

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche: Progetto n. 2 "Ematologia Clinica e
Sperimentale ed Ematopatologia"

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/d3

Settore Scientifico disciplinare: MED-15

TITOLO TESI

Circulating Endothelial Progenitor Cells: isolation and
biological characterization of EPCs from healthy subjects
and nephropatic patients

Dott. Claudio Laterza

Presentata da:

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Stefano Aldo Pileri

Prof. Gianpaolo Bagnara

Esame finale anno 2012

INDICE

Introduzione	Pagina 5
Differenza nella formazione di colonie	pagina 7
Proprietà fenotipiche di EPCs	pagina 8
Caratteristiche biologiche	pagina 8
Stato dell'arte	pagina 13
Patologie di stampo metabolico	pagina 14
Patologie cardiovascolari	pagina 16
Patologie oncologiche	pagina 18
Patologie nefrologiche	pagina 19
Obbiettivi dello studio	pagina 23
Materiali e metodi	pagina 25
Isolamento cellulare e coltura cellulare	pagina 25
Alamar	pagina 25
Matrigel	pagina 26
Alizarine Red	pagina 28
Immunofluorescenza	pagina 29
Aggiunta di calcitriolo e paracalciltolo	pagina 29
alle colture cellulari	

Risultati	pagina 30
Coltura cellulare	pagina 31
Scelta del terreno di coltura	pagina 31
Matrigel	pagina 33
Immunofluorescenza	pagina 34
Alizarine Red	pagina 34
Conclusioni	pagina 35
Figure e tabelle	pagina 41
Bibliografia	pagina 54

INTRODUZIONE:

L'angiogenesi, sino al 1997 è stata considerata come un processo biologico in grado di diminuire l'ipossia locale in un tessuto a livello vascolare tramite la formazione di nuovi vasi a partire da un vaso preesistente;

la vasculogenesi cioè la formazione di vasi "de novo" comprendente l'angiogenesi e l'arteriogenesi, poteva avvenire solo nel feto qualora un progenitore endoteliale denominato "angioblasto" fosse riuscito a differenziarsi in una cellula endoteliale matura, dando origine a nuovi vasi tissutali.

Nel 1997 Asahara ed altri, furono in grado di isolare una popolazione di cellule circolanti nel torrente ematico, che mostravano caratteristiche proprie sia alle cellule endoteliali mature sia alle cellule progenitrici cioè a cellule più ancestrali.

Queste cellule furono denominate cellule endoteliali progenitrici (EPCs) e fu postulata l'ipotesi che potessero avere la capacità intrinseca di dare origine a cellule endoteliali mature tramite un processo denominato vasculogenesi postnatale.

La formazione "de novo" di vasi, venne così attribuita non come abilità di una singola popolazione cellulare di formare endotelio, ma

piuttosto ad una complessa collaborazione di differenti sottoclassi di cellule progenitrici, alcune delle quali con la capacità di diventare cellule endoteliali maturare e formare il lume dei vasi, mentre altre con la capacità di reclutare cellule tramite un'attività prettamente di tipo secretorio ed infine con anche l'ausilio da parte dell'endotelio danneggiato di comunicare in maniera paracrina con ambedue le classi di cellule precedentemente citate.

Indipendentemente dalle loro diverse caratteristiche e abilità intrinseche, queste due popolazioni cellulari furono classificate unicamente con il termine di EPCs.(1)

A seguito di numerosi studi, le EPC sono oggi indentificate come una piccola sottopopolazione di cellule del mononucleate presenti nel torrente circolatorio (circa lo 0,2 % di tutte le cellule mononucleate presenti nel sangue periferico);

sono stati sperimentati differenti metodiche di cultura cellulare in vitro onde cercare di selezionare ed espandere questa popolazione; per lo piu sono stati descritti 2 differenti metodi di coltura cellulare con i quali si è in grado di espandere due diverse sottopopolazioni cellulari denominate l'una early e l'altra late a seconda del tempo di crescita delle colonie in vitro;

il primo metodo fu utilizzato per la prima volta da asahara ed altri e successivamente modificato; in questo metodo cellule mononucleate prelevate dal sangue periferico oppure da sangue di midollo osseo, sono seminate su piastre precedentemente coatate con fibronectina; dopo circa 48 ore le cellule non aderenti sono

prelevate (onde evitare una contaminazione di macrofagi e altre cellule) e seminate in altri pozzetti precedentemente coatati con fibronectina. Il secondo metodo scoperto da Ingram ed al, comprende invece una prima semina e lo scarto delle cellule non aderenti dopo 2 giorni di coltura. (1;2)

Differenza nella formazione di colonie:

Early Endothelial progenitor cells:

Con il primo metodo di coltura, sperimentato da Asahara et al, le colonie tendono ad emergere dopo circa 5-9 giorni dalla seconda semina; al microscopio ottico si può osservare come esse siano formate da un core centrale di cellule di forma rotondeggiante mentre alla periferia della colonia si possono notare cellule con prolungamenti terminali (denominate infatti spindle shape cells).

Le colonie tendono a scomparire intorno alla seconda settimana di coltura. (1)

Late Endothelial progenitor cells:

Con il secondo metodo di coltura, le colonie tendono a formarsi tra il 7 e il 21 giorno; hanno differentemente dalle early una morfologia denominata a ciottolo essendo infatti per lo più tutte cellule dalla forma rotondeggiante.

Le colonie tendono a scomparire intorno alla terza settimana di coltura. (1)

Proprietà fenotipiche di EPCs

Per ciò che riguarda gli antigeni di superficie, ambedue le sottopopolazioni di EPC tendono ad esprimere il CD34, il recettore del Vascular Endothelilia Growth Factor 2 e il CD133 (detto anche KDR).

Le early EPCs esprimono inoltre un fenotipo molto simile a quello di cellule di derivazione monocito-macrofagica in quanto hanno un'alta espressione di cd31, von willdebrand factor e UEA1.

Un ulteriore marker espresso è il CD115.

Hanno inoltre espressione di CD45 e di CD14 che sono due antigeni propri di monociti e macrofagi.

Al contrario le Late EPCs non esprimono il CD14 e solo molto debolmente il CD45 che viene mano a mano perso con il passare dei giorni in cultura.

Recentemente è stato inoltre osservato come invece abbiano l'espressione del cd 144, del recettore della vitamina D e dell'acido retinoico. (3)

(vedi tabella 1)

Caratteristiche biologiche:

è stato pubblicato come sia le late che le early EPCs siano in grado di fagocitare Escherichia Coli e di avere un intake di LDL.

Per ciò che concerne le early EPCs è noto come esse siano in grado di produrre numerose Citochine pro-infiammatorie e di secernerle a livello del flusso ematico (quali per esempio il1, il-8, il6 e tnf); verosimilmente queste citochine avrebbero un'azione chemotattica sia per ciò che riguarda le cellule di tipo infiammatorio sia per late EPCS nel sito di infiammazione endoteliale;

è noto inoltre come tale popolazione cellulare non sia verosimilmente in grado di dare origine a veri e propri vasi sanguigni in vitro.

Verosimilmente quindi la loro funzione, che non è stata ancora del tutto spiegata, potrebbe essere di reclutamento e di attivazione cellulare nel sito di danno vascolare: questa attivazione potrebbe avvenire o tramite un reclutamento delle late EPCs nel sito oppure tramite una comunicazione di tipo paracrino con l'endotelio.

Inoltre è da tenere in considerazione è come questa popolazione cellulare sia prettamente di derivazione midollare:

recentemente infatti è stato pubblicato come queste cellule, in pazienti portatori di policitemia vera ed aventi la mutazione JAK2, abbiano loro stesse tale mutazione. (2,3)

Le late EPCs possono essere considerate come le vere e proprie cellule progenitrici endoteliali; non hanno un'attività secretiva di citokine a livello del sito di danno endoteliale, ma è stato descritto come esse siano in grado di creare in vitro e in vivo nuovi vasi sanguigni; non sono clonalmente correlate a cellule di tipo monocitario-macrofagico derivanti dal midollo osseo;

sono verosimilmente attivate e reclutate da numerosi fattori quali citochine pro-infiammatorie, fattori di crescita quali il G-CSF, e il GM-CSF; (4) la loro attività oltre a quella neoangiogenica è inoltre legata alla protezione del vaso sanguigno e ad un'attività di tipo anti calcifico riuscendo a comunicare con le cellule muscolari lisce dell'endotelio;(4)

l'osteopontina è una proteina secreta in circolo con attività anti calcifica; alcuni studi hanno visto come questa proteina sia espressa dalle late epc e da macrofagi in seguito ad attivazione con vitamina D attivata facendo presupporre che le late EPCs possano in qualche maniera effettuare un'azione anti calcifica a livello della placca ateromasica. (8)

L'osteocalcina invece è una proteina che recentemente si è vista essere espressa dalle EPCs qualora acquisiscano un fenotipo osteogenico e in grado di avere un'azione pro calcifica. (7)

Inoltre le late epc sono in grado di essere attivate dalla produzione di e-nos che spesso è rilasciato dalle cellule muscolari a seguito di un eventuale danno ipossico;

altri fattori in grado di potenziare e di attivare le late EPCs sono il calcio, la vitamina D il cui recettore è stato recentemente individuato a livello della superficie cellulare di tale popolazione cellulare, il vascular endothelial growth factor; (5;6)

Inoltre numerosi sono i fattori in grado di potenziare l'attività delle late EPCs: tra questi le statine e i Fattori di crescita, gli ace-inibitori e l'eritropoietina.

