

DeneySEL Hayvan Modelinde Rapamisin Uygulamasının Matür Endotel Hücreleri ve Endotel Progenitör Hücreler Üzerine Olan Etkisi

Effects of Rapamycin on Mature Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in an Experimental Model

Beyza MACUNLUOĞLU,^a
Aydın ATAKAN,^a
Elif ARI,^a
Aysun TULUNAY,^b
Emel DEMİRALP,^b
Serhan TUĞLULAR,^a
Çetin ÖZENER^a

^aNefroloji BD,
^bİmmünoloji BD,
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 26.12.2013
Kabul Tarihi/Accepted: 10.03.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:
Beyza MACUNLUOĞLU
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Nefroloji BD, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
beyzamacunlu@hotmail.com

ÖZET Amaç: Transplantasyon sonrasında greft rejeksiyonunun önlenmesi amacıyla kullanılan immünsüpresif ilaçların endotel toksisitesini de içeren farklı yan etkileri bulunmaktadır. Rapamisin, mammalian "target of rapamycin (mTOR)" inhibisyonu yaparak immünsüpresif etki göstermektedir. Son yapılan çalışmalarda rapamisin farklı mekanizmalar kullanarak değişik hücreler üzerine sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, deneysel hayvan modelinde yüksek doz rapamisin uygulamasının, endotel hasarı ve bu hasarın bir göstergesi olan dolaşan matür endotel hücresi (MEC) ve endotel progenitör hücre (EPC) sayıları üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda 16 adet, ortalama ağırlıkları 300-350 g olan Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kontrol ve rapamisin grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Rapamisin grubuna çalışma boyunca oral gavaj yoluyla 2 mg/kg/gün rapamisin uygulanmıştır. Yirmi sekiz günlük çalışmanın sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek, alınan kan örneklerinde flow-sitometrik olarak EPC ve MEC sayıları değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Çalışmanın sonunda, rapamisin alan grupta MEC sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (171,42±5,67'e karşı 132±8,72, p<0,05). Ayrıca, rapamisin uygulaması EPC düzeylerinde de kontrol grubuna göre artışa neden olmuştur (103±6,85'e karşı 75±4,11, p<0,05). **Sonuç:** Rapamisin, çalışmamızda kullanılan doz ve sürede endotel hasarı ve tamiri göstergesi olan MEC ve EPC sayılarında artışa neden olmuştur. Sonuçlarımıza göre, uzun dönem rapamisin tedavisi endotel hasarı gelişimi ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Sirolimus; endotelial hücreler

ABSTRACT Objective: Immunosuppressive agents used after organ transplantations have different side effects including endothelial toxicity. Rapamycin shows its immunosuppressive effect by inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR). Recent studies demonstrated that rapamycin shows cytotoxic effects on different cell populations by using different mechanisms. This study investigated the endothelial effects of high dose rapamycin by measuring circulating mature endothelial cells and circulating endothelial progenitor cells in an experimental model. **Material and Methods:** Sixteen male Wistar albino rats, each weighing 300-350 g were used in the study. The groups were divided as control and rapamycin group. Rapamycin group received 2 mg/kg/day rapamycin by oral route for 28 days. After the end of the study period, rats were sacrificed and flowcytometric calculation of EPC and MEC numbers were performed from the blood samples. **Results:** At the end of the study, rapamycin increased the number of circulating mature endothelial cells compared to the control group (171.42±5.67 vs 132±8.72, p<0.05). The number of endothelial progenitor cells also were increased in the peripheral blood of rats treated with rapamycin compared to control group (103±6.85 vs 75±4.11, p<0.05). **Conclusion:** In the present study rapamycin administration increased the number of circulating mature endothelial cells and endothelial progenitor cells associated with cell damage and repair. According to the results of our study, long-term rapamycin treatment may be associated with endothelial dysfunction.

