

# Circulating endothelial cells (CECs) and circulating endothelial progenitor cells (CEPCs) in selected diseases

## Krążące komórki śródbłonna (CECs) i krążące progenitorowe komórki śródbłonna (CEPCs) w wybranych jednostkach chorobowych

Krzysztof Scheller, Jacek Wroński, Marcin Feldo

Chair and Department of Vascular Surgery and Angiology Medical University of Lublin, Poland (Katedra i Klinika Chirurgii Naczyń i Angiologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie)

### Abstract

*Circulating endothelial cells (CECs) are exfoliated endothelial cells which have penetrated into peripheral blood. CECs can be isolated from peripheral blood and counted. The elevated level of these cells, which occurs in a variety of diseases and leads to blood vessels damage, is a new and promising diagnostic and prognostic marker. The number of identified diseases that raise endothelial cell levels in peripheral blood has been constantly increasing. Circulating endothelial precursor cells (CEPCs) come from the bone marrow, differ from CECs in terms of phenotypic features, and participate in postnatal neovascularization and reconstruction of the damaged endothelium. CEPCs are released from the bone marrow in response to tissue ischemia and act as a substrate for neoangiogenesis there. The aim of this study is to present the issue of CECs and CEPCs, their immunological characteristics and methods of determination, as well as selected diseases and clinical conditions in which the level of these cells is connected with their manifestation and/or exacerbation.*

**Key words:** circulating endothelial cells, circulating endothelial precursors cells, ischemic diseases

### Streszczenie

*Krążące komórki śródbłonna (CEC, circulating endothelial cells) są komórkami złuszczonego śródbłonna naczyńowego, które przedostały się do krwi obwodowej. Mogą być z niej izolowane i liczone. Ich podwyższona liczba w różnych jednostkach chorobowych, przebiegających z uszkodzeniem naczyń jest nowym i obiecującym markerem diagnostyczno-prognostycznym. Liczba opisanych chorób przebiegających z podwyższeniem stężenia CEC we krwi obwodowej stale rośnie. Krążące progenitorowe komórki śródbłonna (CEPC, circulating endothelial precursor cells) pochodzące ze szpiku kostnego, mają odmienne do CEC cechy fenotypowe, biorą udział w postnatalnej neowaskularyzacji, uczestniczą w odbudowie uszkodzonego śródbłonna, a w odpowiedzi na niedokrwienie tkanki są uwalniane ze szpiku, gdzie stanowią substrat w procesie neoangiogenezy. Celem pracy jest przybliżenie zagadnienia CEC i CEPC, ich charakterystyki immunologicznej, metod oznaczania oraz wybranych jednostek chorobowych i stanów klinicznych, w których stężenie tych komórek współistnieje z ich występowaniem i/lub stopniem zaostrzenia.*

**Słowa kluczowe:** krążące komórki śródbłonna, krążące progenitorowe komórki śródbłonna, choroby niedokrwienne

Acta Angiol 2014; 20, 1: 1–18

### Adres do korespondencji:

prof. nadzw. dr hab. n. med. Jacek Wroński  
Katedra i Klinika Chirurgii Naczyń i Angiologii  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Staszica 11, 20–089 Lublin  
e-mail: jacek.5996069@interia.pl

## Introduction

Circulating endothelial cells (CECs) are exfoliated endothelial cells which have penetrated into peripheral blood. CECs can be isolated from peripheral blood and counted. The elevated level of these cells, which occurs in a variety of diseases and leads to blood vessel damage, is a new and promising diagnostic and prognostic marker. The number of identified diseases that raise endothelial cell levels in peripheral blood has been constantly increasing. This issue has been described in chronic venous insufficiency, Behcet's disease, septic shock, breast cancer, myeloid leukaemia, lymphoma, inflammatory vascular diseases, Kawasaki disease, systemic lupus erythematosus, scleroderma, diabetes, ischemic heart disease, acute coronary syndromes, abdominal aortic aneurysm, lower extremities ischemia, ischemic stroke, pulmonary hypertension, cytomegalovirus (CMV) infection and Rickettsia Conorii infection, among others.

Circulating endothelial progenitor cells (CEPCs) were first described in 1997. They come from the bone marrow, differ from CECs in terms of phenotypic features, and participate in postnatal neovascularization and reconstruction of the damaged endothelium. CEPCs are released from the bone marrow in response to tissue ischemia (through a variety of factors, including VEGF) and act as a substrate for neoangiogenesis there (fig. 1).

The aim of this study is to present the issue of CECs and CEPCs, their immunological characteristics and methods of determination, as well as selected diseases and clinical conditions in which the level of these cells is connected with their manifestation and/or exacerbation.

### Circulating endothelial cells (CECs)

CECs were first identified and described in the 1970s, when a light microscope was used to assess the morphology of peripheral blood smear [1, 2]. Monoclonal antibodies were first applied to identify CECs in 1991.

The immunomagnetic isolation and flow cytometry methods are currently considered the 'gold standard' [1, 3]. A study was devised to compare the sensitivity and specificity of the two methods in 2006. In this experiment, Goon et al. showed that the methods of immunomagnetic isolation and flow cytometry are equally valuable and their results consistent. CECs are exfoliated cells, that is vascular endothelial cells separated from the endothelium and expressing the surface receptors CD146 and CD34, but not CD45. In their studies, Rowand et al. examined the levels of CECs in tumour metastases [4] using the receptors CD146+, CD105+ and CD45-. Receptor CD146 may also occur on the surface of CEPCs, *tromboblats*, periodontal tissues, malignant tissues (prostate adenoma, melanoma) [2, 5],

## Wstęp

Krążące komórki śródbłonna (CEC, *circulating endothelial cells*) są komórkami złuszczonego śródbłonna naczyń, które przemieszczają się wraz z prądem krwi. Mogą być z niej izolowane i liczone. Ich podwyższona liczba — w różnych jednostkach chorobowych, przebiegających z uszkodzeniem naczyń — jest nowym i obiecującym markerem diagnostycznym i prognostycznym. Liczba opisanych chorób, przebiegających z podwyższeniem poziomu komórek śródbłonna w krwi obwodowej, stale rośnie. Zagadnienie to zostało opisane między innymi w przewlekłej niewydolności żylnej, chorobie Behceta, wstrząsie septycznym, raku piersi, białaczce szpikowej, chłoniaku, zapalnych chorobach naczyń, chorobie Kawasaki, toczeniu rumieniowatym układowym, twardzinie układowej, cukrzycy, chorobie niedokrwiennej serca, ostrych zespołach wieńcowych, tętniaku aorty brzusznej, niedokrwieniu kończyn dolnych, udarze niedokrwinnym mózgu, nadciśnieniu płucnym, infekcji cytomegalowirusem (CMV, *cytomegalovirus*), infekcji Rickettsia Conorii.

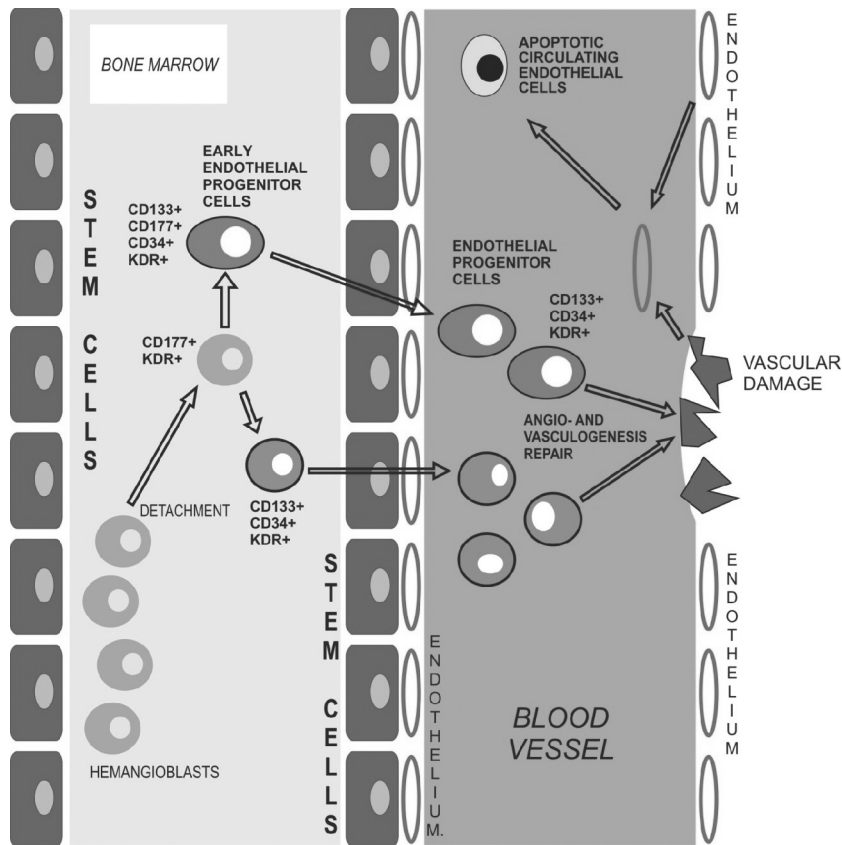
W 1997 roku opisano po raz pierwszy krążące progenitorowe komórki śródbłonna (CEPC, *circulating endothelial precursor cells*). Pochodzą one ze szpiku kostnego, mają odmienne w stosunku do CEC cechy fenotypowe, biorą udział w postnatalnej neowaskularyzacji, uczestniczą w odbudowie uszkodzonego śródbłonna, a w odpowiedzi na niedokrwienie tkanki są uwalniane ze szpiku (za pośrednictwem wielu czynników, m.in. VEGF), gdzie stanowią substrat w procesie neoangiogenezy (ryc. 1).

Celem pracy jest przybliżenie zagadnienia CEC i CEPC, ich charakterystyka immunologiczna, metody oznaczania oraz wybrane jednostki chorobowe i stany kliniczne, w których liczba tych komórek współistnieje z ich występowaniem i/lub stopniem zaostżenia.

### Krążące komórki śródbłonna (CEC)

Krążące komórki śródbłonna zostały po raz pierwszy zidentyfikowane i opisane w lat 70. ubiegłego stulecia. Stosowano wówczas metody oceny morfologicznej rozmazów krwi obwodowej i ich oceny w mikroskopie świetlnym [1, 2]. W 1991 roku po raz pierwszy zastosowano przeciwciała monoklonalne dla identyfikacji CEC.

