PRACE POGLĄDOWE

Adv Clin Exp Med 2007, **16**, 1, 95–104
ISSN 1230-025X

© Copyright by Silesian Piasts
University of Medicine in Wrocław

JOANNA KLUZ, RAJMUND ADAMIEC

Krążące komórki śródbłonka w zapalnych chorobach naczyń

Circulating endothelial cells in inflammatory vascular disorders

Katedra i Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii AM we Wrocławiu
Kolegium Karkonoskie w Jeleniej Górze

Streszczenie

Jak wykazano, w przebiegu licznych schorzeń o etiologii zapalnej dochodzi do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyń mikrokrążenia. Zidentyfikowanie markerów postępującego uszkodzenia śródbłonka pozostaje problemem o pierwszoplanowym znaczeniu klinicznym dla diagnostyki, monitorowania aktywności i podejmowania decyzji dotyczących sposobu leczenia tych chorób. W warunkach fizjologicznych 99% komórek śródbłonka pozostaje w stanie spoczynku, co znajduje odzwierciedlenie w niskiej podstawowej liczbie krążących komórek śródbłonka (CECs – *circulating endothelial cells*). Wzrost liczby CECs, obserwowany w przebiegu różnych schorzeń, charakteryzujących się uszkodzeniem naczyń, wydaje się odzwierciedlać stopień uszkodzenia śródbłonka i może mieć niekorzystny wpływ na rozwój procesu chorobowego. Przedstawiamy kilka zagadnień związanych z problematyką CECs, w tym ich znaczenie jako nowego, obiecującego, nieinwazyjnego markera uszkodzenia śródbłonka w chorobach naczyń, ze szczególnym uwzględnieniem systemowych zapaleń naczyń i układowej postaci tocznia rumieniowatego. Omówimy ponadto metodę izolacji i ilościowego oznaczania tych komórek oraz ich potencjalne działanie patogenetyczne i właściwości fenotypowe, które poddane dalszej analizie mogą dostarczyć istotnych wskazówek odnośnie do patogenezy niektórych schorzeń naczyniowych (**Adv Clin Exp Med 2007, 16, 1, 95–104**).

Słowa kluczowe: krążące komórki śródbłonka, systemowe zapalenia naczyń, SLE.

Abstract

A variety of inflammatory disorders affect microvascular endothelial cells. From a clinical point of view, establishment of markers of ongoing endothelial injury and damage is of crucial importance to diagnose these disorders, monitor their activity and decide about treatment. In normal conditions, 99% of endothelial cells are quiescent and the physiological turnover of the endothelium is reflected by low basal levels of circulating endothelial cells (CECs). Increased number of these cells in various diseases linked with vascular injury seems to be a sign of severe vascular disturbance and may contribute adversely to the disease process. Several clinical interest of CECs will be discussed, including their relevance as a promising, non-invasive marker of endothelial injury, disease activity, severity or treatment efficacy, as well as their use in diagnostic tests, particularly in systemic vasculitides and systemic lupus erythematosus. In addition we describe the methodology of isolation of these cells, their potential pathophysiologic effects and phenotypic features which, when further assessed, may help to elucidate the pathogenesis of some vascular disorders (**Adv Clin Exp Med 2007, 16, 1, 95–104**).

Key words: circulating endothelial cells, systemic vasculitides, SLE.

Jak wykazano, w przebiegu licznych schorzeń o etiologii zapalnej dochodzi do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyniowego (ECs – *endothelial cells*). Zidentyfikowanie wiarygodnych markerów postępującego uszkodzenia śródbłonka jest problemem o pierwszoplanowym znaczeniu klinicznym. Funkcję śródbłonka można wprawdzie oceniać pośrednio, m.in. przez pomiar stężenia krążących markerów jego dysfunkcji, jak czynnik von Willebranda (vWF) i trombomodulina, czy na podstawie wyniku ultrasonograficznego pomiaru stopnia rozszerzenia tętnicy ramiennej związanego z przepływem krwi (FMD – *flow mediated dilation*), niemniej techniki te są niedoskonałe i w wie-

lu przypadkach nieprecyzyjne [1]. To jest powodem, że jest potrzebna nowa metoda diagnostyczna, która pozwoliłaby na skuteczną ocenę uszkodzenia śródbłonka w chorobach naczyń.

Śródbłonek postrzegano początkowo jako rodzaj „tapety" wyścielającej ścianę naczyń krwionośnych, pozbawionej w zasadzie istotnych właściwości funkcjonalnych. Obecnie wiadomo, że śródbłonek pełni wiele funkcji biologicznych o podstawowym znaczeniu dla utrzymania homeostazy układu sercowo-naczyniowego, a jego dysfunkcja prowadzi do rozwoju wielu chorób układu krążenia. Z czynnościowego punktu widzenia zasadny wydaje się podział śródbłonka na 3 oddzielne kompartymenty: komórki śródbłonka ściany naczyniowej, krążące „złuszczone" komórki śródbłonka, które uległy oddzieleniu od ściany naczynia w wyniku jej uszkodzenia oraz krążące progenitorowe komórki śródbłonka pochodzące ze szpiku kostnego.

Krążące komórki śródbłonka (CECs – *circulating endothelial cells*) zidentyfikowano i opisano po raz pierwszy w latach 70. stosując dość prymitywne metody oceny morfologicznej rozmazów krwi obwodowej. W kolejnych dekadach metody oznaczania CECs ewoluowały poprzez techniki diagnostyki immunocytochemicznej do metod izolacji immunomagnetycznej, jako złotego standardu ilościowej oceny tych komórek [2, 3]. Doniesienia ostatnich lat wskazują, iż alternatywną metodą dla izolacji immunomagnetycznej CECs, o potencjalnie większej czułości, może stać się cytofluorymetria przepływowa [4, 5].