Key Words: Sirolimus; endothelial cells

Türkiye Klinikleri J Nephrol 2014;9(1):1-6

Bilindiği üzere, böbrek nakilli hastalarda kardiyovasküler hastalıklar genel popülasyona oranla daha fazla görülmektedir. Bununla birlikte, böbrek hastalığı olanlarda mortalite ve morbiditenin en önemli sebeplerinden biri koroner arter hastalığı (KAH)'dır.¹⁻³ Endotel disfonksiyonu kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kemik iliğinden köken alan ve endotelial progenitör hücre [endothelial progenitor cell (EPC)] olarak adlandırılan hücrelerin endotel tamiirinden sorumlu olduğu ve bu hücrelerin sayısında ve fonksiyonlarında meydana gelen azalmanın endotel disfonksiyonu gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir.⁴⁻⁷

Periferik kanda dolaşan EPH sayısı düşük olmakla birlikte, iskemi gibi damar hasarı varlığı durumunda lokal ve sistemik uyarılar sonucu hasar bölgesinde EPH sayısında artış meydana gelmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, EPH'nin, endotel bütünlüğü ve neovaskülarizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir.⁷ EPH üç farklı yüzey işareti eksprese etmektedir; AC 133 veya prominin olarak da bilinen CD 133, kinaz insert domain reseptör (KDR) olarak bilinen Flk-1 ve CD34. Bunlardan CD133, matür endotel hücre [matur endothelial cell (MEC)]'lerinde eksprese edilmemektedir ve bu nedenle dolaşımda CD133 ekspresyonunu kaybetmiş, ancak CD34 ve Flk-1 eksprese eden hücreler damar duvarında yerleşen daha matür hücre grubunu göstermektedir.⁸ Dolaşan MEC, hasarlı damar duvarından dökülerek dolaşıma katılır. Bunlar CD34 ve Flk-1 eksprese eder, ancak EPC'lerden farklı olarak hematopoietik hücre yüzey işareti olan CD45 eksprese etmezler.⁹ MEC ayrıca, CD146 ve CD31 gibi endotel yüzey işaretlerini de eksprese eder. MEC sayısının dolaşımda yüksek saptanması, damar hasarı veya bütünlüğünün bozulduğu durumlarda görülmektedir.¹⁰

Transplantasyon sonrasında greft rejeksiyonunun önlenmesi amacıyla kullanılan immünsüpresif ilaçların endotel toksisitesini de içeren farklı yan etkileri bulunmaktadır. Rapamisin, kalsinörin inhibiyonu yapan siklosporin ve takrolimustan farklı olarak mammalian "target of rapamycin (mTOR)" inhibisyonu yaparak immünsüpresif etki göster-

mektedir. Son yıllarda rapamisinin özellikle dolaşan EPC ve vasküler düz kaslar üzerindeki antiproliferatif etkileri gündeme gelmiştir. Miruika ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, in vitro ortama çok düşük dozlarda dahi rapamisin eklenmesinin EPC sayısında dramatik azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.¹¹ Bu çalışmada, apoptozis ve bu hücreler üzerinde etkili olan büyüme faktörleri sinyal yolları inhibisyonu hücre ölümüne sebep olan mekanizmalar olarak gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise lökoferez ile elde edilen CD133 (+) hücrelerin ortamına rapamisin konulmasıyla EPC hücre sayısında belirgin azalma saptanmıştır.¹² Yapılan çalışmaların önemli bir kısmında rapamisinin in vitro kültür ortamında EPC ve MEC üzerine olan etkileri incelenmiş olup, ilk kez bizim tarafımızdan yapılan bir çalışmada, rapamisin ve takrolimusun dolaşan endotelial hücreler üzerine in vivo etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada rapamisin, kullanılan doz ve sürede EPC ve MEC sayılarında anlamlı artışa sebep olmuştur.¹³ Mevcut çalışmamızda, deneysel hayvan modeli kullanılarak yüksek doz rapamisinin in vivo ortamda MEC ve EPC sayıları üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda 16 adet, ortalama ağırlıkları 300-350 g olan Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma boyunca hayvanların suya erişimi serbest bırakılmıştır. Sıçanlar her birinde sekiz rat olacak şekilde iki gruba ayrılmıştır.

