

PROANGIOGENNA TERAPIA KOMÓRKOWA: OBIECUJĄCA PERSPEKTYWA CZY ZŁUDNA NADZIEJA?

PROANGIOGENIC CELL THERAPY: HYPE OR HOPE?

Anna GROCHOT-PRZĘCZEK, Krzysztof SZADE, Jerzy KOTLINOWSKI,
Alicja JÓZKOWICZ, Józef DULAK

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Udowodnienie istnienia komórek progenitorowych śródbłonna – EPC (ang. *endothelial progenitor cells*) i ich udziału w postnatalnym powstawaniu naczyń krwionośnych znacząco wpłynęło na perspektywę możliwości zastosowania terapeutycznej angiogenezy w leczeniu chorób układu krążenia oraz innych schorzeń zależnych od unaczynienia tkanki. Początkowe badania dotyczące komórek EPC wyraźnie sugerowały, że zastosowanie ich w klinice może przynieść poprawę jakości życia wielu chorym niekwalifikującym się do rewaskularyzacyjnych zabiegów operacyjnych. Jednak podjęte później pierwsze próby kliniczne terapii komórkowej z wykorzystaniem komórek EPC mocno zweryfikowały tę hipotezę, nie zachwycając wynikami terapeutycznymi. Dodatkowo, brak ściśle ustalonych markerów pozwalających jednoznacznie zidentyfikować tę populację komórkową oraz brak wystarczających danych o molekularnych mechanizmach funkcjonowania EPC utrudnia badania dotyczące proangiogennej terapii komórkowej. Jednak mimo tych trudności, prace nad zastosowaniem tej strategii w chorobach układu krążenia postępują w ogromnym tempie, a nowe odkrycia w tej dziedzinie budzą duże nadzieje.

Słowa kluczowe: proangiogenna terapia komórkowa, komórki progenitorowe śródbłonna, angiogeneza, waskulogeneza.

Summary: The discovery of endothelial progenitor cells (EPCs) and demonstration of their participation in postnatal new blood vessel formation accelerated their application for therapeutic angiogenesis in cardiovascular diseases and vascularity-dependent disorders treatment. First experiments done on EPCs

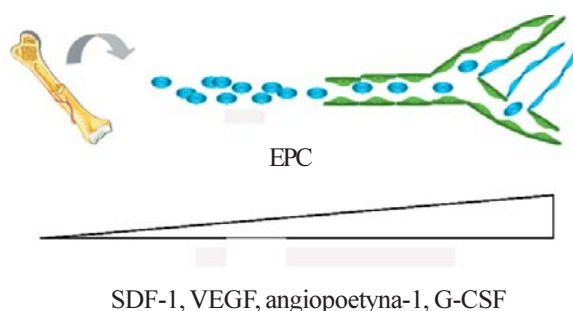
*Praca współfinansowana z grantu MNiSW nr N301 08032/3156. Alicja Józkowicz jest beneficjentem *The Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Science*. Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii jest beneficjentem projektów „Biotechnologia Molekularna dla Zdrowia” (POIG.02.01.00-12-064/08) i „Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków” (POIG 02.02.00-00-014/08) współfinansowanych przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

suggested that usage of these cells in clinic may improve the quality of life of the patients not curable with standard revascularizing surgery. However, the clinical trials of cell therapy with EPCs were not as fruitful as expected. In addition, lack of specified antigens helpful in EPCs population identification and lack of data concerning molecular mechanisms of EPCs function hamper the research on proangiogenic cell therapy. But despite these difficulties, researchers keep hardworking on the strategy of therapeutic angiogenesis and the new discoveries seem to be promising.

Key words: proangiogenic cell therapy, endothelial progenitor cells, angiogenesis, vasculogenesis.

WASKULOGENEZA I ANGIOGENEZA

Powstawanie naczyń krwionośnych jest kluczowe dla rozwoju organizmu i dla prawidłowego przebiegu procesów naprawczych, na przykład gojenia ran skóry. Odgrywa również rolę w niektórych procesach fizjologicznych w dojrzałym organizmie, takich jak: oogeneza, przerost błony śluzowej macicy w cyklu miesięcznym czy wzrost włosów. Proces tworzenia kapilar może odbywać się w drodze waskulogenezy lub angiogenezy. Wyróżnia się również arteriogenezę, ale zjawisko to jest w istocie dojrzewaniem drobnych naczyń krwionośnych. Waskulogeneza polega na tworzeniu kapilar z prymitywnych komórek macierzystych, np. angioblastów lub komórek progenitorowych śródbłonna (EPC) (ryc. 1) [65]. Angiogeneza natomiast jest procesem powstawania naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących. Polega na migracji i proliferacji dojrzałych, w pełni zróżnicowanych komórek śródbłonna, które zostają pobudzone ze stanu spoczynkowego na skutek działania rozmaitych czynników [22]. Spośród wielu mediatorów, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń –



RYCINA 1. Mobilizacja i homing komórek EPC. Komórki progenitorowe śródbłonna mobilizowane są do krwi pod wpływem gradientu czynników SDF-1, VEGF, angiopoetyny-1, G-CSF. Z prądem krwi docierają do miejsc uszkodzenia tkanki (ang. *homing*), gdzie uczestniczą w tworzeniu naczyń krwionośnych

FIGURE 1. EPCs mobilization and homing. EPCs are mobilized into peripheral blood by a gradient of SDF-1, VEGF, angiopoietin-1 and G-CSF factors

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) oraz czynnik pochodzenia stromalnego-1 – SDF-1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*) są niewątpliwie jednymi z najważniejszych [17, 21].

Do niedawna uważano, że unaczynienie postnatalne jest wyłącznie wynikiem angiogenezy. Badania ostatnich lat wskazują jednak, że za powstawanie naczyń w procesach naprawczych odpowiedzialne są również komórki EPC, które mobilizowane są do krwi na przykład ze szpiku kostnego, po czym docierają do uszkodzonej lub niedotlenionej tkanki, gdzie stymulują powstawanie kapilar [4, 5, 79].

NIEEMBRIONALNE KOMÓRKI PROGENITOROWE ŚRÓDBŁONKA

W 1997 roku Asahara i jego współpracownicy opublikowali w czasopiśmie *Science* pracę, w której po raz pierwszy pokazali, że ludzka krew zawiera komórki frakcji leukocytarnej zdolne *in vitro* różnicować do komórek śródbłonka [5]. Do izolacji tych komórek wykorzystano dwa antygeny: CD34 oraz VEGFR-2, które ulegają ekspresji w hematopoetycznych komórkach macierzystych, jak również w komórkach śródbłonka. Wyodrębniona w ten sposób populacja, po kilku dniach hodowli w warunkach różnicujących do śródbłonka, wykazywała ekspresję CD31, E-selektyny, śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS), Tie-2 oraz zdolność internalizacji acetylowanych cząstek LDL, czyli cechy charakterystyczne dla śródbłonka. W kolejnym eksperymencie wyizolowano tego typu komórki z krwi myszy z nadekspresją β -galaktozydazy i następnie podano je dożylnie do myszy z podwiązaną tętnicą udową i niedotlenioną kończyną tylną. Stwierdzono inkorporację komórek β -gal⁺CD31⁺ w powstałych naczyniach krwionośnych, udowadniając tym samym ich udział w postnatalnej waskulogenezie [5]. Kolejne prace tego samego zespołu wskazywały na znaczący udział komórek EPC uwalnianych ze szpiku kostnego w tworzeniu naczyń krwionośnych w modelach zarówno fizjologicznej, jak i patologicznej neowaskularyzacji: gojeniu ran, przeroście endometrium i unaczynieniu ciała żółtego po indukowanej owulacji, niedokrwieniu kończyny tylnej, zawale serca i wzroście nowotworu [4]. W tych doświadczeniach wykorzystane zostały myszy transgeniczne wykazujące konstytutywną ekspresję β -galaktozydazy pod kontrolą promotorów specyficznych dla śródbłonka: Tie-2 lub VEGFR-2. Zwierzęta typu dzikiego z defektywnym układem odporności poddano radiacyjnej mieloablacji i przeszczepiono szpik od myszy transgenicznych. Zaobserwowano, że niedotlenienie tkanki wywołuje wzrost liczby EPC we krwi obwodowej. Dodatkowo wykazano obecność komórek β -gal⁺ w powstałych strukturach naczyniowych [4]. Eksperymenty te były kamieniem milowym w potencjalnym zastosowaniu terapeutycznej angiogenezy w leczeniu chorób układu krążenia u ludzi.

