

Endothelial progenitor cells (EPCs) in therapy

Endotelialne komórki progenitorowe (EPCs) w terapii

Łukasz Partyka¹, Krzysztof Siwiec¹, Rafał Nizankowski⁴, Tomasz Petriczek⁴, Antoni Basta²,
Aleksander B. Skotnicki³, Aldona Dembińska-Kieć¹

¹Department of Clinical Biochemistry, College Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland; ²Chair of Gynecology and Obstetrics, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland; ³Chair of Hematology, College Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland; ⁴Department of Angiology, II Chair of Internal Medicine, College Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland (¹Zakład Biochemii Klinicznej Collegium Medicum UJ w Krakowie; ²Katedra Ginekologii i Położnictwa Collegium Medicum UJ w Krakowie; ³Katedra Hematologii Collegium Medicum UJ w Krakowie; ⁴Zakład Angiologii Collegium Medicum UJ w Krakowie)

Abstract

Stem progenitor cells serve as a functional reserve and may differentiate into mature cells with a different phenotype. Partially differentiated endothelial progenitor cells (EPCs) are characterized by the expression of surface molecules such as endoglin (CD105), vWF, PECAM-1/CD31, VE-cadherin, CD146, CD62E, CD51/61, CD106, CD41a, CD41b, CD34 and AC133, growth factor receptors (e.g. Flt-1, KDR and Tie-1) and others. They may also express the functional capabilities of endothelial cells in the course of their differentiation (e.g. incorporation of modified LDL). Animal studies have confirmed the proangiogenic activity of labelled human (bone marrow, umbilical cord and peripheral blood) as well as animal EPCs in the experimental models of myocardial, peripheral and cerebral ischaemia. The goal of these studies has been to improve the vascularisation and functional activity of the target organs. The first clinical studies in peripheral and coronary artery disease revealed the clinical efficacy of human bone marrow-derived mononuclear fraction in diminishing the adverse effects of peripheral and myocardial ischaemia. No significant side-effects of the EPC application were observed, but further studies are required to confirm the long-term safety and efficacy of this method as well as to assess its possible hazards.

Key words: endothelial progenitor cells, angiogenesis, tissue ischaemia

Streszczenie

Komórki progenitorowe stanowią tkankową rezerwę czynnościową, która „na żądanie” może dojrzewać do komórek docelowych. Komórki progenitorowe dla śródbłonna charakteryzuje ekspresja markerów powierzchniowych, takich jak np. endoglina (CD105), vWF, PECAM-1/CD31, VE-kadheryna, CD146, CD62E, CD51/61, CD106, CD41a, CD41b, CD34, AC133, receptory czynników wzrostu (np. Flt-1, KDR, Tie-1) i inne. W toku różnicowania śródbłonkowe komórki progenitorowe mogą prezentować cechy czynnościowe dojrzałych komórek śródbłonna (np. wchłanianie zmodyfikowanych LDL). Badania przeprowadzone na zwierzętach dowiodły proangiogennej skuteczności stosowania znakowanych ludzkich i zwierzęcych komórek progenitorowych w modelach doświadczalnych niedokrwienia serca, kończyn dolnych i mózgu. Podstawowym kryterium oceny eksperymentów była poprawa unaczynienia i funkcji narządu docelowego. Nie obserwowano istotnych objawów ubocznych, chociaż trzeba brać pod uwagę możliwe zagrożenia. Badania kliniczne dotyczące miażdżycy naczyń obwodowych i choroby niedokrwiennej serca wykazały skuteczność kliniczną subfrakcji ludzkich komórek mononuklearnych szpiku i krwi obwodowej w zmniejszaniu niekorzystnych następstw niedokrwienia obwodowego i mięśnia sercowego. Konieczne są jednak dalsze badania potwierdzające skuteczność i bezpieczeństwo tej metody.

Słowa kluczowe: komórki progenitorowe dla śródbłonna (EPCs), angiogeneza, niedokrwienie tkankowe

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć, Zakład Biochemii Klinicznej CMUJ, ul. Kopernika 15a, 31–501 Kraków, Poland
fax: +48 (0 12) 421 40 73, e-mail: mbkiec@cyf-kr.edu.pl

Biocharacteristics of endothelial progenitor cells

The progenitor cells can be found, with the exception of bone marrow, in the majority of human organs in adults. They serve as “the basic reserve” and differentiate “on demand” into functional cells [1, 2].

The endothelial progenitor cells (EPCs) are, in fact, a heterogeneous group of blasts with properties which change with the advancement of differentiation and according to their final destination. EPCs develop primarily from the haematopoietic organs, i.e. the haematopoietic groups of yolk sac, liver and spleen, and probably (on the evidence of personal communication with Prof. A. Ratajska) from the endocardial cell precursors of embryos [1, 2] as well as from the bone marrow after birth. They differentiate to the CD34⁺, AC133⁺ cell stadium and may be a source of both haemato- and angiopoietic progenitors. The existence of CD34⁺, AC133⁺ cells have also been described [3] and these may differentiate into the endothelial cells, although the possibility of their transdifferentiation into cardiomyocytes has also been proved [5]. The CD34⁺AC133⁻ cells have not so far been isolated [4]. The existence of a primary haemangioblast, a cell that may differentiate both in the haematopoietic and endothelial direction after birth, is postulated [6].

Healthy adults (without coronary risk factors, general and chronic inflammatory disorders or other risk factors such as nicotine) demonstrate a low 5–40 EPCs/mm³ of peripheral blood [7]. The number of EPCs may rise after 4–7 days of granulocyte-colony stimulatory factor (G-CSF) administration. The EPC level is elevated in peripheral ischaemia [10], but is lowered even down to 0 due to cytokine stimulation during chronic inflammation [7–9].

The growth factors of EPCs are: vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, VEGF-R2 (KDR, Flk1) [11], placenta-derived growth factor (PlGF) and its receptor, Flt1, which regulate the proliferation and migration of EPCs [12], angiopoietin-1 and its receptor Tie-1, angiopoietin-2 acting by receptor Tie-2 to aid the differentiation of pericytes, as well as hepatocyte growth factor (HGF) to protect EPCs against apoptosis [13, 14]. HGF, apart from activating EPCs, also takes part in adverse ventricular remodelling after myocardial infarction [44]. Recent publications report that the influence of erythropoietin, on the erythroid line in particular, may also stimulate EPC proliferation and neovascularisation, including that in humans [15].

EPCs are characterised by the number of expressed antigens/proteins. 90% of the adherent cells of the blood or bone marrow mononuclear fraction cultured *ex vivo*

Charakterystyka biologiczna śródbłonkowych komórek progenitorowych

Oprócz szpiku komórki progenitorowe znajdują się w większości narządów wewnętrznych ludzi dorosłych i na podstawie wyników badań przeprowadzonych w ostatnich latach można stwierdzić, że stanowią „bazę rezerwową” dla uszkodzonych tkanek, przekształcając się w razie konieczności w komórki funkcjonalne [1, 2].

Komórki progenitorowe objęte wspólną nazwą EPCs (*endothelial progenitor cells*) w rzeczywistości stanowią heterogenną grupę blastów, które mają różną charakterystykę, zmieniającą się zarówno z wiekiem, jak i w zależności od ich przeznaczenia. Endotelialne komórki progenitorowe wywodzą się pierwotnie z miejsc hematopoezy: u płodu — wyspy hematopoetyczne w woreczku żółtkowym, później w śledzionie, wątrobie i prawdopodobnie w komórkach zawiązku wsierdzia (ustna informacja prof. Anny Ratajczak), a w życiu pozapłodowym — ze szpiku kostnego [1, 2]; dojrzewając tu do stadium komórek CD34⁺, AC133⁺, które mogą różnicować się w kierunku hematopoetycznym i endotelialnym. Opisano również komórki CD34⁺, AC133⁺ [3] mające potencjał różnicowania się tylko w komórki endotelialne, natomiast nie wyizolowano komórek CD34⁺AC133⁻, które miałyby tę właściwość [4]. Wykazano także ich zdolność do przeróżnicowania się w kardiomiocyty [5]. Postuluje się pochodzenie EPCs od hemangioblastu [6], która to komórka daje początek linii hematopoetycznej i endotelialnej.

U zdrowych, dorosłych ludzi (bez czynników ryzyka choroby wieńcowej, bez uogólnionych i przewlekłych stanów zapalnych, niepalących, nieuzależnionych od narkotyków) liczba EPCs w krwi obwodowej wynosi 5–40/mm³ [7]. W przewlekłym stanie zapalnym, w związku z obecnością cytokin, ich liczba może się zmniejszyć nawet do zera. Z kolei liczba EPCs na obwodzie rośnie po podaniu G-CSF (*granulocyte-colony stimulatory factor*) (przez 4–7 dni), jednak efektem ubocznym tej terapii może być nadkrzepliwość krwi i zatory komórkowe w drobnych naczyniach [7–9]. Podobnie wzrost liczby EPCs na obwodzie obserwowano w przypadku niedokrwienia tkanek [10].

Czynnikami wzrostowymi dla EPCs są: naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF, *vascular endothelial growth factor*, działający poprzez receptor VEGF-R2: KDR, Flk1) [11] i PlGF (*placenta-derived growth factor*, działający przez receptor VEGF-R1: Flt1), które wpływają na proliferację i migrację EPCs [12]. Angiopoetyna-1 (aktywator receptora Tie-1) i angiopoetyna-2 (aktywator receptora Tie-2) wspierają różnicowanie się EPCs w kierunku śródbłonka, natomiast czynnik wzrostu hepatocytów

on fibronectin or gelatin-coated dishes are EPCs. This is used for the separation of EPCs from CD45⁺ cells of this fraction. The EPCs form cell clusters after 7 days in culture. Longer incubation results in the formation of cellular "cords". These may then be transformed into tubules with primitive lumen, which may be considered as the equivalent of new vessel formation. The surface membrane markers characterizing EPCs are: VEGFR2 (KDR), endoglin (CD105), vWF, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31), VE-cadherin, CD146, CD62E (E-selectin), CD51/61 ($\alpha_v\beta_3$ integrin), CD106, CD41a, CD41b, Tie-1, and Tie-2. EPCs are capable of expressing the scavenger receptor and incorporate fluoro-labelled ac LDL, which is a distinctive attribute of the endothelial lineage. Similarly, the uptake of BS-I, lectin binding and eNOS (endothelial nitric oxide synthase) or Ulex europeus agglutinin-I (UEA-I) expression also serves to assign these cells to a differentiated endothelium [16].

The pathway stimulated by VEGF and its receptor VEGFR2 (KDR) and signalled by Akt (kinase B) is common for EPCs and endothelium in mediating proliferatory/antiapoptotic activity as well as eNOS induction [17].

EPC application in cardiology and angiology

Possible stem cell plasticity and involvement in tissue regeneration was demonstrated several years ago [25]. Thereafter intense research has been undertaken with the aim of demonstrating the efficacy of these cells in proangiogenic activity for the treatment of disorders related to tissue ischaemia such as coronary artery disease, ischaemic cardiomyopathy, peripheral atherosclerosis and cerebral ischaemia. Current pioneer clinical studies recruit for EPC application only those patients excluded from all other forms of therapy and serve as an alternative pathway of angiogenesis activation.

At present the most frequent model of clinical study involves the injection of a purified, autologous fraction of EPCs into ischaemic tissue or into the main artery supplying blood to ischaemic tissue. This approach enables graft versus host disease (GvHD) to be avoided. Other advantages of such an approach are the avoidance of early post-reperfusion effects (free radical generation after vascular recanalisation), the possible absence of adverse effects on heart electrophysiology (in contrast to myoblast application after myocardial infarction with the rhythm disturbances that have been demonstrated [19]), the avoidance of adverse vascular and heart remodelling (due to collagen II deposition and smooth muscle cell proliferation [20]), and, finally, a lowering of the diffusion distance (vasculogenesis and angiogenesis activation).

(HGF, *hepatocyte growth factor*) chroni EPCs przed apoptozą [13, 14]. Należy tu wspomnieć, że HGF oprócz odgrywania roli aktywatora EPCs bierze udział również w niekorzystnej przebudowie mięśnia komór po zawale serca [44]. Ostatnio pojawiły się również doniesienia, że erytropoetyna stymulująca głównie proliferację komórek erytroidalnych pobudza neowaskularyzację (aktywację tworzenia nowych naczyń z użyciem EPCs) także u ludzi [15].

Komórki progenitorowe szpiku mają bardzo bogatą charakterystykę antygenową i cytobiologiczną. Hodowane na podłożu fibronektynowym lub żelatynowym, stanowią więcej niż 90% komórek adherentnych (wykorzystuje się to do separacji EPCs od komórek leukocytarnych CD45⁺). Po 7 dniach hodowli można zauważyć skupiska (*cell clusters*) EPCs. W dłuższej hodowli są dostrzegalne „sznury” komórek, które po pewnym czasie wytwarzają światło (tubule), co uważa się za odpowiednik tworzenia się naczyń krwionośnego. Markery błonowe charakteryzujące EPCs to: VEGFR2 (KDR), endoglina (CD105), czynnik von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*; PECAM-1/CD31), VE-cadheryna, CD146, CD62E (E-selektyna), CD51/61 (integryna $\alpha_v\beta_3$), CD106, CD41a, CD41b, Tie-1, Tie-2. Inkubacja EPCs ze zmodyfikowanymi lipoproteinami LDL (np. acLDL), znakowanymi fluorescencyjnie i ekspresją receptorów typu receptorów resztkowych (*scavenger*) przez EPCs w hodowli to jedna z cech charakterystycznych komórek linii śródbłonkowej. Podobnie charakterystyczne dla nich jest pobieranie BS-I lektyny oraz ekspresja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*), czy antygeny dla UEA-I (*ulex europaeus agglutinin-I*) [16].

Cytofizjologicznie charakterystyczny dla EPCs i wspólny z komórkami śródbłonka jest szlak przekazywania sygnału od VEGF drogą aktywacji VEGFR2 (KDR) oraz Akt (kinazy białkowej B): działanie proproliferacyjne/antyapoptotyczne, różnicowanie w kierunku śródbłonka, a u zróżnicowanych — aktywacja eNOS [17].

Możliwości zastosowania EPCs w kardiologii/angiologii

Po wykazaniu możliwości regeneracji tkanek przez EPCs od paru lat trwają intensywne próby wykorzystania EPCs jako komórek różnicujących się w kierunku śródbłonka do terapii chorób przyczynowo związanych z zaburzoną funkcją śródbłonka lub niedokrwieniem tkanek. Są to: choroba wieńcowa (także stan po zawale serca), choroba niedokrwienna kończyn dolnych (miażdżycza zarostowa) oraz choroba niedokrwienna mózgu (stany po udarze). Obecnie wspomniane próby terapeutyczne

The first animal and pre-clinical studies

The participation of EPCs in the angiogenesis (vasculogenesis) of the adult organism was first shown by Asahara from the Jeffrey Isner group [16]. These pioneering experiments on the role of EPCs in vasculogenesis were performed on animals (rats, mice, dogs), mainly on immunodeficient mice or rats (SCID, athymic animals) to avoid the host immune response and GvHD. The cells used in this study were the early progenitor AC(CD)133⁺ or CD34⁺ cells isolated from the bone marrow (BM) and labelled with the bacterial protein, for example transfection with the marker gene, β -galactosidase (β -Gal), or the cells from an animal of the other sex (Y chromosomal differences as markers) or from another animal (allogeneic transplant). Human EPCs isolated from the bone marrow, venous blood, and human umbilical cord blood (the last have a greater differentiation potential) were also implemented [21].

Kalka et al. [18] used the hind-limb ischaemia model based on the unilateral segmental excision of the femoral artery in athymic mice. Isolated progenitor cells (mononuclear fraction of peripheral blood isolated from healthy human volunteers) were cultured on fibronectin-coated dishes with growth factors (VEGF, bFGF, EGF). Four days later only the adherent cells were collected and defined as human EPCs (the positive surface expression of hCD62E, hCD51/61, hCD86, hCD83, hCD68, hCD31, hCD34). Mice were divided into 3 groups for xenograft [18]: the first received hEPCs, the second group received human microvascular endothelial cells (HMVEC), considered (in comparison to HUVEC) as more differentiated (matured), while the third group, as the control, received the cell culture growth medium. Tissue blood perfusion monitoring with laser-Doppler measurements (LDPI) revealed the best regeneration of vasculature in animals that received hEPCs (10 out of 17 animals with total regeneration) and, to a lesser degree, in animals receiving HMVEC (1 out of 12 animals with total regeneration). The worst effect, namely lack of increase in flow and leg necrosis, was found in mice who received the cell culture medium.

Other studies on cerebral vasculature have been performed by Zhang et al. [22]. Transgenic mice transfected with β -Gal were the bone marrow donors for mice with an embolised medial cerebral artery. After the injection of β -Gal-labelled bone marrow cells, the functional effect (tissue blood perfusion) was assessed by LDPI, and the origin of cells was determined immunohistochemically using laser-scanning confocal microscopy (LSCM). In addition to angiogenesis, vasculogenesis (with the participation of EPCs) was observed by the incorporation of cells of bone marrow origin into the *choroid plexus* of the cerebral ventricles.

tyczne mają zastosowanie jedynie u pacjentów zdyskwalifikowanych do zabiegów chirurgicznych, u których zostały również wyczerpane inne możliwości leczenia. Stawiają więc, jak dotychczas, eksperymentalną alternatywną metodę indukowania angiogenezy.

Obecnie najczęściej stosowane metody to wszczepianie w miejsce niedokrwione oczyszczonej, autologicznej frakcji EPCs [18]. Postępowanie to pozwala uniknąć wystąpienia objawów GvHD (*graft versus host disease*). Dalsze sugerowane zalety terapii przy użyciu EPCs to: uniknięcie szkód poreperfuzyjnych (związanych z generacją wolnych rodników tlenowych po rekanalizacji naczyń), prawdopodobny brak działań ubocznych na układ bódźoprzewodzący (nie obserwowano arytmii w przeciwieństwie do zastosowania mioblastów w leczeniu szkód po zawale serca [19]), uniknięcie niekorzystnego remodelingu serca i naczyń (tworzenie neointymy: przerost mięśniówki gładkiej i odkładania kolagenu II jak po angioplastyce [20]) oraz zmniejszenie odległości dyfuzyjnej (aktywacja waskulo- i angiogenezy).

Pierwsze doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach i badania przedkliniczne

Udział EPCs w angiogenezie dorosłego organizmu został wykazany w pionierskich pracach Takayuki Asahara z grupy zmarłego niedawno Jeffreya Isnera [16]. Zarówno te badania, jak i te późniejsze przeprowadzono na zwierzętach (szczury, myszy, psy) w większości pozbawionych aktywności układu immunologicznego (zwierzęta atymiczne, SCID), w celu uniknięcia odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza i zniszczenia graftu. Do takich badań używa się wczesnych komórek progenitorowych AC(CD)133⁺ lub CD34⁺ izolowanych ze szpiku kostnego i znakowanych białkiem niesyntetyzowanym w organizmie zwierzęcym [np. transfekcja genem markerowym — β -galaktozydazą (β -Gal)] lub komórek zwierzęcia odmiennej płci (różnice chromosomalne w Y jako marker komórek przeszczepionych) drugiego zwierzęcia (przeszczepy allogeniczne). Do badań tych używa się także ludzkich komórek progenitorowych izolowanych ze szpiku, z krwi pępowinowej ludzi, a także z obwodowej krwi żyłnej pacjentów (mają one jednak słabszy potencjał proliferacyjny [21] — przeszczepy ksenogeniczne).

Kalka i wsp. [18] zastosowali model niedokrwienia kończyn dolnych polegający na jednostronnym, odcinkowym wycięciu tętnicy udowej u myszy atymicznych. Wyizolowane komórki progenitorowe (frakcji mononuklearnej krwi obwodowej zdrowych ludzkich ochotników hodowano na podłożu z fibronektyną w obecności czynników wzrostu: VEGF, bFGF, EGF). Po 4 dniach zebrano tylko osiadłe na fibronektynie komórki i określono jako ludzkie EPCs (hEPCs, *human EPCs*) z pozytywną

A further pioneer study on animals has been carried out by Orlic et al. [23]. The progenitor cells (Lin⁻c-kit^{POS}, but not Lin⁻c-kit^{NEG}) isolated from the BM of male mice were applied intramyocardially after acute ischaemia (coronary artery ligation in female mice). The application of progenitor cells resulted in a significant recovery of heart function in 40% of the animals. This was associated with an increase in the number of myocardial, endothelial and smooth muscle cells with the Y chromosome in the ischaemic myocardium. The other animals developed immunologic rejection of the implanted cells (no immunosuppression was applied) [23].

Recently Deb et al. have reported the presence of functional cardiomyocytes with a Y chromosome in human male recipients after female heart transplantation, supporting the hypothesis of cardiomyocyte regeneration by the host stem cell progenitors [24].

Kocher et al. [25] have published a summary of various experimental results giving the background to the clinical studies. These have shown that mononuclear fraction isolated from the patient after bone marrow mobilisation (4 days of G-CSF administration) is not uniform. Such fraction contains CD34⁺/CD117^{Dim} cells, 20–30% strongly expressing VEGF-R2 as well as the proteins characteristic for more mature endothelial cell fraction: Tie-2, eNOS, vWF, E-selectin (CD62E) and ICAM (CD54). Another fraction CD34⁺/CD117^{Bright} with weaker expression of VEGF-R2 (10–15%) was a „true endothelial progenitor fraction” with Tie-2 and AC133⁺, but not eNOS, vWF, E-Selectin, or ICAM expression. The latter cells also demonstrated the transcription factor GATA-2 and GATA-3 expression characteristic of haemangioblast. These were much more pro-proliferative in a culture on fibronectin-coated dishes and showed a great capacity for tubule formation.

These results indicate the possibility of BM mobilisation in the „endothelial direction”. Human Dil-labelled CD34⁺ cells (2×10^6) containing both the cell fractions described above were injected intravenously into rats with experimental myocardial ischaemia (LAD ligation). The infiltration of the ischaemic area with these cells was found after 48 hours. No healthy myocardium infiltration was observed in the rats operated on, nor was any myocardial infiltration observed in healthy (sham operated) rats. Two weeks after intervention, the ischaemic areas demonstrated enriched capillary density (visualised by immunocytochemistry for factor VIII) with a smaller amount of connective tissue. The newly formed capillaries showed 30% of fluorescent cells (Dil-positive) of human origin. Dil-positive cells (of human origin) were located in the centre of the myocardial ischaemic area, whereas rat cells formed mainly border

ekspresją powierzchniową antygenów: hCD62E, hCD51/61, hCD86, hCD83, hCD68, hCD31, hCD34. Myszy podzielono na 3 grupy. Zwierzętom z pierwszej grupy wstrzyknięto hEPCs do krwi komór serca (dostęp do żyły u myszy może być trudny), z drugiej — komórki śródbłonna mikrowaskularnego spłotu podskórnego (HMVEC, *human microvascular ECs*), uważane w przeciwieństwie do ludzkich komórek śródbłonna izolowanego z żyły pępowinowej (HUVEC, *human umbilical veinendothelial cells*) za bardziej zróżnicowane (dojrzałe). Mysiom z trzeciej grupy — kontrolnej — podano samo medium komórkowe, w którym były zawieszone hEPCs. Zmiany perfuzji mięśni kończyn dolnych monitorowano przy użyciu metody obrazowania perfuzji dopplerem laserowym (LDPI, *laser doppler perfusion imaging*). Po upływie 28 dni najlepszą regenerację unaczynienia stwierdzono u zwierząt otrzymujących hEPCs (10 z 17 zwierząt — regeneracja całkowita), o wiele (2/3) mniejszą — u otrzymujących HMVEC (1 z 12 zwierząt — regeneracja całkowita), bardzo niewiele różniącą się od słabej, spontanicznej regeneracji perfuzji (unaczynienia) tkanki i zaawansowania nekrozy niedokrwionej łąki w grupie kontrolnej.

Inne badania dotyczyły krążenia mózgowego [22]. Po wykonaniu embolizacji tętnicy środkowej mózgu (MCA, *middle cerebral artery*) pozyskano szpik kostny od transgenicznym myszy z ekspresją β -Gal. Po wstrzyknięciu dożylnym znakowanych komórek monitorowano wyniki czynnościowe (przepływ tkankowy) za pomocą LDPI, natomiast pochodzenie komórek oznaczano przy użyciu mikroskopii konfokalnej (LSCM, *laser scanning confocal microscopy*), wykorzystując techniki immunohistochemii. Zauważono wbudowywanie się komórek pozyskanych ze szpiku myszy transgenicznym w *plexus choroideus* komór mózgowych.

Innymi pionierskimi badaniami przeprowadzonymi na modelu zwierzęcym były badania Orlica i wsp. [23]. Wykazali oni, że podanie do mięśnia komór serca z ostrym niedokrwieniem (podwiązanie tętnicy wieńcowej u samic myszy) komórek progenitorowych (Lin⁻c-kit^{POS}, ale nie Lin⁻c-kit^{NEG}) wyizolowanych ze szpiku myszysamców spowodowało u 40% osobników regenerację funkcji mięśnia sercowego ze wzrostem liczby komórek miokardium, śródbłonna i komórek mięśni gładkich ściany naczyń, w których stwierdzono obecność chromosomu Y (czyli od dawcy) w niedokrwionym obszarze miokardium. U pozostałych rozwinęły się objawy odrzucenia zniszczenia tych komórek w procesie immunologicznym (zwierzęta te nie były poddane immunosupresji) [23].

W niedawno opublikowanej pracy Deb i wsp. potwierdzono w materiale ludzkim obecność funkcjonal-

zone capillaries. The myocardium demonstrated the better contractility and left ventricle ejection fraction (LVEF) even 15 weeks after the procedure. It was more physiological in appearance and showed less apoptosis of ischaemic cardiomyocytes. Early angiogenesis inhibited fibrosis and remodelling of the ischaemic tissue. No signs of angiogenesis or inhibition of fibrotic remodelling were found in animals injected with more matured cells (CD34⁺/CD117^{Dim}), although these were concentrated in the ischaemic area.

These studies show that G-CSF-dependent BM induction results in a peripheral occurrence of CD34⁺/CD117^{Bright}GATA-2^{High} cells – the endothelial progenitors, which protects the myocardium against apoptosis and remodelling. Interestingly, GATA-2 regulates expression of endothelial preproendothelin-1, the precursor of endothelin. The latter is a potent vasoconstrictor but also a pro-proliferatory agent for the vascular smooth muscle cells.

It has also been demonstrated that human progenitor cells, isolated from the cord blood and administered to the ischaemic muscle, possess pro-angiogenic properties in the hind-limb ischaemia model in nude rats with diminished immunologic response [21].

Clinical studies

The available pioneering studies that have been published either describe the appearance of EPCs in the various clinical conditions, such as the blood number of EPCs in certain pathology and its possible regulation, or report on the preliminary therapeutic use of EPCs in the treatment of myocardial infarction, coronary artery disease, or peripheral arterial occlusive disease [9]. EPCs used for therapy are injected mainly into the ischaemic area or into the arteries supplying the ischaemic region [26]. In the first clinical studies the intracoronary injection of bone marrow-harvested endothelial cells into a patient with myocardial infarction was been performed [27].

Shintani et al. [28] have monitored the level of CD34⁺ cells in patients after myocardial infarction (16 patients) or with atypical chest pain without signs of ischaemia (8 patients). A higher increase of CD34 positive mononuclear cells (MNCs CD34⁺) was observed on day 7 after the infarction followed by a subsequent gradual decrease. Serum VEGF and bFGF levels were elevated correspondingly. A positive correlation between MNC CD34⁺ concentration and serum VEGF levels was shown. This may correspond to previous studies on the use of angiogenic growth factors in the therapy of ischaemic tissue. After discovery of the VEGF role in vasculo-/angiogenesis trials were conducted on VEGF gene transfer into the cells of ischaemic tissues to obtain a local elevation of VEGF, resulting in the acceleration of angiogenesis [11, 29, 30].

nych kardiomiocytów z chromosomem Y w sercu zmarłych mężczyzn, biorców serca pochodzącego od dawcy — kobiety [24].

Praca zbiorcza dotycząca wyników prac eksperymentalnych, stanowiących podstawy do pierwszych badań klinicznych, to publikacja Kochera i wsp. [25]. Wykazali oni, że frakcja komórek jednojądrzastych pobrana od jednego pacjenta z krwi obwodowej po mobilizacji szpiku (4 dni podawania s.c. G-CSF) nie jest frakcją jednorodną. Zawiera ona komórki CD34⁺/CD117^{Dim} posiadające w 20–30% dużą ekspresję VEGF-R2 oraz wykazują ekspresję białek charakterystycznych dla bardziej dojrzałej frakcji komórek śródbłonka: Tie-2, eNOS, vWF, E-selektyny (CD62E) i ICAM (CD54). Natomiast druga frakcja CD34⁺/CD117^{Bright} o słabszej ekspresji VEGF-R2 (10–15%) stanowiła frakcję komórek „prawdziwie progenitorową dla śródbłonka” o ekspresji Tie-2 i AC133⁺, ale nie eNOS, vWF, E-selektyny czy ICAM, oraz charakterystyczną dla hemangioblastu ekspresję czynników GATA-2 i GATA-3. Te ostatnie komórki wykazywały o wiele większą aktywność proliferacyjną w hodowli na fibronektynie z medium wzbogaconym w czynniki angiogenne, jak i większą zdolność do tworzenia tubul. Te wyniki stanowią dowód na możliwość mobilizacji szpiku w kierunku uwalniania komórek progenitorowych także dla śródbłonka. Dożylnie podanie 2 × 10⁶ ludzkich komórek CD34⁺ wybarwionych fluorescencyjnie Dil, zawierających obie frakcje, spowodowało infiltrację tych komórek po 48 godzinach w obszarze doświadczalnie wywołanego zawału serca (podwiązanie LAD) u szczurów. Nie doszło do infiltracji mięśnia sercowego nieobjętego zawałem ani do infiltracji miokardium zdrowych szczurów kontrolnych (*sham operated*). Dwa tygodnie po zabiegach w obszarze objętym zawałem stwierdzono zwiększoną sieć kapilar (badanych w preparatach immunocytochemicznie obecnością czynnika VIII) ze znacznie mniejszą ilością tkanki łącznej. Kapilary zawierały w 30% komórki fluoryzujące — Dil-pozytywne, czyli pochodzące z izolacji od człowieka. Były one umieszczone bardziej centralne w miejscu niedokrwienia, podczas gdy szczurze komórki śródbłonka tworzyły głównie kapilary obszaru granicznego (*border zone*) niedokrwienia. Mięsień ten wykazywał o wiele lepszą kurczliwość i większą frakcję wyrzutową lewej komory serca (LVEF, *left ventricular ejection fraction*) nawet 15 tygodni po wykonaniu zabiegu. Morfologicznie stwierdzano bardziej fizjologiczny wygląd i mniejszą apoptozę kardiomiocytów tkanki niedokrwionej, a wczesna neoangiogeneza hamowała zwłóknienie łącznotkankowe i bliźnowacenie/przebudowę niedokrwionej tkanki. Natomiast podanie dojrzałszych komórek CD34 (CD34⁺/CD117^{Dim}) powodowało gromadzenie się ich we wczes-

Assmus et al. [31] treated patients after myocardial infarction with an autologous transfer of EPCs separated either by culturing on a fibronectin-coated dish the mononuclear fraction isolated by Ficoll gradient centrifugation from peripheral blood (11 patients) or from bone marrow aspirates (9 patients). Cells incorporated Dil-acLDL, lectin, and demonstrated expression of VEGFR2 (KDR), endoglin (CD105), PECAM (CD31), CD146 (Muc-18, s-endo) and VE-cadherin. Such markers identify, as described above, the endothelial lineage. A statistically significant improvement in ejection fraction was found in the EPC treated patients (51.6 to 60.1%) in relation to a non-randomized matched reference group. Moreover, a significant reduction in end-systolic volume (the marker of heart contractility) (56.1 to 42.5 mL) was found in the EPC treated patients. Studies by Hung-Fat Tse [32] have confirmed the results of the Assmus group. Other authors [33, 34] have also demonstrated the positive effects of stem cell injection into ischaemic regions of the myocardium.

A further study compared the regeneration of the myocardium after EPC or myoblast injection [35]. EPCs were more effective in this study since myoblasts did not produce revascularisation and generated ventricular rhythm disturbances not observed in the EPC-treated group [33].

Tateishi-Yuyama et al. [36] has performed a study on BM-derived progenitor cell treatment efficacy in patients with peripheral atherosclerosis (Fontaine III/IV). The first group (29 patients) received mononuclear fraction of bone marrow origin (intramuscular injection of $2.7-0.1 \times 10^9$ cells to the m. gastrocnemius of the more impaired leg (with ABI < 0.6). The second group (22 patients) was also treated with mononuclear cells of bone marrow origin but, to serve as the control, these received the injections of peripheral blood mononuclear fraction injected to the second leg. A reduction in the symptoms and in the formation of the angiographically proved collateral vessels as well as a significant elevation of ABI and tcpO_2 was observed in the limbs treated with BM mononuclear cells. Moreover MNCsCD34⁺ isolated from the BM demonstrated a high expression of bFGF and VEGF mRNA. Authors have suggested the importance of the local CD34⁺ cell-dependent generation of angiogenic growth factors for the stimulation of angiogenesis.

The risk factors of coronary artery disease such as dyslipidemia and nicotine significantly reduce the number of progenitor cells in the blood [7]. There have been some studies on the role of statins (atorvastatin and simvastatin) in EPC-dependent vasculogenesis [37, 38]. It has been shown that statins regulate the EPC

nych okresach zawału w niedokrwionym miokardium, lecz nie obserwowano indukcji neoangiogenezy ani zahamowania niekorzystnej przebudowy.

Badania te wykazały, że indukcja szpiku G-CSF prowadzi do pojawienia się we krwi obwodowej komórek CD34⁺/CD117^{Bright}GATA-2^{High}, które jako progenitory komórek śródbłonna aktywują neoangiogenezę niedokrwionej tkanki, chroniąc ją przed apoptozą i patologicznym remodelingiem. Interesujący jest fakt, że GATA-2 jest czynnikiem regulującym ekspresję śródbłonkowej preproendoteliny-1 — substancji prekursorowej dla naczyń kurczącej, ale także proliferacyjnej dla komórek ściany naczyń endoteliny.

Także ludzkie komórki progenitorowe, izolowane z krwi pępowinowej, a podane domięśniowo, posiadają zdolność proangiogenną w modelu niedokrwienia kończyny u bezwłosych szczurów o osłabionej odpowiedzi immunologicznej [21].

Pierwsze badania kliniczne

Przeprowadzone dotąd badania kliniczne mają charakter opisowy (np. oznaczanie liczby EPCs w różnych stanach klinicznych [7]) lub obserwacji o wstępnych możliwościach tego typu terapii (oznaczanie bezpieczeństwa zabiegu, zastosowanie EPC w leczeniu zawału serca, choroby niedokrwiennej serca, miażdżycy zarostowej tętnic obwodowych) [9]. W próbach terapii EPCs najczęściej wstrzykuje się domięśniowo, bezpośrednio do miejsca niedokrwionego, oraz dotętniczo po wprowadzeniu cewnika do tętnicy zaopatrującej niedokrwiony obszar [26]. Pierwsze próby kliniczne wiążą się właśnie z dowieńcowym podawaniem komórek mononuklearnych szpiku w zawale serca [27].

Shintani i wsp. [28] monitorowali stężenie komórek CD34⁺ u chorych po zawale serca (16 pacjentów) oraz u osób z bólem zamostkowym niezwiązanym z niedokrwieniem serca (8 pacjentów). Największy wzrost komórek mononuklearnych CD34⁺ (MNCs CD34⁺) obserwowano około 7 dnia po zawale, po czym ich liczba spadała. W tych badaniach wykazano wprost proporcjonalną zależność między liczbą MNCs CD34⁺ a stężeniem VEGF w surowicy. Koresponduje to z wcześniejszymi badaniami na temat zastosowania angiogennych czynników wzrostu (VEGF, bFGF) w terapii niedokrwienia [11, 29, 30].

Assmus i wsp. [31] w badaniu TOPCARE-AMI (*Transplantation of Progenitor cells and regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction*) stosowali u pacjentów (n = 11) po zawale serca autologiczny przeszczep EPCs hodowanych z krwi obwodowej na fibronektynie przez 3 dni. Drugiej grupie chorych podano koncentrat nieselekcyjowanych komórek uzyskanych ze szpiku kostne-

function which influences Rho GTPase (increasing the eNOS mRNA level) and Akt kinase (activating eNOS). During the statin therapy Vasa et al. observed not only a decrease in cholesterol concentration but also a significant increase in EPC numbers in the peripheral blood. A significant acceleration of angiogenesis by statins has been described in mice models [39].

Low molecular weight heparins and even penta- or disaccharides are able to mobilise the progenitor cells into circulation. This may result from the release of growth factors (VEGF or SDF-1, *stromal-derived growth factor-1*) attached to the extracellular space glycosaminoglycans [40].

Most authors declare EPC application to be a relatively safe method of therapy in arterial disease and no significant adverse effects have been reported. It could be introduced as a method of microcirculation support in patients with coronary and peripheral artery disease who are excluded from interventional/surgical revascularisation. However, it should be stressed that some side-effects may be considered. Progenitor cells may home in on inflammatory as well as ischaemic areas. Their possible role in the formation of neointima [41, 42] and tumor angiogenesis has been suggested [43].

Although we already know quite a lot and the preliminary supplementation study results are promising (there are some currently on-going multicentre studies on EPC use), further studies with randomisation and a larger group of patients are necessary, as well as the use of objective methods for quantification measurement of perfusion and neovascularisation. Long-term evaluation of EPC treatment in terms of efficacy and safety are needed. An important problem requiring a solution is the source of endothelial progenitors and the possibility of *ex vivo* expansion to the most effective stage (i.e. when not completely differentiated) for autologous transplant-supporting angiogenesis

A further issue is the possible future application of progenitor cells as the vector in future gene therapy. The lack of an appropriate safe vector for humans is the one of the main restrictions on progress in gene therapy.

Supported by the following EU research programs: QLRT-2001-00183 (DLARFID) and QLK3-CT-2002-30307 (STEC).

References

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411): 143–144.

go metodą wirowania w gradiencie gęstości (9 pacjentów). Komórki te charakteryzował wychwyt Dil-acLDL, lektyny, ekspresja VEGF-R2, endogliny (CD105), PECAM (CD31, *platelet endothelial cell adhesion molecule*), CD146 (Muc-18, s-endo) oraz VE-kadheryny, co jak wspomniano, charakteryzuje linię śródbłonkową. Zauważono istotny statystycznie wzrost frakcji wyrzutowej serca w obu grupach. Wynosił on 51,6–60,1% w porównaniu z brakiem istotnego statystycznie wzrostu w grupie kontrolnej, której nie podawano EPCs. W grupie leczonych komórkami szpiku uzyskano znaczny spadek objętości późnoskurczowej (z 56,1 do 42,5 ml), co jest dobrym wskaźnikiem poprawy kurczliwości serca. Podobne badania przeprowadzone przez Hung-Fat Tse [32] potwierdziły wyniki Assmusa. Inni autorzy [33, 34] także obserwowali poprawę funkcji serca po wszczepieniu komórek progenitorowych do niedokrwionego serca. Badano porównawczo regenerację mięśnia sercowego po wszczepieniu EPCs oraz mioblastów [35]. Terapia nie niosła za sobą ryzyka w przeciwieństwie do podawania mioblastów, których wszczepienie w miejsce zawału wiązało się z częstym uaktywnieniem dodatkowych ośrodków bodźcowych [33].

Tateishi-Yuyama i wsp. [36] podjęli próbę zastosowania komórek progenitorowych szpiku w miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych (stadium Fontaine'a III/IV). Pierwsza grupa (29 pacjentów) otrzymała do kończyny bardziej upośledzonej (ABI < 0,6) mononuklearną frakcję komórek szpiku podaną domięśniowo (mięsień brzuchaty łydki — $2,7-0,7 \times 10^9$ komórek), podczas gdy w drugiej, kontrolnej, podano sól fizjologiczną. Chorym z drugiej grupy (22 osoby) podobnie podano mononuklearne komórki szpiku, natomiast do mięśnia drugiej kończyny (kontrolnej) wszczepiano w podobnej objętości liczbie izolowane autologiczne komórki mononuklearne z krwi obwodowej. U tych pacjentów nastąpiła znaczna poprawa w postaci ustąpienia objawów subiektywnych, u niektórych w angiografii wykazano również wytworzenie krążenia obocznego. Znaczny wzrost wartości wskaźnika kostka-ramię (ABI, *ankle/brachial index*) oraz tcpO₂ obserwowano tylko w kończynach leczonych komórkami szpikowymi. W komórkach MNCs CD34⁺ szpiku stwierdzono znaczną ekspresję mRNA i syntezę białka dla czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, *basic fibroblast growth factor*) oraz VEGF. Autorzy doszukują się korzystnego efektu terapeutycznego przy podawaniu szpikowych komórek CD34⁺ w znacznej generacji proangiogennej, lecz generowanych miejscowo, endogennie czynników wzrostu.

Czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca, takie jak dyslipidemia czy nikotynizm, znacznie obniżają liczbę komórek progenitorowych we krwi [7]. Niektóre leki mogą wywierać korzystne działanie u osób z cho-

2. Verfaillie CM (2002) Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*, 12 (11): 502–508.
3. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S (2003) VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34⁺ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*, 101 (1): 168–172.
4. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95 (10): 3106–3112.
5. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*, 107 (7): 1024–1032.
6. Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D (2002) Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res*, 11 (2): 207–214.
7. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89 (1): E1–E7.
8. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360 (9331): 427–435.
9. Inaba S, Egashira K, Komori K (2002) Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 360 (9350): 2083.
10. Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, Imaizumi T (2003) Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest*, 83 (1): 65–73.
11. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravelleaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T (2000) Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*, 86 (12): 1198–1202.
12. Moons L (2003) Angiogenesis in cardiovascular development. Abstract Book of the Second International Meeting of Angiogenesis. Leiden 23.
13. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T (2001) Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther*, 8 (3): 181–189.
14. Funatsu T, Sawa Y, Ohtake S, Takahashi T, Matsumiya G, Matsuura N, Nakamura T, Matsuda H (2002) Therapeutic angiogenesis in the ischemic canine heart induced by myocardial injection of naked complementary DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124 (6): 1099–1105.
15. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*, 64 (2): 326–333.

robą niedokrwienną przez liczby komórek progenitorowych w krwi obwodowej [37, 38]. Wykazano, że statyny (atorwastatyna i simwastatyna) zwiększają aktywność chemotaktyczną (czyli proangiogenną) komórek progenitorowych. Ma to się odbywać poprzez wpływ na Rho GTPazę (reguluje stężenie mRNA eNOS) oraz na kinazę Akt (aktywuje eNOS). W trakcie terapii statynami zauważono nie tylko spadek stężenia cholesterolu, lecz także zobrazowano znaczny wzrost liczby EPCs we krwi obwodowej u ludzi [7, 37]. Na modelach zwierzęcych obserwowano znaczną akcelerację angiogenezy po statynach [39].

Również heparyny drobnocząsteczkowe, a nawet penta- czy disacharydy posiadają zdolność mobilizacji komórek progenitorowych. Może to się wiązać z uwalnianiem związanych z glikozaminoglikanami tkanek czynników wzrostu (VEGF) czy SDF-1 (*stromal-derived factor-1*) [40].

Większość badaczy podkreśla, że podawanie EPCs wydaje się relatywnie bezpieczną metodą terapeutyczną w chorobie niedokrwiennej serca i kończyn. Jest ona polecana w szczególności pacjentom, u których nie można przeprowadzić zabiegów inwazyjnych.

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że mogą pojawiać się też pewne zastrzeżenia, choć jak na razie teoretyczne, co do możliwego efektu niepożądanego terapii. Komórki progenitorowe umiejscawiają się w ogniskach niedokrwienych, zmienionych zapalnie. Pojawiły się sugestie dotyczące możliwego udziału w tworzeniu neointymy [41, 42] i neoangiogenezie guzów [43].

Mimo że wiele już wiadomo i prowadzi się, ze względu na obiecujące, szybkie wyniki suplementacji, pierwsze wieloośrodkowe badania z zastosowaniem EPCs, to wskazane są dalsze badania z randomizacją oraz zastosowaniem obiektywnych metod oceny perfuzji i neowaskularyzacji. Konieczna wydaje się również ocena długoterminowa leczenia EPCs w perspektywie efektu terapeutycznego oraz możliwych powikłań. Dużym problemem wymagającym odpowiedniego opracowania jest źródło komórek progenitorowych śródłonka, a także możliwość ich namnażania *ex vivo* do etapu komórek najbardziej efektywnych dla angiogenezy (czyli nie w pełni zróżnicowanych) do autoprzeszczepu.

Innym zagadnieniem jest możliwe zastosowanie w przyszłości komórek progenitorowych jako tzw. „wektora” w terapii genowej. Brak takiego wektora jest bowiem jedną z głównych przyczyn zahamowania w rozwoju tej drogi terapii [45].

Praca powstała w ramach realizacji następujących programów badawczych EU: QLRT-2001-00183 (DLARFID) QLK3-CT-2002-30307 (STEC).

16. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 (5302): 964–967.
17. Larrivee B, Lane DR, Pollet I, Olive PL, Humphries RK, Karsan A (2003) VEGFR-2 induces survival of hematopoietic progenitor cells. *J Biol Chem*, 30 [epub ahead of print].
18. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000) Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (7): 3422–3427.
19. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 41 (7): 1078–1083.
20. Nakatani M, Takeyama Y, Shibata M, Yorozuya M, Suzuki H, Koba S, Katagiri T (2003) Mechanisms of restenosis after coronary intervention. Difference between plain old balloon angioplasty and stenting. *Cardiovasc Pathol*, 12 (1): 40–48.
21. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 105 (11): 1527–1536.
22. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M (2002) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*, 90 (3): 284–288.
23. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 938: 221–229.
24. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM (2003) Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*, 107 (9): 1247–1249.
25. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7 (4): 430–436.
26. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. (2003) Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 107 (3): 461–468.
27. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2001) Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr*, 126 (34–35): 932–938.
28. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103 (23): 2776–2779.
29. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T (2002) Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105 (6): 732–738.
30. Dembinska-Kiec A, Dulak J, Partyka L, Huk I, Mailnski T (1997) VEGF-nitric oxide reciprocal regulation. *Nat Med*, 3 (11): 1177.
31. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106 (24): 3009–3017.
32. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 361 (9351): 47–49.
33. Chiu RC (2003) Adult stem cell therapy for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*, 3 (2): 215–225.
34. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD (2002) Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Ann Hematol*, 81 (suppl 2): S21–S25.
35. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 361 (9351): 45–46.
36. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360 (9331): 427–435.
37. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T (2001) HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 108 (3): 399–405.
38. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 103 (24): 2885–2890.
39. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. (2002) Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 105 (25): 3017–3024.
40. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T (2002) Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood*, 99 (1): 44–51.
41. Han CI, Campbell GR, Campbell JH (2001) Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res*, 38 (2): 113–119.
42. Religa P, Bojakowski K, Maksymowicz M, et al. (2002) Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation*, 74 (9): 1310–1315.
43. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Toi M (2002) Lack of CD34 positive stromal cells within angiomyomas (vascular leiomyomas). *J Clin Pathol*, 55 (5): 395–396.
44. Soeki T, Tamura Y, Shinohara H, Sakabe K, Onose Y, Fukuda N (2002) Serum hepatocyte growth factor predicts ventricular remodeling following myocardial infarction. *Circ J*, 66 (11): 1003–1007.
45. Zucali JR, Ciccarone T, Kelley V, Park J, Johnson CM, Merz A (2002) Transduction of umbilical cord blood CD34⁺ NOD/SCID-repopulating cells by simian foamy virus type I (SFV-I) vector. *Virology*, 302 (2): 229–235.