Negli ultimi anni le cellule progenitrici endoteliali circolanti, per la loro capacità di contribuire alla neoangiogenesi, sono state target di numerosi studi clinici in svariati campi della medicina; si è infatti ipotizzato che le late endothelial progenitor cells, essendo considerate come vere e proprie cellule endoteliali progenitrici per la loro capacità neoangiogenica intrinseca, potessero avere un ruolo eziopatogenico in numerose patologie; nello specifico si è ipotizzato un ruolo importante delle EPCs in quelle patologie in cui sia presente un'inflammatione sistemica e cronica riscontrando che la persistenza di flogosi è in grado di influenzare tale popolazione cellulare in maniera negativa per quanto concerne sia il numero di cellule in circolo sia le capacità funzionali di tali cellule. (5)

Per ciò che riguarda l'ambito nefrologico, in numerose patologie e in special modo nell'insufficienza renale cronica in ultimo stadio ed in pazienti in emodialisi da lungo tempo, le più comuni complicanze sono quelle di tipo cardio-vascolare.

Alcuni autori hanno attribuito come causa di queste complicanze, la presenza di un "empairment" nel numero e nelle funzioni delle cellule endoteliali progenitrici circolanti e tale coinvolgimento è stato oggetto di numerosi studi. Sono state postulate numerose ipotesi a riguardo: il siero uremico, ricco di tossine potrebbe sregolare l'attività delle cEPCs ed inoltre diminuirne il numero in circolo. La carenza di vitamina D inoltre potrebbe essere causa di un "empairment" delle abilità intrinseche delle cEPCs. La presenza di diabete mellito e di altre co-morbidità di tipo metabolico, potrebbe influenzare in maniera negativa il ruolo delle EPCs. Inoltre recentemente si è valutato anche un possibile ruolo di alcune proteine quali Clotho ed FGF23 (9). Tuttavia il meccanismo coinvolto nell' "empairment" tra EPCs e l'endotelio è tuttora sconosciuto ed in via di studio.

STATO DELL'ARTE:

Negli ultimi anni, progenitori endoteliali circolanti, per il loro coinvolgimento nel processo di angiogenesi, sono stati target di differenti tipi di studi in vitro e di protocolli clinici in differenti campi della medicina, presupponendo che nel particolare le Late endothelial progenitor cells potessero avere un ruolo eziopatogenetico in numerose patologie, o al contrario per eventualmente essere utilizzate come agente terapeutico in alcune patologie; In particolare è stato ipotizzato un ruolo delle EPCs in patologie infiammatorie croniche, pensando che questa sottopopolazione di cellule mononucleate potesse essere influenzata in maniera negativa sia per quanto riguarda il numero, sia per ciò che riguarda le loro abilità di tipo riparatorio e angiogenico da una flogosi reiterata.

Questa ipotesi ha condotto numerosi studi atti ad investigare quale sia e se vi sia un vero e proprio ruolo delle EPCs in numerose patologie in differenti branche della medicina spaziando dalla cardiologia, alle malattie di stampo metabolico, alla oncologia, l'ambito autoimmune e nefrologico.

Patologie di stampo metabolico:

Negli ultimi anni molti studi clinici e in vitro, sono stati condotti per cercare di spiegare un possibile coinvolgimento di EPCS in alcune patologie di tipo metabolico tra le cui spicca la sindrome metabolica ed il diabete mellitus.

Riguardo alla sindrome metabolica solo alcuni studi hanno studiato il possibile ruolo delle EPCS ma tutti quanti gli autori riportano che è presente un numero inferiore di EPCs rispetto al soggetto sano e che probabilmente questa alterazione nella popolazione di EPCs è dovuta alla ridotta presenza in circolo di fattori in grado di mobilizzare le cellule dal midollo osseo: tra questi fattori per esempio sono presenti l'IGF e il G-CSF (è da notare che la terapia con G-CSF e GM-CSF è in grado di aumentare drasticamente il numero di progenitori circolanti ed inoltre sia le late EPCs che le early EPCs esprimono sulla loro parete cellulare il recettore per il G-CSF e GM-CSF).

Un'ulteriore possibile causa di questa alterazione nel numero di EPCS potrebbe essere imputabile ad una aumentata resistenza al Vasculr Endotelial Growth Factor come è noto avvenire in patologie metaboliche quali per esempio il diabete.

Per ciò che concerne invece il diabete mellito e nel particolare il diabete mellito di tipo II, una possibile causa della disfunzione del numero e delle funzioni delle EPCs potrebbe essere la causa delle alterazioni a livello di riparazione endoteliale e di neoangiogenesi quindi di conseguenza una possibile concausa del manifestarsi di eventi di tipo cardiovascolari che in pazienti affetti da diabete mellito di tipo II sono la principale causa di morte..

A sostegno di questa ipotesi, alcuni studi hanno descritto come l'iperglicemia possa essere una concausa delle disfunzioni funzionali dei progenitori circolanti endoteliali.

EPCs isolate dal sangue periferico di pazienti diabetici sono in minor numero rispetto a soggetti normali.

Inoltre è stata riscontrata in soggetti diabetici una minor capacità di "homing", angiogenesi e migrazione.

Sono state postulate differenti ipotesi riguardo i possibili meccanismi che sono causa di tali alterazioni : per prima cosa una difettiva produzione di alcuni fattori rilasciati normalmente dai tessuti quali per esempio e-NOS e SDF-1^o (è noto che tali fattori sono rilasciati in quantità minori rispetto al soggetto

normale da tessuti che hanno acquisito una resistenza all'insulina); inoltre la presenza e il rilascio di citokine infiammatorie da parte del tessuto danneggiato o di cellule infiammatorie, potrebbe causare un difettivo "homing" di EPCS e un minore reclutamento delle stesse nel sito di danno.(10,11,12,13)

Patologie cardiovascolari:

DA quando Asahara ed altri dimostrarono che le cellule endoteliali progenitrici sono in grado di creare "de novo" vasi e di riparare un eventuale vaso danneggiato, molti clinici hanno riposto la loro attenzione nello studio di EPC, prima per cercare di capire se queste potessero essere un'eventuale causa del danno cardiovascolare e successivamente se potessero essere usate come eventuale terapia a seguito di eventi cardiovascolari acuti per eventualmente migliorare l'"outcome" di tali pazienti ed aumentarne il "lifespan".

In pazienti affetti da ipertensione è stato dimostrato che esiste un impairment tra il numero di EPCs circolanti e le loro funzioni di prevenzione del danno cardiovascolare rispetto a controlli sani.

Una possibile spiegazione potrebbe essere l'aumentata produzione di ROS che è facilmente riscontrabile in pazienti

con ipertensione essenziale oppure la presenza in circolo in cronico di citokine infiammatorie ed infine lo stress di tipo ossidativo.

È stato scoperto che l'angiotensina II, la quale modula normalmente le funzioni pressorie dell'organismo tramite l'asse renina-angiotensina-aldosterone, sembra accelerare la senescenza delle EPC; il meccanismo tramite cui avverrebbe questo processo sembra essere esercitato dall'espressione e dalla proteina GP91phox e dalla eccessiva produzione di ROS.

Gli ACE inibitori che spesso sono usati come terapia da soli o in co-terapia con sartani o calcio antagonisti e diuretici per il controllo pressori nel paziente iperteso, hanno dimostrato un'efficacia non solo nel mantenere la pressione a livelli normali ma inoltre nel migliorare il quantitativo di EPCs in circolo e nel migliorarne le capacità anticalcifiche e di riparazione dei vasi eventualmente danneggiati.

Numerosi sono i fattori che servono al reclutamento delle EPCs dal midollo osseo al sito di danno endoteliale;

per la maggior parte essi sono l'SDF1, l'hypoxia inducible factor e il VEGF come precedentemente citato per quanto riguarda le malattie metaboliche. Questi fattori sono secreti dall'endotelio e da cellule la cui azione chemotattica, per

cercare di reclutare le cellule endoteliali nel sito di riparare il vaso danneggiato.

Alcuni autori hanno scoperto e dimostrato che dopo circa 712 ore da un evento acuto di tipo ischemico, la presenza di EPCs in circolo, porta a una prognosi migliore, e può migliorare l'outcome del paziente;

inoltre probabilmente un trapianto autologo di EPCs direttamente impiantabili nel lembo muscolare inferiore rispetto al sito del vento acuto ischemico, porta a una guarigione e ad una prognosi migliore.

Questo è dovuto soprattutto alla ripresa del flusso sanguigno normale tramite il formarsi e l'utilizzo dei vasi collaterali.

(14,15,16,17,18)

Patologie oncologiche:

La neovascolarizzazione e la neoangiogenesi sono due "step" fondamentali nel processo di cancerogenesi;

negli ultimi anni è stata avanzata la teoria che l'inibizione della neoformazione vascolare potrebbe risultare come un'efficace terapia antitumorale; le EPCs per la loro capacità intrinseca di formare vasi de novo, potrebbero giocare un ruolo di un certo significato nella formazione tumorale, per tale

motivo sono diventate un focus dell'attenzione di molti sperimentatori in quanto una loro possibile inibizione potrebbe risultare efficace dal punto di vista terapeutico.

Alcuni studi sono stati condotti affrontando la tematica di inibire l'angiogenesi in differenti tipi di carcinoma quali il cancro gastrico, il carcinoma polmonare, il carcinoma della mammella e quello intestinale nonché in alcune forme tumorali di pertinenza ematologica.

È stato dimostrato che molti fattori proangiogenici come il VEGF e il bFGF, insieme a numerosi altri sono secreti dalle cellule tumorali per il reclutamento a livello midollare delle EPCs fino al sito del tumore.

Alcuni studi clinici hanno evidenziato che l'efficacia di alcuni farmaci antiangiogenici quali inibitori di proteosoma, NF-κB inibitori etc, sono utili nell'inibire la neoangiogenesi.

Comunque al contrario di un primo entusiasmo il ruolo reale delle EPCs nella creazione di nuovi vasi da parte di tumori è stato messo in discussione. (19,21,22,23,24)

Patologie nefrologiche:

In nefrologia, pazienti affetti da insufficienza renale cronica, ed in emodialisi da lungo tempo, hanno un peggior prognosi di sopravvivenza, soprattutto per il verificarsi di eventi avversi

di tipo cardio-vascolare. C'è evidenza che il processo di aterosclerosi arteriosa è accelerato nei pazienti affetti da "Chronic kidney disease" ed inoltre il processo di neoangiogenesi che sarebbe comunque un grado di compensare un eventuale processo ischemico acuto, è comunque alterato.