EPC – CZYM SĄ I SKĄD POCHODZĄ

Najczęściej EPC definiuje się jako komórki krwi obwodowej lub pochodzące ze szpiku kostnego komórki jednojądrzaste, przylegające do białek macierzy pozakomórkowej (np. fibronektyny) oraz pochłaniające acetylowane cząstki LDL i wiążące izolektynę. Dodatkowo komórki te powinny wykazywać ekspresję markerów śródbłonkowych [5]. Niestety jak dotąd nie zidentyfikowano antygeny, który ulegałby ekspresji wyłącznie na komórkach EPC, co zdecydowanie ułatwiłoby identyfikację tej populacji komórkowej. Ludzkie EPC charakteryzuje ekspresja CD133 i c-kit, która zanika w czasie różnicowania. Ponadto, podobnie jak dojrzałe ludzkie śródbłonki, ludzkie EPC wykazują ekspresję CD34, VE-kadheryny, VEGFR-2, CD146, CXCR4,

vWF, CD31, wychwytyją modyfikowane cząsteczki LDL i wiążą izolektynę *Ulex europaeus*. Markery mysich EPC w dużej mierze pokrywają się z ludzkimi, z pewnymi wyjątkami: mysie EPC wiążą izolektynę BS1 *Griffonia simplicifolia* (wiązanie lektyny *Ulex europaeus* jest specyficzne dla komórek ludzkich), mają ekspresję Sca-1 i nie mają antygenów hematopoetycznych. Obecność antygeny CD133 (prominina) nie jest jednoznacznie potwierdzona, a CD34 rzadko wykorzystuje się do identyfikacji tej populacji. Dojrzałe mysie komórki śródbłonka tracą ekspresję Sca-1 i c-kit [63] (tab. 1).

Jin Hur i współpracownicy w pracy z 2004 roku po raz pierwszy zwrócili uwagę na heterogenność EPC, wskazując, że zespoły badawcze badające komórki EPC pracują na określanych w ten sam sposób, ale *de facto* różnych subpopulacjach komórkowych [33]. Różnorodność ta wynika z wielu przyczyn: różnych źródeł izolacji komórek i markerów wykorzystywanych do identyfikacji populacji oraz niejednakowych warunków hodowli. Analizując poszczególne prace dotyczące EPC oraz wyniki własnych eksperymentów trzeba mieć na uwadze wielość populacji EPC, na których pracują naukowcy.

Jednym z przykładów subpopulacji EPC izolowanych z komórek jednojądrzastych są tzw. wczesne i późne komórki EPC o zupełnie odmiennych właściwościach [33]. Wczesne EPC, o wrzecionowatym kształcie, najintensywniej proliferują pomiędzy 2. i 3. tygodniem od izolacji i są w stanie przeżyć do 4 tygodni. Natomiast późne EPC, o kształcie charakterystycznej dla śródbłonka kostki brukowej, pojawiają się dopiero około 2–3 tygodnia, wykazują eksponencjalny wzrost pomiędzy 4. a 8. tygodniem od izolacji i przeżywają w hodowli *in vitro* do 12 tygodni. Te dwie subpopulacje EPC wykazują różną ekspresję markerów VE-kadheryny, receptorów 1 i 2 dla VEGF oraz CD45. Późne EPC produkują więcej NO, lepiej inkorporują w struktury tworzone przez dojrzałe komórki śródbłonka oraz efektywniej tworzą tuby na matryzeli. Wczesne EPC wydzielają większe ilości proangiogennych

TABELA 1. Zestawienie antygenów i właściwości komórek progenitorowych śródbłonka, dojrzałych śródbłonek i komórek hematopoetycznych

TABLE 1. Antigens and features of EPCs, mature endothelial cells and hematopoietic cells

	Komórki progenitorowe śródbłonkowe	Dojrzałe komórki śródbłonka	Komórki hematopoetyczne
Mysz	Sca-1 ⁺ , c-kit ⁺ , VEGFR-2 ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , Tie2 ⁺ , CXCR4 ⁺ , CD146 ⁺ , vWF ⁺ , D31 ⁺ , wychwytywanie acetylowanych LDL, wiązanie lektyny BS1, D133 ⁺ , CD34 ⁺	Sca-1 ⁻ , c-kit ⁻ , VEGFR-2 ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , Tie2 ⁺ , CD146 ⁺ , vWF ⁺ , CD31 ⁺ , wychwytywanie acetylowanych LDL, wiązanie lektyny BS1	CD31 ⁺ , VEGFR-1 ⁺ , CD34 ⁺ , c-kit ⁺ , vWF ⁺ , wychwytywanie acetylowanych LDL, wiązanie lektyn BS1 lub <i>Ulex europaeus</i>
Człowiek	CD133 ⁺ , CD34 ⁺ , c-kit ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , VEGFR-2 ⁺ , CD146 ⁺ , CXCR4 ⁺ , vWF ⁺ , D31 ⁺ , wychwytywanie acetylowanych LDL, wiązanie izolektyny <i>Ulex europaeus</i>	CD133 ⁻ , c-kit ⁻ , CD34 ⁺ , VE-kadheryna ⁺ , VEGFR-2 ⁺ , CD146 ⁺ , CXCR4 ⁺ , vWF ⁺ , CD31 ⁺ , wychwytywanie acetylowanych LDL, wiązanie izolektyny <i>Ulex europaeus</i>	

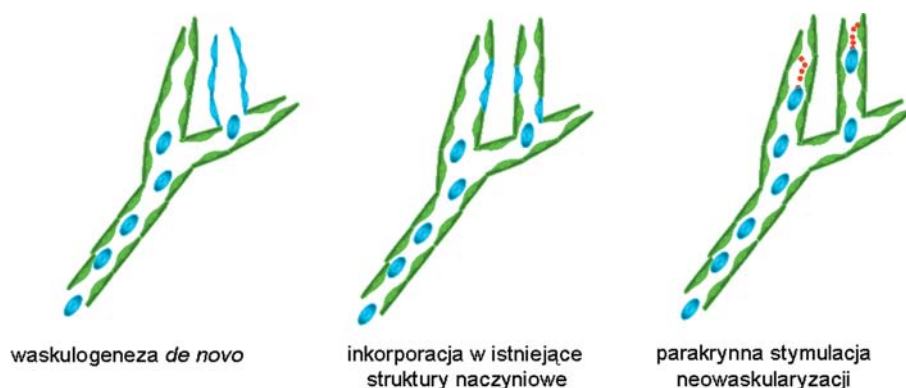
czynników: VEGF i IL-8, natomiast *in vivo* obie subpopulacje wykazują podobny potencjał waskulogeny [33].

Yoder i wsp. zwrócili uwagę na inne dwa typy komórek, oba nazywane komórkami progenitorowymi śródbłonna, ale izolowane w różny sposób [94]. Wychodząc z tego samego źródła – komórek jednojądrzastych krwi obwodowej – otrzymali dwie absolutnie różne populacje. W większości badań, do identyfikacji ludzkich EPC z krwi obwodowej stosuje się markery CD34, CD133 i VEGFR-2 oraz test tworzenia kolonii. Kryteria te nie są wystarczające. Populację tzw. CFU-EC (ang. *colony forming unit-endothelial cell*), uzyskiwaną przez negatywną selekcję komórek jednojądrzastych na fibronektynie, charakteryzuje wysoka ekspresja markerów śródbłonkowych oraz hematopoetycznych. Drugą subpopulacją EPC są komórki ECFC (ang. *endothelial colony-forming cells*), które izoluje się prowadząc pozytywną selekcję na kolagenie I. ECFC nie wykazują ekspresji antygenów hematopoetycznych CD45, CD14 i CD115, natomiast prawie 100% komórek ekspresjuje markery śródbłonkowe. Okazuje się, że te dwie populacje komórek, niestety w nomenklaturze określane tym samym terminem EPC, mają zupełnie inne właściwości. Jak dowodzą autorzy, CFU-EC wywodzą się z komórek hematopoetycznych, mają aktywność progenitorów mieloidalnych, różnicują w fagocytykujące makrofagi i nie tworzą funkcjonalnych naczyń krwionośnych *in vivo*. W przeciwieństwie do CFU-EC, ECFC wykazują duży potencjał proliferacyjny i co najważniejsze tworzą *in vivo* w pełni perfundowane naczynia krwionośne [94].

Pochodzenie komórek EPC nie jest jednoznacznie określone. Do tej pory zidentyfikowano kilka populacji, z których można je otrzymać. Jedną z nich są komórki szpikowe, gdzie pierwotnymi prekursorami EPC są prawdopodobnie hemangioblasty. Istnienie wspólnych prekursorów EPC i komórek hematopoetycznych utrudnia rozróżnienie i rozdzielenie tych dwóch populacji, które mają ekspresję antygenów CD31, VEGFR1, CD34, c-kit, vWF, CD146, zdolność wychwytu acetylowanych LDL i wiązania izolektyny [63] (tab. 1). Dlatego populacja komórek, określana terminem EPC nie jest jednoznacznie zdefiniowana; jest to z pewnością populacja heterogenna, która zawiera komórki o fenotypie śródbłonkowym, ale również hematopoetycznym. Różnorodność antygenów ulegających ekspresji w EPC może być nawet większa, gdyż te komórki mogą wywodzić się również z monocytów CD14⁺ [87], mieloidalnych lub mezenchymalnych komórek macierzystych i osiadłych w tkance komórek macierzystych [74, 88].

