

## LAVORO ORIGINALE

# Progenitori delle cellule endoteliali di origine midollare in corso di sclerosi sistemica: possibile ruolo nell'angiogenesi\*

## *Endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: their possible role in angiogenesis*

N. Del Papa<sup>1</sup>, M. Cortiana<sup>2</sup>, D.P. Comina<sup>1</sup>, W. Maglione<sup>1</sup>, I. Silvestris<sup>2</sup>, L. Moronetti Mazzeo<sup>2</sup>,  
N. Fracchiolla<sup>2</sup>, F. Fantini<sup>1</sup>, A. Cortelezzi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Reumatologia, Istituto Ortopedico G. Pini, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Ematologia, IRCCS Policlinico,  
Università degli Studi di Milano

### SUMMARY

**Background:** Recently, several studies have demonstrated the presence of circulating endothelial progenitors (CEPs) responsible for angiogenesis. Notably, these cells are able to migrate to ischemic tissues and differentiate in situ in mature endothelial cells. Aim of this study was to assess the presence of CEPs in the peripheral blood of patients with Systemic Sclerosis (SSc) and evaluate their significance as an attempt of re-vascularization

**Material and methods:** Samples of peripheral blood from 40 healthy subjects and 56 patients with SSc were studied. Five-parameter, 3-color flow cytometry was performed with a FACScan. CEPs were defined as CD45 negative, CD34 and CD133 positive. In addition, plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were detected by commercial ELISA (R&D Systems).

**Results:** Levels of CEPs (CD133+/CD34+/CD45-) were significantly higher in patients with SSc in comparison to HC ( $P = 0.01$ ). No correlation was found between CEPs and any clinical parameter of disease neither activity score. CEPs were significantly higher in the group of patients with early disease, while their number decreased in the late phases of disease. Plasma levels of VEGF, but not bFGF, were significantly higher in SSc in comparison to HC ( $P < 0.001$ ) but no correlation was found between VEGF concentrations and CEP number.

**Conclusions:** The presence of CEPs in patients with SSc suggest that sclerodermic hypoxic tissues could induce the mobilization of bone-marrow derived cells in an attempt to provided new vessels, in the early phase of the disease, at least.

Reumatismo, 2005; 57(3):174-179

### INTRODUZIONE

La sclerosi sistemica (SSc) è una malattia del tessuto connettivo caratterizzata da sofferenza vascolare a livello della cute e di vari organi interni e da iperproduzione e conseguente accumulo di collagene con conseguente fibrosi (1, 2).

Gli elementi istopatologici più caratteristici delle fasi precoci della SSc sono rappresentati dalla presenza di infiltrati linfocitari perivascolari e da una ridotta densità capillare, che precedono l'eccessivo accumulo di matrice nella fase più tardiva della malattia (4).

La ridotta densità capillare, evidenziabile anche precocemente alla capillaroscopia, è responsabile dell'ischemia tissutale e delle conseguenti tipiche manifestazioni cliniche della malattia quali le ulcere digitali (1, 2).

In condizioni fisiologiche, l'ipossia tissutale determina la formazione di nuovi capillari a partire da quelli preesistenti e tale fenomeno è noto come angiogenesi (4). L'angiogenesi è un complesso pro-

\*Lavoro premiato al XL Congresso SIR, Udine 2003

Indirizzo per la corrispondenza:  
Dott.ssa Nicoletta Del Papa  
Dipartimento di Reumatologia  
Istituto Ortopedico G. Pini  
Via Pini, 9 - 20122 Milano  
E-mail: delpapa@gpini.it

cesso regolato da molteplici mediatori ad azione attivatoria e/o inibitoria che in condizioni normali sono in equilibrio tra loro (4). Il vascular endothelial growth factor (VEGF) ed il basic fibroblast growth factor (bFGF) sono stati caratterizzati come molecole chiave nell'induzione dell'angiogenesi. Il VEGF è coinvolto in molti aspetti dell'angiogenesi, come la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule endoteliali (3). Lo stesso ruolo, anche se non è esclusivamente specifico per le cellule endoteliali è stato attribuito al bFGF (3).

Recentemente studi condotti nell'uomo e negli animali hanno dimostrato l'esistenza di elementi cellulari circolanti di derivazione midollare con potenzialità proliferative definite cellule endoteliali progenitori (CEP). Le CEP sono cellule endoteliali (CE) di derivazione midollare "migranti", con la capacità di circolare, proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature. Tali cellule esprimono marker endoteliali specifici simili alle CE e possono essere considerate precursori delle CE mature (5). In particolare, le CEP identificate in modelli animali di ischemia tissutale sono considerate i veri elementi responsabili della vasculogenesi, essendo quest'ultima fino a poco tempo fa considerata esclusiva della vita embrionale (6-9).

Il danno ischemico nei pazienti SSc potrebbe essere associato a un tentativo di reclutare progenitori a livello dei siti di danno vascolare e scopo di questo studio è stato quello di valutare se nel sangue periferico di pazienti sclerodermici siano presenti le CEP e abbiamo studiato le correlazioni esistenti con alcuni fattori angiogenetici.

## MATERIALI E METODI

### *Pazienti*

Sono stati studiati 40 soggetti sani e 52 pazienti affetti da SSc (F/M, 50/1; età mediana 53 anni, range 24-65; durata media di malattia  $10 \pm 9$  anni). La diagnosi di SSc era stata posta sulla base dei criteri classificativi dell'American College of Rheumatology (10). In base ai criteri proposti da LeRoy et al. (11) 26 pazienti erano affetti da lcSSc e 26 da dcSSc.

Tutti i pazienti avevano fornito un consenso informato al prelievo. L'attività di malattia è stata valutata utilizzando i criteri di attività proposti dallo European Scleroderma Study Group (11). La durata di malattia è stata valutata utilizzando i criteri proposti da Medsger et al. (13).

### *Determinazione delle CEP mediante analisi citofluorimetrica*

100  $\mu$ L di sangue periferico in Eparina sodica sono stati incubati con 10  $\mu$ L di un pannello di anticorpi monoclonali (anti-CD45, -CD34, -CD133) marcati con fluoriscina isotiocianato (FITC), R-phicoeritrina (PE) o peridinin chlorophyll protein (PerCP), per 20 min a temperatura ambiente (RT).

I globuli rossi sono stati quindi lisati mediante incubazione in una soluzione FACS lisante (Becton Dickinson, San Jose, CA) per 10 min a RT. Il pellet di globuli bianchi è stato poi lavato due volte con una soluzione di FACS flow (Becton Dickinson).