Podwyższoną liczbę CECs, jako wyraz mechanicznego, niedokrwiennego lub nadciśnieniowego uszkodzenia ściany naczyń krwionośnych, opisywano w przebiegu licznych schorzeń układu sercowo-naczyniowego [2, 3, 6–8]. W zaburzeniach charakteryzujących się uszkodzeniem lub nowotworzeniem naczyń podwyższona liczba CECs korelowała ze stopniem uszkodzenia śródbłonka lub (i) ze stopniem neowaskularyzacji. Podobnie wyniki badań, przeprowadzonych u pacjentów z zespołami zapalenia naczyń sugerują, że liczba CECs może być markerem aktywności choroby, przydatny w monitorowaniu jego przebiegu i określeniu ryzyka wystąpienia nawrotu [2, 4, 9–18]. W grupie chorób infekcyjnych wysokie poziomy CECs obserwowano w patologiach, w których śródbłonek był docelowym miejscem działania patogenów, w tym w riketsjozie [19], cytomegalii [20] i we wstrząsie septycznym [21]. Podwyższoną liczbę CECs opisywano również u pacjentów z zaburzeniami immunologicznymi (zakrzepowa plamica małopłytkowa, układowy toczeń rumieniowaty, choroba Behçeta, choroba Kawasaki) [10, 13, 15, 22] oraz u chorych z rozsianym procesem nowotworowym [5] i poddanych transplantacji nerek [18, 23]. U pacjentów ze stwierdzonym SLE, ANCA-dodatnim zapaleniem naczyń, anemią sierpowatokrwinkową, chorobą Behçeta, ostrymi zespołami wieńcowymi i pacjentów po zabiegu allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych stężenie CECs wzrastało w ostrej fazie choroby, będąc czynnikiem predykcyjnym jej ciężkości i końcowego wyniku [2, 3, 6, 12, 15]. W odróżnieniu od chorych z klinicznie aktywnym schorzeniem, liczba CECs u chorych pozostających w remisji była nieznacznie podwyższona. Podobnie w toku skutecznego leczenia immunosupresyjnego chorób autoimmunologicznych obserwowano znamienne obniżenie stężenia CECs we krwi obwodowej.

Krążące „złuszczone" komórki śródbłonka

W świetle aktualnej wiedzy, dojrzałe „złuszczone" komórki śródbłonka, oddzielające się od błony podstawnej naczyń i trafiające do krwi obwodowej, uważa się za wykładnik dokonanego uszkodzenia ściany naczyniowej [4, 24, 25]. Mechanizmy oddzielania się ECs w stanach fizjologicznych i patologicznych są różne i słabo poznane. Wydaje się, że mogą one obejmować apoptozę ECs, proteolizę białek macierzy podśródbłonkowej, a podczas schorzeń zapalnych również bezpośredni atak neutrofilowy zależny od dopełniacza oraz uszkodzenie za pośrednictwem cytokin i proteaz [26]. Interakcje ECs z sąsiednimi komórkami oraz ich właściwe zakotwiczenie do macierzy zewnątrzkomórkowej są warunkiem przeżycia tych komórek, dlatego znaczącą rolę w procesie „złuszczania" ECs może odgrywać ich defektywna adhezja międzykomórkowa i do macierzy zewnątrzkomórkowej. Rozważa się również brak równowagi między czynnikami promującymi a hamującymi angiogenezę, a także mechaniczne i polekowe uszkodzenie śródbłonka, np. w wyniku stosowania inhibitorów kalcyneuryny, takich jak cyklosporyna A [11].

Patogenetyczna rola krążących komórek śródbłonka

Kolejnym zagadnieniem związanym z problematyką CECs jest ich potencjalna patogenność. Czy CECs mają zdolność indukowania odpowiedzi zapalnej? Jak dotąd nie udokumentowano w sposób przekonywający, by wspomniane ko-

mórki pełniły określoną rolę biologiczną, jednak w piśmiennictwie spotyka się doniesienia sugerujące, że mogą one być istotnym czynnikiem w patogenezie zapalnych chorób naczyń. Np. Holmén i wsp. [27] wykazali, że CECs pochodzące od pacjentów z aktywnym ziarniniakowym zapaleniem naczyń typu Wegenera wydzielają wiele chemokin aktywujących neutrofile (IL-8, ENA-78, MIP-1α i GRO-α), wytwarzają indukowalną formę syntazy tlenku azotu (iNOS), a także przez upośledzenie funkcji naprawczych komórek progenitorowych śródbłonka mogą przyczyniać się do rozwoju uszkodzenia ściany naczyniowej.

Analiza fenotypowa CECs wydaje się przydatna nie tylko w określaniu stanu czynnościowego tych komórek, ale również w ocenie ich potencjalnego działania patogenetycznego. Ekspresja czynnika tkankowego (TF – *tissue factor*) stwierdzana na powierzchni CECs pochodzących od pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi i anemią sierpowatokrwinkową [2, 7] sugeruje, iż komórki te mogą pośredniczyć w aktywacji kaskady krzepnięcia zależnej od TF. Co więcej, zdecydowana większość CECs izolowanych z krwi chorych na anemię sierpowatokrwinkową wykazywała ekspresję receptorów adhezyjnych dla leukocytów (ICAM-1, VCAM-1 i E-selektyny), przemawiającą za tym, iż śródbłonek ściany naczyniowej, stanowiący źródło wspomnianych komórek, był zmieniony zapalnie [2].

Istotnym problemem pozostaje rozpoznanie obszaru naczyniowego, z którego wywodzą się CECs wykrywane w przebiegu poszczególnych jednostek chorobowych. Uważa się, że znakowanie CECs na obecność antygenu powierzchniowego CD36 może być testem pozwalającym określić, czy pochodzą one z naczyń mikro- czy makrokrążenia. Ekspresja CD36 na powierzchni CECs izolowanych od pacjentów chorych na anemię sierpowatokrwinkową [2] i choroby nowotworowe [5] wskazywała na drobne naczynia jako zasadnicze źródło tych komórek, podczas gdy brak ekspresji wspomnianego antygenu na CECs pochodzących od pacjentów z zawałem mięśnia serca i dławicą niestabilną miał dowodzić, iż oddzielały się one z naczyń makrokrążenia [7]. Niemniej, należałoby przeprowadzić dalsze badania mające na celu identyfikację specyficznych tkankowo markerów śródbłonkowych, pozwalających na precyzyjne określenie anatomicznego umiejscowienia uszkodzenia śródbłonka.