EPC W NEOWASKULARYZACJI

Komórki progenitorowe śródbłonna są mobilizowane ze swoich nisz, na przykład ze szpiku kostnego, w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki. Krażąc we krwi docierają do miejsc ischemicznych i mogą stymulować powstawanie naczyń *de novo*, czyli w drodze waskulogenezy (ryc. 2) [11]. Prawdopodobne jest jednak, że dochodzi także do włączania się progenitorów w istniejące struktury naczyniowe (ryc. 2). Znaczenie tego zjawiska nie jest dobrze poznane – ocenia się, na podstawie



RYCINA 2. EPC w neowaskularyzacji: Komórki progenitorowe śródbłonna mogą stymulować neowaskularyzację w trzech różnych procesach. Tworzenie przez EPC naczyń krwionośnych *de novo* to waskulogeneza, w której komórki progenitorowe różnicują w dojrzałe śródbłonki w miejscu uszkodzenia tkanki. Drugim sposobem jest inkorporacja EPC w istniejące struktury naczyniowe, na zasadzie uzupełniania miejsc z uszkodzonym śródbłonkiem. Określa się, że trzecia możliwość – zjawisko parakrynną stymulacji dojrzałych komórek śródbłonna przez EPC – jest najistotniejsza i występuje najczęściej

FIGURE 2. EPCs in neovascularization. EPCs can participate in neovascularization in three different ways. Vasculogenesis is a process of blood vessel formation *de novo*. In this process EPCs differentiate into mature endothelial cells at site of injury. The second way is an incorporation into existing vasculature, where EPCs fill the gaps with damaged endothelium. Finally, EPCs can paracrinely stimulate mature, fully differentiated endothelial cells - this process is believed to be the most common and important

wbudowywania znakowanych progenitorów w ścianę naczyń, że udział EPC w nowopowstałych kapilarach wynosi od 0 do 80% [5, 25, 87]. Ożywioną dyskusję wzbudziła niedawno praca zespołu P. Salvena, w której pokazano, że powstawanie struktur naczyniowych w nowotworach nie angażuje, ani nie wymaga komórek pochodzenia szpikowego, zróżnicowanych do śródbłonna [61]. Wyniki te zostały potwierdzone również przez inny zespół [90]. Wyniki tych prac są sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi udziału EPC w postnatalnej neowaskularyzacji [44]. Właściwie wątpliwości te pozostają wciąż niewyjaśnione ostatecznie.

Rola EPC w neowaskularyzacji może polegać również na parakrynną stymulacji komórek śródbłonna już istniejących kapilar, gdyż EPC produkują duże ilości czynników wzrostowych, takich jak: VEGF oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), czynnik wzrostowy hepatocytów (HGF), interleukina-8 (IL-8), płytkopochodny czynnik wzrostu-BB (PDGF-BB) czy czynnik chemotaktyczny monocytów (MCP-1) [29, 86] (ryc. 2). Wydaje się, że ten sposób stymulacji powstawania naczyń krwionośnych jest dominujący. Niedawno ukazały się prace demonstrujące skuteczność pobudzenia neowaskularyzacji *in vivo* przy zastosowaniu pożywek kondycjonowanych znanymi komórek progenitorowych śródbłonna [7, 18]. W obliczu trudności z uzyskaniem dużej liczby komórek do przeszczepienia, ewentualnych zagrożeń związanych z wprowadzeniem komórek EPC do organizmu oraz technicznych aspektów terapii komórkowej, strategia podania pacjentom mieszaniny czynników wzrostowych produkowanych przez EPC może okazać się lepszym rozwiązaniem.

Komórki prekursorowe EPC mobilizowane są do krwi przez uwolnione w niedotlenionej tkance cytokiny, takie jak: VEGF, SDF-1, angiopoetyna 1 czy czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) [3]. Proces mobilizacji EPC może być jednak zaburzony w stanach chorobowych, bowiem u pacjentów z chorobami układu krążenia liczba EPC we krwi jest obniżona [30, 89]. Uzasadnione jest więc przypuszczenie, że pożądany efekt terapeutyczny można osiągnąć przez stosowanie terapii komórkowej wykorzystującej komórki lub pożywki kondycjonowane.

ROLA WASKULOGENEZY W STANACH PATOLOGICZNYCH

Wiele procesów patologicznych związanych jest ze złą kondycją naczyń krwionośnych lub niedostatecznym ukrwieniem tkanki. Upośledzone gojenie ran w cukrzycy, choroba wieńcowa i niedokrwienna nóg to przykłady niekorzystnych zjawisk, w których głównym czynnikiem warunkującym chorobę jest osłabienie funkcji śródbłonna i zahamowana waskularyzacja, a bezpośrednią przyczyną dysfunkcji śródbłonna – ischemia [9]. Dlatego najlepszą strategią leczenia tego typu chorób wydaje się być pobudzenie angiogenezy i waskulogenezy. Wiele badań wskazuje na korzystne działanie EPC w regeneracji niedotlenionej tkanki [39, 42]. Ponadto okazuje się, że podanie EPC do uszkodzonej tkanki silniej stymuluje rewaskularyzację niż podanie dojrzałych komórek śródbłonna [47, 88].

Cukrzyca jest jednym ze schorzeń silnie wpływających na stan naczyń krwionośnych. Najgroźniejsze powikłania cukrzycy wynikają z dysfunkcji śródbłonna, prowadzącej do nefropatii, retinopatii, chronicznych, niegojących się owrzodzeń, rozwoju miażdżycy i zawału serca [51]. Przyczyną upośledzenia funkcji tych komórek w cukrzycy jest przewlekła hiperglikemia, a w konsekwencji chroniczny stres oksydacyjny, który powoduje apoptozę dojrzałych komórek śródbłonna [15]. W zdrowym organizmie w przypadku uszkodzenia naczyń krwionośnych jednym z mechanizmów naprawczych jest uwolnienie ze szpiku komórek EPC, które uczestniczą w neowaskularyzacji. Ostatnie badania wskazują jednak, że przewlekły stres oksydacyjny powoduje dysfunkcję również i tych komórek. Schatteman i wsp. oraz Tamarat i wsp. wykazali zmniejszenie liczby i upośledzenie różnicowania *in vitro* komórek EPC izolowanych od myszy z cukrzycą wyindukowaną streptozotocyną [73, 80]. Podobne doświadczenia na komórkach izolowanych od pacjentów z cukrzycą typu I wykazały zmniejszenie liczby EPC oraz ilości proangiogennych czynników przez nie produkowanych [51]. Również komórki EPC pochodzące od pacjentów z cukrzycą typu II wykazywały upośledzoną proliferację, adhezję i inkorporację w teście formowania tubul na matryzeli [84]. W ostatnio opublikowanej pracy Kang i wsp. wykazali u myszy z wywołaną streptozotocyną cukrzycą osłabioną mobilizację komórek progenitorowych śródbłonna w odpowiedzi na niedotlenienie kończyny tylnej. Efekt ten powodował opóźnioną rewaskularyzację ischemicznych mięśni [41].

Upośledzenie funkcji EPC wynikać może z utraty przez te komórki potencjału antyoksydacyjnego. Okazuje się bowiem, że EPC wykazują wysoką ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: katalaza [16], peroksydaza glutationowa (GPx-1) [24] oraz manganowa dysmutaza anionu ponadtlenkowego (MnSOD) [28], dzięki czemu są odporne na stres oksydacyjny. Tymczasem eksperymentalne wyłączenie genu *Sod2* czy *Gpx-1* w znaczącym stopniu upośledza żywotność komórek, czyniąc je bardziej wrażliwymi na działanie stresu oksydacyjnego [24, 28]. Ponadto okazuje się, że zmiany takie mogą powodować spadek potencjału waskulogennego EPC, co obserwuje się u myszy z wyłączonym genem *Gpx-1* [24]. Możliwe, że pociągają za sobą również upośledzenie wytwarzania przez EPC czynników wzrostowych. Należy jednak pamiętać, że istnieje wiele innych genów, które w istotny sposób regulują funkcję komórek progenitorowych śródbłonna (tab. 2). W przyszłości być może dobrym rozwiązaniem okaże się połączona terapia komórkowa i genowa – autologiczne komórki izolowane od pacjentów z chorobami układu krążenia mogą być transdukowane *ex vivo* genami o funkcjach antyoksydacyjnych, a następnie podawane choremu. Możliwość taka jest obecnie testowana przez nasz zespół.