Grup 1: Kontrol grubu (çalışma boyunca %0,09 serum fizyolojik oral gavaj yoluyla uygulanmıştır).

Grup 2: Rapamisin grubu (çalışma boyunca 2 mg/kg/gün dozunda rapamisin oral gavaj yoluyla uygulanmıştır).

Çalışma 28 gün devam etmiş ve bu sürenin sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek gerekli kan örnekleri toplanmıştır. Anestezi için pentobarbital (50 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmış, batın, orta hattan yapılan insizyonla açılmıştır. İnferior vena kava kateterize edilerek her bir sıçan için 4 cc kan örneği flow-sitometrik analiz ve hemogram tetkiki için elde edilmiştir. Çal-

ışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında yapılmış olup, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alınmıştır. Çalışmada “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prensipleri uygulanmıştır.

ENDOTELYAL PROGENİTÖR HÜCRELER VE MATÜR ENDOTEL HÜCRELERİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Alınan taze kan örnekleri EDTA içeren tüplere konularak flow-sitometrik değerlendirme yapılmıştır. Eritrositleri parçalamak için eritrosit lizati kullanılmıştır. Yaklaşık 4 cc kan örneği 35 cc eritrosit lizati ile 10 dakika inkübe edildikten sonra 800 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilmiş ve sedimentin üzerinde kalan kısım dökülerek parçalanmış eritrositler ortamdan uzaklaştırılmıştır. PBS solüsyonu “phosphate-buffer solution (PBS)” eklenerek 1500 rpm de tekrar 10 dakika santrifüj edildikten sonra sedimentin üzerinde kalan kısım dökülerek polimorfonükleer (PMN) hücreler elde edilmiştir. EPC ve MEC flow-sitometrik yöntemle PMN hücrelerden tanımlanmıştır. Flow-sitometri için “Facs-Calibur” flow-sitometri cihazı kullanılmıştır. Flow-sitometrik analiz için her bir örnekten elde edilen 100 µL izole edilmiş, hücre aşağıda belirtilen antikör panelleriyle muamele edilmiştir:

1. FITC işaretli rabbit anti-rat Flk-1 (Santa Cruz), PeCy7 işaretli “mouse monoclonal” CD34 (Santa Cruz) ve PE-işaretli “mouse monoclonal” anti-rat CD146 (R&D Sistemleri).

2. PeCy7 işaretli “mouse monoclonal” CD34 (Santa Cruz), sekonder PE antikoru işaretli goat poliklonal anti-rat CD133 (Santa Cruz) ve FITC işaretli “mouse” anti-rat CD45 (Bioscience).

Flow-sitometrik olarak CD34/CD133/CD45 yüzey işareti taşıyan hücreler EPC, CD34/Flk-1/CD146 yüzey işareti taşıyanlar MEC olarak değerlendirilmiştir. Her bir analiz için 500 000 hücre sayılmış olup, MEC ve EPC sayısı kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bulunan değerler her örnek için kendi lökosit sayısına oranlanarak mutlak rakamlar elde edilmiştir.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Nicel verilerin değerlendirilmesinde, iki bağımsız grup, Student t-test kullanılarak ortalama değerlerine göre karşılaştırılmıştır. Sonuçlarda $p < 0,05$ olması anlamlı farklılık olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

GRUPLARIN VÜCUT AĞIRLIKLARI VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERİ AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmanın başlangıcında grupların ortalama vücut ağırlıkları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışma sonunda tüm grupların vücut ağırlıklarının bazale göre istatistiksel anlamlı olarak arttığı saptanmış, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmanın sonunda ayrıca, hematolojik parametreler de gruplar arası karşılaştırılmış, ancak hemoglobin ve lökosit değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 1).