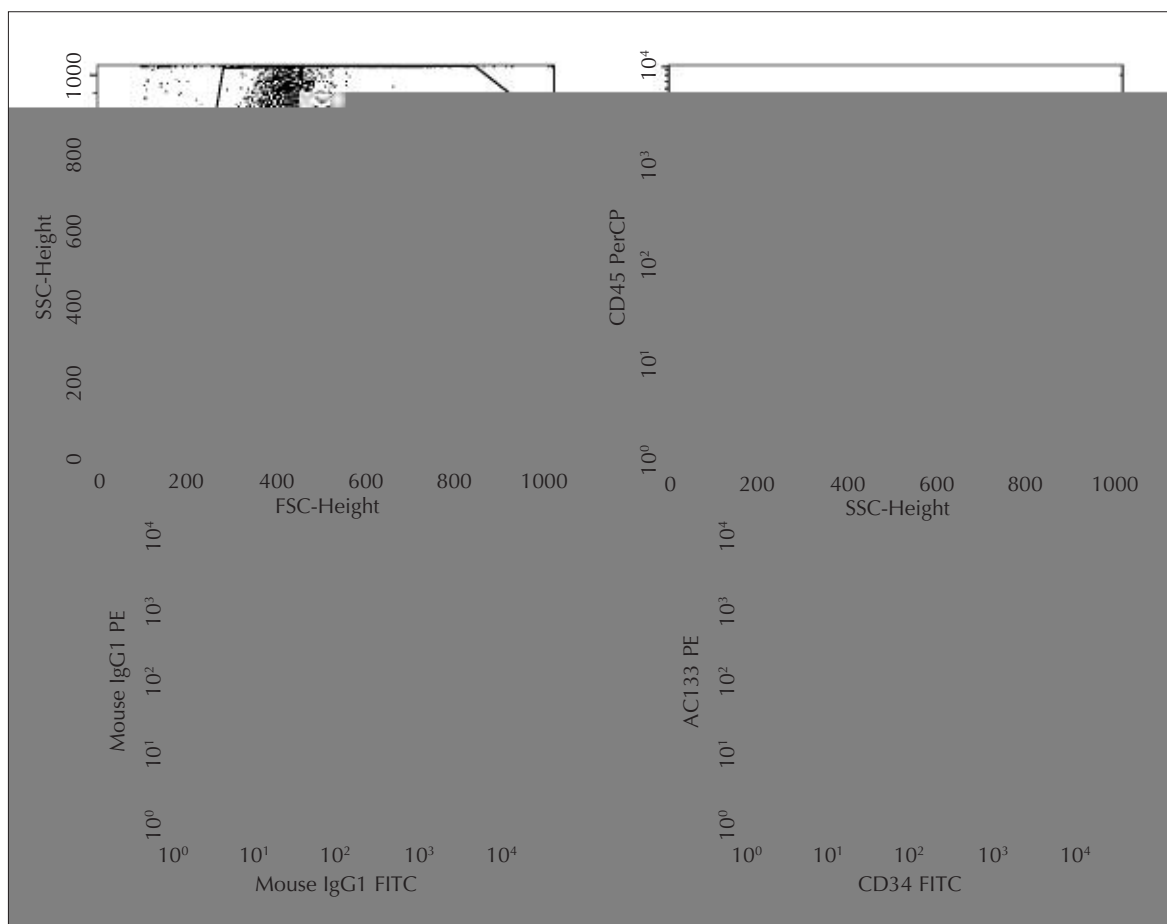
Sono state usate appropriate finestre di analisi per contare il numero totale di CEP. Le CEP sono state definite come CD45 negative, CD34+ e CD133+. La lettura al citofluorimetro FACS con 15-mW argon laser (excitation a 488 nm) (Becton Dickinson) è stata seguita a tre colori/cinque parametri. La sensibilità dei determinanti di fluorescenza è stata settata e monitorata usando Calibrite Beads (Becton Dickinson) secondo le indicazioni della ditta produttrice. Cellule colorate con IgG1 isotipic controls marcate con FITC o PE sono state usate come controllo negativo. Sono state acquisite almeno 100.000 cellule per campione: le analisi sono state considerate informative quando un adeguato numero di eventi (>100) è stato acquisito nelle finestre di valutazione delle CEP. I dati sono stati analizzati mediante CELLquest software (Becton Dickinson).

### *Dosaggio plasmatici di vascular endothelial factor (VEGF) e basic fibroblast growth factor (bFGF)*

I livelli plasmatici di VEGF e di bFGF sono stati determinati mediante metodica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, R&D System, Minneapolis, MN) e calcolati mediante l'uso di una curva di riferimento standard, secondo le indicazioni della ditta.

### *Analisi statistica*

Sono stati messi a confronto i valori di CEP dei sierici dei pazienti sclerodermici con quelli dei controlli sani mediante il Mann-Whitney rank sum test. È stato considerato significativo un valore di  $P < 0.05$ . Inoltre, le correlazioni tra il numero di CEP ed i differenti parametri di patologia sclerodermica sono stati studiati mediante il test di correlazione di Spearman.