Pod względem fenotypowym CECs mogą wykazywać istotne różnice, w zależności od rodzaju schorzenia podstawowego [4]. Warstwy względnie nietkniętych komórek śródbłonka izolowano m.in. z krwi pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi, podczas gdy poważnie uszkodzone nekrotyczne komórki śródbłonka, ich mniejsze cząsteczki i fragmenty błon komórkowych wykrywano w przebiegu chorób zapalnych, takich jak *vasculitis* i riketsjoza [19].

Wykazano, że krążące nekrotyczne komórki śródbłonka uwalniają aktywne biologicznie substancje, za pośrednictwem których mogą przypuszczalnie modyfikować czynność pozostałych komórek. Przykładem takiej substancji jest białko HMGB1 (*high mobility group 1*), wiążące się z receptorem dla zaawansowanych produktów końcowych glikacji (RAGE – *receptor for advanced glycation end products*) i odgrywające rolę silnego mediatora zapalenia [28]. Łańcuch podobnych, wtórnych reakcji mogą również wyzwalać inne substancje uwalniane z komórek nekrotycznych, takie jak cytochromy, DNA czy białka szoku termicznego, dostarczające sygnału dla dojrzewania komórek dendrytycznych. Udowodniono ponadto, że internalizacja materiału nekrotycznego przez makrofagi, odbywająca się przy udziale fosfatydyloseryny (markera powierzchniowego komórek nekrotycznych), prowadzi do ich szeroko pojętej aktywacji [29].

Możliwe, że nekrotyczne szczątki śródbłonka, stanowiąc źródło czynników prozapalnych, mogą w podobny sposób pobudzać zdrowe komórki śródbłonka, a także krążące leukocyty. Wstępne dane z badań nad ludzkimi komórkami śródbłonka, eksponowanymi na działanie nekrotycznego materiału śródbłonkowego, wskazują, że taka ekspozycja zwiększa wytwarzanie przez nie IL-6 [14].

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się również tzw. mikrocząsteczkom śródbłonka. Cząsteczki te są oddzielonymi od komórek macierzystych fragmentami cytoplazmy, mającymi otoczkę zbudowaną z fosfolipidów błonowych. Zdolność do wytwarzania takich cząsteczek nie jest jednak cechą swoistą śródbłonka, lecz charakteryzuje również inne typy komórek, w tym leukocyty i płytki krwi. Uważa się, że obecność mikrocząsteczek śródbłonka we krwi krążącej w przebiegu zapalnych chorób naczyń może predysponować do rozwoju powikłań zakrzepowych, na drodze pobudzania uwalniania czynnika tkankowego pochodzenia śródbłonkowego i pobudzenia wytwarzania trombiny [14, 30]. Powstawanie złogów fibryny, charakterystyczne dla zapalnego uszkodzenia naczyń, nasila ekspresję TF w komórkach śródbłonka, podczas gdy sam TF zwrotnie stymuluje syntezę i odkładanie fibryny, co sugeruje jego rolę jako ważnego ogniwa łączącego ciąg procesów zapalnych i zakrzepowych.

Masywna produkcja mikrocząsteczek śródbłonka u chorych z posocznicą meningokokową wydaje się w istotny sposób przyczyniać do patogenezy rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [31],

a ich obecność we krwi pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi sugeruje, że mogą one być zaangażowane w tworzenie zakrzepu tętniczego na powierzchni uszkodzonej blaszki miażdżycowej [32]. Obecność krążących mikrocząsteczek śródbłonka wykazujących ekspresję TF opisywano również u chorych z anemią sierpowatokrwinkową w okresie przełomów hemolitycznych [30].

Należy jednak podkreślić, że w świetle obecnej wiedzy interakcje CECs z innymi typami komórek, m.in. ze zdrowymi komórkami śródbłonka, pozostają wyłącznie w sferze spekulacji, dlatego dalsza analiza potencjalnej patogenetycznej roli CECs może być fascynującym obiektem przyszłych badań.

Komórki progenitorowe śródbłonka

Do czasu, gdy w 1997 r. po raz pierwszy opisano krążące progenitorowe komórki śródbłonka (EPCs – *endothelial progenitor cells*) [33], za główny mechanizm naprawczy uszkodzonej błony wewnętrznej naczyń uważano lokalną migrację i proliferację dojrzałych komórek śródbłonka, sąsiadujących z miejscami uszkodzenia. Obecnie przyjmuje się, że to właśnie pochodzące ze szpiku kostnego EPCs odgrywają podstawową rolę w postnatalnej neowaskularyzacji, ulegając włączeniu do miejsc aktywnej angiogenezy zachodzącej w obszarach uszkodzenia śródbłonka [34].

Jak wykazano, EPCs są rekrutowane do krwi obwodowej w odpowiedzi na działanie wielu bodźców pobudzających angiogenezę, jak czynnik wzrostu komórek śródbłonka VEGF (*vascular endothelial growth factor*), przewlekłe niedokrwienie czy uraz naczynia.

U pacjentów z ANCA-dodatnim zapaleniem naczyń i z chorobą Kawasaki, liczba krążących EPCs wzrasta, jak się wydaje, wtórnie do zwiększenia liczby krążących złuszczonych komórek śródbłonka, będąc prawdopodobną odpowiedzią naprawczą na jego rozległe uszkodzenie [9, 10]. Nie wyklucza się, że osobnicza podatność na różnego typu choroby naczyń może zależeć od upośledzonej zdolności jednostki do mobilizowania EPCs, jednak hipoteza ta wymaga weryfikacji.