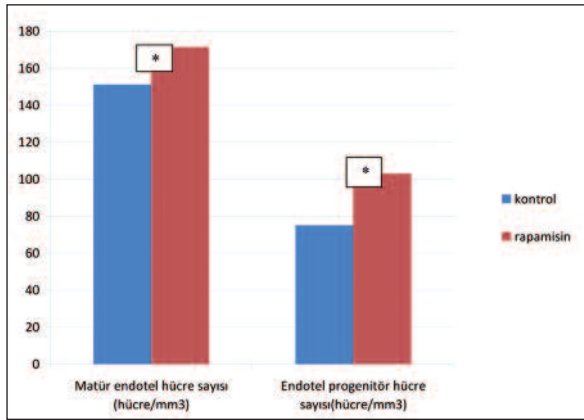
GRUPLARIN MATÜR ENDOTEL HÜCRE VE ENDOTELYAL PROGENİTÖR HÜCRE SAYISI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Rapamisin alan grupta ortalama rapamisin kan düzeyi 8-10 ng/mL arasında saptandı (klinikte kullanılan düzey 5-10 ng/mL). Rapamisinin MEC ve EPC sayıları üzerine olan etkisi Şekil 1’de görülmektedir. Rapamisin uygulanan grupta MEC sayısı, kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptanmıştır (171,42±5,67’e karşı 132±8,72; $p < 0,05$). Ayrıca, rapamisin alan grupta EPC sayısı da kont-

TABLO 1: Çalışmanın sonunda vücut ağırlıkları ve hematolojik parametreler açısından grupların karşılaştırılması.

	Kontrol grubu	Rapamisin grubu	p
Vücut ağırlıkları (g)	368±15	390±15	>0,05
Hemoglobin (g/dL)	14,1±2,14	15,1±0,64	>0,05
Lökosit (hücre/mm ³)	6780±2174	6860±1489	>0,05
EPC (hücre/mm ³)	103±6,85	75±4,11	<0,05
MEC (hücre/mm ³)	132±8,72	171,42±5,67	<0,05

EPC: Endotel progenitör hücre; MEC: Matür endotel hücresi.



ŞEKİL 1: Grupların dolaşan matür endotel hücre ve endotel progenitör hücre sayıları.

*Rapamisin-olan grupta MEC ve EPC sayıları anlamlı olarak daha yüksektir ($p < 0,05$).

rol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($103 \pm 6,85$ 'e karşı $75 \pm 4,11$; $p < 0,05$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, rapamisin ile mTOR inhibisyonu yapılan hayvan modeli kullanılarak, rapamisinin MEC ve EPC üzerine olan etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonunda rapamisin uygulaması EPC sayısında artışa yol açmıştır. Ayrıca, sadece rapamisin uygulanan grupta endotel hasarının bir göstergesi olan dolaşan MEC sayısında artış saptanmıştır.

Rapamisin klinikte lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek etki gösteren antiproliferatif immünsüpresif ajandır. Ancak rapamisinin farklı mekanizmalar kullanarak değişik hücreler üzerine sitotoksik etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmalar arasında apoptozisi ve proapoptotik sinyal indüksiyonu, "caspase" aktivasyonu, ribozomal sinyal yollarını inhibe ederek EPC sayı ve fonksiyonlarında azalmaya neden olması yer almaktadır.^{14,15} İlk olarak, Sugatani ve ark., mTOR inhibisyonu ve "caspase" aktivasyonu arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır.¹⁴ Riesteter ve ark. da endotel hücrelerinde, rapamisin maruziyeti sonrasında "caspase" 3 aktivasyonunun gerçekleştiğini göstermişlerdir.¹⁵ Sonraki çalışmalarda ise rapamisinin ribozomal p70 S6 kinase, BIM ve P13K/AKT gibi hücre sinyal mekanizmalarını süprese ederek

hücre ölümünü tetiklediği, proapoptotik sinyalleri indüklediği gösterilmiştir.^{14,15} Grimaldi ve ark.nın yapmış olduğu bir çalışmada ise rapamisin analogu olan everolimusun EPC üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, everolimusun da apoptozisi artırarak EPC'lerde büyüme inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir.¹⁶