Questo fenomeno è stato per lo più spiegato dalla presenza di alcuni fattori di rischio quali per esempio l'aumentato livello di LDL sieriche, l'ipertensione arteriosa di stampo renale e alterazioni di tipo metabolico quale per esempio l'alterato metabolismo glucidico che spesso è presente in pazienti da lungo tempo nefropatici.

Nella popolazione sana, le cellule endoteliali progenitrici, dopo una prima mobilitazione che avviene dal midollo osseo tramite la secrezione di citokine e altri fattori chemotattici secreti dall'interstizio e dall'endotelio dopo un evento di tipo ischemico, sono deputate al mantenimento dell'integrità dell'endotelio.

Alcuni autori hanno imputato al malfunzionamento e al ridotto numero di EPCs in circolo, la causa della maggiore possibilità di eventi cardiovascolari nel paziente con insufficienza renale cronica rispetto al soggetto sano.

Sono stati attuati numerosi studi clinici e biologici atti a definire il reale ruolo delle EPCs e il loro impatto qualora siano

danneggiate in malattie renali croniche. C'è evidenza che in vitro le tossine presenti in un siero di tipo uremico, possano in qualche modo inibire le funzione delle cellule endoteliali progenitrici circolanti, diminuirne il numero e d inoltre alterarne le capacità funzionali.

A seguito di questo è stato evidenziato che anche in vivo, pazienti con alti livelli di tossine uremiche quali per esempio la beta2microglobulina, il fosfato, l'acido indolacetico hanno un minor numero di EPCs nel sangue periferico ed inoltre queste EPCS hanno alterazioni a livello funzionale.

Alcuni autori hanno quindi cercato di studiare se vi è una correlazione tra il numero di EPC e lo stadio della malattia renale: c'è evidenza sperimentale che sin dal primo stadio dell'insufficienza renale vi è un alterato numero di progenitori circolanti il quale diminuisce mano a mano che lo stadio della malattia è più avanzato fino a giungere al livello di ERSD in cui si ha il picco più basso del numero di EPCs.

Da notare comunque c'è che l'emodialisi è parzialmente in grado di migliorare il numero di EPCs in circolo; inoltre l'introduzione nella terapia di questi pazienti di eritropoietina ricombinante, oltre che a migliorare lo stato anemico di tali pazienti, sembra essere in grado di migliorare e di aumentare il reclutamento di EPCs dal midollo osseo.

Di recente è stata postulata l'ipotesi che alcune proteine quali per esempio CLOTHO, e FGF23 possano avere un'influenza negativa in termini di funzioni di EPCs e ciò è stato verificato.

Solo di recente è stato ipotizzato che la carenza di vitamina D attivata possa giocare un ruolo nella patologia nefrologica coinvolgendo l'attivazione delle EPCs in maniera negativa ed inibendo in parte le loro abilità di tipo anti calcifico e neoangiogenico.

La vitamina D è spesso riscontrata carente in molti pazienti affetti da insufficienza renale cronico da lungo tempo; è da ricordare che la vitamina D, per avere funzione di calcio trasportatore deve essere attivata da un primo passaggio a livello epatico e da un secondo passaggio a livello renale subendo un idrossilazione tramite l'enzima 1,25 OH idrossilasi.

Nel paziente con insufficienza renale cronica tale enzima visto il danno a livello renale è spesso diminuito e il paziente di conseguenza non avendo Vitamina D attivata a livello sufficiente, non è in grado di metabolizzare calcio a sufficienza con la dieta e spesso a seguito dell'ipocalcemia, si instaura un iperparatiroidismo secondario che a sua volta è causa spesso di osteomalacia.

L'introduzione nella terapia di calcitriolo o di paracalcitolo che è un analogo attivo della Vitamina D è in grado di migliorare o

di prevenire l'insorgenza di iperparatiroidismo; solo recentemente è stato studiato che pazienti affetti da malattia cronica renale, a seguito dell'introduzione nella terapia di calcitriolo e paracalcitolo hanno un "lifespan" migliore grazie soprattutto alla minore incidenza di eventi avversi di tipo cardiovascolare.

Si è quindi rivalutata l'attenzione nel cercare di capire in quale maniera la presenza di vitamina D attivata possa migliorare il verificarsi di eventi aterosclerotici; si è visto che il numero di EPCS dopo la somministrazione di Vitamina D attivata è aumentato;

tuttavia in pazienti che assumono alte dosi di calcitriolo, la presenza di iperfosfatemia e ipercalcemia può determinare calcificazioni a livello dell'intima.

Al contrario la terapia con paracalcitolo, è comunque capace di ridurre la presenza di placche ateromasiche anche in presenza di alti livelli di tossine uremiche.

(26-32)

OBIETTIVI DELLO STUDIO:

- Valutazione delle proprietà biologiche delle EPCs in soggetto sano e di un metodo di coltura adeguato.
- valutazione delle EPCs in un soggetto nefropatico.
- valutazione dell'eventuale effetto di calcio, calcitriolo e paracalcinolo sulle EPCs di un soggetto nefropatico

MATERIALI E METODI:

Isolamento cellulare e coltura cellulare:

Sono stati prelevati 27 ml di sangue per ogni paziente o donatore sano in provette da 9 ml in EDTA.

Per separare il sopranatante contenete le cellule della serie bianca dal resto del sangue, è stato utilizzato un gradiente di ficoll:

è stato portato a volume di 35 ml il sangue prelevato diluendolo in pbs;

15 ml di ficoll sono stati versati in una Falcon da 50 ml e successivamente è stato versato il sangue diluito mantendo

la pipetta aderente alla parete della provetta in modo da non versare il sangue al di sotto del ficoll

La provetta è stata centrifugata a 150 rpm per 30 minuti.

È stato poi estratto il sopranatante.

Successivamente sono stati eseguiti 2 lavaggi con pbs addizionato 2% di fbs e centrifugando il tutto per 10 minuti alla velocità di 135 rpm.

Il buffy coat è stato isolato e poi successivamente diluito con pbs al 2 % di fbs allo stesso volume;

successivamente è stato risospeso il pellet in egm2mv o CFU-HILL in 3ml di terreno e quindi seminato in piastre da 24 pozzetti coatate con fibronectina al volume di 2 ml per well (circa 1.500.000 cellule) dopo una conta cellulare con metil violetto al microscopio ottico.

La piastra è stata poi riposta in incubatore alla temperatura di 37°C per 5 giorni.

Al giorno +5 è stato eseguito il primo cambio di terreno previo lavaggio con pbs al 2% di fbs.

I successivi cambi di terreno sono stati eseguiti ogni 3 giorni dopo osservazione al microscopio

ottico per un massimo di 4 settimane.

Alamar:

è stata impiegata la metodica dell'Alamar per la valutazione di quale terreno di coltura utilizzare per i successivi isolamenti:

dopo un isolamento di cellule mononucleate come precedentemente descritto, al giorno +5 dalla prima semina, le cellule sono state staccate dalla piastra per essere riseminate in una piastra da 96 well.

Sono state contate al microscopio ottico con metil violetto.

La concentrazione di cellule seminate nei pozzetti della piastra da 96 well è stata di 160.000 cellule per pozzetto.

Come terreno è stato utilizzato sia CFU-HILL sia EGM2MV.

Le cellule sono state seminate con terreni con aggiunta al 2% di Alamar; ad ogni pozzetto seminato nella piastra da 96 pozzetti è stato aggiunto terreno nella quantità di 1 ml.

Le cellule sono state fatte riposare per 4 ore in incubatore a 37°C. È stato successivamente calcolato il metabolismo cellulare tramite luminometro per la valutazione della crescita cellulare.

È stato osservata la crescita delle cellule a 4, 6 e 24 ore dalla risemina in Alamar.

Per la valutazione del tempo di crescita cellulare massimo disponibile, è stata sempre utilizzata la metodica dell'Alamar:

cellule di uno stesso paziente sono state seminate in piastre da 96 pozzetti dopo 5 giorni dal primo isolamento.

Come precedentemente descritto le cellule sono state contate e poi riseminate alla concentrazione di 160.000 per pozzetto con terreno in questo caso CFU-Hill addizionato al 2% di alamar.

Le cellule sono state osservate dopo 24-48 e dopo 1-2-3-4 settimane al luminometro.

.

Matrigel:

è stato utilizzato saggio su matrigel (Sigma-Aldrich St Louis, MO) onde valutare la capacità delle EPCs di organizzarsi e infine formare strutture capillaro-simili.

50 microlitri di matrigel sono stati applicati in ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti e incubati per 1 ora a 37 °C.

50 microlitri di DMEM contenente 10.000 Late-EPCs sono stati seminati in gel matrix e incubati a 37°C.

La formazione di strutture capillaro-simili è stata successivamente osservata a 2, 4, 6, e 8 ore.

Inoltre è stata valutata anche dopo 4 settimane dalla messa in coltura cellulare.

Alizarine Red:

Le colture di EPCs sono state analizzate per valutare i depositi di calcio presenti nella matrice.

Le cellule sono state fissate con formalina a pH neutro e quindi aggiunte e colorate con soluzione di Alizarina rossa all'1%.

L'analisi qualitativa è stata fatta utilizzando un microscopio ottico.

L'analisi quantitativa è stata ottenuta tramite la risolubilizzazione di alizarina rossa e l'analisi dell'assorbanza a 405 nm.

Immunofluorescenza:

Late EPCs sono state direttamente coltivate su vetrini successivamente impiantati in piastre da 24 pozzetti.

Le cellule sono state poi fissate alla 3 settimana di coltura in 2% di paraformaldeide e permeabilizzate con triton 0,2 % X 100.

il legame aspecifico è stato preventivamente evitato saturando con albumina sierica bovina al 4%.

Le cellule sono poi state incubate con anticorpo anti osteocalcina (R&D System) e fitc come anticorpo secondario.

è stato DAPI utilizzato per visualizzare il nucleo al microscopio a luce polarizzata.; (ECLIPSE 50L, NIKKON, TOKIO).

Aggiunta di calcitriolo e paracalcitolo alle colture cellulari:

Al giorno +5 dall'isolamento, a seguito del primo cambio di terreno, è stato aggiunto al terreno 0.1 mcl di calcitriolo e 0.5 /50 mcl di paracalcitolo onde valutarne l'eventuale tossicità; è stato inoltre aggiunto calcio cloruro alla concentrazione di 1,5 Mm ad ogni cambio di terreno successivo, nei pozzetti in era avvenuta una prima aggiunta di calcitriolo e paracalcitolo, è stato aggiunto calcitriolo e paracalcitolo.

Successivamente dopo la valutazione della tossicità di calcitriolo e paracalcitolo la concentrazione dei due farmaci è stata stabilita a 0,1 nM.

Risultati

Coltura cellulare

Dopo circa 7 giorni dalla semina delle Late EPCs, colonie hanno iniziato a formarsi con la tipica forma a ciottolo già descritta da Ingram; le colonie hanno iniziato a scomparire intorno alla 3 settimana di messa in coltura; La vitalità cellulare delle EPCs prelevate da donatore sano è stata quindi valutata fino a 1 mese di coltura tramite la metodica dell'Alamar (con Alamar si è in grado di valutare il metabolismo cellulare) le cellule hanno mostrato un picco di crescita fino a 3 settimane (grafico 2).

Scelta del terreno di coltura

In letteratura, sono riportati 2 terreni di coltura per la crescita di EPCs: il CFU-Hill e l'EGM2-MV:

sono stati valutati ambedue per decidere quale utilizzare per la crescita cellulare;

in entrambi i casi la crescita cellulare è stata molto ridotta verosimilmente dovuto alla bassa concentrazione di cellule seminate; (vedi grafico 2).

le cellule coltivate con CFU-Hill sono comunque più numerose e cresciute di più rispetto a quelle

coltivate con EGM2-Mv come medium per cui è stato deciso di optare per il CFU-Hill come terreno di coltura.

Valutazione della quantità di calcio paracalcitolo e calcitriolo da aggiungere al terreno:

per valutare un eventuale effetto in senso positivo sulle EPCs di calcitriolo e paracalcitolo, si è deciso di aggiungere tali farmaci al terreno in coltura:

dapprima si è cercato di valutare quale fosse la dose tossica in cui sono stati aggiunti 0.5 e 5 nanogrammi di calcitriolo e paracalcitolo nei pozzetti e valutata l'eventuale tossicità;

inoltre è stato aggiunto calcio cloruro nel terreno alla concentrazione di 1.5 mmol.

Nei pozzetti in cui è stato seminato il paracalcitolo e il calcitriolo alla più alta concentrazione, le cellule hanno mostrato dopo già 3 giorni dalla semina un inizio di picnosi andando via via verso l'apoptosi;

inoltre al giorno +7 nel terreno sono comparsi cristalli di ossalato di calcio;

per questo motivo è stata valutata molto tossica la concentrazione dei 2 farmaci (che comunque era 100 volte più alta rispetto a quella fisiologica) e si è optato per una coltura con 0.5 nanogrammi di ambedue i farmaci.

Matrigel

È stato eseguito saggio con matrigel onde valutare la funzionalità delle cellule precedentemente coltivate:

una volta seminate le cellule nei pozzetti con matrigel, la mobilità di tali cellule ed eventuali cambiamenti morfologici sono stati osservati a 2-4-6-8 ore;

nel donatore sano nel paziente nefropatico in terapia con paracalcitolo dopo 4 ore dalla messa in matrigel, le cellule

hanno iniziato ad organizzarsi diventando allungate e raggiungendo i 4 poli come a cercare di formare un lume di un vaso.

nel paziente nefropatico non in terapia farmacologica con calcio, le cellule non si sono organizzate;

Immunofluorescenza

È stata valutata la presenza di osteopontina onde valutare la possibile attività anti calcifica delle late EPCs;

nel soggetto nefropatico, senza aggiunta in vitro di calcitriolo o paracalci tolo non vi è espressione di osteocalcina al contrario nel paziente nefropatico con aggiunta in vitro di calcitriolo sol una bassa espressione;

nel paziente nefropatico con aggiunta in vitro di paracalci tolo vi è alta espressione di osteocalcina.

Alizarine red

È stata valutata tramite la colorazione di alizarine red la capacità di EPCs di assorbire calcio:

nel paziente nefropatico senza aggiunta di farmaci in vitro e nel paziente nefropatico con aggiunta di calcitriolo, l'intera matrice si è colorata significando che non vi è attività anti calcifica;

nel paziente con aggiunta di paracalcitolo la matrice non si è colorata ma a contrario si sono colorate i citoplasmici cellulari : in questo caso le cellule hanno assorbito il calcio presente nel terreno.

È stata eseguita inoltre una quantificazione allo spettrofotometro atto a caratterizzare in termini numerici la presenza di colorazione rossa di fondo.

Conclusioni

Nel paziente nefropatico è noto come la prognosi di tali pazienti sia peggiore rispetto alla popolazione sana soprattutto per il verificarsi di eventi avversi di tipo cardiovascolare;

è noto come inoltre nel paziente con malattia cronica renale, il processo di atro sclerosi vascolare sia accelerato rispetto al soggetto sano;

recentemente si è ipotizzato che le Endothelial Progenitor Cells, per la loro capacità intrinseca di proteggere l'endotelio, di comunicare con esso in maniera paracrina e per la loro attività angiogenica possano essere coinvolte nel verificarsi di eventi cardio-vascolari;

si è rivolta quindi l'attenzione allo studio di queste ultime onde per prima cosa cercare di caratterizzarle da un punto di vista biologico e funzionale e in un secondo momento di valutare se il possibile inserimento nella terapia del paziente nefropatico cronico di vitamina D attivata possa in qualche maniera giocare un ruolo favorevole nell'attivazione o nell'ampliamento delle funzioni delle EPCs.

Per prima cosa si è cercato di valutare quale terreno tra i 2 più comunemente usati ovvero il CFU-Hill e L'EGM2-mv fosse il più efficace nel coltivare le Late EPCs: si è optato per il CFU-Hill;

successivamente si è valutato su prelievo da soggetto per quanto tempo le cellule fossero in grado di proliferare e di formare colonie:

si è visto con la metodica dell'Alamar come esse siano in grado di formare colonie fino ad un massimo di circa 3 settimane.

Quindi si è valutato eventuali differenze nella crescita di colonie tra un soggetto sano e un soggetto nefropatico non

in terapia con Vitamina D attivata e con aggiunta in terapia di calcitriolo e paracalcitolo: le colonie sono cresciute maggiormente nel soggetto sano e nel pz in terapia con vitamina D attivata;

si è inoltre valutato tramite saggio in matrigel la capacità funzionale delle late epc sempre tra soggetto sano, soggetto nefropatico non in terapia con calcitriolo e in terapia con calcitriolo: fra tutti e tre i campioni, le cellule prelevate dal soggetto sano e dal soggetto in terapia con calcitriolo hanno mostrato una migliore capacità di organizzazione migliore venendo a supporre che nel paziente nefropatico vi sia un deficit di EPCs in termine di funzionalità e di numero e che una eventuale terapia con calcitriolo sia eventualmente in grado di ripristinare tale deficit.

Successivamente, ottenuti questi risultati si è cercato di comprendere in vitro come le Late EPCs possano essere influenzate dall'aggiunta in vitro di calcio;

per prima cosa si è valutato la concentrazione non tossica di calcitriolo e paracalcitolo in vitro: si è notato che una concentrazione di circa 50 nM è tossica per le cellule venendosi a formare cristalli di ossalato di calcio; si è così deciso di mantenere una concentrazione di 0.5 nM di calcitriolo e 1.5 nM di paracalcitolo;

si è successivamente valutata la crescita di colonie tra soggetto nefropatico senza aggiunta di vitamina D, con aggiunta di calcitriolo e di paracalci tolo:

il numero di colonie aumentato in quei pozzetti seminati con aggiunta al terreno di paracalci tolo;

nei pozzetti seminati con calcitriolo le colonie iniziano a formarsi più precocemente venendo a mostrare che l'aggiunta di vitamina D in qualche maniera riesce comunque a migliorare le capacità e il numero delle Late EPCs.

Quindi è stata valutata la capacità anti calcifica delle EPCs in soggetto nefropatico senza vitamina D, con calcitriolo e paracalci tolo;

dopo l'aggiunta nel terreno di calcio cloruro, è stato fatto un saggio con colorazione di alizarine red.

dopo 3 settimane di coltura: si è visto come nei pazienti in terapia in vivo con paracalci tolo e con aggiunta nel terreno di paracalci tolo, la matrice non venga colorata quindi non vi sia la presenza di cristalli di calcio ma solamente le cellule siano al loro interno colorate, venendo quindi a presupporre che tali cellule abbiano una verosimile attività anti calcifica;

si è notato al contrario che la popolazione cellulare prelevata da soggetti nefropatici cronici e senza aggiunta di vitamina D attivata si ha la più alta percentuale di colorazione della matrice.

È stata quindi valutata inoltre con la stessa casistica la presenza o meno di osteocalcina che è una proteina intracellulare che è espressa per lo più da cellule con attività pro calcifica o comunque con un fenotipo di stampo osteogenico: tramite l'immunofluorescenza si è visto che cellule dopo la terza settimana di coltura prelevate da pazienti in terapia con paracalcitolo e con aggiunta in vitro di paracalcitolo, non abbiano un'elevata espressione di questa proteina al contrario colonie di pazienti non in terapia in vitro ne in vivo, la esprimono ad alti livelli;

da questi risultati si può quindi presupporre che nei pazienti nefropatici da lungo tempo, le Late EPCs sono probabilmente dal siero uremico e dalla carenza di Vitamina D attivata danneggiate sia per il numero sia per le capacità funzionali;

l'aggiunta in terapia di alte dosi di paracalcitolo potrebbe giocare un ruolo molto importante nell'outcome di tali pazienti: la qualità di vita e la durata della vita potrebbe essere migliorata in quanto si potrebbero verificare eventi avversi di tipo cardio-vascolare molto minori rispetto al paziente non trattato; questo dovuto alla capacità del paracalcitolo di migliorare le funzioni delle EPCs di protezione del vaso sanguigno e di inibizione del processo di aterosclerosi.

comunque da notare come molti altri fattori possano entrare in gioco come per esempio la presenza in terapia di altri farmaci, emodialisi e le comorbidità soprattutto di tipo metabolico.

EPCs markers expression:

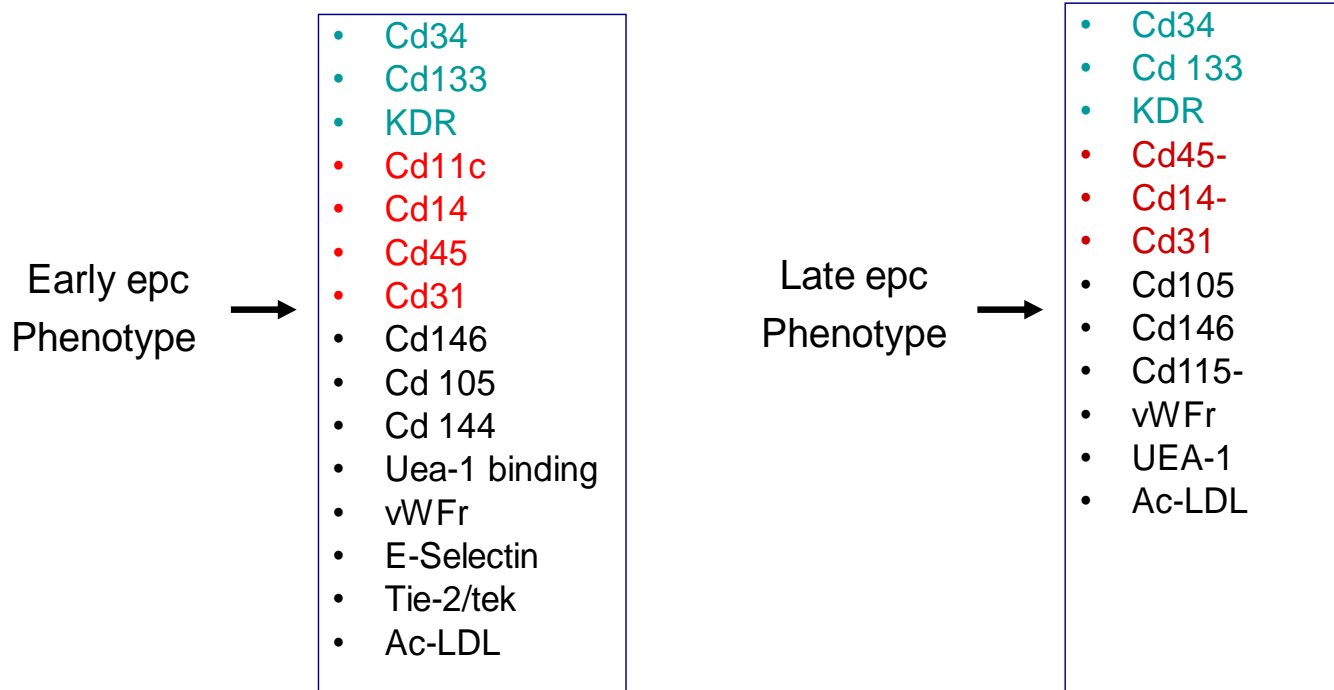
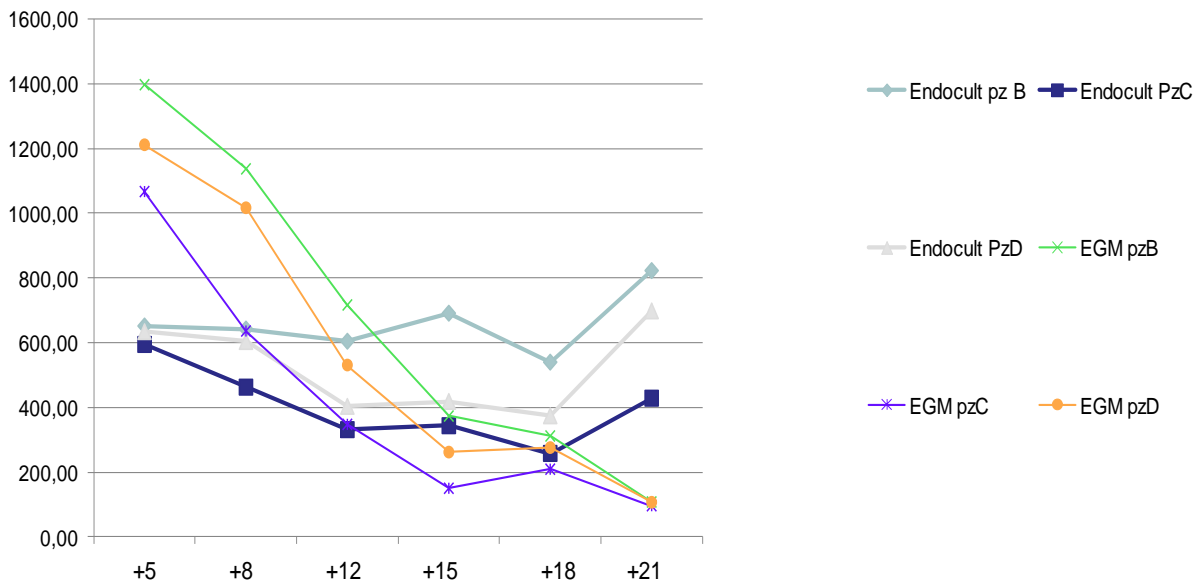


Tabella 1:

Differenze nelle espressione di marcatori di superficie tra Early e Late EPCs.

Growth curve

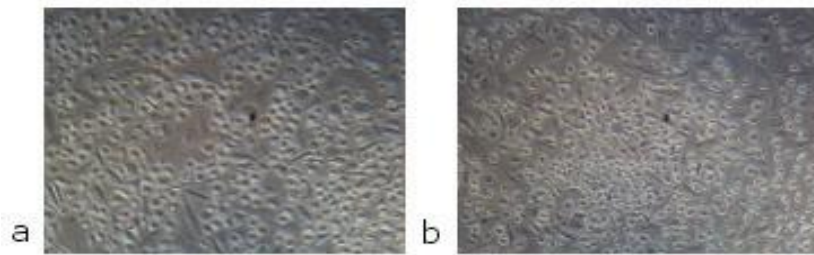
Curva di crescita Late EPCs



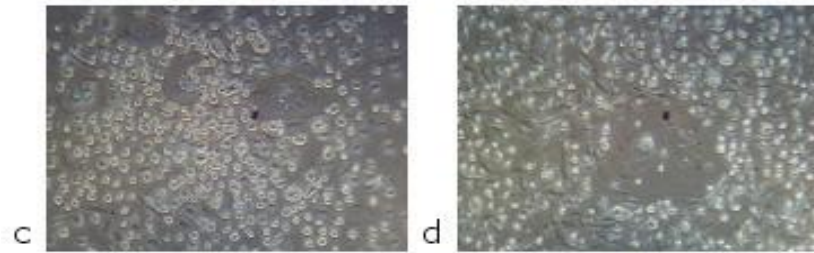
Valutazione delle curve di crescita delle Late EPCs con EGM2-mv e CFU-hill fino a +21 giorni dall'isolamento. Sono state valutate 3 differenti tipi di coltura cellulare: terreno di inizio CFU-hill,, con al primo cambio terreno di coltura cfu-hill o egm,2-mv; con EGM2-mv si dall'inizio della coltura cellulare

Cultures

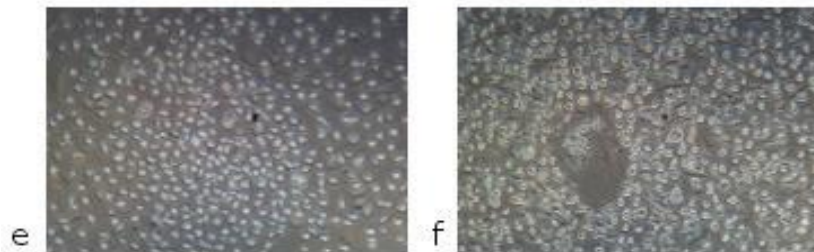
•No therapy



•calcitriol



•paricalcitol



•0.05ng/ml

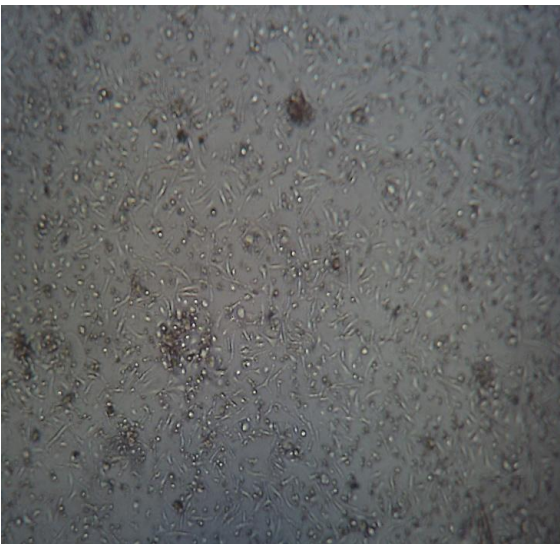
•0.5ng/ml

Differenze nella coltura cellulare con aggiunta calcitriolo e paracalcitolo in vitro.

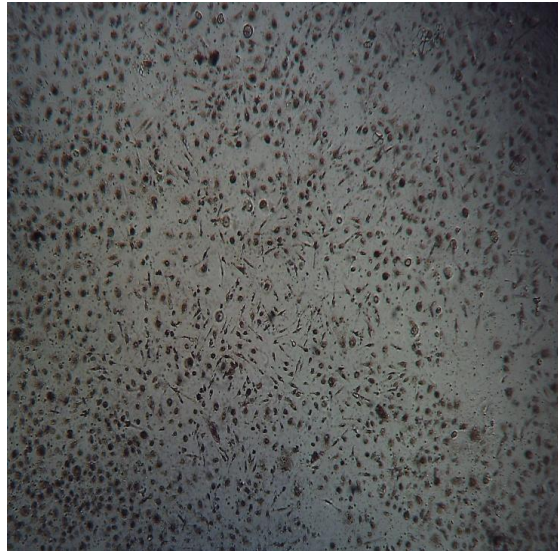
Il media basale è stato sempre CFU-HILL.

Cultures

- calcitriol

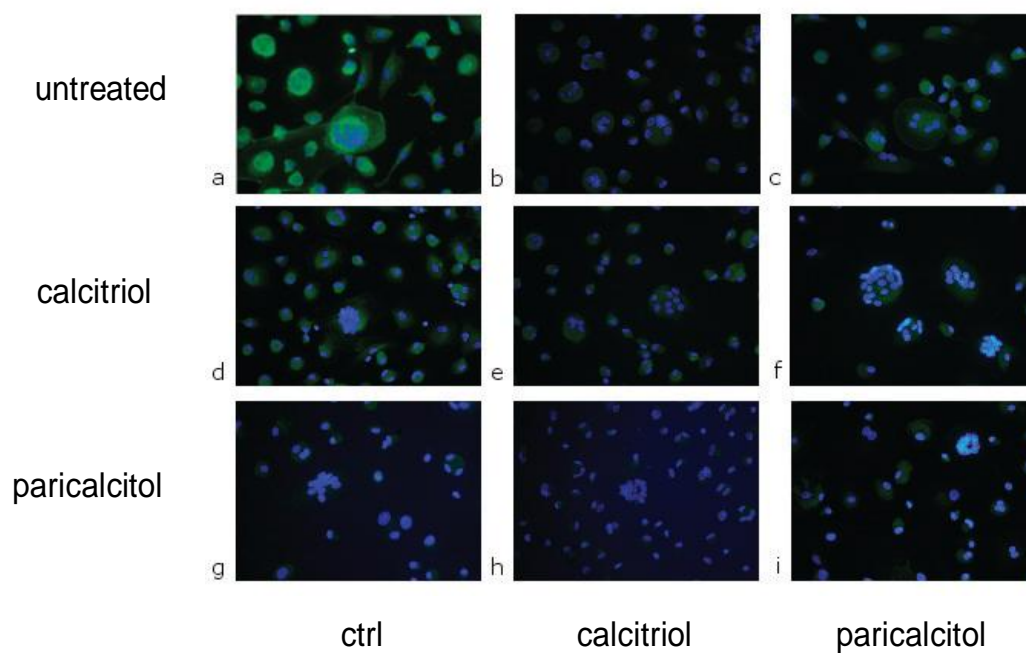


- paricalcitol



Differenza nello sviluppo di coltura cellulare con aggiunta di calcitriolo e paracalcitolo in vitro

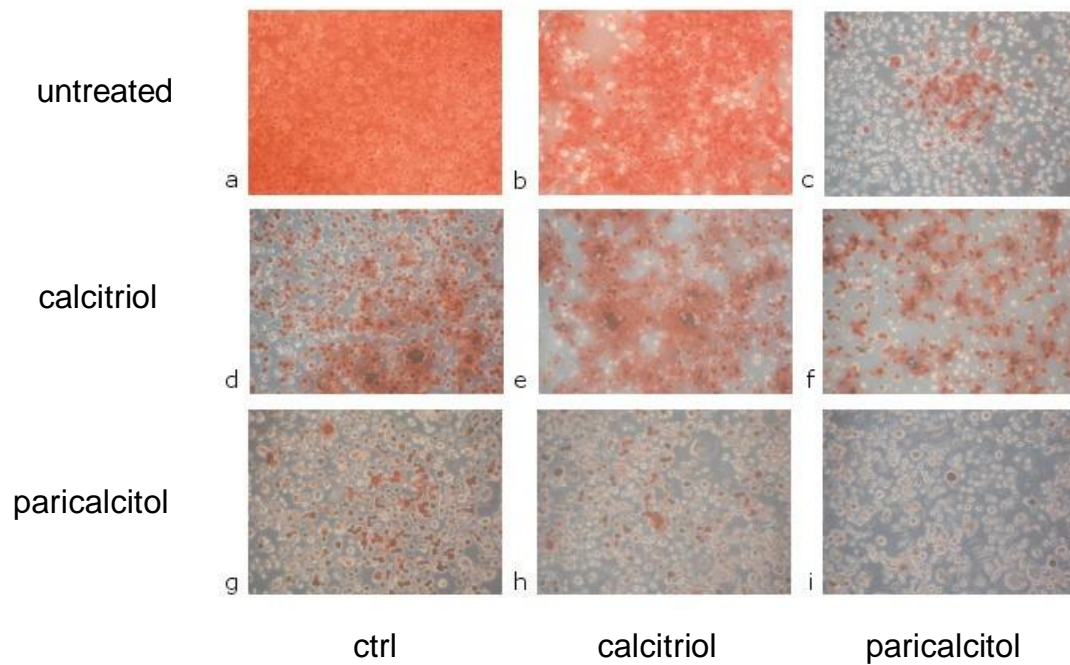
Immunofluorescence of osteocalcin



Immunofluorescenza di osteocalcina:

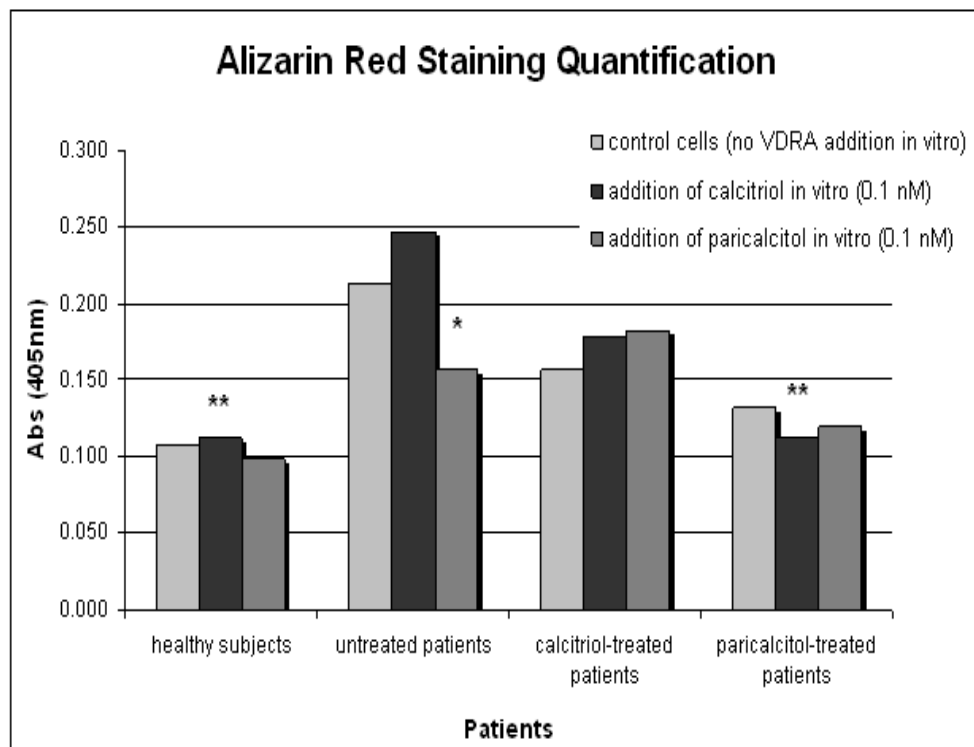
valutazione dell'espressione di osteocalcina in pazienti nefropatici non trattati in vivo o trattati in vivo con calcitriolo e paricalcitol e con l'aggiunta in vitro di calcitriolo e paricalcitol

Alizarin Red

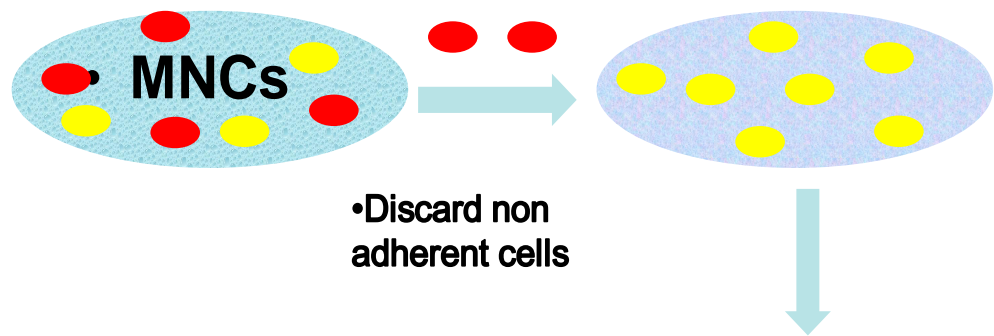


Valutazione dei depositi di calcio nella matrice con colorazione istologica "alizarine red" in pazienti nefropatici non trattati in vivo o trattati in vivo con calcitriolo e paracalcitolo e con l'aggiunta in vitro di calcitriolo e paracalcitolo

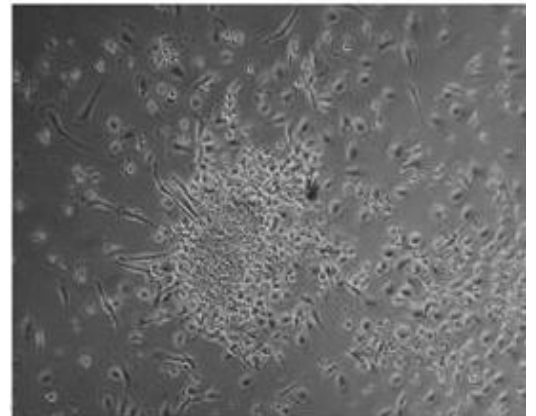
Alizarin Red quantification



Quantificazione di alizarine red in pazienti nefropatici non trattati in vivo o trattati in vivo con calcitriolo e paracalcitolo e con l'aggiunta in vitro di calcitriolo e paracalcitolo

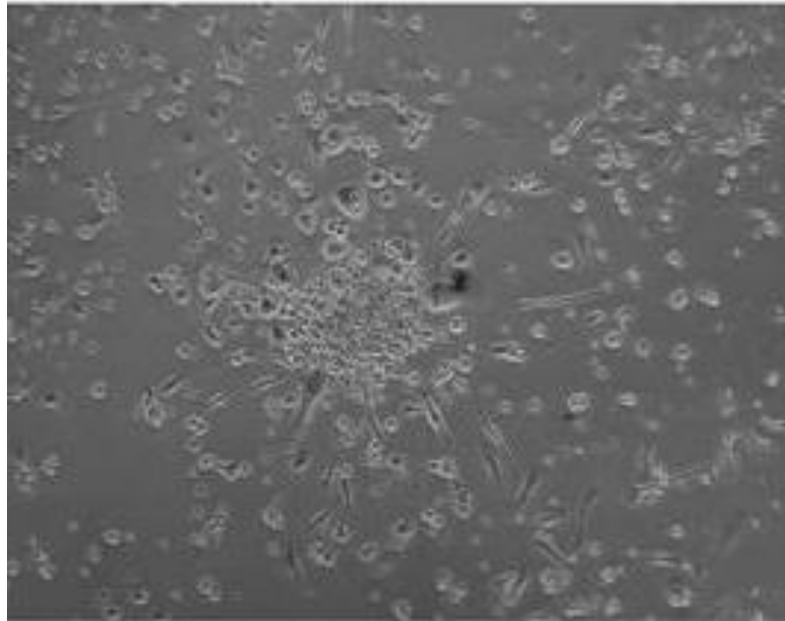


- Growth after 7-21days
- Able to forming vessels in vitro
- Not secreting cytokines
- Acting similar to huvec



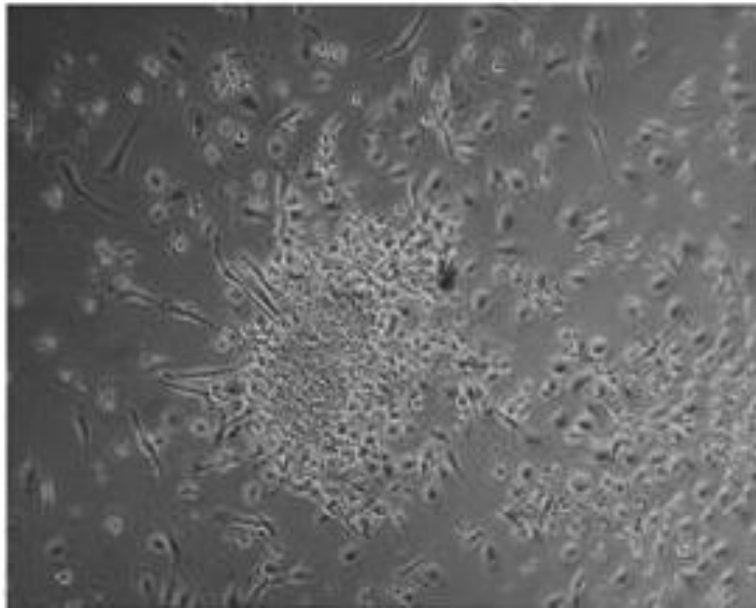
Metodo di coltura di late EPCs. E principali caratteristiche biologiche

Late EPCs Healthy controls



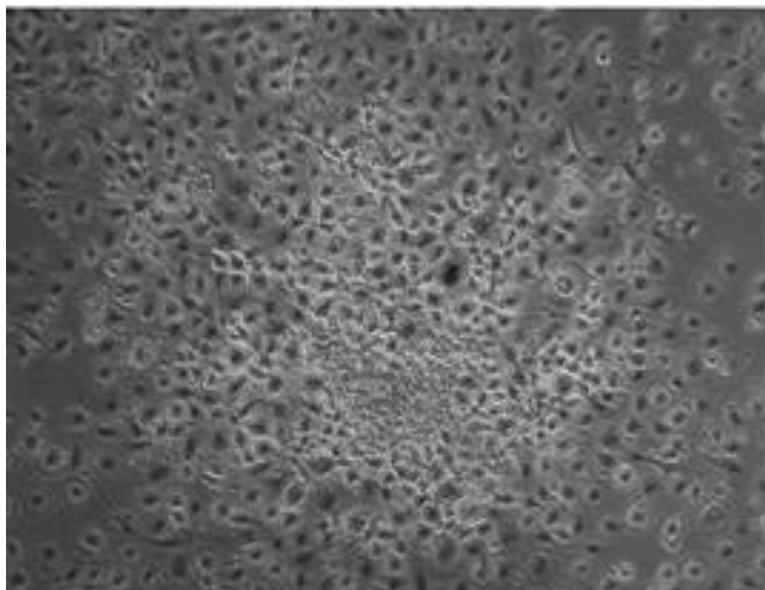
Coltura di Late EPCs da controllo sano

Late EPCs Vit. D Treated



Coltura di Late EPCs da paziente trattato in vivo con alte dosi di Vitamina D attivata

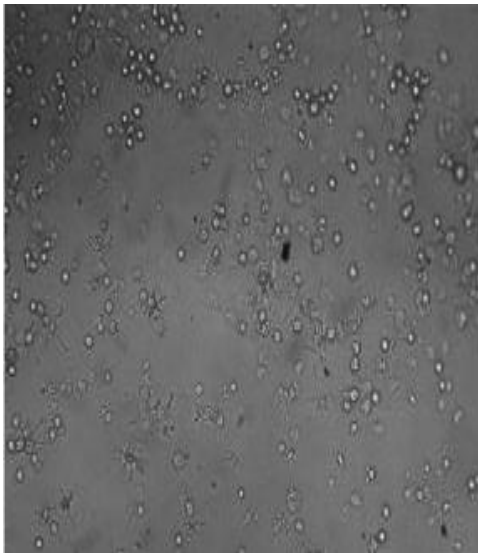
Late EPCs Untreated



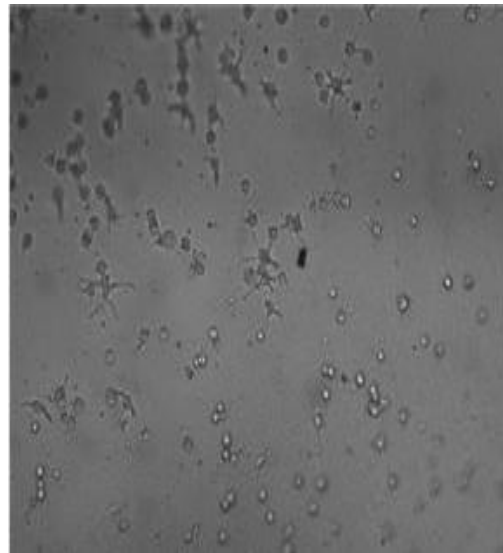
Coltura di Late EPCs da paziente nefropatico non trattato in vivo con Vitamina D attivata

Healthy controls

2 hours



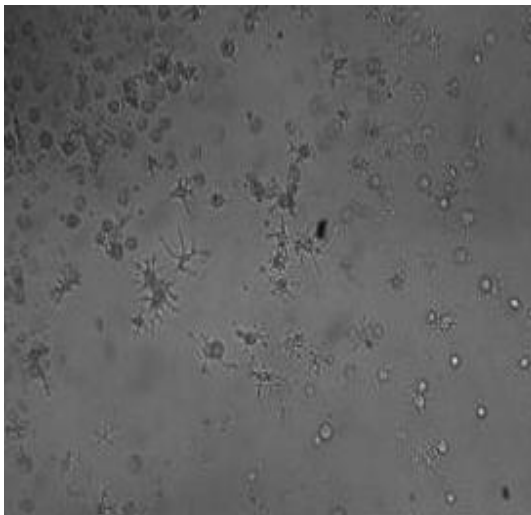
8 hours



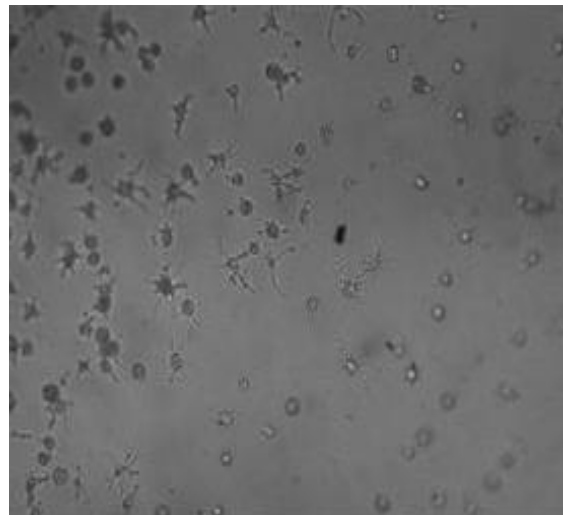
Matrigel dopo 2 e 8 ore in controllo sano

Vit. D Treated

2 hours



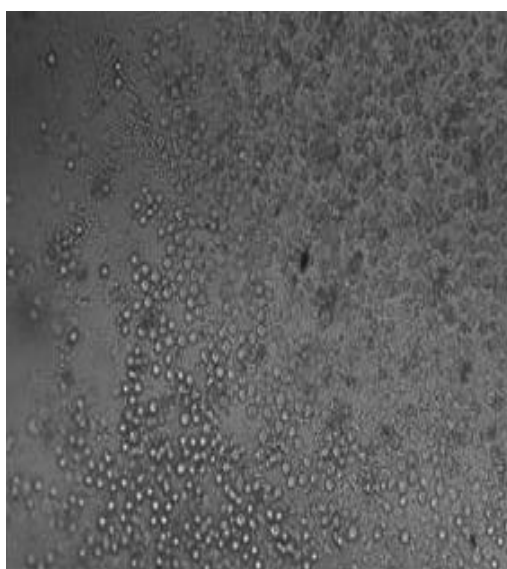
8 hours



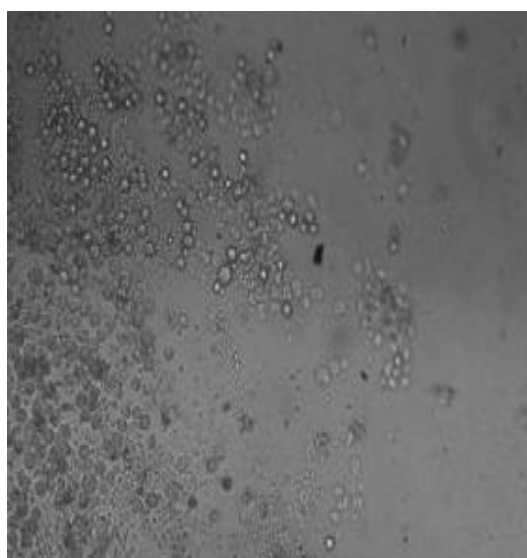
Matrigel dopo 2 e 8 ore in paziente trattato con vitamina D in vivo

Untreated

2 hours



8 hours



matrigel dopo 2 e 4 ore in paziente non trattato con Vitamina D

Bibliografia

1) Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells.

Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC.

Leukemia. 2007 Jun;21(6):1141-9. Epub 2007 Mar 29.

2) Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoieticstem/progenitor cell principals

Mervin C. Yoder,1-3 Laura E. Mead,1,2 Daniel Prater,1,2 Theresa R.

Krier,1,2 Karim N. Mroueh,1,2 Fang Li,1,2 Rachel Krasich,1,2

Constance J. Temm,1,2 Josef T. Prchal,4 David A. Ingram1-3

J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):87-102.

3)Endothelial progenitor cells: identity defined?Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J.

J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):87-102.

4) Endothelial progenitor cells: identity defined?Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J.

J Cell Mol Med. 2009 Jan;13(1):87-102. Review.

5)Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau.

Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A.

Atherosclerosis. 2008 Apr;197(2):496-503.

6) Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration.

Dragoni S, Laforenza U, Bonetti E, Lodola F, Bottino C, Berra-Romani R, Carlo Bongio G, Cinelli MP, Guerra G, Pedrazzoli P, Rosti V, Tanzi F, Moccia F.

Stem Cells. 2011 Nov;29(11):1898-907. doi: 10.1002/stem.734.

7)Osteocalcin positive mononuclear cells are associated with the severity of aortic calcification.

Pal SN, Rush C, Parr A, Van Campenhout A, Golledge J.

Atherosclerosis. 2010 May;210(1):88-93. Epub 2009 Nov 10.

8) Effects of osteopontin on functional activity of late endothelial progenitor cells.

Yu M, Liu Q, Yi K, Wu L, Tan X.

J Cell Biochem. 2011 Jul;112(7):1730-6. doi: 10.1002/jcb.23071.

9) Fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease: New insights and clinical implications.

Damasiewicz MJ, Toussaint ND, Polkinghorne KR.

Nephrology (Carlton). 2011 Mar;16(3):261-8. doi: 10.1111/j.1440-1797.2011.01443.x. Review.

10) Insulin resistance impairs circulating angiogenic progenitor cell function and delays endothelial regeneration.

Kahn MB, Yuldasheva NY, Cubbon RM, Smith J, Rashid ST, Viswambharan H, Imrie H, Abbas A, Rajwani A, Aziz A, Baliga V, Sukumar P, Gage M, Kearney MT, Wheatcroft SB.

Diabetes. 2011 Apr;60(4):1295-303. Epub 2011 Feb 11.

11) Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control.

Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, Tapanadechopone P, Tantrawatpan C, U-Pratya Y, Issaragrisil S.

BMC Endocr Disord. 2010 Apr 7;10:5.

12) Circulating levels of endothelial progenitor cell mobilizing factors in the metabolic syndrome.

Jialal I, Fadini GP, Pollock K, Devaraj S

Am J Cardiol. 2010 Dec 1;106(11):1606-8. Epub 2010 Sep 21.

13) The decrement in circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in type 2 diabetes is independent of the severity of the hypoadiponectemia.

Li M, Ho JC, Lai KW, Au KK, Xu A, Cheung BM, Lam KS, Tse HF.

Diabetes Metab Res Rev. 2011 Feb;27(2):185-94. doi: 10.1002/dmrr.1159.

14) Effects of ACE inhibition on circulating endothelial progenitor cells, vascular damage, and oxidative stress in hypertensive patients.

Cacciatore F, Bruzzese G, Vitale DF, Liguori A, de Nigris F, Fiorito C, Infante T, Donatelli F, Minucci PB, Ignarro LJ, Napoli C.

Eur J Clin Pharmacol. 2011 Sep;67(9):877-83. Epub 2011 Mar 29.

15) Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke.

Navarro-Sobrino M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Ribó M, Alvarez-Sabín J, Montaner J.

Microvasc Res. 2010 Dec;80(3):317-23. Epub 2010 Jun 4.

16) Circulating progenitor cells are increased in newly diagnosed untreated hypertensive patients with arterial stiffening but normal carotid intima-media thickness.

Mandraffino G, Sardo MA, Riggio S, Loddo S, Imbalzano E, Alibrandi A, Saitta C, Cinquegrani M, Mormina EM, Saitta A.

Hypertens Res. 2011 Jul;34(7):876-83.

17) Progenitor cell therapy for heart disease.

Gonzales C, Pedrazzini T.

Exp Cell Res. 2009 Nov 1;315(18):3077-85. Epub 2009 Sep 10. Review.

18) Endothelial precursors in vascular repair.

Kirton JP, Xu Q.

Microvasc Res. 2010 May;79(3):193-9. Epub 2010 Feb 22. Review.

19) Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization.

Patenaude A, Parker J, Karsan A

Microvasc Res. 2010 May;79(3):217-23. Epub 2010 Jan 18.

**20) Role of endothelial progenitor cells in breast cancer angiogenesis:
from fundamental research to clinical ramifications.**

Le Bourhis X, Romon R, Hondermarck H.

**Breast Cancer Res Treat. 2010 Feb;120(1):17-24. Epub 2009 Dec 24.
Review.**

21) Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease.

Nowak K, Rafat N, Belle S, Weiss C, Hanusch C, Hohenberger P, Beck GCh.

Eur J Cardiothorac Surg. 2010 Apr;37(4):758-63. Epub 2009 Nov 6.

22) Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients.

Igreja C, Courinha M, Cachaço AS, Pereira T, Cabeçadas J, da Silva MG, Dias S.

Haematologica. 2007 Apr;92(4):469-77.

23) Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients.

Ahn JB, Rha SY, Shin SJ, Jeung HC, Kim TS, Zhang X, Park KH, Noh SH, Roh JK, Chung HC.

Cancer Lett. 2010 Feb 1;288(1):124-32. Epub 2009 Jul 19.

24) Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease.

Jie KE, Zaikova MA, Bergevoet MW, Westerweel PE, Rastmanesh M, Blankestijn PJ, Boer WH, Braam B, Verhaar MC.

Nephrol Dial Transplant. 2010 Jun;25(6):1875-82. Epub 2010 Jan 18.

25) Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease.

Krenning G, Dankers PY, Drouven JW, Waanders F, Franssen CF, van Luyn MJ, Harmsen MC, Popa ER.

Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jun;296(6):F1314-22. Epub 2009 Apr

26) Endothelial progenitor cell dysfunction in patients with progressive chronic kidney disease.

Krenning G, Dankers PY, Drouven JW, Waanders F, Franssen CF, van Luyn MJ, Harmsen MC, Popa ER.

Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Jun;296(6):F1314-22. Epub 2009 Apr 1.

27) Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients.

Jourde-Chiche N, Dou L, Sabatier F, Calaf R, Cerini C, Robert S, Camoin-Jau L, Charpiot P, Argiles A, Dignat-George F, Brunet P.

J Thromb Haemost. 2009 Sep;7(9):1576-84. Epub 2009 Jul 6.

28) Model-Based Analysis of FGF23 Regulation in Chronic Kidney Disease.

Yokota H, Pires A, Raposo JF, Ferreira HG.

Gene Regul Syst Bio. 2010 Jun 9;4:53-60.

29) Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD.

Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD.

J Am Soc Nephrol. 2010 Feb;21(2):353-61. Epub 2009 Dec 10.

30) Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure.

Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jul;24(7):1246-52. Epub 2004 May 20.

31) Increased total number but impaired migratory activity and adhesion of endothelial progenitor cells in patients on long-term hemodialysis.

Herbrig K, Pistrosch F, Oelschlaegel U, Wichmann G, Wagner A, Foerster S, Richter S, Gross P, Passauer J.

Am J Kidney Dis. 2004 Nov;44(5):840-9.

32) VDR expression on circulating endothelial progenitor cells in dialysis patients is modulated by 25(OH)D serum levels and calcitriol therapy.

Cianciolo G, La Manna G, Cappuccilli ML, Lanci N, Della Bella E, Cuna V, Dormi A, Todeschini P, Donati G, Alviano F, Costa R, Bagnara GP, Stefoni S.

Blood Purif. 2011;32(3):161-73. Epub 2011 Jul 9.