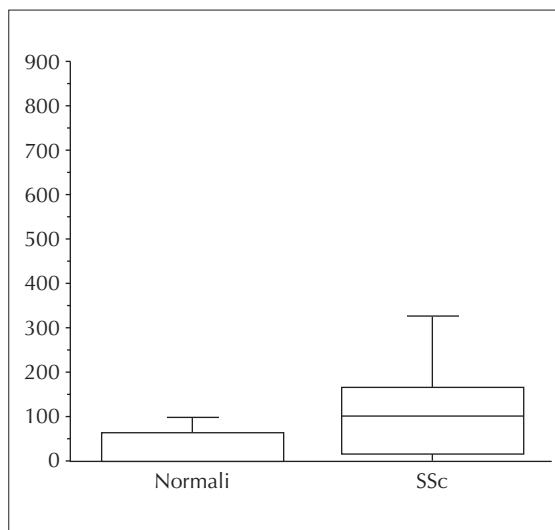


**Figura 1** - Valutazione citofluorimetrica di progenitori di cellule endoteliali circolanti (CEP). a, Pannello di analisi che evidenzia le gate utilizzate per escludere le piastrine e i detriti cellulari. b, Pannello di analisi che mostra il controllo negativo, le CEP nella SSC. PerCP = peridinin chlorophyll protein; PE = phycoerythrin; FITC = fluorescein isothiocyanate.

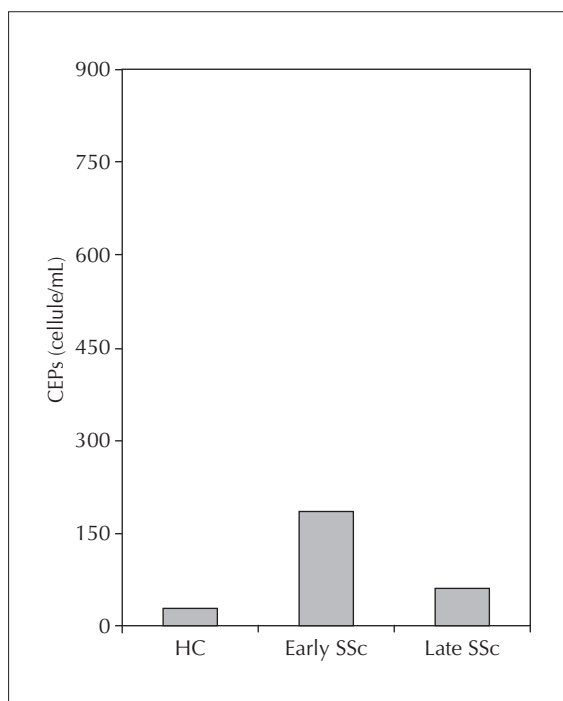
## RISULTATI

### *Determinazione quantitativa delle CEP*

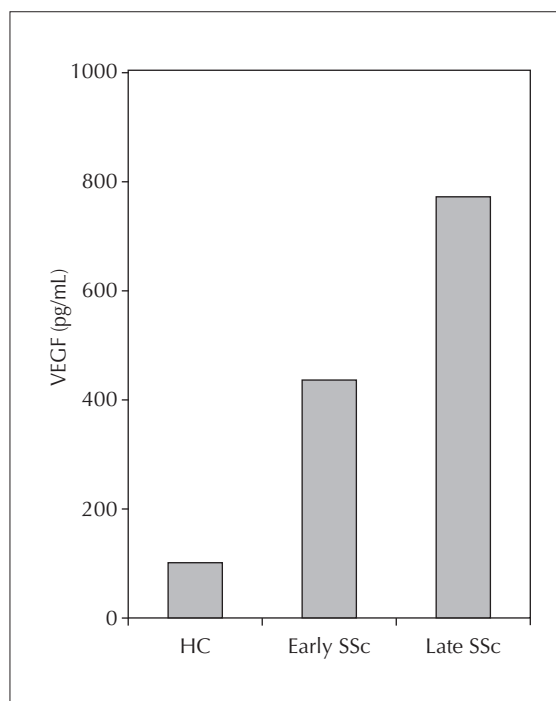
Le CEP sono state identificate in base all'espressione sulla loro superficie di CD34 e CD133, un marcatore di cellule staminali la cui espressione viene persa dopo la differenziazione in cellule endoteliali mature (Fig. 1). Le CEP erano significativamente più elevate in pazienti sclerodermici rispetto ai soggetti sani ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2). Non è stata dimostrata nessuna correlazione significativa con parametri clinici o patologici quali le ulcere digitali, il coinvolgimento cutaneo e viscerale e lo score di attività di malattia. Stratificando i pazienti in base alla durata di malattia è stato osservato che i pazienti *con malattia di breve durata* (inferiore a 5 anni per la lcSSc ed inferiore a 3 anni per la dcSSc) mostravano un aumentato numero di CEP rispetto



**Figura 2** - Correlazione tra il numero di CEP nei pazienti sclerodermici e nei controlli sani.



**Figura 3** - Correlazione tra il numero di cellule endoteliali progenitori (CEP) nei pazienti sclerodermici con malattia di breve durata e pazienti sclerodermici con malattia in fase più tardiva.



**Figura 4** - Correlazione tra le concentrazioni plasmatiche di VEGF nei pazienti sclerodermici e nei controlli sani.

### **Livelli plasmatici di fattori angiogenetici**

Il VEGF è il peptide con maggior capacità angiogenica e maggior attività mitogenica sulle cellule endoteliali; è normalmente prodotto da cellule in condizioni ipossiche ed è coinvolto in numerose tappe dell'angiogenesi.

Le concentrazioni plasmatiche di VEGF erano aumentate nei pazienti sclerodermici rispetto ai controlli sani (mediana 507 pg/mL, range 74-1250; mediana 97 pg/mL; range non determinabile - 248 pg/mL;  $P < 0.001$ ), ma non è stata osservata alcuna correlazione positiva tra le CEP e il VEGF (Fig. 4).

Inoltre, i livelli circolanti di VEGF non mostravano differenze statisticamente significative se analizzati in relazione alla durata di malattia. Nella maggior parte dei pazienti affetti da SSc e nei soggetti sani non erano valutabili concentrazioni significative di bFGF.

## **DISCUSSIONE**

Il nostro studio permette di confermare che nel sangue periferico dei pazienti sclerodermici sono presenti elementi cellulari progenitori delle cellule en-

doteliali. Studi recenti hanno evidenziato l'esistenza di progenitori endoteliali di derivazione midollare che, guidati e modulati da fattori pro-angiogenetici, possano migrare dai siti di attiva neovascolarizzazione dei tessuti ischemici e differenziarsi *in situ* in cellule endoteliali mature (14). Il riscontro di CEP in corso di SSc costituisce un'ulteriore conferma che il danno ischemico periferico peculiare di questa malattia sia in grado di indurre, analogamente ad altre note situazioni di ipossia tissutale (6), una risposta midollare in termini di vasculogenesi. A tale tentativo corrisponde peraltro una realtà evolutiva della malattia contraddistinta istologicamente dal progressivo impoverimento del letto vascolare con il tipico aspetto noto come "deserto vascolare".

La mancanza di una sufficiente risposta all'ipossia e ad altri stimoli a formare nuovi capillari in pazienti con SSc, può essere spiegata da un'inappropriata sintesi di fattori angiogenetici o da una non adeguata inibizione dei fattori angiostatici (4). È possibile ipotizzare che la perdita dell'integrità funzionale e strutturale dell'endotelio sclerodermico possa essere un importante stimolo per i processi di angiogenesi e possa spiegare bene l'aumento dei valori plasmatici di VEGF trovato nei nostri pa-

zienti e confermato da studi precedenti (4-14). In effetti i nostri risultati mostrano che, contrariamente a quanto evidenziato per il VEGF, i livelli plasmatici di bFGF sono sovrapponibili a quanto riscontrato in soggetti sani. Tale dato suggerisce ulteriormente un'alterata regolazione nei meccanismi che promuovono la rigenerazione endoteliale. Nei pazienti con *malattia di breve durata* il numero di CEP è risultato significativamente più elevato rispetto ai pazienti con *malattia di lunga durata*. Tale dato suggerisce che, analogamente ad altre patologie caratterizzate da un'ischemia tissutale, anche

in corso di SSc sia presente un tentativo di rivascularizzazione e riparazione dei tessuti ischemici (5). Tuttavia, tale tentativo viene meno nelle fasi tardive di malattia quando la patologia primariamente endoteliale lascia spazio alle conseguenze dell'attivazione fibroblastica con iperproduzione e deposizione extra-cellulare di collagene. Saranno necessari ulteriori studi per valutare se nella SSc la risposta angiogenetica indotta dall'ipossia tissutale sia in qualche modo "disturbata" dal microambiente periferico e quale possa essere il ruolo o il mancato ruolo delle CEP nell'evoluitività della patologia.

## RIASSUNTO

**Background:** Diversi studi hanno recentemente messo in evidenza l'esistenza nel sangue periferico di progenitori delle cellule endoteliali (CEP) di derivazione midollare potenzialmente in grado di contribuire alla neo-angiogenesi. In particolare, tali elementi cellulari sono in grado di migrare nei siti di neovascolarizzazione nei tessuti ischemici e di differenziarsi in situ in cellule endoteliali mature. **Scopo di questo studio** è stato quello di valutare se nel sangue periferico di pazienti con Sclerosi Sistemica (SSc) sono presenti CEP come espressione di un tentativo di rivascularizzazione e riparazione dei tessuti ischemici.

**Materiali e metodi:** Sono stati studiati campioni di sangue periferico da 40 soggetti normali (NH) e 52 pz. affetti da SSc. Dopo la lisi degli eritrociti, le cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali coniugati (FITC, PE o PerCP): anti-CD45, -CD34 -CD133. Le CEP venivano identificate come CD45 negative e CD34 e CD133 positive. L'analisi citofluorimetrica veniva effettuata con un FACScan flow cytometer. Sono stati inoltre valutati i livelli plasmatici di VEGF e di bFGF utilizzando una metodica immunoenzimatica in fase solida (R&D Systems).

**Risultati:** Il numero di CEP (CD133+/CD34+/CD45-) è risultato significativamente più elevato nei pazienti con SSc rispetto ai NH ( $P = 0.01$ ). Non è stata riscontrata nessuna correlazione significativa tra il numero delle CEP e alcun parametro clinico (cutaneo e/o viscerale) o di attività di malattia. Quando il gruppo di pazienti studiato veniva stratificato in base alla durata di malattia, i pazienti con SSc di recente insorgenza mostravano un aumentato numero di CEP rispetto ai pazienti con malattia di vecchia data ( $P < 0.05$ ). I livelli plasmatici di VEGF sono risultati elevati nei pazienti con SSc rispetto ai NH ( $P < 0.001$ ) ma non è stata trovata alcuna correlazione tra livelli di VEGF e numero di CEP.

**Conclusioni:** La presenza delle CEP nei pazienti con SSc suggerisce l'ipotesi che l'ipossia tissutale sclerodermica possa costituire, analogamente ad altre condizioni ischemiche, uno stimolo per la mobilitazione di progenitori endoteliali di origine midollare in un tentativo di re-endotelizzazione, almeno nelle fasi precoci della malattia.

**Parole chiave** - Progenitori endoteliali, sclerosi sistemica, angiogenesi.

**Key words** - *Endothelial progenitor, systemic sclerosis, angiogenesis.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Fleischmajer R. The pathophysiology of scleroderma. *Int J Dermatol* 1977; 16: 310-8.
2. Denton CP, Black CM, Korn JH, De Crombrugge B. Systemic sclerosis: current pathogenetic concepts and future prospects for targeted therapy. *Lancet* 1996; 347: 1453-8.
3. Hebbbar M, Peyrat J, Hornez L, Patron P, Hachoula E and Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheum.* 2000; 43: 889-93.
4. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, Cipriani P, Conforti ML, et al. Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers. *Arthritis Res* 2002; 4: R11.
5. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, Liu XH, Anjo A, Tolla-Le Port C, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* 2004; 103: 2577-84.
6. 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: 964-7.
7. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC-133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-8.

8. Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 88-96.
9. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 200; 105: 71-7.
10. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 592-8.
11. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis):classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
12. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, D'Angelo S, Della Rossa A, Silman AJ, et al. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis.III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 901-3.
13. Medsger TA. Epidemiology of progressive systemic sclerosis. In Black CM, Myser AR (eds): *Systemic sclerosis (Scleroderma)*. New York, Gower Medical, 1985.
14. Choi JJ, Min DJ, Cho ML, Min SY, Kim SJ, Lee SS, et al. Elevated vascular endothelial growth factor in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003; 30: 1529.