Obecnie za „złoty standard” uważa się metodę izolacji immunomagnetycznej oraz cytofluorymetrii przepływowej [1, 3]. Praca, której celem było porównanie czułości i swoistości obu metod pochodzi z 2006 roku. W doświadczeniu tym Goon i wsp. dowodzą, że metody izolacji immunomagnetycznej i cytofluorymetrii przepływowej są równoważnościowe, a otrzymane wyniki zgodne. Za krążące komórki śródbłonna uznaje się

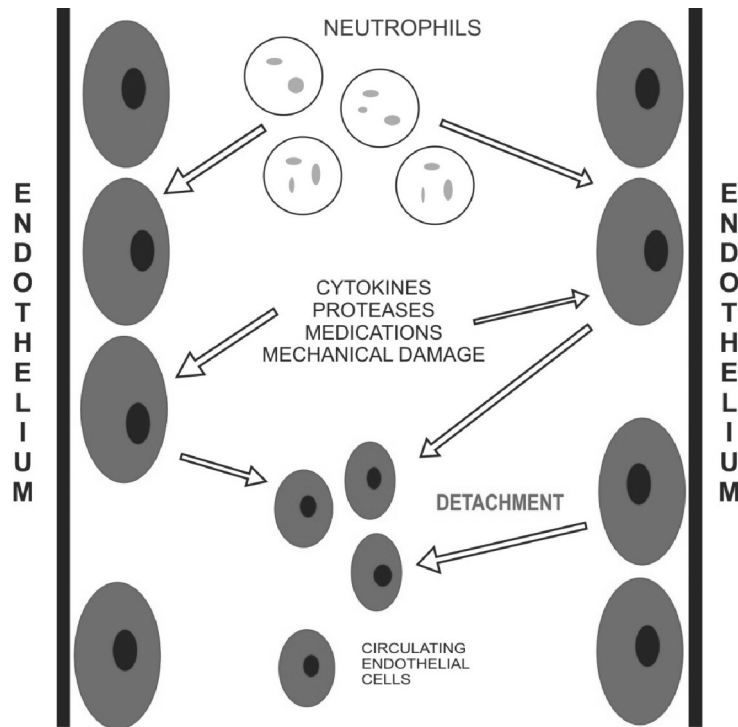


**Rycina 1.** Schematyczna prezentacja krążących komórek śródbłonna i progenitorowych komórek śródbłonna w uszkodzeniu naczyń, jego odbudowie i angiogenezie [2]

**Figure 1.** Schematic presentation of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in a vascular injury, and its reconstruction and angiogenesis [2]

smooth muscle cells and some activated T cells [4]. The researchers emphasize the lack of standards in the immunological definition of these cells [2, 4]. In the immunomagnetic method, CECs are defined as suitably sized cells that join (in a fluorescent microscope image) 4 or more immunomagnetic beads. Their endothelial origin is confirmed by the expression of receptors for von Willebrand factor (vWF), nitric oxide synthase, selectin-E, and others [5]. According to some authors [5–7], the presence of CECs in peripheral blood is an expression of endothelial damage. According to others [3], their small number in the blood may be caused by natural turnover (endothelial cell turnover). It has been proven that their elevated level correlates with pathological conditions or the exacerbation of certain diseases. The mechanisms by which ECs are separated from the endothelium are poorly understood. They may include apoptosis and proteolysis of subendothelial matrix proteins, and also a direct complement-dependent neutrophil attack in the case of inflammatory diseases [1]. They may also be detached as a consequence of

złuszczone, to jest oddzielone od endotelium komórki śródbłonna naczyniowego o ekspresji receptora powierzchniowego CD146, CD34, ale nie CD45 (ryc. 2). Rowand i wsp. oceniali liczbę CEC w przerzutach nowotworowych [4] posługując się obecnością receptorów CD146+, CD105+, CD45–. Receptor CD146 może występować także na powierzchni CEPC, tromboplastach, tkance przyzębia, tkankach nowotworów złośliwych (gruczołak stercza, czerniak) [2, 5], a także mięśniach gładkich i niektórych aktywowanych limfocytach T [4]. Badacze podkreślają brak standardów w immunologicznym definiowaniu tych komórek [2, 4]. W metodzie immunomagnetycznej za CEC uważa się komórki o odpowiednich rozmiarach, które (w obrazie mikroskopu fluorescencyjnego) przyłączyły 4 lub więcej immunomagnetycznych ziarenek. Ich śródbłonkowe pochodzenie potwierdza ekspresja receptora między innymi dla czynnika von Willebranda (vWF, von Willebrand factor), syntazy tlenu azotu, selektyny-E [5]. Według niektórych autorów [5–7] obecność CEC we krwi obwodowej jest wyrazem dokonanego uszkodze-



**Rycina 2.** Potencjalny mechanizm odrywania się komórek śródbłonka i ich przechodzenia do krwi obwodowej [2]

**Figure 2.** The potential mechanism responsible for the detachment of endothelial cells and their penetration into peripheral blood [2]

mechanical damage or a deficiency of anchoring proteins (fibronectin, laminin, collagen type IV) [2, 5]. These cells are likely to have the ability to induce an inflammatory response. Holmen et al. [8] showed that CECs obtained from patients with Wegener's granuloma secrete several chemokines that activate neutrophils (IL-8, ENA-78, MIP-1-alpha, GRO-alpha) and produce the inducible form of nitric oxide synthase [9]. The expression of tissue factor on the surface of CECs is responsible for tissue factor (TF) activation of the dependent coagulation cascade. The origin of CECs (arteries, veins, macro- or microcirculation) remains unclear. Marker CD36 seems to determine the 'microcirculation' origin of CECs, while its absence indicates that the large vessel is the origin of the endothelial cells (fig. 2) [2, 5, 10].

### Circulating endothelial progenitor cells (CEPCs)

CEPCs were first isolated and described by Asahara et al. in 1997 [11]. Until that time, it was believed that the major mechanism responsible for repairing a damaged endothelium was associated with local migration and proliferation of mature endothelial cells adjacent to the injury site.

It is now a well-known fact that these cells come from the bone marrow [1, 2, 12] and are released in

nia śródbłonka. Zdaniem innych [3] niewielka ich liczba we krwi krążącej może być spowodowana naturalnym obrotem (*endothelial cell turnover*). Udowodniono, że ich podwyższone wartości korelują ze stanami patologicznymi lub zaostrzeniem niektórych chorób. Mechanizmy oddzielania się CEC od śródbłonka są słabo poznane. Mogą obejmować apoptozę i proteolizę białek macierzy podśródbłonkowej, a w przebiegu chorób zapalnych także bezpośredni atak neutrofilowy zależny od dopełniacza [1]. Mogą także odrywać się poprzez mechaniczne uszkodzenie lub na skutek defektu białek zakotwiczących (fibronektyna, laminina, kolagen typ IV) [2, 5]. Komórki te prawdopodobnie mają zdolność indukowania odpowiedzi zapalnej. Holmen i wsp. [8] udowodnili, że CEC pobrane od chorych z ziarniniakiem Wegenera wydzielają wiele chemokin aktywujących neutrofile (IL-8, ENA-78, MIP-1-alfa, GRO-alfa) oraz wytwarzają indukowalną formę syntazy tlenu azotu [9]. Ekspresja czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*) na powierzchni CEC odpowiada za aktywację kaskady krzepnięcia zależnej od TF. Określenie miejsca, z którego pochodzą CEC (łożysko tętnicze, żylna, makro- czy mikrokrążenie) pozostaje niejasne. Marker CD36 wydaje się determinować „mikrokrążeniowe” pochodzenie CEC, zaś jego nieobecność wskazuje na duże naczynia jako miejsce uwolnienia komórek śródbłonka [2, 5, 10].

response to stimuli that induce angiogenesis, for example vascular endothelial growth factor (VEGF), chronic ischemia and vascular trauma. Determining peripheral blood CEPCs is problematic since no specific markers of these molecules have been identified. Currently, most authors consider circulating endothelial progenitor cells as co-expression of cell receptors CD34 (marker for hematopoietic stem cells), Flk-1/KDR (or CD309 receptor for VEGF), and TIE-2. Receptors for VEGF, von Willebrand factor, VE-cadherin, and CD146, CD31 are those markers, which seem to confirm the endothelial origin of those cells [12].

The ability of CEPCs to proliferate, migrate and differentiate into mature endothelial cells is an important factor differentiating CECs from CEPCs [2, 3, 5], as is the possibility of *in vitro* cultivation after isolation from peripheral blood. These properties are not typical of CECs, which become necrotic or apoptotic after being isolated from peripheral blood and are not suitable for cultivation without providing special conditions. Many data [10, 13–16] indicate an inverse relationship between the levels of CECs and CEPCs; an elevated level of CECs is associated with a lower level of CEPCs. However, there are few studies testing the simultaneous levels of CECs and CEPCs.

### Methodology for determining CECs and CEPCs

According to Goon et al. [3], the immunomagnetic method is the most popular and widely used method to determine CECs. This involves 'grabbing' cells that express CD146 by using magnetic beads coated with anti-CD146 antibodies and combining these complexes with lectins from the gorse *Ulex europaeus*. This method was first used by George et al. in 1992 [17].

Flow cytometry involves the simultaneous determination of several CECs surface receptors, such as CD146 and CD34, and the lack of CD45 and CD133 (a marker of CEPC immaturity). In order to compare the accuracy and specificity of the two methods, the authors examined the following three groups of patients for the presence of CECs: a healthy control group, patients with acute coronary syndrome and a group of women with primary breast cancer in the preoperative period. The results showed no significant differences in CEC level. The study revealed that there was less agreement between the two methods in the healthy control group than there was in the case of ill subjects. Flow cytometry has been shown to give slightly higher CEC counts, which probably makes it more sensitive in a group of ill subjects. Most importantly, different authors studying various diseases in

### Krążące progenitorowe komórki śródbłonna (CEPC)

Krążące progenitorowe komórki śródbłonna po raz pierwszy zostały wyizolowane i opisane w 1997 roku przez Asaharę i wsp. [11]. Do tego czasu sądzono, że główny mechanizm naprawczy uszkodzonego endotelium wiąże się z lokalną migracją i proliferacją dojrzałych komórek śródbłonna, które sąsiadują z miejscem uszkodzenia.