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, farklı gruplar rapamisinin EPC ve MEC üzerine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Miriuka ve ark.nın yapmış olduğu bir çalışmada, in vitro kültür ortamında rapamisinin klinikte kullanılan dozların çok altında dahi EPC ölümüne yol açtığı gösterilmiştir.¹¹ Bu çalışmada rapamisinin spesifik etkisinin, özellikle erken dönem EPC'ler üzerine olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, geç dönem EPC, MEC ve makrofajlar üzerine daha az etki saptanmıştır. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, in vitro kültür ortamındaki hücreler üzerine rapamisinin etkisi değerlendirilmiştir.^{11,12} Bu çalışmalarda MEC üzerine bir etki saptanmaz iken, EPC sayılarında belirgin azalma olduğu görülmüştür. Bu durum, MEC'de rapamisinin hücre içi reseptör sayısının düşük olmasıyla açıklanmıştır. Barilla ve ark., rapamisinin insan endotel hücreleri üzerine olan etkisini incelemiştir. Bu çalışmada insan umbilikal veni ve aort endotel hücreleri rapamisine maruz bırakılmıştır. Yirmi dört saatlik bir inkübasyon dönemi sonrasında, rapamisinin apoptoz ve nekroz yaparak belirgin hücre kaybına yol açtığı gösterilmiştir.¹⁷ Bu çalışmanın sonucunda, uzun dönem rapamisin tedavisinin endotel disfonksiyonuna neden olabileceği savunulmuştur. Wong M ve ark.nın yapmış olduğu bir başka çalışmada ise sirolimusun, in vitro ortamda vasküler progenitör hücrelerin migrasyonunu ve düz kas hücresine diferansiyasyonunu indüklediği gösterilmiştir.¹⁸ Literatürdeki tüm çalışmalar in vitro ortamda yapılırken, yakın zamanda tarafımızdan yapılan çalışmada, literatürde ilk kez rapamisin ve takrolimusun karşılaştırmalı olarak EPC ve MEC'ler üzerine in vivo etkisi değerlendirilmiştir.¹³ Bu çalışmada rapamisin 1 mg/kg/gün dozunda oral gavaj yoluyla, takrolimus ise aynı dozda intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Çalışma sonunda rapamisin, takrolimusa oranla yaklaşık iki kat daha fazla MEC sayı-

sında artışa neden olmuştur. Aynı zamanda bu çalışmanın sonuçlarına göre literatürden farklı olarak rapamisin uygulanan grupta EPC sayısında da artış saptanmıştır. Bu sonuç, çalışmanın in vivo olmasıyla, rapamisin dozunun düşük olmasıyla ve EPC fonksiyonlarının değerlendirilmemiş olmasıyla açıklanmıştır.¹³

Bu çalışmadaki amacımız, rapamisinin daha yüksek dozlarda EPC ve MPC sayıları üzerine olan etkisini değerlendirmektir. Çalışmamızda yüksek doz rapamisin (2 mg/kg/gün, ortalama rapamisin kan düzeyi 12 ng/mL) 28 gün boyunca uygulanarak EPC ve MEC sayıları üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, yüksek doz rapamisin uygulanması hem MEC hem de EPC sayılarında artışa neden olmuştur. Çalışmamızda, rapamisinin in vivo uygulanması sonucunda muhtemelen artmış apoptoz ve nekroz sonucunda endotel hasarı meydana gelmiştir. Daha önceden bahsedildiği gibi, MEC'ler dolaşımında, hasarlı endotelden dökülme yoluyla bulunurlar. Çalışmamızda in vivo rapamisin uygulanması sonucunda dolaşan MEC sayısında artış muhtemelen bu endotel hasarı ile ilişkilidir. Ayrıca, çalışmamızda yüksek doz rapamisin uygulanması literatürden farklı olarak dolaşan EPC sayılarında da artışa neden olmuştur.^{17,19} Bu farklı sonucun öncelikle, çalışmamızın in vivo olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Rapamisin ile meydana gelen endotel hasarına yanıt olarak, vasküler bütünlüğün korunması ve neovaskülarizasyonda yer almak üzere kemik iliğinde EPC'lerin mobilize

olması, EPC sayısındaki artışı açıklayabilir. Tüm bunlarla beraber EPC fonksiyonlarının da en az EPC sayısı kadar önemli olduğu bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, rapamisinin in vitro ortamda EPC proliferasyon ve diferansiyasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir. Butzal ve ark., insan CD133 öncül hücrelerinin endotel hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonuna olanak veren bir kültür ortamı geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, rapamisin doza bağımlı olarak CD133+ hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir. Aynı çalışmada rapamisin tarafından hızlandırılan apoptoz, takrolimusla preinkübasyon yapılarak azaltılmıştır.¹²

Çalışmamızda dolaşan progenitor hücrelerin fonksiyonları kültür ortamında değerlendirilmiştir. Bu nedenle rapamisinin in vivo uygulaması ile sayıca artış gösteren EPC'lerin fonksiyonlarındaki değişiklikler değerlendirilememiştir. Bu durum çalışmamızın en önemli eksikliğidir. Bunun dışında, kullanılan denek sayısının az olması ve rapamisin uygulanan sürenin klinik uygulamalara göre kısa olması da çalışmanın kısıtlayıcı faktörleridir.

SONUÇ

Çalışmamızda uygulanan doz ve sürede rapamisin uygulaması endotel hasarının bir göstergesi olarak dolaşan MEC ve EPC sayılarında artışa neden olmuştur. Rapamisin klinikte uzun süreli kullanımı, uzun vadede endotel hasarına neden olabilir. Ancak, bu konunun daha net aydınlatılması için klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Annuk M, Zilmer M, Fellström B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2003;12(84): S50-3.
2. Eknoyan G. On the epidemic of cardiovascular disease in patients with chronic renal disease and progressive renal failure: a first step to improve the outcomes. *Am J Kidney Dis* 1998;32(5 Suppl 3):S1-4.
3. Pastan S, Bailey J. Dialysis therapy. *N Engl J Med* 1998;338(20):1428-37.
4. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dembach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003;108(20):2511-6.
5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
6. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3422-7.
7. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24): 3009-17.
8. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(7):1185-9.

9. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001;97(11):3658-61.
10. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 2000;65(4):215-20.
11. Miriuka SG, Rao V, Peterson M, Tumiaty L, Delgado DH, Mohan R, et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death. *Am J Transplant* 2006;6(9):2069-79.
12. Butzal M, Loges S, Schweizer M, Fischer U, Gehling UM, Hossfeld DK, et al. Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res* 2004;300(1):65-71.
13. Macunluoglu B, Atakan A, Gökçe I, Ari E, Tulunay A, Demiralp E, et al. Effects of rapamycin and tacrolimus on mature endothelial cells and endothelial progenitor cells. *J Pak Med Assoc* 2012;62(8):822-5.
14. Sugatani T, Hruska KA. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem* 2005;280(5):3583-9.
15. Riesterer O, Zingg D, Hummerjohann J, Bodis S, Pruschy M. Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathway in endothelial cells. *Oncogene* 2004;23(26):4624-35.
16. Grimaldi A, Balestrieri ML, D'Onofrio N, Di Domenico G, Nocera C, Lamberti M, et al. The synergistic effect of everolimus and chloroquine on endothelial cell number reduction is paralleled by increased apoptosis and reduced autophagy occurrence. *PLoS One* 2013;8(11):e79658.
17. Barilli A, Visigalli R, Sala R, Gazzola GC, Parolari A, Tremoli E, et al. In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* 2008;78(3):563-71.
18. Wong MM, Winkler B, Karamariti E, Wang X, Yu B, Simpson R, et al. Sirolimus stimulates vascular stem/progenitor cell migration and differentiation into smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase/ β -catenin signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(10):2397-406.
19. Fukuda D, Sata M, Tanaka K, Nagai R. Potent inhibitory effect of sirolimus on circulating vascular progenitor cells. *Circulation* 2005;111(7): 926-31.