

Received: 2013.01.08  
Accepted: 2013.04.25  
Published: 2013.09.18

## Komórki macierzyste i progenitorowe w biostrukturze ścian naczyń krwionośnych

### Stem and progenitor cells in biostructure of blood vessel walls

Krzysztof Korta<sup>1</sup>, Piotr Kupczyk<sup>2</sup>, Jan Skóra<sup>1</sup>, Artur Pupka<sup>1</sup>, Paweł Zejler<sup>3</sup>, Marcin Hołysz<sup>4</sup>, Mariusz Gajda<sup>5</sup>, Beata Nowakowska<sup>2</sup>, Piotr Barć<sup>1</sup>, Andrzej T. Dorobisz<sup>1</sup>, Tomasz Dawiskiba<sup>1</sup>, Piotr Szyber<sup>1</sup>, Julia Bar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

<sup>2</sup>Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

<sup>3</sup>Oddział Chirurgii Ogólnej i Naczyń z Pododdziałem Urazów Wielonarządowych, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Najświętszej Maryi Panny w Częstochowie

<sup>4</sup>Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

<sup>5</sup>Zakład Histologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

<sup>6</sup>Zakład Patomorfologii i Onkologii Cytologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

### Streszczenie

Rozwój układów naczyniowego i hematopoetycznego w czasie organogenezy odbywa się jednocześnie. Podczas waskulogenezy, część komórek nie podlega procesowi różnicowania się, a pozostaje na bardzo wczesnym etapie „zakotwiczona” w strukturach tkankowych, określanych jako nisze tkankowe komórek macierzystych i progenitorowych. Obecność naczyń krwionośnych w obrębie niszy tkankowych jest cechą charakterystyczną, która pozwala na identyfikację niszy, a także zapewnia jej funkcjonowanie. Wchodzące w skład biostruktury ściany naczyń żylnych i tętniczych *tunica: intima, media* i *adventitia* przez długi czas były definiowane, jako mechaniczne bariery oddzielające światło naczynia od lokalnego środowiska tkankowego. Badania z zakresu biologii naczyń z ostatniego okresu wykazały, że ściana naczynia jest dynamiczną biostrukturą, która zawiera w komórki macierzyste, opisywane jako rezydentne/spoczynkowe macierzyste i progenitorowe komórki ścian naczyń krwionośnych (VW-SC/PC). Różne obszary naczynia zawierają heterogenne populacje komórek WV-SC/PC, a najważniejsze z nich opisywane są jako strefy: okołosróbłnkowa i waskulogenna. Liczne doświadczenia prowadzone *in vitro* i *in vivo* wskazują, że aktywność komórek macierzystych nie jest ograniczona wyłącznie do organogenezy, ale przejawia się w okresie postnatalnym, gdzie odpowiada za homeostazę, przebudowę oraz regenerację ściany naczynia. Uważa się również, że komórki WV-SC/PC mogą być zaangażowane w progresję i rozwój chorób naczyniowych np. tworzenie *neointima*.

W pracy podsumowano wiadomości o fenotypie komórek mezenchymalnych i progenitorowych, rozmieszczeniu i biologicznych właściwościach VW-SC/PC w *tunica: intima, media* i *adventitia*. Uważa się, że w niedalekiej perspektywie nisze z komórkami VW-SC/PC mogą się stać źródłem pozyskiwania komórek macierzystych i progenitorowych do wykorzystania w naczyniowej bioinżynierii tkankowej, jako alternatywa wobec tradycyjnych metod rewasularyzacyjnych.

## Summary

Development of vascular and hematopoietic systems during organogenesis occurs at the same time. During vasculogenesis, a small part of cells does not undergo complete differentiation but stays on this level, “anchored” in tissue structures described as stem cell niches. The presence of blood vessels within tissue stem cell niches is typical and led to identification of niches and ensures that they are functioning. The three-layer biostructure of vessel walls for artery and vein, tunica: intima, media and adventitia, for a long time was defined as a mechanical barrier between vessel light and the local tissue environment. Recent findings from vascular biology studies indicate that vessel walls are dynamic biostructures, which are equipped with stem and progenitor cells, described as vascular wall-resident stem cells/progenitor cells (VW-SC/PC). Distinct zones for vessel wall harbor heterogeneous subpopulations of VW-SC/PC, which are described as “subendothelial or vasculogenic zones”. Recent evidence from in vitro and in vivo studies show that prenatal activity of stem and progenitor cells is not only limited to organogenesis but also exists in postnatal life, where it is responsible for vessel wall homeostasis, remodeling and regeneration. It is believed that VW-SC/PC could be engaged in progression of vascular disorders and development of neointima. We would like to summarize current knowledge about mesenchymal and progenitor stem cell phenotype with special attention to distribution and biological properties of VW-SC/PC in biostructures of intima, media and adventitia niches. It is postulated that in the near future, niches for VW-SC/PC could be a good source of stem and progenitor cells, especially in the context of vessel tissue bioengineering as a new alternative to traditional revascularization therapies.

**Key words:** vessel wall-stem cell/progenitor cell • tissue bioengineering • tunica: intima • media • adventitia • mesenchymal stem cell • stem cell niches • endothelial progenitor cell • pericytes • perivascular cell • angiogenesis • hemangioblast • tissue remodeling • neointima • vein • artery

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1067258>

**Word count:** 5657  
**Tables:** –  
**Figures:** 3  
**References:** 88

**Adres autora:** dr Krzysztof Korta, Katedra i Klinika Chirurgii Naczyniowej, Ogólnej i Transplantacyjnej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław; e-mail: kkorta@poczta.fm

**Wykaz skrótów:** **ACE** – enzym konwertujący angiotensynę (angiotensin converting enzyme); **AGM** – aorta-gonad-mesonephros; **BM-EPC** – komórki progenitorowe śródbłonna naczyniowego ze szpiku kostnego (bone marrow – endothelial progenitor cells); **C-EPC** – cyrkulujące-komórki progenitorowe śródbłonna naczyniowego (circulating endothelial progenitor cells); **CEACAM-1** – molekula adhezji komórkowej antygenu karcynoembrionalnego 1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1); **CFU** – jednostki formowania kolonii (colony forming units); **CXCL** – C-X-C ligand; **CXCR** – C-X-C receptor; **ECM** – macierz międzykomórkowa (extra cellular matrix); **ESC** – embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells); **FACS** – fluorescencyjny sorter komórkowy (fluorescence-activated cell sorting); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **FGFR** – receptor czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor); **GFP** – białko zielonej fluorescencji (green fluorescent protein); **GM-CSF** – granulocytowo-makrofagowy czynnik wzrostu (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **HAEC** – ludzkie komórki śródbłonna aorty (human aortic endothelial cell); **HDA1** – ludzki antygen skóry 1 (human dermal antigen 1); **HLA** – cząsteczki klasy I głównego kompleksu zgodności tkankowej człowieka (human leukocytes antigens class I molecules); **HSC** – komórki macierzyste hematopoezy (hematopoietic stem cells); **HSCT** – transplantacje komórek macierzystych hematopoezy (hematopoietic stem cell transplantation); **HUVEC** – ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (human umbilical vein endothelial cells); **ISCT** – Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (International Society For Cell Therapy); **KGF** – czynniki wzrostu keratynocytów (keratinocyte growth factor); **MPP** – białka metaloproteinaz (metaloproteinase proteins); **MSC** – mezenchymalne komórki

macierzyste (mesenchymal stem cells); **NG2** – neuralny antygen glejowy 2 (neural glial antigen 2); **PDGF-B** – czynnik wzrostu pochodzenia łożyskowego B (placenta-derived growth factor-B); **PVC** – komórki perywaskularne (perivascular cells); **PBMC** – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells); **SCID** – ciężkie złożone niedobory odporności (severe combined immunodeficiency); **SCL** – komórki macierzyste białaczki (stem cell leukemia); **SDF-1** – czynnik wzrostowy pochodzenia stromalnego 1 (stromal derived factor-1); **Shh** – sygnalizacja Shh (donic hedgehog); **SMC** – komórki mięśniówki gładkiej (smooth muscle cells); **α-SMA** – α-aktyna mięśni gładkich (α-smooth muscle actin); **SMP** – komórki progenitorowe mięśni gładkich (smooth muscle progenitors); **UCB** – krew pępowinowa (umbilical cord blood); **UC-EPC** – komórki progenitorowe śródbłonna naczyniowego z krwi pępowinowej (umbilical cord-endothelial progenitor cells); **UEA-1** – aglutynina Ulex Europeus 1 (Ulex Europaeus Agglutinin-1); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor); **VESC** – komórki śródbłonna żyły odpiszczelowej (vessel endothelial saphenous cell); **VTB-E** – naczyniowa bioinżynieria tkankowa (vascular tissue bioengineering); **VW-MPSC** – multipotentjalne komórki macierzyste ściany naczynia (vessel wall-multipotent stem cell); **VW-SC/PC** – komórki macierzyste/komórki progenitorowe ściany naczynia (vessel wall-stem cell/progenitor cell).

## WSTĘP

Organogeneza układu sercowo-naczyniowego i hematopoetycznego przebiega jednocześnie w okresie embrionalnym. W tym samym czasie w obrębie zachodzących przemian można wyodrębnić proces waskulogenezy, czyli formowania się struktur pierwotnego układu naczyniowego z wykorzystaniem komórek o charakterze macierzystym i progenitorowym. Oba układy: naczyniowy i hematopoetyczny w okresie embrionalnym formują się i różnicują ze wspólnej masy komórek pochodzenia mezodermalnego, która nazywana jest hemangioblastem. Definicja hemangioblastu jest niejednoznaczna. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że komórki z ekspresją markerów CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> mogą niewystarczająco odzwierciedlać właściwości hemangioblastu. W opinii niektórych autorów komórki z ekspresją CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> stanowią jedynie boczną populację, której właściwości biologiczne zbliżone są z linią hematopoetyczną [34,36]. Powyższe obserwacje wskazują, że istotne jest prowadzenie badań zmierzających do zdefiniowania markerów, które pozwoliłyby na ustalenie precyzyjnej granicy między linią naczyniową i hematopoetyczną, a także opisanie markerów typowych dla komórek macierzystych i progenitorowych.

W okresie prenatalnym wzmózniona aktywność komórek macierzystych i progenitorowych prowadzi do powstania pierwszych, pierwotnych struktur naczyniowych. W kolejnych etapach procesu ontogenezy dochodzi do różnicowania komórek i nadawania im „funkcjonalnego przeznaczenia”.

W życiu postnatalnym jedynie niewielka liczba komórek w obrębie zróżnicowanych tkanek narządów stanowi tzw. pule spoczynkowych komórek macierzystych lub progenitorowych. Komórki te nie zostały poddane procesowi definitywnego różnicowania się, lecz zostały „zakotwiczone” w środowisku zróżnicowanych tkanek i narządów [29].

Przez długi czas panowało przekonanie, że powstawanie naczyń krwionośnych w okresie prenatalnym i związana z nim aktywność komórek macierzystych są zjawiskami ograniczonymi do etapu organogenezy [74,77,78]. Pierwsze informacje o zdolnościach regeneracyjnych naczyń krwionośnych w życiu postnatalnym pojawiły się w 1988 r., kiedy to Simionescu M. i Simionescu M.L.W. sformułowali hipotezę, według której w obrębie trójwarstwowej biostruktury naczynia krwionośnego: *tunica intima*, *tunica media* i *tunica adventitia* mogą się znajdować populacje komórek o zdolnościach regeneracyjnych [68,69,70]. Obecnie prawdopodobieństwo występowania komórek o potencjale regeneracyjnym w obrębie biostruktury naczynia krwionośnego jest udokumentowane [1,17,24,25,26,34,39,40,49,50,59,79,80,81,83,88]. Zaangażowanie układu krwionośnego w organogenezę [77,78] oraz zdolności regeneracyjne ściany naczynia wywołane np. warunkami hemodynamicznymi wynikającymi z przepływu krwi to tylko niektóre przykłady potwierdzające tezę, że ściana naczynia zarówno w okresie prenatalnym, jak i postnatalnym jest biostrukturą dynamiczną [2]. W obu przypadkach aktywność komórek macierzystych lub progenitorowych jest niezbędnym czynnikiem kształtującym i utrzymującym prawidłową homeostazę ściany naczynia.

Komórki o różnym potencjale i na różnym etapie różnicowania, opisane w biostrukturze naczyń, przedstawiane są jako rezydentne/spoczynkowe macierzyste i progenitorowe komórki ścian naczyń krwionośnych VW-SC/PC [1,14,24,29,39,41,48,54,79,81,83,86,88]. Identyfikacja komórek progenitorowych dla śródbłonnków naczyniowych we krwi obwodowej C-EPC [3], szpiku kostnym BM-EPC, krwi pępowinowej UC-EPC, a także odkrycie klastrów komórek macierzystych i progenitorowych w obrębie zróżnicowanych tkanek i narządów [29,73,79] stanowi wystarczający dowód, że mechanizmy, których aktywność pozwala na rozwój organizmu w okresie życia prenatalnego są również obecne i aktywne w życiu postnatalnym [88]. Komórki VW-SC/PC spoczywające w środowisku nisz komórkowych zróżnicowanych tka-

nek i narządów, w tym również w obrębie biostruktur naczyń żylnych i tętniczych, są najprawdopodobniej pierwszą bezpośrednią formą zaangażowaną w rekonstrukcje tkankowe w przypadku uszkodzenia lub zmian wywołanych chorobą, na bardzo wczesnych etapach jej rozwoju [80,86]. Należy podkreślić, że wyniki badań na modelach *in vitro* i *in vivo* wykazały, że VW-SC/PC mogą być również zaangażowane w rozwój chorób naczyniowych i nowotworowych [11].

Zastosowanie komórek macierzystych i progenitorowych do celów terapeutycznych jest przedmiotem zainteresowania specjalistów z zakresu transplantologii, angiologii i angiochirurgii oraz biologów i biotechnologów, którzy wspólnie podejmują się idei tworzenia tzw. naczyniowej bioinżynierii tkankowej VTB-E. Tradycyjne interwencje chirurgiczne oraz farmakoterapia u części pacjentów ze schorzeniami naczyniowymi zawodzi, zwłaszcza w terapii naczyń o średnicy poniżej 10 mm. Wykorzystanie VTB-E w celu rekonstrukcji naczyniowych może się okazać skutecznym narzędziem terapeutycznym, a także ograniczyć lub wyeliminować powikłania wynikające z tradycyjnego leczenia rewaskularyzacyjnego [46].

### Waskulogeneza

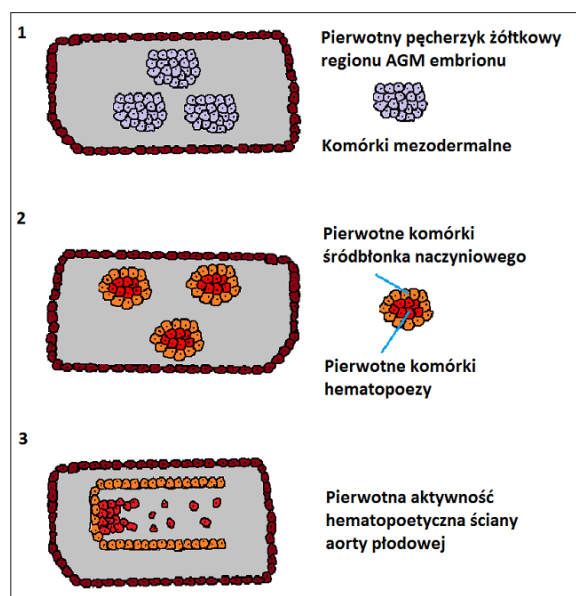
Waskulogeneza, czyli proces formowania się i powstawania pierwotnego układu naczyniowego w wyniku agregacji komórek macierzystych podczas embriogenezy rozpoczyna się tuż po gastrulacji, kiedy pierwotne komórki tylnej i bocznej mezodermy rozpoczynają migrację względem pierwotnego pęcherzyka żółtkowego (yolk sac). Komórki mezodermy agregują i rozpoczynają tworzenie tzw. wysp krwiotwórczych (blood islands). Wyspy krwiotwórcze stanowią jednolitą masę komórek, które w kolejnym etapie podlegają procesowi różnicowania się. Komórki usytuowane w centrum wysp krwiotwórczych stają się zawiązkiem pierwotnego układu hematopoetycznego, natomiast komórki usytuowane obwodowo stają się źródłem komórek układu sercowo-naczyniowego, tzw. angioblastów. Angioblasty w obrębie wysp krwiotwórczych ulegają dalszej reorganizacji, co prowadzi do formowania się pierwszych tzw. prymitywnych splotów naczyniowych (vascular plexus) [13,41,75, 85]. To na poziomie angioblastów i formowania się pierwotnych splotów naczyniowych dochodzi najprawdopodobniej do uruchomienia molekularnych i genetycznych mechanizmów odpowiedzialnych za powstanie trójwarstwowej biostruktury naczyń krwionośnych, a także definiowania śródbłonka żylnego i tętniczego [41,43,49,50].

W kolejnych etapach waskulogenezy migracja i różnicowanie angioblastów z różnych obszarów mezodermy doprowadzają do powstania małych i dużych struktur naczyniowych i limfatycznych, endokardium oraz aorty grzbietowej (dorsal aorta) [41,45,59,84]. Aorta grzbietowa znajduje się w obrębie regionu AGM, który rozwija się z mezodermalnej paraaortycznej otrzewnej trzew-

nej (splanchnopleura). Obszar AGM, w obrębie którego znajduje się aorta płodowa, zawiązki genitaliów oraz pranercze (mesonephros) jest szczególnie interesującym obszarem z punktu widzenia rozwijającego się układu naczyniowego embrionu. Na wczesnym etapie waskulogenezy dochodzi tu do uruchomienia mechanizmów, w wyniku których ściana aorty przejmuje aktywność proliferacyjną stając się źródłem dla pierwotnych komórek hematopoезы [72,85] (ryc.1). Uruchomienie aktywności hematopoetycznej komórek ścian aorty płodowej koreluje z pojawieniem się ekspresji genu *Runx-1*, który najprawdopodobniej inicjuje mechanizm tzw. przejścia śródbłonkowo-hematopoetycznego (endothelial hematopoietic transition) [38,59,75,76,77,78]. Aktywność hematopoetyczna biostruktur aorty płodowej jest przejściowa, gdyż w kolejnych etapach embriogenezy pierwotne komórki hematopoезы migrują i zasiedlają docelowe dla nich nisze w jamach szpikowych. Przejściowa aktywność proliferacyjna ściany aorty potwierdza wspólny i ściśle zależny rozwój układu sercowo-naczyniowego oraz hematopoetycznego, co jest ważnym dowodem na istnienie ich wspólnego przodka, hemangioblastu [13,41,54].

### Hemangioblast

Organogeneza układu sercowo-naczyniowego oraz hematopoetycznego podczas życia embrionalnego stały się inspiracją do poszukiwań wspólnego „przodka”,



**Ryc. 1** Schemat przedstawia masę komórek pochodzenia mezodermalnego (1), z których w wyniku procesów różnicowania się dochodzi do formowania pierwotnego układu sercowo-naczyniowego z komórek usytuowanych obwodowo oraz pierwotnego układu hematopoetycznego z komórek centralnych (2). W dalszym etapie wspólnego rozwoju obu układów dochodzi do zasiedlenia komórek i wystąpienie chwilowej aktywności hematopoetycznej przez ścianę aorty płodowej (3)

bipotencjalnej komórki, tzw. hemangioblastu, który jest początkiem linii komórek hematopoetycznych oraz linii komórek prowadzącej do powstania zróżnicowanych komórek śródbłonnków naczyń [13,41] (ryc.2). Badania eksperymentalne z wykorzystaniem embrionów danio pęgowanego, myszy, a także ludzkich embrionalnych komórek macierzystych ESC dowodzą obecności komórek o bipotencjalnym profilu również w okresie postnatalnym [6,12]. Obecnie wiadomo, że hemangioblast nie jest komórką przejściową, która występuje wyłącznie podczas embriogenezy [12,41,75,85]. Obecność hemangioblastu potwierdzono pod względem fenotypowym i molekularnym w komórkach i tkankach zróżnicowanych. W komórkach ESC wykazano kilka genów i markerów, które uczestniczą w regulacji i różnicowaniu właściwości komórki hemangioblastu: gen *Runx-1*, gen komórki macierzystej białaczki *SCL*, gen mezodermalny T oraz enzym konwertujący angiotensynę ACE/CD143 [54,59,71].

Na podstawie profilu molekularnego i fenotypowania zidentyfikowano populację komórek bipotencjalnych w okresie postnatalnym. Ludzkie komórki o charakterze bipotencjalnym zostały wyizolowane z krwi pępowinowej UCB w oparciu o antygeny CD34<sup>+</sup> oraz CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, z komórek szpiku kostnego z ekspresją CD133<sup>+</sup> oraz mobilizowanych komórek jednojądrzastych krwi obwodowej PBMC o fenotypie CD133<sup>+</sup>. Wszystkie wymienione populacje komórkowe poddane odpowiednim czynnikom różnicującym się do komórek hematopoetycznych i komórek śródbłonnków naczyń [11,55].

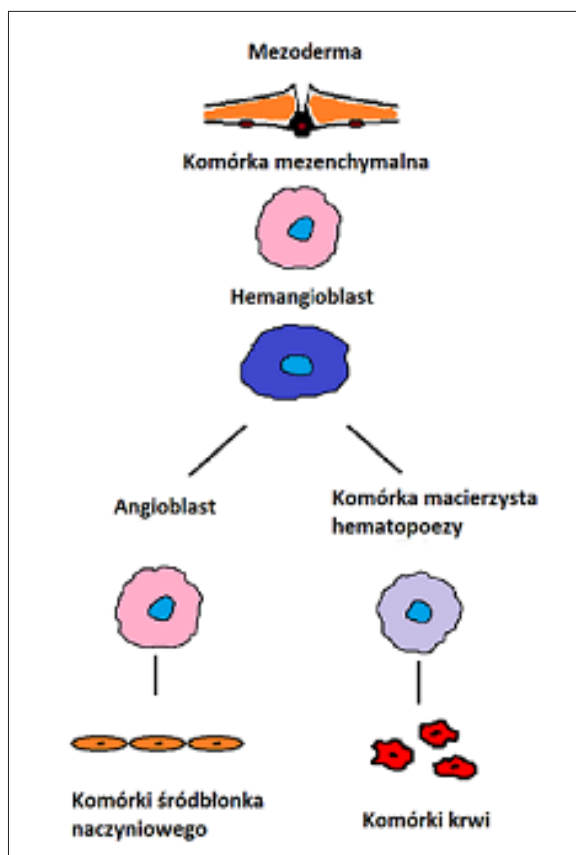
### Mezenchymalne komórki macierzyste

Mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cell/MSK) i ich potencjał biologiczny opisano na początku lat 70 ub.w. w szpiku kostnym. Według Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej ISCT, MSK definiuje się, jako komórki z ekspresją SH-4/CD73<sup>+</sup>, Thy-1/CD90<sup>+</sup>, SH-2/CD105<sup>+</sup> [1,4,8,19]. Dopuszcza się, że w obrębie subpopulacji MSK może się pojawiać ekspresja innych markerów, takich jak: CD44<sup>+</sup>, c-kit/CD117<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, Stro-1<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD49<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup>, oraz CD271<sup>+</sup> [4,23]. Uważa się, że obecność markera CD271, najlepiej definiuje MSK pochodzenia szpikowego, natomiast ekspresja CD146 może być pomocna w identyfikacji pozaszpikowych komórek MSK [19,21]. Wykazano również, że wczesne, niepoddane różnicowaniu MSK, wykazują ekspresję CD166. Klasyczna linia MSK nie powinna wykazywać ekspresji markerów związanych z linią hematopoetyczną: CD11b, CD14, CD19, CD79a, CD33, CD34, CD45, CD133, CD309, HLA-DR, czy też markera komórek śródbłonnka CD31. Ilościowo MSK stanowią 0,01-0,0001% jednojądrzastych komórek szpiku kostnego, a ich poziom obniża się wraz z wiekiem [4,23]. Komórki MSK w warunkach *in vitro* są adherentne, poddane działaniu odpowiednich czynników wzrostowych różnicują się do linii osteoblastów, adipocytów oraz chondrocytów. Hodowla komórek MSK w warunkach *in vitro* jest ograniczona i po 40 pasażach obserwuje się spa-

dek aktywności telomerazy, potencjału proliferacyjnego i tendencji do zmian nowotworowych [3,4,6]. MSK opisano i zidentyfikowano poza szpikiem kostnym w obrębie nisz tkankowych skóry, kości, mięśni, płuc, wątroby, naczyń krwionośnych, w krwi pępowinowej oraz krwi obwodowej [4,8,23,73].

### Komórki progenitorowe śródbłonnków naczyń (endothelial progenitor cell/EPC)

Termin angiogenezy został po raz pierwszy zastosowany przez Folkmana, który opisał go jako formowanie się nowych naczyń krwionośnych z już istniejących w czasie obserwacji unaczynionych guzów nowotworowych [27]. Od czasu wprowadzenia definicji na początku lat 70 ub.w. postęp wiedzy znacząco wzrósł. Przełomowym odkryciem rzucającym nowe spojrzenie na mechanizmy angiogenezy były opublikowane przez Asahara i wsp. wyniki badań z 1997 r. Opisane przez badaczy C-EPC były potwierdzeniem stawianej hipotezy, że proces neowaskularyzacji nie jest ograniczony do życia embrionalnego [3]. Wykazano, że komórki macierzyste pochodzące z krwi obwodowej i szpiku kostnego w określonych warunkach mogą się różnicować i jako C-EPC pełnić funkcje regeneracyjne [56]. Asahara i wsp. pierwsi udowodnili, że komórki macierzyste o fenotypie CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup> izolowane z krwi



Ryc. 2. Różnicowanie się komórek pochodzenia mezodermalnego oraz wspólne pochodzenie i rozwój komórek układu naczyniowego i hematopoetycznego

obwodowej oraz stymulowane czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF mogą w warunkach *in vitro* różnicować się do komórek śródbłonna naczyniowego. W modelach zwierzęcych obserwowano udział komórek CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup> w formowaniu nowych naczyń, czyli tzw. neoangiogenezy. Opisanie przez grupę badawczą Asahary komórki C-EPC występują w niewielkiej liczbie i stanowią zaledwie 0,01-0,0001% jednojądrzastych komórek krwi obwodowej PBMC, w przeciwieństwie do ich odpowiedników w szpiku kostnym, tzw. BM-EPC, opisanych niedługo po C-EPC, które stanowią 1-5% komórek zrębu szpiku kostnego [42].

Dotychczasowe wyniki badań nie pozwalają na precyzyjną definicję EPC. Immunofenotypowanie z wykorzystaniem markerów powierzchniowych pozwala na wyodrębnienie subpopulacji EPC, których właściwości biologiczne sprawdza się w testach klonogennych [9,57]. Uważa się, że komórki zdolne do tworzenia nowych naczyń krwionośnych niezależnie od cech immunofenotypowych należy definiować jako komórki EPC [37,57,66]. Szeroki profil markerów stwierdzanych na powierzchni komórek zróżnicowanych, nieznanymi markerów typowych dla komórek progenitorowych, odkrycie EPC w szpiku kostnym, w krwi pępowinowej, krwi obwodowej oraz w obrębie struktur nisz tkankowych innych narządów, czyni je populacją wyjątkowo heterogenną. Zmienność fenotypowa komórek EPC koreluje z możliwościami biologicznymi, które przejawiają się tworzeniem wyspecjalizowanych populacji komórkowych o cechach: regeneracyjnych, syntetyzujących czynniki wzrostowe, mobilizujących inne populacje komórkowe do wspomagania lokalnej angiogenezy oraz będących źródłem dla zróżnicowania komórek śródbłonna [9,55].

Analiza subpopulacji EPC możliwa jest również dzięki metodom hodowli komórkowych, które pozwalają na ocenę morfologii, zdolności różnicowania i potencjału proliferacyjnego. Testy klonogenne EPC wykazały obecność tzw. wczesnych komórek EPC, które charakteryzują się zdolnością formowania kolonii CFU do 10 dni w hodowlach oraz komórek EPC określanymi jako późne-EPC, które wykazują zdolność CFU nawet po około 4 tygodniach hodowli. Wczesne EPC wykazują zmniejszoną ekspresję CD133<sup>+</sup> w stosunku do hemangioblastu. Ponadto wykazują ekspresję CD309<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> oraz markerów charakterystycznych dla komórek śródbłonna np: CD31, CD62, CD144/VE-kadheryna, eNOS, vWF oraz komórek hematopoetycznych CD14, CD45. Całkowita utrata ekspresji CD133 określa późne komórki EPC, a pojawienie się CD144 wyznacza etap różnicowania się do komórek śródbłonnów naczyniowych. Wczesne komórki EPC wykazują silniejszy potencjał integracyjny z naczyniami krwionośnymi w testach *in vivo*, a późne EPC cechuje zwiększona tendencja do tworzenia struktur przypominających naczynia krwionośne w testach *in vitro* [64]. W obrębie EPC potwierdzono również ekspresję innych markerów, takich jak receptor czynnika wzrostu fibroblastów FGFR, CD38, CD117/c-kit, CXCR4,

vWF, CD144/VE-kadheryna, CD202b/Tie-2/TEK, UEA-1 [9,37,42,55,58,66,72,82].

Profil markerów powierzchniowych ludzkich i mysich EPC jest zbliżony, ale nie na tyle zgodny, aby model zwierzęcy odzwierciedlał zjawiska zachodzące w organizmie ludzkim, co stanowi dodatkowe utrudnienie w ocenie, oznaczaniu EPC oraz badaniu ich biologicznych właściwości [82]. Wciąż aktualnym pozostaje więc pytanie: jaki jest rzeczywisty immunofenotyp subpopulacji EPC, który wyróżnia komórki odpowiedzialne za konkretne efekty biologiczne [9,82]?

### Nisze komórek macierzystych i progenitorowych w biostrukturze ścian naczyń krwionośnych

Pojęcie niszy tkankowych z komórkami o charakterze macierzystym/progenitorowym najlepiej opisano na podstawie mikrosiedliska szpiku kostnego. Nisze tkankowe ze spoczynkowymi komórkami macierzystymi i progenitorowymi w obrębie zróżnicowanego środowiska tkankowego stanowią struktury macierzy międzykomórkowej ECM: zawarte w niej metaloproteinazy oraz czynniki wzrostu, populacje komórek, które kontrolują i regulują właściwości biologiczne niszy. Kontrola komórek macierzystych/progenitorowych zakotwiczonych w środowisku niszy może się odbywać za pomocą receptorów sygnalizacji międzykomórkowej, które definiują stopień dywersyfikacji, potencjał różnicowania, proliferacji oraz mobilizacji [29,41,48,59]. Przedstawione wyżej przykłady środowiska i regulacji funkcjonowania niszy tkankowych są najczęściej prezentowanymi w podejmowanych próbach definicji niszy tkankowej. Definicja niszy tkankowej jest trudna do sprecyzowania, gdyż charakter, profil sposobów regulacji funkcjonowania niszy może zależeć również od lokalizacji tkankowej i narządowej [49]. Prowadzone są badania, które mają na celu wyjaśnienie komunikacji między mobilizacją komórek z jam szpikowych, a środowiskiem tkankowym np.: rola czynników wzrostowych i ich receptorów w procesach adhezji i deadhezji, chemotaksji i mobilizacji [9,28]. Czynniki pochodzenia stromalnego typu 1, SDF-1/CXCL12 i jego receptor CXCR4/CD184 są modelowym przykładem procesu oddziaływań i mobilizacji komórek macierzystych i progenitorowych ze środowiska szpiku kostnego do środowiska tkankowego [7,28]. Wykazano, że ekspresja SDF-1 w *tunica media* oraz *tunica adventitia* na zasadzie chemotaksji powoduje mobilizację komórek macierzystych i progenitorowych z jam szpikowych i promuje hiperplazję w układzie naczyniowym. Aktywację szlaku CXCR4-SDF-1 zaobserwowano również w przypadku przebudowy ściany naczyń krwionośnych płuc u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [52]. Aktywacja szlaku SDF-1-CXCR4 może być spowodowana lokalnym niedotlenieniem, czy też urazami mechanicznymi komórek śródbłonna naczyniowego. W procesie mobilizacji komórek macierzystych i progenitorowych z jam szpikowych do niszy tkankowych mogą być zaangażowane również inne czynniki wzrostowe, np. granulocytowo-makrofagowy czynnik wzrostu GM-CSF, czynnik wzrostu fibroblastów FGF lub VEGF [7,9,15,28].

Istnienie nisz z komórkami macierzystymi i progenitorowymi na różnych poziomach zróżnicowania zaobserwowano i opisano w obrębie wielu narządów. Obecność komponentu naczyniowego wydaje się integralnym składnikiem nisz tkankowych. Ostatnie badania wskazują, że również biostruktury, z których zbudowane są naczynia krwionośne *tunica: intima, media i adventitia* mają komórki macierzyste/progenitorowe ścian naczyń (vascular wall-stem cell/progenitor cell) VW-SC/PC zakotwiczone w niszach tkankowych. Tilki i wsp. zaproponowali definicję VW-SC/PC, jako komórek, które podane odpowiednim czynnikiem różnicującym stają się źródłem komórek śródbłonna, komórek mięśniówki gładkiej SMC oraz fibroblastów, czyli głównych składników biostruktury naczynia [81]. Strefa okołosródbłonkowa na granicy *tunica intima* i *media* oraz waskulogenna (vasculogenic zone) zlokalizowane na granicy *tunica media* i *adventitia* to obszary występowania niszy komórek VW-SC/PC o dużym stopniu heterogenności (ryc.3). W obrębie biostruktur naczyniowych wykazano obecność niszy z komórkami progenitorowymi mięśni gładkich SMP, komórkami macierzystymi hematopoezy HSC, komórkami MSC, nerwowymi komórkami macierzystymi NSC, komórkami mezangium, komórkami linii rozrodczej oraz z komórkami macierzystymi odpowiedzialnymi za inicjowanie procesów nowotworowych [81].

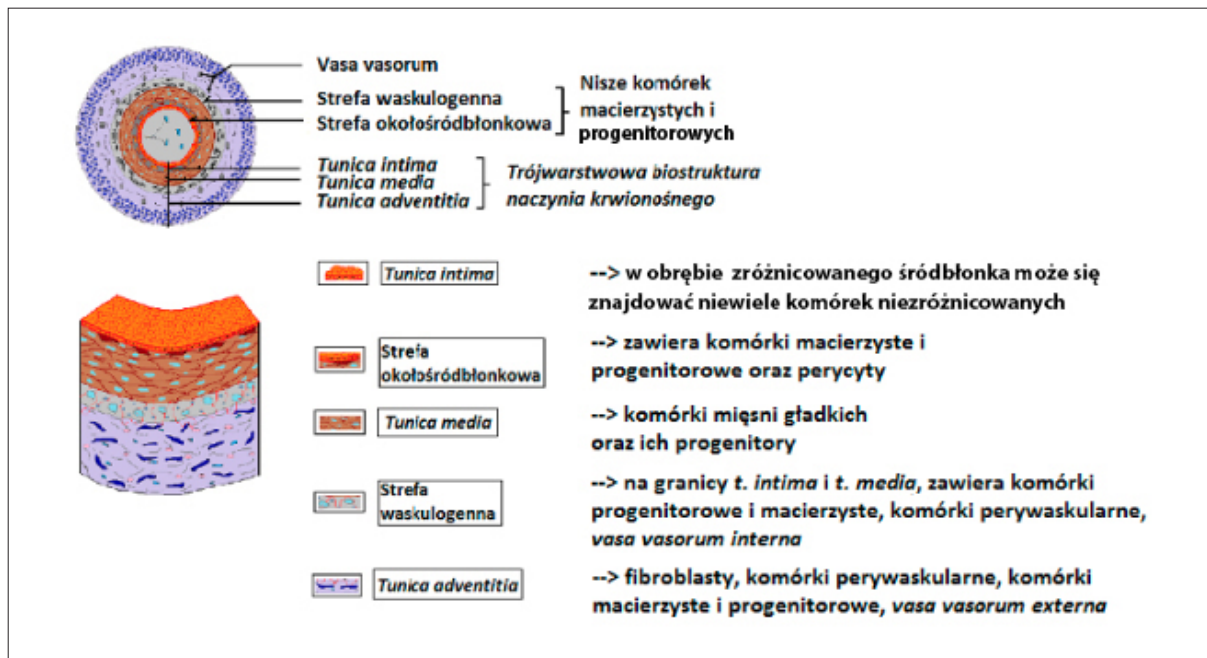
### Komórki macierzyste/progenitorowe w *tunica intima*

*Tunica intima* stanowi wewnętrzną warstwę naczynia żylnego i tętniczego. Jest to pojedyncza warstwa komórek śródbłonna osadzona na błonie podstawnej i wsparta

składnikami ECM, która bezpośrednio kontaktuje się ze światłem naczyń. *Tunica intima* uważana była przez długi czas za w pełni zróżnicowaną biostrukturę, mechaniczną barierę, która oddziela przepływającą krew od lokalnych tkanek. Obecnie *tunica intima* przedstawia się zupełnie inaczej.

Obserwacje Schwartz i Beneditta dostarczyły informacji o zdolności różnicowania i proliferacji komórek śródbłonnków naczyń krwionośnych, migracji i regeneracji w chwili miejscowego uszkodzenia. Trzy lata później ta sama grupa wykazała, że komórki śródbłonna naczyń krwionośnych poddane bodźcom stymulującym lub imitującym zranienie ulegają wzmożonej aktywacji. Zaobserwowano, że w obrębie *tunica intima* występują klastry komórek o podwyższonym potencjale proliferacji i wzrostu, opisywane w literaturze jako: high turnover regions lub growth centers [63,64,65].

Ingram i wsp. uważają, że regeneracyjna aktywność *tunica intima*, pod wpływem czynnika uszkodzającego, jest rezultatem obecnych w niej klastrów VW-SC/PC. Grupa Ingrama wykazała, że komórki śródbłonna wywodzące się z ludzkiej żyły pępowinowej, HUVEC oraz ludzkiej aorty, HAEC wykazują właściwości komórek EPC. Komórki śródbłonna po izolacji z naczyń poddawano analizie za pomocą różnicujących testów proliferacyjnych i klonogennych, a następnie porównano z właściwościami EPC wyizolowanymi z krwi pępowinowej. Potencjał proliferacyjny pojedynczych komórek HUVEC, HAEC oraz EPC krwi pępowinowej sięgał odpowiednio 52, 53 i 55%. Komórki EPC krwi pępowinowej wykazywały



**Ryc. 3.** Schemat trójwarstwowej biostruktury naczynia krwionośnego wraz z proponowanymi obszarami niszy ze spoczynkowymi komórkami macierzystymi i progenitorowymi: strefa okołosródbłonkowa oraz strefa waskulogenna. Uważa się, że wszystkie trzy biostruktury naczynia krwionośnego mogą zawierać niezróżnicowane komórki o charakterze macierzystymi lub progenitorowym

natomiast znacznie większy potencjał tworzenia kolonii CFU (47%) w stosunku do HUVEC (28%) oraz HAEC (27%). Fenotypowanie śródbłonek wykazało profil markerów: CD31<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD141<sup>+</sup>, CD144<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup>, vWF oraz CD309<sup>+</sup> typowy dla EPC. Komórki nie wykazywały natomiast ekspresji markerów hematopoetycznych: CD14<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> [34].

Grupa Fanga i wsp. dostarczyła kolejnych dowodów potwierdzających potencjał regeneracyjny obecny w *tunica intima*. Badacze wykazali, że *intima* ściany naczyń u myszy szczepu C57BL/6J zawiera klastry komórkowe, które opisali, jako dorosłe komórki macierzyste śródbłonek naczyńnych VESC. Komórki VESC zostały opisane przez grupę badawczą w śródbłonekach żylnych i tętniczych nerki, śledziony oraz płuc. Do celów badawczych wyizolowano śródbłonek ze ściany naczyń płuc myszy C57BL/6J. Izolacji dokonano na podstawie markerów Lin<sup>-</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>. W celu wykluczenia komórek linii hematopoetycznej, komórki oczyszczono z komórek CD45<sup>+</sup>. Komórki po enzymatycznej izolacji poddano hodowli z dodatkiem VEGF. Badacze obserwowali jednostki CFU oraz ekspresję markerów śródbłonkowych: CD31<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD144<sup>+</sup>, vWF, ale brak ekspresji markerów hematopoetycznych, takich jak CD45<sup>+</sup>. Komórki o dużej aktywności CFU, zwłaszcza śródbłoneki CD117<sup>+</sup> wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym GFP. Komórki poddano analizie na obecność innych markerów śródbłonek. Wykazano obecność: CD144<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, VEGFR-1, CD104<sup>+</sup> oraz CD34<sup>+</sup>. Komórki po około 14 dniach hodowli znakowano GFP i przeszczepiono do szczepu dzikiego C57BL/6J-wt, bez GFP. Dodatkowo podzielono je na populację komórek CD117<sup>+</sup> i CD117<sup>-</sup>. Okazało się, że komórki CD117<sup>+</sup> były obecne we krwi, a nawet wykazywały zdolność inkorporacji do funkcjonujących już naczyń. Komórki CD117<sup>-</sup> nie wykazywały już takich właściwości. Na podstawie zgromadzonych wyników badacze postawili tezę, że w obrębie zróżnicowanych śródbłonek ściany naczyń znajduje się bardzo mała liczba komórek o charakterze komórek macierzystych i progenitorowych, tzw. VESC zdolnych do inicjowania angiogenezy oraz inkorporacji do funkcjonujących już naczyń w środowisku *in vivo* [26].