Obecnie wiadomo, że komórki te pochodzą ze szpiku kostnego [1, 2, 12] i są z niego uwalniane w odpowiedzi na działanie bodźców pobudzających angiogenezę, jak na przykład czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), przewlekłe niedokrwienie czy uraz naczyń. Oznaczanie CEPC we krwi obwodowej jest problematyczne, ponieważ nie udało się zidentyfikować swoistych markerów tych molekuł. Obecnie w większości prac za progenitorowe komórki śródbłonna uważa się komórki wykazujące koekspresję receptorów CD34 (marker komórek macierzystych hematopoezy), Flk-1/KDR (inaczej CD309 — receptor dla VEGF) oraz TIE-2. Za śródbłonkowym pochodzeniem badanych cytometrycznie komórek przemawia obecność receptorów dla VEGF, czynnika von Willebranda, VE-kadheryny, CD146, CD31 [12].

Ważnym czynnikiem różnicującym CEC i CEPC jest zdolność CEPC do proliferacji, migracji, różnicowania w dojrzałe komórki śródbłonna [2, 3, 5] oraz możliwość hodowli *in vitro* po izolacji z krwi obwodowej. Właściwości tych nie mają CEC, które po izolacji z krwi obwodowej są nekrotyczne lub apoptotyczne i nie nadają się do hodowli bez zastosowania specjalnych warunków. Wiele danych [10, 13–16] wskazuje na to, że istnieje odwrotna zależność pomiędzy stężeniem CEC i CEPC; podwyższone stężenie CEC jest związane z obniżeniem stężenia CEPC. Niewiele jest natomiast prac, w których analizowano jednocześnie stężenie CEC i CEPC.

Jin Hur i wsp. [49] opisują dwa rodzaje CEPC, które nazywają „wczesnymi” i „późnymi” CEPC (*early and late CEPC*). Pierwsze z nich mają kształt wrzecionowaty i podczas hodowli *in vitro* wykazują szczyt wzrostu między 2. a 3. tygodniem, umierają zaś po 4 tygodniach. „Późne” wykazują kształt bardziej owalny, najintensywniej namnażają się w 4.–8. tygodniu, umierają zaś po 12 tygodniach hodowli. Są też różne pod względem ekspresji receptorów powierzchniowych, takich jak VE-kadheryny, KDR czy CD45. Wczesne CEPC syntetyzują więcej tlenu azotu, częściej włączają się w warstwę endotelium żyły pępowinowej, lepiej też formują się w kształt naczyń (*tube formation*) niż „późne” CEPC. Również bardziej aktywne są komórki typu późnego



**Tabela I.** Kryteria definiowania CEC [3]**Table I.** Criteria for defining CECs [3]

Author Autor	Study Badanie	Method Metoda	Markers Markery
Beerepoot et al. Beerepoot i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, 3I+, VEGFR-2+
Duda et al. Duda i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD31+, CD146-, CD45-
Furstenberger et al. Furstenberger i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD45, CD31+, CD34+, CD105+, CD106+
Mancuso et al. Mancuso i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD45, CD31+, CD34+, CD105+, CD106+
Smirnov et al. Smirnov i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, CD105+, CD45-, DAPI+
Willett et al. Willett i wsp.	Neoplasm Nowotwór	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD31+, CD45-
McClung et al. McClung i wsp.	Diabetes type 2 Cukrzyca typu 2	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, UEA-I+
Moroni et al. Moroni i wsp.	Aortitis Zapalenie aorty	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD45-, CD31+, CD36+
Mutin et al. Mutin i wsp.	Acute coronary syndrome Ostry zespół wieńcowy	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, vWF+
George et al. George i wsp.	Rickettsia Conorii infection Infekcja Rickettsia Conorii	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, vWF+
Rajagopalan et al. Rajagopalan i wsp.	Systemic lupus erythematosus Toczeń rumieniowaty układowy	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD3-, CD14-, CD21-, AnnexinV-/+
Solovey et al. Solovey i wsp.	Sickle cell anaemia Anemia sierpowata	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+
Woywodt et al. Woywodt i wsp.	ANCA-associated vasculitis Zapalenie naczyń (ANCA)	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+, vWF+, UEA-I+
Zhang et al. Zhang i wsp.	Multiple myeloma Szpiczak mnogi	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD11c-, CD34+, CD105+
Nakatani et al. Nakatani i wsp.	Kawasaki disease Choroba Kawasaki	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+
Del Papa et al. Del Papa i wsp.	Scleroderma Twardzina układowa	Flow cytometry Cytometria przepływowa	CD146+, CD34+, CD45
Camoin-Jau et al. Camoin-Jau i wsp.	Behcet's disease Choroba Behceta	Immunomagnetic Immunomagnetyczna	CD146+

ANCA (*antineutrophil cytoplasmic antibodies*) — przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów

terms of CECs use slightly different criteria for defining CECs. This is shown in the table I.

In peripheral blood, CECs are regarded a marker of endothelial damage, while CEPCs are a marker of repair [2, 5, 12, 18, 20]. And vice versa: reduced number of CEPCs in diseases such as diabetes, in-stent restenosis, myocardial infarction and ischemia are negative prognostic factors [18, 21].

Some authors [22, 23] report that the ability to form colonies is a good mean of distinguishing CEPC (capable to form colonies) from CEC (incapable to form colonies). It has been shown that cells that exhibit co-expression of KDR and CD133 differentiate into endothelial cells and can therefore be reliable EPC

pod względem syntezy angiogennych cytokin (VEGF; interleukina-8). Jednak oba typy komórek mają podobny potencjał do tworzenia nowych naczyń. Komórki typu późnego powstają w procesie dojrzewania tych wczesnych, jest to więc ta sama linia komórkowa w różnych stadiach wzrostu.

### Metodyka oznaczania CEC i CEPC

Goon i wsp. [3] uznali, że najbardziej popularną i szeroko stosowaną metodą oznaczania CEC jest metoda immunomagnetyczna polegająca na „pochwyceniu” komórek o ekspresji CD146 przez perełki (ziarna) magnetyczne, opłaszczone przeciwciałami anti-CD146 w połączeniu takich kompleksów z lektynami janowca *Ulex*

markers. George et al. [21] studied various CEPC markers and compared them with the level of plasma factors, for example VEGF, erythropoietin (EPO) and C-reactive protein (CRP). These studies showed that the CD34/KDR receptor most significantly correlates with the level of VEGF. This justifies the conclusion that CD34/KDR is the most appropriate receptor for defining CEPCs. Cells expressing CD133/KDR are less mature than those expressing CD34/KDR [5].

### CECs in cardiovascular diseases

CECs are rarely found in the peripheral blood of healthy individuals and do not normally exceed 3/ml to 8/ml [1, 4, 5]. Their level in patients with exacerbations is significantly higher than in patients in whom the disease is in remission or regression. It has been proven that in the case of lower limb ischemia, patients with pain at rest have a higher CEC level than those with intermittent claudication [13]. The same applies to the coronary arteries, where the CEC level is higher in patients with acute myocardial infarction (AMI) or unstable angina than in patients with stable angina [5, 10, 13, 28]. CEC level as a marker of endothelial damage correlates with endothelial dysfunction measured as an increase in vWF, TF [5, 13, 28, 29] and CRP [30]. Quilici et al. [31] have shown that simultaneous determination of CECs and troponin in non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) significantly improves the accuracy of AMI diagnosis and that the CEC level is at its highest at the moment of infarction and returns to normal within 8 hours. Mutin et al. [10] have shown that this increase can persist for as long as 18–24 hours after AMI. Similarly, in the case of coronary angioplasty, the normalized CEC level before the procedure increases after angioplasty and remains elevated for 4 hours after the surgery [10, 17].

A tripling of the CEC level has been demonstrated in heart failure [14]. The level in acute and chronic heart failure was similarly elevated. CEC level has also been confirmed as a predictor of cardiovascular events [29].

Koc et al. [32] found that 7 out of 19 of their patients (haemodialysed) with CEC levels elevated to 19/ml and higher experienced cardiovascular events.

These episodes did not occur in patients with normal CEC levels. Montalescot et al. [33, 34] studied patients admitted due to acute coronary syndromes (ACS). Their elevated levels of CECs and pro-inflammatory cytokine IL-6 and vWF during the first 48 hours after being admitted were the only predictors of major cardiovascular events and death within one month and one year. In this study they demonstrated that the levels of CECs and IL-6 measured during the first 48 hours after the

*europaeus*. Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana przez George'a i wsp. w 1992 roku [17].

Metoda cytometrii przepływowej (FC, *flow cytometry*) polega na jednoczasowym oznaczaniu kilku receptorów powierzchniowych CEC, takich jak CD146, CD34, braku CD45, czy CD133 (będącego markerem niedojrzałości CEPC). Dla porównania dokładności i swoistości obu metod autorzy przebadali 3 grupy chorych na obecność CEC: zdrową grupę kontrolną, chorych z ostrym zespołem wieńcowym oraz grupę kobiet z pierwotnym rakiem piersi w okresie przedoperacyjnym. W wynikach nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie CEC. Badanie wykazało, że zgodność obu metod w zdrowej grupie kontrolnej była mniejsza niż w przypadku chorych. Wykazano, że metoda FC wiąże się z nieznacznie wyższymi wartościami liczonych CEC, a przez to prawdopodobnie z większą czułością w grupie chorych. Co ważne — wielu autorów w ocenie CEC posługuje się nieco odmiennymi kryteriami dla definiowania CEC, co ilustruje tabela 1.

Krążące komórki śródbłonna w krwi obwodowej postrzegane są jako marker dokonanego uszkodzenia śródbłonna, natomiast CEPC są markerem procesów naprawczych [2, 5, 12, 18, 20]. Z kolei zredukowany poziom CEPC w takich jednostkach chorobowych jak cukrzyca, restenoza w stencie, zawał serca czy niedokrwienie jest negatywnym czynnikiem prognostycznym [18, 21].

Niektórzy autorzy [22, 23] donoszą, że zdolność do formowania kolonii jest dobrym narzędziem do odróżniania CEPC od CEC (CEPC mają tę zdolność, zaś CEC nie są zdolne do formowania kolonii). Udowodniono, że komórki wykazujące ko-ekspresję KDR i CD133 różnicują się w komórki endotelium i dlatego mogą być wiarygodnymi markerami CEPC. George i wsp. [21] badali różne markery CEPC i porównywali je ze stężeniem osoczowych czynników, jak: VEGF, erytropoetyną (EPO, *erythropoietin*), białkiem C-reaktywnym (CRP, *C-reactive protein*). Z badań tych wynika, że ze stężeniem VEGF najbardziej koreluje receptor CD34/KDR, co pozwala wnioskować, że CD34/KDR są najbardziej właściwe dla definiowania CEPC. Z kolei komórki o ekspresji CD133/KDR są mniej dojrzałe niż te o ekspresji CD34/KDR [5].

### CEC w chorobach sercowo-naczyniowych

Krążące komórki śródbłonna są rzadko spotykane we krwi obwodowej osób zdrowych. Norma wynosi 3–8 komórek/ml [1, 4, 5]. Ich liczba wśród chorych z zaostrzeniem jest znacząco wyższa niż u chorych w okresie remisji lub zdrowienia. Udowodniono, że

onset of ACS significantly correlate with the presence of major cardiovascular events within one month and one year. They also found the previously described [13, 28] level of vWF as a major predictive factor in cardiovascular events.

### CEPCs and diabetes

Before the discovery of CEPCs, the mechanisms responsible for the impairment of neoangiogenesis in this disease were not known. It is now known that abnormalities in the number and the function of CEPCs play an important role in the development and progression of many diabetic complications, including peripheral vascular disease, cardiomyopathy, nephropathy, neuropathy and diabetic retinopathy [35]. The number of CEPCs is also reduced in the presence of risk factors for cardiovascular disease, for example hypercholesterolemia, smoking and chronic renal failure [35–37]. A decrease in CEPCs was reported in diabetes types 1 and 2 [30, 38–40]. Fadini et al. were the first to prove the relationship between peripheral vascular disease (PVD) and low CEPC levels in type 2 diabetes [30]. They tested 51 patients divided into 3 groups: patients with diabetes but without PVD; patients with diabetes and PVD; and patients without diabetes but with PVD. CEPC levels were examined using flow cytometry (surface marker CD34 and KDR-receptor for VEGF). Their study confirmed reduced CEPC levels in patients with diabetes compared to the healthy control group. In addition, they demonstrated that patients with a diabetic foot at the critical ischemia or necrosis stage have even lower CEPC levels than patients with diabetes and PVD but with no necrotic lesions. The impaired development of collateral blood vessels — an important compensatory mechanism in ischemia — is therefore caused by a lack of CEPCs. High glucose levels can stimulate CEPC apoptosis. Their low level is therefore a consequence of impaired mobilization from the bone marrow and short survival time. Churdchomjan et al. [41] compared the number and function of CEPCs in patients with poorly and well-controlled diabetes. They noticed that the total number of CEPCs in diabetic patients was significantly lower than in healthy subjects. Patients with well-controlled diabetes had significantly higher CEPC levels than those with poorly controlled or completely uncontrolled blood glucose. In addition, the authors observed cells during 3 weeks of cultivation. They reported that the cells isolated from healthy individuals did not show any significant morphological differences compared to the cells isolated from patients with diabetes mellitus. However, the cells of diabetics needed three times longer to form a colony compared to the

w niedokrwieniu kończyn dolnych liczba CEC była wyższa u chorych odczuwających bóle spoczynkowe w porównaniu z tymi z chromaniem przestankowym [13]. To samo dotyczy naczyń wieńcowych — liczba CEC jest wyższa u chorych z ostrym zawałem serca (AMI, *acute myocardial infarction*) lub niestabilną chorobą wieńcową w porównaniu z pacjentami ze stabilną dławicą piersiową [5, 10, 13, 28]. Liczba CEC, jako wykładnik uszkodzenia endotelium, koreluje z dysfunkcją śródbłonna mierzoną za pomocą wzrostu stężenia vWF i czynnika tkankowego [5, 13, 28, 29], a także CRP [30]. Quilici i wsp. [31] wykazali, że jednoczesne oznaczanie CEC i troponiny w NSTEMI znacznie podnosi trafność diagnozy AMI, zaś liczba CEC jest najwyższa w chwili zawału i ulega normalizacji przez kolejnych 8 godzin. Mutin i wsp. [10] wykazali, że wzrost ten utrzymuje się nawet 18–24 godziny od AMI. Podobnie w przypadku angioplastyki tętnic wieńcowych — znormalizowana liczba CEC u pacjentów przed procedurą ulega podwyższeniu po angioplastyce i utrzymuje się do 4 godzin po zabiegu [10, 17].

W niewydolności serca wykazano 3-krotnie podwyższoną liczbę CEC [14]. Ich liczba w ostrej i przewlekłej niewydolności serca podwyższona jest do podobnych wartości. Podwyższona liczba CEC została też potwierdzona jako czynnik predykcyjny zdarzeń sercowo-naczyniowych [29].

Koc i wsp. [32] stwierdzili, że u 7 z 19 badanych chorych hemodializowanych z podwyższoną do 19 komórek/ml i wyższą liczbą CEC wystąpiło zdarzenie sercowo-naczyniowe.

Epizodów takich nie było u osób bez podwyższonej liczby CEC. Montalescot i wsp. [33, 34] badali chorych przyjętych z powodu ostrego zespołu wieńcowego (ACS, *acute coronary syndrom*). Podwyższona ilość CEC oraz prozapalnej cytokiny interleukiny 6 (IL-6) i vWF w 48 godzin po przyjęciu były jedynymi wskaźnikami zarówno dużego zdarzenia sercowo-naczyniowego, jak i śmierci w przeciągu 1 miesiąca i 1 roku. W swoim badaniu udowodnili, że liczba CEC oraz stężenie IL-6, mierzonych w 48 godzin od wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego koreluje wyraźnie z dużym zdarzeniem sercowo-naczyniowym w przeciągu 1 miesiąca i 1 roku. Znaleźli też opisaną już wcześniej [13, 28] wartość stężenia vWF jako czynnika predykcyjnego dużego zdarzenia sercowo-naczyniowego.

### CEPC a cukrzyca

Do czasu odkrycia krążących progenitorowych komórek śródbłonna nie było wiadomo, jakie mechanizmy odpowiadają za upośledzenie neoangiogenezy w tej chorobie. Obecnie wiadomo, że zaburzenia w zakresie



cells of healthy individuals [39, 41]. The researchers also subjected CEPCs to high glucose concentrations and observed their vitality, number, ability to proliferate and predisposition to apoptosis. After several days of cultivation, the number of CEPCs in the tubes with glucose at a concentration of 13.5–19.5 mmol/l was significantly lower than in the tubes with glucose at a concentration of 5.5 mmol/l. The cells subjected to high glucose concentrations had a reduced ability to proliferate, even when the glucose concentration corresponded to that recognized as the limit of proper diabetes control (7.8 mmol/l). The number of apoptotic cells was also significantly higher in samples that had higher glucose concentrations. In another study conducted by Fadini et al. [35], the authors claim that any description of CEPCs should include a quantitative and qualitative assessment of their functions. Flow cytometry is the 'gold standard' for quantitative evaluation. A qualitative assessment can include testing the ability to multiply, form colonies (in response to growth factors released locally as a result of vascular injury or ischemia), adhere (necessary in the processes of angiogenesis and reendothelialization), migrate through the extracellular matrix (also crucial for the growth of new blood vessels) and adjust to the spatial organization of the vessel (tube formation). According to the authors, the number of CEPCs is decreased in both type 1 and type 2 diabetes. The reduced ability to multiply, adhere, migrate and integrate with the structure of new blood vessels indicates qualitative CEPC impairment in diabetes. The mechanisms responsible for the impaired formation of new blood vessels in diabetes include reduced mobilization from the bone marrow, decreased ability to multiply, and a shortened survival time in peripheral blood. Ischemia is the strongest factor stimulating the release of EPCs into peripheral blood. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) is consequently created. This indirectly activates VEGF. A reduction of both these factors was noticed by the authors in the cardiac tissue of diabetic patients during acute coronary syndrome [42].

Studies conducted in rats found that a reduction of HIF-1 expression correlated with the extent of myocardial infarction [43–45]. Humpert et al. showed that insulin therapy increases CD34+ and CD133+ levels in decompensated diabetes in rats [46]. The quantity of CEPCs is not only conditioned by their release from the bone marrow, but also by their survival time in peripheral blood. It was found that factors such as oestrogens, statins and exercise inhibit the apoptosis of CEPCs, while C-reactive protein and hypoxia stimulate it. In animal models, diabetic angiopathy was prevented by implanting endothelial progenitor cells (EPCs) taken

liczby i funkcji CEPC odgrywają istotną rolę w rozwoju i progresji wielu powikłań cukrzycy, do których zaliczamy chorobę naczyń obwodowych, kardiomiopatię, nefropatię, neuropatię czy retinopatię cukrzycową [35]. Liczba CEPC jest zredukowana także przy obecności czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych jak hipercholesterolemia, nikotynizm, a także w przewlekłej niewydolności nerek [35–37]. Redukcję CEPC opisywano w cukrzycy typu 1 i 2 [30, 38–40]. Pierwszymi, którzy dowiedli związku choroby tętnic obwodowych (PVD, *peripheral vascular disease*) w cukrzycy typu 2 z obniżoną liczbą krążących progenitorowych komórek śródbłonna byli Fadini i wsp. [30]. W swojej pracy poddali oni badaniu 51 chorych podzielonych na 3 grupy: chorzy z cukrzycą, ale bez PVD, chorzy z cukrzycą i PVD, chorzy bez cukrzycy z PVD. Posługując się metodą cytometrii przepływowej badali liczbę CEPC (marker powierzchniowy CD 34 i KDR-receptor dla VEGF). Potwierdzili oni obniżoną liczbę CEPC u chorych z cukrzycą w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Ponadto udowodnili, że chorzy ze stopą cukrzycową w stadium krytycznego niedokrwienia lub martwicy mają jeszcze niższą liczbę CEPC niż chorzy z cukrzycą i PVD, ale bez zmian martwiczych. Zaburzone tworzenie naczyń krążenia obocznego — ważny mechanizm kompensacyjny w niedokrwieniu — jest więc efektem braku CEPC. Wysokie stężenie glukozy może wpływać apoptotycznie na CEPC. Ich niska liczba wynika więc z upośledzonej mobilizacji ze szpiku kostnego oraz ze skrócenia czasu przeżycia. Churdchomjan i wsp. [41] porównywali liczbę i funkcję CEPC u chorych z cukrzycą dobrze i źle kontrolowaną. Spostrzegli, że całkowita liczba CEPC u chorych z cukrzycą była zdecydowanie niższa niż u zdrowych. Chorzy z dobrze kontrolowaną cukrzycą mieli znacząco większą liczbę CEPC w porównaniu z tymi ze źle kontrolowaną lub niekontrolowaną glikemią. Ponadto autorzy obserwowali komórki podczas 3-tygodniowej hodowli. Zauważyli, że komórki wyizolowane od zdrowych osób nie wykazywały istotnych różnic morfologicznych w stosunku do komórek wyizolowanych od chorych z cukrzycą. Komórki diabetyków potrzebowały jednak 3 razy więcej czasu by wytworzyć kolonię w porównaniu z komórkami zdrowymi [39, 41]. Badacze poddawali także CEPC działaniu wysokich stężeń glukozy i obserwowali ich witalność, liczbę, zdolność do proliferacji oraz skłonność do apoptozy. Po kilku dniach hodowli liczba CEPC w próbkach z glukozą o stężeniu 13,5–19,5 mmol/l była znacząco niższa niż w próbkach z glukozą o stężeniu 5,5 mmol/l. Komórki poddane wysokim stężeniom glukozy wykazywały obniżoną zdolność do proliferacji, nawet jeśli zastosowane stężenie

from healthy animals. In these models, 'diabetic' EPCs were not only able to conduct angiogenesis, but also exhibited anti-angiogenic properties [44, 45]. The replacement of diabetic EPCs by a pool of cells taken from healthy animals significantly accelerated wound healing in diabetics. Yoon et al. [47] demonstrated that diabetic cardiomyopathy is characterized by an early and progressive decrease in VEGF expression (myocardial). This reduces blood density, induces fibrosis and impairs cardiac muscle contractility. Rats with diabetic cardiomyopathy also had low CEPC levels. The authors put forward the hypothesis that diabetic cardiomyopathy is a complex microvascular complication, where a deficit of CEPCs is a leading cause of microvascular network 'dilution' and thus critically disables myocardial perfusion [44, 45, 47]. It can be presumed that a properly planned intervention in the number of CEPCs and an improvement in their functionality may be important factors in any strategy aimed at treating diabetic complications. Yun-fei Liao et al. [48] studied a group of 46 patients with newly diagnosed type 2 diabetes (and who therefore had not previously been treated) and a group of 51 patients with no history of diabetes and negative oral glucose tolerance test (OGTT) results. The results (the number of CEPCs/ml in blood) correlated with the outcomes of the FMD test (*flow-mediated dilation*). They found that the number of CEPCs directly correlates with the result of the FMD test in the brachial artery.

The authors studied the same parameters after 16 weeks of treatment with metformin and observed a statistically significant improvement in the number of CEPCs and a greater expansion of the brachial artery in the FMD test. The authors emphasize that the endothelial function (measured using the FMD test) is completely impaired in patients with newly diagnosed diabetes and that using metformin significantly improves it. The absolute number of CEPCs is a significant and independent risk factor for diabetic complications. Reports have appeared on its correlation with other parameters and markers of diabetes in recent years. After examining the level and assessing the function of CEPCs, Loomans et al. concluded that the level of CEPCs is inversely correlated with the level of HbA<sub>1c</sub> [38].

The authors argue that the role of these cells is not limited to angiogenesis through being incorporated into the structure of new blood vessels, but that they secrete many pro-angiogenic factors through exocrine activity. It is still not clear whether patients with severe damage to their endogenous CEPC pool will be sensitive to these factors. Nor is it clear whether it is better to transplant a pool of healthy CEPCs or to pharmacologically 'repair' these autogenous.

glukozy odpowiadało stężeniu uznanemu za granicę prawidłowego wyrównania w cukrzycy (7,8 mmol/l). Również liczba komórek apoptotycznych była znacząco wyższa w próbkach o wyższym stężeniu glukozy. W innej pracy zespół Fadiniego [35] podaje, że CEPC powinny być opisywane z uwzględnieniem oceny ilościowej i jakościowej oceny funkcji. Dla oceny ilościowej „złotym standardem” jest cytometria przepływowa. Pod względem jakościowym można badać zdolność do namnażania, formowania kolonii (w odpowiedzi na czynniki wzrostu uwalniane lokalnie przy uszkodzeniu naczyń czy niedokrwieniu), zdolność do adhezji (niezbędną w procesie reendotelizacji i angiogenezy), zdolność do migracji CEPC przez macierz zewnątrzkomórkową (także znaczące dla procesu wzrostu nowych naczyń), zdolność do przestrzennej organizacji w kształt naczyń (*tube formation*). Zdaniem autorów w obu typach cukrzycy I i 2 obserwuje się spadek liczby CEPC. Spadek zdolności do namnażania, przylegania, migracji i włączania do struktury nowych naczyń to wykładniki jakościowego upośledzenia CEPC w cukrzycy. Mechanizmy leżące u podstawy upośledzenia tworzenia nowych naczyń w cukrzycy to ich obniżona mobilizacja ze szpiku, spadek zdolności do namnażania oraz skrócenie czasu przeżycia we krwi obwodowej. Najsilniejszym czynnikiem stymulującym uwalnianie CEPC do krwi obwodowej jest niedokrwienie, w następstwie którego tworzony jest czynnik HIF-1 (*hipoxia inducible factor-1*), który pośrednio aktywuje VEGF. Redukcję obu tych czynników autorzy dostrzegli w tkance mięśnia sercowego chorych z cukrzycą podczas ostrego zespołu wieńcowego [42].

W badaniach na szczurach stwierdzono, że redukcja ekspresji HIF-1 korelowała z rozległością zawału [43–45]. Humpert i wsp. udowodnili, że insulinoterapia w zdekompensowanej cukrzycy u szczurów podnosi stężenie CD34+ i CD133+ [46]. Wpływ na liczbę CEPC ma nie tylko ich uwalnianie ze szpiku kostnego, ale także czas przeżycia we krwi obwodowej. Stwierdzono, że czynniki takie jak estrogeny, statyny, ćwiczenia fizyczne działają hamująco na apoptozę CEPC, zaś białko C-reaktywne czy hipoksja nasilają ją. W modelach zwierzęcych zaburzonej angiopatii cukrzycowej zapobiegano poprzez wszczepianie im CEPC od zdrowych zwierząt. „Cukrzycowe” CEPC w modelach tych nie tylko nie były zdolne do angiogenezy, ale wykazywały właściwości antyangiogenetyczne [44, 45]. Zastąpienie cukrzycowych CEPC przez pulę komórek od zwierząt zdrowych znacznie przyspieszało gojenie ran cukrzycowych. Yoon i wsp. [47] dowiedli, że kardiomiopatia cukrzycowa charakteryzuje się wczesnym i postępującym obniżeniem ekspresji VEGF (miokardialnego), co

Jin Hur et al. [49] describe two types of CEPCs, which they call 'early' and 'late' CEPCs. The former are shaped like a spindle, and when cultured in vitro, their growth peaks between the second and third week and they die within 4 weeks. The latter are more oval in shape, multiply most intensively between the fourth and eighth week and die after 12 weeks of cultivation. They also differ in terms of expression of surface receptors such as VE-cadherins, kinase insert domain receptor (KDR) and CD45. 'Late' CEPCs synthesize more nitric oxide than 'early' CPCs, are more frequently incorporated into the umbilical vein endothelial layer and better adjust to the vascular shape (tube formation). 'Late' CEPCs are also more active in terms of angiogenic cytokines synthesis (VEGF, interleukin-8). However, both types of cell have a similar potential to create new blood vessels. The 'late' cells are formed during the maturation of the early ones, and therefore belong to the same cell line at different stages of growth.

### The role of CEPCs in cardiovascular events

CEPCs are beneficial to peripheral blood. Once released from the bone marrow, they head for endothelial damage sites and help repair it [12]. Schmidt-Lucke et al. [8] assume that the presence of atherosclerotic risk factors is associated with lower CEPC levels. The authors selected a group of 120 subjects: 44 with coronary artery disease; 33 with unstable angina; and 44 healthy individuals as a control group. The control group had a significantly higher CEPC level in their peripheral blood than the subjects with coronary artery disease. Atherosclerosis risk factors, such as age, hypertension, smoking, and family history of heart disease were inversely correlated with the number of CEPCs. Patients who suffered a cardiovascular event during the last 10–12 months of follow-up had a significantly lower CEPC level when they entered the study.

The authors also examined the CEPC level at which people are predisposed to cardiovascular events and the probability of such an event occurring if the CEPC level is lowered. It was observed that reduced levels were connected with a 4-fold increase in the risk of major events during the follow-up period. CEPCs are therefore an independent predictor in the prognosis of acute coronary events.

Urbich [12] reports that CEPCs play a therapeutic role. Implanting CEPCs previously isolated from the bone marrow into the bloodstream of mice after myocardial infarction significantly improved blood flow and reduced scarring of the left ventricle muscle. Additionally, CEPCs support post-natal neovascularization

redukuje gęstość naczyń, nasila włóknienie i uszkadza kurczliwość mięśnia serca. Szczury z kardiomiopatią cukrzycową miały także obniżoną liczbę CEPC. Autorzy wysunęli hipotezę, że cukrzycowa kardiomiopatia jest złożonym mikronaczyniowym powikłaniem, gdzie deficyt CEPC jest wiodącą przyczyną powodującą „rozrzedzenie” sieci mikrokrażenia i poprzez to krytycznie upośledzającą perfuzję mięśnia sercowego [44, 45, 47]. Można domniemywać, że odpowiednio zaplanowana ingerencja w liczbę i poprawa funkcji CEPC może okazać się ważnym czynnikiem w strategii leczenia powikłań w cukrzycy. Yun-fei Liao i wsp. [48] poddali badaniu grupę 46 chorych ze świeżo wykrytą cukrzycą typu 2, nie leczonych wcześniej z tego powodu oraz grupę 51 chorych bez wywiadu w kierunku cukrzycy, z negatywnym wynikiem doustnego testu tolerancji glukozy (OGTT, *oral glucose tolerance test*). Wyniki (liczba CEPC/ml krwi) korelowali z testem relaksacji tętnicy ramiennej (FMD, *flow-mediated dilation*). Stwierdzili, że liczba CEPC koreluje w sposób bezpośredni z wynikiem testu FMD przeprowadzonym na tętnicy ramiennej.

Autorzy badali te same parametry po 16-tygodniowym leczeniu metforminą i zauważyli znaczącą statystycznie poprawę zarówno pod względem liczby CEPC, jak i większą rozszerzalność tętnicy ramiennej w teście FMD. Autorzy podkreślają, że funkcja śródbłonna (mierzona w FMD) jest bezwzględnie upośledzona u chorych ze świeżo zdiagnozowaną cukrzycą, zaś stosowanie metforminy poprawia tę funkcję w sposób znaczący. Bezwzględna liczba CEPC jest konkretnym i niezależnym czynnikiem ryzyka powikłań w cukrzycy. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia dotyczące korelowania jej z innymi parametrami i wykładnikami cukrzycy. Loomans i wsp. badając ich stężenie i oceniając funkcję CEPC doszli do wniosku, że liczba CEPC jest odwrotnie skorelowana z wartością hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>) [38].

Autorzy twierdzą, że rola tych komórek nie ogranicza się jedynie do angiogenezy poprzez ich włączanie do struktury nowych naczyń, ale także poprzez ich aktywność egzokrynną polegającą na wydzielaniu wielu proangiogenetycznych czynników. Wciąż niejasne jest czy pacjenci z głębokim uszkodzeniem puli endogennej CEPC będą wrażliwi na te czynniki, a także czy lepsze jest przeszczepianie puli zdrowych CEPC czy też farmakologiczny „remont” tych autogennych.

### Rola CEPC w zdarzeniach sercowo-naczyniowych

Krążące progenitorowe komórki śródbłonna są pożądane we krwi obwodowej. Po uwolnieniu ze

caused by hypoxia and tissue damage. The authors also report that statins, oestrogens and exercise are factors that 'protect' from a decrease of CEPCs.

### CECs and CEPCs in malignant diseases

The progression of malignant tumours depends on an intensified, non-physiological angiogenesis in order to nourish tumour tissue and disseminate cells. Vascular endothelial cells are stimulated by a number of factors that are particularly active in carcinogenesis, for example cytokines, lipoproteins and oxidative stress. The uncontrolled activation of these factors in malignant tumours leads to endothelial cells losing their integrity and becoming dysfunctional. This can be measured by using plasma markers including vWF, tissue plasminogen activator, E-selectin and thrombomodulin, and by applying the FMD test in the brachial artery. Mancuso et al. were the first to describe elevated CEC levels in malignant diseases [50]. They divided circulating endothelial cells into resting CECs (rCECs) and activated CECs (aCECs).

According to their pioneering study, both fractions are elevated in patients diagnosed with breast cancer or lymphoma. CEPCs also play a role in tumorigenesis, especially in tumour angiogenesis, according to recent studies [51]. Yet another marker has been described in connection with endothelial damage — endothelial microparticels (EMP). These are 'bubbles' formed from the endothelial cell membrane detached from them as a result of damage or activation. They express CEC surface markers and may serve as a signal for cytokines and adhesins [2]. Elevated CEC levels have been described in lymphoma, skin melanoma, ganglioma, carcinoid, cancer of the breast, colon, stomach, oesophagus, kidney, ovary, uterine cervix, testicle and prostate, and in malignant tumours of the head and neck. It is not known whether their increased levels result from local damage to tumour vessels or from a generalized process and systemic activation of the endothelium. Mancuso et al. [50] reported higher CEC levels in breast cancer and lymphoma.

These studies show that CEC levels increase in the early stages of the disease and in metastases, but decline after quadrantectomy. Patients with lymphoma in complete remission after chemotherapy 'attain' a normalized CEC level. This suggests that CEC level may be a potential tool in monitoring disease progression and recovery. Similarly, Beerepoot et al. [52] found a significant CEC increase in patients with a progressive malignant disease compared to patients in remission.

Zhang et al. [53] studied the effect of treatment with Thalidomide on CEC and EPC levels in patients with multiple myeloma. They first proved elevated CEC

szpiku kostnego kierują się do miejsc uszkodzonego śródbłonka uczestnicząc w procesach naprawczych [12]. Schmidt-Lucke i wsp. [8] założyli, że czynniki ryzyka miażdżycy są związane z obniżeniem stężenia CEPC. Autorzy wyłonili do badania grupę 120 osób: 44 osoby z chorobą naczyń wieńcowych, 33 z niestabilną dusznicą bolesną i 44 osoby jako zdrową grupą kontrolną. Grupa kontrolna (44 zdrowych osób) miała znacząco większą liczbę CEPC we krwi obwodowej w porównaniu z osobami z chorobą naczyń wieńcowych. Czynniki ryzyka miażdżycy takie jak wiek, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, wywiad rodzinny w kierunku choroby serca korelowały odwrotnie z liczbą CEPC. Chorzy, którzy doznali zdarzenia sercowo-naczyniowego w ciągu ostatnich 10–12 miesięcy obserwacji wykazywali w momencie włączenia do badania znacząco mniejszą liczbę CEPC.

Autorzy badali też liczbę CEPC predysponującą do zdarzeń sercowo-naczyniowych i prawdopodobieństwo takiego zdarzenia w przypadku obniżenia liczby CEPC. Zaobserwowali, że ich obniżona liczba wiąże się z 4-krotnym wzrostem ryzyka dużego zdarzenia podczas obserwacji. Wynika stąd, że CEPC są niezależnym czynnikiem predykcyjnym w prognozowaniu ostrych epizodów wieńcowych.

Urbich i wsp. [12] podkreślają terapeutyczną rolę CEPC. Wszczepienie wyizolowanych wcześniej ze szpiku CEPC do układu krążenia myszy po zawale serca znacząco poprawiało przepływ krwi i redukowało proces bliznowacenia mięśnia serca lewej komory. Poza tym CEPC wspierają postnatalną neowaskularyzację dokonującą się w efekcie niedotlenienia lub uszkodzenia tkanki. Autorzy donoszą także, że statyny, estrogeny i wysiłek fizyczny są czynnikami „zabezpieczającymi” przed spadkiem stężenia CEPC.

### CEC i CEPC w chorobach nowotworowych

Progresja nowotworów uzależniona jest od nasilonej, niefizjologicznej angiogenezy niezbędnej do odżywiania tkanki nowotworowej i procesu rozsiewania komórek. Komórki śródbłonka naczyniowego pobudzone są za pośrednictwem wielu czynników szczególnie aktywnych w procesie nowotworzenia, takich jak: cytokiny, lipoproteiny, stres oksydacyjny. Niekontrolowana w nowotworze aktywacja tych czynników prowadzi do utraty integralności komórek śródbłonka i jego dysfunkcji, co możemy mierzyć za pomocą markerów osoczowych, między innymi czynnika von Willebranda, tkankowego aktywatora plazminogenu, E-selektyny, trombomoduliny oraz za pomocą testu FMD. Pierwszym, który opisał podwyższoną liczbę



and CEPC levels in this disease, and later reported their parallel decline after thalidomide therapy.

The cited studies show that an increase in the CEC level coincides with carcinogenesis. Until recently, it was believed that, in adulthood, new blood vessels are formed by budding from the existing vessels in a process known as angiogenesis. However, more recent studies suggest that postnatal angiogenesis depends on the differentiation of immature progenitor cells from the bone marrow into mature cells [11, 54, 55]. These cells are mobilized and incorporated into places of vascular growth or repair. Their role in malignant diseases is not clear. Some studies show that EPCs derived from bone marrow enhance the formation of tumour vessels by incorporating them into the neoendothelium [56, 57]. Studies conducted in mice demonstrate that such incorporation only occurs in 20–50% [58]. Elevated CEC and CEPC levels have also been reported in acute myeloid leukaemia. Wierzbowska et al. [59] divided circulating endothelial cells into rCECs (defined as CD31+, CD34+, CD146+, CD45–, CD133– and CD105– and CD106– with the last two defined as activation markers), aCECs (surface receptors different only in terms of CD105+ and CD106+) and the CEPCs (CD45–, CD34+, CD31+, CD133+). The level of all fractions was significantly elevated in patients with acute myeloid leukemia (AML) compared to the control group. The authors observed that the CEC level was twice as high in patients with elevated white blood cell count (WBC) and high-density lipoprotein (HDL). The level of rCECs, aCECs and CEPCs after the first course of chemotherapy was significantly lower than when AML was diagnosed. Identified and counted endothelial cells may come from vascularization foci or other sites distant from the tumour, after prior activation by cytokines released from the tumour or mobilized from the bone marrow.

CEPCs were also examined in non-small cell lung cancer. A pioneering study on this subject [60] reported a higher level of CEPCs in patients before treatment and a correlation between a high CEPC level and a poor prognosis. The authors show that the CEPC level decreased significantly in patients who responded well to treatment. This makes CEPC level a good tool for monitoring treatment in proliferative diseases.

### CECs and CEPCs in systemic connective tissue diseases

Systemic connective tissue diseases are associated with non-physiological angiogenesis in certain affected areas. Studying a group of 18 patients with rheumatoid arthritis, Ruger et al. [58] demonstrated the presence of cells expressing CD34 and CD133 in the synovial mem-

branes. CEC w chorobie nowotworowej był Mancuso i wsp. [50]. Krążące komórki śródbłonka podzielił na CEC w stanie spoczynku (rCEC) i aktywowane (aCEC). Obie frakcje, zgodnie z jego pionierskimi badaniami, były podwyższone u chorych, u których wykryto raka piersi lub chłoniaka.

Podwyższoną liczbę CEC opisano w chłoniaku, czerniaku skóry, zwojaku, raku piersi, jelita grubego, żołądka, przełyku, nerki, raku jajnika, szyjki macicy, w rakowiaku, raku jądra, stercza oraz w nowotworach głowy i szyi. Nie wiadomo, czy ich podwyższona liczba wynika z lokalnego zniszczenia naczyń guza, czy jest wynikiem uogólnionego procesu i systemowej aktywacji śródbłonka.

Mancuso i wsp. w cytowanej powyżej pracy [50] donieśli o podwyższonej liczbie CEC w przypadku gruczolakoraka piersi i chłoniaka. Z badań tych wynika, że stężenie CEC było podwyższone zarówno we wczesnym stadium choroby, jak i w przerzutach, spadało natomiast po zabiegu kwadrantektomii. Chorzy z chłoniakiem w okresie zupełnej remisji po chemioterapii osiągnęli znormalizowany poziom CEC, co sugeruje, że może być on potencjalnym narzędziem w monitorowaniu postępu choroby lub procesu zdrowienia.

Podobnie Beerepoot i wsp. [52] znaleźli znaczący wzrost liczby CEC u chorych z progresją choroby nowotworowej w porównaniu z chorymi w okresie remisji. CEPC odgrywają także rolę w procesie nowotworzenia, które w świetle ostatnich badań [51] są włączone w proces nowotworowej angiogenezy. Opisano jeszcze jeden marker związany z uszkodzeniem śródbłonka (EMP, *endothelial microparticles*), czyli mikrocząsteczki śródbłonka. Są to „pęcherzyki” utworzone z błony komórek śródbłonka odrywającej się od nich w efekcie uszkodzenia lub aktywacji. Wykazują one ekspresję markerów powierzchniowych dla CEC i mogą pełnić rolę sygnałową dla cytokin i adhezyn [2].

Zhang i wsp. [53] badali wpływ leczenia thalidomidem na liczbę CEC i CEPC u chorych na szpiczaka mnogiego. Najpierw udowodnili podwyższoną liczbę CEC i CEPC w tej chorobie, a następnie ich równoległy spadek po przeleczeniu thalidomidem.

Z cytowanych badań wynika, że wzrost liczby CEC współistnieje z procesem nowotworzenia. Do niedawna sądzono, że w życiu dorosłym nowe naczynia tworzą się poprzez odpączkowanie od naczyń już istniejących w procesie zwanym angiogenezą. Nowsze badania sugerują jednak, że postnatalne naczyniotworzenie to proces polegający na różnicowaniu niedojrzałych komórek progenitorowych pochodzących ze szpiku kostnego w komórki dojrzałe [11, 54, 55], ich mobilizacji i włączaniu do miejsc wzrostu lub naprawy



brane. These cells are grouped just below the synovial membrane. Furthermore, they expressed receptor CXCR-4 for chemokines and VEGFR-2 for vascular growth factor. Hirohata et al. [61] collected progenitor cells from the bone marrow of 13 patients with rheumatoid arthritis (RA) and incubated them in the presence of colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The cells from patients with RA had a significantly higher expression of a receptor for vWF than the cells taken from the bone marrow of healthy individuals. This proves that cells expressing C34 and CD133 are involved in neovascularization of the synovial membrane and progression of the disease. The observations of the synovium are inversely related to the presence of CEPCs in peripheral blood. Grisar et al. [62] examined CEPC levels in 52 patients with rheumatoid arthritis and in 16 patients from the control group and concluded that ill subjects have lower CEPC levels than healthy individuals. CEPC levels in patients whose symptoms were less severe or in remission were similar to those in healthy individuals from the control group. Patients treated with infliximab responded to the therapy with an increased CEPC level in their peripheral blood. Therefore, it was concluded that reduced eosinophil cationic protein (ECP) levels in the peripheral blood of patients with RA may be associated with a decreased ability to revascularize hypoxic tissue and may cause cardiovascular events, which are very common in patients with RA.

Testing CEPC and CEC levels in scleroderma confirmed their role as a pathogenic factor and a predictor. Del Papa et al. [63] studied a group of 22 patients with a localized form of scleroderma and 24 patients with a generalized form. The average age was 56 years. Elevated CEC levels were reported in both groups compared to the control group. The level significantly correlated with the activity of disease [64]. The authors divided CECs into passive (at rest) and activated (defined by the expression of receptors CD106 and CD62). The activated CEC level was higher in patients with an active, acute phase of the disease, including patients with pulmonary hypertension, which is a serious complication of scleroderma. The CEPC level was significantly elevated in patients at the early stage of the disease.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a disorder commonly associated with a high risk of developing cardiovascular disease. A diagnosis of SLE is the strongest predictor of cardiovascular disease, even in patients with well-controlled risk factors. Clancy et al. [65] demonstrated that the CEC level in patients with SLE was significantly elevated compared to the control group. The activation of CECs in SLE suggests that these cells

naczyń. W przypadku nowotworzenia ich rola nie jest jednoznaczna. Niektóre badania pokazują, że pochodzące ze szpiku CEPC wzmagają formowanie naczyń guza poprzez włączanie ich do neoendotelium [56, 57]. Badania przeprowadzone na myszach wykazują, że taka inkorporacja zachodzi jedynie w 20–50% [58]. Podwyższone wartości CEC i CEPC znaleziono też w ostrej białaczce szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*). W pracy Wierzbowskiej i wsp. [59] krążące komórki śródbłonna zostały podzielone na rCEC — komórki w stanie spoczynku (definiowane jako CD31+, CD34+, CD146+, CD45–, CD133– oraz CD105– i CD106– dwa ostatnie jako markery aktywacji), aCEC — komórki aktywowane (receptory powierzchniowe różne tylko o CD105+ i CD106+), i CEPC — komórki progenitorowe (CD45–, CD34+, CD31+, CD133+). Liczba wszystkich wymienionych frakcji była znacząco podwyższona u pacjentów z AML w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy zauważyli dwukrotnie wyższą liczbę CECs u chorych z podwyższonym stężeniem leukocytów i cholesterolu frakcji HDL (*high-density lipoprotein*). Liczba rCEC, aCEC i CEPC po pierwszym kursie chemioterapii była znacząco niższa niż w chwili diagnozy AML. Zidentyfikowane i zliczone komórki śródbłonna mogą pochodzić z ognisk naczyńnowotworzenia lub z innych odległych od guza miejsc, po wcześniejszej aktywacji przez wydzielone z guza cytokiny lub też mogą być mobilizowane ze szpiku kostnego.

Krążące komórki śródbłonna były też badane w niedrobnokomórkowym raku płuca. Pionierska praca na ten temat [60] donosi o podwyższonej liczbie CEPC u pacjentów sprzed okresu leczenia oraz o korelacji wysokiego stężenia CEPC ze złym rokowaniem. Autorzy dowodzą, że u chorych, którzy dobrze zareagowali na leczenie liczba CEPC znacząco obniżyła się, co sprawia, że CEPC są dobrym narzędziem monitorującym proces leczenia w chorobach rozplamowych.

### **CEC i CEPC a choroby układu tkanki łącznej**

Choroby układowe tkanki łącznej wiążą się z niefizjologiczną angiogenezą w objętych procesem chorobowym miejscach. Ruger i wsp. [58] badając grupę 18 chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), udowodnili w błonie maziowej obecność komórek o ekspresji CD34 i CD133. Komórki te grupowały się tuż pod błoną maziową. Ponadto wykazywały ekspresję receptora dla chemokin CXCR-4 i dla czynnika wzrostu naczyń VEGFR-2. Hirohata i wsp. [61] pobrali ze szpiku 13 chorych z RZS komórki progenitorowe i inkubowali je w obecności czynnika wzrostu granulocytów (CSF, *colony-stimulating factor*) oraz czynnika

may be potential participants of inflammatory processes in response to immunological stimuli and work in a kind of vicious circle to induce progressive, inflammatory vascular damage. Inflammatory vascular damage occurs for example in Kawasaki disease, which is described as inflammation of the small, medium and large arteries, especially the coronary vessels. Nakatani et al. [66] assume that the elevated CEC levels observed in the course of this disease are caused by disorders and an impairment of the coronary arteries promoted by the disease. They studied 20 patients with Kawasaki disease and 10 healthy children. The CEC level was about 6/ml in healthy individuals. However, it was significantly increased in patients with Kawasaki disease in acute form, sub-acute form and remission (in descending order). At the same time, it was noted that the CEC level was considerably higher in patients with coronary artery impairment. There was no CEPC growth in the group of healthy individuals, whereas Nakatani reported an elevated CEPC level in 11 of the 20 children with the disease.

### Summary

There are increasingly fewer diseases in which the issue of CECs and CEPCs are not described. The PubMed database has more and more items appearing under the entry 'CECs and CEPCs' every month. There are also more reports postulating a significant role for CECs and CEPCs as prognostic markers. Isolating autologous endothelial progenitor cells from bone marrow and implanting them into ischemic muscle significantly improves blood flow. This is evident in for example scientific reports claiming significantly faster and better healing of ischemic ulcers.

From these facts it can be concluded that we can expect a breakthrough in diagnosis and treatment using the described endothelial cells in the very near future.

### References

1. Kluz J, Adamiec R (2007) Circulating endothelial cells in inflammatory vascular disorders. *Adv Clin Exp Med*; 16: 95–104.
2. Goon P, Lip G, Boos C et al (2006) Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells and microparticles in cancer. *Neoplasia*; 8: 79–88.
3. Goon P, Boos C, Stonelake P et al (2006) Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost*; 96: 45–52.
4. Rowand JL, Martin G, Doyle GV et al (2007) Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas. *Cytometry*; 71: 105–113.
5. Boos C, Lip G, Blann A et al (2006) Circulating endothelial cells in cardiovascular diseases. *JACC*; 48: 1538–1547.

wzrostu granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*). Komórki od chorych z RZS wykazywały znacznie większą ekspresję receptora dla vWF niż komórki pobrane ze szpiku osób zdrowych. Wynika stąd, że komórki o ekspresji C34 i CD133 są zaangażowane w proces neowaskularyzacji błony maziowej i postęp choroby. Obserwacje poczynione w błonie maziowej pozostają w odwrotnej zależności do obecności CEPC we krwi obwodowej. Grisar i wsp. [62] badając ich liczbę u 52 chorych cierpiących z powodu RZS i 16 chorych z grupy kontrolnej doszedł do wniosku, że chorzy mają niższe wartości CEPC niż zdrowi. Ich liczba u chorych z mało nasilonymi objawami lub w okresie remisji pozostawała na podobnym poziomie jak u zdrowej grupy kontrolnej. Chorzy leczeni infliksymem reagowali wzrostem CEPC we krwi obwodowej. Stąd wniosek, że obniżona liczba CEPC we krwi obwodowej u chorych z RZS może się wiązać z obniżeniem zdolności do rewaskularyzacji tkanek niedotlenionych i skutkować także zdarzeniami sercowo-naczyniowymi, które są bardzo częste w grupie chorych na RZS.

W twardzinie układowej wartości CEC i CEPC zostały przebadane i potwierdzone jako czynnik patogenetyczny i predykcyjny. Del Papa i wsp. [63] przebadali grupę 22 chorych z postacią ograniczoną twardziny i 24 chorych z postacią uogólnioną. Średnia wieku badanych wynosiła 56 lat. W obu badanych grupach stwierdzono podwyższoną liczbę CEC w porównaniu z grupą kontrolną, przy czym ich wartości wyraźnie korelowały z aktywnością choroby [64]. Autorzy podzielili CEC na bierne — w stanie spoczynku — i aktywowane (definiowane ekspresją receptora CD106 i CD62). Liczba aktywowanych CEC była wyższa u chorych w aktywnej, ostrej fazie choroby, włączając chorych z nadciśnieniem płucnym jako poważnym powikłaniem w twardzinie układowej. Z kolei liczba CEPC była podwyższona w sposób istotny u chorych we wczesnym stadium choroby.

Toczeń rumieniowaty układowy (SLE, *systemic lupus erythematosus*) to jednostka chorobowa związana z dużym ryzykiem powikłania pod postacią rozwoju choroby niedokrwiennej sercowo-naczyniowej. Rozpoznanie SLE jest najbardziej obciążającym czynnikiem prognostycznym choroby niedokrwiennej nawet u chorych z dobrze kontrolowanymi czynnikami ryzyka. Clancy i wsp. [65] dowiedli, że liczba CEC była znacząco podwyższona u pacjentów z SLE w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywacja CEC w SLE sugeruje, że komórki te w odpowiedzi na bodźce immunologiczne mogą być potencjalnymi uczestnikami procesów zapalnych zdolnymi na zasadzie błędnego koła indukować postępujące,

6. Blaauw A, Woywod A, Bertolini F et al (2005) Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*; 93: 228–235.
7. Holmen C, Eshikh E, Stenvinkel P et al (2005) Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cells dysfunction in vasculitis patient with kidney involvement. *J Am Soc Nephrol*; 16: 3110–3120.
8. Woywodt A, Bahlamann F, de Groot K et al (2002) Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*; 17: 1728–1730.
9. Duda D, Cohen K, di Tomaso E et al (2006) Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. *Clin Oncol*; 24: 1449–1453.
10. Mutin M, Canavy I, Blann A et al (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*; 93: 2951–2958.
11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*; 275: 964–967.
12. Urbich C, Dimmler S (2005) Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int*; 67: 1672–1676.
13. Makin A, Blann A, Chunga N et al (2004) Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J*; 25: 371–376.
14. Chong A, Blann A, Patel J et al (2004) Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow mediate dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation*; 110: 1794–1798.
15. Szmítka P, Fedak P, Weisel R et al (2003) Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*; 107: 3093–3100.
16. Roberts N, Jahangiri M, Xu Q (2005) Progenitor cells in vascular disease. *J Cell Mol Med*; 9: 583–591.
17. George F, Brisson C, Poncelet P et al (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody coupled to immunomagnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost*; 67: 147–153.
18. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S et al (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events. Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*; 111: 2981–2987.
19. Hai-Ya W, Ping-Jin G, Kai-Da J et al (2007) Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. *Hypertens Res*; 30: 133–141.
20. George J, Shmilowich H, Deutschi V et al (2006) Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Engineering*; 12: 331–335.
21. Mc Clung A, Naseer N, Saleem M et al (2005) Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 dia-

zapalne uszkodzenie naczyń. Zapalne uszkodzenie naczyń dokonuje się między innymi w chorobie Kawasaki (KD, *Kawasaki disease*), opisywanej jako zapalenie małych, średnich i dużych tętnic, szczególnie wieńcowych. Nakatani i wsp. [66] w swojej pracy założyli, że podwyższone wartości CEC wynikają w tej chorobie z zaburzeń i upośledzenia funkcjonowania naczyń wieńcowych, do czego choroba predysponuje. Przebadali 20 chorych dzieci z chorobą Kawasaki i 10 zdrowych ochotników w tym samym przedziale wiekowym. U dzieci zdrowych liczba CEC wyniosła około 6/ml, znacząco był natomiast podwyższona u chorych z KD w fazie ostrej, podostrej i remisji z tendencją malejącą w wymienionej kolejności stadiów. Jednocześnie zauważono, że liczba CEC była znacząco wyższa u chorych z uszkodzeniem naczyń wieńcowych. Nie obserwowano wzrostu CEPC w grupie zdrowych, natomiast u 11 z 20 chorych dzieci autorzy stwierdzili ich wyższe wartości.

### Podsumowanie

Z każdym rokiem przybywa doniesień o znaczącej roli CEC i CEPC jako markerów prognostycznych w różnych jednostkach chorobowych. Izolowanie ze szpiku kostnego autologicznych progenitorowych komórek śródbłonka i wszczepianie ich w niedokrwione mięśnie poprzecznie prążkowane powoduje znaczącą poprawę ukrwienia, co przejawia się znacznie szybszym i lepszym efektem gojenia owrzodzeń niedokrwiennych.

Z powyższych danych wynika, że w najbliższym czasie można spodziewać się znaczącego postępu zarówno pod względem diagnostyki, jak i terapii przy użyciu opisywanych komórek śródbłonka.

---

betes mellitus independently of HbA(1)c. *Diabetologia*; 48: 345–350.

22. Hill J, Zalos G, Halcox J et al (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med*; 348: 593–600.
23. George J, Herz I, Goldstein E et al (2003) Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23: 57–60.
24. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R et al (2003) Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*; 102: 1340–1346.
25. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K et al (2001) Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*; 103: 2885–2890.
26. Scheubel J, Zorn H, Silber R et al (2003) Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*; 42: 2073–2080.

27. Peichev M, Naiyer A, Pereira D et al (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*; 95: 952–958.
28. Lee K, Lip G, Tayebjee M, Foster W et al (2005) Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood*; 105: 526–532.
29. Lee K, Blann A, Lip G et al (2006) Inter-relationships of indices of endothelial damage/dysfunction circulating endothelial cells, von Willebrand factor and flow-mediated dilatation to tissue factor and interleukin-6 in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol*; 111: 302–308.
30. Fadini G, Miorin M, Facco M et al (2005) Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes Mellitus. *J Am Coll Cardiol*; 45: 1449–1457.
31. Quilici J, Banzet N, Paule P et al (2004) Circulating endothelial cell count as a diagnostic marker for non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Circulation*; 110: 1586–1591.
32. Koc M, Richards H, Bihorac A et al (2006) Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in haemodialysis patients. *Kidney Int*; 67: 1078–1083.
33. Montalescot G, Philippe F, Ankri A et al (1998) Early increase of von Willebrand factor predicts adverse outcome in unstable coronary artery disease: beneficial effects of enoxaparin. French Investigators of the ESSENCE Trial. *Circulation*; 98: 294–299.
34. Montalescot G, Collet J, Choussat R, Ankri A, Thomas D (2000) A rise of troponin and/or von Willebrand factor over the first 48h is associated with a poorer 1-year outcome in unstable angina patients. *Int J Cardiol*; 72: 293–294.
35. Fadini G, Agostini C, Sartore S et al (2007) Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care*; 30: 1305–1313.
36. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*; 89: 1–7.
37. Choi H, Kim K, Huh W et al (2004) Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patient with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24: 1–6.
38. Loomans C, Koning E, Staal F et al (2004) Endothelial progenitor cell dysfunction. A Novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*; 53: 195–199.
39. Tepper O, Galiano R, Capla J et al (2002) Human endothelial progenitor cells from type 2 diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*; 106: 2781–2786.
40. Yue W, Lau K, Siu C et al (2011) Impact of glycemic control on circulating endothelial progenitor cells and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*; 10: 113–117.
41. Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S et al (2010) Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocrine Disorders*; 10: 5–14.
42. Marfella R, Esposito K, Nappo F et al (2004) Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. *Diabetes*; 53: 2383–2391.
43. Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C et al (2002) Myocardial Infarction in diabetic rats: role of hyperglycemia on infarct size and early expression of hypoxia inducible factor 1. *Diabetes*; 45: 1172–1181.
44. Schattteman G, Hanlon H, Jiao C et al (2000) Blood derived angioblasts accelerate blood flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*; 106: 571–578.
45. Awad O, Jiao C, Ma N et al (2005) Obese diabetic mouse environment differentially affects primitive and monocytic endothelial cell progenitors. *Stem Cells*; 23: 575–583.
46. Humpert P, Neuwirth M, Batissa M et al (2005) SDF-1 genotype influences insulin-dependent mobilization of adult progenitor cells in type 2 diabetes. *Diabetes Care*; 28: 934–936.
47. Yoon Y, Uchida S, Masuo O et al (2005) Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. *Circulation*; 111: 2073–2085.
48. Yun-fei Liao, Lu-Lu Chen, Thian-shu Zeng et al (2010) Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. *Vascular Medicine*; 15: 279–285.
49. Jin Hur, Chang-Hwan Yoon, Hyo-Soo Kim et al (2004) Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Biol*; 24: 288–293.
50. Mancuso P, Burlinii A, Pruneri G et al (2001) Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*; 97: 3658–3661.
51. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*; 2: 826–835.
52. Beerepoot L, Mehra N, Vermaat J et al (2004) Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol*; 15: 139–145.
53. Zhang H, Vakil V, Braunstein M et al (2005) Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*; 105: 3286–3294.
54. Aicher A, Heeschen Ch, Feil S et al (2009) cGMP-dependent protein kinase I is crucial for angiogenesis and postnatal vasculogenesis. *PLOS ONE*; 4: 1–7.
55. Miller-Kasprzak E, Jagodziński P (2007) Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp*; 55: 247–259.
56. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.
57. Lyden D, Hattori H, Dias S et al (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*; 7: 1194–1201.
58. Ruger B, Giurea A, Wanivenhaus A et al (2004) Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*; 50: 2157–2166.

59. Wierzbowska A, Robak T, Krawczyńska A et al (2005) Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*; 75: 492–497.
60. Dome B, Tirmar J, Dobos J et al (2006) Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res*; 66: 7341–7347.
61. Hirohata S, Yanagida T, Nampei A et al (2004) Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis & Rheumatism*; 50: 3888–3896.
62. Grisar J, Aletaha D, Steiner C et al (2005) Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*; 111: 204–211.
63. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N et al (2004) Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*; 50: 1296–1304.
64. Avouac J, Uzan G, Boileau A, Allanore Y (2008) Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine*; 75: 131–137.
65. Clancy R, Marder G, Martin V et al (2001) Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis & Rheumatism*; 44: 1203–1208.
66. Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H et al (2003) Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*; 131: 536–540.