MONOCYTY O WŁASNOŚCIACH ANGIOGENNYCH

Kilka lat po odkryciu EPC przez zespół Jeffreya Isnera [5], badacze zaczęli zwracać uwagę na podobieństwo fenotypowe tych komórek do monocytów. Zaczęła wtedy ewoluować koncepcja istnienia komórek układu odpornościowego zdolnych do uczestniczenia w powstawaniu naczyń krwionośnych. Dwie prace z 2003 roku jako pierwsze pokazały, że EPC wywodzą się z komórek monocytarnych oraz że mają ich cechy [64, 88]. Późniejsze doświadczenia zmieniły nieznacznie tę koncepcję; coraz częściej mówiło się po prostu o komórkach monocytarnych, które „udają” komórki progenitorowe śródbłonna. Hipoteza ta wywodziła się właściwie od obserwacji, że EPC *in vitro* nie proliferowały, a jest to cecha charakterystyczna dla monocytów [64]. Gdy porównywano ekspresję markerów śródbłonkowych, hematopoetycznych oraz progenitorowych w monocytach przed i po hodowli w medium różnicującym do śródbłonna, zaobserwowano, że indukcja różnicowania monocytów do śródbłonna powoduje utratę CD14 i CD45. Ponadto, niezróżnicowane pierwotne monocyty wykazują ekspresję większości genów śródbłonkowych nawet na poziomie wyższym, niż domniemane EPC. Wprawdzie ani świeże, ani hodowane monocyty nie wykazywały zdolności tworzenia tubul na matryzeli, to ich obecność była w hodowli CFU-EC niezbędna dla pozytywnego wyniku tego testu [66]. Autorzy pracy podsumowują, że powszechnie akceptowane cechy identyfikujące EPC (takie jak wychwytywanie acetylowanych cząstek LDL, wiązanie izolektyny, ekspresja CD31, CD105, CD144) są również charakterystyczne dla monocytów. To prowadzi często do uznania komórek układu odpornościowego za progenitory śródbłonkowe [66]. Należy jednak pamiętać, że ze względu na wielość hodowanych populacji i różnorodność warunków izolacji i hodowli EPC, stopień pochodzenia tych komórek od monocytów oraz mimikry

TABELA 2. Zestawienie wybranych genów regulujących funkcję komórek progenitorowych śródbłonka

TABLE 2. Genes regulating EPCs function

Gen	Wpływ na funkcję EPC	Piśmiennictwo
Kaspaza-8	tworzenie kolonii, adhezja i migracja; homing i tworzenie naczyń krwionośnych <i>in vivo</i>	Scharner et al. [72]
Kalikreina	migracja i aktywacja	Stone et al. [78]
PI3K gamma	prolifерacja, przeżywalność, migracja, inkorporacja w struktury naczyniowe	Madeddu et al. [54]
eNOS	mobilizacja	Aicher et al. [2]
Szlak Flk-1-PI3K-Akt-HDAC3-p53-p21	prolifерacja i różnicowanie	Zeng et al. [95]
HGF	prolifерacja, migracja, potencjał angiogeny	Song et al. [76]
MMP-9	tworzenie kolonii i tubul na matryzeli, adhezja, migracja, mobilizacja	Huang et al. [32]
MMP-2	prolifерacja, mobilizacja	Cheng et al. [13]
MnSOD	odporność na stres oksydacyjny	He et al. [28]
GPx-1	migracja, odporność na stres oksydacyjny, tworzenie naczyń krwionośnych <i>in vivo</i>	Galasso et al. [24]
Katalaza	przeżywalność, migracja	Dernbach et al. [16]
HO-1	mobilizacja, reendotelializacja	Lin et al. [50]
p66ShcA	przeżywalność	Di Stefano et al. [19]
Kinaza sfingozynowa	różnicowanie	Bonder et al. [10]
Szlak PPAR δ -PI3K-Akt	prolifерacja, przeżywalność, migracja, formowanie tubul na matryzeli	Han et al. [27]
Jagged-1	różnicowanie	Kwon et al. [48]
E-selektyna	adhezja, migracja, homing, inkorporacja w struktury naczyniowe	Oh et al. [59]; Nishiwaki et al. [58]
Angiotensyna II	adhezja, przeżywalność, produkcja NO	Yin et al. [93]
HIF-1a	różnicowanie, prolifерacja, migracja, homing, produkcja VEGF, NO	Jiang et al. [36]
Akt-FOXO3a	różnicowanie, dojrzewanie	Mogi et al. [56]
Id1	różnicowanie	Ciarrocchi et al. [14]
EphB4	adhezja, potencjał angiogeny	Foubert et al. [23]
CXC chemokine rec2	adhezja, homing	Hristov et al. [31]
ICAM/CD18	adhezja, potencjał angiogeny, homing	Wu et al. [92]
TGFb1	prolifерacja, przeżywalność, produkcja białek macierzy zewnątrzkomórkowej	Sales et al. [69]
Kaweolina	mobilizacja, homing	Sbaa et al. [70]
HDAC-HoxA9	różnicowanie	Rössig et al. [68]

monocytno-śródbłonkowej jest zmienny. Wiele prac, w tym również nasze niepublikowane wyniki badań, wykazują istnienie stosunkowo wysokiej bazalnej proliferacji komórek EPC, co może świadczyć o braku charakteru monocytarnego tej populacji. Z drugiej strony, niedawno ukazała się praca, w której wykazano, że monocyty ekspresujące CD31 i F4/80 mogą być rekrutowane do miejsc uszkodzenia tkanki, gdzie bezpośrednio biorą udział w neowaskularyzacji [45].

Dotychczasowe dywagacje na temat mimikry monocytarno-śródbłonkowej dotyczyły cech śródbłonkowych posiadanych przez monocyty. Raemer i współpracownicy spojrzeli na to zagadnienie z innej perspektywy [62]. Zadali pytanie, czy komórki EPC mają funkcje immunologiczne. Okazuje się, że EPC, tak jak komórki układu odpornościowego, wykazują zdolność prezentacji antygenów na poziomie podobnym do monocytów i dużo silniejszą niż dojrzałe komórki śródbłonka. Potrafią również kostymulować naiwne komórki T [62]. To implikuje, że można je uważać za profesjonalne komórki prezentujące antygeny. Jak zaznaczają autorzy pracy, fakt ten ma ogromne znaczenie w świetle potencjalnego zastosowania terapeutycznego EPC. W przypadku transplantacji organów, może mieć to pozytywny wpływ, ponieważ zastąpienie obcych komórek śródbłonka obecnych w przeszczepionym narządzie przez autologiczne komórki EPC może zahamować lub spowolnić immunologiczną reakcję przeszczepu. Można natomiast spodziewać się odpowiedzi immunologicznej ze strony tych komórek z chwilą powstania stanu zapalnego w narządzie. Z drugiej strony, komórki EPC mające własności stymulujące układ odpornościowy osiadające w miejscach uszkodzenia naczyń krwionośnych mogą nasilać na przykład procesy miażdżycowe [62].

Bez względu na faktyczne pochodzenie komórek progenitorowych śródbłonka oraz ekspresję markerów, odpowiednie warunki izolacji i hodowli mogą zaowocować odnalezieniem populacji o bardzo dobrych własnościach terapeutycznych. Najważniejszą w medycynie regeneracyjnej jest odpowiednia funkcja *in vivo* tych komórek, a nie ekspresja wybranych markerów. To, w jaki sposób komórki progenitorowe uczestniczą w powstawaniu naczyń krwionośnych, jest również kwestią o mniejszym znaczeniu. Bez względu na to, czy będzie to waskulogeneza *de novo*, inkorporacja w istniejące struktury naczyniowe czy parakrylna stymulacja neowaskularyzacji, jeśli efekt leczniczy jest osiągnięty w bezpieczny sposób, możemy mówić o sukcesie zastosowania EPC w terapeutycznej angiogenezie.

EPC W KLINICE

Odkrycie komórek progenitorowych śródbłonka otworzyło ogromne pole badań dotyczących potencjalnych możliwości ich terapeutycznego wykorzystania. Próby kliniczne z wykorzystaniem komórek szpikowych spowodowane były w pierwszej kolejności wynikami pracy opublikowanej w roku 2001, w której wykazano korzystny efekt podania izolowanych ze szpiku angioblastów w zawale serca u szczura [47]. Druga praca sugerowała, że progenitory szpikowe stymulują regenerację mięśnia

sercowego po zawale na skutek różnicowania się komórek szpikowych do kardiomiocytów [60]. Wyniki tej pracy poddane zostały surowej krytyce, w szczególności przez Charlesa Murry'a, który sugerował, że obserwowane po podaniu komórek szpikowych nowe kardiomiocyty to artefakt, a przyczyną poprawy funkcji serca *de facto* było nasilenie angiogenezy [57].

Należy zaznaczyć, że w dotychczas przeprowadzonych próbach klinicznych wykorzystywano różne populacje komórek. Jak wiadomo, komórki progenitorowe śródbłonna są pewną subpopulacją komórek jednojądrzastych – tMNC (ang. *total mononuclear cells*) izolowanych z krwi lub szpiku [34]. W różnych przeprowadzonych próbach klinicznych wykorzystywano zarówno nieselekcyjonowane komórki jednojądrzaste, jak również tylko część spośród tej populacji charakteryzującą się ekspresją danego markera [75]. W przypadku stosowania tylko pewnej subpopulacji spośród wszystkich komórek jednojądrzastych, selekcyjonowanymi komórkami, były te, które wykazywały ekspresję markerów CD34 [52] lub CD133 [1, 8, 77]. Ekspresja CD34 lub CD133 nie jest oczywiście wystarczającą cechą odróżniającą EPC od innych komórek, np. komórek hematopoetycznych CD34⁺, jednakże stosowanie selekcji na podstawie jednoczesnej ekspresji kilku markerów proponowanej przez niektóre grupy CD31, CD34, KDR [55] jest niemożliwe ze względu na znikomą ilość takich komórek we krwi czy szpiku. Jak podaje Zhang i współpracownicy komórki CD34⁺ stanowią wyłącznie 2,58±0,36%, natomiast komórki CD133⁺ 1,48±0,33% wszystkich komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej [96]. Zważywszy, że w próbach klinicznych pacjentowi podaje się od jednego do nawet kilkuset milionów komórek (w zależności od danej próby klinicznej i leczonej choroby), widać, że dostępność komórek o bardziej określonej charakterystyce jest jednym z czynników limitujących terapię komórkową [38]. Rozwiązaniem tego problemu może być ekspansja komórek w warunkach *in vitro* przed podaniem pacjentowi. Takie próby przeprowadzono [12, 20], należy jednak pamiętać, że w czasie hodowli *in vitro* komórki mogą zmieniać swoją charakterystykę [26]. Terapię komórkową z zastosowaniem komórek progenitorowych śródbłonna próbuje się stosować w chorobach, które wymagają zwiększenia ukrwienia tkanki przez nasilenie procesów angiogennych. Dotychczasowe próby kliniczne dotyczyły zastosowania tych komórek głównie w różnych postaciach zawału mięśnia sercowego (ostry zawał serca [12, 40, 53, 71, 91], przewlekły zawał serca [77], zawał serca z uniesieniem odcinka ST [35, 83]), a także w chorobie wieńcowej [20] oraz chorobach niedokrwienych kończyn [82]. Przegląd wybranych prób klinicznych przedstawiono w tabeli 3. Warto zaznaczyć, iż jedna z tych prób realizowana była w latach 2005–2008 w Polsce przez zespół prof. Michała Tendery.

Analizując wyniki i efektywność dotychczas przeprowadzonych prób klinicznych należy wziąć pod uwagę sposób podania komórek i ich liczbę. Szczególne znaczenie w przypadku prób dotyczących przywracania funkcji mięśnia sercowego po zawale ma także czas, jaki upływa od zawału do podania komórek. W jednej z największych prób klinicznych – randomizowanym, wielośrodkowym badaniu REPAIR-AMI – skutecznym zabiegiem było podanie ponad 200 milionów komórek jednojądrzastych.

TABELA 3. Próby kliniczne z wykorzystaniem komórek progenitorowych śródbłonek – zestawienie
 TABLE 3. Clinical trials with endothelial progenitor cells

Choroba	Podawane komórki, źródło	Średnia dawka (kom. x 10 ⁶)	Badana grupa (leczeni: kontrola)	Droga podania	Czas obserwacji (mies.)	Efektywność	Próba kliniczna Ref.
Choroba niedokrwienna serca	całkowita populacja z krwi obwodowej	22	34:23	dowieńcowo	3	nie	Assmus et al. [6]
	całkowita populacja ze szpiku kostnego	205	35:23			tak	
Ostry zawał serca	jednojądrzaste, szpik kostny	68	50:50	dowieńcowo	12	nie	ASTAMI [53]
	całkowita populacja ze szpiku kostnego	2460	30:30		18	nie	BOOST [9]
	jednojądrzaste, szpik kostny, ekspansja komórek <i>in vitro</i>	8000	34:34		6	nie	Chen et al. [12]
	jednojądrzaste, krew obwodowa, równocześnie podawano GCSF	1000	10:10:7*		6	tak**	MAGIC [40]
	jednojądrzaste, szpik kostny	236	100:101		12	tak	REPAIR-AMI [7]
Przewlekły zawał serca	jednojądrzaste, jednojądrzaste CD34 CXCR4	1,9	80:80:40***	domięśniowo	6	nie	REPAIR-AMI [7] REGENT [83]
	CD133, szpik kostny	5,6	46:9		6	tak	Stamm et al. [77]
Ostry zawał serca	CD133, szpik kostny	12,6	19:16	dowieńcowo	4	tak	Bartunek et al. [8]
Zawał serca	CD133, szpik kostny	1,89	18:9	domięśniowo	6	tak	Ahmedi et al. [1]
Dusznicza bolesna	CD34 z krwi obwodowej mobilizowane przez podawanie GCSF	0,3	18:6	domięśniowo	6	tak	Losodro et al. [52]
Przewlekła okluzja naczyń wieńcowych	jednojądrzaste, krew obwodowa, ekspansja komórek <i>in vitro</i> przed podaniem	69	13:13	dowieńcowo	3	tak	Erbs et al. [20]
Choroba niedokrwienna kończyn	jednojądrzaste, szpik kostny	1,5	22:***	domięśniowo	36	tak	TACT [82]

* grupa z podanymi komórkami i GCSF: wyłącznie GCSF; kontrola; ** odnotowano również zwiększone ryzyko wystąpienia restenozy;
 *** grupa z podanymi komórkami jednojądrzastymi:komórkami CD34 CXCR4;kontrola; **** pacjenci z chorobą niedokrwienną obu kończyn dolnych, do jednej kończyny podawano komórki, drugą traktowano jako kontrolę

Pacjentom 3 do 7 dni po zawale serca podawano w obręb tętnicy objętej zawałem komórki lub samo medium jako placebo [71]. Wśród pacjentów, którym podawano komórki, w ciągu następnych 12 miesięcy obserwowano mniej powtórnych zawałów i ograniczenie koniecznych kolejnych hospitalizacji z powodu dolegliwości naczyniowo-sercowych [71]. Natomiast w badaniu BOOST, w którym podawano około 10 razy więcej komórek, przy czym były to komórki pełnego szpiku kostnego, korzystne efekty można było obserwować po upływie 6 miesięcy – zwiększyła się frakcja wyrzutowa i kurczliwość lewej komory w rejonie przyległym do zawałowego, aczkolwiek po upływie 18 miesięcy parametry te pomiędzy grupą poddaną terapii komórkowej a kontrolną zrównały się [91]. Terapię komórkową próbowano także zastosować u chorych z ustabilizowaną chorobą niedokrwienną serca, którzy przeszli zawał przynajmniej 3 miesiące przed rozpoczęciem terapii. Porównano efektywność komórek izolowanych z krwi obwodowej oraz szpiku kostnego. Po 3 miesiącach w grupie, której podano komórki ze szpiku kostnego, zaobserwowano efektywność nieznaczną, ale statystycznie istotną w porównaniu z grupą, w której stosowano terapię komórkami z krwi, oraz z grupą kontrolną [6]. Próby, w których podawano komórki selekcyonowane na podstawie ekspresji CD133 czy CD34, pomimo mniejszej liczby podanych komórek okazały się być korzystne dla pacjentów po zawale serca (zwiększona frakcja wyrzutowa lewej komory [46, 77]) czy cierpiących na dusznicę bolesną (zwiększona perfuzja niedokrwionego obszaru [52]). Obiecujące wyniki dały próby terapii komórkowej u osób z chorobą niedokrwienną kończyn dolnych. Zwiększyło się dostarczanie tlenu do tkanki, pacjenci odczuwali mniejszy ból spoczynkowy oraz zmniejszenie bólu podczas chodzenia w kończynie nastrzykniętej szpikowymi komórkami jednojądrzastymi w porównaniu z drugą niedokrwioną kończyną będącą kontrolą [82]. Co ważne, powyższe próby kliniczne pokazały, że w przypadku wymienionych chorób terapia komórkowa wydaje się być zabiegiem bezpiecznym i niepowodującym poważnych skutków ubocznych. Jedynie iniekcja komórek bezpośrednio do mięśnia sercowego jest bardziej inwazyjna, powodując lokalne uszkodzenie tkanki. Dlatego preferowanym sposobem podania komórek jest ich dostarczenie bezpośrednio do tętnicy objętej zawałem [75].

Inną strategią zastosowania komórek progenitorowych śródbłonna w kardiologii jest użycie stentów pokrytych przeciwciałami rozpoznającymi antygen CD34, który występuje na ludzkich komórkach EPC. Strategia ta zakłada przyspieszone pokrywanie stentów przez monowarstwę komórek śródbłonna, co w konsekwencji ma chronić przez zakrzepem i restenozą [49]. Pierwsze tego typu próby zostały już przeprowadzone. Jednak istnieją również doniesienia o niekorzystnych i groźnych dla pacjenta zjawiskach towarzyszących tej terapii. Zaobserwowano komplikacje kwalifikujące do przetoczenia krwi oraz wyłączenia leków przeciwzakrzepowych i przeciwplatekcyjnych [49], jak również późne (mające miejsce po 156 dniach od implantacji stentu) wystąpienie zakrzepu i restenozy, a w konsekwencji zawału serca u pacjenta poddanego takiej terapii [67].

Podsumowując, dotychczasowe próby kliniczne przynajmniej w części potwierdziły terapeutyczny potencjał komórek progenitorowych. Wyniki kilkunastu randomizowanych badań wykazały skuteczność takiej terapii, jednakże efekty nie były tak

spektakularne, jak można by się spodziewać po wynikach eksperymentów na modelach zwierzęcych [38, 43, 75]. W przypadku zastosowania terapii komórkowej w regeneracji mięśnia sercowego po zawale, często porównywany parametr, jakim jest frakcja wyrzutowa lewej komory, poprawia się o kilka punktów procentowych. Warto natomiast odnotować, że pomimo stosunkowo niewielkiej poprawy frakcji wyrzutowej obserwowanej w badaniach, w jednej z większych prób (REPAIR-AMI) leczeni za pomocą terapii komórkowej pacjenci rzadziej wymagali ponownej hospitalizacji z powodów niewydolności naczyniowo-sercowej, co wydaje się być jednym z ważniejszych kryteriów oceny skuteczności terapii [71]. Korzystne są także wyniki aplikacji komórek progenitorowych w przypadku zaawansowanej choroby niedokrwiennej kończyn, dla której nie istnieje dzisiaj żadna inna skuteczna terapia [82]. W przypadku kilku prób klinicznych nie wykazano korzystnych efektów terapeutycznych [53, 91]. Powodów tłumaczących brak efektywności lub tylko nieznaczny efekt terapeutyczny prób może być kilka. W dalszym ciągu nie wiemy, które komórki spośród komórek krwi obwodowej czy szpiku kostnego mają największy potencjał angiogeny. Być może dokładniejsze określenie subpopulacji o charakterze progenitorów śródbłonna, próba jej izolacji i podania okaże się receptą na zwiększenie efektywności kolejnych prób. Nie możemy jednak zapominać o czynniku limitującym, jakim jest liczba dostępnych komórek. Pacjenci, którzy wymagają leczenia, często są w podeszłym wieku, co wpływa u nich na wielkość populacji EPC [37, 85]. Ponadto, chorobom niedokrwinnym towarzyszą takie schorzenia, jak: cukrzyca, nadciśnienie, hipercholesterolemia, które jak pokazano dodatkowo wpływają na zmniejszenie liczby komórek progenitorowych oraz na ich funkcjonowanie [75]. Warto również zwrócić uwagę, że komórki po iniekcji trafiają do niekorzystnego środowiska, takiego jak mięsień po zawale, kończyna objęta martwicą i niedokrwieniem. W takich warunkach szansa przetrwania komórek oczywiście spada. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się połączenie terapii komórkowej z terapią genową. W tego typu próbach, izolowane od pacjenta komórki poddaje się modyfikacji genetycznej *ex-vivo*, a następnie podaje do tkanki wymagającej leczenia. Drogą modyfikacji genetycznej możemy uzyskać nadekspresję genów cytoprotekcyjnych, które mogą pomóc przeżyć podawanym komórkom w trudnych warunkach niedokrwionej tkanki. Przykładem takiego badania jest uzyskanie nadekspresji oksygenazy hemowej pierwszej w mezenchymalnych komórkach macierzystych i podanie ich w obręb mięśnia zawałowego [81].

Uzyskane wyniki pozwalają z umiarkowanym optymizmem patrzeć na przyszłe zastosowanie kliniczne terapii komórkowej w chorobach naczyniowych. Niezaprzeczalnie, aby udoskonalić dotychczasowe metody, potrzebne są kolejne badania, zarówno na podstawowym poziomie wyjaśniającym mechanizm terapeutycznego działania i dokładniej charakteryzujące populacje o potencjale angiogenym, jak również następne, większe próby kliniczne III fazy.

LITERATURA

- [1] AHMADI H, BAHARVAND H, ASHTIANI SK, SOLEIMANI M, SADEGHIAN H, ARDEKANI JM, MEHRJERDINZ, KOUHKAN A, NAMIRI M, MADANI-CIVI M, FATTAHI F, SHAHVERDIA, DIZAJI AV. Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Curr Neurovasc Res* 2007; **4**: 153–160.
- [2] AICHER A, HEESCHEN C, MILDNER-RIHM C, URBICH C, IHLING C, TECHNAU-IHLING K, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; **9**: 1370–1376.
- [3] ASAHARA T, KAWAMOTO A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287**: C572–579.
- [4] ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MANGNER M, ISNER JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; **85**: 221–228.
- [5] 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.
- [6] ASSMUS B, HONOLD J, SCHACHINGER V, BRITTEN MB, FISCHER-RASOKAT U, LEHMANN R, TEUPE C, PISTORIUS K, MARTIN H, ABOLMAALI ND, TONN T, DIMMELER S, ZEIHNER AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1222–1232.
- [7] BARCELOS LS, DUPLAA C, KRANKEL N, GRAIANI G, INVERNICI G, KATARE R, SIRAGUSA M, MELONI M, CAMPESI I, MONICA M, SIMM A, CAMPAGNOLO P, MANGIALARDI G, STEVANATO L, ALESSANDRI G, EMANUELI C, MADEDDU P. Human CD133⁺ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res* 2009; **104**: 1095–1102.
- [8] BARTUNEK J, VANDERHEYDEN M, VANDEKERCKHOVE B, MANSOUR S, DE BRUYNE B, DE BOND T, VAN HAUTE I, LOOTENS N, HEYNDRICKX G, WIJNS W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005; **112**: 1178–1183.
- [9] BEHRENDT D, GANZ P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; **90**: 40L–48L.
- [10] BONDER CS, SUN WY, MATTHEWS T, CASSANO C, LI X, RAMSHAW HS, PITSON SM, LOPEZ AF, COATES PT, PROIA RL, VADAS MA, GAMBLE JR. Sphingosine kinase regulates the rate of endothelial progenitor cell differentiation. *Blood* 2009; **113**: 2108–2117.
- [11] CERADINI DJ, GURTNER GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med* 2005; **15**: 57–63.
- [12] CHEN SL, FANG WW, QIAN J, YE F, LIU YH, SHAN SJ, ZHANG JJ, LIN S, LIAO LM, ZHAO RC. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004; **117**: 1443–1448.
- [13] CHENG XW, KUZUYA M, NAKAMURA K, MAEDA K, TSUZUKI M, KIM W, SASAKI T, LIU Z, INOUE N, KONDO T, JIN H, NUMAGUCHI Y, OKUMURA K, YOKOTAM, IGUCHIA, MUROHARA T. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res* 2007; **100**: 904–913.
- [14] CIARROCCHI A, JANKOVIC V, SHAKED Y, NOLAN DJ, MITTAL V, KERBEL RS, NIMER SD, BENEZRA R. Id1 restrains p21 expression to control endothelial progenitor cell formation. *PLoS One* 2007; **2**: e1338.
- [15] CREAHER MA, LUSCHER TF, COSENTINO F, BECKMAN JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; **108**: 1527–1532.
- [16] DERNBACH E, URBICH C, BRANDES RP, HOFMANN WK, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004; **104**: 3591–3597.
- [17] DESHANE J, CHEN S, CABALLERO S, GROCHOT-PRZECZEK A, WAS H, LI CALZI S, LACH R, HOCK TD, CHEN B, HILL-KAPTURCZAK N, SIEGAL GP, DULAK J, JOZKOWICZA, GRANT MB, AGARWAL A. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; **204**: 605–618.

- [18] DI SANTO S, YANG Z, WYLER VON BALLMOOS M, VOELZMANN J, DIEHM N, BAUMGARTNER I, KALKA C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: *in vitro* generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 2009; **4**: e5643.
- [19] DI STEFANO V, CENCIONI C, ZACCAGNINI G, MAGENTA A, CAPOGROSSI MC, MARTELLI F. p66ShcA modulates oxidative stress and survival of endothelial progenitor cells in response to high glucose. *Cardiovasc Res* 2009; **82**: 421–429.
- [20] ERBS S, LINKE A, ADAMS V, LENK K, THIELE H, DIEDERICH KW, EMMRICH F, KLUGE R, KENDZIORRA K, SABRI O, SCHULER G, HAMBRECHT R. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005; **97**: 756–762.
- [21] FERRARA N, HENZEL WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 851–858.
- [22] FOLKMAN J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 1984; **51**: 601–604.
- [23] FOUBERT P, SILVESTRE JS, SOUTTOU B, BARATEAU V, MARTIN C, EBRAHIMIAN TG, LEREDEAN C, CONTRERES JO, SULPICE E, LEVY BI, PLOUET J, TOBELEM G, LE RICOUSSE-ROUSANNE S. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1527–1537.
- [24] GALASSO G, SCHIEKOFER S, SATO K, SHIBATAR, HANDY DE, OUCHIN, LEOPOLD JA, LOSCALZO J, WALSH K. Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res* 2006; **98**: 254–261.
- [25] GARCIA-BARROS M, PARIS F, CORDON-CARDO C, LYDEN D, RAFII S, HAIMOVITZ-FRIEDMAN A, FUKS Z, KOLESNICK R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003; **300**: 1155–1159.
- [26] HAI-JIANG W, XIN-NA D, HUI-JUN D. Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Am J Hematol* 2008; **83**: 922–926.
- [27] HAN JK, LEE HS, YANG HM, HUR J, JUN SI, KIM JY, CHO CH, KOH GY, PETERS JM, PARK KW, CHO HJ, LEE HY, KANG HJ, OH BH, PARK YB, KIM HS. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* 2008; **118**: 1021–1033.
- [28] HE T, PETERSON TE, HOLMUHAMEDOV EL, TERZIC A, CAPLICE NM, OBERLEY LW, KATUSIC ZS. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 2021–2027.
- [29] HE T, PETERSON TE, KATUSIC ZS. Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H968–972.
- [30] HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIWA MA, QUYYUMI AA, FINKEL T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; **348**: 593–600.
- [31] HRISTOV M, ZERNECKE A, BIDZHEKOV K, LIEHN EA, SHAGDARSUREN E, LUDWIG A, WEBER C. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 2007; **100**: 590–597.
- [32] HUANG PH, CHEN YH, WANG CH, CHEN JS, TSAI HY, LIN FY, LO WY, WU TC, SATA M, CHEN JW, LIN SJ. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1179–1184.
- [33] HUR J, YOON CH, KIM HS, CHOI JH, KANG HJ, HWANG KK, OH BH, LEE MM, PARK YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 288–293.
- [34] INGRAM DA, CAPLICE NM, YODER MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; **106**: 1525–1531.
- [35] JANSSENS S, DUBOIS C, BOGAERT J, THEUNISSEN K, DEROOSE C, DESMET W, KALANTZI M, HERBOTS L, SINNAEVE P, DENS J, MAERTENS J, RADEMAKERS F, DYMARKOWSKI S, GHEYSENS O, VAN CLEEMPUT J, BORMANS G, NUYTS J, BELMANS A, MORTELMANS L, BOOGAERTS M, VAN DE WERF F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; **367**: 113–121.

- [36] JIANG M, WANG B, WANG C, HE B, FAN H, GUO TB, SHAO Q, GAO L, LIU Y. Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs. *J Cell Biochem* 2008; **103**: 321–334.
- [37] JIE KE, GOOSSENS MH, VAN OOSTROM O, LILJEN MR, VERHAAR MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 2009; **202**: 345–347.
- [38] JUJO K, II M, LOSORDO DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 530–544.
- [39] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LIT, ISNER JM, ASAHARA T. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3422–3427.
- [40] KANG HJ, KIM HS, ZHANG SY, PARK KW, CHO HJ, KOO BK, KIM YJ, SOO LEE D, SOHN DW, HAN KS, OH BH, LEE MM, PARK YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; **363**: 751–756.
- [41] KANG LN, CHEN Q, WANG L, GAO L, MENG K, CHEN JH, FERRO A, XU B. Decreased Mobilization of Endothelial Progenitor Cells Contributes to Impaired Neovascularization in Diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009.
- [42] KAWAMOTO A, GWON HC, IWAGURO H, YAMAGUCHI JI, UCHIDA S, MASUDA H, SILVER M, MA H, KEARNEY M, ISNER JM, ASAHARA T. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103**: 634–637.
- [43] KAWAMOTO A, LOSORDO DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends Cardiovasc Med* 2008; **18**: 33–37.
- [44] KERBEL RS, BENEZRA R, LYDEN DC, HATTORI K, HEISSIG B, NOLAN DJ, MITTAL V, SHAKED Y, DIAS S, BERTOLINI F, RAFII S. Endothelial progenitor cells are cellular hubs essential for neoangiogenesis of certain aggressive adenocarcinomas and metastatic transition but not adenomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: E54; author reply E55.
- [45] KIM SJ, KIM JS, PAPADOPOULOS J, WOOK KIM S, MAYA M, ZHANG F, HE J, FAN D, LANGLEY R, FIDLER IJ. Circulating monocytes expressing CD31: implications for acute and chronic angiogenesis. *Am J Pathol* 2009; **174**: 1972–1980.
- [46] KLEIN HM, GHODSIZAD A, MARKTANNER R, POLL L, VOELKEL T, MOHAMMAD HASANI MR, PIECHACZEK C, FEIFEL N, STOCKSCHLAEDER M, BURCHARDT ER, KAR BJ, GREGORIC I, GAMS E. Intramyocardial implantation of CD133⁺ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg Forum* 2007; **10**: E66–69.
- [47] KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; **7**: 430–436.
- [48] KWON SM, EGUCHI M, WADA M, IWAMI Y, HOZUMI K, IWAGURO H, MASUDA H, KAWAMOTO A, ASAHARA T. Specific Jagged-1 signal from bone marrow microenvironment is required for endothelial progenitor cell development for neovascularization. *Circulation* 2008; **118**: 157–165.
- [49] LEE WL, HO HH, CHAN KW, HAI SH, SIN WC, TAM CC, LAM L, CHAN HW. Successful use of endothelial progenitor cell capture stents in two cases of acute coronary syndrome complicated by major bleeding episodes. *Int J Cardiol* 2009.
- [50] LIN HH, CHEN YH, YET SF, CHAU LY. Heme oxygenase-1/carbon monoxide enhances reendothelialization after vascular injury via promoting mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 2009.
- [51] LOOMANS CJ, DE KONING EJ, STAAL FJ, ROOKMAAKER MB, VERSEYDEN C, DE BOER HC, VERHAAR MC, BRAAM B, RABELINK TJ, VAN ZONNEVELD AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; **53**: 195–199.
- [52] LOSORDO DW, SCHATZ RA, WHITE CJ, UDELSON JE, VEERESHWARAYYA V, DURGIN M, POH KK, WEINSTEIN R, KEARNEY M, CHAUDHRY M, BURG A, EATON L, HEYD L, THORNE T, SHTURMAN L, HOFFMEISTER P, STORY K, ZAK V, DOWLING D, TRAVERSE JH, OLSON RE, FLANAGAN J, SODANO D, MURAYAMA T, KAWAMOTO A, KUSANO KF, WOLLINS J, WELT F, SHAH P, SOUKAS P, ASAHARA T, HENRY TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; **115**: 3165–3172.

- [53] LUNDE K, SOLHEIM S, AAKHUS S, ARNESEN H, ABDELNOOR M, EGELAND T, ENDRESEN K, ILEBEKKA, MANGSCHAU A, FJELD JG, SMITH HJ, TARALDSRUD E, GROGAARD HK, BJORNERHEIM R, BREKKE M, MULLER C, HOPP E, RAGNARSSON A, BRINCHMANN JE, FORFANG K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1199–209.
- [54] MADEDDU P, KRAENKEL N, BARCELOS LS, SIRAGUSA M, CAMPAGNOLO P, OIKAWAA, CAPO-RALI A, HERMAN A, AZZOLINO O, BARBERIS L, PERINO A, DAMILANO F, EMANUELI C, HIRSCH E. Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 68–76.
- [55] MASSA M, ROSTI V, FERRARIO M, CAMPANELLI R, RAMAJOLI I, ROSSO R, DE FERRARI GM, FERLINI M, GOFFREDO L, BERTOLETTI A, KLERSY C, PECCI A, MORATTI R, TAVAZZI L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005; **105**: 199–206.
- [56] MOGI M, WALSH K, IWAI M, HORIUCHI M. Akt-FOXO3a signaling affects human endothelial progenitor cell differentiation. *Hypertens Res* 2008; **31**: 153–159.
- [57] MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, RUBART M, PASUMARTHI KB, VIRAG JI, BARTELMEZ SH, POPPA V, BRADFORD G, DOWELL JD, WILLIAMS DA, FIELD LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; **428**: 664–668.
- [58] NISHIWAKI Y, YOSHIDA M, IWAGURO H, MASUDA H, NITTA N, ASAHARA T, ISOBE M. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 512–518.
- [59] OH IY, YOON CH, HUR J, KIM JH, KIM TY, LEE CS, PARK KW, CHAE IH, OH BH, PARK YB, KIM HS. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood* 2007; **110**: 3891–3899.
- [60] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705.
- [61] PURHONEN S, PALM J, ROSSI D, KASKENPAA N, RAJANTIE I, YLA-HERTTUALA S, ALITALO K, WEISSMAN IL, SALVEN P. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 6620–6625.
- [62] RAEMER PC, HAEMMERLING S, GIESE T, CANADAY DH, KATUS HA, DENGLER TJ, SHANKAR SG. Endothelial progenitor cells possess monocyte-like antigen-presenting and T-cell-co-stimulatory capacity. *Transplantation* 2009; **87**: 340–349.
- [63] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**: 702–712.
- [64] REHMAN J, LI J, ORSCHELL CM, MARCH KL. Peripheral blood „endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; **107**: 1164–1169.
- [65] RISAU W, SARIOLA H, ZERWES HG, SASSE J, EKBLÖM P, KEMLER R, DOETSCHMAN T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988; **102**: 471–478.
- [66] ROHDE E, MALISCHNIK C, THALER D, MAIERHOFER T, LINKESCH W, LANZER G, GUELLY C, STRUNK D. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 357–367.
- [67] ROSSI ML, ZAVALLONI D, GASPARINI GL, MANGO R, BELLI G, PRESBITERO P. The first report of late stent thrombosis leading to acute myocardial infarction in patient receiving the new endothelial progenitor cell capture stent. *Int J Cardiol* 2009.
- [68] ROSSIG L, URBICH C, BRUHL T, DERNBACHE E, HEESCHEN C, CHAVAKIS E, SASAKI K, AICHER D, DIEHL F, SEEGER F, POTENTE M, AICHER A, ZANETTA L, DEJANA E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* 2005; **201**: 1825–1835.
- [69] SALES VL, ENGELMAYR GC, JR., METTLER BA, JOHNSON JA, JR., SACKS MS, MAYER JE, JR. Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue-engineering scaffolds. *Circulation* 2006; **114**: 1193–1199.

- [70] SBAA E, DEWEVER J, MARTINIVE P, BOUZIN C, FRERART F, BALLIGAND JL, DESSY C, FERON O. Caveolin plays a central role in endothelial progenitor cell mobilization and homing in SDF-1-driven postischemic vasculogenesis. *Circ Res* 2006; **98**: 1219–1227.
- [71] SCHACHINGER V, ERBS S, ELSASSER A, HABERBOSCH W, HAMBRECHT R, HOLSCHERMANN H, YU J, CORTI R, MATHEY DG, HAMM CW, SUSELBECK T, WERNER N, HAASE J, NEUZNER J, GERMING A, MARK B, ASSMUS B, TONN T, DIMMELER S, ZEIHNER AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; **27**: 2775–2783.
- [72] SCHARNER D, ROSSIG L, CARMONA G, CHAVAKIS E, URBICH C, FISCHER A, KANG TB, WALLACH D, CHIANG YJ, DERIBE YL, DIKIC I, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Caspase-8 is involved in neovascularization-promoting progenitor cell functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 571–578.
- [73] SCHATTEMAN GC, HANLON HD, JIAO C, DODDS SG, CHRISTY BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 2000; **106**: 571–578.
- [74] SCHMEISSER A, GARLICH CD, ZHANG H, ESKAFI S, GRAFFY C, LUDWIG J, STRASSER RH, DANIEL WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; **49**: 671–680.
- [75] SEKIGUCHI H, II M, LOSORDO DW. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *J Cell Physiol* 2009; **219**: 235–242.
- [76] SONG MB, YU XJ, ZHU GX, CHEN JF, ZHAO G, HUANG L. Transfection of HGF gene enhances endothelial progenitor cell (EPC) function and improves EPC transplant efficiency for balloon-induced arterial injury in hypercholesterolemic rats. *Vascul Pharmacol* 2009.
- [77] STAMM C, KLEINE HD, CHOI YH, DUNKELMANN S, LAUFFS JA, LORENZEN B, DAVID A, LIEBOLD A, NIENABER C, ZURAKOWSKI D, FREUND M, STEINHOFF G. Intramyocardial delivery of CD133⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; **133**: 717–725.
- [78] STONE OA, RICHER C, EMANUELI C, VAN WEEL V, QUAX PH, KATARE R, KRAENKEL N, CAMPAGNOLO P, BARCELOS LS, SIRAGUSA M, SALA-NEWBY GB, BALDESSARI D, MIONE M, VINCENT MP, BENEST AV, AL HAJ ZEN A, GONZALEZ J, BATES DO, ALHENC-GELAS F, MADEDDU P. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 657–664.
- [79] TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; **5**: 434–438.
- [80] TAMARAT R, SILVESTRE JS, LE RICOUSSE-ROUSSANNE S, BARATEAU V, LECOMTE-RACLET L, CLERGUE M, DURIEZ M, TOBELEM G, LEVY BI. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 2004; **164**: 457–466.
- [81] TANG YL, TANG Y, ZHANG YC, QIAN K, SHEN L, PHILLIPS MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; **46**: 1339–1350.
- [82] TATEISHI-YUYAMA E, MATSUBARA H, MUROHARA T, IKEDA U, SHINTANI S, MASAKI H, AMANO K, KISHIMOTO Y, YOSHIMOTO K, AKASHI H, SHIMADA K, IWASAKA T, IMAIZUMI T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427–435.
- [83] TENDER A, WOJAKOWSKI W, RUZYLO W, CHOJNOWSKA L, KEPKA C, TRACZ W, MUSIALEK P, PIWOWARSKA W, NESSLER J, BUSZMAN P, GRAJEK S, BREBOROWICZ P, MAJKA M, RATAJCZAK MZ. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34⁺CXCR4⁺ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J* 2009; **30**: 1313–1321.
- [84] TEPPER OM, GALIANO RD, CAPLA JM, KALKA C, GAGNE PJ, JACOBOWITZ GR, LEVINE JP, GURTNER GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; **106**: 2781–2786.

- [85] THUM T, HOEBER S, FROESE S, KLINK I, STICHTENOTH DO, GALUPPO P, JAKOB M, TSIKAS D, ANKER SD, POOLE-WILSON PA, BORLAK J, ERTL G, BAUERSACHS J. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res* 2007; **100**: 434–443.
- [86] URBICH C, AICHERA, HEESCHEN C, DERNBACH E, HOFMANN WK, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **39**: 733–742.
- [87] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2004; **14**: 318–322.
- [88] URBICH C, HEESCHEN C, AICHER A, DERNBACH E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 2511–2516.
- [89] VASAM, FICHTLSCHERER S, AICHERA, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; **89**: E1–7.
- [90] WICKERSHEIM A, KERBER M, DE MIGUEL LS, PLATE KH, MACHEIN MR. Endothelial progenitor cells do not contribute to tumor endothelium in primary and metastatic tumors. *Int J Cancer* 2009.
- [91] WOLLERT KC, MEYER GP, LOTZ J, RINGES-LICHTENBERG S, LIPPOLT P, BREIDENBACH C, FICHTNER S, KORTE T, HORNIG B, MESSINGER D, ARSENIJEV L, HERTENSTEIN B, GANSERA, DREXLER H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; **364**: 141–148.
- [92] WU Y, IP JE, HUANG J, ZHANG L, MATSUSHITA K, LIEW CC, PRATT RE, DZAU VJ. Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 2006; **99**: 315–322.
- [93] YIN T, MA X, ZHAO L, CHENG K, WANG H. Angiotensin II promotes NO production, inhibits apoptosis and enhances adhesion potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Cell Res* 2008; **18**: 792–799.
- [94] YODER MC, MEAD LE, PRATER D, KRIER TR, MROUEH KN, LI F, KRASICH R, TEMM CJ, PRCHAL JT, INGRAM DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; **109**: 1801–1809.
- [95] ZENG L, XIAO Q, MARGARITA, ZHANG Z, ZAMPETAKI A, PATEL S, CAPOGROSSI MC, HU Y, XU Q. HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. *J Cell Biol* 2006; **174**: 1059–1069.
- [96] ZHANG S, GE J, SUN A, XU D, QIAN J, LIN J, ZHAO Y, HU H, LI Y, WANG K, ZOU Y. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 1132–1147.

*Prof. dr hab. Józef Dulak,
Zakład Biotechnologii Medycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
e-mail: jozef.dulak@uj.edu.pl; 12 664 6375*