Jak dotąd nie udało się zidentyfikować swoistych markerów pozwalających w pewny sposób zróżnicować EPCs i dojrzałe CECs. Brak pełnej zgodności na temat sposobów fenotypowego różnicowania tych komórek wynika z faktu, że mają one wiele wspólnych antygenów powierzchniowych. Krążące CECs wykrywa się najczęściej za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD146, przy czym antygen ten nie jest markerem charakterystycznym wyłącznie dla dojrzałych ECs i może ulegać ekspresji również na powierzchni EPCs [4, 6]. W większości przypadków EPCs definiuje się jako komórki wykazujące koekspresję markerów niedojrzałości (CD133) oraz markerów śródbłonkowych, posiadające zdolność do tworzenia kolonii o wysokim potencjale proliferacyjnym w hodowlach *in vitro* [33, 35]. Innymi markerami, które mogą służyć do identyfikacji EPCs są m.in. Flk-1/KDR (receptor dla VEGF), Tie-2 i CD34 [36–40]. W praktyce do wykrywania EPCs najczęściej stosuje się znakowanie na obecność Flk-1/KDR i CD133, jednak należy podkreślić, że Flk-1/KDR ulega ekspresji również na powierzchni dojrzałych CECs [37, 38].

W ostatnim czasie Holmén i wsp. [27], badający funkcję śródbłonka u chorych z ziarniniakiem Wegenera, zaproponowali nowy sposób fenotypowego różnicowania CECs i EPCs za pomocą znakowania na obecność białka adhezyjnego VAP-1 (*vascular adhesion protein*) i łańcucha A związanego z głównym kompleksem zgodności tkankowej klasy I MICA (MHC *class-I related chain A*), cząsteczki te mają ulegać ekspresji wyłącznie na dojrzałych zapalnych CECs.

Izolacja CECs

U zdrowych ludzi liczba CECs w porównaniu z liczebnością innych populacji komórek krwi obwodowej jest bardzo mała i zazwyczaj nie przekracza 5 komórek/ml, dlatego techniki detekcji CECs muszą obejmować kolejno: wychwyt tych rzadkich komórek z krwi pełnej stosując odpowiednio czułą metodę i ich następczą identyfikację za pomocą specyficznego markera śródbłonkowego. W większości opublikowanych badań CECs były izolowane z zastosowaniem metody immunomagnetycznej, za pomocą perełek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałem przeciwśródbłonkowym anty-CD146 [2, 3, 6–15, 18–22, 41].

Z wyjątkiem śladowej ekspresji na powierzchni megakariocytów i komórek niektórych linii nowotworowych, antygen CD146 występuje wyłącznie na powierzchni komórek śródbłonka, co sprawia, że jest uznawany za swoisty marker śródbłonkowy, w tym marker CECs [14]. Uważa się, iż wspomniane białko jest istotnie zaangażowane w procesy kohezji międzykomórkowej i przebudowę cytoszkieletu komórki. W ostatnich latach w piśmiennictwie spotyka się również doniesienia o ekspresji CD146 na powierzchni EPCs [4,6], niemniej dane z poszczególnych badań nie są do końca spójne. Np. ekspresja CD146 na powierzchni EPCs nie została potwierdzona przez Woywodta i wsp. [9, 11, 12, 14, 18, 42], szeroko wykorzystujących metodę immunomagnetyczną

do izolacji CECs. Zdaniem cytowanych autorów, krążące komórki śródbłonka, izolowane przez nich za pomocą metody immunomagnetycznej z zastosowaniem przeciwciała anty-CD146, nie wykazywały ekspresji antygenu CD133, co przeczyło ich progenitorowemu fenotypowi. Podobnie sugestie, że izolacja immunomagnetyczna CECs zależna od CD146 może obejmować populację pericytów nie znalazły uzasadnienia, ponieważ żadna z komórek pozyskanych w ten sposób nie wykazywała ekspresji klasycznego markera pericytów, α-aktyny mięśni gładkich [14].

Dane co do ilości CECs stwierdzanej u zdrowych ludzi, pochodzące z badań, w których posługiwano się techniką izolacji immunomagnetycznej tych komórek, w większości są zgodne i mówią o liczbie kilku komórek na mililitr krwi obwodowej [2, 3, 6–13, 15, 18–22, 41]. Opisywano natomiast istotne różnice liczebności CECs u pacjentów z odmiennymi jednostkami chorobowymi, co było w głównej mierze uwarunkowane rodzajem podstawowej choroby, jak również mogło stanowić odbicie odrębności metodycznych wykrywania i zliczania tych komórek. Wysoką liczbę CECs obserwowano m.in. u osób z rozległym uszkodzeniem śródbłonka w przebiegu cytomegalii, zakażenia riketsjowego wikłanego zapaleniem naczyń i anemii sierpowatokrwinkowej w okresie przełomów hemolitycznych [2, 19, 20], podczas gdy liczba CECs u chorych ze zlokalizowanym uszkodzeniem śródbłonka, po zabiegu przezskórnej angioplastyki wieńcowej, tylko nieznacznie przewyższała zakres normy stwierdzanej u ludzi zdrowych [3].

W ostatnich latach pewną alternatywą dla techniki izolacji immunomagnetycznej CECs staje się technika cytometrii przepływowej, która ma być metodą charakteryzującą się większą czułością [4]. Donoszono m.in. o wielokrotnie wyższej liczbie CECs wykrywanej techniką cytometrii przepływowej u chorych z czynną chorobą nowotworową i w grupie kontrolnej zdrowych osób, w porównaniu z wynikami uzyskanymi za pomocą techniki izolacji immunomagnetycznej [5]. Istotna rozbieżność danych pochodzących z badań wykorzystujących obie metody, podobnie jak techniczna prostota procedury izolacji immunomagnetycznej CECs, wydaje się przemawiać na korzyść metod standaryzowanych w porównaniu z mało, jak dotąd, sprawdzoną, skomplikowaną i trudno dostępną metodą cytometryczną.

Technika izolacji immunomagnetycznej CECs

CECs, izolowane z żylnej krwi obwodowej z zastosowaniem metody immunomagnetycznej, są odzyskiwane w dwóch frakcjach, wykorzystywanych odpowiednio do oceny ilościowej tych komórek oraz ich następczej charakterystyki fenotypowej. Bardzo istotna jest właściwa technika wenopunkcji, a także odrzucenie kilku pierwszych mililitrów pobranej krwi, tak aby uniknąć jej fałszywego zanieczyszczenia komórkami śródbłonka oddzielonymi na skutek traumatyzacji żyły. Wyizolowane w ten sposób CECs, tworzące rozety z perełkami magnetycznymi, barwi się rutynowo akrydyną i zlicza w mikroskopie fluorescencyjnym. Należy jednak podkreślić, że właściwa ocena mikroskopowa tak przygotowanych preparatów zależy w dużym stopniu od doświadczenia badającej osoby [14].

Za pomocą techniki separacji immunomagnetycznej, poza całymi komórkami śródbłonka o rozmiarach rzędu 10–50–70 μm, izoluje się również większe agregaty komórek (przypuszczalnie zlepione włóknami fibryny) oraz mikrocząsteczki śródbłonka, powstające zapewne na skutek fragmentacji komórek *in situ*, bądź po ich dokonanym oddzieleniu się od błony podstawnej [24].

W miarę coraz szerszego zastosowania metody separacji immunomagnetycznej CECs, pojawiały się określone problemy techniczne, wymagające wprowadzania konkretnych modyfikacji proceduralnych. Problem potencjalnego nieswoistego wiązania leukocytów z perełkami magnetycznymi opłaszczonymi przeciwciałem przeciwśródbłonkowym rozwiązano wprowadzając dodatkowe kryteria identyfikacji wyizolowanych komórek, pozwalające upewnić się co do ich śródbłonkowego pochodzenia. Oceniano m.in. morfologię, liczbę związanych perełek magnetycznych oraz właściwości cytochemiczne komórek, w tym ich dodatnie znakowanie się na obecność antygenów śródbłonkowych, takich jak CD31 (PECAM-1) i czynnik von Willebranda, przy jednoczesnym braku ekspresji antygenów leukocytarnych, głównie CD45. Doskonałym testem umożliwiającym identyfikację ludzkich komórek śródbłonka okazało się wiązanie przez nie lektyny izolowanej z ziaren *Ulex europaeus* (UEA-1), co pozwoliło na opracowanie dość prostego protokołu separacji immunomagnetycznej CECs, z ich następczym znakowaniem za pomocą UEA-1 i oceną mikroskopową [3, 7, 42].

Podstawowe znaczenie dla zmniejszenia stopnia nieswoistego wiązania leukocytów z perełkami magnetycznymi ma również utrzymywanie temperatury reakcji w granicach 4°C, ponadto wiązanie to, w przeciwieństwie do wiązania perełek magnetycznych z komórkami śródbłonka, ma charakter niestabilny, dlatego intensywne przepłukiwanie próbek pozwoliło na jego dalszą redukcję do nieistotnego poziomu. Czułość omawianej metody

i jej kolejnych modyfikacji oceniano stosując kontrolne linie komórkowe ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej, uzyskując wynik rzędu 90% [14].

Krążące komórki śródbłonka a powikłania naczyniowe w przebiegu układowego tocznia rumieniowatego (SLE – *systemic lupus erythematosus*)

W porównaniu z ogólną populacją, pacjenci z SLE są obciążeni większym ryzykiem rozwoju choroby sercowo-naczyniowej. Również śmiertelność związana z przebytym zawałem mięśnia sercowego jest u nich znacząco wyższa niż w dobranej wiekowo grupie kontrolnej [43]. Patomechanizm przyspieszonego rozwoju miażdżycy i jej dynamicznego postępu u tych chorych nie został do końca wyjaśniony. Obecność klasycznych czynników ryzyka procesu miażdżycowego nie tłumaczy częstszego występowania incydentów sercowo-naczyniowych w przebiegu SLE. Okazało się, iż rozpoznanie SLE pozostaje najbardziej obciążającym czynnikiem prognostycznym choroby sercowo-naczyniowej także u tych chorych, u których klasyczne czynniki ryzyka są dobrze kontrolowane [43].

Donoszono o istotnie częstszym występowaniu miażdżycy tętnic szyjnych u chorych na SLE w porównaniu do osób z grupy kontrolnej, zbliżonej pod względem obciążenia pozostałymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej [44]. Niezależnymi czynnikami prognostycznymi obecności blaszek miażdżycowych były tu: długi czas trwania choroby, znaczny stopień dysfunkcji śródbłonka, a także rzadsze stosowanie cyklofosfamidu jako elementu leczenia immunosupresyjnego.

Nie udało się dotychczas opracować przydatnego w codziennej praktyce klinicznej nieinwazyjnego markera, który w wiarygodny sposób pozwoliłby oszacować stopień uszkodzenia śródbłonka w przebiegu SLE. Jednak wyniki kilku badań sugerują, że wspomnianym markerem może stać się liczba CECs, która u chorych z aktywnym SLE jest podwyższona i wydaje się odzwierciedlać rozległe, postępujące uszkodzenie śródbłonka, również wtedy, gdy nie stwierdza się klinicznych objawów zapalenia naczyń.

W badaniu przeprowadzonym przez Clancy'ego i wsp. [13] liczba CECs u chorych z zaostrzeniem SLE była znacząco wyższa, niż w zdrowej grupie kontrolnej i dodatnio korelowała ze stężeniem składowej C3a dopełniacza w surowicy. Komórki te wykazywały ekspresję reaktywnej formy NO – nitrotyrozyny, co dowodziło ich aktywacji *in situ* przed dokonanym oddzieleniem się od ściany naczyniowej. W innym badaniu, u chorych z dodatnim antykoagulantem toczniowym, opisywano powstawanie mikrocząsteczek śródbłonka *in vitro*, o zwiększonej aktywności prozakrzepowej [45].

Potencjalnym markerem aktywności choroby w przebiegu SLE, powiązanym z liczbą CECs, może być również stężenie śródbłonkowego receptora białka C (EPCR – *endothelial protein C receptor*) w surowicy [41]. W warunkach fizjologicznych głównym zadaniem EPCR, należącego do grupy czynników cytoprotekcyjnych komórek śródbłonka, jest przeciwdziałanie rozwojowi zmian zapalno-zakrzepowych naczyń. W stanach chorobowych wspomniane białko ulega rozpadowi lub rozkładowi enzymatycznemu i oddziela się od powierzchni komórek śródbłonka, co predysponuje do wystąpienia skazy zakrzepowej.

W porównaniu z wynikami uzyskanymi w zdrowej grupie kontrolnej, u chorych z SLE obserwowano skłonność do zwiększonego oddzielania się EPCR od powierzchni śródbłonka *in situ*, co mogło być bezpośrednią przyczyną wzrostu stężenia rozpuszczalnej frakcji tego białka w surowicy oraz jego zmniejszonej ekspresji na powierzchni CECs. Wydaje się zatem, że złożona etiopatogeneza powikłań naczyniowych tocznia może być przynajmniej częściowo uwarunkowana nieprawidłowym metabolizmem i dystrybucją EPCR [41].

Aktywacja CECs opisywana u pacjentów z SLE sugeruje, że komórki te, pobudzone przez bodźce immunologiczne, mogą być potencjalnymi uczestnikami procesów zapalnych, zdolnymi, na zasadzie „błędnego koła", indukować postępujące uszkodzenie naczyń krwionośnych [13]. Mechanizmy nieprawidłowej aktywacji i uszkodzenia śródbłonka, zapoczątkowujące powstawanie zmian zapalno-wytwórczych naczyń w przebiegu tocznia, nie zostały dotychczas w pełni scharakteryzowane [26].

Wydaje się, że patologiczną aktywację śródbłonka u chorych na SLE najlepiej ilustruje model uszkodzenia typu Schwartzmana. Ważnym elementem rozwoju tego typu uszkodzenia jest aktywacja składowych C3 i C5 dopełniacza, prowadząca do pobudzenia krążących neutrofilów. Równolegle, pod wpływem wielu bodźców immunologicznych, takich jak:

IL-1, TNF-α, kompleksy immunologiczne wiążące składową C1q dopełniacza, przeciwciała przeciwśródbłonkowe i przeciwciała antyfosfolipidowe, dochodzi do wzrostu ekspresji cząstek ad-

hezyjnych (ICAM-1 i E-selektyny) na powierzchni komórek śródbłonka. Hamowanie wspomnianej ekspresji przez glikokortykosteroidy, udokumentowane w badaniach *in vitro*, może być jednym z mechanizmów skuteczności tych leków w terapii zaostrzeń SLE [13].

Równoczesna aktywacja krążących neutrofilów i komórek śródbłonka *in situ*, podobnie jak wzrost liczby aktywowanych CECs, miałaby sprzyjać powstawaniu agregatów leukocytarnych zamykających światło drobnych naczyń krwionośnych. Zgodnie z przytoczonym modelem teoretycznym, CECs wchodząc w interakcje z miejscami o zmienionej funkcji śródbłonka, ułatwiałyby adhezję pobudzonych neutrofilów i płytek krwi do błony wewnętrznej naczyń. Stanowiąc ponadto, bogate źródło TF, miałyby predysponować do rozwoju powikłań zakrzepowych zwiększających stopień uszkodzenia naczyniowego [13].

Jeden z potencjalnych mechanizmów powstawania CECs w przebiegu SLE obejmuje apoptozę śródbłonka *in situ* [26]. Donoszono również o zwiększonej ekspresji indukowalnej formy syntazy tlenku azotu w komórkach śródbłonka pacjentów z SLE oraz o zależnym od dawki NO hamowaniu adhezji tych komórek do białek macierzy podśródbłonkowej za pośrednictwem receptorów integrynowych [13]. Jedna z hipotez zakłada, że obniżenie aktywności wspomnianych receptorów pod wpływem NO może przyczyniać się do dysfunkcji śródbłonka w przebiegu SLE, w tym do wzmożonego oddzielania się ECs od błony podstawnej naczyń i następczego wzrostu liczby CECs.

Dostępne dane wskazują ponadto, że apoptoza komórek śródbłonka może odgrywać istotną rolę w patogenezie przedwczesnej miażdżycy charakteryzującej chorych na SLE. Wykazano, że nieprawidłowa aktywacja i dysfunkcja śródbłonka w przebiegu miażdżycy może być zapoczątkowana i podtrzymywana przez komórki śródbłonka w apoptozie obecne na powierzchni niestabilnych blaszek miażdżycowych [46]. Wiadomo również, że większość znanych czynników ryzyka miażdżycy pobudza procesy apoptozy, podczas gdy leki przeciwmiażdżycowe i interwencje profilaktyczne wywierają działanie przeciwstawne [26].

Rajagopalan i wsp. [47] informowali o znacząco wyższej liczbie CECs w apoptozie u młodych kobiet z SLE, w porównaniu ze starszą grupą pacjentów z chorobą niedokrwienną serca i zbliżoną wiekowo zdrową grupą kontrolną. Autorzy obserwowali ponadto istotną korelację między liczbą CECs w apoptozie, a podwyższonym stężeniem krążącego TF i stopniem dysfunkcji komórek śródbłonka ocenianym na podstawie ultrasonograficznego pomiaru rozszerzenia tętnicy ramieniowej, związanego z przepływem krwi lub podaniem nitrogliceryny.

Podsumowując, zgromadzone dane sugerują, iż u pacjentów z ustalonym rozpoznaniem SLE liczba CECs we krwi obwodowej może być wiarygodnym i nieinwazyjnym markerem aktywności choroby, a także czynnik pozwalającym przewidzieć rozwój przedwczesnych powikłań miażdżycowych, głównie choroby niedokrwiennej serca. Co więcej, zakładając, iż CECs są poddawane działaniu tych samych bodźców środowiskowych, co śródbłonek ściany naczyniowej, można przypuszczać, że szczegółowa analiza fenotypu i funkcji tych komórek powinna dostarczyć cennych informacji dotyczących patogenezy powikłań naczyniowych w przebiegu SLE.

Krążące komórki śródbłonka w systemowych zapaleniach naczyń

Systemowe zapalenia naczyń są heterogenną grupę zaburzeń, z uszkodzeniem komórek śródbłonka jako dominującą cechą patologiczną. Zasięg kliniczny objawów zależy od rozmiarów i umiejscowienia zajętych naczyń. Jak dotąd nie udało się opracować uniwersalnego testu diagnostycznego, pozwalającego na skuteczne monitorowanie aktywności tych chorób i ułatwiającego tym samym decyzje dotyczące sposobu leczenia. W ostatnich latach coraz więcej danych wskazuje na to, iż markerem umożliwiającym ocenę rozległości i stopnia uszkodzenia śródbłonka w systemowych zapaleniach naczyń może stać się liczba CECs we krwi obwodowej. Wydaje się przy tym, iż oznaczenie liczby CECs winno raczej istotnie rozszerzyć, niż zastąpić konwencjonalne badania dodatkowe służące ocenie aktywności choroby [14].

Woywodt i wsp. [9] analizowali liczbę CECs u chorych z ANCA-dodatnim zapaleniem naczyń. Wysoka liczba tych komórek była wykrywana u pacjentów w ostrej fazie choroby i znacząco zmniejszała się w toku skutecznego leczenia immunosupresyjnego. U chorych pozostających w remisji klinicznej stwierdzano jedynie umiarkowany wzrost liczby CECs, podczas gdy u pacjentów z odmiennymi schorzeniami nefrologicznymi oraz u pacjentów z chorobami infekcyjnymi, służących jako grupy kontrolne, nie obserwowano istotnych zmian w liczebności omawianych komórek. CECs miały cechy nekrozy, co przemawiało za ciężkim przebiegiem procesu zapalnego naczyń oraz wykazywały fenotyp prozakrzepowy związany ze wzmożoną ekspresją czynnika tkankowego [9].

Informacje dotyczące liczby CECs w przebiegu innych postaci systemowego zapalenia naczyń są dość skąpe. Donoszono m.in. o znacząco wyższym poziomie tych komórek u pacjentów z ziarniniakiem Wegenera w aktywnej fazie choroby, w porównaniu z pacjentami pozostającymi w remisji i ze zdrową grupą kontrolną. Podwyższona liczba CECs o fenotypie prozapalnym korelowała tu ze zwiększonym zajęciem narządowym, w tym z obecnością powikłań w postaci kłębuszkowego zapalenia nerek [27].

W nielicznych badaniach analizowano poziom CECs u chorych z zapaleniem dużych naczyń. Przykładowo Dang i wsp. [48] stwierdzali podwyższoną liczbę CECs, korelującą ze zwiększonym stężeniem krążącej endoteliny-1 u pacjentów ze zmianami typu aortoarteriitis.

Z kolei Nakatani i wsp. [10] obserwowali podobne zależności w przebiegu choroby Kawasaki, gdzie pacjenci z wysoką aktywnością choroby i zajęciem tętnic wieńcowych charakteryzowali się znamiennie wyższą liczbą CECs we krwi obwodowej niż osoby ze zdrowej grupy kontrolnej.

Wzrost liczby CECs we krwi obwodowej w przebiegu licznych chorób o etiologii zapalnej wydaje się odzwierciedlać rozległość i stopień uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. W kilku badaniach wykazano, że poziom CECs u chorych z zapaleniem naczyń dodatnio korelował z kliniczną aktywnością choroby i był wyższy w jej ostrej fazie w porównaniu z okresem remisji i rekonwalescencji. Niezależnie od swojej wartości prognostycznej, ocena liczby CECs we krwi obwodowej może być potencjalnym, dodatkowym narzędziem diagnostycznym w sytuacjach, w których wyniki badań konwencjonalnych są niewystarczające.

Wzrost liczby CECs wydaje się przedstawiać nie tylko nowy, obiecujący marker uszkodzenia śródbłonka, lecz również czynnik przewidywania rozwoju przedwczesnych zmian miażdżycowych w przebiegu SLE. Kliniczna przydatność CECs musi jednak zostać zweryfikowana w badaniach na dużej liczbie chorych, z zastosowaniem możliwie prostej technicznie i dostępnej metody.

Analiza fenotypowa CECs i ocena ich potencjalnej patogenności może dostarczyć cennych wskazówek co do mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój zmian zapalnych naczyń w przebiegu schorzeń autoimmunologicznych.

Piśmiennictwo

[1] Chong AY, Blann AD, Lip GYH: Assessment of endothelial damage and dysfunction: observations in relation to heart failure. QJM 2003, 96, 253–267.

[2] Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP: Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. N Engl J Med 1997, 337, 1584–1590.

[3] George F, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J: Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody coupled to magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. Thromb Haemost 1992, 67, 147–153.

[4] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F: Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. Thromb Haemost 2005, 93, 228–235.

[5] Goon PKY, Lip GYH, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD: Circulating Endothelial Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Endothelial Microparticles in Cancer. Neoplasia 2006, 8, 79–88.

[6] Makin AJ, Blann AD, Chung NAY, Silverman SH, Lip GYH: Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells: relationship with von Willebrand factor and tissue factor. Eur Heart J 2004, 25, 371–376.

[7] Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F: Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. Blood 1999, 93, 2951–2958.

[8] McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, Kappas A: Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA_1c. Diabetologia 2005, 48, 345–350.

[9] Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M: Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. Lancet 2003, 361, 206–210.

[10] Nakatani K, Takeshita S, Tsujimoto H, Kawamura Y, Tokutomi T, Sekine I: Circulating endothelial cells in Kawasaki disease. Clin Exp Immunol 2003, 131, 536–540.

[11] Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, Haubitz M: Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. Hypertension 2003, 41, 720–723.

[12] Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, Hertenstein B, Haubitz M: Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. Blood 2004, 103, 3603–3605.

[13] Clancy R, Marder G, Martin V, Belmont HM, Abramson SB, Buyon J: Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: Further evidence for diffuse vasculopathy. Arthritis Rheum 2001, 44, 1203–1208.

[14] Haubitz M, Woywodt A: Circulating endothelial cells and vasculitis. Intern Med 2004, 43, 660–667.
[15] Camoin-Jau L, Chabrol B, Sampol J, Dignat-George F: Circulating endothelial cells in Behçet's disease with cerebral thrombophlebitis. Thromb Haemost 2000, 83, 631–632.
[16] Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, Comina DP, Vitali C, Fantini F, Cortelezzi A: Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2004, 50, 1296–1304.
[17] Mancuso P, Cassi C, Gobbi A, Capillo M, Pruneri G, Martinelli G, Bertolini F: Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. Adv Exp Med Biol 2003, 522, 83–97.
[18] Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, Haller H, Haubitz M: Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. Transplantation 2003, 76, 1–4.**[19] G e - orge F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampol J:** Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury *in vivo* by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. Blood 1993, 82, 2109–2116.
[20] Grefte A, Van Der Giessen M, Van Son W, The H: Circulating cytomegalovirus (CMF)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. J Infect Dis 1993, 167, 270–277.
[21] Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, Baudouin SV: Circulating endothelial cells in patient with septic shock. Am J Respir Crit Care Med 2001, 163, 195–200.
[22] Lefevre P, George F, Durand JM, Sampol J: Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. Thromb Haemost 1993, 69, 522.
[23] Reinders MEJ, Rabelink TJ, Briscoe DM: Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. J Am Soc Nephrol 2006, 17, 932–942. **[24] Woywodt A, Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Haubitz M:** Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. Nephrol Dial Transplant 2002, 17, 1728–1730.
[25] Boos CJ, Lip GYH, Blann AD: Circulating Endothelial Cells in Cardiovascular Disease. JACC 2006, 48, 1538–1547.
[26] Štefanec T: Endothelial apoptosis: the missing link between atherosclerosis and SLE? Blood 2004, 103, 3608–3609.
[27] Holmén C, Elsheikh E, Stenvinkel P, Rashid Qureshi A, Pettersson E, Jalkanen S, Sumitran-Holgersson S: Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in vasculitis patients with kidney involvement. J Am Soc Nephrol 2005, 16, 3110–3120.
[28] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature 2002, 418, 191–195.
[29] Krysko DV, Brouckaert G, Kalai M, Vandenabeele P, D'Herde K: Mechanisms of internalization of apoptotic and necrotic L929 cells by a macrophage cell line studied by electron microscopy. J Morphol 2003, 258, 336–345.
[30] Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP: Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. Blood 2003, 102, 2678–2683.
[31] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood 2000, 95, 930–935.
[32] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Hypertension 2003, 41, 211–217.
[33] 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.
[34] Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW: Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. Circulation 2006, 113, 1605–1614.
[35] Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G: Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells. Circ Res 2006, 99, E74–E83.
[36] Burger PE, Coetzee S, McKeehan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL: Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. Blood 2002, 100, 3527–3535.
[37] Gehling UM, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W: *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 2000, 95, 3106–3112.
[38] Peichev M, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Raffi S: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies population of functional endothelial precursors. Blood 2000, 95, 952–958.
[39] Leor J, Marber M: Endothelial Progenitors: A New Tower of Babel?. JACC 2006, 48, 1588–1590.
[40] Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S: Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. Stroke 2006, 37, 2277–2282.
[41] Sesin CA, Yin X, Esmon CT, Buyon JP, Clancy RM: Shedding of endothelial protein C receptor contributes to vasculopathy and renal injury in lupus: in vivo and in vitro evidence. Kidney International 2005, 68, 110–120.

[42] Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M: An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. Ann Hematol 2004, 83, 491–494.
[43] Gorman C, Isenberg D: Atherosclerosis and lupus. Rheumatology 2004, 43, 943–945.
[44] Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, Crow MK, Schwartz JE, Paget SA, Devereux RB, Salmon JE: Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 2003, 349, 2399–406.
[45] Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F: In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J Clin Invest 1999, 104, 93–102.
[46] Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A: Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. Circulation 2000, 101, 2450–2453.
[47] Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, Chakrabarti A, Richardson BC, Shelden E, McCune WJ, Kaplan MJ: Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. Blood 2004, 103, 3677–3683.
[48] Dang A, Wang B, Li W, Zhang P, Liu G, Zheng D, Ruan Y, Liu L: Plasma endothelin-1 levels and circulating endothelial cells in patients with aortoarteritis. Hypertens Res 2000, 23, 541–544.

Adres do korespondencji:

Joanna Kluz
Klinika Angiologii, Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii AM
ul. Poniatowskiego 2
50-326 Wrocław
tel.: (071) 322 84 34
fax: (071) 322 84 34
e-mail: joannakluz@wp.pl

Conflict of interest: None declared

Praca wpłynęła do Redakcji:
Po recenzji:
Zaakceptowano do druku:

Received:
Revised:
Accepted: