

Current opinion on the role of angiogenic factors in the development of diabetic retinopathy

Aktualne poglądy na rolę czynników naczyniowych w powstawaniu retinopatii cukrzycowej

Edyta Sacha¹, Tomasz Sacha², Aldona Dembińska-Kieć³, Jolanta Dubiel¹

¹Department of Ophthalmology District Rydygier Hospital, Cracow, Poland (Oddział Okulistyki WSS im. L. Rydygiera w Krakowie), ²Chair of Hematology, College Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland (Katedra i Klinika Hematologii Collegium Medicum UJ w Krakowie), ³Department of Clinical Biochemistry, College Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland (Katedra Biochemii Klinicznej Collegium Medicum UJ w Krakowie)

Abstract

The pathological outgrowth of new blood vessels in the bottom of the eye and during eyeball tissue disruption are currently responsible for most cases of vision loss. Aberrant blood vessel growth in the retina, which underlies the pathology of proliferative diabetic retinopathy, is the result of the ischemia-driven disruption of the normally antiangiogenic environment of the retina. Ischemic retinopathies are thought to be caused by the increase of activators of neovascularization and vessel wall leakage, as well as by the decreased activity of the angiogenesis inhibitors. The most important proangiogenic factors include: basic fibroblast growth factor (bFGF), placental growth factor (PIGF), insulin-like growth factor (IGF-1), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) when pigment epithelium-derived growth factor (PEDF) is discovered to be their natural inhibitor. In this review, the current knowledge concerning the role of angiogenic factors in the development of diabetic retinopathy is presented.

Keywords: proliferative diabetic retinopathy, angiogenesis, pro-angiogenic growth factors, inhibitors of angiogenesis

Streszczenie

Według współczesnych poglądów patologiczne nowotworzenie naczyń w obrębie gałki ocznej i uszkodzenia tkanek nim wywołane są odpowiedzialne za większość przypadków utraty wzroku. Do nieprawidłowego wzrostu naczyń siatkówki, leżącego u podłoża proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej, dochodzi w wyniku wywołanego niedokrwieniem upośledzenia antyangiogennej właściwości środowiska siatkówki. Przyczyn retinopatii o podłożu niedokrwienym upatruje się we wzroście aktywności czynników stymulujących angiogenezę oraz zmniejszeniu aktywności jej inhibitorów. W pracy omówiono mechanizmy aktywności biologicznej głównych czynników stymulujących angiogenezę, jak: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), łożyskopochodny czynnik wzrostu (PIGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1), wątrobowy czynnik wzrostu (HGF), naczyniopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), oraz udział naturalnego inhibitora angiogenezy — czynnika wzrostu pochodzącego z nabłonka barwnikowego (PEDF) w powstawaniu retinopatii cukrzycowej.

Słowa kluczowe: proliferacyjna retinopatia cukrzycowa, angiogeneza, angiogenne czynniki wzrostu, inhibitory angiogenezy

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Lek. med. Edyta Sacha, Oddział Okulistyki WSS im. L. Rydygiera

Oś. Złota Jesień 1, 31–826 Kraków

tel. +48 (0 12) 646 80 00, w. 332, fax: +48 (0 12) 646 89 30

Introduction

The pathological outgrowth of new blood vessels in the bottom of the eye, as well as eyeball disruption are currently recognized as the most frequent causes of vision loss. Abnormal vessels can originate (beside the genetic malformation) from the choroid circulation and from the retinal vessels as a reaction to local ischaemia induced by different pathological conditions. These irregular vessels can give rise to retinopathies that threaten vision in many patients suffering from systemic hypertension or diabetes mellitus [1]. The impaired retinal microcirculation in proliferative diabetic retinopathy (PDR) is thought to be due to: increased permeability of capillary endothelium; lack of supportive function of pericytes; thickening of basal membrane; the microaneurysms formation; impaired perfusion in the microcapillaries. All the above disturbances lead to local ischaemia and retinal cells hypoxia [2]. The angiogenic factor, which plays a major role in PDR etiopathogenesis is not well identified. The clinical, as well as experimental studies suggest that tissue oxygenation regulates the production of growth factors important for coordinating vascularization and metabolic needs of the retina [3]. In patients with PDR in which tissue hypoxia promotes neovascularization, the levels of several growth factors in the ocular tissues, as well as peripheral blood, were reported to be elevated. These results strongly suggest that growth factors that are regulated by the metabolic needs of the retina participate in the ocular diseases in which hypoxia plays an important role. These factors include: vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) [4], platelet-derived growth factor (PDGF) [5], insulin-like growth factor (IGF), [6], interleukin-8 (IL-8) [7], angiogenine [8], placental growth factor (PIGF) [9], and hepatocyte growth factor (HGF) [10] (Tab. I). It is believed that angiogenic homeostasis is controlled mainly by the balance between the above angiogenic stimulators, and angiogenic inhibitors, such as pigment epithelium-derived factor (PEDF) play an important role in the development of proliferative diabetic retinopathy [1, 11].

The role of basic fibroblast growth factor (bFGF)

It is suggested by the increasing number of reports that basic fibroblast growth factor plays an important role in the differentiation, proliferation and survival of different cell types in the fetal as well as the mature organism tissues [12]. During the early neonatal period, both bFGF and VEGF co-operate in modulating the capillary growth. bFGF facilitates arteriolar growth, and the two growth factors interact in early postnatal regu-

Wstęp

Według współczesnych poglądów patologiczne nowotworzenie naczyń w obrębie narządu wzroku i uszkodzenia gałki ocznej będące jego rezultatem są odpowiedzialne za większość przypadków utraty wzroku [1]. Nieprawidłowe naczynia (poza genetycznie uwarunkowaną malformacją) mogą powstawać w błonie naczyniowej lub siatkówce w przebiegu wszystkich stanów chorobowych prowadzących do lokalnego niedokrwienia i wywoływać retinopatię u wielu chorych na cukrzycę czy nadciśnienie tętnicze [1].

Upośledzenie mikrokrążenia siatkówki obserwowane w przebiegu proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej (PDR) jest wywołane między innymi: zwiększeniem przepuszczalności śródbłonna kapilar, znacznym zaburzeniem funkcji podporowej pericytów, pogrubieniem błony podstawnej, powstawaniem mikrołętniaków oraz upośledzeniem perfuzji (okluzją światła) mikrokapilar. Wszystkie powyższe zaburzenia doprowadzają do niedokrwienia i hipoksji komórek siatkówki [2]. Jak dotąd nie ustalono głównego czynnika odpowiedzialnego za stymulację nowotworzenia naczyń, występującego typowo w PDR. Od dawna podkreśla się jednak rolę hipoksji jako mechanizmu wpływającego na uwolnienie wielu czynników naczyniopochodnych w rozwoju tego zjawiska w obrębie siatkówki i błony naczyniowej [3]. W wielu pracach udokumentowano zwiększenie stężenia czynników stymulujących angiogenezę w ciele szklistym oczu z proliferacyjną retinopatią cukrzycową pod wpływem hipoksji. Do czynników tych zaliczono zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) [4], płytkopochodny czynnik wzrostu (PDF) [5], insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I) [6], interleukinę 8 (IL-8) [7], angiogenezę [8], łożyskopochodny czynnik wzrostu (PIGW) [9] i wątrobowy czynnik wzrostu (HGF) [10] (tab. I). Wyniki ostatnio prowadzonych badań wskazują jednak na istotną rolę naczyniopochodnego śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) oraz naturalnego inhibitora angiogenezy — czynnika wzrostu pochodzącego z nabłonka barwnikowego jako ważnych modulatorów rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej [1, 11].

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF)

Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) odgrywa istotną rolę w procesach proliferacji i różnicowania różnego typu komórek zarówno rozwijającego się płodu, jak i dorosłego organizmu [12]. Czynnik ten współdziała z VEGF w formowaniu kapilar i arteriol oraz zawiązkwów serca już podczas życia płodowego [13]. Przypisuje mu się także istotną rolę w procesie organogenezy i powstawania gałki ocznej [14]. Zasadowy czyn-

Table 1. Activators, and inhibitors of angiogenesis involved in the development of proliferative diabetic retinopathy**Tabela 1.** Czynniki stymulujące i hamujące angiogenezę zaangażowane w rozwój proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej

Activators of angiogenesis Aktywatory angiogenezy	Inhibitors of angiogenesis Inhibitory angiogenezy
Vascular endothelial growth factor (VEGF) Naczyniopochodny śródbłonkowy czynnik wzrostu	Pigment epithelium-derived factor (PEDF) Czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka barwnikowego
Basic fibroblast growth factor (bFGF) Zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów	
Platelet-derived growth factor (PDGF) Płytkopochodny czynnik wzrostu	
Insulin-like growth factor (IGF) Insulinopodobny czynnik wzrostu	
Placental growth factor (PIGF) Łożyskopochodny czynnik wzrostu	
Hepatocyte growth factor (HGF) Wątrobowy czynnik wzrostu	

lation of coronary angiogenesis to establish the normal hierarchy of the arteriolar tree [13]. bFGF also plays a role in organogenesis including eyeball development [14]. bFGF is a potent mitogen for different types of cells. Increased expression of bFGF was noted during malignant transformation and progression of various neoplastic disorders [14]. bFGF is secreted in large amounts from the retinal cells after local injury. This phenomenon is considered to be a defense reaction necessary for the protection of photoreceptors from overstimulation. Significantly increased levels of bFGF were also seen after corneal injuries [15, 16].

Paracrine interaction of the vitreous bFGF on ocular cells is suggested [17], resulting in inhibition of cellular apoptosis. The lack of bFGF caused lens fiber cells to display characteristics of apoptosis [12]. *In vitro* tests suggest that the inhibitory effect of bFGF on apoptosis is through the upregulation of the inhibitor of apoptosis such as angiostatin or PEDF, instead of downregulation of the initiators of this event (HGF, VEGF) [12].

The role of placental growth factor (PIGF)

Placental growth factor is the recently identified member of the VEGF family and potent inducer of angiogenesis. It is expressed in the tissue of diabetic patients' eyes undergoing preretinal neovascularization. PIGF immunoreactivity was localized to the endothelial and perivascular regions of newly formed blood vessels of excised fibrovascular preretinal membranes. Intense localization of PIGF protein, present in all diabetic vitreous samples, was also observed in superficial retinal vessels in diabetic retinae adjacent to neovascular preretinal membranes. PIGF protein was absent in normal retinae, as well as in diabetic retinae of patients that had

nik wzrostu fibroblastów jest silnym mitogenem dla wielu typów komórek, a zwiększoną ekspresję genu bFGF obserwowano w przebiegu transformacji nowotworowej i progresji różnych nowotworów [14]. Czynnik ten jest wydzielany w dużych ilościach z komórek siatkówki pod wpływem miejscowego, ogniskowego urazu. Wielu autorów uważa to zjawisko za wyraz reakcji obronnej, mającej na celu ochronę fotoreceptorów przed ich nadmierną stymulacją. Istotny wzrost stężenia bFGF obserwowano także po urazach rogówki [15, 16].

Sugeruje się parakrynnie oddziaływanie bFGF, zawartego w ciele szklistym na komórki gałki ocznej [17] — jego wpływ polega głównie na hamowaniu apoptozy. Zaobserwowano, że brak bFGF wywołuje nasiloną apoptozę w komórkach włókien soczewki [12]. Wyniki badań *in vitro* dotyczące apoptozy komórek soczewki wskazują, że obecność bFGF blokuje apoptozę raczej poprzez aktywację jej inhibitorów, takich jak angiostatin, PEDF, niż przez zablokowanie jej aktywatorów, np. HGF, VEGF [12].

Łożyskopochodny czynnik wzrostu (PIGF)

Łożyskopochodny czynnik wzrostu (PIGF) jest niedawno wyodrębnionym czynnikiem stymulującym nowotworzenie naczyń, należącym do rodziny białka VEGF. Nie stwierdza się go w ciele szklistym zdrowych oczu. Natomiast jego podwyższone stężenie obserwuje się w gałkach ocznych, w których toczy się zaawansowany proces nowotworzenia naczyń siatkówki [9]. W badaniach immunohistochemicznych wykazano obecność dużej ilości PIGF w obrębie komórek śródbłonka i w tkance wokół nowopowstałych naczyń. Duże ilości PIGF zlokalizowano także w powierzchniowych naczyniach siatkówki oczu z retinopatią cukrzycową [9].

received extensive treatment with scatter laser photocoagulation [9]. These results strongly suggest a role of PIGF in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy.

The role of insulin-like growth factor (IGF-I)

The results of both clinical and experimental studies concerning the influence of IGF-I on angiogenesis presents controversial results. Punglia et al. demonstrated that elevated IGF-I increased VEGF expression in retinal pigment epithelial cells, and that this effect was additive with hypoxia [18]. In other experiments, the decrease of retinal epithelial cell proliferation was observed when IGF-I and VEGF were used simultaneously, as compared with the case when they were used separately [19]. Smith et al. have reported an important role for IGF-I in regulation of retinal proliferation and modulation of VEGF activity in mice with hypoxia-induced proliferative retinopathy [20].

In the study, in which diabetic patients and nondiabetic control subjects underwent vitrectomy, significantly higher intravitreal levels of free IGF-I and VEGF in diabetic patients with PDR in comparison with the control group, was detected [21]. The authors did not observe significant differences in serum VEGF and free IGF-I levels between diabetic patients with PDR and the control subjects included in the study. A correlation between vitreal levels of IGF-I and VEGF was not detected. After adjusting for total intravitreal protein concentration, VEGF (expressed as ng/mg of protein) was significantly higher in diabetic patients with PDR than in the control group, whereas free IGF-I (ng/mg of protein) was lower in diabetic patients than in control subjects. This relative deficit of free IGF-I could be explained by the intravitreal increase of serum-derived IGF — binding proteins (IGFBPs) reported in patients with PDR, which could overcome the intraocular production of free IGF-I, thus leading to a reduction in the biologically active IGF-I pool, or by the reduced intraocular production of IGF-I in diabetic patients [21]. The latter explanation was confirmed by the study in which a threefold lower IGF-I mRNA level in retinas obtained *post-mortem* from diabetic human donors than in retinas of age-matched nondiabetic donors was detected [22]. The disruption of the blood-retinal barrier that occurs in PDR permits the passage into the vitreous body of serum proteases, which in turn can result in the degradation of IGF-I. These results do not deny the possible role of serum derived IGF-I and IGF-binding proteins in the pathogenesis of diabetic retinopathy. It has been demonstrated that the biology of the IGF/IGFBPs is very complex, thus making it difficult to determine the final ba-

W komórkach siatkówki oczu zwierząt doświadczalnych chorujących na cukrzycę, jednak bez proliferacyjnych zmian naczyniowych, stwierdzono niewielkie tylko ilości PIGF lub jego brak. Czynniki te nie występowały w komórkach zdrowej siatkówki oraz w komórkach siatkówki u chorych na cukrzycę podlegających intensywnemu leczeniu za pomocą fotokoagulacji laserowej. Nie stwierdzono również jego obecności w komórkach siatkówki oczu chorych na cukrzycę, jednak bez cech proliferacji naczyniowej. Powyższe dane wskazują na istotny udział tego czynnika w powstawaniu proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej.

Insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-I)

Wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych nad wpływem IGF-I na angiogenezę są kontrowersyjne. Punglia i wsp. wykazali, że IGF-I zwiększa ekspresję VEGF w komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki i efekt ten sumował się z działaniem hipoksji [18]. W innych badaniach stwierdzono zmniejszenie intensywności proliferacji komórek nabłonka siatkówki pod wpływem zastosowanego jednocześnie IGF-I i VEGF, w porównaniu z proliferacją obserwowaną pod wpływem każdego z czynników stosowanych oddzielnie [19]. Natomiast u myszy z wywołaną niedokrwieniem retinopatią proliferacyjną wykazano istotną rolę IGF-I w regulacji naczyniowej proliferacji siatkówkowej oraz w modulowaniu aktywności VEGF [20]. W badaniach przeprowadzonych u pacjentów z PDR stwierdzono kilkakrotnie wyższe stężenia VEGF oraz statystycznie istotnie wyższe stężenie IGF-I w płynie ciała szklistego w porównaniu z grupą kontrolną. Nie obserwowano natomiast różnic w stężeniu obu czynników w surowicy krwi w poszczególnych grupach [21]. Nie stwierdzono również zależności pomiędzy stężeniem IGF-I a VEGF w płynie ciała szklistego. Po korekcji stężeń VEGF i IGF-I względem innych białek odnotowano istotnie wyższe stężenia VEGF oraz obniżone stężenia IGF-I w płynie ciała szklistego chorych z PDR w porównaniu z grupą kontrolną, co potwierdza tezę o zwiększonej syntezie VEGF w tkankach oczu chorych na proliferacyjną retinopatię cukrzycową. Płyn ciała szklistego pacjentów z PDR zawiera mniej wolnego IGF-I w przeliczeniu na miligram białka niż płyn osoby zdrowej. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że wzrost stężenia białek wiążących IGF-I (IGFBP's) w ciele szklistym niweluje zwiększoną produkcję IGF-I, co prowadzi do zmniejszenia puli wolnego, aktywnego biologicznie IGF-I. Inną możliwością może być zmniejszenie generacji wolnego IGF-I przez tkanki oka chorego na cukrzycę. Zjawisko to potwierdzono w pracy, w której wykazano zmniejszoną ekspresję mRNA dla IGF-I w tkankach oczu chorych na

lance of IGF-I activity from the measurement of free IGF-I alone. A relationship between intravitreal VEGF concentration and PDR activity was observed, however, intravitreal free IGF-I was not related to PDR activity. The study supports the concept that intraocular production of VEGF is increased in diabetic patients with PDR and also suggests the relevant role of VEGF in the etiopathogenesis of diabetic retinopathy, however, further studies are required to establish the precise role of free IGF-I.

The role of hepatocyte growth factor (HGF)

Hepatocyte growth factor is a mesenchyme-derived pleiotropic factor that regulates cell motility and growth. HGF is synthesized mainly in the liver. The expression of HGF was also detected in other tissues including lungs, kidneys, smooth muscle cells, corneas and lenses. The expression of HGF and its receptor on endothelial cells was documented [23]. HGF is an endothelial growth factor, and its mitogenic activity is the most potent compared with that of bFGF, VEGF, interleukin-1 and interleukin-6 [24, 25]. HGF exerts its activity through the receptor for tyrosine kinase encoded by MET proto-oncogene [26]. Endothelial cells expose the mature protein at the cell surface. HGF is initially synthesized and secreted in an inactive single-chain precursor form, after which it is cleaved to yield a physiologically active heterodimeric form. The invasion of endothelial cells into the perivascular matrix and proliferation at that point is considered as a crucial event in the angiogenic process. HGF promotes the scattering of the endothelial cell monolayer within the underlying collagen matrix. It has been observed that the HGF potency in stimulation of angiogenesis is more efficacious than that of other growth factors such as VEGF and bFGF [24, 25]. Thus, HGF may play a role in the initial steps of the angiogenic process [23]. It was noted that HGF levels in vitreous fluid were significantly higher in the eyes of patients with PDR than in those of patients with non-diabetic diseases. Furthermore, HGF levels were significantly higher in the samples from patients with active PDR than in those from patients with quiescent PDR. It was suggested, therefore, that vitreous HGF is involved in the progressive stage of PDR. The source of increased vitreous HGF concentration is not clear, but there may be a possible effect of serum HGF on vitreous HGF concentrations. The lack of correlation between HGF and the VEGF vitreous concentrations suggests that HGF may differ from VEGF in the process of proliferative retinopathy with respect to roles and induction mechanisms [10].

cukrzycę w porównaniu z grupą kontrolną, lecz w badaniu wykonanym *post mortem* [22]. Przerwanie bariery surowica/siatkówka, obserwowane w przebiegu PDR, umożliwia przechodzenie proteaz surowicznych do ciała szklanego, co wtórnie może prowadzić do degradacji tego czynnika.

Powyższe badania nie podważają roli IGF-I oraz jego białek wiążących w powstawaniu cukrzycowej retinopatii proliferacyjnej. Wskazują jedynie, że biologia kompleksu IGF-I/IGFBP jest bardzo skomplikowana i bardzo trudno jest określić ostatecznie aktywność IGF-I na podstawie pomiarów stężeń jedynie wolnej formy IGF-I.

Zaobserwowano dodatnią zależność pomiędzy stężeniem VEGF w płynie ciała szklanego a aktywnością i rozwojem cukrzycowej retinopatii proliferacyjnej. Nie stwierdzono natomiast takiej zależności dla stężeń IGF-I [21]. Precyzyjne określenie roli IGF-I w etiopatogenezie PDR wymaga dalszych badań.

Wątrobowy czynnik wzrostu (HGF)

Wątrobowy czynnik wzrostu jest pleiotropowym czynnikiem pochodzącym z tkanki mezenchymalnej, regulującym wzrost i migrację wielu typów komórek. Synteza HGF odbywa się głównie w wątrobie, innymi miejscami wytwarzania tego czynnika są płuca, nerki, komórki mięśni gładkich, a także rogówka i soczewka, w których stwierdzono ekspresję receptora dla HGF. Udokumentowano także ekspresję HGF oraz jego receptora w komórkach śródbłonka [23]. Wątrobowy czynnik wzrostu będący czynnikiem wzrostu komórek śródbłonka, którego aktywność mitogenna jest większa niż takich czynników, jak bFGF, VEGF, interleukina 1 (IL-1) i interleukina 6 (IL-6) silnie stymuluje angiogenezę [24, 25]. Czynnikiem ten działa za pośrednictwem receptorów dla kinazy tyrozynowej kodowanej przez protoonkogen MET. Komórki śródbłonka wykazują ekspresję genu MET, a powstałe na jego matrycy białko znajduje się na powierzchni komórek [26]. Wątrobowy czynnik wzrostu jest wydzielany w postaci jednołańcuchowego prekursora, który ulega aktywacji poprzez proteolityczne odcięcie fragmentu cząsteczki.

Za kluczowy etap nowotworzenia naczyń w przebiegu PDR uważa się migrację komórek śródbłonka do przestrzeni macierzy okołonaczyniowej i rozpoczęcie tam proliferacji. Wątrobowy czynnik wzrostu umożliwia rozproszenie się warstwy komórek śródbłonka w macierzy kolagenowej. Zaobserwowano, że efektywność oddziaływania HGF na procesy angiogenezy jest wyższa niż efektywność VEGF lub bFGF [24, 25]. Z tego powodu uważa się aktualnie, że HGF może odgrywać istotną rolę w początkowych etapach angiogenezy [23].

The role of vascular endothelial growth factor (VEGF)

Vascular endothelial growth factor is a potent inducer of neovascularization and vessel wall permeability. VEGF is a mitogen for endothelial cells whose expression both *in vivo* and *in vitro*, can be induced by hypoxia and inflammatory processes (infiltration of macrophages) [11]. Other activators of the secretion of VEGF are reported (interleukin-1, low concentration of nitric oxide, TNF alfa, as well as statins). High-affinity receptors for VEGF were detected in the cellular membranes of endothelial and pigmented epithelial cells [27, 28]. Also, the expression of VEGF receptors is regulated and increases under hypoxia. High levels of VEGF were detected in the vitreous fluid in diabetic patients with retinopathy [29, 30] and in the experimental animals with multiple eye disorders with local hypoxia and neovascularization [31–34]. Elevated expression of VEGF in the pigment — epithelium cells located between retina and chorioid membrane plays a key role in the development of retina disturbances in the course of diseases with increased neovascularization, such as diabetes [35]. VEGF was absent in normal eyes, whilst all eyes with PDR showed an upregulated expression of VEGF mRNA. Intensity of the VEGF immunostaining of diabetic eyes was dependent on the severity of retinopathy, being least in diabetics with no overt retinopathy and greatest in retinas with proliferative retinopathy. VEGF expression was upregulated in the in all three nuclear layers — namely, the ganglion cell layer, the inner nuclear layer, and the outer nuclear layer. The distribution of retinal cells with upregulated VEGF mRNA expression suggests that the restricted population of VEGF producing cells is likely to represent cells residing in ischaemic regions of the retina. The unbalanced expression of VEGF gene and elevated level of this protein, by several times, in the ocular tissues in the diabetic eyes with PDR is currently considered to be one of the major factors playing the key role in the mechanism of such pathology [11, 15, 34–36]. However, a change in the VEGF seems unlikely to be the only cause of retinopathies because: increases in VEGF can occur in the absence of retinopathy; decreases in the severity of retinopathies can occur without any change in VEGF level [20, 37]; drugs that prevent a rise in VEGF can vary in their effects on retinopathy [38]. Additionally, therapies designed to interfere with the action of VEGF have not been able to completely inhibit vessel growth in an experimental animal model of ischemia-induced retinopathy [39]. These facts suggest that additional stimulatory angiogenic factors and/or natural inhibitors are also playing an important role in the PDR process.

Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie HGF w płynie ciała szklistego pacjentów z PDR niż u cierpiących na inne schorzenia gałki [10]. Ponadto stężenie HGF w płynie ciała szklistego pacjentów z aktywną postacią proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej było znacznie wyższe niż w grupie z nieaktywną postacią PDR. Stąd wniosek o udziale HGF w regulacji zaawansowania procesu PDR. Źródło występowania HGF w płynie ciała szklistego jest nieznanne, przypuszcza się, iż na jego stężenie może wpływać frakcja surowicza tego czynnika, która w przypadku chorych na cukrzycę była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Brak zależności pomiędzy stężeniami HGF i VEGF w ciele szklistym pacjentów z PDR i grupy kontrolnej sugeruje, że oba te czynniki różnią się pomiędzy sobą pod względem odgrywanej roli i mechanizmu aktywacji tego typu retinopatii [10].

Naczyniowopochodny nabłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)

Naczyniowopochodny nabłonkowy czynnik wzrostu jest silnym aktywatorem nowotworzenia naczyń i czynnikiem zwiększającym ich przepuszczalność [11]. Jest on mitogenem dla komórek śródbłonna naczyniowego, którego wytwarzanie zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* jest regulowane głównie miejscowym stężeniem tlenu. Zwiększenie sekrecji VEGF obserwowano w wielu typach komórek gałki ocznej badanych w warunkach hipoksji. Innymi czynnikami aktywującymi uwalnianie VEGF są IL-1, niskie stężenie tlenu azotu (NO), TNF- α , a także leki, np. statyny.

Charakteryzujące się wysokim powinowactwem receptory dla VEGF wykryto w błonach komórkowych komórek śródbłonna naczyniowego i komórek barwnikowych siatkówki [27, 28]. Ich ekspresja wzrasta, podobnie jak samego VEGF, pod wpływem niskiego stężenia tlenu. Wysokie stężenie VEGF stwierdzono m.in. w ciele szklistym u pacjentów z retinopatią [29, 30] oraz u zwierząt doświadczalnych w wielu schorzeniach oczu przebiegających z lokalną hipoksją i nowotworzeniem naczyń [31–34]. Wysoka ekspresja VEGF w komórkach nabłonka pigmentowego siatkówki, umiejscowionego pomiędzy siatkówką a błoną naczyniową, odgrywa kluczową rolę w powstawaniu zaburzeń siatkówki w przebiegu schorzeń z nasilonym nowotworzeniem naczyń, np. w cukrzycy [35]. W badaniach immunohistochemicznych siatkówki zaobserwowano, że VEGF nie występował w siatkówkach oczu ludzi zdrowych, pojawiał się natomiast u chorych na cukrzycę [11]. Intensywność reakcji barwnej odzwierciedlająca ilość molekuł VEGF w tkance wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania zmian naczyniowych — najmniejsza u chorych na cukrzycę bez retinopatii i znacznie większa u chorych

The role of pigment epithelium-derived growth factor (PEDF)

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) was first identified as a 50 kDa secreted protein in a conditioned medium from cultured fetal human retinal pigment epithelium (RPE) cells [40]. In human eyes, PEDF is synthesized and secreted by the photoreceptor cells and inner retina layer cells [41]. PEDF is neurotrophic for cerebellar granule cells and inhibits microglial as well as young fibroblasts growth. The protein shares sequence and structural homology with the serine protease inhibitors (serpins) family but does not inhibit proteases. *In vitro*, PEDF inhibited endothelial cell migration in a concentration-dependent manner with a median effective dose (ED50) of 0.4 nM, placing it among the most potent natural inhibitors of angiogenesis in this assay [42]. PEDF also inhibited VEGF, PDGF, IL-8, acid fibroblast growth factor (aFGF) — and bFGF-induced endothelial cells migration [42]. Antiangiogenic activity of PEDF is selectively directed toward new-developed vessels, without effect on the already existing vessels. However, it was possible to observe the regression of aberrant retinal vasculature developed in the course of PDR after transfection of the adenoviral expressing PEDF vector to the retina or the administration of PEDF protein into vitreous body [43]. PEDF is likely to contribute to the regulation of blood vessel growth in the eye by creating a permissive environment for angiogenesis when the oxygen supply is limited (as it is in tumors and in retinopathies) and create the angiogenesis inhibitory environment when oxygen concentrations are normal or high [42]. PEDF stimulates apoptosis *in vitro* model when given to cultured endothelial cells. It revealed the similar effects on endothelial cells forming new vessels *in situ* in mice with retinopathy [1]. In multiple studies it was demonstrated that the retinal PEDF levels, (in contrast to VEGF), were negatively correlated with pathologic retinal neovascularization [1, 15, 44, 45]. It has been reported that photocoagulation activates this potent inhibitor of neovascularization and/or reduces the level of stimulators of neovascularization from regenerating retinal pigment epithelium cells [45]. Laser photocoagulation reduces the VEGF concentration in the vitreous body as well [30].

Due to the high potency and the broad range of angiogenic inducers against which it can act, PEDF may prove to be a useful therapeutic for pathologic ocular neovascularization [42]. In a recently published study it was demonstrated that PEDF is present in plasma at a concentration of approx. 100 nM (5 µg/ml), twice the concentration required to inhibit aberrant blood-vessel

z zaawansowaną PDR [11]. U wszystkich pacjentów z proliferacyjną retinopatią cukrzycową stwierdzono podwyższoną ekspresję mRNA VEGF w komórkach siatkówki należących do warstwy zwojowej oraz wewnętrznej i zewnętrznej warstwy jądrowej. Dystrybucja komórek z podwyższoną ekspresją mRNA VEGF wskazuje, że do zwiększonej syntezy tego czynnika dochodzi w najbardziej niedokrwionych regionach siatkówki [36]. Niezrównoważona działaniem inhibitorów podwyższona ekspresja VEGF oraz wielokrotnie wykazane zwiększone stężenie tego czynnika w tkankach oka w przebiegu PDR uważa się obecnie za jeden z najważniejszych czynników odgrywających kluczową rolę w rozwoju tego zaburzenia [11, 15, 36]. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby zmiany w stężeniu VEGF były jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój retinopatii. Mogą o tym świadczyć następujące fakty: obserwuje się wzrost stężenia VEGF, któremu nie towarzyszy powstanie retinopatii; może dojść do zmniejszenia zaawansowania retinopatii bez ewidentnych zmian w sekrecji i stężeniu VEGF [20, 37]; wykazano różnorodny wpływ na przebieg retinopatii leków zapobiegających zwiększeniu stężenia VEGF [38]. Opracowane na zwierzętach doświadczalnych metody leczenia retinopatii niedokrwiennej, modyfikujące oddziaływanie VEGF nie doprowadziły do całkowitego zahamowania proliferacji naczyń [39]. Powyższe spostrzeżenia sugerują zaangażowanie dodatkowych stymulatorów lub naturalnych inhibitorów angiogenezy w proces powstawania naczyniowych zmian gałek ocznych przyczyniających się do rozwoju retinopatii. Ostatnie badania wskazują, że istotnie aktywacja nowotworzenia naczyń może być wywołana nie tylko lokalnym wzrostem stężenia molekuł indukujących angiogenezę, ale także spadkiem stężenia endogennych inhibitorów angiogenezy.

Czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka barwnikowego (PEDF)

Po raz pierwszy PEDF wyizolowano jako białko o masie cząsteczkowej 50 kDa z medium hodowlanego płodowych ludzkich komórek nabłonka barwnikowego jako czynnik pobudzający różnicowanie neuronalne hodowanych komórek retinoblastomy Y79 [40]. W oczach ludzkich PEDF jest obecny w komórkach fotoreceptorów i jest przez nie wydzielany oraz przez komórki wewnętrznych warstw siatkówki [41]. Jest to czynnik neurotropowy dla komórek ziarnistych mózgu, hamuje wzrost mikrogleju i młodych fibroblastów. Wykazuje strukturalną homologię z rodziną inhibitorów proteaz serynowych (serpinami), lecz nie wykazuje ich aktywności względem czynników krzepnięcia krwi. W badaniach *in vitro* PEDF blokuje migrację ko-

growth in the eye. Thus, the systemic delivery of PEDF has the putative therapeutical potency to affect pathological angiogenesis or neurotrophic processes [46, 47].

It is now believed that angiogenesis is regulated by two counterbalancing systems: angiogenic stimulators and angiogenic inhibitors. The retinas with neovascularization showed a fivefold higher level of VEGF and a twofold lower level of PEDF compared with the age-matched controls. Results from several studies support the hypothesis that the higher levels of VEGF and lower levels of PEDF in the vitreous may promote ocular neovascularization in diabetic retinopathy and may subsequently lead to proliferative diabetic retinopathy. Therefore, restoration of the balance between the angiogenic stimulators and inhibitors by activating endogenous angiogenic inhibitors can become a potential therapeutic strategy to arrest the progression of retinal neovascularization.

References

1. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N (2001) Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 2593–2597.
2. Garner A (1994) Pathobiology of ocular disease. A dynamic approach. Marcel Dekker, New York, 1625–1710.
3. Michaelson IC (1948) The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc*, 68: 137–180.
4. Hanneken A, de Juan E, Lurry A, et al (1991) Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 109: 1005–1011.
5. Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ et al (1994) Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35: 3649–3663.
6. Dills DG, Moss SE, Klein R et al (1991) Association of elevated IGF-I with increased retinopathy in late-onset diabetes. *Diabetes*, 40: 1725–1730.
7. Elner SG, Strieter R, Bian ZM et al (1998) Interferon-induced protein 10 and interleukin 8. C-X-C chemokines present in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 116: 1597–1601.
8. Ozaki H, Hayashi H, Oshima K (1996) Angiogenin levels in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmol Res*, 28: 356–360.
9. Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, et al (1998) Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest*, 78: 109–116.
10. Katsura Y, Okano T, Noritake M, et al (1998) Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders. *Diabetes Care* 21: 1759–1763.
11. Boulton M, Foreman D, Williams G, McLeod D (1998) VEGF localisation in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 82: 561–568.

mórek śródbłonna naczyń w sposób zależny od dawki, ze średnią skuteczną dawką (ED50) 0,4 nM (większą niż określoną dla angiostatyny, trombospondyny-1 i endostatyny), co umiejscawia go w gronie najsilniejszych inhibitorów angiogenezy [42]. Czynnikiem ten blokuje migrację komórek śródbłonna indukowaną większością aktywatorów angiogenezy: VEGF, PDGF, IL-8, kwaśnym i bazowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (aFGF, bFGF) i wybranymi fosfolipidami [42]. Aktywność antyangiogenna PEDF jest wyrażona selektywnie przeciwko nowopowstałym naczyniom i nie wpływa na naczynia już powstałe. Jednak w badaniach przeprowadzonych na myszach dowiedziono, że istnieje możliwość regresji nieprawidłowych naczyń powstałych w toku nowotworzenia naczyń siatkówki po wprowadzeniu za pomocą adenowirusa genu zwiększającego ekspresję PEDF w siatkówce lub do ciała szklistego [43]. Badania nad antyangiogennymi właściwościami PEDF wykazały, że wywiera on regulacyjny wpływ na powstawanie naczyń w siatkówce, stwarzając odpowiednie środowisko, hamując wpływ na nowotworzenie naczyń w sytuacji prawidłowego utlenowania krwi, a promując angiogenezę w warunkach niedostatku tlenu. Pod wpływem PEDF dochodzi do indukcji apoptozy aktywnie dzielących się komórek śródbłonna.

W wielu badaniach wykazano negatywną zależność pomiędzy miejscowym stężeniem PEDF w obrębie siatkówki i błony naczyniowej a zaawansowaniem patologicznych zmian naczyniowych zarówno w badaniach *in vitro* [15, 42], jak i *in vivo* [44].

Interesujące są dane dotyczące możliwości zwiększenia ekspresji mRNA dla PEDF w hodowanych *in vitro* komórkach ludzkiego nabłonka barwnikowego siatkówki oraz w siatkówkach zwierząt laboratoryjnych pod wpływem fotokoagulacji laserowej, często wykorzystywanej w leczeniu zmian naczyniowych powstałych w przebiegu retinopatii cukrzycowej [45].

Biorąc pod uwagę szerokie spektrum czynników pobudzających angiogenezę, których działanie potrafi zablokować PEDF, może on stać się czynnikiem bardzo użytecznym w terapii patologicznego nowotworzenia naczyń oczu [42]. W ostatnio opublikowanych badaniach [46] wykazano obecność PEDF w osoczu krwi obwodowej w stężeniu około 100 nMol/l ($5 \mu\text{g/ml}$) — około 2-krotnie przekraczającym stężenie mogące zahamować patologiczny rozrost naczyń krwionośnych w obrębie oka. Podawanie systemowe PEDF może zatem wywierać wpływ na procesy neurotropowe i nowotworzenia naczyń [46, 47].

W prawidłowych tkankach oka homeostaza procesu angiogenezy jest kontrolowana poprzez utrzymywanie

12. Wang Y, He H, Zigler JS Jr et al (1999) BFGF supresses serum — deprivation-induced apoptosis in human lens epithelial cell line. *Exp Cell Res*, 249: 123–130.
13. Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Holifield JS (2001) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res*, 88: 1135–1141.
14. Yanagawa T, Matsuo T, Matsuo N (1998) Aqueous vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor decrease during regression of rabbit pupillary membrane. *Jpn J Ophthalmol*, 42: 157–161.
15. Gao G, Li Y, Zhang D et al (2001) Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS*: 270–276.
16. Benelli U, Bocci G, Danesi R et al (1998) The heparan sulfate sulpharoides inhibits rat corneal angiogenesis and in vitro neovascularization. *Exp Eye Res*, 67: 133–142.
17. Tripathi RC, Borisuth NS, Li J, Tripathi AJ, Tripathi BJ (1997) Quantitative characterization of high- and low-affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on trabecular cells of the eye. *Exp Eye Res*, 64: 335–341.
18. Punglia RS, Lu M, Hsu J et al (1997) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes*, 46: 1619–1626.
19. Kaven CW, Spraul CW, Zavazava NK, Lang GK, Lang GE (2000) Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res*, 20: 480–487.
20. Smith LE, Shen W, Perruzzi C et al (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-I receptor. *Nat Med*, 5: 1390–1395.
21. Simo R, Lecube A, Segura RM, Garcia Arumi J, Hernandez C (2002) Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 134: 376–382.
22. Gerhardinger C, McClure KD, Romeo G, Podesta F, Lorenzi M (2001) IGF-I mRNA and signaling in the diabetic retina. *Diabetes*, 50: 175–183.
23. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J et al (1995) Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 483–488.
24. Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S et al (1996). A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure. *Hypertension*, 28: 409–413.
25. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J et al. (1996) Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens*, 14: 1067–1072.
26. Naldini L, Weidner KM, Vagna E et al (1991) Scatter factor and hepatocytes growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J*, 10: 2867–2878.
27. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase I is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7533–7537.
28. Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P et al (1995) Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J Cell Physiol*, 164: 385–394.
29. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT et al (1994) Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, 118: 445–450.
30. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 331: 1480–1487.
31. Boyd SR, Zachary I, Chakravarthy U (2002) Correlation of increased Vascular Endothelial Growth Factor With Neovascularization and Permeability in Ischaemic Central Vein Occlusion. *Arch Ophthalmol*, 120: 1644–1650.
32. Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H, Keshet E (1996) Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37: 290–299.
33. Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, Dvorak HF, Brown LF (1996) Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol*, 114: 1210–1217.
34. Thieme H, Aiello LP, Takagi H, Ferrara N, King GL (1995) Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes*, 44: 98–103.
35. Nagineni CN, Samuel W, Nagineni S et al (2003) Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 1000–1005.

równowagi pomiędzy aktywatorami i inhibitorami angiogenezy. Endogennym inhibitorem czynników angiogenicznych przypisuje się obecnie kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy procesu angiogenezy w obrębie siatkówki. Zaburzoną równowagę pomiędzy aktywatorami i inhibitorami angiogenezy w obrębie siatkówki wielokrotnie opisywano jako przyczynę powstawania proliferacyjnej retinopatii w przebiegu cukrzycy [11, 36, 42]. Aktualnie podkreśla się szczególnie rolę, jaką mają odgrywać inhibitory nowotworzenia naczyń dla tej patologii. Wskazuje się istotną przewagę naturalnych inhibitorów, do których należy PEDF, nad czynnikami specyficznymi blokującymi receptory dla czynników angiogenicznych tylko jednej klasy lub wywołującymi zahamowanie aktywności poszczególnych czynników naczyniowych. Naturalne inhibitory powodują natomiast zablokowanie nowotworzenia naczyń stymulowanego którymkolwiek z dużej grupy jej aktywatorów [42]. Z tego powodu w ich zastosowaniu upatruje się możliwości terapeutycznego oddziaływania na patologiczne procesy angiogenezy, do których dochodzi w przebiegu m.in. cukrzycy.

- lar endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol*, 197: 453–462.
36. Pe'er J, Folberg R, Itin A et al (1996) Upregulated expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 80: 241–245.
 37. Okamoto N, Tobe T, Hackett SF et al (1997) Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol*, 151: 281–291.
 38. Frank RN, Amin R, Kennedy A et al (1997) An aldose reductase inhibitor and aminoguanidine prevent vascular endothelial growth factor expression in rats with long-term galactosemia. *Arch Ophthalmol*, 15: 1036–1047.
 39. Robinson GS, Pierce EA, Rook SL et al (1996) Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 4851–4856.
 40. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV (1991) PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res*, 53: 411–414.
 41. Karakousis PC, John SK, Behling KC et al (2001) Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis*, 30: 154–163.
 42. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P et al (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 285: 245–248.
 43. Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L, Campochiaro PA (2002) Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43: 2428–2434.
 44. Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M et al (2001) Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes*, 50: 2641–2645.
 45. Ogata N, Tombran-Tink J, Jo N et al (2001) Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am J Ophthalmol*, 132: 427–429.
 46. Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ (2003) A physiologically relevant concentration of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in human blood. Purification and Characterization. *Biochem J*, 374: 199–206.
 47. King GL, Suzuma K (2000) Pigment-epithelium-derived factor — a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N Engl J Med*, 342: 349–351.