

Rola endotelialnych komórek progenitorowych i potencjału redoks w neowaskularyzacji błony maziowej stawu

Role of endothelial progenitor cells and redox potential in synovium neovascularisation

Przemysław Rzodkiewicz^{1,2}, Michał Gajewski¹, Sławomir Maśliński², Elżbieta Wojtecka-Łukasik¹

¹Zakład Biochemii Instytutu Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie

²Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Słowa kluczowe: neowaskularyzacja błony maziowej, NADPH oksydaza, redoks, endotelialne progenitorowe komórki macierzyste.

Key words: synovium neovascularisation, NADPH oxidase, redox, endothelial progenitor stem cells.

Streszczenie

Zwiększona neowaskularyzacja błony maziowej jest jednym z istotnych elementów patomechanizmu rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Jednym z czynników mających znaczenie w przebiegu tego procesu jest produkcja wolnych rodników tlenowych, które wpływają zarówno na proces neowaskularyzacji, jak i na metabolizm endotelialnych komórek progenitorowych. Zaburzenia związane z produkcją wolnych rodników tlenowych w przebiegu zapalenia mogą być więc nie tylko bezpośrednią przyczyną uszkodzeń obserwowanych w przebiegu RZS, lecz także czynnikiem wpływającym na przebieg choroby. W niniejszej publikacji przedstawiono stan aktualnej wiedzy na temat procesu neowaskularyzacji, ze szczególnym omówieniem znaczenia potencjału redoks.

Summary

Increased neovascularization of synovium is a significant element of pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). One of the factors that influence the course of the pathological process is production of reactive oxygen species which influence both the neovascularization process and endothelial progenitor cells metabolism. Abnormalities in production of reactive oxygen species in the course of inflammation may be not only a cause of damage observed in RA, but also one of the factors affecting the course of disease. This publication presents the current state of knowledge about the process of neovascularization, with particular discussion of the importance of redox potential.

Neowaskularyzacja błony maziowej w reumatoidalnym zapaleniu stawów

Rozwój reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) jest związany ze zwiększoną waskularyzacją błony maziowej. Do powstawania nowych naczyń dochodzi w wyniku procesu angiogenezy, polegającego na powstawaniu nowych włośniczek z już istniejących włosowatych naczyń krwionośnych, oraz neowaskularyzacji, polegającej na rozwoju naczynek krwionośnych z niezróżnicowanych endotelialnych komórek progenitorowych. Czynniki proangiogenne mogą być produkowane i wydzielane przez wiele typów komórek obecnych w błonie maziowej. Czynni-

ki te aktywują komórki śródbłonna, co prowadzi do wydzielania przez nie enzymów proteolitycznych powodujących degradację błony podstawnej śródbłonna oraz macierzy pozakomórkowej. Dochodzi do zwiększenia przepuszczalności ściany naczynia, dzięki czemu komórki śródbłonna rozpoczynają migrację, penetrując nowe miejsca. Komórki te ulegają szybkim podziałom, kolejno pączkując. Po uformowaniu światła w obrębie pączkującego naczynka, komórki śródbłonna odbudowują błonę podstawną, w wyniku czego tworzona jest nowa, w pełni funkcjonalna włośniczka [1].

Zapalenie stawów jest związane z powstawaniem w obrębie błony maziowej nacieków leukocytów.

Adres do korespondencji:

mgr farm. Przemysław Rzodkiewicz, Zakład Biochemii, Instytut Reumatologii im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher, ul. Spartańska 1, 02-637 Warszawa, tel. +48 22 646 39 96, e-mail: przemyslaw.rzodkiewicz@ir.ids.pl

Praca wpłynęła: 19.03.2012 r.

Przedłużający się proces zapalny utrwała angiogenezę, prowadząc do zwiększenia liczby naczyń krwionośnych w obrębie błony maziowej. Konsekwencją wzrostu powierzchni śródbłonna jest zwiększenie napływu leukocytów do *synovium* i progresja RZS [2]. W proces migracji leukocytów przez śródbłonek zaangażowanych jest wiele białek adhezyjnych, takich jak integryny, selektyny oraz odpowiadające im ligandy. Do poznanych czynników proangiogennych zaliczyć należy czynniki wzrostu: czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF), czynnik wzrostu hepatocytów (*hepatocyte growth factor* – HGF), transformujący czynnik wzrostu β (*transforming growth factor β* – TGF- β), płytkowy czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF), kwaśne czynniki wzrostowe fibroblastów (*acidic fibroblast growth factor* – aFGF); czynnik indukowany przez niedotlenienie (*hypoxia inducible factor* – HIF); cytokiny prozapalne: czynnik martwicy nowotworów α (*tumor necrosis factor α* – TNF- α), interleukiny: IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* – GM-CSF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (*granulocyte colony-stimulating factor* – G-CSF); chemokiny: ELR+ CXC, SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL2, fraktalkina/CXC3CL1; cząsteczki adhezyjne: $\alpha v \beta 3$ integrynę, selektynę E, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*); proteazy, inhibitory apoptozy i stabilizatory naczyń [1]. W dotychczasowych badaniach wykazano zwiększone stężenie/ekspresję wyżej wymienionych czynników u chorych na RZS [1, 2].

Możliwość ograniczenia angiogenezy jest coraz powszechniej doceniana w leczeniu RZS. Wydaje się, że wiele leków o tym działaniu mogłoby zostać wykorzystanych w terapii. Zaliczyć tu należy angiostatynę, endostatynę, paklitaksel, analogi fumagiliny, 2-metoksyestradiol oraz talidomid [2].

Endotelialne komórki progenitorowe

Nasilona waskularyzacja błony maziowej obserwowana w RZS jest związana z aktywacją komórek śródbłonna naczyń (angiogeneza) lub endotelialnych komórek progenitorowych (*endothelial progenitor cells* – EPC) (neowaskularyzacja) [3]. Endotelialne komórki progenitorowe są heterogenną populacją komórek. Trudno je jednoznacznie zdefiniować, ponieważ ich fenotyp zależy m.in. od miejsca pochodzenia i stopnia dojrzałości. Izolowane są one z różnych tkanek, np. szpiku kostnego, śledziony, krwi obwodowej i pępowinowej. Charakterystyczne dla nich jest to, że wykazują cechy typowe dla komórek endotelium (adherencja do macierzy komórkowej, wiązanie lektyny, inkorporacja LDL), są zdolne do różnicowania się w komórki endotelialne, wykazują ekspresję markerów właściwych liniom komórek hematopoetycznych oraz śródbłonko-

wych (m.in. CD34, CD133, VEGF-R2, oraz brak ekspresji receptora CD45) [4, 5]. Wyróżnia się dwa główne rodzaje EPC – wczesne oraz późne, które różnią się morfologią, zdolnością do proliferacji oraz stopniem przeżywalności.

Wczesne EPC w hodowli komórkowej charakteryzuje wrzecionowaty kształt, niewielka zdolność proliferacji, wykazują one ekspresję endotelialnej syntazy tlenu azotu (eNOS) [5], pełnią przede wszystkim funkcje angiogenne, wydzielają cytokiny wzrostowe, takie jak VEGF. Na poziomie molekularnym fenotyp wczesnych EPC przypomina fenotyp monocytów (analiza proteomiczna wykazała 77-procentową zbieżność) wykazują też ekspresję CD14 oraz receptorów TLR (*Toll-like receptor*) i cząsteczek HLA (*human leukocyte antigen*) [6].

Analiza proteomiczna późnych EPC wykazuje 90-procentowe podobieństwo do komórek endotelialnych. Mają one znaczący udział w angiogenezie, wykazują ekspresję receptora angiopoetyn o aktywności kinazy tyrozynowej (Tie2), eNOS, efryn [6]. W hodowli komórkowej charakteryzuje je sześcienny kształt oraz wysoki stopień proliferacji. Od komórek wczesnych odróżnia je również brak ekspresji markera CD14 [5].

Przebieg procesu neowaskularyzacji

Proces neowaskularyzacji polega na rozwoju naczynek krwionośnych z niezróżnicowanych EPC. Endotelialne komórki progenitorowe powstają w szpiku kostnym w następstwie różnicowania komórek CD34+. Mobilizacja komórek macierzystych ze szpiku kostnego jest uzależniona od warunków panujących w mikrośrodowisku szpiku kostnego, nazywanym niszą komórek macierzystych. Najsilniejszy fizjologiczny czynnik mobilizujący EPC stanowi niedokrwienie tkanki, którego następstwem jest uwolnienie do układu krążenia VEGF oraz chemokiny CXCL12, nazywanej również SDF-1 (*stromal cell derived factor 1*), silnych czynników uwalniających EPC ze szpiku kostnego. Zwiększone stężenie VEGF we krwi zwiększa aktywność metaloproteazy MMP-9, która uwalnia sKitL (nazywany również czynnikiem komórek macierzystych SCL) z błonowego białka mKitL. Chemokina CXCL12 (SDF-1) jest czynnikiem chemotaktycznym oddziałującym na receptor CXCR4, warunkującym ruch EPC w kierunku zwiększającego się stężenia SDF-1 [7]. Dodatkowo aktywacja proteaz, takich jak elastazy, katepsyny G oraz metaloproteazy macierzy (*matrix metalloproteinases* – MMP), osłabia powiązania pomiędzy komórkami podścieliska, umożliwiając migrację EPC do krążenia [8].

Czynnikami, które zwiększają mobilizację EPC ze szpiku kostnego, są również G-CSF, GM-CSF, erytropoetyna (EPO), statyny, eNOS oraz wysiłek fizyczny [8]. Wydaje się, że duże znaczenie w procesie mobilizacji EPC ze szpiku kostnego ma aktywacja syntazy tlenu azotu w drodze zależnej od szlaku sygnałowego PI3K/Akt [8, 9].

Uwolnione ze szpiku kostnego EPC migrują w miejsca uszkodzenia układu naczyniowego. Mechanizm ich naprowadzania oraz różnicowania wymaga skoordynowanego wieloetapowego procesu, obejmującego mobilizację, chemotaksję, adhezję, transmigrację przez ścianę naczynia, migrację w tkankach oraz ostatecznie różnicowanie [8]. Proces transmigracji EPC nie jest jeszcze w pełni poznany, jednak prowadzone do tej pory badania wskazują, że jest on związany z oddziaływaniem wielu białek EPC oraz śródbłonna. W proces ten zaangażowane są selektyny P, E oraz L, za pośrednictwem których EPC „zaczepiają się” na powierzchni komórek śródbłonna [10]. Na powierzchni EPC izolowanych z krwi pępowinowej potwierdzono ekspresję integryny LFA-1 oraz VLA-4, co potwierdza możliwość oddziaływania EPC z ligandami dla integryn zlokalizowanymi na śródbłonnku (ICAM-1, ICAM-2 łączące się z integryną LFA-1 oraz VCAM-1 łączący się z integryną VLA-4) [11]. Po dotarciu EPC we właściwe miejsce, pod wpływem działania takich czynników, jak VEGF, angiopoetyna 1 czy nawet naprężenia mechaniczne i siły generowane przez przepływ krwi, dochodzi do zwiększenia ekspresji genów specyficznych dla komórek endotelialnych, a w następstwie do różnicowania komórek w komórki śródbłonna oraz powstawania nowego naczynia krwionośnego [12]. Proces ten jest związany z aktywacją czynników transkrypcyjnych p53 oraz p21. Badania wykazały, że ogromną rolę w tym procesie odgrywa aktywność deacetylazy histonowej (HDAC) [13].

Ponieważ wczesne EPC produkują większe ilości czynników wzrostu niż późne EPC, sugeruje się zróżnicowaną rolę EPC w neowaskularyzacji. Wczesne EPC mają słabą zdolność proliferacyjną, wykazując jednocześnie syntezę czynników proangiogennych, które mogą stymulować potencjał proliferacyjny późnych EPC, oraz aktywując angiogenezę komórek endotelium [5, 14].

Endotelialne komórki progenitorowe w reumatoidalnym zapaleniu stawów

W badaniach nad patogenezą RZS potwierdzono udział EPC w rozwoju tej choroby. Po raz pierwszy obecność komórek CD34+ wykazujących znaczną ekspresję receptorów CXCR4 oraz VEGFR-2 w błonie maziowej osób chorych na RZS wykazali Ruger i wsp. w 2004 r. [15]. W tym samym roku podobną obserwację, potwierdzającą większą liczbę komórek CD34+ w błonie maziowej osób chorych na RZS w porównaniu z osobami z grupy kontrolnej, opublikowali Hiroshita i wsp. [16]. Zwiększona liczba EPC migrujących do błony maziowej koreluje ze zmniejszeniem się liczby tych komórek krążących we krwi obwodowej [17]. Liczba EPC krążących we krwi pacjentów z RZS koreluje z aktywnością choroby (u osób o małej aktywności zbliżona jest do liczby obserwowanej u osób zdrowych,

natomiast u osób o wysokiej aktywności jest ona 2–3 razy mniejsza niż w grupie kontrolnej) [18].

Czynnikiem wpływającym na nieprawidłową waskulogenezę u chorych na RZS może być TNF- α . Zastosowanie inhibitora TNF- α u pacjentów z RZS podwyższa liczbę EPC krążących we krwi [18]. W terapii biologicznej z wykorzystaniem infliksymabu wykazano np. silną korelację pomiędzy kliniczną odpowiedzią na leczenie, liczbą EPC we krwi oraz obniżeniem DAS28 [19].

Przy stosowaniu terapii glikokortykosteroidami zaobserwowano podobny efekt. Po tygodniu leczenia odnotowano 2-krotne zwiększenie liczby EPC we krwi, obserwacji tej towarzyszyło również obniżenie aktywności RZS [20]. Stwierdzone w RZS zmniejszenie liczby EPC w krążeniu może być związane z ich nasiloną migracją do stawu. Ponieważ obniżenie liczby EPC we krwi w związku z nasiloną migracją do stawu nie może być skompensowane, procesy neowaskularyzacji mogą być związane nie tylko z nasiloną waskularyzacją błony maziowej, lecz także z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego towarzyszących RZS [21].

Wolne rodniki tlenowe i zapalenie stawów

Metabolizm komórek w tkankach stawu podlega złożonej wielowymiarowej kontroli, w którą zaangażowane są m.in. cytokiny, czynniki wzrostu, czynniki fizyczne, takie jak ciśnienie parcjalne tlenu, oraz wolne rodniki (*reactive oxygen species* – ROS). W chorobach reumatycznych, takich jak RZS oraz choroba zwyrodnieniowa, wykazano zwiększoną produkcję ROS. Chondrocyty w odpowiedzi na działanie mediatorów procesu zapalnego, czynników immunomodulacyjnych, obniżonego ciśnienia parcjalego tlenu lub uszkodzeń mechanicznych produkują zwiększone ilości ROS, głównie rodnika nitrozyłowego (NO \cdot), anionorodnika ponadtlenkowego (O $_2^{\cdot-}$), które – reagując z innymi cząsteczkami – generują kolejne rodniki, m.in. nad-tlenoazotyn (ONOO $^-$) oraz nadtlenek wodoru (H $_2$ O $_2$) [22].

Ważnym źródłem ROS w tkance objętej zapaleniem są również migrujące do stawu neutrofile wytwarzające: anionorodnik ponadtlenkowy (O $_2^{\cdot-}$), nad-tlenek wodoru (H $_2$ O $_2$) oraz rodnik hydroksylowy (OH \cdot) [23]. Produkowane wewnątrzkomórkowo mogą powodować zmiany potencjału redoks, znacząco modulując funkcje receptorów, aktywność enzymów, poziom i aktywność czynników transkrypcyjnych, ekspresję genów [23]. Wolne rodniki odpowiadają za modulację procesu zapalnego poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 oraz szlaków sygnałowych MAPK [24]. Uwalniane do przestrzeni śród-komórkowej powodują uszkodzenie licznych elementów macierzy w wyniku degradacji proteoglikanów oraz kolagenu [22].

W wielu pracach potwierdzono wpływ wolnych rodników tlenowych na procesy neowaskularyzacji oraz metabolizm EPC. Wpływ ten zależy od wytwarzanych lokalnie ilości ROS. Wytwarzane na niskim poziomie ROS działają jak cząsteczki sygnałowe i mogą podtrzymywać tworzenie naczyń w sytuacji uszkodzenia (m.in. zwiększając proliferację, migrację, różnicowanie, przeżywalność komórek śródbłonna i EPC oraz ekspresję w tych komórkach genów proangiogennych). Nadmierne wytwarzanie ROS, jak to zachodzi w RZS, upośledza angiogenezę i neowaskularyzację, m.in. powodując przedwczesne starzenie się i apoptozę komórek śródbłonna oraz EPC [25].

Stres oksydacyjny a neowaskularyzacja błony maziowej

Wiedza dotycząca wpływu stresu oksydacyjnego na neowaskularyzację i angiogenezę w błonie maziowej pacjentów z RZS jest nadal ograniczona. Dostępnych jest jednak wiele wyników badań analizujących wpływ stresu oksydacyjnego na funkcje śródbłonna w innych chorobach, np. w miażdżycy oraz cukrzycy.

Głównym źródłem ROS są enzymy zaliczane do rodziny NADPH oksydaz. Są to enzymy katalizujące reakcję redukcji tlenu cząsteczkowego do anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), będącego prekursorem kaskady reakcji wolnorodnikowych [26]. W skład enzymu wchodzi kilka podjednostek: zlokalizowany w błonie komórkowej cytochrom b558, złożony z dwóch białek gp91^{phox} (nazywany również Nox2), oraz p22^{phox}, komponenty cytozolowe p40^{phox}, p47^{phox} i p67^{phox}, a także mała GTP-aza Rac1 [29].

U myszy, u których zahamowano ekspresję Nox2 po incydencie niedokrwinnym, zaobserwowano zahamowaną neowaskularyzację [27]. Wykazano również, że ekspresja VEGF-A i proliferacja komórek śródbłonna są bezpośrednio modulowane przez stężenie ROS, a w proces ten zaangażowane są zarówno Nox2, jak i Rac1 [28]. Stwierdzono, że ROS powstałe w wyniku aktywności NADPH oksydazy wpływają na ekspresję selektyny E u pacjentów z cukrzycą po incydencie niedokrwinnym [29]. Wolne rodniki wpływają na ekspresję cząsteczek adhezyjnych śródbłonna ICAM-1, VCAM-1 [30] oraz selektyny P [31]. Wyniki tych i wielu innych badań potwierdzają, że NADPH oksydazy mogą odgrywać znaczącą rolę w angiogenezie [32]. Oksydaza NADPH jest również zaangażowana w migrację EPC.

Wolne rodniki modulują wydzielanie czynników chemotaktycznych SDF-1/CXCR4 oraz IL-8/CXCR2 [25]. Chemokina CXCL12 (SDF-1), oddziałująca na komórki za pośrednictwem receptora CXCR4, jest najsilniejszym czynnikiem chemotaktycznym dla EPC. Badania *in vitro* prowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych o zablokowanej ekspresji białka Nox2 wskazały zahamowanie migracji EPC indukowanej przez SDF-1. W zmodyfikowanej

wersji doświadczenia, w której EPC preinkubowano w obecności niedużego stężenia H_2O_2 , zaobserwowano większą migrację EPC i zasugerowano, że produkowane w wyniku działania NADPH oksydazy ROS modulują migrację EPC [33]. Indukowana przez SDF-1 polimeryzacja aktyny oraz fosforylacja serynowo-treoninowej kinazy Akt, zwanej również kinazą B, mają istotne znaczenie w migracji EPC [34], w komórkach z upośledzoną ekspresją NOX2 również zaobserwowano istotne zahamowanie tych procesów [33].

Interleukina 8 jest prozapalną cytokiną, która równocześnie może stymulować angiogenezę oraz jest czynnikiem chemotaktycznym dla EPC [25]. Oddziałując na receptor CXCR2, IL-8 powoduje aktywację NADPH oksydazy poprzez translokację podjednostki Rac do błony komórkowej [35]. Zablokowanie receptora CXCR2 hamuje migrację EPC [36]. Sugeruje się, że aktywacja NADPH oksydazy przez IL-8 w wyniku stymulacji receptora CXCR2 jest jednym z procesów regulujących naprowadzanie (*homing*) EPC [25].

Prowadzone w ostatnich latach badania genetyczne również wykazały, że aktywność NADPH oksydazy może mieć znaczenie w patogenezie RZS. W badaniach przeprowadzonych w szwedzkiej populacji, w grupie 1824 pacjentów z RZS, wykazano korelację polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w genie *NCF4* kodującym podjednostkę p40^{phox} NADPH oksydazy z niskim poziomem autooprzeciwniań anty-CCP i brakiem czynnika reumatoidalnego u mężczyzn [37]. Znaczenie funkcjonalne polimorfizmów genów kodujących składowe NADPH oksydazy jest jednak wciąż niejasne. Wcześniejsze doświadczenia prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że polimorfizm w obrębie genu *NCF1* kodującego podjednostkę p47^{phox} wiązać można z większym prawdopodobieństwem rozwoju zapalenia stawów w modelu zwierzęcym [38, 39]. Wyniki doświadczeń na zwierzętach sugerują, że białka Nox są również zaangażowane w aktywację limfocytów T [40, 41].

Podsumowanie

Endotelialne komórki progenitorowe biorą udział w patologicznym rozroście błony maziowej w RZS. Przyczyną nasilonej migracji EPC do błony maziowej stawu w przebiegu choroby może być zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna (selektyna E, ICAM-1, VCAM-1, selektyna P, β_1 -integryna, β_2 -integryna) oraz nasilona produkcja czynników chemotaktycznych (VEGF, SCF). Ważnym czynnikiem regulującym ekspresję czynników chemotaktycznych oraz cząsteczek adhezyjnych, a także wpływającym na proliferację EPC jest potencjał redoks. Wyniki wielu badań sugerują, że zaburzenia związane z produkcją wolnych rodników tlenowych w przebiegu zapalenia mogą być nie tylko bezpośrednią przyczyną uszkodzeń obserwowanych w przebiegu RZS oraz

choroby zwyrodnieniowej, lecz mogą także wpływać na patogenezę schorzenia. Synteza wolnych rodników tlenowych jest zatem istotnym elementem regulującym przebieg zapalenia, a nie tylko odpowiadającym za bezpośrednie uszkodzenia stawu.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Kotulska A, Kucharz JE. Angiogeneza w reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Reumatologia* 2011; 49: 1-9.
- Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 2009; 42: 563-573.
- Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, et al. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1: 44-51.
- Głowińska-Olszewska B, Łuczniński W, Bossowski A. Komórki progenitorowe śródbłonna jako nowy marker funkcji endotelium w ocenie ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; 65: 8-15.
- Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 413-421.
- Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, et al. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* 2010; 3: 18.
- Skóra J, Biegus J, Pupka A i wsp. Molekularne podstawy angiogenezy. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 410-415.
- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-353.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9: 1370-1376.
- Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, et al. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2007; 117: 1527-1537.
- Duan H, Cheng L, Sun X, et al. LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. *Thromb Haemost* 2006; 96: 807-815.
- Wang H, Riha GM, Yan S, et al. Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1817-1823.
- Rössig L, Urbich C, Brühl T, et al. Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1825-1835.
- Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 733-742.
- Rüger B, Giurea A, Wanivenhaus AH, et al. Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2157-2166.
- Hirohata S, Yanagida T, Napei A, et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34⁺ cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3888-3896.
- Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, et al. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 157-163.
- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2005; 111: 204-211.
- Ablin JN, Boguslavski V, Aloush V, et al. Effect of anti-TNF α treatment on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2006; 79: 2364-2369.
- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, et al. Endothelial progenitor cells in active rheumatoid arthritis: effects of TNF and of glucocorticoid therapy. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1284-1288.
- Avouac J, Uzan G, Kahan A, et al. Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine* 2008; 75: 131-137.
- Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 747-755.
- Gajewski M, Rządziejewicz P, Maśliński S. Aktualne poglądy na znaczenie neutrofilów w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Wciąż neutrofile czy może już mikrofagi? *Reumatologia* 2011; 49: 344-350.
- Chi PL, Chen YW, Hsiao LD, et al. Heme oxygenase 1 attenuates interleukin-1 β -induced cytosolic phospholipase A2 expression via a decrease in NADPH oxidase/reactive oxygen species/activator protein 1 activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2114-2125.
- Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2517-2533.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, et al. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005; 111: 2347-2355.
- Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukui T, et al. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002; 91: 1160-1167.
- Higai K, Shimamura A, Matsumoto K. Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. *Clin Chim Acta* 2006; 367: 137-143.
- Min JK, Kim YM, Kim SW, et al. TNF-related activation induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005; 175: 531-540.
- Akgür FM, Brown MF, Zibari GB, et al. Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H791-797.
- Ebrahimian TG, Heymes C, You D, et al. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 2006; 169: 719-728.

33. Urao N, Inomata H, Razvi M, et al. Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res* 2008; 103: 212-220.
34. Fuhler GM, Drayer AL, Olthof SG, et al. Reduced activation of protein kinase B, Rac, and F-actin polymerization contributes to an impairment of stromal cell derived factor-1 induced migration of CD34+ cells from patients with myelodysplasia. *Blood* 2008; 111: 359-368.
35. Zhao M, Wimmer A, Trieu K, et al. Arrestin regulates MAPK activation and prevents NADPH oxidase-dependent death of cells expressing CXCR2. *J Biol Chem* 2004; 279: 49259-49267.
36. Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, et al. Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 2007; 100: 590-597.
37. Olsson LM, Lindqvist AK, Källberg H, et al. A case-control study of rheumatoid arthritis identifies an associated single nucleotide polymorphism in the NCF4 gene, supporting a role for the NADPH-oxidase complex in autoimmunity. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R98.
38. Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, et al. Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 2003; 33: 25-32.
39. Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, et al. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12646-12651.
40. Gelderman KA, Hultqvist M, Holmberg J, et al. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12831-12836.
41. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 2002; 3: 1129-1134.