Grupa Fanga i wsp. w 2005 roku przedstawiła wyniki badań, w których prezentuje obecność komórek CD105<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD11a<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup> izolowanych ze ściany aorty płodowej. Komórki w warunkach hodowli *in vitro* z dodatkiem VEGF różnicowały się do komórek śródbłonek. Pod wpływem medium różnicującego komórki po 3 tygodniach hodowli wykazały ekspresję CD31<sup>+</sup>, CD202b<sup>+</sup> oraz vWF, co potwierdzono w analizie FACS oraz western-blotting. Podanie komórek do mysich modeli uszkodzenia skóry inicjowało procesy angiogenne, a same komórki obserwowano w naczyniach, co potwierdzono metodą immunohistochemiczną na obecność markerów śródbłonek: CD31, vWF oraz mięśniówki:  $\alpha$ -SMC [25].

Powyższe przykłady dowodzą, że obserwowana na początku lat 70 ub.w. zdolność zróżnicowanych komórek *tunica intima* do regeneracji, proliferacji i migracji nie

wynika wyłącznie z biologicznych właściwości śródbłonek. Okazuje się, że zróżnicowany śródbłonek zawiera niewielki odsetek komórek o charakterze macierzystym i progenitorowym, które stymulowane odpowiednim środowiskiem czynników wzrostowych wykazuje zdolności proliferacji i regeneracji w testach *in vitro* i *in vivo*.

### Komórki macierzyste/progenitorowe w *tunica media*

*Tunica media*, zbudowana z komórek mięśni gładkich, SMC, stanowi o sile skurczowej i rozkurczowej naczyń, nadaje i reguluje ton przepływu krwi, uczestniczy w kontrolowaniu stabilności mechanicznej. W układzie tętniczym jest ona silniej rozwinięta niż w żylnym. Istnieje hipoteza, według której komórki SMC *tunica media* pod wpływem zmian naczyniowych wywołanych procesem chorobowym ulegają różnicowaniu z postaci spoczynkowej do aktywnej proliferacyjnej. Uważa się, że proces ten może wynikać z aktywności komórek progenitorowych mięśni gładkich PMC, które uczestniczą w procesie proliferacji i migracji komórek z *tunica media* do strefy okołóśródbłonkowej *tunica intima*. Aktywność komórek PMC może odpowiadać za formowanie się zmian naczyniowych np. powstawanie *neointimy* [30,47,51].

Kolejne dowody potwierdzające istnienie VW-SC/PC pochodzą z eksperymentów wykonanych na segmentach ścian naczyń izolowanych z tętnicy łuku aorty, tętnicy piersiowej oraz udowej. Eksperymentalnie udowodniono, że komórki izolowane ze ścian wspomnianych naczyń wykazują ekspresję markerów *Oct-4*, *Stro-1*, *Sca-1* oraz *Notch-1*, charakterystycznych dla MSC. Fenotypowanie komórek nie wykazało obecności markerów komórek hematopoetycznych oraz śródbłonek naczyńnych. W testach *in vitro* komórki poddane czynnikom różnicującym rozwijały się do linii komórek SMC, adipocytów oraz chondrocytów [47,51].

W cytowanej wcześniej pracy Fang i wsp. przedstawiają, że komórki CD309<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> izolowane ze ściany ludzkiej aorty płodowej oprócz potencjału proangiogenego i zdolności tworzenia dojrzałych komórek śródbłonek, mają możliwość różnicowania się do komórek SMC. Komórki po enzymatycznym trawieniu ściany naczyń i hodowli poddano fenotypowaniu. Analiza nie wykazała markerów charakterystycznych dla mięśniówki:  $\alpha$ -SMA, MHC I oraz kalponiny. Natomiast hodowla komórek w medium różnicującym z dodatkiem PDGF-BB powodowała ekspresję markerów mięśniówki u 80% komórek. Komórki wykazywały ekspresję czynnika vWF oraz  $\alpha$ -SMA, co nadawało im mieszany charakter mioangiogeny. Podanie komórek do mysiego modelu eksperymentalnego poprzez żyłę ogonową wzmagало proces neoangiogenezy i gojenia ran w skórze. Na podstawie tego zjawiska można stwierdzić, że poza właściwościami angiogennymi komórki doskonale radziły sobie z zasiedlaniem miejsc ich przeznaczenia [25].

Komórki izolowane z *tunica intima* żyły odpiszczelowej pacjentów z żyłakami, na granicy *tunica media* i *adven-*



titia, czyli tzw. strefy waskulogennej zawierają komórki VW-SC/PC z ekspresją CD34<sup>+</sup> oraz CD117<sup>+</sup>. Komórki poddane hodowli, a następnie fenotypowaniu wykazały ekspresję markerów MSC: CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, natomiast nie wykazano u nich ekspresji markerów linii hematopoetycznej. W testach klonogennych komórki tworzą CFU po 2-3 tygodniach hodowli, a poddane czynnikom różnicującym rozwijały się w linie osteoklastów, osteoblastów i chondroblastów. W środowisku różnicującym obserwowano tworzenie struktur naczyńopodobnych, a także ekspresję genu komórek MSC, *Oct-4* [18, 83].

Podsumowując, VW-SC/PC obecne w *tunica media* są komórkami, które mają właściwości proangiogenne, charakter komórek MSC, a także mają możliwość różnicowania się w komórki mięśni gładkich oraz inne populacje komórkowe. Zaobserwowano również, że w obrębie *tunica media* występują komórki, które nie wykazują cech linii hematopoetycznej [83].

#### Komórki macierzyste/progenitorowe w *tunica adventitia*

*Tunica adventitia* jest najbardziej zewnętrzną warstwą naczyń krwionośnych, bogatą w fibroblasty, kolagen i system okołonaczyniowych włókien nerwowych o nieuporządkowanej strukturze. Podobnie jak w przypadku pozostałych biostruktur naczyń, *tunica adventitia* uważana była za barierę oddzielającą naczynie od lokalnego środowiska tkankowego, w czym nie dopatrywano się szczególnego znaczenia [31]. Poznanie molekularnych i genetycznych mechanizmów odpowiedzialnych za jej formowanie pozwoliło odkryć jej dynamizm oraz zaangażowanie w różne procesy biologiczne, takie jak: udział w rekonstrukcji naczyniowej, pośrednictwo w sygnalizacji między komponentami naczyń, a lokalnym środowiskiem tkankowym, transport komórek układu immunologicznego do środowiska tkankowego, czy też kontrola i nadawanie tonu naczyniowego przez oddziaływanie na *tunica media* [31,32]. Bezpośredni kontakt *tunica adventitia* z lokalnym środowiskiem tkankowym powoduje, że sygnały o zmianach patologicznych zachodzących w świetle naczyń oraz w *tunica intima* i *media* mogą być przesyłane za pomocą jej komponentów do pozanaczyniowego środowiska tkankowego. *Tunica adventitia* może uczestniczyć w regeneracji lokalnego środowiska tkankowego na wczesnych etapach rozwoju choroby, a na poziomie bardziej zaawansowanym w tworzeniu *neointimy* [31,32,49,50].

Na podstawie obecnych doniesień uważa się, że *tunica adventitia* jest największym rezerwuarem VW-SC/PC. W 2004 r. Hu i wsp. opisali, że *tunica adventitia* aorty szczepu myszy *Apo E*<sup>-/-</sup> ma komórki z profilem Sca-1<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>. Komórki te poddane działaniu czynnika PDGF-BB ulegają różnicowaniu do SMC w warunkach *in vitro*. Populacja fibroblastów Sca-1<sup>+</sup>, inkorporowana do eksperymentalnych przeszczepów naczyń myszy *Rosa26* migrowała przez *tunica adventitia* do *tunica media*. Komórki traciły ekspresję Sca-1, a naby-

wały fenotyp SMC. Po 4 tygodniach od przeszczepu obserwowano ich obecność również w *neointymie*, gdzie promowały jej progresję [33,82].

Sainz i wsp. wyizolowali populację komórek progenitorowych z aorty myszy *ApoE*<sup>-/-</sup> o profilu markerów Sca-1<sup>+</sup>, CD117<sup>-/low</sup>, Lin<sup>-</sup>, CD34<sup>-/low</sup>. Komórki te poddane czynnikom, takim jak: VEGF lub PDGF-BB/TGF-β1 ulegały różnicowaniu do komórek śródbłonna oraz SMC, ale nie do HSC. W celu obserwacji zachowania komórek Sca-1<sup>+</sup> w warunkach *in vivo*, komórki podawano myszom, u których fibroblasty ściany aorty nie wykazywały ekspresji Sca-1. Po 4 tygodniach od transplantacji obserwowano obecność komórek Sca-1<sup>+</sup>, których udział w formowaniu się *neointimy* stanowił do 30% [62].

Zaobserwowano również, że migracja komórek z *tunica adventitia* i ich udział w formowaniu *neointimy* może być regulowana poprzez sygnalizację sonic-hedgehog Shh, która zaangażowana jest w tworzenie pierwotnych struktur naczyniowych. Passman i wsp. opisali populacje z ekspresją Sca-1<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD140b<sup>+</sup>, zlokalizowane w subregionie *adventitia*. U myszy transgenicznych *Shh*<sup>-/-</sup> zaobserwowano znacznie mniej komórek Sca-1<sup>+</sup>, co oznacza, że sygnalizacja Shh może być zaangażowana w regulację procesu zasiedlania komórek Sca-1<sup>+</sup> do *tunica media*, gdzie przyczyniły się do formowania *neointimy* [57].

