

CUKRZYCA A KOMÓRKI PROGENITOROWE ŚRÓDBŁONKA*

DIABETES AND ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS

Jerzy KOTLINOWSKI¹, Magdalena KOZAKOWSKA¹,
Anna GROCHOT-PRZĘCZEK¹, Barbara KOTLINOWSKA²,
Alicja JÓZKOWICZ¹, Józef DULAK¹

¹Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński oraz ²Zakład Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw
Wewnętrznych i Administracji, Kraków

Streszczenie: Coraz częstsze występowanie cukrzycy typu 2 stanowi wyzwanie zarówno dla lekarzy, jak i naukowców. Mimo wyjaśnienia wielu mechanizmów powodujących pogorszenie funkcjonowania śródbłonna oraz mimo opracowania nowych strategii terapeutycznych, liczne powikłania naczyniowe wciąż prowadzą do przedwczesnej śmierci pacjentów. Wykazano, że podwyższone ryzyko sercowo-naczyniowe związane z cukrzycą koreluje ze spadkiem liczby i upośledzeniem funkcji komórek progenitorowych śródbłonna (EPC). Co więcej, stwierdzono, że hiperglikemia pogarsza działanie EPC zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. EPC biorą udział w tworzeniu i naprawie naczyń krwionośnych przez bezpośrednią inkorporację do uszkodzonych miejsc oraz przez parakrynną stymulację komórek sąsiednich. Wydaje się zatem, że terapia komórkowa z wykorzystaniem EPC może doprowadzić do poprawy stanu zdrowia pacjentów cierpiących z powodu trudno gojących się ran czy owrzodzeń. Z drugiej strony, potrzebne są dodatkowe badania, aby lepiej wyjaśnić potencjalnie negatywne skutki nadmiernej aktywności EPC, np. w retinopatii cukrzycowej.

Słowa kluczowe: cukrzyca, komórki progenitorowe śródbłonna, powikłania cukrzycowe.

Summary: Increasing number of type 2 diabetes patients (T2DM) represents a major health problem both for physicians and scientists. Despite characterization of endothelial dysfunction and application of new therapeutic strategies, numerous vascular complications lead to earlier death of diabetic patients. It was demonstrated that increased cardiovascular risk in diabetes positively correlates with impaired functions

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

of endothelial progenitor cells (EPC). Moreover, hyperglycemia also attenuates their activities *in vitro* and *in vivo*. EPC are able to promote vascular growth and repair vascular injuries, however the exact mechanism of their action is not fully elucidated. They can incorporate into damaged vessels, but growing body of evidence also suggests a paracrine mode of action. Using EPC in cell therapy it may be possible to improve and accelerate healing of chronic wounds and leg ulcers in diabetic patients. However, more studies are needed to fully understand the potential risk of enhanced angiogenesis due to EPC for example in diabetic retinopathy.

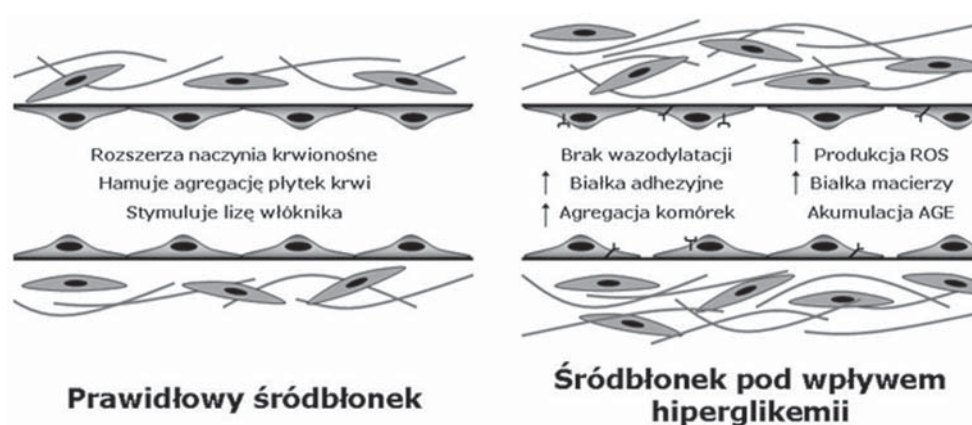
Key words: diabetes, endothelial progenitor cells, diabetic complications.

WSTĘP

Cukrzyca – DM (*diabetes mellitus*) jest określana mianem epidemii XXI wieku. Dane Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że w 2006 roku na świecie chorowało na nią 180 milionów osób, a według prognoz liczba ta podwoi się przed rokiem 2030. Większość chorych (90–95%) cierpi na cukrzycę typu 2 – T2DM (*type 2 diabetes mellitus*), która spowodowana jest insulinoopornością, prowadzącą do zaburzeń we wchłanianiu i metabolizmie glukozy przez komórki mięśniowe, adipocyty i hepatocyty. W pierwszej fazie T2DM, aby zrekompensować gorsze działanie insuliny, organizm zwiększa jej produkcję. Wiąże się to z nadmiernym metabolizmem komórek trzustki i prowadzi stopniowo do ich apoptozy, a następnie do wtórnego, trwałego spadku produkcji hormonu. Zmniejszona wrażliwość tkanek i brak endogennej insuliny powoduje hiperglikemię, która jest bezpośrednią przyczyną uszkodzenia komórek, a w konsekwencji – występowania powikłań cukrzycy.

Podwyższony poziom glukozy we krwi zaburza funkcjonowanie wielu typów komórek, a zwłaszcza komórek śródbłonna – EC (*endothelial cells*). Wiadomo, że w warunkach prawidłowych glukoza jest przekształcana do ATP, a produktem ubocznym tych przemian jest powstawanie niewielkiej ilości reaktywnych form tlenu – ROS (*reactive oxygen species*). W hiperglikemii, oprócz syntezy ATP dochodzi do zwiększonej produkcji ROS i do niespecyficznego glikacji białek – powstawanie AGE (*advanced glycation endproducts*), aktywacji kinazy białkowej C oraz indukcji szlaku polioloowego i heksozoaminowego.

Produkcja ROS i AGE uważana jest za kluczowy czynnik uszkodzający naczynia krwionośne i przyczyniający się do rozwoju mikro- i makroangiopatii, głównych powikłań cukrzycy. Wykazano, że wiązanie AGE z receptorem wywołuje indukcję oksydaz NADPH, wzrost produkcji ROS, a w konsekwencji prowadzi do uszkodzeń w DNA [34, 69]. Stwierdzono również, że wywoływana przez hiperglikemię i ROS apoptoza EC zależy od szlaku NF κ B, c-Jun i aktywacji kaspaz [32, 33]. Upośledzenie funkcji EC w warunkach hiperglikemii wynika również z hamowania szlaku PI3K przez AGE. W prawidłowych warunkach aktywacja PI3K poprawia żywotność EC oraz zwiększa ich zdolność do migracji i produkcji tlenku azotu (NO) przez śródbłonną syntazę NO (eNOS) [19, 59, 74]. W hiperglikemii dochodzi do rozprzęgnięcia eNOS (braku zgodności stechiometrycznej pomiędzy ilością cząsteczek eNOS i NO), czego efektem jest zmniejszenie syntezy NO i nadprodukcja wolnych



RYCINA 1. Prawidłowy śródbłonek naczyń krwionośnych i mechanizmy odpowiedzialne za jego uszkodzenie w hiperglikemii (na podstawie Fadini GP et al. [2005], zmienione)
FIGURE 1. Healthy endothelium in blood vessels and mechanisms responsible for its injury in hyperglycemia (after Fadini GP et al. [2005], modified).

rodników [3]. U chorych na cukrzycę dysfunkcja śródbłonna związana jest ponadto z nasiloną syntezą cytokin prozapalnych, adhezyn i czynników wzrostowych. Prowadzi to do nadmiernej adhezji limfocytów, płytek krwi i monocytów, indukuje reakcję zapalną i może powodować rozwój miażdżycy. Dodatkowym czynnikiem ułatwiającym infiltrację monocytów jest zwiększona przepuszczalność śródbłonna w warunkach hiperglikemii, spowodowana osłabieniem połączeń międzykomórkowych [56]. Wykazano też, że AGE wywołując agregację białek macierzy są przyczyną spadku elastyczności naczyń i hamowania aktywacji metaloproteinaz (ryc. 1) [21, 25, 31, 50].

Wywołane przez hiperglikemię i ROS zmiany w funkcjonowaniu EC oraz zaburzony skład i struktura macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzą do dysfunkcji śródbłonna, zmniejszenia światła naczyń krwionośnych i upośledzenia przepływu krwi. W efekcie, u osób chorych na cukrzycę dochodzi do rozwoju powikłań [61]. Zaburzenia krążenia w połączeniu z neuropatią cukrzycową powodują powstawanie trudno gojących się ran i owrzodzeń u około 10% chorych. Zmiany te u około 1% pacjentów kończą się amputacją kończyny. Z kolei retinopatia – powikłanie cukrzycy związane z występującą lokalnie w siatkówce oka nadmierną angiogenezą – może doprowadzić do utraty wzroku. Epidemia cukrzycy i liczne powikłania z nią związane dotyczą przede wszystkim naczyń krwionośnych, dlatego kluczowym zagadnieniem jest możliwość poprawy ich funkcjonowania [8, 11, 17].

KONDYCJA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH A EPC

Przez wiele lat uważano, że u osób dorosłych regeneracja i tworzenie nowych naczyń krwionośnych zachodzi jedynie w procesie angiogenezy, czyli drogą migracji i różnicowania *in situ* dojrzałych EC. Tworzenie *de novo* naczyń z niezróżnicowanych komórek prekursorowych zarezerwowane było jedynie dla rozwoju

płodowego. Ten powszechnie zaakceptowany pogląd uległ zmianie po odkryciu przez Asaharę i wsp. we krwi dorosłych osób komórek progenitorowych śródbłonka – EPC (*endothelial progenitor cells*) zdolnych do proliferacji, migracji i inkorporowania do istniejących naczyń [5]. Ten sam zespół w kolejnych eksperymentach przeprowadził rekonstytucję szpiku kostnego u napromieniowanych myszy, przeszczepiając im komórki wykazujące ekspresję genu reporterowego *LacZ* pod kontrolą promotorów genów charakterystycznych dla komórek śródbłonka *tie-2* lub *flk-1* (VEGFR-2). Badacze stwierdzili obecność znakowanych komórek w nowopowstałych naczyniach. Co więcej zawał serca, zranienie skóry, czy wzrost nowotworu zwiększał ich liczbę we krwi [35, 62].

Komórki progenitorowe śródbłonka scharakteryzowane przez Asaharę i wsp. wykazywały ekspresję CD34, VEGFR-2, CD31, eNOS i E-selektyny. Badacze wyizolowali EPC z populacji komórek jednojądrzastych, które miały ponadto zdolność do wiązania lektyny, adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej i wchłaniania acetylowanych LDL [5, 35, 39]. Mimo intensywnych badań biologii komórek EPC, ze względu na trudną analizę (brak specyficznych markerów, małą liczbę, brak standaryzacji metod izolacji i hodowli) mechanizm ich działania nie jest całkowicie wyjaśniony. Choć pojawiają się wątpliwości na temat zdolności EPC do tworzenia naczyń krwionośnych *de novo* [23], na podstawie doniesień wielu grup badawczych stwierdzono, że EPC inkorporują zarówno do powstających, jak i uszkodzonych naczyń. Jednak z powodu rozbieżnych wyników (od 0% do 80%) trudno jednoznacznie stwierdzić, jaki procent komórek w nowopowstałych naczyniach stanowią progenitory [38, 64, 66]. Coraz więcej badaczy zwraca też uwagę na parakryny mechanizm działania EPC, które po dotarciu do uszkodzonego naczynia, wydzielając czynniki wzrostowe aktywują zarówno EC, jak i pericyty [7, 13, 27, 65].

Prowaskulogeny potencjał komórek progenitorowych śródbłonka i ich duże znaczenie dla prawidłowej kondycji naczyń krwionośnych nie budzi dziś wątpliwości, mimo trudności z jednoznacznym wyjaśnieniem mechanizmu ich działania. Rola EPC w procesie regeneracji naczyń krwionośnych skłoniła badaczy do analizy ich funkcjonowania u osób chorych na cukrzycę.

CUKRZYCA A FUNKCJONOWANIE EPC

Pacjenci chorzy na cukrzycę 3 czy 4 razy częściej zapadają na choroby układu krążenia oraz cierpią na wiele innych powikłań zarówno ostrych (hipoglikemia, kwasica ketonowa), jak i przewlekłych (choroba wieńcowa, choroba naczyń obwodowych, nefropatia, retinopatia, stopa cukrzycowa). Stwierdzono, że najważniejszą przyczyną tych komplikacji jest dysfunkcja śródbłonka. Co więcej, wydaje się, że nasilenie niekorzystnych zmian w naczyniach wynika również ze zmniejszonej liczby i osłabionego potencjału klonogenego EPC [29, 39, 73].

Jedne z pierwszych doświadczeń badających funkcjonowanie EPC w cukrzycy przeprowadzili Harraz i wsp. w roku 2001. Podawane przez nich ludzkie komórki

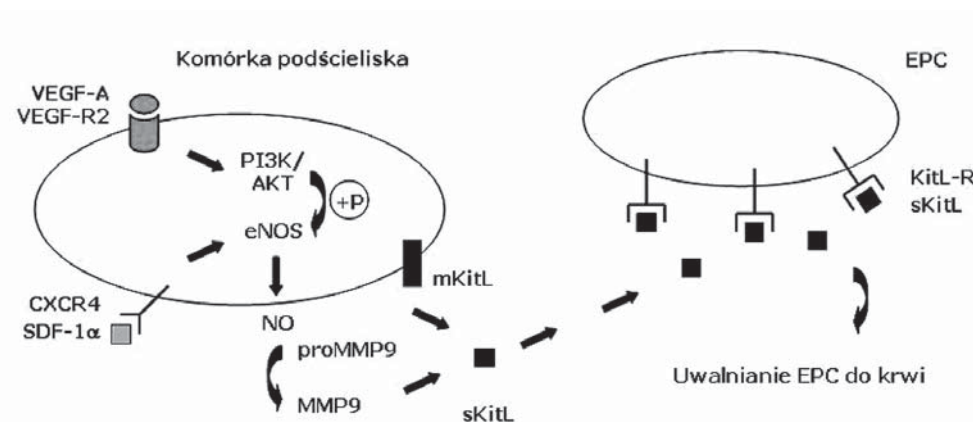
CD34+ (czyli populacja komórek wzbogacona w EPC) przyspieszały regenerację przepływu krwi w mysim modelu niedotlenienia kończyny tylnej. Pozytywny efekt terapii obserwowany był jedynie w przypadku wstrzyknięcia tych komórek myszom cukrzycowym. Natomiast podanie wysortowanej populacji CD34+ myszom zdrowym nie przyniosło pozytywnego skutku, co może sugerować, że endogenne komórki tych zwierząt działały wystarczająco sprawnie [26]. Kolejne eksperymenty przeprowadzone na zwierzętach potwierdziły duży wpływ cukrzycy na funkcjonowanie EPC.

Tamarat i wsp., przeszczepiając jednojądrzaste komórki progenitorowe izolowane ze szpiku, wykazali mniejszy potencjał angiogeny komórek pochodzących od myszy cukrzycowych niż od myszy zdrowych. Komórki te charakteryzowały się również osłabionym różnicowaniem *in vitro*, jak i tworzeniem mniejszej liczby kapilar *in vivo*. Co ciekawe, niekorzystny wpływ cukrzycy na funkcjonowanie EPC został odwrócony po podaniu czynnika wzrostu pochodzenia łożyskowego – PIGF (*placenta growth factor*) [63].

Aby aktywnie włączać się w proces odbudowy zniszczonych naczyń, EPC muszą skutecznie docierać do miejsc zranienia. Stwierdzono, że jednym z efektów hiperglikemii jest spowolnienie migracji i pogorszenie uwalniania EPC ze szpiku kostnego, między innymi na skutek osłabionej odpowiedzi na stymulację czynnikiem pochodzenia stromalnego – SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*). Okazało się, że EPC izolowane od myszy kontrolnych były tak samo wydajnie mobilizowane do uszkodzonych miejsc po podaniu myszom zdrowym i cukrzycowym. Wyniki te sugerują, że krótkotrwała ekspozycja EPC *in vivo* na podwyższone stężenie glukozy nie ma negatywnego wpływu na ich funkcjonowanie [46, 57]. W modelu niedotlenienia/reperfuzji kończyny tylnej wykazano ponadto zmienioną ekspresję SDF-1 i czynnika wzrostu śródbłona naczyń – VEGF (*vascular endothelial growth factor*) u szczurów z cukrzycą. U zwierząt tych, inaczej niż u osobników zdrowych, nie zaobserwowano mobilizacji komórek EPC do krwi i wytworzenia nowych kapilar w tkance mięśniowej (ryc. 2) [16].

Badania *in vitro* udowodniły niekorzystny wpływ hiperglikemii na aktywność EPC. Hodowanie komórek izolowanych z krwi zdrowych osób w warunkach podwyższonego stężenia glukozy obniżało ich liczebność [40, 58]. Podobne wyniki otrzymano dla mysich EPC. Osłabiona proliferacja w hiperglikemii związana była z niższą ekspresją cdk2, cykliny E i PCNA oraz z nasiloną apoptozą [75]. Choć dane na temat indukcji apoptozy EPC przez wysokie stężenia glukozy nie są spójne, jednoznacznie wykazano, że hiperglikemia zmniejsza liczbę komórek i upośledza ich funkcjonowanie [40, 58, 75]. Wydaje się, że starzenie się i osłabiona proliferacja EPC u osób chorych na cukrzycę spowodowana jest nadmierną aktywacją kinazy p38, wynikającą z fosforylacji reszt treoniny 180 i tyrozyny 182. Dochodzi do niej w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, stres oksydacyjny lub stres osmotyczny. Zaburzona jest też aktywność szlaku Akt/p53/p21 [41, 54].

Upośledzenie działania EPC przejawia się słabszą parakrynną stymulacją komórek sąsiednich, ponieważ cukrzycowe EPC charakteryzują się niższą ekspresją eNOS i VEGF [40, 46]. Eksperymenty wykonane u myszy nastrzykniętych streptozotocyną, powodującą martwicę komórek trzustki, pozwoliły ocenić wpływ hiperglikemii na różnicowanie prekursorowych komórek szpiku kostnego w EPC, makrofagi i komórki dendrytyczne. Po



RYCINA 2. Mechanizm mobilizacji EPC ze szpiku kostnego zależny od VEGF-A, SDF-1 oraz osi eNOS/NO/MMP9/KitL (na podstawie Liu ZH i Velazquez OC [2008], zmienione). W odpowiedzi na czynniki stymulujące (VEGF-A, SDF-1) dochodzi do aktywacji syntazy tlenku azotu w komórkach podścieliska szpiku kostnego. Wzrost produkcji NO aktywuje MMP9, która uwalnia czynnik komórek macierzystych (KitL) obecny w błonie komórkowej. Rozpuszczalna wersja KitL (sKitL) po związaniu z receptorem na powierzchni komórek EPC indukuje ich mobilizację

FIGURE 2. Mechanism of EPC mobilization from the bone marrow, dependent on VEGF-A, SDF-1 and eNOS/NO/MMP9/KitL axis (after Liu ZH and Velazquez OC [2008], modified). Stimulatory factors (VEGF-A, SDF-1) activate nitric oxide synthase in bone marrow stromal cells. Increased production of NO activates MMP9, which releases the stem cell factor (KitL) present in the cell membrane. Soluble form of KitL (sKitL) binds to receptor on the surface of EPC and induces their mobilization

raz kolejny okazało się, że ze szpiku myszy z cukrzycą można wyhodować mniej EPC. Stwierdzono również, że uzyskane komórki mają fenotyp prozapalny: produkują więcej IL-12 i silniej aktywują limfocyty T niż komórki kontrolne [48].

Badania osób chorych na cukrzycę potwierdziły niekorzystny wpływ hiperglikemii na liczbę i funkcjonowanie EPC, opisywany w modelach zwierzęcych i w eksperymentach *in vitro*. Wykazano odwrotną korelację pomiędzy poziomem glikowanej hemoglobiny (HbA1c) a liczbą EPC w krwi obwodowej pacjentów z T1DM i T2DM [14, 47, 64]. U chorych na cukrzycę typu 1 wykryto ponad 40% mniej EPC w krwi obwodowej niż u osób zdrowych. Pożywki warunkowane pozyskane z tych komórek słabiej stymulowały ludzkie komórki śródbłonna z żyły pępowinowej – HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) do tworzenia kapilar *in vitro*. Co więcej, osłabiona aktywność cukrzycowych EPC była widoczna również po trwającej 4 dni hodowli w warunkach normoglikemii [47].

O kluczowej roli hiperglikemii w pogorszeniu funkcjonowania EPC świadczą prace, w których stwierdzono, że liczba EPC w krwi osób zdrowych i z cukrzycą zdiagnozowaną po raz pierwszy (HbA1c < 7,5%) nie różni się, a lepsza kontrola poziomu glukozy u pacjentów zwiększa potencjał jednojądrzastych komórek krwi obwodowej do różnicowania *in vitro* w kierunku EPC [42, 51].

Komórki EPC izolowane z krwi osób chorych na cukrzycę wykazują obniżoną o prawie 50% proliferację i znacznie mniej wydajnie inkorporują do kapilar. W przeciwieństwie do prawidłowej adhezji do kolagenu, fibrynogenu i wyciszonych EC, ich zdolność do wiązania się z aktywowanym śródbłonkiem jest zaburzona [64]. Tymczasem wiązanie EPC z

uszkodzonym śródbłonkiem ma kluczowe znaczenie, gdyż warunkuje możliwość naprawy naczyń. Podwyższone stężenie glukozy (15 mM) *in vitro* blokuje te interakcje [55].

Trudno dziś jednoznacznie stwierdzić, czy występowanie mikro- i makroangiopatii w cukrzycy spowodowane jest zaburzeniem funkcji EPC, czy też na skutek rozwoju powikłań, między innymi choroby naczyń obwodowych lub stopy cukrzycowej dochodzi do zmian w biologii EPC. Analizy kliniczne dokumentują jedynie, że osoby chore na cukrzycę współistniejącą z powikłaniami mają mniej EPC w krwi obwodowej, a stopień zaawansowania choroby naczyń obwodowych jest odwrotnie proporcjonalny do liczby tych komórek [14].

EPC A POWIKŁANIA CUKRZYCOWE

Gojenie ran

Obniżony przepływ krwi w naczyniach obwodowych i osłabiona odnowa naczyń krwionośnych u chorych na cukrzycę są najważniejszymi czynnikami prowadzącymi do powstawania trudno gojących się ran, czyli takich, które goją się dłużej niż 8 tygodni, nie goją się wcale lub pojawiają się powtórnie [72]. Skrajnym przypadkiem są owrzodzenia stóp występujące u kilku procent osób cierpiących na cukrzycę, a które z powodu braku skutecznej terapii u około 1% chorych kończą się amputacją [8, 71]. Prawidłowy proces gojenia trwa 2–3 tygodnie i prowadzi do całkowitej regeneracji. W cukrzycy jego przedłużenie lub całkowite zahamowanie wynika z rozwijającej się neuropatii i waskulopatii lub może być spowodowane zakażeniami [9, 53].

Zaangażowanie EPC w gojenie ran jest procesem wieloetapowym, obejmującym przekaz sygnału do szpiku, uwalnianie EPC do krwi, migrację komórek do miejsca zranienia i aktywne włączanie się w proces odbudowy. Zakłócenie któregośkolwiek z tych etapów może opóźnić lub całkowicie zaburzyć regenerację tkanek. Wykazano, że opóźnione uwalnianie komórek progenitorowych ze szpiku kostnego w cukrzycy spowodowane jest przede wszystkim zmienioną aktywnością eNOS [14, 20, 47]. Tlenek azotu produkowany przez ten enzym aktywuje syntetyzowaną w formie proenzymu metaloproteinazę MMP9. Aktywna postać MMP9 jest konieczna do uwolnienia z błony komórkowej czynnika komórek macierzystych – SCF lub KitL (*stem cell factor* lub *kit ligand*), który po połączeniu ze swoim receptorem na powierzchni EPC indukuje ich mobilizację (ryc. 2) [1, 28, 36].

Jedną z najważniejszych chemokin odpowiedzialnych za uwalnianie EPC ze szpiku jest SDF-1. EPC migrują zgodnie z gradientem tego białka, którego stężenie w prawidłowych warunkach powinno być najwyższe w miejscu uszkodzenia naczyń. Stwierdzono jednak niższą ekspresję SDF-1 w zranionej tkance u myszy cukrzycowych. Dopiero odtworzenie naturalnie występującego gradientu przez lokalne podanie rekombinowanego białka indukowało mobilizację EPC i przyspieszało gojenie ran [20]. Podobne wyniki otrzymano analizując trzy modele myszy cukrzycowych (db/db, NOD i myszy nastrzyknięte streptozotocyną). We wszystkich modelach zaobserwowano spowolnienie gojenia ran, wynikające najprawdopodobniej z obecności mniejszej liczby

EPC w miejscu zranienia. Tak jak w przypadku SDF-1, miejscowe podanie płytkowego czynnika wzrostu-B – PDGF-B (*platelet-derived growth factor-B*) przyspieszało gojenie i stymulowało powstawanie nowych naczyń [37]. Wyniki te sugerują, że stymulacja komórek EPC może pomóc w terapii przewlekłych ran oraz owrzodzeń.

Retinopatia cukrzycowa

Terapia komórkowa z wykorzystaniem EPC może być bardzo obiecująca, ale wiadomo również o potencjalnych zagrożeniach tej metody. EPC mogą bowiem przyczyniać się do unaczyniania nowotworów czy rozwoju retinopatii cukrzycowej [4]. U osób chorych na cukrzycę na skutek lokalnego niedotlenienia w siatkówce dochodzi do nadmiernego rozrostu niefunkcjonalnych naczyń krwionośnych, które zaburzają jej strukturę [10]. Konsekwencją tych zmian u pacjentów z nieleczoną retinopatią może być nawet utrata wzroku. Komórki progenitorowe biorą udział w neowaskularyzacji, ale molekularny mechanizm odpowiedzialny za nadmierny wzrost kapilar nie jest do końca wyjaśniony [12, 24, 45]. Butler i wsp. wykazali wysokie stężenie SDF-1 w cieple szklistym osób chorych na cukrzycę i stwierdzili, że blokowanie jego aktywności *in vivo* zapobiega rozwojowi schorzenia [10].

Dalsze badania pozwoliły na identyfikację kolejnych białek mobilizujących EPC w retinopatii: czynnika wzrostu hepatocytów – HGF (*hepatocyte growth factor*), PIGF i PDGF [18, 49, 60]. Aiello i wsp. wykazali odmienne stężenie VEGF w różnych tkankach u chorych na cukrzycę: wzrost w płynie wewnątrzgałkowym i spadek w niedotlenionych obszarach poza siatkówką [2]. Niekontrolowany wzrost naczyń krwionośnych w przypadku retinopatii cukrzycowej jest przeciwieństwem upośledzonej neowaskulogenezy zarówno u pacjentów T1DM, jak i T2DM [47, 64]. Jedną z hipotez tłumaczących ten paradoks zakłada, że w odpowiedzi na lokalną mobilizację EPC w niedotlenionej siatkówce dochodzi do wzrostu kapilar, ale ich dalsze funkcjonowanie jest upośledzone. Hipoteza ta została sformułowana na podstawie wyników, które otrzymali Asnaghi i wsp. analizując EPC krążące we krwi obwodowej osób zdrowych, cierpiących na T1DM bez powikłań oraz T1DM współistniejącą z retinopatią cukrzycową. Potencjał klonogeny EPC u pacjentów z cukrzycą i powikłaniami był większy niż u pozostałych grup. Autorzy potwierdzili również osłabienie potencjału klonogeny cukrzycowych EPC (od pacjentów z T1DM bez retinopatii) w porównaniu z komórkami osób zdrowych [6]. Natomiast Fadini i wsp. analizując liczbę komórek CD34+/KDR+ w krwi obwodowej pacjentów T2DM stwierdzili, że występowanie powikłań w tej chorobie ma decydujący wpływ na EPC. W porównaniu do osób bez komplikacji, pacjenci z cukrzycą i z chorobą naczyń obwodowych mieli mniej EPC, zaś współistnienie cukrzycy i retinopatii było związane ze zwiększoną liczbą tych komórek [15].

NADZIEJA DLA ZDROWYCH I CHORYCH

Podejmowane są liczne próby poprawy właściwości komórek progenitorowych śródbłonna i zapobiegania uszkodzeniom wywoływanym przez cukrzycę. Wykazano

między innymi, że nawet jednorazowy wysiłek fizyczny prowadzi do wzrostu liczby EPC we krwi [52]. Już 30 minut biegania, podobnie jak długoterminowa, regularna gimnastyka, stymuluje uwalnianie EPC do krwi. Co istotne, ćwiczenia zwiększają liczbę i poprawiają funkcjonowanie komórek zarówno u osób zdrowych, jak i cierpiących na chorobę naczyń wieńcowych [30, 44]. U chorych na cukrzycę wykazano, że związki będące agonistami PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) korzystnie wpływają na biologię EPC. Wzrost aktywności PPAR γ , czynnika transkrypcyjnego z nadrodziny receptorów jądrowych, zaangażowanego w regulację metabolizmu glukozy, zwiększał liczbę EPC we krwi oraz poprawiał ich właściwości *in vitro*. Pioglitazon lub rosiglitazon, leki działające przez aktywację PPAR γ , poprawiały zdolność EPC do migracji, proliferacji i adhezji zarówno u myszy, jak i u pacjentów z cukrzycą [22, 51, 67, 68]. U chorych na cukrzycę typu 2 leczonych rosiglitazonem, korzystne efekty utrzymywały się nawet przez 9 tygodni [51]. Podobne wyniki otrzymano badając osoby z normalną tolerancją glukozy, ale cierpiące na chorobę naczyń wieńcowych [70]. Co więcej, lepsza kontrola glikemii u osób chorych na cukrzycę poprawiała także różnicowanie komórek szpiku kostnego do EPC [42, 67].

Zmniejszona liczba i upośledzenie funkcji komórek progenitorowych śródbłonna u osób chorych na cukrzycę może być jednym z czynników prowadzących do zwiększenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych oraz powstawania mikro- i makroangiopatii. Wiadomo już, że stosowanie leków regulujących poziom glukozy poprawia funkcjonowanie EPC, jednak niezbędne są dalsze badania mające na celu lepsze poznanie biologii tych komórek, tak aby w przyszłości można było skutecznie wykorzystać ich prowaskulogenne właściwości w praktyce klinicznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AICHER A, HEESCHEN C, MILDNER-RIHM C, URBICH C, IHLING C, TECHNAU-IHLING K, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; **9**: 1370–1376.
- [2] AIELLO LP, WONG JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 2000; **77**: S113–119.
- [3] ALP NJ, CHANNON KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **2**: 413–420.
- [4] ASAHARA T, KAWAMOTO A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; **287**: C572–359.
- [5] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964–967.
- [6] ASNAGHI V, LATTANZIO R, MAZZOLARI G, PASTORE MR, RAMONIA, MAESTRONIA, RUGGIERI D, LUZI L, BRANCATO R, ZERBINI G. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia* 2006; **49**: 11090–1111.
- [7] BARCELOS LS, DUPLAA C, KRANKEL N, GRAIANI G, INVERNICI G, KATARE R, SIRAGUSA M, MELONI M, CAMPESII I, MONICA M, SIMMA, CAMPAGNOLO P, MANGIALARDI G, STEVANATO L, ALESSANDRI G, EMANUELI C, MADEDDU P. Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res* 2009; **104**: 1095–1102.

- [8] BARTUS CL, MARGOLIS DJ. Reducing the incidence of foot ulceration and amputation in diabetes. *Curr Diabetes Rep* 2004; **4**: 413–418.
- [9] BAUM CL, ARPEY CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; **31**: 674–686.
- [10] BUTLER JM, GUTHRIE SM, KOC M, AFZALA, CABALLERO S, BROOKS HL, MAMES RN, SEGAL MS, GRANT MB, SCOTT EW. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest* 2005; **115**: 86–93.
- [11] CHATURVEDI N. The burden of diabetes and its complications: trends and implications for intervention. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; **76**: S3–S12.
- [12] CSAKY KG, BAFFI JZ, BYRNES GA, WOLFE JD, HILMER SC, FLIPPIN J, COUSINS SW. Recruitment of marrow-derived endothelial cells to experimental choroidal neovascularization by local expression of vascular endothelial growth factor. *Exp Eye Res* 2004; **78**: 1107–1116.
- [13] DI SANTO S, YANG Z, WYLER VON BALLMOOS M, VOELZMANN J, DIEHM N, BAUMGARTNER I, KALKA C. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: *in vitro* generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 2009; **4**: e5643.
- [14] FADINI GP, MIORIN M, FACCO M, BONAMICO S, BAESSO I, GREGO F, MENEGOLO M, DE KREUTZENBERG SV, TIENGO A, AGOSTINI C, AVOGARO A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**: 1449–1457.
- [15] FADINI GP, SARTORE S, BAESSO I, LENZI M, AGOSTINI C, TIENGO A, AVOGARO A. Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox. *Diabetes Care* 2006; **29**: 714–716.
- [16] FADINI GP, SARTORE S, SCHIAVON M, ALBIERO M, BAESSO I, CABRELLE A, AGOSTINI C, AVOGARO A. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia* 2006; **49**: 3075–3084.
- [17] FONG DS, AIELLO L, GARDNER TW, KING GL, BLANKENSHIP G, CAVALLERANO JD, FERRIS FL 3rd, KLEIN R, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2003; **26**: S99–S102.
- [18] FREYBERGER H, BRÖCKER M, YAKUT H, HAMMER J, EFFERT R, SCHIFFERDECKER E, SCHATZ H, DERWAHL M. Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; **108**: 106–109.
- [19] FULTON D, GRATTON JP, McCABE TJ, FONTANA J, FUJIO Y, WALSH K, FRANKE TF, PAPAPE-TROPOULOS A, SESSA WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; **399**: 597–601.
- [20] GALLAGHER KA, LIU ZJ, XIAO M, CHEN H, GOLDSTEIN LJ, BUERK DG, NEDEAU A, THOM SR, VELAZQUEZ OC. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1249–1259.
- [21] GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; **90**: 251–262.
- [22] GENSCHEC, CLEVER YP, WERNER C, HANHOUN M, BÖHM M, LAUFS U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neovascularization and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2007; **192**: 67–74.
- [23] GÖTHERT JR, GUSTIN SE, VAN EEKELEN JA, SCHMIDT U, HALL MA, JANE SM, GREEN AR, GÖTTGENS B, IZON DJ, BEGLEY CG. Genetically tagging endothelial cells *in vivo*: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 2004; **104**: 1769–1777.
- [24] GRANT MB, MAY WS, CABALLERO S, BROWN GA, GUTHRIE SM, MAMES RN, BYRNE BJ, VAUGHT T, SPOERRI PE, PECK AB, SCOTT EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; **8**: 607–612.
- [25] HAMMES HP, WEISS A, HESS S, ARAKIN, HORIUCHI S, BROWNLEE M, PREISSNER KT. Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties *in vitro* and in the diabetic retina. *Lab Invest* 1996; **75**: 325–338.
- [26] HARRAZ M, JIAO C, HANLON HD, HARTLEY RS, SCHATTEMAN GC. CD34+ blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 2001; **19**: 304–312.
- [27] HE T, PETERSON TE, KATUSIC ZS. Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H968–672.
- [28] HEISSIG B, HATTORI K, DIAS S, FRIEDRICH M, FERRIS B, HACKETT NR, CRYSTAL RG, BESMER P, LYDEN D, MOORE MA, WERB Z, RAFFI S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; **109**: 625–637.

- [29] HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWI W MA, QUYYUMI AA, FINKEL T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; **348**: 593–600.
- [30] HOETZER GL, VAN GUILDER GP, IRMIGER HM, KEITH RS, STAUFFER BL, DeSOUZA CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 847–852.
- [31] HOWARD EW, BENTON R, AHERN-MOORE J, TOMASEK JJ. Cellular contraction of collagen lattices is inhibited by nonenzymatic glycation. *Exp Cell Res* 1996; **228**: 132–137.
- [32] HO FM, LIN WW, CHEN BC, CHAO CM, YANG CR, LIN LY, LAI CC, LIU SH, LIAU CS. High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cell Signal* 2006; **18**: 391–399.
- [33] HO FM, LIU SH, LIAU CS, HUANG PJ, LIN-SHIAU SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000; **101**: 2618–2624.
- [34] INOBUCHI T, LI P, UMEDA F, YU HY, KAKIMOTO M, IMAMURA M, AOKI T, ETOH T, HASHIMOTO T, NARUSE M, SANO H, UTSUMI H, NAWATA H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; **49**: 1939–1945.
- [35] ISNER JM, ASAHARA T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1231–1236.
- [36] KAMINSKI A, MA N, DONNDORF P, LINDENBLATT N, FELDMEIER G, ONG LL, FURLANI D, SKRABAL CA, LIEBOLD A, VOLLMAR B, STEINHOFF G. Endothelial NOS is required for SDF-1-alpha/CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit+ bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2008; **88**: 58–69.
- [37] KESWANI SG, KATZ AB, LIM FY, ZOLTICK P, RADU A, ALAEE D, HERLYN M, CROMBLEHOLME TM. Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen* 2004; **12**: 497–504.
- [38] KOPP HG, RAMOS CA, RAFII S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 2006; **13**: 175–181.
- [39] KRAWCZYK A, IZDEBSKA M, GRZANKAA. Wpływ hiperglikemii na funkcje endotelialnych komórek progenitorowych. *Pol Merkur Lekarski* 2009 **26**(153): 245–247.
- [40] KRÄNKEL N, ADAMS V, LINKE A, GIELEN S, ERBS S, LENK K, SCHULER G, HAMBRECHT R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 698–703.
- [41] KUKI S, IMANISHI T, KOBAYASHI K, MATSUO Y, OBANA M, AKASAKA T. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circ J* 2006; **70**: 1076–1081.
- [42] KUSUYAMA T, OMURA T, NISHIYA D, ENOMOTO S, MATSUMOTO R, TAKEUCHI K, YOSHIKAWA J, YOSHIYAMA M. Effects of treatment for *diabetes mellitus* on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci* 2006; **102**: 96–102.
- [43] LAUFS U, URHAUSEN A, WERNER N, SCHARHAG J, HEITZ A, KISSNER G, BÖHM M, KINDERMANN W, NICKENIG G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; **12**: 407–414.
- [44] LAUFS U, WERNER N, LINK A, ENDRES M, WASSMANN S, JÜRGENS K, MICHE E, BÖHM M, NICKENIG G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; **109**: 220–226.
- [45] LEE IG, CHAE SL, KIM JC. Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye* 2006; **20**: 546–552.
- [46] II M, TAKENAKA H, ASAI J, IBUSUKI K, MIZUKAMI Y, MARUYAMA K, YOON YS, WECKER A, LUEDEMANN C, EATON E, SILVER M, THORNE T, LOSORDO DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006; **98**: 697–704.
- [47] LOOMANS CJ, DE KONING EJ, STAAL FJ, ROOKMAAER MB, VERSEYDEN C, DE BOER HC, VERHAAR MC, BRAAM B, RABELINK TJ, VAN ZONNEVELD AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type I diabetes. *Diabetes* 2004; **53**: 195–199.

- [48] LOOMANS CJ, VAN HAPEREN R, DUIJS JM, VERSEYDEN C, DE CROM R, LEENEN PJ, DREXHAGE HA, DE BOER HC, DE KONING EJ, RABELINK TJ, STAAL FJ, VAN ZONNEVELD AJ. Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol Med* 2009; **15**: 152–159.
- [49] MITAMURA Y, TASHIMO A, NAKAMURA Y, TAGAWA H, OHTSUKA K, MIZUE Y, NISHIHARA J. Vitreous levels of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2002; **25**(12): 2352.
- [50] NEWBY AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006; **69**: 614–624.
- [51] PISTROSCH F, HERBRIG K, OELSCHLAEGEL U, RICHTER S, PASSAUER J, FISCHER S, GROSS P. PPAR γ -agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* 2005; **183**: 163–167.
- [52] REHMAN J, LI J, PARVATHANENI L, KARLSSON G, PANCHAL VR, TEMM CJ, MAHENTHIRAN J, MARCH KL. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**: 2314–2318.
- [53] REIBER GE, VILEIKYTE L, BOYKO EJ, DEL AGUILA M, SMITH DG, LAVERY LA, BOULTON AJ. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care* 1999; **22**: 157–162.
- [54] ROSSO A, BALSAMO A, GAMBINO R, DENTELLI P, FALCIONI R, CASSADER M, PEGORARO L, PAGANO G, BRIZZI MF. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 4339–4347.
- [55] RUIZ E, REDONDO S, GORDILLO-MOSCOSO A, RODRIGUEZ E, REGUILLO F, MARTINEZ-GONZALEZ J, TEJERINA T. EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: effect of pioglitazone. *Front Biosci* 2009; **14**: 3608–3618.
- [56] SCALIA R, GONG Y, BERZINS B, ZHAO LJ, SHARMA K. Hyperglycemia is a major determinant of albumin permeability in diabetic microcirculation: the role of mucalpain. *Diabetes* 2007; **56**: 1842–1849.
- [57] SEGAL MS, SHAH R, AFZALA, PERRAULT CM, CHANG K, SCHULER A, BEEM E, SHAW LC, LI CALZI S, HARRISON JK, TRAN-SON-TAY R, GRANT MB. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 2006; **55**: 102–109.
- [58] SEEGER FH, HAENDELER J, WALTER DH, ROCHWALSKY U, REINHOLD J, URBICH C, RÖSSIG L, CORBAZ A, CHVATCHKO Y, ZEIHNER AM, DIMMELER S. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005; **111**: 1184–1191.
- [59] SESSA WC. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; **100**: 15–18.
- [60] SIMÓ R, LECUBE A, GARCIA-ARUMI J, CARRASCO E, HERNÁNDEZ C. Hepatocyte growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy: its relationship with vascular endothelial growth factor and retinopathy activity. *Diabetes Care* 2004; **27**: 287–288.
- [61] SPINETTI G, KRAENKEL N, EMANUELI C, MADEDDU P. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovasc Res* 2008; **78**: 265–273.
- [62] TAKAHASHI T, KALKAC, MASUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; **5**: 434–438.
- [63] TAMARAT R, SILVESTRE JS, LE RICOUSSE-ROUSSANNE S, BARATEAU V, LECOMTE-RACLET L, CLERGUE M, DURIEZ M, TOBELEM G, LÉVY BI. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 2004; **164**: 457–466.
- [64] TEPPER OM, GALIANO RD, CAPLA JM, KALKAC, GAGNE PJ, JACOBOWITZ GR, LEVINE JP, GURTNER GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; **106**: 2781–2786.
- [65] URBICH C, AICHERA, HEESCHEN C, DERNBACHE, HOFMANN WK, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; **39**: 733–742.

- [66] URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2004; **14**: 318–322.
- [67] WANG CH, CILIBERTIN, LI SH, SZMITKO PE, WEISEL RD, FEDAK PW, AL-OMRAN M, CHERNG WJ, LI RK, STANFORD WL, VERMA S. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation* 2004; **109**: 1392–1400.
- [68] WANG CH, TING MK, VERMA S, KUO LT, YANG NI, HSIEH IC, WANG SY, HUNGA, CHERNG WJ. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 2006; **152**: 1051.e1–8.
- [69] WAUTIER MP, CHAPPEY O, CORDA S, STERN DM, SCHMIDT AM, WAUTIER JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; **280**: E685–E694.
- [70] WERNER C, KAMANI CH, GENSCHE C, BÖHM M, LAUFS U. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance. *Diabetes* 2007; **56**: 2609–2615.
- [71] WU SC, DRIVER VR, WROBEL JS, ARMSTRONG DG. Foot ulcers in the diabetic patient: prevention and treatment. *Vasc Health Risk Manag* 2007; **3**: 65–76.
- [72] WYSOCKI AB. Wound fluids and the pathogenesis of chronic wounds. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 1996; **23**: 283–290.
- [73] VASAM, FICHTLSCHERER S, AICHERA, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; **89**: E1–E7.
- [74] ZHANG R, LUO D, MIAO R, BAI L, GE Q, SESSA WC, MIN W. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene* 2005; **24**: 3954–3963.
- [75] ZHANG W, WANG X, JIN H, QIAN R, ZHANG G, CHEN S, HU R. Effects of high glucose plus high insulin on proliferation and apoptosis of mouse endothelial progenitor cells. *Inflamm Res* 2008; **57**: 571–576.

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