è ridotta, possono essere impiegati gli ACE inibitori. I diuretici sono di solito efficaci anche quando la funzione renale è significativamente ridotta. L'ipertensione moderata o grave dovrebbe essere trattata per evitare il suo effetto deleterio sulla funzione cardiaca e renale.

Quando la terapia convenzionale non è più efficace, è necessario rimpiazzare la funzione renale tramite trattamento sostitutivo artificiale (dialisi) o trapianto

d'organo. Il trattamento di elezione è il trapianto di rene, che permette il ripristino di tutte le funzioni deficitarie nella CKD. Tuttavia, la scarsa disponibilità di organi e le lunghe lista di attesa per trapianto, oltre a condizioni cliniche avverse che possono ostacolare per un certo periodo di tempo l'iter trapiantologico di un paziente, rendono la dialisi un trattamento assolutamente indispensabile.

La dialisi è una tecnica di depurazione dei fluidi corporei, realizzata mediante scambi di acqua e soluti tra il sangue e il liquido di dialisi (una soluzione polisalina) separati da una membrana porosa semipermeabile (filtro dializzatore nell'emodialisi o membrana peritoneale nel caso della dialisi peritoneale). Questa tecnica è in grado di depurare il sangue dalle sostanze tossiche ritenute patologicamente tramite diffusione, mentre per ultrafiltrazione si ha la rimozione dei liquidi in eccesso che non vengono più eliminati con le urine. La dialisi è un trattamento salva-vita, che permette la sopravvivenza del paziente anche per un lungo tempo in attesa di un trapianto. La dialisi sostituisce la funzione escretoria del rene: la funzionalità endocrina, tuttavia, non viene ripristinata e spesso sono necessarie terapie in grado di supplementare, ad esempio, il deficit di eritropoietina e di vitamina D. Vi possono essere diverse complicanze associate al trattamento dialitico, tra cui l'infiammazione cronica dovuta al contatto del sangue con il circuito di dialisi, eventi ipotensivi intradialitici, embolia gassosa, amiloidosi e accumulo di alluminio (contenuto nel liquido dialitico).^{1,2,3}

1.2 Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder

Il termine *Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder* (CKD-MBD) è stato coniato dalla *Kidney Disease Improving Global Outcomes Foundation* (KDIGO) nel 2006 per rimpiazzare il termine osteodistrofia renale, in seguito alle recenti scoperte nella fisiopatologia della CKD. La definizione centra l'attenzione sul profondo legame che esiste tra disfunzione renale e alterazioni del metabolismo minerale e osseo, che si riflette tuttavia anche a livello sistemico.⁴

La CKD-MBD è una sindrome clinica complessa. Si tratta di un disordine sistemico del metabolismo minerale e osseo indotto dalla CKD, che si manifesta in alterazioni del metabolismo minerale e nella formazione di calcificazioni extrascheletriche.⁵ Le anomalie del metabolismo minerale non sono coinvolte solo nell'alterato rimodellamento osseo, ma influiscono direttamente sul sistema cardiovascolare, causando calcificazioni ectopiche a livello dei vasi, ipertensione e ipertrofia ventricolare sinistra nei pazienti affetti da CKD. Inoltre possono anche contribuire alla progressione del danno renale.

Sono diversi i fattori patogenetici che intervengono nella CKD-MBD, tutti strettamente intercorrelati: il deficit di vitamina D, il metabolismo alterato del calcio, la ritenzione di ioni fosfato, un aumento eccessivo nella secrezione di paratormone (PTH), l'aumento dei livelli di *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF-23) e la diminuzione dell'espressione di Klotho.

1.2.1 Deficit di vitamina D

La vitamina D viene sintetizzata a livello cutaneo con l'esposizione solare o assunta con la dieta. Con il termine di vitamina D si indica un gruppo di pro-ormoni che devono subire reazioni di idrossilazione per essere convertiti nella forma biologicamente attiva, il calcitriolo, che ha un ruolo centrale nella regolazione dell'omeostasi del calcio. L'enzima citocromo p450 27B1 (gene CYP27B1), o 25-idrossivitamina D3 1- α -idrossilasi, è presente soprattutto a livello del tubulo prossimale renale ed è deputato alla conversione dell'intermedio calcidiolo in calcitriolo.

La diminuzione dei livelli circolanti di calcitriolo inizia precocemente nell'insufficienza renale, quando la GFR è inferiore a 70 ml/min.⁶ Questa riduzione non è tuttavia riconducibile solamente alla perdita di massa renale, in quanto questa risulta essere ancora limitata nelle fasi precoci della CKD.

Inizialmente, la ridotta escrezione di ioni fosfato gioca un ruolo principale. Infatti, un aumento della fosfatemia stimola la produzione di FGF-23 da parte di osteociti e osteoblasti: questo fattore è in grado di ridurre i livelli di calcitriolo

circolanti attraverso l'inibizione della 1- α idrossilasi; stimola inoltre la degradazione del calcitriolo attraverso la sovrarregolazione dell'enzima 24-idrossilasi (gene CYP24A1).⁷⁻¹⁰

Il calcitriolo regola i livelli di calcio e fosfato circolanti aumentando il loro assorbimento intestinale, promuovendo il riassorbimento di calcio nei tubuli renali e inibendo la secrezione di PTH. Bassi livelli di calcitriolo sono direttamente responsabili della perdita di materiale osseo, a causa di un ridotto reclutamento di osteoblasti.

Il recettore per la vitamina D (VDR) è espresso in diversi tipi cellulari, tra cui osteoblasti, cellule della paratiroide, cuore, vasi e cellule renali.^{5,9} È stato dimostrato che l'asse vitamina D-VDR possa giocare un ruolo nella regolazione di diversi organi, oltre che nel metabolismo minerale.⁹ Studi clinici recenti hanno dimostrato come il trattamento con calcitriolo sia in grado di ridurre la mortalità nei pazienti in emodialisi, sia generale che per cause cardiovascolari. Ne consegue che una ridotta attivazione dei VDR può contribuire alla patogenesi della malattia cardiovascolare nei pazienti con CKD..

La vitamina D agisce sul sistema cardiovascolare sia direttamente che indirettamente. La supplementazione di vitamina D può abbassare la pressione arteriosa, probabilmente tramite il miglioramento dell'ipocalcemia. Un altro meccanismo possibile è il miglioramento dell'iperaldosteronismo iperreninico.

Il deficit di vitamina D è probabilmente coinvolto nella progressione dell'ipertrofia ventricolare sinistra nei pazienti con CKD. La vitamina D è coinvolta in diversi processi biologici fondamentali per il cuore, come la contrazione dei cardiomiociti, la proliferazione, la maturazione, l'espressione proteica e la sintesi di collagene. Una dieta povera di vitamina D può indurre l'aumento nella sintesi di collagene e la loro deposizione nel tessuto cardiaco, causando ipertrofia ventricolare sinistra.

1.2.2 Alterato metabolismo del calcio

Nel corso della progressione della CKD i livelli di calcio diminuiscono gradualmente, principalmente a causa del ridotto assorbimento intestinale secondario al deficit di calcitriolo.⁹

L'ipocalcemia rappresenta lo stimolo principale per la produzione di PTH e per l'insorgenza dell'iperparatiroidismo secondario. Le cellule principali delle paratiroidi esprimono infatti il *Calcium-Sensing Receptor* (CaSR), un recettore di membrana accoppiato a proteine G, che è in grado di rilevare le alterazioni nei livelli plasmatici di calcio in forma ionica. I bassi livelli di calcio impediscono l'attivazione di questo recettore, che a sua volta inibirebbe la sintesi e secrezione di PTH attraverso l'attivazione della via delle *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK).^{5,9}

L'ipocalcemia induce l'aumento nei livelli di PTH circolanti attraverso diversi meccanismi. Una stimolazione delle paratiroidi di breve durata induce l'esocitosi del PTH contenuto nei granuli citoplasmatici. Una stimolazione più lunga induce proliferazione delle cellule deputate alla produzione dell'ormone, a cui seguono alterazioni nei livelli di degradazione intracellulare e la mobilitazione di un pool di riserva secondario.^{9,11}

Con il deficit di calcitriolo sia ha sottoregolazione dei CaSR delle paratiroidi, questo spiega in parte come le paratiroidi non riescano più a rispondere al carico di calcio nelle fasi avanzate di CKD e nell'iperparatiroidismo refrattario.^{9,12}

Oltre all'iperparatiroidismo, le alterazioni nel metabolismo del calcio sono coinvolte in diversi disordini ipertensivi, quali l'ipertensione essenziale e gestazionale. Nella CKD, il deficit di calcio contribuisce a mantenere un'elevata pressione arteriosa. Tuttavia, anche l'ipercalcemia che talora si può verificare rappresenta un fattore di rischio per morbosità e mortalità per cause cardiovascolari.⁵

1.2.3 Ritenzione di ioni fosfato

Uno degli stimoli primari che portano allo sviluppo della CKD-MBD è senza dubbio l'iperfosfatemia. Fisiologicamente, gli ioni fosfato vengono liberamente filtrati dal rene a livello glomerulare e vengono riassorbiti dal tubulo prossimale attraverso l'azione di un cotrasportatore sodio-fosfato (NaPi). Tre sono le famiglie principali di questo cotrasportatore: NaPi di tipo I si ritrova soprattutto nel fegato, nel rene e nel cervello; NaPi di tipo II è presente a livello renale (in cui la cui funzione è principalmente il riassorbimento tubulare degli ioni fosfato), nell'intestino e nei polmoni. I recettori NaPi di tipo III sono invece ubiquitari.^{7,9,13}

Nella CKD, la funzione di filtrazione del rene viene gradualmente compromessa, con un conseguente aumento dei livelli sierici di ioni fosfato. Inizialmente la fosfatemia risulta all'interno dei range di normalità, in quanto l'aumento dei livelli di PTH e di FGF-23 contrasta l'innalzamento dei suoi livelli. Negli stadi avanzati di CKD, tuttavia, questi meccanismi non sono sufficienti ad ostacolare l'iperfosfatemia.^{6,7,9,11}

L'eccesso di fosfato gioca un ruolo essenziale nella patogenesi dell'iperparatiroidismo secondario, in quanto il fosfato stimola direttamente la sintesi di paratormone (PTH), la sua secrezione e la proliferazione delle cellule paratiroidi.¹¹ È stato dimostrato che la ritenzione degli ioni fosfato accelera la progressione della CKD e sia anche implicata nell'insorgenza di alcune sue complicazioni. L'iperfosfatemia, analogamente all'ipocalcemia e ad un elevato prodotto $Ca \times P$, è associata ad elevata morbosità e mortalità cardiovascolare nella popolazione affetta da CKD in fase uremica.¹⁴ L'iperfosfatemia esalta la malattia cardiovascolare tramite la formazione di calcificazioni ectopiche e il rimodellamento cardiovascolare. Il fosfato promuove la trasformazione delle cellule muscolari lisce dei vasi in cellule dal fenotipo osteoblastico. L'aumento di fosfato intracellulare (dovuto all'ingresso tramite il cotrasportatore NaPi di tipo III) stimola il *Core Binding Factor- α 1* (Cbfa-1), che a sua volta induce la produzione di collagene I e altre proteine non collageniche da parte di condrociti

e osteoblasti. L'aumentata espressione di Cbfa-1 probabilmente predispone alla calcificazione della matrice extracellulare delle cellule muscolari lisce per l'eccessivo carico di fosfato e calcio.⁵

1.2.4 Iperparatiroidismo secondario

Nei pazienti con CKD, l'iperparatiroidismo secondario è una delle alterazioni più comuni e importanti del metabolismo minerale. Sono diversi i fattori che contribuiscono ad un'aumentata secrezione di PTH: iperfosforemia, ipocalcemia e produzione ridotta di calcitriolo, sia direttamente che indirettamente, attraverso l'azione di FGF-23. L'attivazione del VDR a livello delle paratiroidi sopprime l'espressione dell'mRNA del pre-pro-PTH. Mancando la segnalazione da parte del VDR, può aumentare ulteriormente la produzione di PTH.⁹

I fattori descritti contribuiscono all'ipertrofia e alla proliferazione delle cellule della paratiroide, esitando in un'iperplasia prima diffusa e poi nodulare.¹² Lo sviluppo di iperplasia nodulare è associata alla sottoregolazione del VDR e del CaSR, ma gli eventi iniziali che portano allo sviluppo di iperplasia sono ancora da chiarire. Solitamente i pazienti con iperplasia nodulare sono refrattari alla terapia: il trattamento con analoghi della vitamina D non solo è inefficace, ma addirittura aumenta il rischio di formazione di calcificazioni vascolari, in quanto aumenta il carico Ca x P.

Alte concentrazioni di PTH rappresentano una delle principali tossine uremiche e sono coinvolte nell'insorgenza di diverse complicanze dell'uremia, come ipertensione, alterazione del metabolismo lipidico, intolleranza glucidica e anemia resistente all'eritropoietina. La paratiroidectomia sembra migliorare queste alterazioni nei pazienti con iperparatiroidismo secondario. Inoltre, il PTH contribuisce al rimodellamento cardiovascolare indipendentemente dalla pressione del sangue.⁵

1.2.5 FGF-23 e Klotho

Recentemente è stato scoperto un nuovo fattore della famiglia di FGF, la cui azione è di fondamentale importanza nella regolazione del metabolismo minerale. FGF-23 è una proteina di 32 kDa espressa principalmente da osteociti e osteoblasti.^{7,9,10,15,16} In qualità di fosfatona, è uno dei principali regolatori dei livelli sierici di fosfato; gli stimoli principali alla sua secrezione sono l'iperfosfatemia e un elevato *intake* di ioni fosfato. FGF-23 ha un'azione fosfaturica, che induce tramite downregolazione ed endocitosi dei co-trasportatori sodio-fosfato a livello renale, necessari per il riassorbimento degli ioni che vengono liberamente filtrati a livello glomerulare. FGF-23 regola inoltre il metabolismo della vitamina D3, inibendo direttamente l'1 α -idrossilasi e stimolando la 24-idrossilasi, con il risultato netto di provocare una marcata diminuzione nei livelli di calcitriolo. Il calo nei livelli di 1,25(OH)D3 a sua volta provoca una riduzione dell'assorbimento intestinale di fosforo.

FGF-23 lega a bassa affinità i recettori classici FGFR. È stato osservato tuttavia che topi con delezione della proteina Klotho (-/-) avevano un fenotipo molto simile ai topi FGF-23 -/-. Ulteriori studi hanno dimostrato che Klotho aumenta l'affinità di FGF-23 per i recettori FGFR1: si tratta dunque di un corecettore fondamentale per la trasduzione del segnale da parte di FGF-23, determinandone anche la specificità tissutale. Una sovraespressione di FGF-23, infatti, non ha effetti fisiologici sul metabolismo minerale in assenza di questo fattore.^{17,18}

Klotho è un putativo gene soppressore dell'invecchiamento. Difetti nell'espressione del gene Klotho nel topo si traducono in un fenotipo simile a quello nelle sindromi da invecchiamento prematuro nell'uomo. La sua sovraespressione provoca invece un aumento della longevità, con effetto superiore rispetto al modello wild type. Nel topo Klotho *null*, la patologia include osteopenia e calcificazioni ectopiche e presenta diverse somiglianze con la CKD-MBD. I fenotipi di Klotho e FGF-23 *null* sono molto simili e coinvolgono un invecchiamento precoce e un metabolismo minerale anomalo.¹⁷⁻

L'espressione di Klotho diminuisce progressivamente nella CKD, mentre aumentano i livelli di FGF-23. Ad accompagnare queste alterazioni ci sono anche l'aumento dei livelli di fosfato e PTH e bassi livelli di calcitriolo. Il declino nei livelli di Klotho è già apprezzabile nella CKD di fase I e precede l'aumento di FGF-23, tant'è che alcuni autori ritengono Klotho il *biomarker* più precoce di CKD e che la CKD rappresenti uno stato di invecchiamento accelerato associato al deficit di Klotho e alla ritenzione di fosfato: secondo questa teoria il deficit di Klotho sarebbe l'evento iniziale che condurrebbe alla disregolazione minerale correlata alla CKD.¹⁷ I meccanismi che portano al deficit di Klotho nelle fasi iniziali della CKD, tuttavia, non sono ancora noti.

1.3 Conseguenze della CKD-MBD

1.3.1 Malattia dell'osso

L'osteodistrofia uremica a basso *turnover* potrebbe rappresentare la patologia ossea iniziale della CKD, ma spesso non viene diagnosticata. Il segno istologico principale di malattia dell'osso adinamica è un netto calo del *turnover* osseo dovuto a un ridotto numero di siti di rimodellamento attivi, la soppressione della formazione di osso e un basso riassorbimento, quest'ultimo tuttavia non diminuito come la formazione. Il risultato è una condizione di scarso rimodellamento osseo che porta a osteopenia e osteoporosi. La maggior parte del tessuto osseo trabecolare è coperta da cellule di rivestimento, con pochi osteoblasti e pochi osteoclasti. La struttura ossea è in prevalenza lamellare e la superficie di mineralizzazione è marcatamente ridotta.

La malattia ossea adinamica è dunque caratterizzata da una minore formazione ossea come risultato di un ridotto reclutamento di osteoblasti e della loro attività e difetti nella mineralizzazione ossea.^{20,21} Questo tipo di anomalia si riscontra principalmente in pazienti con relativamente bassi livelli di PTH (<150 pg/ml) e può essere causato, almeno in parte, dai bassi livelli di calcitriolo.

Dati recenti suggeriscono che la malattia ossea adinamica possa rappresentare un rischio aggiuntivo per l'insorgenza di malattia cardiovascolare, nel caso di un sovraccarico concomitante di alluminio o calcio a causa dell'inabilità dell'osso di tamponare i minerali in eccesso.

La malattia ossea ad alto *turnover* è invece caratterizzata da una velocità elevata di riassorbimento e formazione ossea, che avviene in risposta ad alti livelli di PTH. In questa condizione, sia l'attività degli osteoclasti che quella degli osteoblasti è aumentata e questo tipo di rimodellamento impedisce un'adeguata mineralizzazione dell'osso neoformato. La malattia ossea ad alto *turnover* rappresenta l'anormalità ossea metabolica più frequente nei pazienti con CKD. Nei pazienti pre-dialisi, più del 90% dei soggetti presentano questa forma di coinvolgimento osseo.^{6,12,22-24}

1.3.2 Complicanze cardiovascolari

La malattia cardiovascolare (*Cardiovascular Disease, CVD*) rappresenta la causa più frequente di morbosità e di mortalità nei pazienti affetti da CKD in terapia sostitutiva artificiale. Il rischio di morte per CVD è comunque costantemente presente in tutte le fasi della progressione della CKD, risultando di circa 40 volte superiore nei pazienti con insufficienza renale allo stadio terminale, rispetto alla popolazione generale.⁶

A contribuire all'elevato rischio cardiovascolare dei pazienti con CKD vi sono tanto i fattori tradizionali di Framingham²⁵ (l'età anagrafica, l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito, le dislipidemie, l'obesità, il fumo), quanto i fattori di rischio cardiovascolare correlati all'uremia: l'età dialitica, l'anemia, l'iperomocisteinemia, la disfunzione endoteliale, l'infiammazione cronica e le alterazioni del metabolismo minerale. Queste ultime in particolare, oltre a rappresentare una delle alterazioni di più frequente riscontro nel paziente affetto da CKD, svolgono un ruolo decisivo nella patogenesi delle calcificazioni vascolari sulla scorta di numerosi studi osservazionali e sperimentali. È infatti noto che siano strettamente associate ad eventi cardiovascolari nella popolazione

generale, e anche nella popolazione CKD questa correlazione acquisisce sempre maggiore evidenza.²⁶⁻³¹

Il processo di calcificazione vascolare è caratterizzato da una deposizione di fosfato di calcio, sotto forma di bioapatite, che può verificarsi tanto a livello dei vasi quanto delle valvole cardiache. Le calcificazioni della parete vascolare nei pazienti con CKD si differenziano da quelle della popolazione generale perché interessano non solo la tunica intima, in associazione con le placche aterosclerotiche, ma anche e tipicamente la tunica media dei vasi. I pazienti con CKD non hanno mediamente un maggior numero di placche aterosclerotiche rispetto alla popolazione generale, piuttosto sembra ci siano delle differenze qualitative nella loro composizione. Infatti i pazienti in emodialisi presentano uno spessore maggiore della tunica media delle coronarie, un numero maggiore di placche calcificate e una calcificazione più severa rispetto a soggetti non affetti da CKD.

La calcificazione intima e mediale è strettamente associata a una ridotta *compliance* vascolare, che induce un aumento nello stress del miocardio, nel consumo di ossigeno e una ridotta perfusione coronarica. Questo può causare ipertrofia ventricolare sinistra, fibrosi miocardica e insufficienza cardiaca. Lo sviluppo di ipertrofia ventricolare può essere causato anche da fattori addizionali, tra cui l'iperparatiroidismo. Numerosi studi sperimentali hanno sufficientemente chiarito che questo processo di calcificazione extrascheletrica ha una doppia patogenesi. Infatti, se da un lato il calcio ed il fosfato possono precipitare passivamente in sede ectopica, dall'altro in questo fenomeno sono attivamente coinvolte proteine osteogeniche. Alcune di queste hanno una funzione inibitoria (matrix Gla protein, fetuina, osteoprotegerina, osteopontina), altre una funzione promotrice (osteocalcina, BMP2a, fosfatasi alcalina) rispetto al processo di calcificazione e contribuiscono alla trasformazione osteoblastica di popolazioni cellulari quali le cellule muscolari lisce ed in generale di numerose cellule di derivazione mesenchimale. Diversi studi sperimentali hanno mostrato come il fosfato sia in grado di indurre calcificazione diffusa di cellule

muscolari lisce della tonaca media della parete vascolare attraverso l'attivazione del Cbfa-1, un fattore di trascrizione in grado di regolare la trasformazione osteoblastica delle cellule. La patogenesi della calcificazione vascolare è comunque un processo finemente modulato da numerosi mediatori cui concorrono, oltre al fosfato, altri fattori del metabolismo minerale quali il calcio ed il PTH.³²⁻³⁵

Il trattamento con agonisti del recettore della vitamina D (VDRA) sembra avere un effetto cardioprotettivo in quanto in grado di modulare molti dei processi che interessano i tessuti cardiovascolari. Questo aspetto protettivo è dovuto all'espressione del VDR sia su cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) che su cellule endoteliali.

1.4 Progenitori di cellule endoteliali

Negli ultimi anni è stata progressivamente modificata la visione dell'endotelio da tessuto inattivo a struttura altamente dinamica, capace di partecipare alla regolazione della vasocostrizione, alla coagulazione, alla proliferazione delle VSMC e alla rigenerazione vascolare. Si riteneva, inoltre, che il differenziamento delle cellule mesodermiche in angioblasti e successivamente in cellule endoteliali fosse un processo possibile solo durante lo sviluppo embrionale. Questo dogma è stato messo in discussione da Asahara e colleghi, i quali hanno dimostrato che progenitori emopoietici CD34⁺ da donatori adulti possono differenziare *ex vivo* verso un *lineage* endoteliale.³⁶ Successivamente anche altri lavori hanno dimostrato l'esistenza di progenitori endoteliali circolanti,³⁷⁻⁴⁰ che sono in grado di mantenere l'omeostasi dell'endotelio e possono indurre vasculogenesi anche nell'adulto. Queste cellule sono state denominate *Endothelial Progenitor Cells* (EPC) e sono definite come cellule positive per CD34 e KDR; successivamente è stato dimostrato che anche cellule circolanti CD133⁺ possono differenziare in senso angiogenico, per cui anche questo marcatore è stato incluso come marker identificativo per le EPC. L'utilizzo del marcatore CD133 permette di distinguere stadi maturativi diversi

delle EPC, poiché tale antigene è espresso in una fase precoce del differenziamento e viene perso in fase tardiva, mentre il CD34 e il KDR permangono durante tutto il processo di maturazione.³⁸ Oltre agli antigeni appena descritti, sono stati utilizzati altri antigeni specifici (CD31, E-selectina, Flk-1) come marcatori di cellule endoteliali e marcatori di origine monocitaria (CD14) che suggeriscono come le EPC costituiscano una popolazione eterogenea di cellule circolanti nel sangue a vari stadi di maturazione, ciascuna con un diverso potenziale di differenziazione in cellule endoteliali mature. Indipendentemente dal grado di maturazione e dal fenotipo, tutte le EPC hanno la capacità di essere reclutate nei siti di danno per mantenere l'integrità vascolare.

I progenitori di cellule endoteliali sono cellule derivanti dal midollo osseo che possono essere identificate nel sangue periferico e nel sangue cordonale e sono state isolate per la prima volta da Asahara tramite un metodo immunomagnetico.³⁶ Come già accennato, diversi studi hanno mostrato come il termine EPC non si riferisca a un singolo tipo cellulare, ma a diverse popolazioni che sono in grado di differenziare verso il *lineage* endoteliale. Sono almeno tre le popolazioni cellulari che possono essere definite EPC. La prima popolazione ha come precursore l'emangioblasto e le cellule esprimono CD34, KDR e CD133 sulla superficie cellulare. Il CD133 è una glicoproteina transmembrana di 120 kDa, espressa dalle EPC ma non dalle cellule endoteliali mature.³⁸ Le EPC e l'angioblasto embrionale condividono caratteristiche simili, in quanto entrambi derivano dal precursore emangioblasto e possono migrare verso la periferia dove sono in grado di proliferare e differenziare in cellule endoteliali mature.

Un'altra popolazione di EPC ha come precursore le cellule progenitrici multipotenti del midollo osseo (*multipotent adult progenitor cells* – MAPC). Anche le MAPC esprimono CD133 e KDR, ma non esprimono CD34 o VCAM. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che le MAPC possono differenziare in

cellule endoteliali mature, se cresciute in un terreno privo di siero, ma con aggiunta del VEGF.

Infine, anche le cellule mielo/monocitiche possono differenziare in EPC. Queste cellule esprimono CD14 e differenziano in cellule endoteliali positive per vWF, KDR e CD45.

Indipendentemente dalla loro origine, le EPC hanno la capacità di incorporare le LDL acetilate e legano la *Ulex europaeus agglutinin 1*.

In sintesi, tre gruppi di progenitori sono in grado di differenziare, *in vivo*, in cellule endoteliali mature: gli emangioblasti, le MAPC e le cellule mielo/monocitiche. Sono state invece definite due popolazioni di EPC *in vitro*: le EPC *early*, di derivazione monocitaria con espressione di CD45, CD14, CD11b/c e le EPC *late*, che non esprimono CD45 o CD14. Le EPC *early*, dette anche *endothelial cell-like cells*, sono di morfologia fusiforme e appaiono in coltura dopo 4-21 giorni dall'isolamento, hanno un basso potenziale proliferativo e non producono strutture capillariformi *in vitro*. Queste cellule differenziano *in vivo* in macrofagi ma non formano vasi. Tuttavia hanno un importante ruolo paracrino, sono infatti in grado di secernere fattori pro-angiogenici. Per questo motivo, non sono considerate vere EPC, anche se rivestono un ruolo molto importante del processo di angiogenesi e neovascolarizzazione. Le EPC *late*, anche dette *endothelial outgrowth cells*, originano da cellule CD45-CD34⁺ e non esprimono marcatori emopoietici, mentre sono caratterizzate dalla positività per CD31, CD34, CD105, CD146, VE-caderina e KDR. Sono cellule dalla morfologia poligonale e appaiono dopo almeno 7 giorni di coltura, hanno un alto potenziale proliferativo e possono formare strutture capillariformi sia *in vitro* che *in vivo*.⁴¹⁻⁴⁵

Il numero di cellule circolanti e la funzionalità delle EPC risultano alterati in diverse patologie, quali ipertensione essenziale, preeclampsia, sindrome metabolica, nefropatie e diabete di tipo I e di tipo II. Anche la presenza di fattori di rischio cardiovascolare è associata a una disregolazione delle EPC, come il fumo e l'invecchiamento.⁴⁶ La disfunzione dei progenitori endoteliali sembra

essere dovuto in parte a una ridotta capacità migratoria in risposta al fattore SDF-1 (dovuto in parte agli effetti negativi dei fattori di rischio cardiovascolari), a una funzionalità angiogenetica compromessa e a un'induzione di senescenza cellulare precoce. Nel diabete, vi è una minore attivazione della ossido nitrico sintasi endoteliale (*endothelial nitric oxide synthase* – eNOS), altro fattore che contribuisce al minore reclutamento in circolo delle EPC.⁴⁶

1.4.1 Coinvolgimento delle EPC nella CKD

La CKD è caratterizzata da un numero ridotto di EPC circolanti e da una diminuzione nella formazione delle colonie.^{41,47,48} Il numero di EPC circolanti nel paziente affetto da CKD può essere inferiore del 30% rispetto al soggetto sano.⁴⁶ Le EPC dei pazienti affetti da CKD presentano anche alterazioni di funzionalità migratoria, di adesione e incorporazione. La migrazione viene valutata dall'abilità di queste cellule di migrare verso un gradiente di SDF-1, potente agente chemotattico; l'adesione è l'abilità delle cellule a formare un monostrato (con anche cellule endoteliali mature); l'incorporazione è la capacità di organizzarsi in strutture capillariformi. Dal punto di vista del rischio cardiovascolare, l'alterazione della funzionalità potrebbe essere più importante che il loro numero assoluto.

Questi difetti nei progenitori endoteliali sembrano instaurarsi precocemente nel corso della malattia. Alcuni studi riportano come un numero ridotto e una funzionalità aberrante di cellule CD34⁺ circolanti si riscontrino anche nella CKD di fase I, con un peggioramento con la progressione a stadi più avanzati.^{47,48}

La maggior parte degli studi sui pazienti in emodialisi hanno riscontrato riduzione del numero e alterata funzionalità delle EPC. Tuttavia, sia la dialisi che il trapianto di rene sembrano avere un effetto positivo, ma non normalizzante, sulle EPC.

Nonostante sia chiaro che la funzionalità dei progenitori endoteliali sia compromessa nella CKD, i meccanismi patogenetici sono ancora da chiarire. La riduzione del numero delle EPC potrebbe essere dovuta a un'inefficace

mobilizzazione dal midollo osseo, da una sopravvivenza ridotta o da una ipoproliferazione (meccanismi simili a quelli dell'insorgenza di anemia). Uno dei fattori più importanti per la mobilizzazione delle EPC è la eNOS, che tuttavia è fortemente inibita dalla dimetilarginina asimmetrica, che si accumula nei pazienti con CKD. Un deficit di attività di eNOS è riscontrabile anche in pazienti diabetici, una delle cause principali di CKD. Livelli elevati di dimetilarginina asimmetrica sono associati con bassi livelli di EPC e con l'inibizione, *in vitro*, della loro proliferazione, mobilizzazione, incorporazione in strutture capillariformi e formazione di colonie.⁴²

Un altro meccanismo plausibile che spiega la disfunzione delle EPC è l'infiammazione, che può indurre senescenza ed apoptosi attraverso l'aumento dello stress ossidativo e la diminuzione dell'attività telomerasica. Infine, alcune delle tossine uremiche (es. omocisteina, p-cresolo, PTH) possono inibire il differenziamento delle EPC.⁴⁸

1.4.2 Coinvolgimento delle EPC nella malattia cardiovascolare

In passato si riteneva che l'endotelio danneggiato fosse riparato dalla migrazione e dalla proliferazione delle cellule endoteliali circostanti verso il sito della lesione. Recentemente, è stato proposto che le EPC contribuiscano attivamente al riparo endoteliale, andando a sostituire le cellule endoteliali mature che, a causa della presenza di fattori di rischio cardiovascolare, sono soggette ad apoptosi. Nonostante sia da chiarire quale sia il contributo delle EPC nel processo di rigenerazione endoteliale, non vi è alcun dubbio che le arterie danneggiate o denudate siano almeno parzialmente colonizzata da precursori endoteliali di derivazione midollare o del sangue periferico, sia nell'uomo che nei modelli animali.⁴³ È stato dimostrato che le EPC riescono a ricoprire protesi vascolari in Dacron nei cani e, nei pazienti, la superficie di impianti ventricolari o parti nude di arterie dopo danno da angioplastica.^{37,49} È stato suggerito che le EPC possano agire come effettori paracrini, attraverso il rilascio di citochine

proangiogeniche che promuovono migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali circostanti.⁴³

È ora anche chiaro che le EPC non partecipano solo al riparo del danno endoteliale, ma possono contribuire attivamente alla patogenesi delle malattie vascolari. Le EPC circolanti possono contribuire alla progressione dell'aterosclerosi, come è stato dimostrato dai modelli animali e dall'aterosclerosi post-trapianto.^{50,51}

Nei volontari sani, senza malattia cardiovascolare nota, esiste una correlazione inversa tra il numero delle EPC nel sangue periferico e il rischio cardiovascolare cumulativo. I livelli di EPC circolanti sono risultati essere dei predittori migliori di reattività vascolare rispetto allo score di rischio di Framingham. In presenza di aterosclerosi manifesta, vi è evidenza che sia i livelli che la bioattività delle EPC siano compromesse. La diminuzione dei livelli di cellule CD34⁺KDR⁺ circolanti, addirittura dopo l'aggiustamento per i fattori di rischio cardiovascolari tradizionali, è stata correlata in modo indipendente alla progressione della malattia aterosclerotica, e predice una più alta incidenza di eventi cardiovascolari e morte. Tuttavia, la correlazione tra le EPC e la malattia coronarica deve essere meglio approfondita.⁵²⁻⁵⁴

Sono stati osservati l'abbassamento dei livelli e l'alterazione della funzione delle EPC *early* nei pazienti con coronaropatia rispetto ai soggetti sani, e il numero di EPC si correla inversamente con fattori di rischio noti. In particolare, la conta delle colonie di EPC formatesi *in vitro* è un forte predittore indipendente (oltre l'età del paziente) di coronaropatia multivasale. Inoltre, l'aumento del numero di cellule CD34⁺KDR⁺, in pazienti con coronaropatia documentata da angiografia, è stato associato ad un minor rischio di morte per cause cardiovascolari, di un primo evento cardiovascolare maggiore, rivascolarizzazione e ospedalizzazione. Alcuni studi, invece, hanno riscontrato un aumento dei livelli di EPC nell'infarto acuto del miocardio e nell'angina cronica. Questo è probabilmente dovuto ad un reclutamento in circolo delle EPC per il riparo dei vasi danneggiati. Infine, altri stati patologici correlati ad aterosclerosi, quali ictus, insufficienza renale cronica

e disfunzione erettile sono stati associati a una marcata diminuzione del numero di EPC circolanti e di colonie.⁴³

Infine, è stato dimostrato che nei pazienti con aterosclerosi coronarica iniziale o avanzata vi è un aumento significativo della percentuale di cellule CD34+/KDR+ e CD34+/CD133+/KDR+ che esprimono osteocalcina (OC).⁵⁵

OC è una proteina la cui produzione dipende dalla vitamina K e può costituire fino al 3% delle proteine dell'osso. OC si trova soltanto nel tessuto osseo e nei tessuti mineralizzati ed è prodotta dagli osteoblasti. Si ritiene intervenga nel processo di mineralizzazione, probabilmente sotto l'influenza degli ormoni regolatori del metabolismo del calcio: calcitonina, ormone paratiroideo e vitamina D. Proprio per questi motivi, OC risulta essere un importante marcatore di calcificazione.

Date queste considerazioni, è possibile che le EPC possano promuovere la calcificazione vascolare come tentativo di avviare un'attività di riparazione del vaso: nello stesso lavoro è stata anche dimostrata l'espressione, da parte di cellule CD34⁺, di geni correlati al metabolismo osseo, quali BMP-2, Notch, β -catenina, a livelli compatibili con quelli delle cellule staminali mesenchimali, che sono autentici precursori osteoblastici.

2. SCOPO DELLA TESI

La CKD è associata ad un rischio cardiovascolare più elevato rispetto alla popolazione generale, tant'è che un paziente affetto da CKD in fase iniziale ha una probabilità maggiore di morire per cause cardiovascolari che di raggiungere il momento in cui un trattamento sostitutivo diventa necessario. Questo rischio aumentato non è spiegabile sulla base dei soli parametri tradizionali di Framingham²⁵, ma esistono fattori specifici legati all'insufficienza renale che incidono fortemente sulla morbosità e mortalità per cause cardiovascolari nel paziente uremico. Questi fattori sono rappresentati da uremia, stress ossidativo, età dialitica, anemia, iperomocisteinemia, disfunzione endoteliale, infiammazione cronica, alterazioni del metabolismo minerale e presenza di calcificazioni vascolari. In particolar modo, la presenza di calcificazioni ectopiche nel ramo vascolare rappresenta uno dei fattori più influenti nel determinare questo rischio aumentato.

Sono diversi gli studi che hanno verificato il coinvolgimento dei progenitori endoteliali nella malattia aterosclerotica ed è stata anche dimostrata l'espressione di osteocalcina, marcatore di calcificazione e ossificazione, da parte di questa popolazione cellulare.^{37,43,49-55} Inoltre, nella CKD è presente una disfunzione delle EPC, sia nel numero che nel loro fenotipo e funzionalità.^{45,48} Attualmente, il ruolo delle EPC nella formazione delle calcificazioni vascolari nei pazienti in dialisi non è stato ancora chiarito. Lo scopo della presente tesi è dunque quello di studiare le EPC prelevate da pazienti con CKD in trattamento sostitutivo dialitico, al fine di determinarne numero e fenotipo. In particolare, è stato verificato il possibile fenotipo pro-calcifico delle EPC. È stato inoltre valutato l'effetto del trattamento *in vitro* e *in vivo* con calcitriolo e paracalcitolo sulle EPC, considerando che molti pazienti in dialisi sono in trattamento con analoghi della vitamina D (VDRA) e che questo sembra avere effetti positivi anche sul sistema cardiovascolare. La citofluorimetria è stata impiegata per valutare il numero delle EPC presenti nel sangue periferico dei soggetti coinvolti nello

studio e la relativa espressione di OC e di VDR. I risultati così ottenuti sono stati messi in correlazione con i parametri demografici, clinici e biochimici (test di routine e test ELISA per valutare i livelli di fattori coinvolti nel metabolismo minerale); l'analisi statistica multivariata ha permesso di determinare quali parametri siano in relazione al numero di EPC circolanti e all'espressione di VDR e OC. Le colture cellulari sono state invece impiegate per analizzare la morfologia e il fenotipo cellulare delle EPC e per valutare gli effetti del trattamento con i VDRA *in vitro*. A tal proposito, sono state effettuate analisi in immunofluorescenza per valutare l'espressione di OC; colorazioni istochimiche con Alizarin Red S per la valutazione della presenza di depositi di calcio; test ELISA sul sovranatante delle colture cellulari per la valutazione di possibili fattori secreti dalle cellule e coinvolti nei processi di calcificazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Sono stati reclutati 82 pazienti caucasici in trattamento emodialitico da almeno sei mesi. Di questi, 24 ricevevano 15 µg/settimana di paracalcitolo per via endovenosa, 30 pazienti con 1.75 µg/settimana di calcitriolo orale, mentre 28 pazienti non ricevevano alcuna terapia con agonisti del recettore della vitamina D (VDRA). La terapia con VDRA è stata scelta in base dai valori basali di PTH: i pazienti con livelli di PTH inferiori a 150 pg/ml non venivano trattati, coloro che mostravano valori fino a 500 pg/ml ricevevano calcitriolo orale, mentre i pazienti con valori di PTH sopra i 500 pg/ml seguivano una terapia a base di paracalcitolo per via endovenosa. I pazienti effettuavano lo stesso regime di terapia da almeno sei mesi prima dell'inclusione. Trenta soggetti sani sono stati arruolati come gruppo di controllo. I criteri di inclusione comprendevano: età superiore ai 18 anni, stabilità clinica per almeno tre mesi prima dell'ingresso nello studio e una fistola arterovenosa funzionante come accesso vascolare. I seguenti criteri di esclusione sono stati adottati: infezioni attive, eventi cardiovascolari recenti (nei sei mesi precedenti l'arruolamento), neoplasie, sanguinamento attivo, fratture ossee durante gli ultimi 12 mesi, malattia di Paget, terapia con bifosfonati, dislipidemia, terapia con statine, ipertensione, terapia con ACE inibitori o antagonisti del recettore dell'angiotensina II, terapia con calciomimetici. I pazienti erano sottoposti a trattamento emodialitico standard tre volte alla settimana, con l'utilizzo di una membrana di polisulfone. Il parametro Kt/V, che misura la clearance frazionata dell'urea come indice dell'efficacia del trattamento dialitico, era pari a $1,3 \pm 0,3$, mentre la diuresi era inferiore ai 200 ml/die. Un bolo singolo di eparina a basso peso molecolare (Fragmin®, dalteparin sodium, Pfizer, Italy) pari a 100 IU/kg massa corporea è stato somministrato all'inizio della sessione di emodialisi come anticoagulante standard. La concentrazione di calcio nel dialisato era pari a 1,5 mM. L'eventuale terapia per il trattamento dell'iperparatiroidismo secondario al

momento dell'inclusione è stato mantenuto stabile durante il corso dello studio. La tabella 1 descrive il trattamento per l'iperparatiroidismo.

Tabella 1. Descrizione della terapia per il trattamento dell'iperparatiroidismo dei pazienti coinvolti nello studio.

Tipo di trattamento	Pazienti, numero (%)
paracalcitolo IV + sevelamer + calcio carbonato	18 (22,0)
paracalcitolo IV + lantanio carbonato + calcio carbonato	6 (7,3)
calcitriolo orale	7 (8,5)
calcio carbonato + calcitriolo orale	8 (9,8)
calcitriolo orale + sevelamer + calcio carbonato	15 (18,3)
sevelamer	15 (18,3)
sevelamer + calcio carbonato	6 (7,3)
lantanio carbonato + calcio carbonato	4 (4,9)
calcio carbonato	3 (3,7)

La tabella 2 descrive invece i parametri demografici, clinici e biochimici dei pazienti al momento dell'inclusione. L'età dialitica media era di $33,3 \pm 40,3$ mesi; il 29,3% dei pazienti era diabetico (diabete mellito di tipo 2), HbA1c era mediamente $6,5 \pm 1,2\%$. Il siero ed il plasma dei soggetti partecipanti allo studio sono stati prelevati prima dell'inizio della sessione dialitica. Sono stati valutati i livelli di proteina C-reattiva, calcio, fosfato, albumina, protidemia, fosfatasi alcalina, glicemia, profilo lipidico, fibrinogeno, emoglobina, ematocrito, 25(OH)D e 1,25(OH)D tramite metodiche di routine. Il PTH è stato quantificato utilizzando un metodo elettrochemiluminescente (Elecsys intact PTH; Roche, Milan, Italy). I livelli totali di omocisteina sono stati determinati tramite HPLC. I livelli di circolanti di fetuina A, VEGF, OPN, OC e FGF23 sono stati determinati utilizzando test ELISA commerciali, secondo le istruzioni fornite dal produttore (Human Fetuin-A Elisa Kit, BioVendor, Heidelberg, Germany; Human VEGF Immunoassay Quantikine R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Human Osteopontin TiterZyme EIA kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit for Osteocalcin, Usen Life Science, Wuhan, China; Human Intact FGF-23 ELISA kit, Immutopics, San Clemente, CA, USA). Dal momento che i livelli di 25(OH)D cambiano con

l'esposizione solare, è stata valutata la media di almeno sei misurazioni nel periodo di un anno. Per tutti gli altri parametri (eccetto per i test ELISA), è stata utilizzata la media di quattro diverse determinazioni negli ultimi sei mesi. I pazienti sono stati sottoposti a *Multislice Spiral Computed Tomography* (MSCT) per valutare il grado di calcificazioni coronariche. La valutazione è stata effettuata con lo strumento Somatom Sensation 16 Cardiac (Siemens, Forchheim, Germany), mentre il valore di *calcium score* di ogni paziente è stato determinato usando un software specifico (Syngo Ca-score; Siemens) in accordo con il sistema di Agatston.⁵⁶

Tabella 2. Tabella riassuntiva dei dati demografici, clinici e biochimici della popolazione in esame. Le variabili categoriche sono presentate come valori assoluti, mentre per le variabili continue sono state riportate la media e la relativa deviazione standard.

	Soggetti sani (n=30)	Pazienti non trattati (n=28)	Pazienti trattati con calcitriolo (n=30)	Pazienti trattati con paracalcitolo (n=24)
Sesso, M/F	18/12	19/11	19/13	16/8
Età, anni	53.5 ± 15.6	55.8 ± 13.8	61.4 ± 14.1	57.2 ± 14.9
BMI, kg/m ²	23.5 ± 4.6	24.9 ± 3.4	25.6 ± 4.6	26.5 ± 6.6
Età dialitica, mesi	/	38.4 ± 29.0	34.2 ± 33.2	32.9 ± 36.9
Diabete, con/senza	0/30	9/28	9/30	6/24
<i>Calcium score</i> , unità di Agatston	/	1010 ± 1727	1434 ± 1855	828 ± 1414
Pressione arteriosa, mmHg	96.7 ± 8.5	110.1 ± 15.4	104.4 ± 11.2	103.9 ± 10.4
Proteina C-reattiva, mg/dL	0.27 ± 0.48	0.47 ± 0.70	0.65 ± 0.55	0.57 ± 0.60
PTH, pg/mL	36.3 ± 48.9	218.1 ± 140.7	207.9 ± 121.5	442.1 ± 464.3
Ca, mg/dL	9.48 ± 0.65	8.49 ± 0.44	8.94 ± 0.53	9.21 ± 0.77
P, mg/dL	3.64 ± 0.24	5.32 ± 1.41	4.94 ± 1.33	5.58 ± 1.52
Albumina, g/dL	4.90 ± 0.70	4.07 ± 0.39	4.22 ± 0.40	4.30 ± 0.43
Protidemia, g/dL	7.04 ± 0.47	6.79 ± 0.66	7.16 ± 0.65	7.41 ± 0.60
Fosfatasi alcalina, IU/L	89.3 ± 45.9	198.1 ± 82.3	211.5 ± 65.2	277.7 ± 72.8
Glicemia, g/L	92.0 ± 21.5	117.9 ± 53.6	106.3 ± 29.5	102.7 ± 43.9
Colesterolo totale, mg/dL	191.1 ± 45.3	169.4 ± 36.4	171.8 ± 32.7	167.5 ± 37.7
Colesterolo LDL, mg/dL	98.9 ± 42.1	81.6 ± 26.2	94.6 ± 27.3	85.6 ± 36.6
Colesterolo HDL, mg/dL	52.8 ± 19.7	39.9 ± 12.4	38.5 ± 12.2	33.9 ± 13.0
Trigliceridi, mg/dL	171.6 ± 24.9	181.0 ± 77.8	197.3 ± 97.4	227.1 ± 87.6
Fibrinogeno, mg/dL	241.6 ± 154.2	418.6 ± 101.8	408.6 ± 115.0	471.6 ± 115.2
Omocisteina, µM	10.4 ± 6.1	27.4 ± 14.9	31.8 ± 23.0	28.0 ± 15.8
Emoglobina, g/dL	13.9 ± 1.5	10.9 ± 1.4	11.1 ± 1.4	11.3 ± 1.2
25(OH)D, ng/mL	35.2 ± 10.6	18.1 ± 9.2	16.0 ± 6.1	16.8 ± 6.9
Fetuin-A, g/L	37.8 ± 8.1	35.4 ± 10.0	34.8 ± 8.7	35.9 ± 6.4
VEGF, pg/mL	43.3 ± 41.2	67.2 ± 26.9	65.9 ± 32.9	73.6 ± 31.4
Osteopontina, ng/mL	52.5 ± 13.6	296.1 ± 162.7	228.8 ± 83.1	361.1 ± 161.9
Osteocalcina, ng/mL	12.3 ± 9.4	139.6 ± 63.1	137.8 ± 68.8	267.5 ± 188.1
FGF23, pg/mL	Non rilevabile	301.5 ± 242.7	300.0 ± 235.5	483.3 ± 256.8

3.2 Analisi citofluorimetrica delle EPC da sangue periferico

L'analisi citofluorimetrica è stata utilizzata per definire e determinare le conte relative delle cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁺KDR⁺ e CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ e per valutare la percentuale di cellule positive per VDR e OC e la loro intensità media di fluorescenza.

Circa 25 ml di sangue periferico sono stati prelevati dai pazienti e dai soggetti sani in provette Vacutainer contenenti EDTA. I campioni dei pazienti dializzati sono stati prelevati prima dell'inizio dell'emodialisi per escludere ogni possibile influenza della dialisi sulle cellule. Dopo una diluizione del sangue con tampone fosfato salino (PBS) 1:1, le cellule mononucleate del sangue (PBMC) sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità in Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Dopo due lavaggi con PBS/EDTA 0,5 mM, è stata effettuata la selezione per le cellule CD34⁺ tramite un metodo immunomagnetico (CD34 Multisort kit, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). In breve, le cellule sono state concentrate in 300 µl di volume in PBS/EDTA/FCS 0,5% (Buffer). Sono stati aggiunti 100 µl di FcR blocking reagent, al fine di saturare possibili recettori per il frammento cristallizzabile degli anticorpi ed limitare i falsi positivi. 100 µl di biglie anti-CD34 sono stati poi aggiunti alla sospensione e le cellule sono state incubate per 30 minuti a 4°C. Dopo l'incubazione, la frazione positiva è stata trattenuta su una colonnina magnetica ed eluita in 2,5 ml di Buffer.

Metà del campione è stata utilizzata per la marcatura con anticorpo anti-VDR, mentre l'altra metà è stata impiegata per l'analisi dell'espressione di OC. Per il VDR, un antigene nucleare, è stata effettuata la fissazione e la permeabilizzazione delle cellule, utilizzando Inside Stain Kit (Miltenyi Biotech). Per ogni campione, 10 µl di anticorpo primario mouse anti human VDR IgG1 (AbCAM, Cambridge, UK) sono stati diluiti in 90 µl di buffer. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario per 10 minuti a temperatura ambiente, a cui è seguita la marcatura con l'anticorpo secondario (rat anti-mouse IgG1 FITC, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). In questo caso, 4 µl di

anticorpo secondario per ogni campione erano diluiti con 96 μ l di buffer. L'incubazione ha avuto una durata di 10 minuti a temperatura ambiente, al riparo dalla luce.

Per la marcatura delle cellule con OC, non sono stati necessari i passaggi di fissazione e permeabilizzazione, in quanto si voleva valutare l'espressione di OC a livello della superficie cellulare. 10 μ l di anticorpo anti-OC (R&D Systems) sono stati diluiti in 90 μ l di buffer. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario per 30 minuti a 4°C, a cui è seguita la marcatura con anticorpo secondario rat anti-mouse IgG1 FITC (BD Biosciences): 2 μ l di anticorpo secondario erano diluiti in 98 μ l di buffer. Similmente alla procedura per il VDR, l'incubazione con secondario è stata di 10 minuti a temperatura ambiente e al buio.

Terminata la procedura di marcatura per VDR o OC, sono state effettuate le marcature di superficie per l'identificazione delle EPC. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: 10 μ l di CD34-PerCP Cy5.5 (BD Biosciences), 5 μ l di CD45-PE-Cy7 (BD Biosciences), 10 μ l di CD133-APC (Miltenyi Biotech) e 6,6 μ l di KDR-PE (R&D Systems). Gli anticorpi sono stati aggiunti a 100 μ l della sospensione cellulare e incubati per 30 minuti a 4°C.

Cellule marcate con controlli isotipici o con il solo anticorpo secondario sono state usate come controlli negativi di fluorescenza.

Sono state acquisite almeno 2×10^4 cellule utilizzando un citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipaggiato di laser con emissione a 488 e 635 nm. L'analisi dei dati è stata effettuata tramite il software dedicato, CellQuest (Becton Dickinson).

I *dot plot* che rappresentano *side scatter* vs. fluorescenza dei controlli isotipici sono stati utilizzati per identificare i livelli di fluorescenza di fondo per ogni anticorpo.

Il numero di EPC è stato definito come il numero di eventi positivi per CD34 e KDR e negativi per CD45, con un basso *side scatter*. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule CD45⁻CD133^{+/+}KDR⁺ fra le cellule CD34⁺

per la quantificazione delle EPC. La percentuale di EPC esprimenti VDR o OC è stata poi calcolata e, per valutare il livello di espressione dei due antigeni nei diversi gruppi di pazienti, sono stati presi in considerazione i parametri di intensità di fluorescenza media sia di VDR che di OC (VDR-MFI e OC-MFI, rispettivamente).

3.3 Colture cellulari

I campioni di un sottogruppo di pazienti della popolazione in esame, scelti casualmente, sono stati impiegati per l'allestimento di colture cellulari di progenitori endoteliali. Sono stati seguiti due protocolli differenti, uno per l'isolamento delle EPC *early* per il saggio di formazione delle colonie, uno per l'isolamento delle EPC *late* e la caratterizzazione fenotipica delle EPC.

Sono stati prelevati circa 20 ml di sangue periferico in provette Vacutainer contenenti EDTA. È stata prestata particolarmente attenzione a utilizzare provette da una nuova confezione, al fine di evitare possibili contaminazione dal tappo della provetta.

Dopo una diluizione del sangue 1:1 in PBS, le PBMC sono state isolate tramite centrifugazione su gradiente di densità utilizzando Ficoll Paque PLUS. Dopo due lavaggi in PBS/FCS 2%, le cellule sono state colorate con metilvioioletto e contate su camera Neubauer. 5×10^6 cellule sono state poi seminate in piastre da 6 pozzetti, a cui precedentemente è stato applicato un *coating* di fibronectina. Le colture così allestite sono state mantenute in incubatore a 37°C, 5% CO₂, in terreno CFU-Hill Liquid Medium Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), con l'aggiunta di una miscela di penicillina e streptomicina all'1%. Nelle colture è stata inoltre mantenuta una concentrazione finale di cloruro di calcio 1.5 mM (concentrazione fisiologica di calcio), mentre è stata verificata una concentrazione di fosfato inferiore a 1.4 mM.

Il protocollo per l'isolamento delle EPC *early* prevedeva due giorni di coltura, seguiti dal trasferimento del sovrinatante contenente le cellule in una piastra da 24-pozzetti trattata con fibronectina, alla densità di 10^6 cellule/pozzetto. Questo

passaggio serve ad eliminare le cellule che aderiscono velocemente al supporto, come cellule endoteliali mature e monociti. Dopo tre ulteriori giorni di coltura, è stata osservata la formazione delle colonie, il cui numero è in correlazione con la quantità di progenitori circolanti. L'osservazione e la conta delle colonie sono state effettuate con un microscopio ottico rovesciato.

Il secondo protocollo, per l'isolamento delle EPC *late*, prevedeva il mantenimento in coltura delle cellule per 5 giorni prima di effettuare un cambio con terreno fresco. Le cellule sono state mantenute in coltura per almeno 21 giorni per ottenere un buon isolamento e un numero di cellule sufficienti alle analisi successive.

Per l'analisi degli effetti di calcitriolo e paracalcitolo *in vitro* sulle colture cellulari, sono state allestite colture di EPC *late*. Al primo cambio terreno (5 giorni dall'isolamento) sono stati aggiunti calcitriolo (Calcijex 1 µg, Abbott Laboratories. Abbott Park, IL, USA) e paracalcitolo (Zemplar 5 µg, Abbott Laboratories) alla concentrazione finale di 50 pg/ml e 500 pg/ml (pari a circa 0.1 nM e 1 nM). La concentrazione di 50 pg/ml è all'interno del range di normalità per i valori plasmatici di 1,25(OH)D. Inizialmente è stata anche testata una concentrazione superiore (5 ng/ml, pari a circa 10 nM), ma è risultata subito tossica per la formazione di cristalli in coltura, assomiglianti per morfologia a cristalli di ossalato di calcio. Al fine di mantenere stabile la concentrazione dei farmaci nel terreno di coltura, è stato effettuato un cambio terreno ogni 2 giorni. Le cellule sono state mantenute in coltura per 21 giorni, poi è stata effettuata l'analisi per la deposizione di calcio tramite colorazione con Alizarin Red S; sono state inoltre valutate le alterazioni di espressione di OC nei diversi gruppi di pazienti e di trattamento *in vitro*, tramite immunofluorescenza.

Per l'immunofluorescenza, le cellule sono state fatte crescere su vetrini coprioggetto (anche questi con *coating* di fibronectina) del diametro di 12 mm all'interno di piastre da 24 pozzetti. In questo caso, la procedura di isolamento è simile, con la differenza che le cellule vengono piastrate a una densità di 10^6

cellule per pozzetto, mantenendo in tal modo la stessa densità di semina rispetto alle piastre da 6 pozzetti.

3.4 Immunofluorescenza

L'analisi in immunofluorescenza dell'espressione di OC è stata effettuata al fine di valutare il potenziale osteogenico delle EPC in coltura e di verificare l'effetto *in vitro* dei VDRA. In questo caso è stata analizzata l'espressione a livello intracellulare di OC.

I vetrini sono stati prelevati dai pozzetti e lavati con 500 µl di PBS. Le cellule sono state prima fissate in 200 µl di paraformaldeide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 2% per 10 minuti; successivamente sono state permeabilizzate con 200 µl di Triton X100 (Sigma Aldrich) per 10 minuti a temperatura ambiente. I potenziali siti di legame aspecifico sono stati saturati con una soluzione di PBS/BSA 4% (Sigma Aldrich) a temperatura ambiente per 30 minuti.

Per la procedura, sono stati impiegati gli stessi anticorpi utilizzati per la citofluorimetria. Per ogni vetrino da marcare, sono stati utilizzati 10 µl di anticorpo primario anti-OC (R&D Systems), diluiti in 140 µl di PBS/BSA 0.1%. Le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario per 3 ore a 37°C. Dopo sei lavaggi in PBS/Tween 20 0.25%, è stata effettuata la marcatura con l'anticorpo secondario rat anti mouse IgG1 FITC (10 µl di anticorpo diluiti in 140 µl di PBS/BSA 0.1% per vetrino), per 1 ora a 37°C, al buio. Sono stati effettuati ulteriori lavaggi prima di effettuare la colorazione dei nuclei con 150 µl/vetrino di DAPI alla concentrazione di 0,1 µg/ml. Infine, i vetrini sono stati montati su portaoggetto con Antifade Mounting Medium (Sigma Aldrich) e lasciati asciugare *overnight*. I vetrini sono stati analizzati tramite un microscopio a fluorescenza Axiostar Plus Microscope (Carl Zeiss, Oberkachen, Germany), equipaggiato di una lampada a vapori di mercurio HBO 50/AC (Carl Zeiss) e una telecamera Camera Control DS-U1/USB (Nikon Corporation, Tokio, Japan). Il software per l'acquisizione e l'analisi di immagine utilizzato è ACT/2U (Nikon Corporation).

3.5 Colorazione istochimica con Alizarin Red S

Le colture di EPC sono state analizzate con lo scopo di valutare la deposizione di calcio nella matrice extracellulare e l'effetto dei VDRA.

Per la colorazione con Alizarin Red S è stato seguito il protocollo descritto da Kawazoe.⁵⁷ Dopo aver scartato il sovrinatante, le cellule sono state lavate con PBS per eliminare eventuali residui di terreno. Le cellule sono state poi fissate con 500 μ l di formalina neutra tamponata al 10% per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio con acqua distillata, è stata effettuata la colorazione delle colture con Alizarin Red S (Sigma Aldrich) 1% in acqua distillata. Il colorante in eccesso è stato eliminato tramite un ulteriore lavaggio in acqua distillata. Dopo aver lasciato asciugare le piastre, le colture sono state osservate tramite un microscopio ottico a contrasto di fase Diavert (Leitz Microsystems, Wetzlar, Germany). Immagini rappresentative sono state catturate utilizzando una fotocamera digitale Syrio-2 (Orma, Milano, Italy).

Al fine di quantificare con esattezza l'intensità della colorazione, il colorante è stato risolubilizzato secondo la procedura descritta da Gregory.⁵⁸

In breve, 800 μ l di acido acetico al 10% sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La piastra è stata poi incubata a temperatura ambiente per 30 minuti in agitazione. Con l'aiuto di uno *cell scraper* sono staccate le cellule e la sospensione è stata trasferita in una provetta tipo eppendorf da 1,5 ml. Dopo aver vortexato per 30 secondi, la sospensione è stata ricoperta con 500 μ l di olio minerale (Sigma Aldrich), riscaldata a 85°C per 10 minuti e raffreddata in ghiaccio per 5 minuti. La sospensione è stata poi centrifugata a 20.000 rpm per 15 minuti. 500 μ l del sovrinatante sono stati prelevati e trasferiti in una nuova provetta e sono stati aggiunti 200 μ l di idrossido d'ammonio al 10%, per neutralizzare la reazione. Infine, aliquote da 150 μ l dei campioni sono state lette in triplicato a 405 nm allo spettrofotometro.

3.6 Test di formazione di capillari su Matrigel

L'analisi della formazione di capillari è stata effettuata su terreno semisolido (Matrigel, Sigma Aldrich). 50 µl di Matrigel disciolti in DMEM sono stati seminati in pozzetti di una piastra 96-well. Il terreno è stato lasciato solidificare a 37°C per 1 ora. 50 µl di DMEM contenenti 10⁴ cellule sono stati seminati sopra il gel e incubati a 37°C. La formazione di strutture capillariformi è stata osservata a 2, 4, 6 e 8 ore dalla semina con un microscopio ottico e sono state catturate immagini rappresentative.

3.7 Test ELISA

Test ELISA sono stati effettuati sia su campioni di siero o plasma dei pazienti arruolati nello studio, sia su sovrinatanti delle colture cellulari per analizzare i fattori secreti dalle EPC.

I livelli di Fetuina-A, VEGF e OC sono stati analizzati su siero, mentre osteopontina e FGF-23 sono stati esaminati su plasma utilizzando kit ELISA commerciali, seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: Human Fetuin-A Elisa Kit, BioVendor, Heidelberg, Germany (sensibilità 0,35 ng/ml); Human VEGF Immunoassay Quantikine R&D Systems, Minneapolis, MN, USA (sensibilità 5-9 pg/ml); Human Osteopontin TiterZyme EIA kit, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA (sensibilità 0,110 ng/ml); Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit of Osteocalcin, Uscn Life Science (sensibilità 0,46 ng/ml); Human Intact FGF-23 ELISA kit, Immutopics, San Clemente, CA, USA (sensibilità 1 pg/ml). I risultati di questi test sono stati successivamente inclusi nell'analisi multivariata, per analizzare la loro correlazione con i livelli di EPC, l'espressione di VDR e l'espressione di OC.

I livelli di OC, BMP-7, VEGF e osteopontina sono stati invece misurati sul sovrinatante delle colture cellulari dopo 21 giorni dall'isolamento delle EPC *late*. Sono stati impiegati i seguenti kit: Human Osteopontin TiterZyme EIA kit, Assay Designs; Human BMP-7 Immunoassay Quantikine, R&D Systems (sensibilità 0.79-7.83 pg/ml); Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit of

Osteocalcin, Usen Life Science; Human VEGF Immunoassay Quantikine R&D Systems.

Ogni campione è stato analizzato in duplicato. I risultati, espressi in densità ottica, sono stati interpolati a una curva standard generata a partire da campioni a concentrazione nota (forniti all'interno dei kit).

3.8 Analisi statistica

La normalità della variabili continue è stata determinata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili con distribuzione normale sono presentati come medie \pm deviazione standard, mentre i dati con distribuzione non normale sono riportati come media e range. Le variabili categoriche sono riportate come frequenza o percentuale.

Le variabili continue sono state valutate usando un test t di Student *unpaired*, ovvero un test Mann-Whitney quando il dato non seguiva una distribuzione gaussiana. Le variabili categoriche sono state valutate tramite test del χ^2 .

Per valutare le differenze nella percentuale di EPC e di cellule esprimenti VDR o OC (e la relativa intensità di fluorescenza) tra i gruppi di pazienti, è stato effettuata un'analisi della varianza a una via (*one-way ANOVA*), con analisi post-hoc (t-test, Kruskal-Wallis o Bonferroni). È stata anche analizzata l'espressione di VDR e OC a seconda dei livelli di PTH, scegliendo il valore di 500 pg/ml come *cut-off*, in accordo con la classificazione dell'iperparatiroidismo di Lindberg.⁵⁵

L'analisi di regressione multipla *stepwise* è stata effettuata utilizzando i parametri relativi all'espressione di VDR e OC sulle EPC come variabili dipendenti e i parametri clinici e biochimici come variabili indipendenti.

L'analisi statistica è stata eseguita con l'ausilio del software STATA, versione 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). I valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

4. RISULTATI

4.1 Pazienti

I dati demografici, clinici e biochimici dei soggetti sani e dei pazienti uremici (non trattati con VDRA, trattati con calcitriolo o paracalcitolo) sono riassunti nella tabella 1. I soggetti arruolati nello studio risultavano omogenei per quanto riguardava il sesso, l'età, il *body mass index* (BMI), la protidemia, il colesterolo totale e LDL, i trigliceridi e i livelli di fetuina A. Come atteso, i controlli sani avevano una pressione arteriosa media minore rispetto ai pazienti uremici e mostravano livelli minori di proteina C-reattiva (PCR), PTH, fosfato, fosfatasi alcalina, glicemia, fibrinogeno, omocisteina, VEGF, osteopontina e osteocalcina. Inoltre, i soggetti sani hanno mostrato livelli più elevati di albumina, colesterolo HDL e calcidiolo (25(OH)D).

I diversi gruppi di pazienti dializzati, indipendentemente dalla terapia con VDRA, erano omogenei per età dialitica, diabete, *calcium score*, pressione arteriosa media, CRP, fosfato, albumina, glicemia, profilo lipidico, fibrinogeno, omocisteina, emoglobina, 25(OH)D e fetuina A. Tuttavia, sono state osservate differenze in altri parametri: i livelli di PTH, fosfatasi alcalina, VEGF, osteocalcina, FGF-23 erano significativamente più alti nei pazienti trattati con paracalcitolo che negli altri gruppi. I pazienti trattati con VDRA mostravano inoltre livelli aumentati di calcio rispetto ai pazienti non trattati. I livelli di osteopontina circolanti erano superiori nei pazienti trattati con paracalcitolo e in quelli non trattati, rispetto ai pazienti trattati con calcitriolo.

4.2 Analisi delle EPC circolanti e analisi multivariata

La tabella 3 mostra, per tutti i soggetti ed i pazienti nello studio, i valori di intensità di fluorescenza del VDR e la percentuale di EPC (intese come cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺) che esprimono il VDR. Non sono riportati i dati riguardanti le EPC con espressione del CD133 (CD34⁺CD45⁻CD133⁺KDR⁺), in

quanto i livelli circolanti di queste cellule, mediante citofluorimetria, sono al limite della rilevazione e non sono pertanto analizzabili.

Tabella 3. La tabella descrive la percentuale di CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ sulle cellule CD34⁺, l'espressione di VDR (% cellule e VDR-MFI) e l'espressione di OC (% cellule e OC-MFI). Sono paragonati i soggetti sani e i sottogruppi di pazienti in dialisi (non trattati, trattati con calcitriolo e trattati con paracalcitolo). La percentuale di EPC sulle cellule CD34 totali è riportata come media ± deviazione standard; gli altri dati sono presentati come mediane e range tra parentesi quadre.

	Soggetti sani (n=30)	Pazienti senza trattamento (n=28)	Pazienti trattati con calcitriolo (n=30)	Pazienti trattati con paracalcitolo (n=24)
% CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD133 ⁻ KDR ⁺ su CD34 ⁺	4,12 ± 1,65	2,97 ± 2,11	3,05 ± 2,09	3,27 ± 1,93
%VDR ⁺ su CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD133 ⁻ KDR ⁺	100,0% [90,0%-100,0%]	95,8% [77,8%-100,0%]	97,4% [75,0%-100,0%]	99,0% [90,8%-100,0%]
VDR-MFI su CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD133 ⁻ KDR ⁺	2767,7 [193,2-7459,8]	1994,7 [371,4-3528,2]	1697,1 [335,9-3895,6]	1747,0 [876,0-3456,0]
%OC ⁺ su CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD133 ⁻ KDR ⁺	17,9% [0,3%-69,0%]	17,3% [1,2%-75,0%]	17,6% [3,4%-49,0%]	28,0% [9,1%-63,2%]
OC-MFI su CD34 ⁺ CD45 ⁻ CD133 ⁻ KDR ⁺	252,8 [108,3-5003,8]	224,0 [123,0-5016,7]	222,7 [144,1-5551,5]	398,0 [122,1-729,0]

La percentuale di EPC positive per VDR tendeva ad essere maggiore nei soggetti sani rispetto ai pazienti dializzati, anche se i dati non hanno raggiunto la significatività statistica (p=0.056). Fra i tre gruppi di pazienti uremici, la percentuale di EPC che esprime VDR era aumentata significativamente nei pazienti trattati con calcitriolo o paracalcitolo, rispetto ai pazienti senza trattamento con VDRA (p<0.05). Il VDR-MFI è risultato essere maggiore nei soggetti sani rispetto ai pazienti uremici (p<0.05), ma nessuna differenza è stata riscontrata in base al diverso trattamento con VDRA. Per chiarire la relazione tra i livelli di PTH e l'espressione di VDR nei pazienti trattati con paracalcitolo, i pazienti sono stati suddivisi sulla base dei valori di PTH sierici, con il *cut-off* considerato a 500 pg/ml. Non si sono osservate differenze, né nella percentuale di EPC positive per VDR, né nel VDR-MFI, fra i pazienti con PTH superiore a

500 pg/ml (n=9) e quelli con valori sotto la soglia considerata (n=15) (%VDR⁺ su CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺: 99.1 ± 1.1% vs. 97.2 ± 3.4%, p=non significativo [ns]; VDR-MFI: 2125.2 ± 864.8 vs. 1694.9 ± 629.8, p=ns). L'analisi di regressione multipla *stepwise* è stata effettuata per identificare i parametri correlati all'espressione di VDR sulle EPC. L'analisi multivariata ha rivelato che la percentuale di EPC positive per VDR era correlata positivamente con la terapia a base di VDRA e i livelli di 25(OH)D, e negativamente con diabete, PCR, emoglobina e livelli di osteopontina. In aggiunta, il VDR-MFI correlava positivamente con terapia VDRA, PTH e 25(OH)D, negativamente con diabete ed livelli di osteopontina. I risultati sono riassunti nella tabella 4.

Tabella 4. *Influenza di fattori demografici, clinici e biochimici sulla percentuale di cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ che esprime il VDR e il VDR-MFI, come calcolato dall'analisi multivariata. Sono riportati in grassetto i coefficienti di regressione standardizzati che sono risultati significativi, con il valore di p relativo.*

	% VDR⁺ su CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺	VDR-MFI su CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺
Terapia con vitamina D	0.346 (p=0.024)	0.776 (p=0.013)
Età	0.145 (p=0.643)	0.879 (p=0.146)
BMI	0.119 (p=0.406)	25.4 (p=0.454)
Età dialitica	0.001 (p=0.942)	6.67 (p=0.141)
Diabete	-5.19 (p=0.002)	-0.399 (p=0.029)
Calcium score	0.0005 (p=0.263)	0.046 (p=0.661)
PCR	-0.424 (p=0.024)	-9.15 (p=0.895)
PTH	0.006 (p=0.165)	2.85 (p=0.014)
Ca	2.22 (p=0.111)	-24.6 (p=0.940)
P	-0.197 (p=0.688)	-135.9 (p=0.247)
Albumina	0.507 (p=0.840)	171.0 (p=0.775)
Fosfatasi alcalina	0.010 (p=0.221)	0.270 (p=0.894)
Omocisteina	-0.048 (p=0.387)	-10.98 (p=0.251)
Emoglobina	-0.469 (p=0.041)	162.2 (p=0.232)
25(OH)D	0.315 (p=0.018)	0.672 (p=0.046)
Fetua-A	-0.014 (p=0.840)	3.11 (p=0.858)
VEGF	0.003 (p=0.901)	-9.20 (p=0.116)
Osteopontina	-0.017 (p=0.004)	-5.05 (p=0.001)
Osteocalcina	0.002 (p=0.891)	-2.43 (p=0.403)
FGF23	0.104 (p=0.254)	2.03 (p=0.578)
OC-MFI	-0.055 (p=0.087)	-0.026 (p=0.060)

Tabella 5. *Influenza di fattori demografici, clinici e biochimici sulla percentuale di cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ che esprime il OC e il OC-MFI, come calcolato dall'analisi multivariata. Sono riportati in grassetto i coefficienti di regressione standardizzati che sono risultati significativi, con il relativo valore di p.*

	% OC⁺ su CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺	OC-MFI suCD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺
Terapia con VDRA	1.66 (p=0.746)	-188.6 (p=0.587)
Età	0.540 (p=0.157)	2.14 (p=0.873)
BMI	0.267 (p=0.577)	1.92 (p=0.953)
Età dialitica	0.014 (p=0.828)	0.065 (p=0.988)
Diabete	-2.02 (p=0.711)	-258.0 (p=0.486)
<i>Calcium score</i>	0.490 (p=0.038)	0.364 (p=0.019)
PCR	0.556 (p=0.572)	-51.99 (p=0.436)
PTH	0.123 (p=0.015)	0.149 (p=0.009)
Ca	-2.81 (p=0.544)	106.7 (p=0.734)
P	4.14 (p=0.015)	2.36 (p=0.050)
Albumina	11.4 (p=0.179)	-1034.6 (p=0.074)
Fosfatasi alcalina	0.031 (p=0.271)	0.293 (p=0.881)
Omocisteina	-0.054 (p=0.685)	3.23 (p=0.723)
Emoglobina	0.358 (p=0.851)	361.2 (p=0.007)
25(OH)D	-0.592 (p=0.050)	-25.34 (p=0.021)
Fetaina-A	0.402 (p=0.107)	0.981 (p=0.953)
VEGF	0.002 (p=0.927)	0.519 (p=0.703)
Osteopontina	-0.105 (p=0.202)	-11.41 (p=0.043)
Osteocalcina	0.052 (p=0.204)	-0.913 (p=0.742)
FGF-23	-0.214 (p=0.111)	0.469 (p=0.696)

Sono stati dunque analizzati i parametri correlati all'espressione di OC nelle EPC fra i gruppi di pazienti (tabella 2). La percentuale di cellule positive per OC era inferiore nei soggetti sani rispetto a tutti i pazienti uremici (P=0.032). Non si sono riscontrate differenze significative nella popolazione di pazienti uremici in base al trattamento con VDRA. L'intensità di fluorescenza di OC (OC-MFI) era significativamente elevata nei pazienti trattati con paracalcitolo rispetto a tutti gli altri gruppi di pazienti (p<0.05). L'analisi dei parametri di espressione di OC, nei pazienti trattati con paracalcitolo divisi per livelli di PTH, ha mostrato che sia la percentuale di cellule che esprimono OC, sia OC-MFI, sono significativamente maggiori nei pazienti con elevati livelli di PTH, rispetto a quelli con valori di PTH sotto i 500 pg/ml (%OC⁺ su CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺:

41.0 ± 18.5% vs. 25.2 ± 11.0%; p=0.015; OC-MFI: 498.5 ± 180.8 vs. 324.2 ± 180.6; p<0.05) (Figure 1A e 1B, barre color grigio chiaro). L'analisi multivariata sui fattori che influenzano i parametri legati a OC ha dimostrato che la percentuale di EPC positive per OC era correlata positivamente con il *calcium score*, il PTH e i livelli di fosfatemia, e negativamente con i livelli di 25(OH)D. Inoltre, OC-MFI correlava positivamente con il *calcium score*, il PTH, la fosfatemia e i livelli di emoglobina, mentre correlava negativamente con albumina, 25(OH)D e i livelli di osteopontina. I risultati sono schematizzati nella tabella 5.

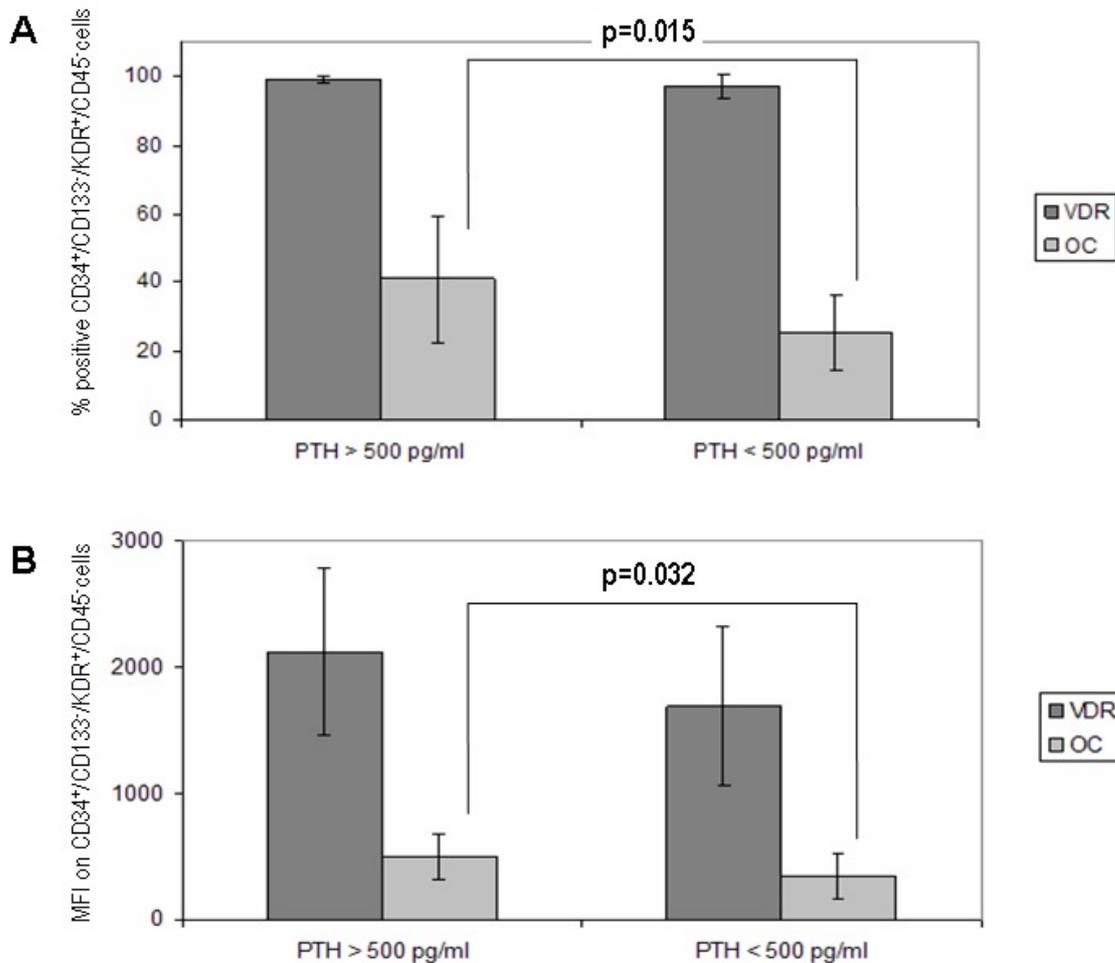


Figura 1. (A) Percentuale di cellule CD34+CD45-CD133-KDR+ che esprimono VDR e OC nei pazienti trattati con VDRA, divisi in base ai livelli di PTH circolanti. (B) Intensità di fluorescenza media per VDR e OC nei pazienti trattati con VDRA, suddivisi in base ai livelli di PTH. Il cut-off considerato per il PTH è di 500 pg/ml.

4.3 Colture cellulari

Le colonie di EPC *early* in coltura, isolate da sangue periferico tramite selezione dalle PBMC con terreno specifico per la crescita dei progenitori endoteliali, sono riconoscibili dalla morfologia caratteristica. Le colonie sono formate da un nucleo centrale di cellule rotondeggianti, circondate da cellule fusiformi, disposte a raggiera.

Queste colonie appaiono in coltura dopo 4-5 giorni: il loro numero è in relazione ai livelli di progenitori circolanti. Le EPC *late* sono invece cellule a forma di ciottolo, che diventano numericamente evidenti dopo 15-20 dall'isolamento.

La conta delle colonie ha mostrato i seguenti risultati: $16,03 \pm 7,68$ colonie/ 10^6 PBMC per i soggetti sani; $5,17 \pm 1,65$ colonie/ 10^6 PBMC per i pazienti non trattati; $7,54 \pm 0,19$ colonie/ 10^6 PBMC per i pazienti trattati con calcitriolo; $8,13 \pm 0,54$ colonie/ 10^6 PBMC per i pazienti trattati con paracalcitolo.

Per quanto riguarda le EPC *late*, sembra che le cellule trattate con calcitriolo abbiano formato colonie più precocemente rispetto alle cellule non trattate o trattate con paracalcitolo (7 giorni vs. 9-10 giorni). Inoltre, il trattamento con paracalcitolo sembrava aumentare il numero di cellule all'interno delle colonie e, quindi, la loro dimensione; il trattamento con calcitriolo ha indotto la formazione di un numero maggiore di colonie rispetto alle cellule non trattate ($9,27 \pm 0,98$ colonie/ 10^6 PBMC vs. $5,36 \pm 1,13$ colonie/ 10^6 PBMC, rispettivamente, $p < 0,05$). L'effetto di calcitriolo e paracalcitolo sul momento di comparsa delle colonie e sul loro numero non è risultato dose-dipendente alle concentrazioni di farmaco testate. La figura 2 mostra delle immagini rappresentative delle colture cellulari a 21 giorni dall'isolamento. Le cellule isolate da soggetti sani e da pazienti già in trattamento con VDRA non hanno mostrato differenze quanto sono stati aggiunti i farmaci *in vitro*, ma erano simili, in morfologia, alle cellule da pazienti uremici senza trattamento, con aggiunta di VDRA *in vitro*.

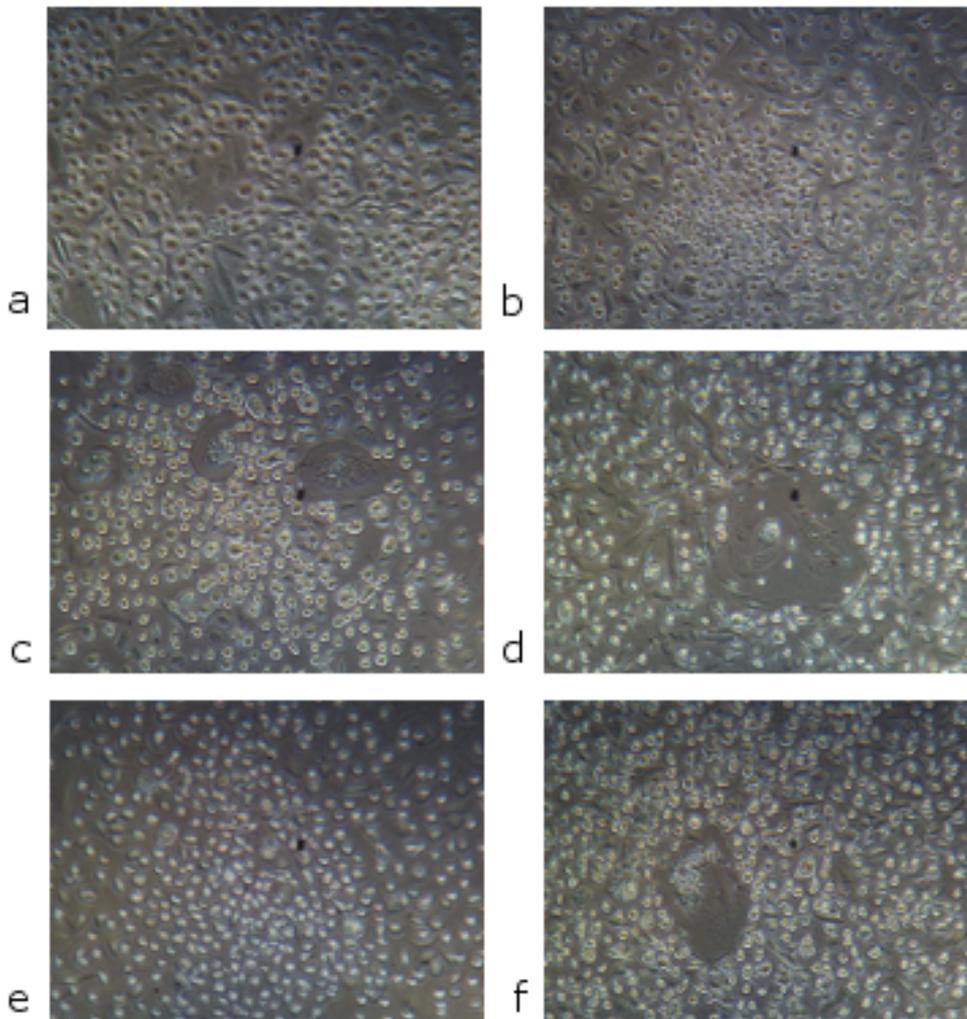


Figura 2. Immagine rappresentativa delle colture cellulari a 21 giorni. (400x). a) e b) EPC senza aggiunta di VDRA in coltura. c) e d) Cellule trattate con calcitriolo *in vitro* alle concentrazioni di 50 pg/ml and 500 pg/ml, rispettivamente. e) e f) Cellule trattate con paracalcitolo alle concentrazioni di 50 pg/ml and 500 pg/ml, rispettivamente. Non sono stati osservati effetti tossici utilizzando la dose a 500 pg/ml per entrambi i farmaci.

4.4 Immunofluorescenza

Tramite immunofluorescenza è stata analizzata l'espressione di osteocalcina nelle EPC in coltura a 21 giorni dall'isolamento. Le cellule isolate da pazienti non trattati con VDRA ha mostrato alti livelli di espressione di OC, come riportato nella figura 3a; la fluorescenza calava drasticamente sia nei pazienti in trattamento con VDRA (figura 3d, 3g), sia con l'aggiunta di calcitriolo (figura 3b, 3e, 3h) o paracalcitolo *in vitro* (figura 3c, 3f, 3i), indipendentemente dalla

dose utilizzata. Le cellule isolate dai soggetti sani non mostravano positività per OC (immagine non mostrata).

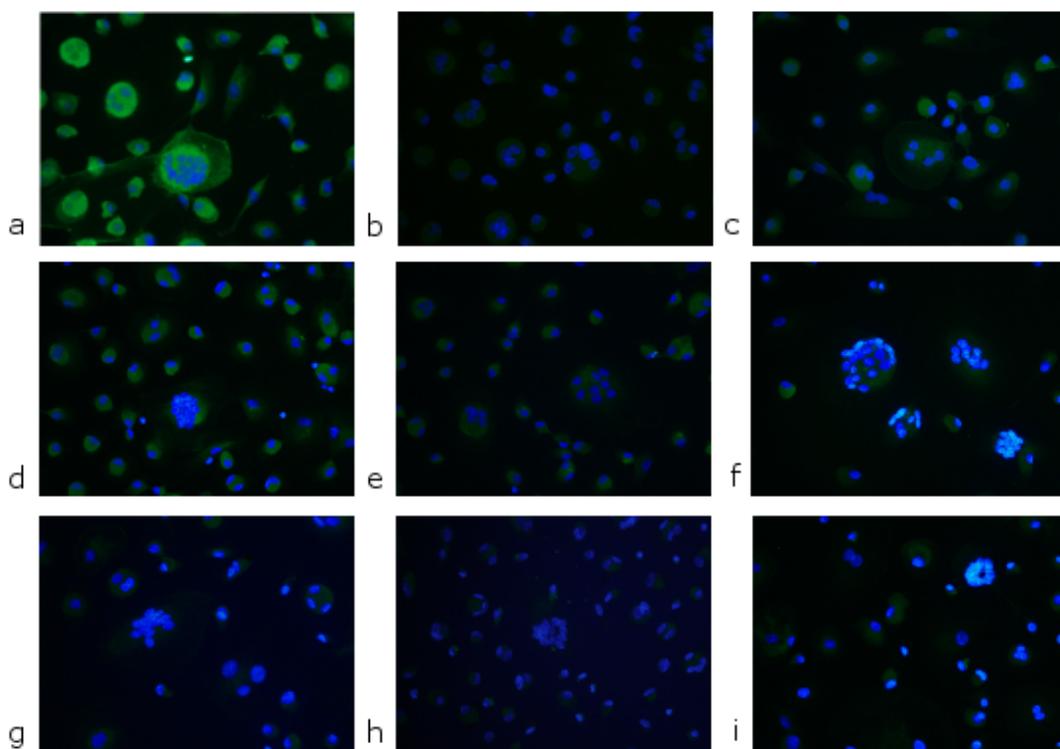


Figura 3. Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza per OC sulle EPC isolate da pazienti dializzati (400x). Le immagini dell'immunofluorescenza da pazienti sani non sono mostrate. Nella griglia di figure, le righe rappresentano il trattamento dei pazienti, mentre le colonne indicano l'aggiunta di VDRA in vitro. a) Pazienti non trattati, nessuna aggiunta di VDRA; b) Pazienti non trattati, aggiunta di calcitriolo in vitro; c) Pazienti non trattati, aggiunta di paracalcitolo in vitro; d) Pazienti trattati con calcitriolo, nessuna aggiunta di VDRA; e) Pazienti trattati con calcitriolo, aggiunta di calcitriolo in vitro; f) Pazienti trattati con calcitriolo, aggiunta di paracalcitolo in vitro; g) Pazienti trattati con paracalcitolo, nessuna aggiunta di VDRA; h) Pazienti trattati con paracalcitolo, aggiunta di calcitriolo in vitro; i) Pazienti trattati con paracalcitolo, aggiunta di paracalcitolo in vitro. Sono mostrate le immagini dei trattamenti con calcitriolo e paracalcitolo alla concentrazione di 50 pg/ml.

4.5 Test di formazione di capillari su Matrigel

Come mostra la figura 4, le EPC da controlli sani e pazienti trattati con VDRA, seminate su Matrigel, hanno mostrato dopo 8 ore cambiamenti morfologici e un rimodellamento cellulare che assomigliano a strutture capillariformi precoci. Già due ore dopo la semina, le EPC hanno mostrato la formazione di processi

cellulari, richiamando le fasi iniziali della formazione dei tubuli. Al contrario, le EPC da pazienti non trattati non hanno dimostrato questa organizzazione e hanno sempre mantenuto una morfologia cellulare rotondeggiante.

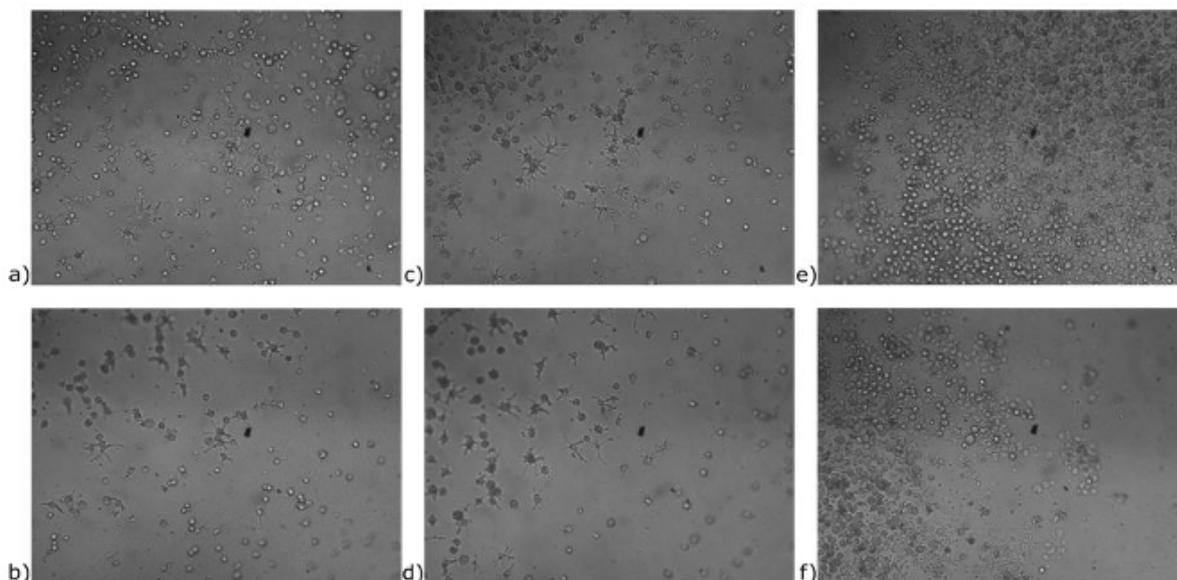


Figura 4. EPC late coltivate su terreno semisolido (Matrigel) a 15 giorni dall'isolamento (400x) e a 2 e 8 ore dalla semina. a) Controllo sano, 2h. b) Controllo sano, 8h. c) Pazienti trattati con calcitriolo, 2h. d) Pazienti trattati con calcitriolo, 8h. e) Pazienti non trattati, 2h. f) Pazienti non trattati, 8h. Le immagini dei pazienti trattati con paracalcitolo non sono mostrate.

4.6 Colorazione con Alizarin Red

La colorazione delle colture di EPC late con Alizarin Red S ha mostrato che le colture di cellule prelevate dai pazienti non trattati con VDRA sono quelle in cui la presenza di depositi di calcio era più marcata. (Figura 5a). Tuttavia, l'aggiunta di paracalcitolo *in vitro* ha determinato una forte diminuzione della colorazione (Figura 5c). Questo effetto è stato verificato solo per il paracalcitolo ad entrambe le dosi utilizzate, ma non nelle stesse cellule trattate *in vitro* con calcitriolo (figura 5b). Le colture da pazienti in trattamento con calcitriolo hanno mostrato una colorazione meno intensa (Figura 5d), anche se questa differenza non è risultata significativa alla quantificazione. Similmente a quanto già osservato per i pazienti senza trattamento, solo l'aggiunta di paracalcitolo *in vitro* diminuisce i livelli di depositi di calcio (figura 5f). Le colture da pazienti in trattamento con

paracalcitolo, invece, hanno mostrato bassi livelli di colorazione con Alizarin Red (figura 5g), praticamente assente quando è stato aggiunto ulteriore paracalcitolo *in vitro* (figura 5i). Le cellule da pazienti sani presentavano livelli minimi di colorazione con Alizarin Red (dati non mostrati). Gli effetti del trattamento con calcitriolo e paracalcitolo *in vitro* nella deposizione di calcio sembrano essere indipendenti dalla dose utilizzata, per cui vengono riportati i risultati con l'utilizzo della concentrazione minore di farmaco, nonché fisiologica. La figura 5 mostra immagini rappresentative della colorazione con Alizarin Red S delle colture di EPC. Il grafico della figura 6 rappresenta la quantificazione della colorazione con Alizarin Red.

4.7 Test ELISA su sovrinatante delle colture cellulari

Al fine di determinare l'effetto *in vitro* di calcitriolo e paracalcitolo sulle colture di EPC *late* sulla secrezione di fattori importanti nella regolazione del metabolismo minerale e sul potenziale angiogenico, i livelli di osteopontina, BMP-7, OC e VEGF sono stati misurati nel sovrinatante delle colture a 21 giorni dall'isolamento tramite test ELISA. I livelli di BMP, OC e VEGF non differivano significativamente tra i pazienti e non hanno mostrato alterazioni in relazione ai trattamenti *in vitro*. L'aggiunta di calcitriolo o paracalcitolo alle EPC da pazienti non trattati ha invece mostrato un aumento significativo nei livelli di osteopontina (effetto non dose-dipendente).

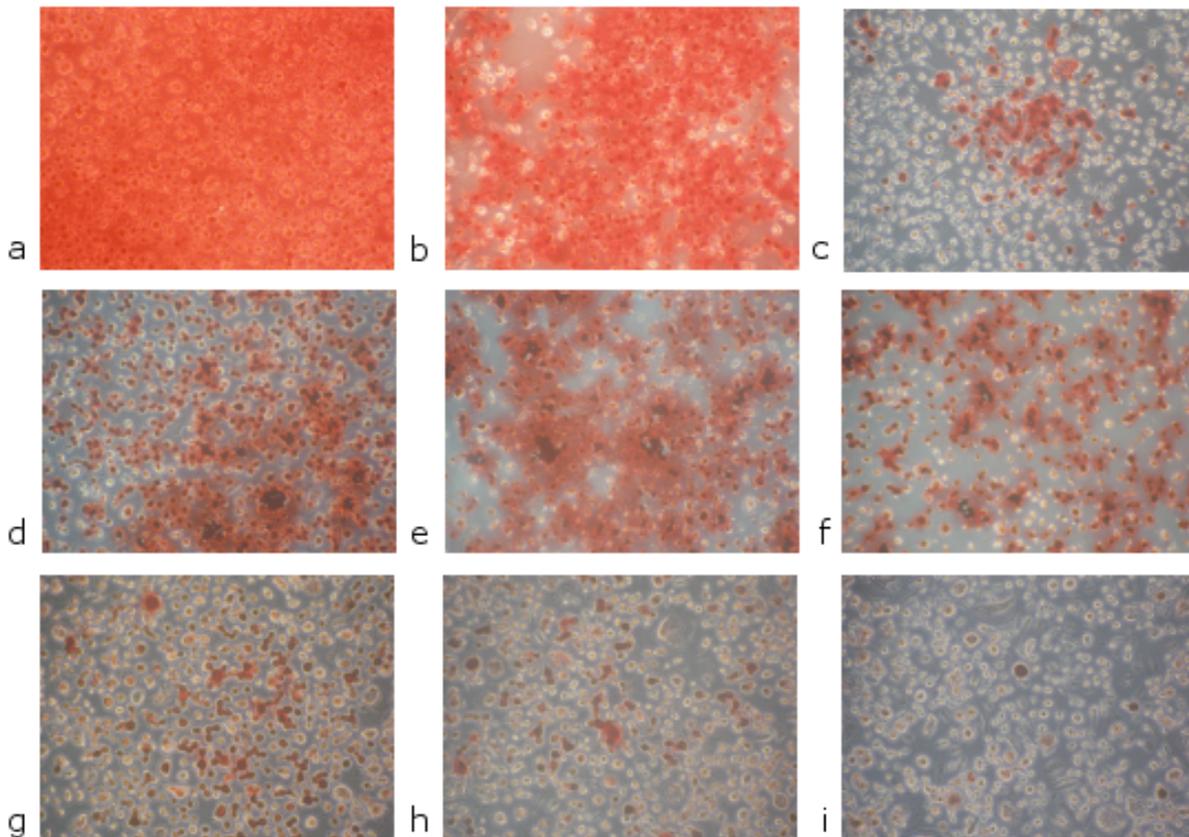


Figura 5. Immagini rappresentative della colorazione con Alizarin Red delle colture di EPC isolate da pazienti dializzati (400x). Le immagini delle colorazioni nelle colture da soggetti sani non sono mostrate. Nella griglia di figure, le righe rappresentano il trattamento dei pazienti, mentre le colonne indicano l'aggiunta di VDRA in vitro. a) Pazienti non trattati, nessuna aggiunta di VDRA; b) Pazienti non trattati, aggiunta di calcitriolo in vitro; c) Pazienti non trattati, aggiunta di paracalcitolo in vitro; d) Pazienti trattati con calcitriolo, nessuna aggiunta di VDRA; e) Pazienti trattati con calcitriolo, aggiunta di calcitriolo in vitro; f) Pazienti trattati con calcitriolo, aggiunta di paracalcitolo in vitro; g) Pazienti trattati con paracalcitolo, nessuna aggiunta di VDRA; h) Pazienti trattati con paracalcitolo, aggiunta di calcitriolo in vitro; i) Pazienti trattati con paracalcitolo, aggiunta di paracalcitolo in vitro. La colorazione con Alizarin Red è più intensa nelle cellule da pazienti non trattati e senza aggiunta di VDRA in vitro (a) e con aggiunta di calcitriolo (b), mentre con l'aggiunta di paracalcitolo alla colture si ha una netta diminuzione dei depositi di calcio (c). I pannelli d), e) e f) mostrano le EPC isolate da un paziente trattato con calcitriolo, dove l'aggiunta di VDRA in vitro non induce una riduzione significativa nella colorazione. I pazienti trattati con paracalcitolo mostrano livelli minimi di colorazione con Alizarin Red. (g, h, i). Sono mostrate le immagini dei trattamenti con calcitriolo e paracalcitolo alla concentrazione di 50 pg/ml.

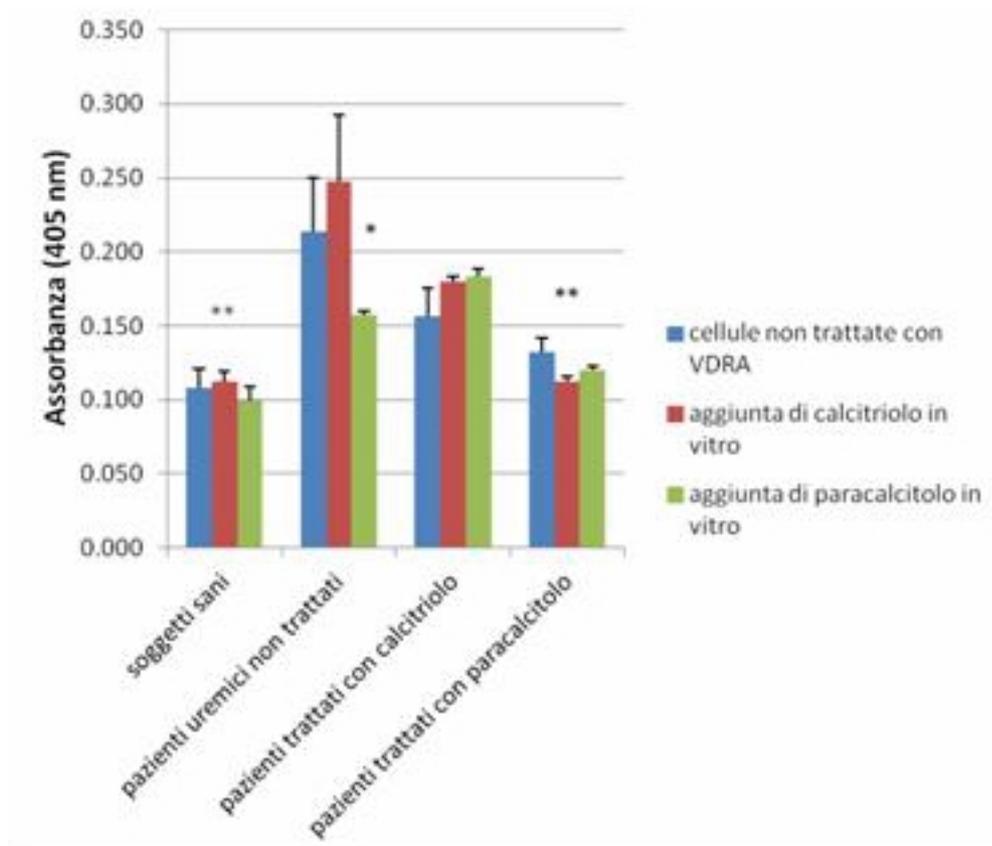


Figura 6. Il grafico illustra i livelli di depositi di calcio, ottenuti quantitativamente dalla solubilizzazione della colorazione e successiva quantificazione allo spettrofotometro (vedere i metodi per i riferimenti. (*) Fra i pazienti non trattati con VDRA, l'aggiunta di paracalcitolo in vitro ha determinato una netta diminuzione nei livelli di Alizarina nelle colture di EPC, rispetto sia alle cellule non trattate che a quelle trattate con paracalcitolo. ($p < 0,05$) (**) Nel complesso, i pazienti trattati con paracalcitolo e i controlli sani hanno mostrato livelli molto bassi di colorazione con Alizarina, rispetto ai pazienti non trattati ($p < 0,01$).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo studio suggeriscono che i progenitori endoteliali possano essere coinvolti nella patogenesi delle calcificazioni vascolari nella CKD, in virtù del fenotipo pro-calcifico che esprimono nel paziente uremico.

Si può notare come i livelli circolanti di cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁺KDR⁺ fossero in generale molto bassi già nei soggetti sani, praticamente nulli nei pazienti uremici, indipendentemente dalla terapia con VDRA (dati non mostrati).

I progenitori endoteliali che esprimono CD133 sono cellule piuttosto immature, probabilmente maggiormente rappresentate a livello midollare che nel circolo sanguigno, come riportato da Peichev e Urbich.^{38,44} Questo potrebbe spiegare il numero esiguo di progenitori rilevato in circolo; un'altra spiegazione possibile potrebbe essere che la metodica utilizzata per l'analisi, la citofluorimetria, non sia sufficientemente sensibile da rilevare un numero di cellule così basso, in un *background* così vasto ed eterogeneo come quello delle cellule mononucleate del sangue.

Al contrario, le cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ (una sottopopolazione che identifica probabilmente le EPC *late-outgrowth*) sono facilmente analizzabili e i risultati ottenuti sono in linea con la letteratura: i pazienti uremici mostrano una deplezione di cellule rispetto ai controlli sani. Il lavoro di de Groot e colleghi ha dimostrato che il siero uremico è in grado di inibire il differenziamento delle EPC e ne opera una diminuzione in termini numerici.⁴⁵ Non si rileva tuttavia una reale differenza significativa tra pazienti non trattati e trattati con VDRA, nonostante le differenze siano vicine al valore di significatività e sia osservabile un andamento.

Il primo risultato importante è la dimostrazione dell'espressione del VDR sui progenitori endoteliali. Questo è il primo studio che riporta l'espressione di tale recettore sulle EPC e dalle analisi effettuate è risultato che più del 90% delle EPC esprima VDR. Questo dato ha dei risvolti molto importanti: può significare che la vitamina D possa influire sui processi di vasculogenesi e di riparo della

parete vascolare, spiegando almeno in parte il suo effetto positivo sul sistema cardiovascolare e fornendo un potenziale collegamento patogenetico tra malattia renale, ossea e cardiovascolare nella CKD-MBD.

Dai risultati dell'analisi multivariata, la percentuale di cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ che esprimeva VDR correlava positivamente con la terapia a base di VDRA e con i livelli sierici di 25(OH)D, e negativamente con diabete, PCR, emoglobina e osteopontina. I livelli di VDR-MFI hanno mostrato invece un'associazione positiva con la terapia VDRA e i livelli di PTH, e negativa con diabete e livelli di osteopontina.

L'associazione positiva del 25(OH)D con entrambi i parametri di espressione del VDR ha confermato studi precedenti.⁶⁰ Infatti, la predittività dei livelli sierici di 25(OH)D e dei VDRA supporta l'ipotesi che vi sia una cooperazione tra i sistemi della vitamina D locale ed endocrino, come già osservato nel caso dei monociti nei pazienti con CKD. Inoltre, l'associazione positiva tra livelli sierici di 25(OH)D, terapia con VDRA ed espressione di VDR su cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ potrebbe rispecchiare i dati ottenuti da Stubbs,⁶¹ che hanno indicato un aumento dell'espressione di VDR su monociti circolanti, indotto da colecalciferolo e paracalcitolo nei pazienti uremici.

Dai risultati è stata anche osservata un'associazione positiva tra la percentuale di EPC che esprimevano OC e i livelli di fosfato e *calcium score*, mentre sarebbe negativa l'associazione con i livelli sierici di 25(OH)D. OC-MFI è risultata associata in modo positivo con PTH, livelli di fosfato e *calcium score*, e negativamente con 25(OH)D, albumina e osteopontina. Inoltre, una percentuale aumentata di EPC che esprimono OC è stata riscontrata in pazienti uremici rispetto ai controlli sani.

L'associazione positiva tra OC-MFI e PTH merita ulteriori commenti. È noto che i recettori del PTH siano presenti sulle cellule endoteliali, anche se il loro ruolo fisiologico potenziale non è stato determinato, soprattutto per quanto coinvolge l'espressione di VDR.³³ Modelli sperimentali hanno dimostrato che il PTH induce un aumento significativo di tutte le sottopopolazioni di EPC

mobilizzate dal midollo osseo al sangue periferico attraverso la stimolazione dei relativi recettori.^{62,63} Ciò non è stato confermato dal lavoro di Lomonte,⁶⁴ che invece ha dimostrato una correlazione inversa tra livelli di cellule CD34⁺ circolanti e PTH sierico, che è stato dimostrato causare una deplezione nella nicchia ematopoietica nel midollo osseo.

Jiang *et al.*⁶⁵ hanno osservato che l'espressione di OC è regolata da diversi ormoni calciotropici e da fattori di crescita tra i quali calcitriolo e PTH. L'effetto positivo del PTH su OC-MFI, indicato dall'analisi di regressione multipla, è stato confermato quando sono stati confrontati i pazienti in terapia con VDRA con diversi livelli di PTH sierici. I pazienti con livelli di PTH superiori a 500 pg/ml presentavano infatti un OC-MFI superiore a quelli con livelli di PTH sotto il valore soglia. Inoltre, i livelli sierici di 25(OH)D erano associati positivamente con l'espressione di VDR e negativamente con l'espressione di OC. Questa scoperta sembra suggerire che il deficit di vitamina D possa compromettere la funzionalità delle EPC. La correlazione inversa quasi significativa ($p=0.06$) tra OC-MFI e VDR-MFI sembra confermare questa ipotesi.

Un altro punto interessante dello studio è l'associazione positiva riscontrata tra i livelli di fosfato sierici ed entrambi i parametri che valutano l'espressione di OC. Il fosfato è stato recentemente coinvolto come tossina endoteliale, dal momento che compromette la sintesi di ossido nitrico, aumenta la generazione di specie reattive dell'ossigeno e aumenta l'apoptosi. Inoltre, il fosfato può agire tramite l'inibizione della 1 α -idrossilasi periferica tramite l'azione di FGF-23, anche se in questo studio i livelli di questo fattore di crescita non sono risultati correlati con l'espressione di OC. Questo concetto è supportato da uno studio recente di Coll *et al.*, che hanno indicato un rischio minore di calcificazione intimale associato a livelli inferiori di fosfato.⁶⁶

Un risultato inaspettato dello studio è l'associazione inversa riscontrata tra i livelli di osteopontina e VDR/OC-MFI sulle cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺. Inoltre, i livelli plasmatici di osteopontina erano più elevati nei pazienti trattati con paracalcitolo. È stato osservato che i VDRA sono in grado di stimolare

inibitori della mineralizzazione vascolare quali la proteina Matrix-Gla e osteopontina, i cui livelli plasmatici sono significativamente associati con la malattia cardiovascolare indipendentemente dai fattori di rischio tradizionali. I risultati delle colture cellulari possono confermare questi dati.

In questo studio è stata dimostrata, per la prima volta, un'associazione positiva tra l'espressione di OC sulle cellule CD34⁺CD45⁻KDR⁺ e il *calcium score*. Studi precedenti, che si sono focalizzati sulle cellule CD34⁺KDR⁺, hanno studiato la relazione tra le EPC e la malattia cardiovascolare, mentre in questo lavoro è stata analizzata una sottopopolazione che esprime un marcatore osteogenico specifico, probabilmente coinvolta nella calcificazione vascolare. Il network cellulare e i *pathway* molecolari coinvolti nella formazione delle calcificazioni vascolari rimangono ancora non del tutto chiariti. Un ulteriore meccanismo basato sulla circolazione di progenitori derivati dal midollo osseo è stato recentemente proposto da Pal e colleghi,⁶⁷ che hanno dimostrato una correlazione tra cellule mononucleate circolanti che esprimono OC e la calcificazione aortica. Inoltre, altri studi riportano di cellule circolanti CD34⁺ con caratteristiche non solo ematopoietiche e vasculogeniche, ma anche capaci di differenziarsi, *in vitro*, in cellule osteoblastiche.⁶⁸⁻⁷⁰

Sebbene la terapia con VDRA non sia risultata associata in modo significativo all'espressione di OC analizzata tramite citofluorimetria, i risultati ottenuti dalle colture cellulari hanno restituito risultati differenti. Le cellule da pazienti non trattati hanno mostrato EPC con un'alta fluorescenza per OC, che è risultata drasticamente ridotta dopo l'aggiunta *in vitro* di calcitriolo e paracalcitolo, mentre l'espressione di OC nelle colture da pazienti già in trattamento con VDRA era trascurabile e l'aggiunta di ulteriore farmaco *in vitro* non ne modificava i livelli di fluorescenza. Nondimeno, la colorazione delle colture con Alizarin Red S ha mostrato che calcitriolo e paracalcitolo hanno effetti diversi sulla deposizione di calcio extracellulare, che risulta ridotta solo quando il paziente seguiva terapia con paracalcitolo o se questo farmaco veniva aggiunto *in vitro*. L'effetto non è risultato dose-dipendente alle concentrazioni testate e

non era mediato da alterazioni nei livelli di calcio e fosfato, dal momento che le concentrazioni di questi minerali erano fisse nel terreno di coltura. Possiamo postulare che la riduzione nei depositi di calcio possa essere mediata da osteopontina, anche se nei sovranatanti delle colture cellulari non sono state trovate differenze tra i vari gruppi. Il paracalcitolo potrebbe indurre preferenzialmente la fosforilazione di osteopontina, rendendola più attiva.⁷¹

I risultati qui presentati sono parzialmente in accordo con le osservazioni di Li *et al*,³⁴ i quali hanno mostrato che il paracalcitolo è un inibitore più potente della calcificazione delle cellule muscolari lisce rispetto al calcitriolo. Il ruolo putativo anticalcifico del paracalcitolo merita ulteriori approfondimenti, considerando anche i maggiori livelli di osteopontina plasmatici nei pazienti trattati con questo farmaco. Sul paracalcitolo e sulla sua funzione sono stati pubblicati diversi studi. Risulta particolarmente interessante il lavoro di Teng,⁷² che ha dimostrato come la somministrazione di paracalcitolo nei pazienti in dialisi sia associato ad un aumento significativo della sopravvivenza a 36 mesi, rispetto ai pazienti in trattamento con calcitriolo. Un ulteriore studio retrospettivo⁷³ descrive la correlazione della somministrazione endovenosa di calcitriolo e paracalcitolo con tutte le cause di mortalità: la sopravvivenza è risultata del 20 - 25% maggiore nei pazienti in terapia con paracalcitolo e il beneficio era indipendente dai valori di calcio, fosforo e PTH.

Le EPC da pazienti uremici sono state prelevate e coltivate *in vitro*, non sono state quindi esposte all'ambiente uremico durante la crescita. Nonostante questo, le cellule da pazienti affetti da CKD, senza trattamento con VDRA, hanno mostrato un fenotipo osteogenico (elevata espressione di OC e deposizione di calcio nella matrice extracellulare) che è stato corretto solo dopo l'aggiunta di vitamina D. Queste alterazioni suggeriscono che la compromissione della funzionalità delle EPC sia dovuta almeno in parte al deficit di vitamina D, per cui la sua supplementazione potrebbe migliorare l'assetto fenotipico e funzionale di queste cellule. Dal momento che i VDRA hanno molti altri effetti, oltre alla

regolazione del metabolismo minerale, questo punto richiede studi più approfonditi.

I risultati ottenuti da questo studio non permettono di affermare definitivamente che una più alta espressione di VDR risulti in una migliore funzionalità delle EPC, tuttavia i dati delle colture cellulari sembrano supportare questa ipotesi. Infatti, l'aggiunta di calcitriolo alle colture cellulari ha determinato sia una formazione precoce delle colonie, sia un aumentato numero delle stesse, rispetto alle colture senza aggiunta di VDRA *in vitro* e a quelle con supplementazione di paracalcitolo. Tuttavia, l'aggiunta di paracalcitolo alle colture ha determinato un aumento del numero di cellule all'interno delle colonie. Tutti questi effetti relativi all'aggiunta di VDRA *in vitro* non sono risultati dose-dipendenti alle concentrazioni di farmaco testate.

Le ragioni che spiegano il beneficio in termini di sopravvivenza per i pazienti affetti da CKD sotto terapia con VDRA, indipendentemente dai livelli ridotti di PTH, non sono ancora chiarite. Le EPC giocano un ruolo chiave nel mantenimento e nel riparo dell'integrità vascolare in risposta al danno endoteliale. Tuttavia, sono pochi gli studi che hanno analizzato il possibile ruolo protettivo della vitamina D sul numero e sulla funzione delle EPC. Yiu *et al.*⁷⁴ hanno dimostrato che il deficit di vitamina D è associato in modo indipendente alla deplezione di cellule CD34⁺CD133⁺KDR⁺ circolanti in pazienti con diabete di tipo 2. Inoltre, la vitamina D potrebbe avere una funzione protettiva su queste cellule, migliorando i livelli di prodotti finali della glicazione avanzata e la deplezione di EPC mediata da stress ossidativo.

In aggiunta, il ruolo della vitamina D nella calcificazione vascolare è molto controverso.⁷⁵⁻⁷⁷ Il lavoro di Mathew ha suggerito che dosi minori di VDRA sono in grado di inibire la calcificazione delle placche aterosclerotiche nella popolazione generale, mentre dosi più elevate hanno un effetto opposto.⁷⁸ D'altro canto, studi clinici hanno indicato che i livelli sierici di 25(OH)D e 1,25(OH)D siano inversamente correlati con la calcificazione coronarica nella popolazione generale.^{79,80}

Questo studio ha dimostrato per la prima volta una più alta espressione di OC su cellule CD34⁺CD45⁻CD133⁻KDR⁺ nei pazienti con insufficienza renale cronica, rispetto ai controlli sani. L'associazione inversa tra espressione di OC e livelli sierici di 25(OH)D, e la correlazione positiva tra OC e i livelli di *calcium score*, insieme alla riduzione nella deposizione di calcio dopo aggiunta di VDRA, suggeriscono che la vitamina D abbia un ruolo protettivo nei confronti delle calcificazioni vascolari intimali. Un altro punto che merita uno studio più approfondito è l'associazione tra i livelli di fosfato e l'espressione di OC sulle EPC, dal momento che è stato dimostrato che l'iperfosfatemia può contribuire alla formazione di calcificazioni a livello dell'intima nel ramo vascolare.⁸¹

La principale limitazione di questo studio probabilmente è il suo disegno *cross-sectional*. Per questo motivo, i nostri risultati attuali non stabiliscono se i parametri utilizzati per valutare l'espressione di VDR e OC rappresentino due stati separati dal punto di vista fisiopatologico e cronologico dello stesso fenomeno. Un altro punto di difficile interpretazione è la discrepanza tra l'analisi di regressione *stepwise* e i risultati delle colture cellulari. Gli effetti dell'aggiunta di VDRA potrebbe essere legata alla dose farmacologica utilizzata nelle colture. Tuttavia, i risultati ivi ottenuti suggeriscono che un'alta percentuale di EPC che esprimono osteocalcina nel paziente uremico possano contribuire alla formazione di calcificazioni vascolari e che il trattamento con VDRA sia in grado di attenuare questo fenomeno.

Riassumendo, i risultati di questo studio suggeriscono che il trattamento con calcitriolo e paracalcitolo abbia un effetto positivo sulle EPC. *In primis*, il trattamento dei pazienti con VDRA sembra aumentare il numero di EPC circolanti, sebbene non raggiungano i livelli dei soggetti sani. *In vitro*, sembra esservi un effetto positivo sulla morfologia delle colonie e delle cellule. Tuttavia, gli effetti più significativi sembrano essere quelli sull'espressione di osteocalcina e sulla deposizione di sali di calcio: sia calcitriolo che paracalcitolo sono in grado di ridurre notevolmente l'espressione di OC, mentre solo il paracalcitolo ha un effetto significativo sulla riduzione dei depositi di calcio in

coltura (sia valutando l'effetto *in vitro*, che quello *in vivo*). Rimane un punto chiave quello di studiare approfonditamente, in futuro, quale sia il meccanismo di azione dei due farmaci, in modo da poter rendere conto di queste differenze. Quanto appena descritto rappresenta un valido supporto all'idea che si possa ridurre, nei pazienti affetti da CKD, il rischio cardiovascolare con una terapia a base di VDRA.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Greenberg A, Cheung AK, Coffman TM, Falk RJ, Jennette JC (eds.). Primer on Kidney Diseases 5th edition. Saunders Elsevier: Philadelphia, 2009.
2. Brenner BM, Rector FC. Il Rene. Verduci editore, 2002.
3. Linee guida National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI)
4. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006; 69: 1945-1953.
5. Ogata H, Koiwa F, Kinugasa E, Akizawa T. CKD-MBD: impact on management of kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2007; 11: 261–268.
6. Raggi P, Kleerekoper M. Contribution of Bone and Mineral Abnormalities to Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 836-843.
7. Fourtounas C. Phosphorus metabolism in chronic kidney disease. *Hippokratia* 2011; 15: 50-52.
8. Stubbs JR, He N, Idiculla A, Gillihan R, Liu S, David V, Hong Y, Darryl Quarles L. Longitudinal Evaluation of FGF23 Changes and Mineral Kidney Disease. *J Bone Min Res* 2010; 27: 38-46.
9. Hruska K, Choi ET, Memon I, Davis TK, Mathew S. Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD). *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 769-778.
10. Larsson TE. The role of FGF-23 in CKD-MBD and cardiovascular disease: friend or foe? *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 1376-1381.
11. Slatopolsky E, Brown A, Dusso A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1999; 56(Suppl 73): S14–S19.

12. Fukagawa M, Hamada Y, Nakanishi S, Tanaka M. The kidney and bone metabolism: Nephrologists' point of view. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 434–438.
13. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011; 109: 697-711.
14. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthum N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2208–2218.
15. Mejía N, Roman-Garcia P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andia JB. Chronic kidney disease – mineral and bone disorder: a complex scenario. *Nefrologia* 2011; 31: 514-519.
16. Prié D, Friedlander G. Reciprocal Control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 Formation Involving the FGF23 / Klotho System. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1717-1722.
17. Kuro-o M. Phosphate and Klotho. *Kidney Int* 2011; 79: S20-S23.
18. Bernheim J, Benchetrit S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2433-2438.
19. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770-774.
20. Elder G. Pathophysiology and recent advances in the management of renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 2094–2105.
21. Coen G. Adynamic bone disease: An update and overview. *J Nephrol* 2005; 18: 117–122.
22. Moe SM, Drüeke T, Lameire N, Eknoyan G. Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007; 14: 3-12.

23. Demer L, Tintut Y. The bone-vascular axis in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 19: 349-353.
24. Saliba W, El-Haddad B. Secondary Hyperparathyroidism: Pathophysiology and Treatment. *J Am Board Fam Med* 2009; 22: 574-581.
25. Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology* 1987; 59(14): 91G–94G.
26. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* 2003; 228: 826–833.
27. Arad Y, Goodman KJ, Roth M, Newstein D, Guerci AD. Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: The St. Francis Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 158–165.
28. Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA* 2004; 291: 210–215.
29. Blacher J, Demuth K, Guerin AP, Safar ME, Moatti N, London GM. Influence of biochemical alterations on arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 535–541.
30. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1014–1021.
31. Raggi P, Boulay A, Chasan-Taber S, Amin N, Dillon M, Burke SK, Chertow GM. Cardiac calcification in adult hemodialysis patients: A link between end-stage renal disease and cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 695–701.

32. Lau WL, Festing MH, Giachelli CM. Phosphate and Vascular Calcification: Emerging Role of the Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter PiT-1. *Thromb Haemost* 2010; 104(3): 464–470.
33. Isales CM, Sumplio B, Bollag RJ, Zhong Q, Ding K, Du W, Rodriguez-Commes J, Lopez R, Rosales OR, Gasalla-Herraiz J, McCarthy R, Barrett PQ. Functional parathyroid hormone receptors are present in an umbilical vein endothelial cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E654–E662.
34. Li X, Speer MY, Yang H, Bergen J, Giachelli CM. Vitamin D Receptor Activators Induce an Anticalcific Paracrine Program in Macrophages: Requirement of Osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(2): 321–326.
35. Pai AS, Giachelli CM. Matrix Remodeling in Vascular Calcification Associated with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1637–1640.
36. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275: 964-967.
37. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida 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; 92: 362–367.
38. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952–958.
39. Sabin FR. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11(1): 5–7.

40. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85(3): 221–228.
41. George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, Suriano R, Shanmugam A, Mittelman A, Tiwari RK. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 24-31.
42. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, Zaccone V, Perfetti M, D'Amario D, Rebuzzi AG, Crea F. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2009; 30: 890-899.
43. Pompilio G, Capogrossi MC, Pesce M, Alamanni F, DiCampli C, Achilli F, Germani A, Biglioli P. Endothelial progenitor cells and cardiovascular homeostasis: Clinical implications. *Int J Cardiol* 2009; 131: 156-167.
44. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-353.
45. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, Fliser D. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 2004; 66: 641–646.
46. Goligorsky MS, Kuo MC, Patschan D, Verhaar MC. Review article : Endothelial progenitor cells in renal disease. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14: 291-297.
47. Krenning G, Dankers PY, Drouven JV, Waanders F, Franssen CF, van Luyn MJ, Harmsen MC, Popa ER. Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F1314–F1322.
48. Mohandas R, Segal MS. Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Vesicles – What Is the Significance for Patients with Chronic Kidney Disease? *Blood Purif* 2010; 29: 158-162.

49. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003; 108: 2710–2715.
50. George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovic J, Miller H, Keren G. Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2636–2641.
51. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, Potteaux S, Esposito B, Duriez M, Clergue M, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Merval R, Groux H, Tobelem G, Levy B, Tedgui A, Mallat Z. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E- knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation* 2003; 108: 2839–2842.
52. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593–600.
53. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predict future cardiovascular events Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981–2987.
54. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999–1007.
55. Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1314–1325.

56. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using UCT. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 827–832.
57. Kawazoe Y, Katoh S, Onodera Y, Kohgo T, Shindoh M, Shiba T. Activation of the FGF signaling pathway and subsequent induction of mesenchymal stem cell differentiation by inorganic polyphosphate. *Int J Biol Sci* 2008; 4(1): 37-47.
58. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004; 329(1): 77–84.
59. Lindberg JS, Culleton B, Wong G, Borah MF, Clark RV, Shapiro WB, Roger SD, Huserl FE, Klassen PS, Guo MD, Albizem MB, Coburn JW. Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 800–807.
60. Wiese RJ, Umland-Smith A, Ross TK, Prah J, DeLuca F. Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. *J Biol Chem* 1992; 267: 20082–20086.
61. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 353–361.
62. Brunner S, Zaruba MM, Huber B, David R, Vallaster M, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Franz WM. Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow. *Exp Hematol* 2008; 36: 1157–1166.
63. Napoli C, William-Ignarro S, Byrns R, Balestrieri ML, Crimi E, Farzati B, Mancini FP, de Nigris F, Matarrazzo A, D'Amora A, Abbondanza C, Fiorito C, Giovane A, Florio A, Varricchio E, Palagiano A, Minucci PB,

- Tecce MF, Giordano A, Pavan A, Ignarro LJ. Therapeutic targeting of the stem cell niche in experimental hindlimb ischemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 571–579.
64. Lomonte C, Derosa C, Vernaglion L, Casucci F, Losurdo N, Libutti P, Teutonico A, Basile C. Serum parathyroid hormone and phosphate influence the levels of circulating CD34+ cells in uremia. *J Nephrol* 2010; 23: 693–698.
65. Jiang D, Franceschi RT, Boules H, Xiao G. Parathyroid hormone induction of the osteocalcin gene. Requirement for an osteoblast-specific element 1 sequence in the promoter and involvement of multiple-signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 5329–5337.
66. Coll B, Betriu A, Martinez-Alonso M, Amoedo ML, Arcidiacono MV, Borrás M, Valdivielso JM, Fernández E. Large artery calcification on dialysis patients is located in the intima and related to atherosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 303–310.
67. Pal SN, Clancy P, Golledge J. Circulating concentrations of stem-cell-mobilizing cytokines are associated with levels of osteoprogenitor cells and aortic calcification severity. *Circ J* 2011; 75: 1227–1234.
68. Long MW, Williams JL, Mann KG. Expression of human bone-related proteins in the hematopoietic microenvironment. *J Clin Invest* 1990; 86: 1387–1395.
69. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15: 368–377.
70. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005; 23: 1105–1112.

71. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000; 275: 20197–20203.
72. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA Jr, Thadhani R. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1115–1125.
73. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med* 2003; 349: 446-456.
74. Yiu YF, Chan YH, Yiu KU, Siu CW, Li SW, Wong LY, Lee SW, Tam S, Wong EW, Cheung Bm, Tse HF. Vitamin D deficiency is associated with depletion of circulating endothelial progenitor and endothelial dysfunction in patient with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 96: E830–E835.
75. London GM, Guerin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, Métivier F. Mineral metabolism and arterial functions in endstage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 613–620.
76. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int* 2007; 72: 709–715.
77. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 484–715.
78. Mathew S, Lund RJ, Chaudhary LR, Geurs T, Hruska KA. Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1509–1519.
79. Doherty TM, Tang W, Dascalos S, Watson KE, Demer LL, Shavelle RM, Detrano RC. Ethnic origin and serum levels of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ are independent predictors of coronary calcium

- mass measured by electron-beam computed tomography. *Circulation* 1997; 96: 1477–1481.
80. De Boer IH, Kestenbaum B, Shoben AB, Michos ED, Sarnak MJ, Siscovick DS. 25-hydroxyvitamin D levels inversely associate with risk for developing coronary artery calcification. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1805–1812.
81. Ellam TJ, Chico TJ. Phosphate: The new cholesterol? The role of the phosphate axis in nonuremic vascular disease. *Atherosclerosis* 2012; 220(2): 310-318.