Uważa się, że największy zasób VW-SC/PC znajduje się w strefie waskulogennej na granicy *tunica media* i *adventitia*, również w obrębie samej *tunica adventitia*. Zengin i wsp. po raz pierwszy wprowadzili termin tzw. strefy waskulogennej w oparciu o badania ludzkich ścian naczyń żylnych i tętniczych. Ze ściany naczyń poddanej enzymatycznemu trawieniu wyizolowano komórki CD34<sup>+</sup> oraz wysortowano na podstawie markera CD105 w celu wykluczenia zróżnicowanych komórek śródbłonna. Następnie wykonano modyfikację tętniczego testu pierścieniowego na bazie kolagenu typu I w celu określenia potencjału angiogennej komórek. Zaobserwowano, że po 3-4 dniach hodowli dochodzi do formowania się pierwszych struktur o charakterze naczyniowym. Po około 14 dniach hodowli komórki wykazywały ekspresję antygenów CD34<sup>+</sup>, CD309<sup>+</sup>, CD202b<sup>+</sup>. Następnie obserwowano ekspresję CD144, białka okludyny, charakterystycznego dla ścisłych połączeń komórkowych oraz CD66a/CEACAM1 występującego na aktywowanych komórkach śródbłonnów naczyniowych. Potencjał angiogennej komórek na różnych etapach testu potwierdzono poprzez hodowlę *in vitro*, gdzie z dodatkiem czynnika VEGF tworzyły system mikronaczyń po transplantacji do mysich modeli nowotworowych. Komórki także opisano w naczyniach żylnych i tętniczych z prostaty, śledziony, serca, mózgu oraz nerki [88].

Campagnolo i wsp. w żyły odpiszczelowej wykazują obecność komórek CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>+</sup>, które opisują jako komórki progenitorowe wydające się z żyły odpiszczelowej SVP obecne w obrębie *tunica adventitia* i *vasa*

vasorum. Po enzymatycznym trawieniu ściany naczyń, inkubacji z medium różnicującym wyhodowano selekcyjonowane komórki, a następnie poddano analizie FACS. Komórki CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, vWF w obecności medium nabywają fenotypu komórek mezenchymalnych/pericytów (ekspresja genu *Sox-2*), a w testach klonogennych wykazują silny potencjał proliferacyjny, a także zdolność wieloliniowego różnicowania się. Na powierzchni komórek SVP wykazano również jednoczesną ekspresję markerów komórek MSC, CD117<sup>+</sup> oraz EPC, CD133<sup>+</sup>. Komórki w testach *in vitro* wykazują zdolność różnicowania się do komórek śródbłonnków naczyniowych i SMC. SVP okazały się również źródłem czynników wzrostowych. Komórki SVP podane do mysich modeli transplantacyjnych wzmagają neowaskularyzację u zwierząt przez oddziaływanie na inne populacje komórek spoczynkowych niszy. Zaobserwowano, że podanie inhibitorów receptorów Tie-2 oraz PDGFR- $\beta$ , które są odpowiedzialne również za udział w kapilarogenezie i kształtowaniu biostruktury naczyń koreluje ze znacznym obniżeniem potencjału migracyjnego i neowaskularyzacyjnego w porównaniu do grupy zwierząt, którym domięśniowe podanie komórek inicjowało neowaskularyzację w mysich modelach niedokrwiennych. Obecność komórek SVP w biostrukturze naczyń potwierdzano nawet 14 dni po przeprowadzonych transplantacjach [10].

Podobne rezultaty zaobserwował zespół Fanga, który izolował komórki CD309<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> z ludzkiego materiału tętniczego. Komórki po izolacji hodowane w obecności VEGF oraz PDGF po inkorporacji do zwierzęcych modeli wzmagają progresję procesu neowaskularyzacji i różnicowanie się do komórek śródbłonna oraz SMC. Komórki różnicują się również do linii adipocytów, czy osteoblastów [25].

Corselli i wsp. na materiale ze stromalnej frakcji naczyniowej wykazali, że *tunica adventitia* naczyń żylnych i tętnicznych zawiera komórki CD34<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD146<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, które wykazują cechy MSC. Komórki nie wykazują ekspresji markerów komórek śródbłonna, pericytów oraz hematopoetycznych, ale mają markery klasycznych MSC: CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> i CD105<sup>+</sup>. Ich inkorporacja w zwierzęcych modelach doświadczalnych koreluje dodatnio ze wzmoczoną aktywnością regeneracyjną naczyń [16,17].

Z kolei zespół Kleina opisuje w tętnicach ludzkich mezenchymalne, multipotencjalne komórki macierzyste ściany naczyń VW-MPSC z obszaru strefy waskulogennej oraz *tunica adventitia*. Komórki VW-MSCP wykazują ekspresję klasycznych markerów komórek MSC: CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD74<sup>+</sup> oraz brak markerów CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>. Komórki VW-MPSC mają zdolność różnicowania się do pericytów oraz SMC, co według badaczy może być rezerwuarem komórek np. do rekonstrukcji ściany naczyń. Identyfikacja VW-MPSC została dodatkowo potwierdzona poprzez barwienie immunohistochemiczne fragmentów ściany tętnicy na obecność  $\alpha$ -SMA oraz kolokalizację z markerem MSC, CD73 oraz

RG55, markerem aktywowanych pericytów. W obrębie strefy waskulogennej zaobserwowano również ekspresję genu *Sox-2* oraz CD90<sup>+</sup>, nestyny i CD44<sup>+</sup>. W kolejnym etapie wykonano tętnicze testy pierścieniowe, które po dwóch dniach wykazały obecność markera pericytów NG2<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, ale brak ekspresji markerów śródbłonnkowych: CD34 i CD146. Podanie komórek CD44<sup>+</sup> *in vitro* oraz *in vivo* do mysich modeli SCID wzmagало tworzenie struktur naczyniowych. Przypuszcza się, że komórki VW-MPSC CD44<sup>+</sup> mogą być zaangażowane w proces rekonstrukcji i utrzymywania prawidłowej homeostazy ściany naczyń, co wynika np. ze zdolności różnicowania się do SMC i pericytów oraz wbudowywania się komórek do biostruktury naczyń [40].

Badania eksperymentalne na modelach zwierzęcych oraz wyniki prac klinicznych wskazują, że w obrębie *tunica adventitia* mogą się znajdować nisze tkankowe z populacjami komórek macierzystych/progenitorowych o silnym potencjale angiogennym. Interesujące jest to, że aktywność wspomnianych komórek może być zaangażowana w proces tworzenia systemu mikroskopijnego unaczynienia, obserwowany u pacjentów z miażdżycą. Wzmoczona neoangiogeneza oraz gęstość mikrounaczynienia w *tunica adventitia* wydaje się korelować z postępowaniem miażdżycy i formowaniem *neointimy* [53,84].

Nisze tkankowe *tunica adventitia* z komórkami VW-SC/PC odgrywają ważną rolę w procesie prawidłowej homeostazy naczyń i w utrzymywaniu kontaktu z lokalnym środowiskiem tkankowym. Są źródłem komórek macierzystych i progenitorowych na różnych poziomach rozwoju, co potwierdzono poprzez opisanie heterogennej „strefy waskulogennej”. Wstępne informacje dowodzą, że *tunica adventitia* może być zaangażowana w rozwoju chorób naczyniowych, a jednym z powodów może być wzmocniona aktywność proliferacyjna komórek VW-SC/PC [31].

### Pericyty

Pericyty/komórki ścienny/komórki Rougeta definiowane są najczęściej jako okołośródbłonne komórki, które opisano począwszy od mikronaczyń i kapilar naczyniowych, aż po duże naczynia krwionośne. Komórki te umiejscowione są wzdłuż komórek śródbłonna, z którymi dzielą wspólnie błonę podstawną oraz połączone są licznymi połączeniami międzykomórkowymi. W większych naczyniach mogą występować w obrębie *tunica adventitia*, a ich charakter morfologiczny i fizjologiczny jest swoisty narządowo [6]. Pericyty to źródło czynników wzrostowych, które regulują proces formowania „tuby naczyniowej”, nadają kształt i światło naczyń, regulują jego ton, oddziałują na komórki śródbłonna regulując ich proliferację i migrację. W dużych naczyniach pericyty spotykane są również w *tunica media* i *tunica adventitia*. Pericyty są źródłem czynników wzrostowych, które regulują angiogenezę oraz utrzymują homeostazę naczyniową i uczestniczą

w syntezie składników ECM. Sekrecja przez perycyty czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego typu B PDGF-B kontroluje proces tzw. kapilarogenezy, czyli tworzenia spłotów naczyniowych przez wbudowywanie komórek śródbłonna do biostruktury naczynia. Synteza PDGF-B przez perycyty oddziałuje również na różnicowanie, proliferację i migrację EPC. Myszy transgeniczne pozbawione perycytów wykazują liczne anomalie naczyniowe, np. nieregularną i chaotyczną strukturę naczyniową, czy też zmiany w połączeniach międzykomórkowych [6,15]. Perycyty są komórkami zdecydowanie wyróżniającymi się fenotypowo na tle całej biostruktury naczynia, gdyż nie wykazują ekspresji markerów komórek śródbłonna i hematopoetycznych, takich jak CD31, CD34, CD144, czynnik vWF, UEA1 oraz CD45. Natomiast na ich powierzchni obserwuje się ekspresję CD146, NG2, PDGF-B, fosfatazę alkaliczną oraz ludzki antygen dermalny 1 HDA1 [16,22].

Biorąc pod uwagę zaangażowanie perycytów w kapilarogenezę, regulację śródbłonnków i innych komórek biostruktury naczynia poprzez sekrecję czynników wzrostowych, utrzymywanie prawidłowej homeostazy ściany naczynia czyni je potencjalnym źródłem komórek o właściwościach regeneracyjnych. W literaturze naukowej perycyty oraz komórki blisko z nimi spokrewnione, wykazujące właściwości regeneracyjne określane są komórkami perywaskularnymi PVC lub nazywane są potomkami komórek MSC okresu postnatalnego [16,17].

Komórki PVC opisano oraz analizowano w naczyniach: mięśni szkieletowych, łożyska, skóry, mózgu, krwi pępowinowej, serca, miazgi zęba i szpiku kostnego [22]. Komórki poddane hodowli *in vitro*, a następnie fenotypowaniu wykazywały ekspresję markerów MSC: CD44<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> oraz właściwości miogenne [20,21,22]. PVC izolowane ze ścian naczyń, hodowane w warunkach *in vitro* ulegają również różnicowaniu do linii komórek osteoblastów, adipocytów, chondrocytów, a także mioblastów oraz EPC [14,16,17,19,20,21,22].

W mysim modelu doświadczalnym zaobserwowano, że podanie komórek PVC CD146<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> izolowanych z mięśni o charakterze mioendotelialnym, przyczynia się do regeneracji miokardium oraz wzmacnia neoangiogenezę u zwierząt [16]. Obecność PVC opisano również we krwi pępowinowej, w obrębie galarety Warthona. Komórki PVC izolowane z tego obszaru wykazują ekspresję markerów MSC, ale również ESC: Oct-4, SSEA-4. Ich podanie w modelach eksperymentalnych powodowało migrację do miejsc uszkodzenia, sekrecję VEGF, czynnika wzrostu keratynocytów KGF oraz inicjowało procesy rekonstrukcyjne uszkodzonych mięśni, a także wzmacniało proces neoangiogenezy [16,17].

Z kolei zespół badawczy Tiggesa przedstawia badania, z których wynika, że komórki PVC oraz MSC izolowane z *tunica adventitia* tętnicy udowej myszy mogą być zaangażowane w proces restenozy, który występuje po zabiegach angioplastyki tętnic. Mechanizm i zaangażo-

wanie konkretnych populacji komórek w tym procesie jest wciąż nie do końca poznany. Badacze zaobserwowali wzmożoną aktywność komórek PVC CD146<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>, PDGFβ-R\* w mysim modelu, w którym wywołano uszkodzenie ściany naczynia w porównaniu do myszy grupy kontrolnej. Część komórek wykazywała charakter MSC (CD29,CD90) i była obserwowana w *neointima*. Kultury *in vitro* oraz eksperymenty transplantacyjne *in vivo* wykazały, że komórki nie są pochodzenia szpikowego, lecz w wyniku wzmożonej proliferacji powstają w środowisku biostruktury *tunica adventitia*. Sytuacja ta jest podyktowana miejscową reakcją na uszkodzenie ściany naczynia [80].

Wydaje się, że połączenie fenotypu MSC, zdolność sekrecji wielu czynników wzrostowych, udział w homeostazie ściany naczynia czynią komórki PVC oraz same perycyty atrakcyjnym, potencjalnym źródłem komórek regeneracyjnych. Możliwość różnicowania się komórek PVC w komórki linii, takich jak osteoklasty, osteoblasty, adipocyty oraz komórki mięśni gładkich dodatkowo wzmacnia ich pozycję, jako atrakcyjnego czynnika regeneracyjnego.

#### ***Vasa vasorum*, czyli unaczynienie ściany naczyń krwionośnych**

*Vasa vasorum* to system mikroskopijnego unaczynienia występujący przede wszystkim w obrębie *tunica adventitia* dużych naczyń krwionośnych o średnicy powyżej 5 mm i grubości około 29 komórek. Przebieg *vasa vasorum* w obrębie ściany naczyń żylnych i tętnicznych jest nieuporządkowany i może ulegać drobnym modyfikacjom w różnych naczyniach. Wyróżnia się *vasa vasorum: interna, externa* i *vasa vasorae*. Mikronaczynia *vasa vasorum* penetrują ścianę naczynia od *tunica media* przez *tunica adventitia*, w niektórych miejscach kontaktując się z lokalnym otoczeniem odpowiadając za kontakt tkankowy, stopień perfuzji naczyniowej, ale przede wszystkim za dostarczanie składników odżywczych i tlenu do najbardziej na zewnątrz usytuowanych komponentów tkankowych naczynia [61]. Istotność *vasa vasorum* w homeostazie i strukturze naczyń krwionośnych jest niekwestionowana, czego najlepszym dowodem są eksperymenty, w których usuwa się tę biostrukturę. Usunięcie *vasa vasorum* w modelach doświadczalnych zwierząt powoduje nekrozę *tunica media*, zwłaszcza jej środkową i zewnętrzną część, co wskazywałoby, że biostruktury naczynia umiejscowione najbardziej na zewnątrz zaopatrywane są przez *vasa vasorum* i komponenty tkankowe *adventitia* [49]. Przypuszcza się, że *vasa vasorum* może również uczestniczyć w procesie miażdżycowym, jednak informacje te wymagają dodatkowego potwierdzenia [5]. W obrębie *vasa vasorum* odnotowano aktywność komórek o charakterze macierzystym i progenitorowym. Z *vasa vasorum* żyły odpiszczelowej wyizolowano komórki z ekspresją markerów: CD34<sup>+</sup>, Sox2<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>. W obrębie tej populacji wykazano również obecność komórek o charakterze MSC z ekspresją NG2<sup>+</sup>, PDGFβ<sup>+</sup>. Obie populacje poddawane czynnikom różnicującym wykazywały zdol-

ności klonogenne oraz przejawiały cechy MSC, a inkorporowane do zwierzęcych modeli doświadczalnych inicjowały mechanizmy regeneracyjne [10,11].

## PODSUMOWANIE

Współczesne badania niszy z komórkami macierzystymi i progenitorowymi w obrębie zróżnicowanego środowiska tkankowego dostarczają informacji, z których wynika, że aktywność komórek macierzystych i progenitorowych w mniejszym stopniu występuje również w okresie życia postnatalnego. Biostruktury naczyń żylnych i tętniczych *tunica: intima, media* i *adventitia* są rezerwuarem VW-SC/PC, ponieważ czynniki środowiskowe, takie jak np. hemodynamika krwi wymuszają nieustanną kontrolę oraz regenerację ściany naczynia w chwili uszkodzenia. Granica między funkcją naprawczą, a udziałem w promowaniu zmian naczyniowych przez VW-SC/PC jest niejednoznaczna i trudna do sprecyzowania. Najprawdopodobniej aktywność naprawcza komórek VW-SC/PC przejawia się na bardzo wczesnych etapach powstawania choroby. Natomiast dane eksperymentalne z testów

*in vitro* i na modelach zwierzęcych *in vivo* wykazują, że komórki te na etapie zaawansowanej choroby naczyniowej zamiast regenerować, mogą uczestniczyć w progresji choroby. Informacje te wskazują, że niezbędne jest dokładne poznanie biologicznych właściwości nisz z komórkami WV-SC/PC. VW-SC/PC stanowią bogate źródło heterogennych populacji komórek, które poddane odpowiednim warunkom hodowlanym mogą się stać źródłem zróżnicowanych komórek biostruktury naczyniowej, a nawet komórek pochodzenia pozanaczyniowego. Cechy te predysponują do wykorzystania tych komórek w naczyniowej bioinżynierii tkankowej, dziedzinie, której możliwości terapeutyczne mogą być wykorzystywane w sytuacjach, w których tradycyjne metody chirurgii rewaskularyzacyjnej są niewystarczające.

Podsumowując, nisze komórek VW-SC/PC wydają się interesującym źródłem pozyskiwania komórek macierzystych do celów terapeutycznych, a ich izolacja, hodowla i różnicowanie w odpowiednim kierunku może się stać w niedługiej przyszłości alternatywą dla przeszczepów komórek macierzystych hematopoezy HSCT.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Abedin M., Tintut Y., Demer L.L.: Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ. Res.*, 2004; 95: 671-676
- [2] Anwar M.A., Shalhoub J., Lim C.S., Gohel M.S., Davies A.H.: The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J. Vasc. Res.*, 2012; 49: 463-478
- [3] Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schattman G., Isner J.M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275: 964-967
- [4] Bajek A., Olkowska J., Drewna T.: Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 124-132
- [5] Barger A.C., Beeuwkes R.3rd, Lainey L.L., Silverman K.J.: Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role of pathophysiology of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 1984; 310: 175-177
- [6] Bautch V.L.: Stem cells and the vasculature. *Nat. Med.*, 2011; 17: 1437-1443
- [7] Bogunia-Kubik K., Gieryng A., Gebura K., Lange A.: Genetic variant of the G-CSF receptor gene is associated with lower mobilization potential and slower recovery of granulocytes after transplantation of autologous peripheral blood progenitor cells. *Cytokine*, 2012; 60: 463-467
- [8] Boxall S.A., Jones E.: Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cell Int.*, 2012; 975871
- [9] Caiado F., Dias S.: Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012; 5: 4
- [10] Campagnolo P., Cesselli D., Al Ha Zen A., Beltrami A.P., Krankel N., Katara R., Angelini G., Emanuel C., Madeddu P.: Human adult vena saphena contains perivascular, progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation*, 2010; 121: 1735-1745
- [11] Campagnolo P., Wong M.M., Xu Q.: Progenitor cells in arteriosclerosis: good or bad guys? *Antioxid. Redox. Signal*, 2011; 15: 1013-1027
- [12] Cao N., Yao Z.X.: The hemangioblast: from concept to authentication. *Anat. Rec.*, 2011; 294: 580-588
- [13] Chao H., Hirschi K.K.: Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc. Res.*, 2010; 79: 169-173
- [14] Chen C.W., Corselli M., Peault B., Huard J.: Human blood-vein-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012; 2012: 597439
- [15] Chen C.W., Montelatici E., Crisan M., Corselli M., Huard J., Lazzari L., Peault B.: Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2009; 20: 429-434
- [16] Corselli M., Chen C.W., Crisan M., Lazzari L., Peault B.: Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010; 30: 1104-1109
- [17] Corselli M., Chen C.W., Sun B., Yap S., Rubin J.P., Peault B.: The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, 2011; 21: 1299-1308
- [18] Covas D.T., Piccinato C.E., Orellana M.D., Siufi J.L., Silva W.A.Jr., Proto-Siqueira R., Rizzatti E.G., Neder L., Silva A.R., Rocha V., Zago M.A.: Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp. Cell. Res.*, 2005; 309: 340-344
- [19] Crisan M., Chen C.W., Corselli M., Andriolo G., Lazzari L., Peault B.: Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2009; 1176: 118-123
- [20] Crisan M., Deasy B., Gavina M., Zheng B., Huard J., Lazzari L., Peault B.: Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol.*, 2008; 86: 295-309
- [21] Crisan M., Huard J., Zheng B., Sun B., Yap S., Logar A., Giacobino J.P., Casteilla L., Peault B.: Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Curr. Prot. Stem Cell Biol.*, 2008; 2

- [22] Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P.N., Traas J., Schugar R., Deasy B.M., Badyrak S., Buhring H.J., Giacobino J.P., Lazzari L., Huard J., Peault B.: A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 2008; 3: 301-313
- [23] Docheva D., Popov C., Mutschler W., Schieker M.: Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell. Mol. Med.*, 2007; 11: 21-38
- [24] Ergun S., Tilki D., Klein D.: Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2011; 15: 981-995
- [25] Fang B., Li Y., Song Y., Li N.: Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the human fetal aorta wall. *Exp. Biol. Med.*, 2010; 235: 130-138
- [26] Fang S., Wei J., Pentimikko N., Leinonen H., Salven P.: Generation of functional blood vessels from a single c-kit+ adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol.*, 2012; 10: e1001407
- [27] Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182-1186
- [28] Gieryng A., Bogunia-Kubik K.: Znaczenie interakcji między SDF-1 i CXCR4 w hematopoezie i mobilizacji macierzystych komórek hematopoetycznych do krwi obwodowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 369-383
- [29] Gomez-Gavira M.V., Lovell-Badge R., Fernandez-Aviles F., Lara-Pezzi E.: The vascular stem cell niche. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2012; 5: 618-630
- [30] Hirschi K.K., Majesky M.W.: Smooth muscle stem cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 2004; 276: 22-33
- [31] Hoglund V.J., Dong X.R., Majesky M.W.: Neointima formation: a local affair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010; 30: 1877-1879
- [32] Hoglund V.J., Majesky M.W.: Patterning the artery wall by lateral induction of Notch signaling. *Circulation*, 2012; 125: 212-215
- [33] Hu Y., Zhang Z., Torsney E., Afzal A.R., Davison F., Metzler B., Xu Q.: Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 1258-1265
- [34] Ingram D.A., Mead L.E., Moore D.B., Woodard W., Fenoglio A., Yoder M.C.: Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*, 2005; 105: 2783-2786
- [35] Jaffredo T., Bollerot K., Sugiyama D., Gautier R., Drevon C.: Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 2005; 49: 269-277
- [36] Jaffredo T., Nottingham W., Liddiard K., Bollerot K., Pouget C., de Bruijn M.: From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp. Hematol.*, 2005; 33: 1029-1040
- [37] Khakoo A.Y., Finkel T.: Endothelial progenitor cells. *Annu. Rev. Med.*, 2005; 56: 79-101
- [38] Kissa K., Herbomel P.: Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature*, 2010; 464: 112-115
- [39] Klein D., Hohn H.P., Kleff V., Tilki D., Ergun S.: Vascular wall-resident stem cells. *Histol. Histopathol.*, 2010; 25: 681-689
- [40] Klein D., Weisshardt P., Kleff V., Jastrow H., Jakob H.G., Ergun S.: Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. *PLoS One*, 2011; 6: e20540
- [41] Kovacic J.C., Boehm M.: Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Res.*, 2009; 2: 2-15
- [42] Krause D.S., Fackler M.J., Civin C.I., May W.S.: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 1996; 87: 1-13
- [43] Kume T.: Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012; 727: 210-222
- [44] Lander A.D., Kimble J., Clevers H., Fuchs E., Montarras D., Buckingham M., Calof A.L., Trumpp A., Oskarsson T.: What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.*, 2012; 10: 19
- [45] Leri A., Hosoda T., Kajstura J., Anversa P., Rota M.: Identification of a coronary stem cell in the human heart. *J. Mol. Med.*, 2011; 89: 947-959
- [46] Lukasiewicz A., Drewa T., Molski S.: Advances in engineering of blood vessels. *Pol. Merkur. Lek.*, 2007; 23: 439-442
- [47] Majesky M.W.: Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007; 27: 1248-1258
- [48] Majesky M.W.: Developmental biology in the vasculature--review series. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009; 29: 622
- [49] Majesky M.W., Dong X.R., Hoglund V., Daum G., Mahoney W.M.Jr.: The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs*, 2012; 195: 73-81
- [50] Majesky M.W., Dong X.R., Hoglund V., Mahoney W.M.Jr., Daum G.: The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011; 31: 1530-1539
- [51] Majesky M.W., Dong X.R., Regan J.N., Hoglund V.J.: Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ. Res.*, 2011; 108: 365-377
- [52] Montani D., Perros F., Gambaryan N., Girerd B., Dorfmueller P., Price L.C., Huertas A., Hammad H., Lambrecht B., Simonneau G., Launay J.M., Cohen-Kaminsky S., Humbert M.: C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011; 184: 116-123
- [53] Nykanen A.I., Krebs R., Saaristo A., Turunen P., Alitalo K., Yla-Herttuala S., Koskinen P.K., Lemstrom K.B.: Angiopoietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation*, 2003; 107: 1308-1314
- [54] Pacilli A., Pasquinelli G.: Vascular wall resident progenitor cells: a review. *Exp. Cell Res.*, 2009; 315: 901-914
- [55] Paprocka M., Krawczenko A., Dus D., Kantor A., Carreau A., Grillon C., Kieda C.: CD133 positive progenitor endothelial cell lines from human cord blood. *Cytometry A*, 2011; 79: 594-602
- [56] Parker R.C.: The development of organized vessels in cultures of blood cells. *Science*, 1933; 77: 544-546
- [57] Passman J.N., Dong X.R., Wu S.P., Maguire C.T., Hogan K.A., Bautch V.L., Majesky M.W.: A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 9349-9354
- [58] Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S.: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000; 95: 952-958
- [59] Psaltis P.J., Harbuzariu A., Delacroix S., Holroyd E.W., Simari R.D.: Resident vascular progenitor cells - diverse origins, phenotype, and function. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2011; 4: 161-176
- [60] Ranjan A.K., Kumar U., Hardikar A.A., Poddar P., Nair P.D., Hardikar A.A.: Human blood vessel-derived endothelial progenitors for endothelialization of small diameter vascular prosthesis. *PLoS One*, 2009; 4: e7718
- [61] Ritman E.L., Lerman A.: The dynamic vasa vasorum. *Cardiovas. Res.*, 2007; 75: 649-658
- [62] Sainz J., Al Haj Zen A., Caligiuri G., Demerens C., Urbain D., Lemitre M., Lafont A.: Isolation of „side population” progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 281-286

- [63] Schwartz S.M., Benditt E.P.: Cell replication in the aortic endothelium: a new method for study of the problem. *Lab. Invest.*, 1973; 28: 699-707
- [64] Schwartz S.M., Benditt E.P.: Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976; 73: 651-653
- [65] Schwartz S.M., Stemerman M.B., Benditt E.P.: The aortic intima. II. Repair of the aortic lining after mechanical denudation. *Am. J. Pathol.*, 1975; 81: 15-42
- [66] Sen S., McDonald S.P., Coates P.T., Bonder C.S.: Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin. Sci.*, 2011; 120: 263-283
- [67] Shi Q., Rafii S., Wu M.H., Wijelath E.S., Yu C., Ishida A., Fujita Y., Kothari S., Mohle R., Sauvage L.R., Moore M.A., Storb R.F., Hammond W.P.: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998; 92: 362-367
- [68] Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E.: Morphometric data on the endothelium of blood capillaries. *J. Cell. Biol.*, 1974; 60: 128-152
- [69] Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E.: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell. Biol.*, 1975; 67: 863-865
- [70] Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E.: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J. Cell. Biol.*, 1976; 68: 705-723
- [71] Sinka L., Biasch K., Khazaal I., Peault B., Tavian M.: Angiotensin-converting enzyme (CD143) specifies emerging lympho-hematopoietic progenitors in the human embryo. *Blood*, 2012; 119: 3712-3723
- [72] Skora J., Biegus J., Pupka A., Barc P., Sikora J., Szyber P.: Molekularne podstawy angiogenezy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 410-415
- [73] Staniszewska M., Sluczawska-Glabowska S., Drukala J.: Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2011; 49: 375-380
- [74] Tavian M., Biasch K., Sinka L., Vallet J., Peault B.: Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010; 54: 1061-1065
- [75] Tavian M., Cortes F., Robin C., Schiavon V., Hallais M.F., Coulombel L., Charbord P., Labastie M.C., Peault B.: The hemangioblast, common precursor of endothelial and hematopoietic cells. *Transfus. Clin. Biol.*, 2000; 7: 238-241
- [76] Tavian M., Coulombel L., Luton D., Clemente H.S., Dieterlen-Lievre F., Peault B.: Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood*, 1996; 87: 67-72
- [77] Tavian M., Peault B.: Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.*, 2005; 49: 243-250
- [78] Tavian M., Peault B.: Analysis of hematopoietic development during human embryonic ontogenesis. *Methods. Mol. Med.*, 2005; 105: 413-424
- [79] Tavian M., Zheng B., Oberlin E., Crisan M., Sun B., Huard J., Peault B.: The vascular wall as a source of stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005; 1044: 41-50
- [80] Tigges U., Komatsu M., Stallcup W.B.: Adventitial pericyte progenitor/mesenchymal stem cells participate in the restenotic response to arterial injury. *J. Vasc. Res.*, 2012; 50: 134-144
- [81] Tilki D., Hohn H.P., Ergun B., Rafii S., Ergun S.: Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends. Mol. Med.*, 2009; 15: 501-509
- [82] Timmermans F., Plum J., Yoder M.C., Ingram D.A., Vandekerckhove B., Case J.: Endothelial progenitor cells: identity defined? *J. Cell. Mol. Med.*, 2009; 13: 87-102
- [83] Torsney E., Xu Q.: Resident vascular progenitor cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2011; 50: 304-311
- [84] Wnuczko K., Szczepanski M.: Endothelium--characteristics and functions. *Pol. Merkur. Lek.*, 2007; 23: 60-65
- [85] Xiong J.W.: Molecular and developmental biology of the hemangioblast. *Dev. Dyn.*, 2008; 237: 1218-1231
- [86] Yeager M.E., Frid M.G., Stenmark K.R.: Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulm. Circ.*, 2011; 1: 3-16
- [87] Zampetaki A., Kirton J.P., Xu Q.: Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.*, 2008; 78: 413-421
- [88] Zengin E., Chalajour F., Gehling U.M., Ito W.D., Treede H., Lauke H., Weil J., Reichenspurner H., Kilic N., Ergun S.: Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development*, 2006; 133: 1543-1551

---

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesu.