

Agata Głuchowska

**Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe oraz białka wydzielane przez
stare komórki mięśni gładkich aorty – wpływ na funkcje
limfocytów T**

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia

Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Dr hab. Grażyna Mosieniak

Warszawa, 2023

Wyniki umieszczone w niniejszej pracy zostały uzyskane w ramach kierowanego przez dr hab. Grażynę Mosieniak grantu Opus finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (numer projektu badawczego UMO 2014/15/B/NZ3/01150), w którym autorka niniejszej rozprawy doktorskiej pełniła rolę wykonawcy.

Pragnę serdecznie podziękować:

dr hab. Grażynie Mosieniak

za opiekę naukową, pomoc i wskazówki udzielane na każdym etapie powstawania niniejszej pracy oraz nieustające wsparcie i niezwykłą życzliwość w pracy na co dzień

prof. dr hab. Ewie Sikorze

za wsparcie merytoryczne, cenne uwagi oraz codzienną życzliwość

mgr Dorocie Janiszewskiej

za pomoc w doświadczeniach na blaszkach miażdżycowych

koleżankom i kolegom z Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia

za codzienną życzliwość, pomoc i miłą atmosferę pracy na co dzień

prof. dr hab. n. med. Krzysztofowi Bojakowskiemu z Państwowego Instytutu Medycznego MSWiA, Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej

za udostępnienie blaszek miażdżycowych, wsparcie merytoryczne i zaangażowanie w prowadzone badania

dr Paulinie Podszywałow-Bartnickiej z Pracowni Cytometrii

za wsparcie merytoryczne oraz pomoc przy izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

mgr Łukaszowi Bugajskiemu

oraz pozostałym koleżankom i kolegom z Pracowni Cytometrii

za pomoc przy pomiarach cytometrycznych

dr Małgorzacie Śliwińskiej

z Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych

za pomoc i wprowadzenie mnie w świat mikroskopii elektronowej

dr Dominikowi Cysewskiemu

z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN

za wsparcie i pomoc przy analizach proteomicznych

dr Ewie Kozłowskiej

z Zakładu Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego

za pomoc merytoryczną w doświadczeniach z limfocytami

Rodzicom i Mężowi

za wsparcie i wiarę w moje możliwości

Oleńce

Spis treści

Wykaz wybranych skrótów	11
Streszczenie	13
Summary	15
1. Wstęp.....	17
1.1. Starzenie komórkowe	17
1.1.1. Starzenie replikacyjne	17
1.1.2. Starzenie przyspieszone indukowane stresem.....	19
1.1.3. Znaczniki starzenia komórkowego.....	20
1.2. Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem.....	24
1.2.1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nowy element sekretomu komórek starych.....	26
1.3. Rola starzenia komórkowego w organizmie	31
1.3.1. Starzenie komórkowe a choroby związane z wiekiem.....	33
1.3.2. Starzenie komórkowe w rozwoju miażdżycy.....	34
1.3.3. Miażdżyca jako choroba wywołana stanem zapalnym	36
1.3.4. Rola pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w rozwoju miażdżycy	37
2. Założenia i cele.....	39
3. Materiały i metody	41
3.1 Materiały.....	41
3.1.1 Materiał badawczy.....	41
3.1.2 Przeciwciała.....	43
3.1.3 Roztwory	45
3.2 Metody.....	50
3.2.1 Indukcja starzenia	50
3.2.2 Badanie cyklu komórkowego	51
3.2.3 Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem.....	51
3.2.4 Barwienia cytochemiczne.....	52
3.2.5 Badanie poziomu białek metodą Western blotting.....	54
3.2.6 Mikroskopia elektronowa	55
3.2.7 Analiza profilu wydzielniczego komórek VSMC z zastosowaniem mikromacierzy. 57	
3.2.8 Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	59

3.2.9 Izolacja limfocytów T z kożuszka leukocytarno - płytkowego i ich aktywacja.....	63
3.2.10 Badanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty na limfocyty T	66
3.2.11 Analiza statystyczna	68
4. Wyniki.....	69
4.1 Charakterystyka ludzkich komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu przyspieszonemu indukowanemu stresem.....	69
4.1.1 Ocena zahamowania proliferacji w komórkach indukowanych do starzenia oraz w komórkach głodzonych i przegęszczonych	72
4.1.2 Analiza poziomu białka Ki67	73
4.1.3 Analiza cyklu komórkowego.....	75
4.1.4 Ocena aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal).....	78
4.1.5 Analiza poziomu białek związanych ze starzeniem	79
4.1.6 Porównanie procesu przyspieszonego starzenia indukowanego stresem w fibroblastach, preadipocytach oraz VSMC.....	84
4.2 Charakterystyka ludzkich komórek mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	89
4.2.1 Analiza wybranych markerów w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na wczesnym i późnym etapie tego procesu w modelu <i>in vitro</i> oraz komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych	90
4.2.2 Porównanie zmian morfologicznych i ultrastrukturalnych komórek ulegających starzeniu <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i> w oparciu o badanie z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej	95
4.2.3 Porównanie poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem w VSMC ulegających starzeniu <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i>	100
4.2.4 Analiza profilu wydzielniczego komórek VSMC ulegających starzeniu <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i>	105
4.3 Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty.....	110
4.3.1 Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez młode i stare komórki VSMC.....	114
4.3.2 Analiza proteomiczna czynników rozpuszczalnych wydzielanych przez młode i stare komórki VSMC	123
4.3.3 Analiza porównawcza czynników wydzielanych przez różne typy komórek.....	126
4.4 Badanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na aktywację i proliferację limfocytów T	128

4.4.1 Ocena wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na migrację limfocytów T	132
4.4.2 Analiza cytokin wydzielanych przez limfocyty T pod wpływem komórek starych	133
4.4.3 Badanie wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na aktywację limfocytów T.....	134
4.4.4 Badanie wpływu EVs na wydzielanie cytokin przez limfocyty T.....	138
5. Dyskusja	141
5.1 Uniwersalne markery starzenia komórkowego	141
5.2 Charakterystyka procesu starzenia komórkowego <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i>	146
5.3 Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem.....	150
5.4 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich	153
5.5 Wpływ czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich na limfocyty T	155
6. Podsumowanie i wnioski.....	161
6.1 Podsumowanie.....	161
6.2 Wnioski.....	162
7. Bibliografia.....	163
8. Lista publikacji autorki rozprawy	181
9. Suplement pracy.....	183

Wykaz wybranych skrótów

53BP1	<i>p53 binding protein</i> , białko wiążące p53
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> , 5-bromo-2-deoksyurydyna
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i> , wzorce molekularne związane z uszkodzeniem
DDR	<i>DNA damage response</i> , odpowiedź na uszkodzenia DNA
DNA-SCARS	<i>DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i> , odcinki DNA ze zmianami chromatyny wspomagającymi starzenie komórkowe
DSB	<i>double strand breaks</i> , pęknięcia dwóch nici DNA
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> , endosomalny kompleks sortujący wymagany do transportu
EVs	<i>extracellular vesicles</i> , pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
GDF-15	<i>growth differentiation factor 15</i> , różnicujący czynnik wzrostu 15
GDNF	<i>glial cell derived neurotrophic factor</i> , czynnik neurotroficzny pochodzący z komórek glejowych
GM130	<i>cis-Golgi matrix protein</i> , białko macierzy cis-Golgiego
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i> , białko o wysokiej mobilności grupy 1
IFNγ	<i>Interferon gamma</i>
IL	<i>interleukin</i> , interleukina
ILVs	<i>intraluminal vesicles</i> , pęcherzyki powstające w świetle endosomu
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> , metaloproteinaza macierzy międzykomórkowej
MVB	<i>multivesicular body</i> , ciało wielopęcherzykowe
NTA	<i>nanoparticle tracking analysis</i> , analiza polegająca na śledzeniu ruchu nanocząstek
OPG	<i>Osteoprotegerin</i> , osteoprotegeryna
OPN	<i>Osteopontin</i> , osteopontyna
PARP	<i>Poly [ADP-ribose] polymerase 1</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> , antygen jądrowy proliferującej komórki

RS	<i>replicative senescence</i> , starzenie replikacyjne
SA-β-gal	<i>senescence associated β galactosidase</i> , związana ze starzeniem β galaktozydaza
SAHF	<i>senescence-associated heterochromatin foci</i> ; skupiska heterochromatyny związane ze starzeniem
SASP	<i>senescence associated secretory phenotype</i> , fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem
SIPS	stress induced premature senescence, przyspieszone starzenie indukowane stresem
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i> , transformujący czynnik wzrostu beta
THSB1	<i>Thrombospondin 1</i> , trombospondyna 1
TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , czynnik martwicy nowotworu alfa
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , cząsteczka adhezji komórek naczyń 1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> , komórki mięśni gładkich naczyń

Streszczenie

Starzenie komórkowe jest procesem, który istotnie wpływa na funkcjonowanie organizmu. Charakteryzuje się stabilnym i nieodwracalnym zatrzymaniem podziałów komórki, przy jednoczesnym zachowaniu jej aktywności matabolicznej. W trakcie tego wieloetapowego procesu w komórce zachodzi szereg zmian, które prowadzą do osiągnięcia przez komórkę starą określonego fenotypu. Wraz z pojawiającymi się nowymi doniesieniami na temat starzenia komórkowego, rośnie świadomość złożoności i różnorodności tego procesu, który zależy między innymi od typu komórki ulegającej starzeniu czy czynnika wywołującego ten proces.

Jedną z cech komórek starych mającą największe znaczenie fizjologiczne jest tzw. fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*). Opublikowane w ostatnich latach badania sugerują, że istotną i do tej pory mało poznaną rolę w złożonych i zróżnicowanych funkcjach SASP mogą odgrywać pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. *Extracellular vesicles*). Udowodniono, że SASP może przyczyniać się między innymi do powstania przewlekłego stanu zapalnego, który sprzyja chorobom związanym z wiekiem, w tym miażdżycy. Opublikowane do tej pory prace dowiodły obecności starych komórek mięśni gładkich aorty w obrębie blaszki miażdżycowej, gdzie odgrywają istotną rolę w jej rozwoju. Co więcej, wydzielane przez stare komórki czynniki SASP mogą wpływać na sąsiadujące komórki, w tym limfocyty T, i modyfikować mikrośrodowisko tkanki przyczyniając się tym samym do promowania stanu zapalnego.

W pierwszej części niniejszej rozprawy doktorskiej dokonałam charakterystyki i porównania fenotypu przespieszonego starzenia w trzech różnych typach komórek prawidłowych hodowanych *in vitro* i traktowanych doksorubicyną lub nadtlenkiem wodoru. Zmiany w fenotypie komórek starych były porównywane z fenotypem komórek proliferujących oraz komórek spoczynkowych o przejściowo zahamowanej proliferacji. Wykazałam, że zmianami, które najsilniej korelowały ze starzeniem i były dla niego unikalne to spadek poziomu białek jądrowych - laminy B1, HMGB1, PARP1 oraz spadek poziomu białka zaangażowanego w regulację mitozy - cykliny B1. Zmiany te można uznać za uniwersalne markery starzenia.

W dalszej części porównałam starzenie replikacyjne oraz przyspieszone komórek mięśni gładkich aorty, będących na wczesnym oraz późnym etapie tego procesu. Wykazałam, że zmiany obserwowane na wczesnych etapach nasilają się w miarę upływu czasu od zahamowania proliferacji. Obserwowałam między innymi wzrost aktywności SA- β -gal, postępujący spadek poziomu białek HMGB1 oraz laminy B1, wzrost poziomu białka p16 oraz wzrost ilości wydzielanych cytokin. Na podstawie zebranych wyników stwierdziłam, że fenotyp komórek będących na późnym etapie różni się od komórek na wczesnym etapie starzenia i jest zbliżony do fenotypu komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu. Przeprowadziłam również analizę wybranych markerów starzenia w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych jako modelu starzenia w warunkach *in vivo*. W komórkach tych obserwowałam obniżenie poziomu białek, które określiłam, w oparciu o wcześniejsze analizy, jako uniwersalne markery starzenia. Ponadto komórki ulegające starzeniu *in vivo* charakteryzowały się zwiększonym wydzielaniem czynników SASP, a profil wydzielniczy komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych

w znacznym stopniu był podobny do profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu.

Dokonałam charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) wydzielanych przez komórki VSMC. Wykazałam, że ulegające starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu komórki mięśni gładkich aorty wydzielają zdecydowanie więcej EVs. Na podstawie przeprowadzonej analizy proteomicznej pęcherzyków oraz czynników rozpuszczalnych wykazałam różnice w składzie sekretomu komórek młodych i starych, jak i sekretomu komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu.

Oceeniłam wpływ czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich na aktywację, proliferację i migrację limfocytów T oraz na wydzielanie cytokin przez te komórki. Wykazałam, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą regulować aktywację komórek układu odpornościowego poprzez częściowe jej hamowanie, a także promują sekrecję niektórych cytokin produkowanych przez te komórki.

Uzyskane i opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki przyczyniają się do lepszego zrozumienia złożoności procesu jakim jest starzenie komórkowe, a szczegółowa analiza wielu markerów starzenia pozwoliła wytypować te, które potencjalnie mogłyby być uniwersalnymi znacznikami tego procesu. Z kolei badania dotyczące SASP wskazały na potencjalną rolę starych komórek mięśni gładkich aorty w rozwoju miażdżycy między innymi poprzez wpływanie na komórki układu odpornościowego, takie jak limfocyty.

Summary

Cellular senescence is a process that significantly impacts the functioning of the whole organism. It is characterized by a stable and irreversible cell cycle arrest, while maintaining its metabolic activity. During this multi-stage process, a number of changes occur within the cell, which leads to the senescent cell achieving a specific phenotype. Along with new research on cellular senescence, awareness of the complexity and diversity of this process, which depends e.g. on the cell type or the inducing factor, is growing.

One of the most important features of senescent cells that have the greatest physiological significance is senescence-associated secretory phenotype (SASP). Recently published data suggest that extracellular vesicles (EVs) may play an important and so far little-understood role in the complex and diverse functions of SASP. It has been proven that SASP may contribute to chronic inflammation, which promotes age-related diseases, such as atherosclerosis. The studies published so far have demonstrated the presence of senescent vascular smooth muscle cells (VSMC) within the atherosclerotic plaque, where they play an important role in its development. Moreover, SASP factors secreted by senescent cells can influence neighboring cells, including T lymphocytes, and modify the tissue microenvironment, thereby contributing to the promotion of inflammation.

In the first part of this dissertation, I characterized and compared the premature senescence phenotype in three different types of normal cells cultured *in vitro* and induced to senescence by doxorubicin or hydrogen peroxide treatment. Changes in the phenotype of senescent cells were compared with the phenotype of proliferating cells and quiescent cells with temporary inhibited proliferation. I showed that the changes which correlated the most strongly with senescence were a decreased level of nuclear proteins - lamin B1, HMGB1, PARP1 and a decreased level of a protein involved in the regulation of mitosis - cyclin B1. These changes can be considered as universal markers of senescence.

Next, I compared the replicative and premature senescence of VSMC at the early and late stages of this process. I have shown that the changes observed at the early stage intensify over the time after the inhibition of proliferation. I observed an increased activity of SA- β -gal, a decreased level of HMGB1 and lamin B1 proteins, an increased level of p16 protein and an increased amount of secreted cytokines. Based on the obtained results, I concluded that the phenotype of cells in the late state of senescence differs from that in the early state and is resemble the phenotype of cells undergoing replicative senescence. I also analyzed selected markers in smooth muscle cells isolated from atherosclerotic plaques as an *in vivo* model of senescence. I observed a decrease level of proteins that I identified, based on previous analyses, as universal markers of senescence. Moreover, cells undergoing senescence *in vivo* were characterized by increased secretion of SASP factors, and the secretory profile of smooth muscle cells isolated from atherosclerotic plaques was largely similar to the secretory profile of cells undergoing replicative senescence and premature senescence at a late state of this process.

I characterized extracellular vesicles (EVs) secreted by VSMC cells. I have shown that VSMC undergoing replicative and premature senescence secrete significantly more EVs than control one. Based on the proteomic analysis of EVs and soluble factors, I showed differences

in the composition of the secretome of control and senescent cells, as well as the secretome of cells undergoing replicative and premature senescence.

I examined the influence of factors secreted by senescent VSMC on the activation, proliferation and migration of T lymphocytes and on the secretion of cytokines by these cells. I showed that extracellular vesicles can regulate the activation of immune cells by partially inhibiting it, and also promote the secretion of cytokines produced by T cells.

The results obtained and described in this dissertation contribute to a better understanding of the complexity of the cellular senescence process. The detailed analysis of many senescent markers allowed the selection of those that could potentially be universal markers of this process. What is more, research on SASP revealed the role of senescent VSMC cells as an important factor that may contribute to the development of atherosclerosis, by influencing the immune cells, such as lymphocytes.

1. Wstęp

W ostatnich latach odnotowuje się duży wzrost populacji osób starszych. W latach 1950-2017 średnia długość życia kobiet wzrosła z 52,9 do 75,6 lat, natomiast dla mężczyzn wzrosła z 48,1 do 70,5 lat (Mateos i wsp. 2022). Chociaż wzrost długości życia jest pozytywnym efektem poprawy warunków sanitarnych, żywieniowych i społeczno-ekonomicznych na świecie, niesie on ze sobą pewne zagrożenie. W momencie, gdy ludzie osiągają podeszły wiek, często stają w obliczu wieloletniej niepełnosprawności naznaczonej utratą witalności, słabością oraz wieloma chorobami przewlekłymi, takimi jak choroby układu krążenia, nowotwory, choroby zwyrodnieniowe oraz neurodegeneracyjne. To właśnie starzenie się jest głównym czynnikiem ryzyka dla większości chorób przewlekłych, które stają się coraz bardziej rozpowszechnione wraz ze wzrostem liczby osób starszych w społeczeństwie. Jednym z podstawowych procesów, które mogą przyczyniać się do dysfunkcji związanych z wiekiem, jest starzenie komórkowe (ang. *cellular senescence*).

1.1. Starzenie komórkowe

Według definicji starzenie komórkowe to stan stabilnego i nieodwracalnego zatrzymania podziałów komórki, przy jednoczesnym zachowaniu jej aktywności metabolicznej (Campisi 2013). W przeciwieństwie do komórek będących w stanie spoczynku (ang. *quiescent cells*), w których również dochodzi do przejściowego zahamowania proliferacji, komórki ulegające starzeniu są niewrażliwe na czynniki wzrostu i bodźce mitogenne mogące zainicjować podziały komórkowe. W trakcie starzenia w komórce zachodzi szereg zmian, którym towarzyszy pojawienie się charakterystycznych znaczników. Dochodzi między innymi do zmian w strukturze chromatyny oraz zmian w aktywacji ścieżek sygnałowych. Poprzez modyfikację profilu wydzielniczego komórek starych zmienia się również wpływ na komórki sąsiadujące, a nagromadzenie się komórek starych i zwiększona ilość wydzielanych przez nie cytokin prozapalnych przyczynia się do powstawania przewlekłego stanu zapalnego, który sprzyja chorobom związanym z wiekiem. W zależności od początkowego sygnału indukującego starzenie można wyróżnić kilka typów starzenia komórkowego.

1.1.1. Starzenie replikacyjne

Po raz pierwszy starzenie replikacyjne komórek (RS, ang. *replicative senescence*) opisane zostało w 1961 roku przez dwóch uczonych, Leonarda Hayflicka i Paula Moorheda (Hayflick i Moorhead 1961). Zauważyli oni wówczas, że komórki prawidłowe izolowane z tkanek i utrzymywane w hodowli nie dzielą się w nieskończoność, lecz mają ograniczoną zdolność

do podziałów. Obserwacje poczynione przez Hayflicka przeczyły obowiązującej w pierwszej połowie XX wieku teorii Alexisa Carrela, zgodnie z którą komórki hodowane w sprzyjających warunkach mogą dzielić się w nieskończoność (Carrel i Ebeling 1921). Przeprowadzone na fibroblastach doświadczenia pozwoliły Hayflickowi wyróżnić trzy fazy wzrostu komórek. Początkowo komórki intensywnie dzielą się do momentu osiągnięcia pełnej konfluencji, która skutkuje kontaktowym zahamowaniem proliferacji z powodu braku wolnej przestrzeni w naczyniu hodowlanym. Pasaż redukcyjny przywraca możliwość podziałów i komórki wkraczają w drugą fazę wzrostu, pod koniec której tempo proliferacji komórek spada. Czas osiągnięcia pełnej konfluencji wydłuża się i jest zależny od rodzaju komórek. Trzecia, ostatnia faza charakteryzuje się nieodwracalnym zahamowaniem proliferacji. Komórki po przejściu określonej liczby podziałów przestają się dzielić i osiągają tak zwany limit Hayflicka, pozostając aktywne metabolicznie (Hayflick i Moorhead 1961, Hayflick 1965). Zatem starzenie replikacyjne definiuje się jako wyczerpanie potencjału proliferacyjnego połączone z nieodwracalnym zahamowaniem wzrostu. Obecnie wiadomo, że obserwowany przez Hayflicka proces związany jest ze stopniowym skracaniem telomerów. Brak aktywnej telomerazy powoduje, że z każdą rundą replikacji DNA telomery stopniowo skracają się i spada poziom białek telomerowych, co w konsekwencji powoduje, iż wolne końce chromosomów stają się krytycznie krótkie. Proces ten prowadzi do aktywacji ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA damage response*). „Niezabezpieczone” telomerami o określonej długości i strukturze końce chromosomów są rozpoznawane przez białka ścieżki DDR, co prowadzi do aktywacji zależnej od p53 ekspresji inhibitora kinazy zależnej od cyklin – białka p21^{Cip1/Waf} (p21) oraz w konsekwencji do zahamowania cyklu komórkowego (d'Adda di Fagagna 2008). Te uszkodzenia DNA pozostają nienaprawione przez długi czas nie indukując apoptozy (Fumagalli i wsp. 2014). Zaobserwowano także, iż skracanie telomerów w różnych typach komórek następuje wraz ze starzeniem się organizmu (Blasco 2007), jak również towarzyszy wielu chorobom wieku podeszłego, w tym miażdżycy (Matthews i wsp. 2006, McHugh i Gil 2018). Co więcej, wykazano, że genetycznie modyfikowane myszy z konstytutywnie aktywną telomerazą (enzym umożliwiający odbudowywanie telomerów) żyły dłużej od myszy dzikich (Tomas-Loba i wsp. 2008). Z kolei mutacje telomerazy i białek tworzących telomerom, prowadzące do ich skracania, wiążą się z występowaniem szeregu chorób u ludzi mających symptomy przedwczesnego starzenia (Armanios 2009).

1.1.2. Starzenie przyspieszone indukowane stresem

Chociaż początkowo starzenie komórkowe było przede wszystkim powiązane z wyczerpaniem potencjału proliferacyjnego, które następuje w hodowli stopniowo w ciągu kilku tygodni bądź kilku miesięcy w zależności od typu komórek, może ono także pojawić się jako szybka, indukowana w ciągu kilku dni reakcja na stres. Mówimy wówczas o przyspieszonym, przedwczesnym starzeniu wywołanym stresem (SIPS, ang. *stress induced premature senescence*). Wykazano, że m.in. reaktywne formy tlenu, promieniowanie UV lub związki chemiczne (stosowane np. w trakcie chemioterapii) są czynnikami prowadzącymi do pęknięć podwójnej nici DNA i indukującymi starzenie w różnych typach komórek w stosunkowo krótkim czasie (zazwyczaj kilka dni). W przeciwieństwie do starzenia replikacyjnego, w starzeniu przyspieszonym zahamowanie proliferacji, które jest odpowiedzią komórki na stres, nie wynika ze skracania telomerów i jak do niedawna uważano jest niezależne od telomerów. Indukcja SIPS początkowo charakteryzuje się występowaniem losowo w całym genomie uszkodzeń DNA. Jednak to uszkodzenia DNA znajdujące się w obrębie telomerów i pozostające nienaprawione przez dłuższy czas są główną przyczyną trwałego zahamowania proliferacji (Fumagalli i wsp. 2012, de Magalhaes i Passos 2018). Co więcej, do indukcji starzenia przyczynia się także stres oksydacyjny, który może przyspieszać skracanie telomerów (von Zglinicki 2002) oraz ekspresja onkogenów (Serrano i wsp. 1997). Ponadto wykazano, że w starzeniu indukowanym onkogenami szlak DDR jest aktywowany niezależnie od zmian w długości telomerów, jednak wciąż związany jest z ich dysfunkcją (Suram i wsp. 2012).

Niezależnie od rodzaju starzenia i czynnika indukującego go, zaangażowany w niego szlak DDR wiąże się z tworzeniem skupisk γ -H2AX (histon H2AX fosforylowany na Ser139) oraz białka wiążącego p53 (53BP1). Skupiska te gromadzą się wokół pęknięć podwójnej nici DNA (DSB, ang. *double strand breaks*). Dochodzi do aktywacji kaskady kinaz inicjatorowych ATM i ATR, a następnie kinaz punktu kontrolnego cyklu komórkowego CHK1 i CHK2. W konsekwencji prowadzi to do aktywacji szlaku sygnałowego p53/p21 i przejściowego zatrzymania cyklu komórkowego (d'Adda di Fagagna 2008). W przypadku naprawy uszkodzeń, następuje wznowienie cyklu komórkowego i komórka może się dalej dzielić. W momencie gdy naprawa uszkodzeń jest niemożliwa, następuje eliminacja komórki na drodze apoptozy lub dochodzi do trwałego zatrzymania cyklu komórkowego, zahamowania podziałów i indukcji procesu starzenia. W starzeniu komórkowym istotną rolę odgrywają dwa szlaki sygnałowe p53/p21 oraz p16/pRb. Białko p16 ($p16^{\text{INK4a}}$), podobnie jak p21

(p21^{Cip1/Waf}), jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin i może utrzymywać białko pRb w formie aktywnej - hipofosforylowanej. Hipofosforylacja białka Rb powoduje jego wiązanie się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, co hamuje aktywność tego czynnika, który reguluje ekspresję genów niezbędnych do syntezy DNA. Szlak p16/pRb bierze udział w starzeniu indukowanym onkogenami i uczestniczy w powstawaniu skupisk heterochromatyny związanych ze starzeniem (SAHF), które są jednym ze znaczników tego procesu (Larsson 2011, Aird i Zhang 2013).

Zatem starzenie komórkowe można zdefiniować jako odpowiedź komórki na różnego rodzaju czynniki stresowe, takie jak uszkodzenia DNA, onkogeny, reaktywne formy tlenu, które to w konsekwencji prowadzą do indukcji różnych ścieżek sygnałowych prowadzących do zmian w metabolizmie komórki wyrażających się jako złożony fenotyp starzeniowy.

1.1.3. Znaczniki starzenia komórkowego

Niezależnie od tego czy mamy do czynienia ze starzeniem replikacyjnym czy przyspieszonym, fenotyp komórek starych jest podobny. Komórki stare wykazują szereg zmian morfologicznych i funkcjonalnych. Co więcej, podobne zmiany obserwowane są zarówno w przypadku starzejących się komórek prawidłowych - takich jak fibroblasty (Alvarez i wsp. 2017), komórki mięśni gładkich naczyń (Bielak-Zmijewska i wsp. 2014, Przybylska i wsp. 2016) - jak i starych komórek nowotworowych, np. komórek raka okrężnicy (HCT116), komórek raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231), komórek raka płuc (A549) (Mosieniak i wsp. 2015, Bojko i wsp. 2019) i innych (Sikora i wsp. 2019). Warto jednak zaznaczyć, że w chwili obecnej nie ma jednego uniwersalnego markera pozwalającego stwierdzić, że komórka uległa starzeniu. Stąd też, aby móc zidentyfikować komórki stare, należy zbadać szereg cech (Sikora i wsp. 2021).

Jedną z podstawowych zmian, jaką obserwujemy w hodowli podczas starzenia, jest kilkukrotne zwiększenie rozmiarów komórki a także jej spłaszczenie (Rodier i Campisi 2011). Dochodzi również do zmian w składzie lipidowym błony komórkowej, przez co staje się ona bardziej sztywna (Fulop i wsp. 2012). Zmianom ulega również cytoszkielet komórki. W starych komórkach obserwowany jest spadek poziomu aktyny i tubuliny a także wzrost poziomu wimentyny (Nishio i Inoue 2005).

Powszechnie stosowanym markerem, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, jest wzrost aktywności i poziomu enzymu lizosomalnego kwaśnej β -galaktozydazy związanej ze

starzeniem (SA- β -gal, ang. *senescence-associated β -galactosidase*). Wzrost aktywności tego enzymu koreluje ze wzrostem masy lizosomów, obserwowanym w komórkach starych. Za pomocą relatywnie szybkiego i prostego sposobu, opisanego przez Dimri i wsp. (Dimri i wsp. 1995), jesteśmy w stanie wykryć zwiększoną aktywność tego enzymu już w pH 6,0. Pomimo że SA- β -gal jest podstawowym markerem starzenia, to enzym ten nie jest specyficznym markerem tego procesu i nie odgrywa w nim żadnej dotychczas poznanej roli (Lee i wsp. 2006).

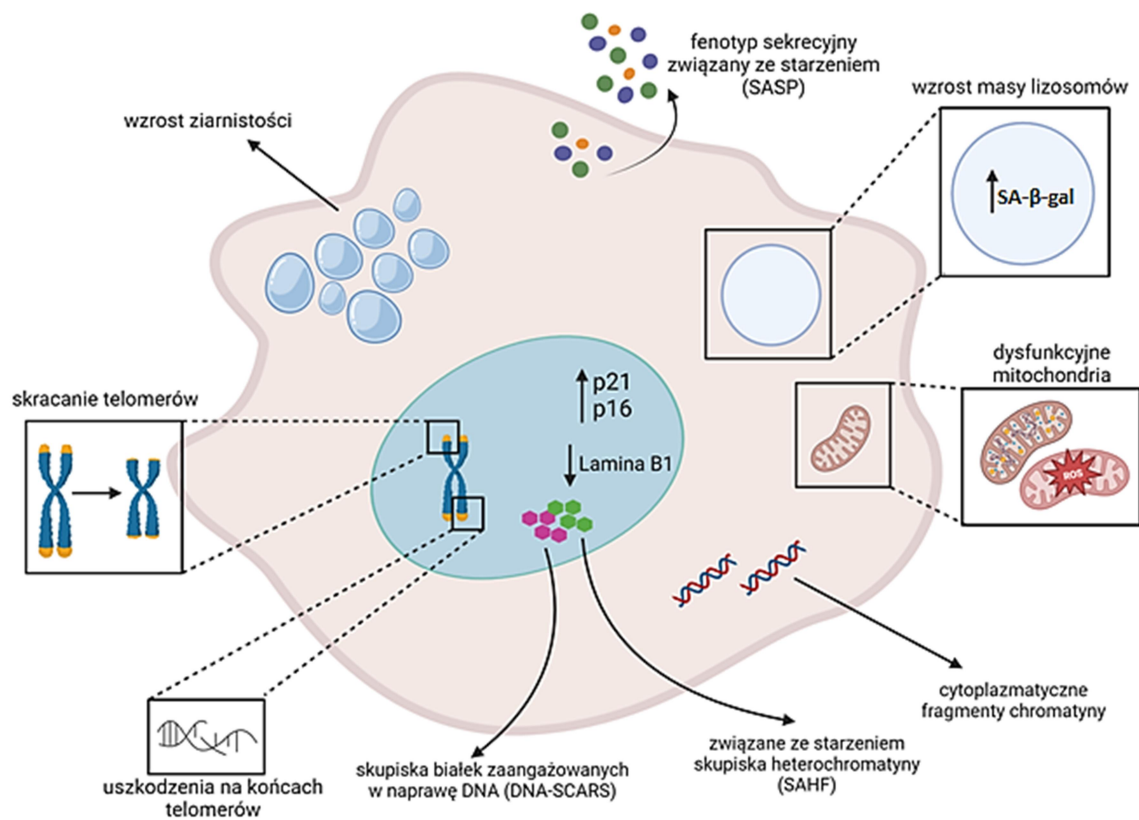
Kolejną cechą komórek starych jest trwałe zatrzymanie proliferacji. Najprostszą metodą oceny, czy komórki proliferują, jest określenie ich liczby w kolejnych dniach hodowli. W momencie zahamowania proliferacji liczba komórek nie ulega zmianie. Komórki niezdolne do proliferacji nie są w stanie syntetyzować DNA. Powszechnie stosowaną metodą pozwalającą ocenić zahamowanie proliferacji jest ocena zdolności komórek do wbudowywania do DNA bromodeoksyurydyny (BrdU) lub 5-etynyl-2-deoksyurydyny (EdU). Innym znacznikiem proliferacji jest białko Ki67, którego niska ekspresja lub jej brak w komórce świadczy o zatrzymaniu proliferacji (Kee i wsp. 2002, Sauerzweig i wsp. 2009).

Zahamowanie proliferacji komórek jest równoznaczne z ich zatrzymaniem w cyklu komórkowym. Warto również zaznaczyć, że brak proliferacji jest również cechą komórek zróżnicowanych, i/lub spoczynkowych. Jednak w wyniku odpowiedniej stymulacji mitogenami, komórki te mogą wznowić podziały. W przypadku starzenia, mamy do czynienia z nieodwracalnym zatrzymaniem cyklu komórkowego. W rzadkich przypadkach, związanych z mutacjami, komórka stara może ponownie wejść w cykl komórkowy, jednak wciąż uważa się, że jest to raczej odstępstwo od reguły niż powszechnie występujący proces (Sikora i wsp. 2021). W zależności od czynnika indukującego starzenie a także od typu komórek do zatrzymania komórek może dojść w fazie G1 lub G2 cyklu komórkowego. Komórki indukowane do starzenia zatrzymują się w fazie G2 (Sliwiska i wsp. 2009, Mosieniak i wsp. 2012), natomiast w przypadku starzenia replikacyjnego zazwyczaj dochodzi do zatrzymania komórek w fazie G1, chociaż część komórek może też gromadzić się w fazie G2 cyklu (Mao i wsp. 2012). Cykl komórkowy jest ściśle kontrolowany za pomocą cyklin, kinaz zależnych od cyklin a także inhibitorów kinaz zależnych od cyklin. Zatem białka odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego wykorzystywane są jako markery starzenia. Wzrost poziomu inhibitorów kinaz cyklinozależnych, takich jak p16 oraz p21, towarzyszy zarówno starzeniu replikacyjnemu jak i przyspieszonemu.

W komórkach ulegających starzeniu w wyniku trwałej aktywacji szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, możemy zaobserwować w jądrze komórkowym skupiska białek będących elementami tego szlaku (DNA-SCARS, ang. *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). Do najczęściej badanych białek należą 53BP1, fosforylowana forma histonu H2AX (γ H2AX) oraz ATM, które tworzą skupiska w miejscu, gdzie doszło do pęknięcia obydwu nici DNA (DSB, ang. *double strand DNA break*). Co więcej, w komórkach starych występują także tzw. skupiska heterochromatyny związane ze starzeniem (SAHF, ang. *Senescence Associated Heterochromatin Foci*), które mogą być wykryte między innymi za pomocą znakowania na obecność histonu H3 ulegającego metylacji w pozycji lizyny 9 (H3 Lys 9). W wyniku starzenia dochodzi do zmian w jądrze komórkowym. Dotyczą one przede wszystkim zmniejszonej funkcjonalności otoczki jądrowej, dekompozycji blaszki jądrowej, reorganizacji struktury chromatyny oraz zmian w oddziaływaniu białek otoczki jądrowej z cytoszkieletem. Obserwowany w komórkach starych spadek laminy B1, białka strukturalnego blaszki jądrowej, prowadzi do destabilizacji integralności jądrowej, a w konsekwencji do utraty kondensacji heterochromatyny i pojawienia się na terenie cytoplazmy fragmentów chromatyny uwolnionej z jądra tzw. cytoplazmatycznych fragmentów chromatyny (CCF, ang. *cytoplasmic chromatin fragments*) (Ivanov i wsp. 2013).

W starych komórkach dochodzi również do zaburzenia prawidłowej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a opisane poniżej klasyczne znaczniki starzenia wskazują na defekty organelli komórkowych. I tak na przykład dysfunkcyjne lizosomy wykazują zwiększoną aktywność SA- β -gal, zaś wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) wynika ze zmian w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Ponadto zmiany w retikulum endoplazmatycznym związane ze starzeniem prowadzą do aktywacji ścieżki odpowiedzi na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR, ang. *unfolded protein response*), a uszkodzenia DNA, zaburzenia w strukturze otoczki jądrowej oraz skupiska heterochromatyny (SAHF) świadczą o zmianach w jądrze komórkowym. Chociaż nadal do końca nie jest wyjaśnione, w jaki sposób dochodzi do wewnątrzkomórkowych zmian w morfologii i funkcji organelli, oraz jakie mechanizmy indukują ich dysfunkcje, są one prawdopodobnie związane ze zmienionym metabolizmem komórkowym towarzyszącym starzeniu. Według jednej z hipotez, zwiększona biogeneza organelli w komórce starej może być odpowiedzią na nieprawidłowe funkcjonowanie tych organelli spowodowane uszkodzeniami związanymi ze stresem oksydacyjnym. Mimo to nowo wytworzone organella,

podlegające ciągłej ekspozycji na szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu pogłębiają jeszcze zaburzenia funkcji w starej komórce (Machado-Oliveira 2020).



Ryc. 1.1 Wybrane znaczniki starzenia komórkowego. Komórka stara charakteryzuje się powiększeniem i spłaszczeniem ciała komórki. Obserwowany jest wzrost masy lizosomów i zwiększona aktywność β-galaktozydazy związanej ze starzeniem, a także dysfunkcyjne mitochondria produkujące reaktywne formy tlenu. W komórkach starych dochodzi również do szeregu zmian na poziomie jądrowym, takich jak spadek poziomu laminy B1 czy skracanie telomerów. Charakterystyczne jest występowanie w jądrze komórkowym skupisk heterochromatyny tzw. SAHF, ang. *Senescence Associated Heterochromatin Foci*, oraz nienaprawionych uszkodzeń DNA identyfikowanych jako tzw. DNA-SCARS, ang. *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*, a także uszkodzeń na końcach telomerów. W cytoplazmie komórki obserwowane są cytoplazmatyczne fragmenty chromaty. Jedną z istotnych cech charakterystycznych dla komórek ulegających starzeniu jest występowanie fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem (SASP). Schemat zmodyfikowano na podstawie (Cohn i wsp. 2023) i wykonano za pomocą programu BioRender.

Starzenie komórkowe jest więc dynamicznym i wieloetapowym procesem, podczas którego właściwości komórek starych nieustannie się zmieniają. W początkowym etapie, komórki przechodzą z przejściowego do trwałego zatrzymania cyklu komórkowego, któremu towarzyszy aktywacja inhibitorów cyklu. Następnie na wczesnym etapie starzenia, komórki nabywają charakterystyczny fenotyp rozpoznawany przez powszechnie stosowane w tym celu

markery. Wreszcie, w wyniku zmian genetycznych i epigenetycznych, komórki przechodzą w stan tzw. późnego starzenia, który charakteryzuje się zróżnicowanym fenotypem.

1.2. Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem

Jedną z istotnych cech, charakterystycznych dla wszystkich komórek ulegających starzeniu, jest występowanie tzw. fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). Pomimo zatrzymania w cyklu i zahamowania proliferacji, komórki stare pozostają stale aktywne metabolicznie i wydzielają szereg czynników, w tym chemokiny i cytokiny prozapalne, takie jak: IL-6, IL-8, CCL2, CXCL1; modulatory wzrostu jak amfiredulina (AREG), insulinopodobne białka wiążące czynnik wzrostu (IGFBP); oraz cząsteczki sprzyjające przetrwaniu, takie jak czynnik neurotroficzny GDNF (Chambers i wsp. 2021). Prowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że w skład fenotypu wydzielniczego wchodzi również setki białkowych i niebiałkowych cząsteczek sygnałowych, w tym proteazy, czynniki hemostatyczne, ceramidy, składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), a także tzw. alarminy - wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (DAMPs, ang. *damage – associated molecular patterns*) (Wiley i wsp. 2019, Basisty i wsp. 2020). Należy jednak zaznaczyć, że fenotyp sekrecyjny jest plastyczny, co oznacza, iż jego skład może się zmieniać w trakcie starzenia, a białka w nim zawarte różnią się w zależności od typu komórek oraz bodźca indukującego starzenie. Trudno też wskazać poszczególne elementy SASP, które są charakterystyczne dla wszystkich starzejących się komórek, zarówno tych zdolnych do proliferacji, jak i komórek postmitotycznych czy nowotworowych.

SASP jest regulowany przez kilka ścieżek sygnałowych i jest ściśle powiązany z DDR. Większość czynników wydzielanych przez komórki stare jest pozytywnie regulowana przez niektóre białka szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, takie jak kinaza ATM, kinaza CHK2 czy białko NBS1 (Rodier i wsp. 2009). W przeciwieństwie do pozytywnej regulacji przez szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA, białko p53 negatywnie reguluje wydzielanie czynników SASP, a inaktywacja tego białka prowadzi do zwiększonej sekrecji niektórych elementów SASP. Co ciekawe, w starzeniu niezależnym od DDR także wykryto niektóre składniki SASP. W komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych ulegających starzeniu w wyniku obniżenia ekspresji oksydazy NADPH 4 (NOX4) zaobserwowano zwiększoną produkcję

IL-6, IL-8 oraz VEGF (Przybylska i wsp. 2016), a sekrecję IL-6 odnotowano także w hodowli

szczurzych komórek kory mózgowej starzejących się niezależnie od uszkodzeń DNA (Piechota i wsp. 2016). Ponadto SASP może być również pozytywnie regulowany przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B. W komórkach starych wczesną odpowiedzią na bodźce indukujące starzenie jest zwiększona ekspresja cytokiny IL-1 α , która wiąże się do receptora błonowego IL1R. Zapoczątkowuje to kaskadę sygnalizacyjną, która ostatecznie aktywuje NF- κ B. Czynniki ten z kolei indukuje transkrypcję genów kodujących cytokiny zapalne, takie jak IL-6 i IL-8. Obniżenie poziomu NF- κ B w fibroblastach indukowanych do starzenia onkogenem oraz w mysim modelu chłoniaka skutkowało zmniejszeniem ekspresji genów SASP i osłabieniem starzenia (Chien i wsp. 2011). Co więcej, wyciszenie p65, który jest składnikiem NF- κ B w komórkach nowotworowych indukowanych do starzenia dokсорubicyną, również prowadziło do obniżenia sekrecji IL-8. Niemniej w tym przypadku nie obserwowano żadnego wpływu na starzenie komórek (Strzeszewska i wsp. 2018). Z kolei aktywacja białka p38MAPK, niezależnie od szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA, prowadziła do indukcji fenotypu wydzielniczego poprzez aktywację NF- κ B. Również cytozolowe fragmenty chromatyny (CCF) są czynnikiem indukującym SASP. Fragmenty chromatyny wykrywane są przez cykliczną syntazę GMP-AMP (cGAS), która następnie wytwarza cykliczny GMP-AMP (cGAMP), aktywując tym samym stymulator genów interferonu (STING). Aktywacja szlaku cGAS/STING uważana jest za kluczowy regulator indukcji SASP (Gluck i wsp. 2017). Co więcej, szlak sygnałowy cGAS/STING jest także zaangażowany w rozpoznawanie transpozonoń L1 w cytoplazmie komórek ulegających starzeniu oraz w aktywację odpowiedzi zapalnej. Aktywacja transpozonoń L1 prowadziła do odpowiedzi na INF-I, a co ciekawe mechanizm ten był aktywny w fibroblastach na tzw. późnym etapie starzenia, czyli kilka tygodni po ustaniu proliferacji (De Cecco i wsp. 2019). Można zatem uznać aktywację transpozonoń L1 za kolejny regulator SASP.

Warto zaznaczyć, że fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem rozwija się stopniowo (przez kilka dni w hodowli) i dopiero po ustabilizowaniu trwałej aktywacji szlaku DDR. Oznacza to, że szybka i przejściowa aktywacja szlaku, pojawiająca się natychmiast po uszkodzeniu DNA, nie powoduje wydzielania czynników wchodzących w skład SASP (Campisi 2013). W związku z dynamicznym i złożonym charakterem fenotypu wydzielniczego, jego aktywność biologiczna jest bardzo różnorodna. Czynniki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu działają zarówno autokrynnie (działanie bezpośrednio na komórki produkujące je), jak i parakrynnie (na komórki sąsiadujące), a działanie ich może mieć zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na procesy zachodzące w organizmie. Białka

wchodzące w SASP mogą wpływać na proliferację i różnicowanie komórek a także sprzyjać transformacji nowotworowej i migracji komórek nowotworowych, co w konsekwencji może prowadzić do powstawania przerzutów (Coppe i wsp. 2010, Takasugi i wsp. 2023). Z drugiej jednak strony SASP może przyczyniać się do powstawania mikrośrodowiska ograniczającego wzrost nowotworu poprzez zmianę polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu M1 hamującego nowotwór (Lujambio i wsp. 2013). Fenotyp wydzielniczy jest także swego rodzaju formą komunikacji z komórkami układu odpornościowego. Wykazano, że chemokiny wydzielane przez komórki, dając sygnał do usunięcia uszkodzonych, niefunkcyjnych lub starych komórek, przeciwdziałają tym samym ich nagromadzeniu się w tkankach. W młodych zdrowych tkankach SASP jest zazwyczaj przemijający i zwykle przyczynia się do zachowania lub przywrócenia homeostazy tkanek. Jednak pojawiająca się wraz z wiekiem zwiększona liczba starych komórek i towarzyszący im SASP są istotnym czynnikiem wielu patologicznych cech starzenia, w tym przewlekłego stanu zapalnego, powstawania nowotworów czy upośledzonej odnowy komórek macierzystych (Tchkonia i wsp. 2013).

1.2.1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nowy element sekretomu komórek starych

Do tej pory opisane powyżej funkcje fenotypu wydzielniczego przypisywano głównie rozpuszczalnym białkom. Jednak pojawiające się w ostatnich latach badania sugerują, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, ang. *extracellular vesicles*) mogą odgrywać kluczową rolę w złożonych i zróżnicowanych funkcjach SASP (Takasugi 2018). Początkowo, po ich odkryciu w 1983 roku, uważane były przede wszystkim za pęcherzyki służące do usuwania uszkodzonych fragmentów organelli lub białek z komórki (Pan i Johnstone 1983). Jednak ostatnio coraz bardziej docenia się ich rolę jako mediatorów w komunikacji międzykomórkowej, zwłaszcza od czasu odkrycia, że EVs mogą dostarczać funkcjonalne RNA i białka do komórek biorców (Valadi i wsp. 2007). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe ogólnie definiowane są jako pęcherzyki otoczone podwójną błoną lipidową, zawierające ogromną różnorodność białek i kwasów nukleinowych i składają się z wysoce heterogennej populacji, która różni się wielkością, funkcją oraz biogenezą.

Najmniejszymi, ale i najszerzej badanymi pęcherzykami są pęcherzyki pochodzenia endosomalnego nazywane egzosomami, których rozmiar zawiera się w przedziale 50 – 150 nm (Thery i wsp. 2018). W wyniku procesu endocytozy tworzą się wczesne endosomy, które następnie wędrują w głąb komórki, tworząc tzw. późne endosomy. W wyniku pączkowania ich błony do wewnątrz, w świetle endosomu powstają pęcherzyki, okraślane jako

intraluminal vesicles (ILVs), które są prekursorami egzosomów. Endosomy zawierające pęcherzyki ILVs, określane są jako ciała wielopęcherzykowe (MVBs, ang. *multivesicular bodies*). Następnie MVBs mogą przemieszczać się w kierunku powierzchni komórki i łącząc się z błoną plazmatyczną, w wyniku egzocytozy, uwalniać na zewnątrz zamknięte pęcherzyki ILVs, które zyskują miano egzosomów.

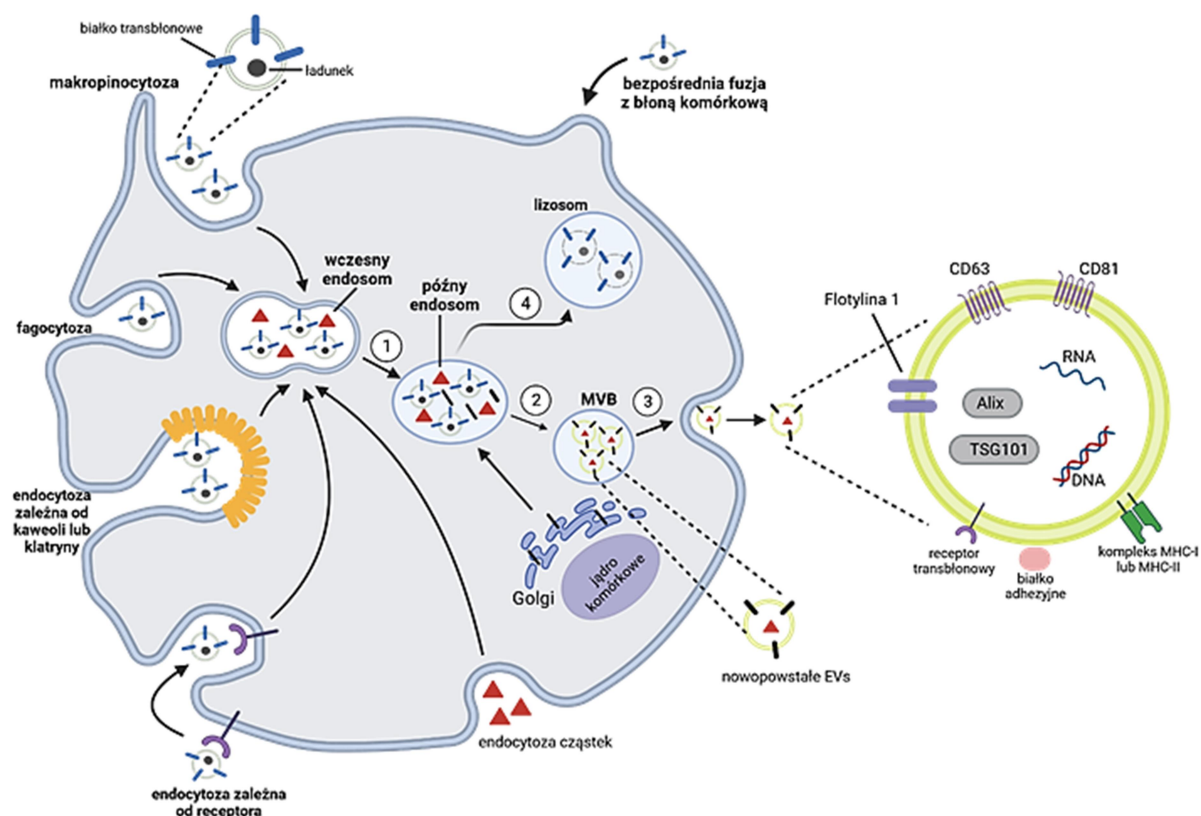
Endosomalny kompleks sortujący wymagany do transportu (ESCRT ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) jest kluczowym szlakiem biogenezy MVBs. Pośredniczy on w rekrutacji specyficznych składników komórkowych (tzw. cargo), takich jak białka, lipidy, mRNA a także w procesie pączkowania oraz oderwania błony endosomalnej. Mechanizm ESCRT składa się z czterech domen, które w sposób stopniowy wykorzystywane są podczas tworzenia MVBs. Początkowo podjednostki ESCRT -0 i -I, takie jak TSG101 oraz białka pomocnicze, takie jak Alix i syntenina, gromadzą transbłonowe i cytoplazmatyczne elementy w mikrodomenach na błonie endosomalnej. Następnie podjednostki ESCRT -II i -III odpowiadają za pączkowanie błony i jej pęknięcie w celu uwolnienia do wewnątrz pęcherzyków ILVs. Białka zaangażowane w tworzenie MVBs, takie jak TSG101 i Alix, uważane są za markery biogenezy egzosomów. Istnieje również niezależny od ESCRT szlak biogenezy MVBs. Wykorzystuje on grupowanie lipidów w kształcie stożka, tym samym powodując spontaniczne pączkowanie błony endosomalnej (Tkach i Thery 2016). Wykazano, że ten alternatywny szlak prowadzi do powstania wzbogaconych w CD63 pęcherzyków ILVs przy wyciszonym szlaku ESCRT (Stuffers i wsp. 2009). CD63 należy do tetraspanin, która wraz z innymi tetraspaninami CD9 i CD81 bierze udział w biogenezie egzosomów, przyczyniając się do sortowania ładunków (tzw. cargo) egzosomalnych. Do tworzenia pęcherzyków ILVs mogą przyczynić się także ceramidy, powstałe w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez obojętną sfingomielinazę 2 (nSMase2), które ułatwiają osiągnięcie wymaganej krzywizny błony endosomalnej prowadząc do pączkowania pęcherzyków ILVs (Trajkovic i wsp. 2008).

Dojrzałe ciała wielopęcherzykowe mogą następnie połączyć się z błoną plazmatyczną w celu wydzielenia egzosomów albo w wyniku fuzji z lizosomami zdegradować swoją zawartość. Wykazano, że w komórkach z upośledzoną funkcją lizosomów zaobserwowano wzrost produkcji egzosomów, działając w ten sposób jako alternatywny mechanizm pozbywania się wadliwych białek (Eitan i wsp. 2016, Schorey i Harding 2016). W wewnątrzkomórkowym transporcie MVBs do błony komórkowej kluczową rolę odgrywają białka z rodziny Rab, takie jak Rab7, Rab11, Rab27a, Rab27b, Rab35 (Savina i wsp. 2002, Ostrowski i wsp. 2010,

Baietti i wsp. 2012). Rab 27a i Rab 27b są również kluczowymi pośrednikami uwalniania egzosomów poprzez regulację fuzji MVBs z błoną plazmatyczną (Ostrowski i wsp. 2010). W przyłączeniu się MVBs do błony komórkowej istotną rolę odgrywają także białka transbłonowe SNARE, takie jak SNAP23, syntaksyna-4 czy VAMP7. W momencie gdy MVBs łączą się z błoną plazmatyczną dochodzi do uwolnienia egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą oddziaływać z macierzą zewnątrzkomórkową, wpływać na sąsiadujące komórki, mogą również dostać się do krążenia przez limfę lub krew, a także mogą zostać pobrane przez komórki biorcy. Istnieje szereg mechanizmów biologicznych, takich jak endocytoza, fagocytoza, makropinocytoza czy też fuzja błon, za pomocą których pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) wiążą się i/lub są internalizowane przez komórki biorcy. Zmienność dróg wychwyty EVs może zależeć od makrocząsteczek obecnych na powierzchni zarówno EVs, jak i komórek biorców (Mulcahy i wsp. 2014). Większość badań sugeruje, że głównym szlakiem wychwyty EV jest endocytoza (Koumangoye i wsp. 2011, Durak-Kozica i wsp. 2018, Yao i wsp. 2018). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być wychwytywane na drodze endocytozy za pośrednictwem receptora. Tetraspaniny (CD9, CD63, CD81) oraz inne cząsteczki obecne na błonie EVs inicjują wiązanie się pęcherzyka do komórki biorcy. Niemniej, niezależnie od ligandów EVs, internalizacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może odbywać się także na drodze endocytozy zależnej od kaweoli, klatryny lub od tratw lipidowych. W wyniku fagocytozy następuje aktywne wchłanianie dużych cząstek zewnątrzkomórkowych do fagosomów, które następnie kierowane są do lizosomów w celu wytworzenia fagolizosomu. Mechanizm ten dotyczy przede wszystkim komórek fagocytarnych, takich jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne (Savina i Amigorena 2007). Mając na uwadze charakter tego procesu, można wnioskować, że dotyczy on głównie dużych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych takich jak ciała apoptotyczne oraz mikropęcherzyki. Zdarza się jednak, że pęcherzyki o wielkości mniejszej niż 100 nm są pobierane na drodze fagocytozy (Kuhn i wsp. 2014, Kettler i wsp. 2016). Niemniej biorąc pod uwagę rolę komórek fagocytarnych, pobrane przez nie EVs trafiają do organelli bogatych w enzymy trawienne powodując ich zniszczenie (Feng i wsp. 2010). Zatem fagocytoza stanowi raczej środek eliminacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych aniżeli proces pośredniczący w komunikacji między komórkami. Trzecim mechanizmem internalizacji EVs jest makropinocytoza. Aczkolwiek proces ten nie jest specyficznym ukierunkowany na cząsteczki znajdujące się w środowisku

zwnątrzkomórkowym, przez co wychwyt EVs może wynikać jedynie z ich obecności w pobliżu błony komórkowej. Rycina 1.2. przedstawia schemat różnych procesów uczestniczących w wychwycie pęcherzyków zwnątrzkomórkowych jak też tworzeniu egzosomów.



Ryc. 1.2 Cykl obiegu pęcherzyków zwnątrzkomórkowych Pęcherzyki zwnątrzkomórkowe mogą być wychwytywane przez komórkę biorcy na drodze: endocytozy za pośrednictwem receptora, endocytozy zależnej od kaweoli lub klatryny, fagocytozy, makropinocytozy bądź bezpośredniej fuzji z błoną komórkową. Endocytoza prowadzi do powstania wczesnego endosomu, a następnie dojrzewania późnego endosomu (1). Pęcherzyki wewnątrz światła (ILV) powstają w wyniku pączkowania do wewnątrz błony endosomu i tworzą ciała wielopęcherzykowe (MVB) (2). Późne endosomy lub MVB ulegają fuzji z błoną komórkową w celu uwolnienia nowo utworzonych EVs (3) lub mogą łączyć się z lizosomem w celu degradacji zawartości EVs (4). Schemat zmodyfikowano na podstawie (Moller i Lobb 2020) i wykonano za pomocą programu BioRender.

Oprócz egzosomów, do pęcherzyków zwnątrzkomórkowych możemy zaliczyć także mikropęcherzyki (MVs, ang. *microvesicles*), które mogą bezpośrednio pączkować i odrywać się od błony plazmatycznej. Są one mniej jednorodnie pod względem wielkości, bowiem ich rozmiar waha się od 100 nawet do 1000 nm. Chociaż wiele białek, takich jak białka ESCRT czy tetraspaniny, są wzbogacone w egzosomach i często stosowane są jako ich markery, niekoniecznie są one specyficzne tylko dla egzosomów (Witwer i wsp. 2013). Ciężko zatem jednoznacznie przypisać określoną funkcję pęcherzyków zwnątrzkomórkowych wyłącznie

danej subpopulacji. W związku z tym w dalszej części rozprawy doktorskiej używany będzie ogólny termin „pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” (EVs) zamiast odnosić się do konkretnych subpopulacji.

Podczas gdy wzmożony sekretom komórek starych był szeroko badany na przestrzeni lat, to zmiany w wydzielaniu EVs przez komórki stare dopiero niedawno spotkały się z dużym zainteresowaniem naukowców. Lehmann jako pierwszy w 2008 roku zbadał związek między EVs a starzeniem, pokazując że w indukowanym promieniowaniem starych ludzkich komórkach raka prostaty obserwowany jest wzrost produkcji EVs (Lehmann i wsp. 2008). Badanie przeprowadzone niedawno na ludzkich fibroblastach TIG-3 także wykazało, że komórki te produkują większą liczbę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na bodźce indukujące starzenie, w tym doksorubicynę czy onkogenną ekspresję genu RAS (Takasugi i wsp. 2017). Co więcej, wzrost sekrecji EVs potwierdzono w modelach komórek indukowanych do starzenia takimi czynnikami jak chemioterapeutyki (Kavanagh i wsp. 2017), H₂O₂ (Terlecki-Zaniewicz i wsp. 2018), promieniowanie (Basisty i wsp. 2020) oraz w starzeniu replikacyjnym (Mensa i wsp. 2020). Nieznane są jeszcze dokładne mechanizmy odpowiadające za zwiększoną produkcję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w komórkach starych. Jednak niedawno opublikowane badania wskazują dysfunkcyjną aktywność lizosomalną jako główny czynnik mający wpływ na tempo produkcji EVs przez komórki stare. Sztuczne obniżenie pH lizosomalnego w starych ludzkich fibroblastach skórnych zaburzało produkcję EVs, podczas gdy wzrost pH w proliferujących komórkach wpływał na zwiększoną produkcję pęcherzyków (Choi i wsp. 2020).

Zawartość pęcherzyka zewnątrzkomórkowego pochodzi z komórki, z której został wydzielony na zewnątrz, co w pewien sposób może dostarczyć informacji o tej komórce w momencie produkcji EVs. W wyniku indukcji starzenia, w komórce dochodzi do wielu zmian, co sugeruje, że zmianie może ulec także skład pęcherzyków pochodzących z takiej komórki. W trakcie starzenia w komórce dochodzi między innymi do dysfunkcji mitochondriów, a stres oksydacyjny jest kluczowym czynnikiem indukującym starzenie. Indukcja starzenia za pomocą H₂O₂ prowadzi do zwiększonej produkcji EVs. Co więcej, mitochondrialne DNA (mtDNA) zostało również zidentyfikowane w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z astrocytów oraz mioblastów (Guescini i wsp. 2010), co sugeruje możliwość pozbywania się nieprawidłowych składników mitochondrialnych przy pomocy pęcherzyków. W 2007 roku Valadii i wsp. po raz pierwszy

zademonstrowali funkcjonalny transfer kwasów nukleinowych pomiędzy komórkami za pośrednictwem EVs (Valadi i wsp. 2007). W tym przypadku był to transfer RNA z mysich do ludzkich komórek tucznych poprzez EVs, potwierdzający kluczową rolę pęcherzyków w komunikacji międzykomórkowej. Indukcja starzenia w wyniku nadekspresji miR-433 w komórkach raka jajnika A2780 również skutkowała upakowaniem miR-433 do EVs. Pęcherzyki zawierające miR-433 miały wpływ na parakrynną odpowiedź komórek biocyty na starzenie (Weiner-Gorzal i wsp. 2015). Co więcej, EVs wyizolowane z komórek starych promowały proliferację kilku typów komórek nowotworowych, podczas gdy zebrana z komórek starych pożywka kondycjonowana pozbawiona EVs osłabiła proproliferacyjny wpływ na komórki raka piersi MCF-7 (Takasugi i wsp. 2017). Opublikowane w ostatnim czasie badania sugerują, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być potencjalnymi mediatorami komunikacji komórkowej pomiędzy komórkami ulegającymi starzeniu a lokalnym mikrośrodowiskiem. Wykazano bowiem, że EVs pochodzące z fibroblastów indukowanych onkogenem RAS przyczyniają się do starzenia sąsiadujących komórek (Borghesan i wsp. 2019), a zahamowanie produkcji EVs było wystarczające, aby obniżyć sekrecję czynników SASP w sąsiadujących komórkach.

1.3. Rola starzenia komórkowego w organizmie

Starzenie komórkowe jest uniwersalnym i fundamentalnym procesem, który istotnie wpływa na funkcjonowanie całego organizmu a jego znaczenie zmienia się wraz z wiekiem. Obecność starych komórek potwierdzono w różnych tkankach i narządach, a ich liczba skorelowana jest z wiekiem (van Deursen 2014). W młodym organizmie starzenie komórkowe odgrywa szczególną rolę w utrzymaniu homeostazy. Komórki, w których doszło do uszkodzenia materiału genetycznego, przestają się dzielić i ulegają starzeniu, wydzielając przy tym szereg cytokin, które następnie są rozpoznawane przez komórki żerne układu odpornościowego przyczyniając się do eliminacji komórek starych. Zahamowanie proliferacji komórek z uszkodzonym DNA oraz ich usuwanie zabezpiecza przed ich potencjalną transformacją nowotworową. Starzenie komórkowe ma także istotny wpływ na gojenie się ran i regenerację tkanek. W odpowiedzi na uszkodzenia dochodzi lokalnie do intensywnej proliferacji komórek i odbudowy uszkodzonej tkanki. W wyniku wzmożonej proliferacji, komórki produkują dużą ilość białek, w tym metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej i chemokiny. Metaloproteiny usuwają różnicujące w fibroblasty komórki, które są przyczyną powstawania zwłóknień i blizn. Natomiast chemokiny są odpowiedzialne za rekrutację

komórek NK układu odpornościowego, które poprzez eliminację starych komórek niwelują stan zapalny (Krizhanovsky i wsp. 2008).

Co ciekawe, starzenie komórkowe bierze również udział w embriogenezie, w której do prawidłowego przebiegu i formowania organów niezbędna jest eliminacja nieprawidłowych komórek. Kluczowym białkiem zaangażowanym w starzenie podczas rozwoju jest p21, a jego aktywacja nie zależy od p53. Nie zaobserwowano również obecności białka p16 oraz skupisk γ H2AX, które świadczyłyby o uszkodzeniach materiału genetycznego. Obecność starych komórek, które wykazywały podwyższoną aktywność SA- β -gal, potwierdzono w grzbietowo-wierzchołkowej części ektodermy oraz blaszce grzbietowej cewy nerwowej (Storer i wsp. 2013, Munoz i wsp. 2015). Komórki stare pojawiają się w określonych miejscach i określonym czasie rozwoju płodu, a następnie usuwane są przez komórki układu odpornościowego, dzięki czemu możliwe jest uformowanie struktur docelowych. Sugeruje się, że starzenie komórkowe w procesie embriogenezy może pełnić podobną rolę co programowana śmierć komórkowa. Pomimo pozytywnych aspektów starzenia komórkowego opisanych powyżej, komórki stare mogą mieć przede wszystkim negatywny wpływ na organizm. Akumulacja komórek starych w tkankach i zwiększona sekrecja czynników SASP prowadzi do powstania stanu zapalnego. O ile przejściowy stan zapalny występujący podczas gojenia ran czy kontaktu z patogenami jest dobroczynny dla organizmu, o tyle długotrwały stan zapalny nie wpływa korzystnie na organizm i może być przyczyną destrukcji tkanek. Wykazano, że wraz z wiekiem rośnie liczba komórek starych w organizmie, co w konsekwencji prowadzi do pojawienia się przewlekłego stanu zapalnego, który promuje rozwój większości chorób wieku podeszłego. Co więcej, wykazano, że starzenie komórkowe jest także przyczyną starzenia się organizmu. Potwierdziły to badania przeprowadzone na transgenicznym myszom ulegającym przyspieszonemu starzeniu (myszy BubR1^{H/H}). W modelu tym, myszy cechowały się obniżonym poziomem białka BubR1, które związane jest z punktem kontroli wrzeciona podziałowego i jest niezbędne podczas prawidłowego podziału komórki. Eliminacja komórek starych u tych myszy opóźniła wystąpienie objawów starzenia, a myszy te charakteryzowały się grubszą tkanką tłuszczową i lepszą ogólną sprawnością (Baker i wsp. 2011). Przeprowadzone przez tę grupę dalsze badania pokazały, że eliminacja komórek starych u zdrowych myszy wydłuża funkcjonalność tkanek, chroni przed nowotworami oraz łagodzi skutki uboczne chemioterapii (Baker i wsp. 2016). Co więcej, usunięcie za pomocą gancyklowiru komórek starych u myszy poddanych

wcześniejszej chemioterapii, ograniczało nawrót nowotworu i przerzuty oraz zmniejszało skutki uboczne wywołane terapią (Demaria i wsp. 2017).

1.3.1. Starzenie komórkowe a choroby związane z wiekiem

Wraz z wiekiem obserwujemy u ludzi między innymi spadek odporności, zmniejszenie elastyczności skóry, siwienie, upośledzenie słuchu i wzroku czy też stopniowy zanik masy kostnej (osteoporoza). Są to uniwersalne cechy, które dotyczą niemal każdej osoby w podeszłym wieku. Oprócz występowania wymienionych cech, starzenie wiąże się również z upośledzoną zdolnością regeneracji oraz zwiększoną zapadalnością na tak zwane choroby związane z wiekiem. Do chorób tych możemy zaliczyć: choroby układu krążenia (miażdżyca, nadciśnienie), zaćma, jaskra, cukrzyca typu II, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona) (Bielak-Zmijewska i wsp. 2014). Wraz z wiekiem obserwowany jest także wzrost zapadalności na niektóre nowotwory. Wykazano, że rozwojowi chorób związanych z wiekiem towarzyszy akumulacja komórek strych w obrębie określonych tkanek. I tak na przykład u pacjentów z cukrzycą typu II obserwowano podwyższony poziom białek p53 i p21 w komórkach tkanki tłuszczowej - adipocytach (Minamino i wsp. 2009). Z kolei w badaniach przeprowadzonych na mysich modelach cukrzycy i otyłości zaobserwowano podwyższony poziom reaktywnych form tlenu i cytokin zapalnych w tkance tłuszczowej (Minamino 2010). Zapadalność na choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, rośnie po 60. roku życia. U osób cierpiących na te schorzenia wykazano obecność markerów starzenia komórkowego. W zmienionych na skutek choroby Alzheimera płytkach β -amyloidu zaobserwowano zwiększoną ekspresję p16 i czynników związanych z SASP (Bhat i wsp. 2012, Tan i wsp. 2014). Co więcej, w mysim modelu choroby neurodegeneracyjnej zależnej od białka tau stwierdzono akumulację białka p16 w astrocytach i mikrogleju, a eliminacja tych komórek u myszy transgenicznych zapobiegała hiperfosforylacji rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego białka tau, zachowując w ten sposób funkcje poznawcze (Chinta i wsp. 2018). Obecność starych fibroblastów i komórek nabłonkowych stwierdzono w tkance płucnej ludzi i myszy dotkniętych idiopatycznym włóknieniem płuc (IPF), które prowadzi do skrócenia długości życia (Hashimoto i wsp. 2016). Wykorzystując myszy transgeniczne INK-ATTAC, u których za pomocą bleomycyny wywołano uszkodzenie płuc (jako model IPF), wykazano, że usunięcie ulegających starzeniu komórek zmniejsza objawy choroby i poprawia czynności płuc (Schafer i wsp. 2017). To tylko niektóre przykłady świadczące o istnieniu związku pomiędzy starzeniem komórkowym a rozwojem chorób związanych z wiekiem.

1.3.2. Starzenie komórkowe w rozwoju miażdżycy

Zmiany w układzie naczyniowo-sercowym należą do jednych z najczęstszych dolegliwości wieku podeszłego. Po 55. roku życia odnotowuje się gwałtowny wzrost występowania takich chorób jak nadciśnienie czy miażdżycy (Niccoli i Partridge 2012). Miażdżycy jest chorobą przewlekłą, polegającą na powstawaniu zmian w tętnicach prowadzących do formowania tzw. blaszek miażdżycowych, które charakteryzują się gromadzeniem lipidów w ścianie naczyń, rekrutacją komórek zapalnych i powstaniem lokalnego stanu zapalnego, proliferacją i migracją komórek mięśni gładkich, tworzeniem komórek piankowatych, apoptozą i martwicą, zwapnieniem oraz jej zwłóknieniem (Hansson 2005, Grootaert i Bennett 2021). Blaszkę miażdżycową powodują zwężenie światła naczynia ograniczając przepływ krwi, jednak jedną z najpoważniejszych konsekwencji miażdżycy jest pęknięcie blaszki prowadzące do powstania skrzepu, który po oderwaniu się od blaszki może spowodować zatkanie światła naczynia. W efekcie może dojść do przejściowych ataków niedokrwienych bądź udaru. Prawdopodobieństwo pęknięcia blaszki miażdżycowej jest większe w tzw. niestabilnej, zwykle dojrzałej blaszce, a mniejsze - w stabilnej (Mori i wsp. 2018).

Ściana tętnicy ma strukturę trójwarstwową. Najbardziej zewnętrzna warstwa zawiera zakończenia nerwowe, komórki tuczne oraz mikronaczynia, które odżywiają zewnętrzną warstwę błony śluzowej. Środkowa warstwa składa się ze spoczynkowych komórek mięśni gładkich i dobrze zorganizowanej macierzy pozakomórkowej zawierającej elastynę, kolagen i inne makrocząsteczki. Blaszkę miażdżycową tworzy się w najbardziej wewnętrznej warstwie błony wewnętrznej i główną rolę w jej rozwoju odgrywają komórki śródbłonna, komórki układu odpornościowego oraz komórki mięśni gładkich naczyń (Rognoni i wsp. 2015). W obszarach podatnych na uszkodzenia zmiany miażdżycowe zaczynają rozwijać się pod nienaruszonym, ale nieszczelnym i dysfunkcyjnym śródbłonkiem. Wewnątrz komórek śródbłonna dochodzi do aktywacji szlaków sygnałowych i zaburzenia funkcjonowania tych komórek. Dochodzi również do obniżenia wydzielania tlenu azotu NO, który odpowiada między innymi za utrzymywanie ciągłości bariery mechanicznej chroniącej wewnętrzne warstwy ściany naczyń krwionośnych. W początkowym etapie powstawania zmian chorobowych, cząsteczki lipoprotein o małej gęstości (LDL) gromadzą się w błonie wewnętrznej, gdzie ulegają utlenieniu i innym modyfikacjom, czyniąc je prozapalnymi i immunogennymi.

Za stabilność blaszki miażdżycowej w dużej mierze odpowiadają komórki mięśni gładkich naczyń (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cells*) znajdujące się w czapeczce, które produkują duże ilości kolagenu, elastyny, proteoglikanów oraz składników macierzy pozakomórkowej. We wczesnym stadium rozwoju blaszki obserwuje się zwiększoną aktywność proliferacyjną tych komórek w porównaniu z proliferacją w nienaruszonej ścianie naczynia. Natomiast zaawansowana blaszka miażdżycowa charakteryzuje się bardzo niskim wskaźnikiem proliferacji (Bennett i wsp. 2016). Co więcej, zwiększoną proliferację VSMC obserwuje się również podczas procesu naprawy po pęknięciu blaszki miażdżycowej, co dowodzi istotnemu znaczeniu proliferacji VSMC w stabilizacji i naprawie blaszki (Bennett i wsp. 2016). Niestety zdolność komórek mięśni gładkich do wchodzenia w cykl komórkowy znacznie spada w miarę postępu miażdżycy i ostatecznie komórki te nie są w stanie naprawić pęknięć i uszkodzeń blaszki miażdżycowej, mimo że znajdują się w mikrośrodowisku bogatym w mitogeny. Co więcej, we wczesnych stadiach zmian miażdżycowych obserwowano częstsze podziały VSMC i znacznie wydajniejszą naprawę blaszek w porównaniu do stadiów zaawansowanych (Gorenne i wsp. 2006, Basatemur i wsp. 2019). Uważa się, że przyczyną tego zjawiska jest starzenie komórkowe. Komórki izolowane bezpośrednio z blaszki miażdżycowej i hodowane w warunkach *in vitro* wykazują zmiany morfologiczne i biochemiczne typowe dla procesu starzenia (Grootaert i wsp. 2018). VSMC pochodzące z blaszki mają krótsze telomery, wykazują niższe tempo proliferacji oraz niższy odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego. Hodowane *in vitro* przechodzą mniej podziałów niż komórki VSMC izolowane od tego samego pacjenta z fragmentów niezmiennego, prawidłowego naczynia (Bennett i wsp. 1995, Bennett i Boyle 1998). Ponadto komórki te posiadają podwyższony poziom SA- β -gal, inhibitorów cyklu komórkowego (p16 oraz p21) oraz uszkodzeń DNA jak również skrócone telomery (Gorenne i wsp. 2006, Wang i wsp. 2015, Garrido i wsp. 2022). Zatem obecne w blaszce miażdżycowej komórki VSMC ulegają starzeniu zarówno replikacyjnemu, jak i przyspieszonemu. Istotną rolę w indukcji procesu starzenia komórek VSMC zachodzącego w blaszkach miażdżycowych odgrywa podwyższony poziom reaktywnych form tlenu, o czym świadczą wykrywane oksydacyjne uszkodzenia DNA.

Wykazano również, że stare komórki VSMC nabierają cechy fenotypu osteoblastów i zwiększają swoją podatność na zwapnienie poprzez wzrost ekspresji różnych białek charakterystycznych dla komórek kościotwórczych (Nakano-Kurimoto i wsp. 2009). Poza starzeniem istotny wpływ na strukturę blaszki ma również apoptoza komórek VSMC,

obserwowana głównie w zaawansowanej blaszce. Pozostałości umierających apoptotycznie komórek VSMC znajdujące się w blaszce mogą powodować mikrozwapnienia blaszki, które to również zwiększają prawdopodobieństwo jej pęknięcia (Proudfoot i wsp. 2000, Otsuka i wsp. 2014). Coraz więcej dowodów wskazuje, że komórki VSMC odgrywają istotną rolę w rozwoju miażdżycy. Proliferacja i migracja tych komórek ułatwiają wczesny rozwój zmian chorobowych, ale są równie ważne dla utrzymania stabilności blaszki miażdżycowej poprzez utrzymanie ochronnej czapeczki pokrywającej rdzeń lipidowy w zaawansowanych stadiach chorobowych.

1.3.3. Miażdżycy jako choroba wywołana stanem zapalnym

Stan zapalny odgrywa istotną rolę w inicjacji, progresji i destabilizacji blaszki miażdżycowej. Najbardziej licznymi komórkami układu odpornościowego mającymi wpływ na rozwój stanu zapalnego są makrofagi, choć należy wskazać także na limfocyty T i B. Monocyty krążące w krwioobiegu mogą wiązać się z cząsteczkami adhezyjnymi VCAM1 ulegającymi ekspresji przez aktywowane komórki śródbłonna i wędrować do warstwy wewnętrznej ściany tętnicy. Dodatkowo niektóre chemokiny mogą promować migrację monocytów do ściany tętnicy. Monocyty te inicjują powstanie rdzenia bogatego w cholesterol, komórki dendrytyczne oraz komórki tuczne. Znajdujące się w błonie wewnętrznej monocyty dojrzewają do makrofagów, które wiążąc cząsteczki lipoprotein, przekształcają się w komórki piankowe. Produkowane przez makrofagi czynniki wzrostu stymulują proliferację komórek mięśni gładkich znajdujących się w wewnętrznej warstwie ściany naczynia. Pod wpływem PDGF, FGF i MMP komórki mięśni gładkich znajdujące się w środkowej warstwie są pobudzone do ukierunkowanej migracji do miejsca tworzenia rdzenia blaszki miażdżycowej (Johnson 2014). W odpowiedzi na produkowany przez makrofagi transformujący czynnik wzrostu TGF wydzielają wieloskładnikową macierz zewnątrzkomórkową zawierającą kolagen, proteoglikany oraz elastynę. Macierz ta pokrywa wytworzony przez komórki piankowe i inne komórki układu odpornościowego rdzeń blaszki, tworząc w ten sposób włóknistą strukturę zwaną czapeczką.

We wczesnych stadiach miażdżycy tętnic makrofagi odpowiadają za usuwanie reaktywnych, uszkodzonych i utlenionych cząstek lipoprotein o małej gęstości (oxLDL). W późniejszych etapach, w wyniku akumulacji wewnątrz komórki oxLDL, dochodzi do upośledzenia fagocytozy makrofagów i ich śmierci (Zhu i wsp. 2018). Martwe komórki i ich fragmenty przyczyniają się do powstania prozakrzepowego nekrotycznego rdzenia charakterystycznego

dla dojrzałej blaszki miażdżycowej. Gromadzące się w obrębie blaszek miażdżycowych czynniki należące do DAMPs (wzorce molekularne związane z uszkodzeniami), stanowią źródło endogennych ligandów, które aktywują makrofagi. Co więcej, kryształy cholesterolu powstające w wyniku przemiany fazowej cholesterolu mogą prowadzić do aktywacji inflammasomu Nlrp3 i produkcji prozapalnej IL-1 i IL-18 (Christ i wsp. 2016, Kong i wsp. 2022).

Limfocyty T, choć mniej licznie niż monocyty, również migrują do warstwy wewnętrznej i mogą odgrywać istotną rolę w regulacji funkcji komórek odpornościowych oraz komórek śródbłonna i komórek mięśni gładkich. Produkcja takich cytokin jak IL-12 czy IL-18 prowadzi do aktywacji limfocytów pomocniczych Th1. Z kolei cytokiny zapalne wytwarzane przez komórki Th1 (głównie INF i TNF) oraz ekspresja ligandu CD40 na powierzchni tych komórek prowadzi do produkcji proteaz i innych mediatorów prozapalnych oraz aktywacji makrofagów, komórek śródbłonna oraz przyczynia się do hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich i produkcji kolagenu. Zmiany te prowadzą do zmniejszenia stabilności blaszki miażdżycowej oraz zwiększenia ryzyka jej pęknięcia. Z drugiej strony wydzielane przez limfocyty regulatorowe Treg oraz limfocyty Th2 cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-10 i TGFB osłabiają stan zapalny blaszki i przyczyniają się do jej stabilizacji. Zatem zarówno inicjacja, rozwój oraz ostatecznie pęknięcie blaszki miażdżycowej jest ściśle kontrolowane przez czynniki wydzielane przez komórki zaangażowane w tworzenie blaszki. Do czynników tych należą chemokiny, cytokiny prozapalne i przeciwzapalne oraz metaloproteiny (Soehnlein i Libby 2021).

1.3.4. Rola pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w rozwoju miażdżycy

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe także mają swój udział w powstawaniu i utrzymywaniu się stanu zapalnego w organizmie. Komórki wykorzystują EVs do usuwania resztek komórkowych w przypadku nieprawidłowego funkcjonowania lizosomów (Eitan i wsp. 2016). Co za tym idzie, EVs mogą pośredniczyć w rozprzestrzenianiu się nieprawidłowo sfałdowanych i patogennych białek, nie tylko do pobliskich, lecz także odległych komórek, przemieszczając się w układzie krążenia i limfatycznym. Wykazano, że zmiany miażdżycowe zawierają i uwalniają EVs, pochodzące z leukocytów, płytek krwi, komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna, na wszystkich etapach rozwoju miażdżycy (van der Vorst i wsp. 2018). Dowiedziono również, że egzozomy pochodzące z aktywowanych limfocytów T były wzbogacone w cholesterol, a hodowla monocytów w obecności egzozomów zwiększała

akumulację cholesterolu w tych komórkach. Co więcej, wraz z akumulacją cholesterolu w monocytach wzrastała produkcja prozapalnej cytokiny TNF α (Zakharova i wsp. 2007). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą również wpływać na integralność oraz funkcję ściany naczynia, poprzez promowanie stresu oksydacyjnego, nasilenie stanu zapalnego czy indukowanie apoptozy, co w następstwie może wywoływać dysfunkcję komórek śródbłonna (EC, ang. *endothelial cells*) i inicjować miażdżycę (Peng i wsp. 2020). Udowodniono, że pochodzące z komórek EC EVs zawierają metaloproteinazy macierzy i mogą degradować macierz zewnątrzkomórkową, promując tym samym migrację komórek VSMC (Paudel i wsp. 2016). Migracja komórek VSMC z błony środkowej do błony wewnętrznej jest krytycznym krokiem w rozwoju miażdżycy. Także mikroRNA transportowane w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych może wpływać na proliferację i migrację komórek VSMC. Na przykład miR-221 reguluje proliferację, poprzez wpływ na ekspresję p27 i p57, które są inhibitorami kinaz zależnych od cyklin. Zmniejszona ekspresja genów kodujących białka kurczliwe przez miR-221 zwiększała proliferację i migrację komórek VSMC (Davis i wsp. 2009). Do destabilizacji blaszki miażdżycowej przyczyniać się może również mineralizacja i zwapnienie naczyń. Stany patologiczne, takie jak miażdżycyca, charakteryzują się brakiem równowagi mineralnej i mogą powodować, że komórki mięśni gładkich naczyń oraz makrofagi wydzielają EVs zawierające składniki sprzyjające mineralizacji, takie jak wapń i fosforany (Bakhshian Nik i wsp. 2017). Sugerowano, że interakcja tych EVs z utlenioną formą cholesterolu może przyspieszać zwapnienie naczyń poprzez przeprogramowanie komórek mięśni gładkich do różnicowania osteogennego (Ruiz i wsp. 2016). Prowadzi to do mikrozwapnień w blaszkach miażdżycowych, które stają się niestabilne i podatne na pękanie, wywołując miejscowy zakrzep.

Pomimo zgromadzonej do tej pory wiedzy na temat roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w rozwoju miażdżycy wciąż niewiele jest dostępnych informacji o znaczeniu EVs wydzielanych przez komórki stare obecne w blaszkach miażdżycowych.

2. Założenia i cele

Starzenie komórkowe jest procesem, któremu ulegają różne typy komórek co zostało wykazane w przypadku wielu zwierzęcych modeli eksperymentalnych a także w przypadku analiz tkanek i komórek pochodzących od człowieka. Można założyć, że proces ten zachodzi także u innych ssaków. Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci przeprowadzono szereg badań dotyczących starzenia komórkowego ze względu na jego znaczącą rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Starzenie komórkowe może zostać wyindukowane w odpowiedzi na działanie różnego rodzaju czynników stresowych, takich jak skracanie telomerów, uszkodzenia DNA, stres oksydacyjny czy aktywacja onkogenów. W odróżnieniu od starzenia komórkowego związanego ze skracaniem telomerów, inne typy starzenia można zaklasyfikować jako przyspieszone starzenie indukowane stresem. W wyniku zadziałania bodźca stresogennego dochodzi do trwałego zatrzymania cyklu komórkowego, a komórka stara pozostaje aktywna metabolicznie i wydziela szereg czynników, określanych mianem fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem. W miarę rozwoju wiedzy na temat starzenia komórkowego rośnie także świadomość złożoności i różnorodności tego procesu, który zależy od czynnika indukującego, typu komórki czy też kontekstu fizjologicznego. W związku z tym pierwszym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było:

1. Scharakteryzowanie i porównanie fenotypu przyspieszonego starzenia w różnych typach komórek prawidłowych hodowanych *in vitro* oraz wyznaczenie uniwersalnych znaczników tego procesu.

W tym celu do doświadczeń wykorzystano trzy typy komórek prawidłowych: komórki mięśni gładkich aorty, preadipocyty oraz fibroblasty. Komórki te indukowano do starzenia za pomocą doksorubicyny lub nadtlenu wodoru, a następnie analizowano ich potencjał proliferacyjny, cykl komórkowy oraz poziom wybranych białek związanych ze starzeniem.

Starzenie komórkowe jest procesem dynamicznym i wieloetapowym. Leży ono u podstaw wielu chorób związanych z wiekiem, w tym miażdżycy. Udowodniono, że w rozwoju tej choroby istotną rolę odgrywa starzenie komórek mięśni gładkich. Stąd też kolejnymi celami pracy były:

2. Porównanie zmian zachodzących w komórkach mięśni gładkich aorty ulegających przyspieszonemu starzeniu na wczesnym i późnym etapie tego procesu oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu.

3. Charakterystyka komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych jako modelu starzenia komórkowego *in vivo*.

Jedną z istotnych cech komórek ulegających starzeniu jest występowanie tzw. fenotypu wydzielniczego związanego ze starzeniem (SASP). Udowodniono, że czynniki wydzielane przez komórki stare mogą przyczyniać się między innymi do powstawania przewlekłego stanu zapalnego, który sprzyja chorobom związanym z wiekiem. Coraz częściej sugeruje się, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą odgrywać kluczową rolę w złożonych i zróżnicowanych funkcjach SASP. W związku z tym kolejnymi celami było:

4. Porównanie profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo*.

5. Określenie podobieństw i różnic w proteomie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz czynników rozpuszczalnych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty ulegające starzeniu replikacyjnemu i przyspieszonemu.

W powstaniu i rozwoju blaszki miażdżycowej istotną rolę odgrywają zarówno ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich jak i komórki układu odpornościowego. W związku z tym, że wydzielane przez komórki stare czynniki SASP mogą wpływać na sąsiadujące komórki i modyfikować mikrośrodowisko tkanki przyczyniając się do promowania stanu zapalnego, ostatnim celem badań było:

6. Zbadanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na aktywację, proliferację i różnicowanie limfocytów T.

3. Materiały i metody

3.1 Materiały

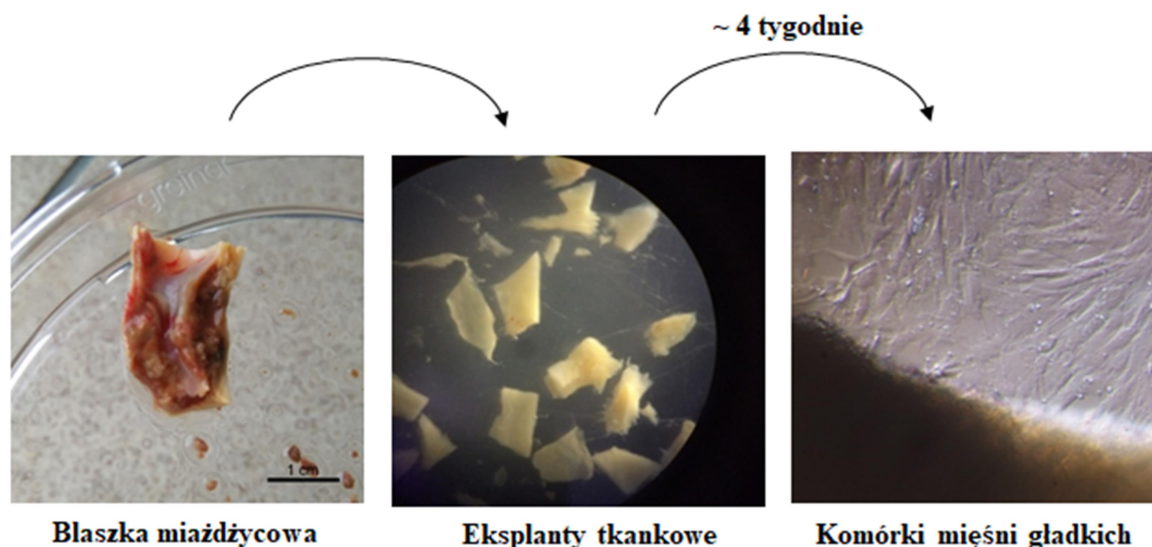
3.1.1 Materiał badawczy

3.1.1.1 Ludzkie komórki mięśni gładkich aorty

Do doświadczeń wykorzystano ludzkie komórki mięśni gładkich izolowane z aorty, dostępne komercyjnie z banku komórkowego (ATCC lub Lonza). Komórki hodowano w specjalnie dedykowanej pożywce (ATCC lub Lonza) uzupełnionej 5% płodową surowicą cielęcą (ang. Fetal Bovine Serum, FBS) oraz wzbogaconą o suplementy: 5 µg/ml insulina, 5 ng/ml FGF-B, 5 ng/ml EGF, 10 mM L-glutamina oraz 50 µg/ml kwas askorbinowy (zestaw suplementów – Lonza/ATCC). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla i 95% wilgotności.

3.1.1.2 Ludzkie komórki mięśni gładkich izolowane z blaszek miażdżycowych

Blaszki miażdżycowe, izolowane z tętnicy szyjnej pacjentów, otrzymano przy współpracy z prof. dr hab. n. med. Krzysztofem Bojakowskim. Materiał do badań został pobrany w czasie planowanych operacji endarterektomii tętnicy szyjnej i przekazany do doświadczeń po uprzednim uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej działającej przy Szpitalu MSWiA w Warszawie oraz zgody pacjentów. Wyizolowane blaszki miażdżycowe zawieszano w pożywce DMEM, zawierającej 10% płodowej surowicy cielęcej, 2 mM L-glutaminę (Sigma-Aldrich, USA), 10 U/ml penicyliny, 0,1 mg/ml streptomycyny oraz 0,25 µg/ml amfoterycyny B i przewożono na lodzie do Instytutu Biologii Doświadczalnej. Następnie blaszki miażdżycowe były mechanicznie oczyszczane ze skrzepów krwi, pozbawiane zwapniałych fragmentów tkanki oraz cięte na fragmenty o wielkości około 1-2 mm². Tak otrzymane eksplanty hodowano w pożywce DMEM na podłożu selekcyjnym pokrytym kolagenem (BD), umożliwiającym adhezję komórek mięśni gładkich. Hodowlę prowadzono do czasu osiągnięcia przez komórki konfluencji lub przez około 4 tygodnie (Ryc. 3.1). Następnie komórki odklejało roztworem 0,25% trypsyny (Sigma-Aldrich), wysiewano w gęstości około 3,5 tys./cm² na dalsze doświadczenia i hodowano w pożywce ATCC dedykowanej do hodowli komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych.



Ryc. 3.1. Przykładowe zdjęcia przedstawiające poszczególne etapy izolacji komórek mięśni gładkich z blaszek miazdżycowych. Skala na pierwszym zdjęciu od lewej odpowiada 1 cm.

3.1.1.3 Ludzkie preadipocyty

Ludzkie preadipocyty zakupiono w banku komórek (ScienCell) za pośrednictwem firmy Biomedica. Komórki hodowano w specjalnie dedykowanej pożywce (ScienCell) uzupełnionej 5% płodową surowicą cielęcą oraz wzbogaconą o suplement wzrostu preadipocytów (mieszanina czynników wzrostu, hormonów i białek niezbędnych do hodowli) i mieszaninę antybiotyków – penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 µg/ml). Komórki hodowano w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla i 95% wilgotności.

3.1.1.4 Ludzkie fibroblasty

Ludzkie fibroblasty, izolowane ze skóry, zakupiono w banku komórek (ATCC oraz GIBCO). Komórki hodowano w pożywce DMEM (Sigma-Aldrich) wzbogaconej 10% FBS (Biowest), 2 mM L-glutaminą (Sigma-Aldrich) oraz mieszaniną antybiotyków - penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) i amfoterycyny B (0,25 µg/ml) (Sigma-Aldrich), w atmosferze 95% wilgotności, 5% CO₂ i temperaturze 37°C.

3.1.1.5 Ludzkie limfocyty T

Ludzkie limfocyty T izolowano z kożuszka leukocytno-płytkowego dostarczanego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Dawcami były osoby płci męskiej w przedziale wiekowym 25 – 40 lat. Limfocyty T (CD3+) izolowano w wyniku negatywnej selekcji za pomocą zestawu RosetteSep Human T Cell Enrichment

Cocktail (Stemcell Technologies), który zawierał koktajl przeciwciał skierowanych przeciwko wszystkim elementom morfotycznym krwi poza limfocytami T (Tabela 3.1). W wyniku dodania koktajlu przeciwciał do kożuszka leukocyarno-płytkowego, tworzone są duże agregaty komórkowe (rozetki immunologiczne) i jedynie limfocyty T pozostają niezwiązane. W trakcie wirowania w gradiencie gęstości duże agregaty komórkowe, jako cięższe, opadają na dno falkonu, a na granicy faz osocza i medium znajdują się limfocyty T.

Tabela 3.1 Wykaz przeciwciał wchodzących w skład zestawu wykorzystywanego do izolacji limfocytów T

Antygen przeciwciała	Komórki wykazujące ekspresję
CD16	granulocyty, komórki NK
CD19	limfocyty B
CD36	monocyty, płytki krwi
CD56	komórki NK
CD66b	granulocyty
glikoforyna A	erytrocyty

3.1.2 Przeciwciała

Poniżej przedstawiono przeciwciała pierwszorzędowe oraz drugorzędowe, stosowane podczas analizy poziomu białek techniką Western blotting oraz w barwieniach immunofluorescencyjnych:

Tabela 3.2 Wykaz przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych podczas doświadczeń.

Nazwa przeciwciała	Masa [kDa]	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Bufor blokujący/ do rozcz. przeciwciała	Producent
53BP1	---	królik	1:200	3% BSA, 0,1% Tween 20, 0,1% Triton X-100 w PBS	Novus
CD63	26	mysz	1:500	5% BSA w TBST	Abcam
CD81	22	mysz	1:500	5% BSA w TBST	Abcam
cyklina B1	55	królik	1:500	mleko	Santa Cruz

flotilina – 1	48	mysz	1:1000	mleko	BD
GAPDH	35	mysz	1:50 000	mleko	Sigma
GM130	130	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
HMGB1	25	królik	1:500	mleko	Abcam
Ki67	358	królik	1:500	mleko	Abcam
lamina B1	72	mysz	1:500	mleko	Santa Cruz
PARP	113	mysz	1:500	mleko	BD
PCNA	36	mysz	1:1000	mleko	Cell Signaling
p53	53	mysz	1:500	mleko	Santa Cruz
p21	21	królik	1:500	mleko	Santa Cruz
p16	16	królik	1:500	mleko	Proteintech
TOM20	20	królik	1:1000	mleko	Santa Cruz
TSG101	50	królik	1:500	mleko	Abcam

Tabela 3.3 Wykaz przeciwciał drugorzędowych stosowanych podczas doświadczeń.

Antygen	Koniugat	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
część Fc króliczych IgG	peroksydaza chrzanowa	koza	1:2000	DAKO
część Fc mysich IgG	peroksydaza chrzanowa	koza	1:2000	DAKO
część Fc króliczych IgG	Fluorochrom Alexa Fluor 488	koza	1:500	Invitrogen
część Fc mysich IgG	Fluorochrom Alexa Fluor 488	koza	1:500	Invitrogen
część Fc króliczych IgG	Fluorochrom Alexa Fluor 555	koza	1:500	Invitrogen

W tabeli 3.4 przedstawiono przeciwciała stosowane podczas analizy cytometrycznej.

Tabela 3.4 Wykaz przeciwciał stosowanych do analiz cytometrycznych.

Antygen	Fluorochrom	Firma
Barwnik do poliferacji	CFSE	eBioscience
Barwnik na przeżywalność	455 UV (DAPI)	eBioscience
CD3	FITC	BD
CD4	Alexa Fluor 700	eBioscience
CD8	PE-eFluor 610	eBioscience
CD25	APC	eBioscience
CD38	PE-Cyanine 7	eBioscience
CD69	PerCP-eFluor 710	eBioscience

3.1.3 Roztwory

3.1.3.1 Związki wykorzystane do traktowania komórek

Doksorubicyna - doksorubicynę (Sigma-Aldrich) rozpuszczano w sterylnej wodzie w celu otrzymania roztworu o stężeniu 10mg/ml (17,24 mM) i przechowywano w temperaturze 4°C. W celu traktowania komórek, roztwór doksorubicyny rozcieńczano 1000-krotnie w PBS i dodawano odpowiednią objętość do pożywki, tak aby stężenie końcowe wynosiło 150 nM.

Nadtlenek wodoru - 30% roztwór nadtlenku wodoru (Sigma-Aldrich) rozcieńczano 1000-krotnie w PBS, aby uzyskać stężenie 10 mM, a następnie rozcieńczano w celu uzyskania 150 µM stężenia końcowego w hodowli komórkowej.

3.1.3.2 Roztwory stosowane do oznaczania aktywności związanej ze starzeniem β -galaktozydazy

Roztwór utrwalający - roztwór zawierający 2% formaldehydu (Sigma-Aldrich) oraz 0,2% glutaraldehydu (Sigma-Aldrich) w PBS.

Roztwór barwiący - roztwór zawierający X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -Dgalaktopiranozyd, substrat dla SA- β -galaktozydazy) w stężeniu 1 mg/ml, 2,5 mM

heksacyjanożelazian potasu ($C_6FeK_4N_6 \cdot 3H_2O$), 2,5 mM żelazocyjanian potasu ($C_6FeK_3N_6$), 150 mM chlorek sodu oraz 2 mM chlorek magnezu w buforze fosforanowym o pH 6,0.

Bufor fosforanowy o pH 6,0 - roztwór przygotowany poprzez zmieszanie 87,7 ml NaH_2PO_4 0,1 M (13,79 g/l) z 12,3 ml Na_2HPO_4 0,1 M (17,79 g/l), co dawało pożądaną wartość pH.

3.1.3.3 Roztwory stosowane do barwień cytochemicznych

Roztwór 20% paraformaldehydu (PFA) - 20 g PFA (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 90 ml PBS z dodatkiem wodorotlenku sodu w temperaturze 60°C. Po całkowitym rozpuszczeniu roztwór doprowadzono do pH 7,4 za pomocą kwasu chlorowodorowego i uzupełniono PBS do 100 ml. Roztwór przechowywano w temperaturze -20°C.

3.1.3.4 Roztwory stosowane w metodzie Western blotting

Bufor 1 M Tris-HCl o pH 6,8 - przygotowano przez rozpuszczenie 60,57 g Tris w 400 ml wody dejonizowanej. Po dobie ustalono pH za pomocą kwasu chlorowodorowego i uzupełniono bufor do 500 ml wodą dejonizowaną.

Bufor 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8 - przygotowano przez rozpuszczenie 90,85 g Tris w 400 ml wody dejonizowanej. Po dobie ustalono pH za pomocą kwasu chlorowodorowego i uzupełniono bufor do 500 ml wodą dejonizowaną.

Bufor Laemmli'ego - przygotowano roztwór wyjściowy (2× stężony) o stężeniu 125 mM Tris-HCl o pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol oraz 0,2% błękit bromofenolowy w wodzie dejonizowanej. Bufor przechowywano w temperaturze pokojowej chroniąc przed światłem. Przed użyciem do porcji buforu dodawano DTT, aby otrzymać końcowe stężenie DTT 100 mM.

Bufor do elektroforezy białek - przygotowano roztwór wyjściowy (10× stężony) o stężeniu 250 mM Tris-HCl, 2,5 M glicyna i 1% SDS w wodzie dejonizowanej. Przed użyciem roztwór rozcieńczano dziesięciokrotnie w wodzie dejonizowanej, przechowywano w 4°C i używano dwukrotnie.

Bufor do transferu białek na membranę - przygotowano roztwór wyjściowy (10× stężony) o stężeniu 250 mM Tris-HCl, 2 M glicyna i 0,5% SDS w wodzie dejonizowanej. Przed użyciem roztwór rozcieńczano dziesięciokrotnie w roztworze alkoholu metylowego, tak by końcowe stężenie metanolu wynosiło 20%. Bufor przechowywano w 4°C i używano dwukrotnie.

TBST - przygotowano roztwór wyjściowy TBS (10× stężony) o stężeniu 200 mM Tris-HCl oraz 1,37 M chlorek sodu w wodzie dejonizowanej. Roztwór doprowadzano do pH 7,6 za pomocą 10 M kwasu chlorowodorowego i przechowywano w temperaturze 4°C. Bezpośrednio przed użyciem roztwór TBS rozcieńczano dziesięciokrotnie i dodawano Tween-20, tak by jego końcowe stężenie wynosiło 0,1%.

Roztwór Ponceau S - roztwór otrzymany przez rozpuszczenie 1 g różu Ponceau S w 100 ml 3% kwasu octowego i przechowywano w temperaturze pokojowej.

Roztwór błękitu Coomassie - roztwór otrzymany przez rozpuszczenie 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich) oraz 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck) w roztworze 40% alkoholu etylowego, 5% alkoholu metylowego i 8% kwasu octowego w wodzie dejonizowanej. Roztwór przesączony przez sącze z bibuły przechowywano w temperaturze pokojowej i używano wielokrotnie.

Roztwory do przygotowania żeli poliakrylamidowych - w doświadczeniach stosowano żele poliakrylamidowe o stężeniach 8%, 10%, 12% i 15%. Skład roztworów do przygotowania żeli podano w tabeli 3.5.

Tabela 3.5. Skład roztworów do przygotowania żeli poliakrylamidowych.

Stężenie żelu	żel rozdzielający (objętość [ml] na 5 ml żelu)				żel zagęszczający (objętość [ml] na 5 ml żelu)	
	8%	10%	12%	15%	Stężenie żelu	5%
Odczynnik					Odczynnik	
woda	2,6	2,35	2,1	1,72	woda	3,61
40% akrylamid/ bis-akrylamid 29:1	1	1,25	1,5	1,88	40% akrylamid/ bis-akrylamid 29:1	0,64
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1 M Tris-HCl pH 6,8	0,63
10% SDS	0,05	0,05	0,05	0,05	10% SDS	0,05
10% APS	0,05	0,05	0,05	0,05	10% APS	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002	0,002	TEMED	0,005

3.1.3.5 Roztwory stosowane do przygotowania komórek do mikroskopii elektronowej

Wszystkie roztwory wykorzystywane podczas mikroskopii elektronowej przygotowywane były na bieżąco bezpośrednio przed użyciem.

0,4 M HEPES o pH 7,3 - 9,5 g HEPES rozpuszczono w 100 ml wody podwójnie destylowanej, a następnie roztwór doprowadzano do pH 7,3 za pomocą wodorotlenku sodu.

Bufor utrwalający - 2 g PFA (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 40 ml wody podwójnie destylowanej z dodatkiem kropli 5 M wodorotlenku sodu w temperaturze 60°C. Po całkowitym rozpuszczeniu, do roztworu dodawano 50 ml 0,4 M HEPES o pH 7,3 i 0,2 ml świeżo otwartego 25% glutaraldehydu (EMS). Roztwór doprowadzano do pH 7,3 za pomocą wodorotlenku sodu i uzupełniano wodą podwójnie destylowaną do 100 ml.

Bufor blokujący - roztwór przygotowywano poprzez rozpuszczenie 0,5 g albuminy surowicy bydlęcej (BSA), 0,05 g saponiny oraz 0,27 g chlorku amonu w 100 ml PBS.

3% roztwór żelazo (II) cyjanku potasu - 0,3 g żelazo (II) cyjanku potasu (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 10 ml 0,2 M buforu fosforanowego o pH 7,4.

1% roztwór zredukowanego tetratlenku osmu - 4% roztwór tetratlenku osmu (Agar Scientific) zmieszano z 3% roztworem żelazo (II) cyjanku potasu i wody podwójnie destylowanej w stosunku 1:2:1.

2% roztwór tetratlenku osmu - 4% roztwór tetratlenku osmu (Agar Scientific) i wody podwójnie destylowanej zmieszano w stosunku 1:1.

Tiokarbohydrazyd (TCH) - 0,1 g TCH (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 10 ml wody podwójnie destylowanej i ogrzewano w 60°C przez 1 h mieszając co kilkanaście minut.

1% roztwór octanu uranylu - 0,4 g octanu uranylu (Ted Pella) rozpuszczono w 10 ml wody podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C. Tuż przed użyciem roztwór przefiltrowano i rozcieńczano czterokrotnie wodą podwójnie destylowaną.

Roztwór asparaginianu ołowiu Waltona - 0,066 g azotanu ołowiu (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 10 ml 0,03 M kwasu asparaginowego o pH 3,8 w łaźni wodnej o temp. 60°C. Roztwór asparaginianu ołowiu doprowadzano do pH 5,5 za pomocą 1M wodorotlenku sodu.

Żywica epoksydowa Durcupan - żywicę Durcupan (Sigma-Aldrich) przygotowano przez zmieszanie 8,33 g składnika A/M, 8,33 g składnika B, 0,33 g składnika D oraz 4 kropli DMP-30.

3.1.3.6 Roztwory stosowane podczas cytometrycznej analizy cyklu komórkowego

Bufor cytrynianowy pH 7,8 - roztwór zawierający 192 mM wodorooortofosforanu (V) sodu (POCh) i 4 mM kwas cytrynowy (Sigma-Aldrich).

Roztwór barwiący - roztwór zawierający 3,8 mM cytrynian sodu, 50 µg/ml jodku propidyny (Sigma-Aldrich) i 0,5 µg/ml RNazy A w PBS

3.2 Metody

3.2.1 Indukcja starzenia

3.2.1.1 Starzenie przyspieszone

W celu indukcji starzenia, komórki na wczesnych pasażach wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² i po 24 lub 48 godzinach od wysiania traktowano je nadtlutkiem wodoru o stężeniu końcowym 150 μM lub doksorubicyną o stężeniu końcowym 150 nM. Komórki analizowano po 3 i 7 dobach od traktowania oraz po 4 tygodniach.

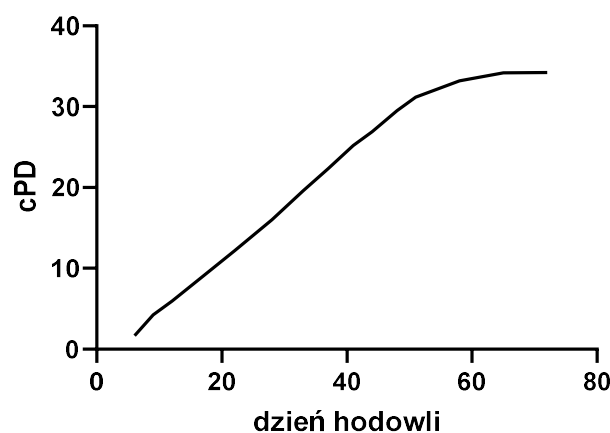
3.2.1.2 Starzenie replikacyjne

Komórki na wczesnych pasażach wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² i pasażowano co 3 – 4 dni. Przy każdym pasażu komórki liczone w komorze Neubauera, w celu określenia liczby podwojeń populacji (PD) oraz skumulowanej liczby podwojeń populacji (cPD), korzystając ze wzoru:

$$PD = \frac{\log_{10}Nh - \log_{10}Ni}{\log_{10}2}$$

Gdzie: Ni – liczba wysianych komórek podczas pasażu; Nh – liczba zebranych komórek podczas kolejnego pasażu

W celu określenia ogólnej liczby podwojeń populacji (cPD) sumowano wartości PD z całego okresu trwania hodowli. Komórki uznawane były za stare replikacyjnie gdy przestały się dzielić a cPD zbliżało się lub osiągało plateau (Ryc. 3.2).



Ryc. 3.2 Przykładowy wykres skumulowanej liczby podwojeń (cPD) populacji komórek VSMC.

3.2.2 Badanie cyklu komórkowego

W celu odklejenia komórek od podłoża, zbierano pożywkę z nad komórek, a następnie komórki płukano PBS i inkubowano z 0,25% roztworem trypsyny (Sigma Aldrich). Po odklejeniu komórek, trypsynę neutralizowano zebraną wcześniej pożywką. Zawieszono poprzez kilkukrotne pipetowanie komórki przenoszono do falkonów i wirowano przez 5 min przy 1200 rpm. Następnie osad komórkowy płukano w PBS, ponownie wirowano, a otrzymany osad zawieszono w niewielkiej objętości PBS (około 0,3 ml) i utrwalano 5 ml zimnego 70% alkoholu etylowego. Falkony z utrwalonymi komórkami przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy, minimum 24 godziny.

Zawiesinę komórkową wirowano 5 min przy prędkości 1200 rpm w celu pozbycia się etanolu. Komórki przepłukano dwukrotnie – najpierw roztworem 0,05% Tween 20 w PBS, a następnie samym PBS za każdym razem wirując je przez 5 min przy 1200 rpm. Osad zawieszono w 500 µl PBS, dodawano 500 µl buforu cytrynianowego i inkubowano przez 5 min. Następnie komórki przepłukano PBS i wirowano przez 5 min przy 1200 rpm. Po zwirowaniu, osad komórkowy zawieszono w 250 µl buforu barwiącego zawierającego jodek propidyny, który wbudowuje się w DNA. Komórki inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Analizę cyklu komórkowego wykonano za pomocą cytometru przepływowego FACS Calibur. Dokonywano pomiaru wielkości komórek (parametr FSC – *forward scatter*), ziarnistości (parametr SSC – *side scatter*) oraz intensywności fluorescencji komórek (kanał FL2), która odpowiada ilości DNA w jądrze komórkowym. Z każdej próbki analizowano co najmniej 10 000 komórek. Analizę odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu przeprowadzono przy użyciu oprogramowania CellQuest Pro oraz Modfit.

3.2.3 Oznaczanie aktywności β-galaktozydazy związanej ze starzeniem

W celu oznaczenia aktywności β-galaktozydazy związanej ze starzeniem, komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm. Następnie przepłukiwano je trzykrotnie PBS i utrwalano przez 5 min w buforze utrwalającym. Następnie komórki przepłukano trzykrotnie PBS i inkubowano w roztworze barwiącym zawierającym X-gal (substrat dla kwaśnej β-galaktozydazy związanej ze starzeniem). Inkubację prowadzono przez 18 godzin w inkubatorze w temperaturze 37°C, chroniąc przed światłem i dostępem powietrza. Po upływie 18 godzin komórki płukano trzykrotnie PBS, barwiono roztworem Hoechst 33342 o stężeniu 2 µg/ml przez 15 min, ponownie płukano PBS a następnie szkiełka

z komórkami zatapiano na szkiełku podstawowym przy użyciu Fluoromount G (Invitrogen). Preparaty oglądano i fotografowano przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research. Odsetek komórek z aktywną SA- β -galaktozydazą określano w stosunku do wszystkich komórek na podstawie liczby jąder komórkowych. Analizę przeprowadzono za pomocą programu ImageJ.

3.2.4 Barwienia cytochemiczne

Komórki do barwień cytochemicznych wysiewano na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm umieszczonych w szalkach 12-dółkowych w gęstości 12 tys. komórek na dółek.

3.2.4.1 Badanie proliferacji komórek za pomocą testu wbudowywania bromodeoksyurydyny do DNA

W ostatniej dobie hodowli do komórek dodawano bromodeoksyurydynę (BrdU) o stężeniu końcowym 10 μ M. Po 18 godzinach inkubacji z BrdU komórki płukano trzykrotnie PBS, utrwalano zimnym 70% alkoholem etylowym i przechowywano w temp. -20°C do czasu barwienia (minimum przez 24 godziny). W celu barwienia komórki płukano dwukrotnie przez 5 min roztworem 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) w PBS, a następnie inkubowano przez 30 min w roztworze 2N kwasu HCl w PBS, ponownie płukano dwukrotnie w PBS i inkubowano przez 1 min w 0,1 M roztworze tetraboranu sodu. Po dwukrotnym przepłukaniu komórek PBS inkubowano je przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z mysim przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciw BrdU (Becton-Dickinson) rozcieńczonym 1:100 w PBS z dodatkiem 0,5% Tween 20 (Sigma-Aldrich) oraz 1% BSA (Sigma-Aldrich). Po upływie godziny komórki płukano dwukrotnie roztworem 0,5% Tween 20 w PBS i inkubowano je przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w ciemności z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa Fluor 488 rozcieńczonym 1:500 w roztworze jw. Po inkubacji komórki płukano dwukrotnie roztworem 0,5% Tween 20 w PBS i przez 15 min barwiono jądra roztworem DAPI o stężeniu 1 μ g/ml. Po trzykrotnym przepłukaniu komórek PBS, zatapiano je na szkiełku podstawowym za pomocą Fluoromount-G. Zdjęcia preparatów wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (nazwa mikroskopu i oprogramowania w podrozdziale 3.2.3 - powyżej) i analizowano za pomocą programu ImageJ. Wynik przedstawiano jako procent komórek wbudowujących BrdU, w stosunku do całkowitej liczby komórek (DAPI).

3.2.4.2 Ekspresja Ki67 i F-aktyny w komórkach

Komórki utrwalano roztworem 4% PFA przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie płukano trzykrotnie PBS i przechowywano w temperaturze 4°C do czasu barwienia. Przed barwieniem komórki przepłukano dwukrotnie PBS i permabilizowano przez 10 minut roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS. Następnie komórki blokowano przez 1 godzinę w buforze zawierającym 2% BSA, 1,5% koziej surowicy i 0,1% Triton X-100 w PBS. Po tym czasie komórki inkubowano w komorze wilgotnej przez dwie godziny z pierwszorzędowym przeciwciałem anti-Ki67, rozcieńczonym 1:500 w buforze blokującym. Następnie komórki płukano trzykrotnie przez 5 minut PBS i inkubowano w ciemności przez 1 godzinę z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa Fluor 555 oraz, w celu uwidocznienia F-aktyny, z falloidyną sprzężoną z fluorochromem Alexa Fluor 488. Po inkubacji komórki płukano trzykrotnie PBS, barwiono przez 15 min roztworem Hoechst 33342 o stężeniu 2 µg/ml i ponownie płukano PBS. Preparaty zatapiano na szkiełku podstawowym za pomocą Fluoromount-G. Zdjęcia wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego lub mikroskopu konfokalnego Leica SP8 i oprogramowania LAS AF Lite 3.3.

3.2.4.3 Analiza liczby uszkodzeń DNA w oparciu o liczenie skupisk 53BP1

Komórki utrwalano zimnym 70% alkoholem etylowym i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu barwienia (minimum 24 godziny). Po dwukrotnym przepłukaniu PBS, komórki permabilizowano przez 10 min, a następnie blokowano przez 1 godzinę w roztworze zawierającym 2% BSA, 1,5% koziej surowicy i 0,1% Triton X-100 w PBS. Następnie komórki inkubowano w komorze wilgotnej przez 2 godziny, temperatura pokojowa z przeciwciałem pierwszorzędowym anti-53BP1, rozcieńczonym 1:500 w buforze blokującym. Po trzykrotnym przepłukaniu komórek PBS, inkubowano je przez 1 godzinę w ciemności z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa Fluor 488. Po przepłukaniu komórek PBS, jądra barwiono przez 15 min roztworem Hoechst 33342 o stężeniu 2 µg/ml, ponownie płukano PBS i zatapiano preparaty na szkiełku podstawowym za pomocą Fluoromount-G. Zdjęcia wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i analizowano za pomocą programu ImageJ. W celu policzenia skupisk 53BP1 w jądrach komórkowych, komórki podzielono na 4 grupy: komórki bez widocznych skupisk 53BP1 w jądrze, komórki z jednym skupiskiem, komórki posiadające od 2 do 5 skupisk oraz komórki posiadające więcej niż 5 skupisk. Wyniki przedstawiono jako procent całkowitej liczby analizowanych komórek.

3.2.5 Badanie poziomu białek metodą Western blotting

W celu zbadania poziomu białek, komórki wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² w butelkach hodowlanych. Po upływie odpowiedniego czasu w hodowli, komórki płukano PBS, odklejano przy pomocy 0,25% trypsyny i zneutralizowaną zawiesinę komórkową wirowano przez 5 min w 1200 rpm. Następnie komórki płukano PBS i wirowano przez 5 min z prędkością 10 000 rpm. Odsączano PBS z nad otrzymanego osadu, a uzyskany pelet przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.5.1 Przygotowanie lizatów i normalizacja próbek

Izolację białek przeprowadzano po uprzednim zebraniu wszystkich osadów komórkowych z danego doświadczenia. Po rozmrożeniu na lodzie pelety komórkowe zawieszano w odpowiedniej objętości PBS i dodawano taką samą objętość dwukrotnie stężonego buforu Laemliego. Następnie próbki homogenizowano przy użyciu strzykawkę insulinowych o średnicy igły 0,3 mm i inkubowano 10 min w temperaturze 95°C. Następnie próbki wirowano przez 5 min przy prędkości 12 500 rpm i supernatant przenoszono do czystego eppendorfa. Przygotowane w ten sposób lizaty przechowywano w temperaturze -20°C.

W celu wyrównania i normalizacji pomiędzy poszczególnymi próbkami ilości totalnego białka, próbki rozdzielano na 12% żelu poliakrylamidowym, nanosząc taką samą objętość każdej próbki. Żel barwiono roztworem błękitu Coomassie Blue przez 5 min, a następnie odbarwiano 8% roztworem kwasu octowego. Na podstawie intensywności zabarwienia poszczególnych ścieżek w żelu dobierano odpowiednią objętość ekstraktów nanoszonych na żel.

3.2.5.2 Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym i transfer na membranę

W zależności od wielkości analizowanych białek, do rozdziału elektroforetycznego wykorzystywano 8%, 10%, 12% lub 15% żele poliakrylamidowe. Rozdział białek prowadzono w buforze do elektroforezy pod stałym napięciem początkowo 50V a następnie 120V (dla żelu 8% - 50V i 90V) przez około 2 – 2,5 godziny wykorzystując aparat Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Następnie rozdzielone na żelu białka przenoszono na membranę nitrocelulozową prowadząc dalej transfer (aparat Mini Trans-Blot (Bio-Rad)) w buforze do transferu przy stałym natężeniu 400 mA i w temperaturze 4°C przez 1 lub 2 godziny w zależności od wielkości analizowanych białek. W celu oceny wydajności transferu białek na membranę, membranę inkubowano przez 1 minutę w roztworze Ponceau S.

3.2.5.3 Wizualizacja białek

Przy pomocy wzorca mas membranę dzielono na fragmenty zawierające poszczególne białka. Fragmenty membrany blokowano następnie przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w buforze do blokowania zawierającym odpowiednio 5% odłuszczonego mleka lub 5% BSA w TBST w zależności od analizowanego później białka. Następnie membranę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym. Rozcieńczenia stosowanych przeciwciał oraz buforów w których je rozcieńczano opisane zostały w tabeli 3.2. Następnego dnia fragmenty membrany płukano trzykrotnie przez 5 min TBST i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Po trzykrotnym przepłukaniu membrany w TBST detekcję białek wywoływano roztworem ECL (ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)). Sygnał odczytywano wykorzystując klisze rentgenowskie za pomocą urządzenia Fuji FPM 800A. Analizę densytometryczną przeprowadzono z użyciem programu ImageJ, a intensywność próbek normalizowano do poziomu białka GAPDH.

3.2.6 Mikroskopia elektronowa

3.2.6.1 Obrazowanie komórek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej

Komórki utrwalano w roztworze zawierającym 2,5% glutaraldehyd (EMS, EM grade) i 4% paraformaldehyd w 0,2M HEPES o pH 7,3. Następnie przepłukano trzykrotnie po 3 minuty wodą podwójnie destylowaną i utrwalano w 1% roztworze tetratenu osmu przez 60 min w temperaturze pokojowej. Po ponownym trzykrotnym przepłukaniu wodą podwójnie destylowaną komórki odwadniano alkoholem etylowym, wykorzystując roztwory o wzrastającym stężeniu: 30%, 50%, 75%, 95% i 100%. Następnie komórki suszono przy użyciu suszarki w punkcie krytycznym (Polaron) i napyłano katodowo cienką warstwą złota (JEOL Co.)

3.2.6.2 Obrazowanie organelli komórkowych za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Komórki wysiewano na specjalne szalki ze szklanym dnem (MatTek, p35g-1-5-14-cgrd) w gęstości około 3 tys./cm². Następnie utrwalano je dwuetapowo roztworem 0,2M HEPES o pH 7,3 zawierającym 2% PFA i 1% GA. Najpierw dodano 1 ml roztworu do pożywki na 5 minut, a następnie usunięto pożywkę i komórki zalano 2 ml roztworu i utrwalano przez 30

minut. Utrwalone komórki płukano pięciokrotnie przez 5 min 0,2 M roztworem HEPES o pH 7,3 a następnie pięciokrotnie zimnym roztworem 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4. W kolejnych etapach komórki inkubowano kolejno w 1% roztworze zredukowanego tetratlenku osmu przez 30 min na lodzie, przefiltrowanym przez filtr strzykawkowy roztworze TCH przez 20 min w temperaturze pokojowej a następnie w 2% roztworze tetratlenku osmu przez 20 min w temperaturze pokojowej. Pomędzy poszczególnymi inkubacjami komórki przepłukiwano pięciokrotnie przez 5 min wodą podwójnie destylowaną. Następnie preparaty pozostawiono na noc w temperaturze 4°C w przefiltrowanym roztworze 1% octanu uranylu. Następnego dnia komórki przepłukano pięciokrotnie wodą podwójnie destylowaną i umieszczono je na 30 min w piecu w temperaturze 60°C. Następnie inkubowano je w roztworze asparagianu ołowiu Waltona przez 20 min w temperaturze 60°C i płukano odgazowaną wodą podwójnie destylowaną. W kolejnym etapie komórki odwadniano alkoholem etylowym, wykorzystując roztwory o wzrastającym stężeniu: 20%, 50%, 70%, 80%, 90% i 2 razy 100%. Za każdym razem komórki odwadniane były przez 5 min. Po całkowitym odwodnieniu komórki inkubowano najpierw przez 1 godzinę z 50% roztworem żywicy Durcupan w etanolu, a następnie 100% żywicą Durcupan przez noc. Następnego dnia do szkiełek z komórkami przyklejano kapsułkę z obciętym dnem i wypiekano je w piecu w temperaturze 70°C przez co najmniej dobę. Kapsułkę następnie wypełniano żywicą i inkubowano próbki przez kolejne 3 doby w temperaturze 70°C. Po upływie minimum 3 dni kapsułki odrywano od szalek, rozcinano i zdejmowano a otrzymane bloczki żywicy z komórkami były cięte za pomocą ultramikrotomu (ultracut R, Leica) na skrawki o grubości 70 nm i zbierane na miedzianych siatkach pokrytych formvarem (Agar Scientific). Gotowe preparaty obrazowano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 (JEOL Co.) wyposażonego w kamerę MORADA G2 (EMSIS GmbH).

3.2.6.3 Obrazowanie lokalizacji białka CD63 za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

W celu immunocytochemicznej detekcji białka CD63 komórki wysiewano na szalki ze szklanym dnem w gęstości około 3 tys./cm². Inkubowano je w buforze utrwalającym zawierającym 4% PFA i 0,05% GA przez 5 min. w temperaturze 37°C oraz przez kolejne 10 min. na blacie w temp. pokojowej. Po czym komórki przepłukano buforem utrwalającym zawierającym 4% PFA i pozostawiono w tym buforze na 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie trzykrotnie przepłukano PBS i inkubowano w buforze blokującym przez 30 min,

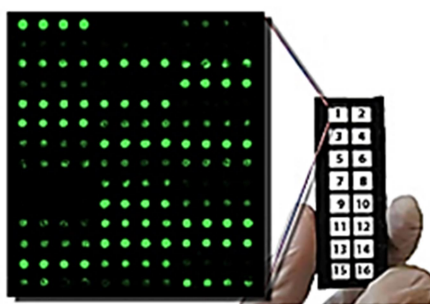
temperatura pokojowa. Komórki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w komorze wilgotnej, z przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciw białku CD63, rozcieńczonym 1:200 w buforze blokującym. Następnego dnia komórki przepłukano sześciokrotnie PBS i inkubowano przez 2 godziny w temp. pokojowej z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z nanocząsteczkami złota (rozcieńczenie 1:50 w buforze blokującym). Następnie komórki przepłukano trzykrotnie PBS, trzykrotnie wodą podwójnie destylowaną i inkubowano z odczynnikiem Gold EnhanceTM (NanoProbes) przez około 30 sekund w celu wzmocnienia sygnału cząstek złota. Preparaty przepłukano wodą podwójnie destylowaną a następnie PBS i ponownie utrwalono roztworem 1% GA w PBS przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Po upływie 10 min. preparaty przepłukano dwukrotnie PBS, a następnie pięciokrotnie zimnym 0,1 M buforem fosforanowym. Dalej postępowano tak jak opisano powyżej w podrozdziale 3.2.6.2 od momentu inkubacji w 1% roztworze zredukowanego tetratlenku osmu przez 30 min. na lodzie.

3.2.7 Analiza profilu wydzielniczego komórek VSMC z zastosowaniem mikromacierzy

W celu jakościowej i ilościowej analizy profilu wydzielniczego komórek zastosowano technikę z wykorzystaniem mikromacierzy. Zaletą tej metody w porównaniu do powszechnie stosowanego testu ELISA, jest możliwość wykrywania i oznaczania ilościowego wielu cytokin jednocześnie, co zdecydowanie jest mniej pracochłonne. W celu przeprowadzenia analizy zastosowano zestaw mikromacierzy Quantibody Human Cytokine Antibody Array 2000 (Ray Biotech) składający się z trzech mikromacierzy umożliwiających pomiar 120 cytokin (QAH-INF-3; QAH-GF-1; QAH-CHE1). Oraz dodatkowo mikromacierz zawierającą 10 cytokin – metaloproteinaz (QAH-MMP-1-1). Jedna szklana kasetka podzielona była na 16 studzienek. W każdej z szesnastu studzienek znajdował się zestaw identycznych macierzy z przeciwciałami cytokin, a każde przeciwciało było ułożone w czterech powtórzeniach (Ryc. 3.3). W celu ilościowego oznaczenia cytokin wykorzystano dostarczone przez producenta specyficzne standardy cytokin. Na podstawie porównania sygnałów z analizowanych próbek z krzywą standardową, określono stężenie poszczególnych cytokin.

Do doświadczeń komórki wysiewano w dołkach szalki 12-dołkowej, w gęstości 10 tys. komórek na dołek. Na 24 godziny przed planowanym zbieraniem pożywki, pożywkę z komórek zmieniano na świeżą, pozbawioną surowicy po wcześniejszym przepłukaniu komórek PBS. Zebrany materiał przechowywano w temperaturze -20°C. Mikromacierze oraz niezbędne bufony były dołączone do zestawu dostarczonego przez producenta, a przygotowanie próbek do analizy prowadzono według dostarczonego protokołu. W skrócie:

płytki mikromacierzy blokowano przez 30 min w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano przez 2 godziny z pożywką zebraną z komórek również w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto próbki i przepłukano pięciokrotnie każdą studzienkę buforem dołączonym do zestawu, za każdym razem dokładnie usuwając bufor z dołków. Następnie przez 2 godziny w temperaturze pokojowej prowadzono inkubację z mieszaniną biotynylowanych przeciwciał. Po pięciokrotnym przepłukaniu studzienek, dodano roztwór streptawidyny sprzężonej z barwnikiem Cy3 i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie płytki przepłukano pięciokrotnie buforem, zdjęto z nich zabezpieczenia, dokładnie osuszono i umieszczono w specjalnych probówkach do przechowywania. Detekcja sygnałów za pomocą skanera laserowego została przeprowadzona w USA.



Zestaw – Czynniki zapalne

(QAH-INF-3) Each antibody is printed in quadruplicate horizontally												
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	POS1				POS2				BLC (CXCL13)			
B	Eotaxin-1 (CCL11)				Eotaxin-2 (MIPF-2)				GCSF			
C	GM-CSF				I-309 (TCA-3/CCL1)				ICAM-1 (CD54)			
D	IFN-gamma				IL-1 alpha				IL-1 beta			
E	IL-1ra (IL-1 F3)				IL-2				IL-4			
F	IL-5				IL-6				IL-6 R			
G	IL-7				IL-8 (CXCL8)				IL-10			
H	IL-11				IL-12 p40				IL-12 p70			
I	IL-13				IL-15				IL-16			
J	IL-17A				MCP-1 (CCL2)				M-CSF			
K	MIG (CXCL9)				MIP-1 alpha (CCL3)				MIP-1 beta (CCL4)			
L	MIP-1 delta (CCL15)				PDGF-BB				RANTES (CCL5)			
M	TIMP-1				TIMP-2				TNF-alpha			
N	TNF beta				TNF RI				TNF RII			

Zestaw – Czynniki wzrostu

(QAH-GF-1) Each antibody is printed in quadruplicate horizontally												
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	POS1				POS2				Amphiregulin (AR)			
B	BDNF				bFGF				BMP-4			
C	BMP-5				BMP-7				beta-NGF			
D	EGF				EGFR				EG-VEGF (PK1)			
E	FGF-4				FGF-7 (KGF)				GDF-15			
F	GDNF				Growth Hormone (GH)				HB-EGF			
G	HGF				IGFBP-1				IGFBP-2			
H	IGFBP-3				IGFBP-4				IGFBP-6			
I	IGF-1				Insulin				M-CSF R			
J	NGFR (TNFSR16)				NT-3				NT-4			
K	Osteoprotegerin (OPG)				PDGF-AA				PLGF (PIGF)			
L	SCF				SCF R (CD117)				TGF alpha			
M	TGF beta 1				TFG beta 3				VEGF (VEGF-A)			
N	VEGF R2				VEGF R3				VEGF-D			

Zestaw – Chemokiny

(QAH-CHE-1) Each antibody is printed in quadruplicate horizontally												
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
A	POS1				POS2				6Ckine (CCL21)			
B	Axl				Betacellulin (BTC)				CCL28 (MEC)			
C	CTACK (CCL27)				CXCL16				ENA-78 (CXCL5)			
D	Eotaxin-3 (CCL26)				GCP-2 (CXCL6)				GRO			
E	HCC-1 (CCL14)				HCC-4 (CCL16)				IL-9			
F	IL-17F				IL-18 BP alpha				IL-28A			
G	IL-29				IL-31				IP-10 (CXCL10)			
H	I-TAC (CXCL11)				LIF				LIGHT (TNFSF14)			
I	Lymphotactin				MCP-2 (CCL8)				MCP-3 (CCL7)			
J	MCP-4 (CCL13)				MDC (CCL22)				MIF			
K	MIP-3 alpha				MIP-3 beta				MIPF-1 9CCL23)			
L	MSP				NAP-2 (CXCL7)				Osteopontin (OPN)			
M	PARC (CCL18)				Platelet Factor 4 (PF4)				SDF-1 alpha			
N	TARC (CCL17)				TECK (CCL25)				TSLP			

Zestaw – Metaloproteazy

Each antibody is printed in quadruplicate horizontally												
	1	2	3	4	1	2	3	4				
A	POS1				POS2							
B	MMP-1				MMP-2							
C	MMP-3				MMP-8							
D	MMP-9				MMP-10							
E	MMP-13				TIMP-1							
F	TIMP-2				TIMP-4							

Ryc. 3.3 Poglądowe zdjęcie przedstawiające szklaną płytkę 16-dołkową zawierającą mikromacierze do analizy cytokin. Poniżej znajdują się tabele z rozkładem cytokin jakie były analizowane w poszczególnych zestawach. Zdjęcia zaczerpnięto z dołączonego przez producenta protokołu.

3.2.8 Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

3.2.8.1 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych metodą ultrawierowania

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe izolowano zgodnie z protokołem opracowanym przez Clotilde Thery (Thery i wsp. 2006) z pewnymi modyfikacjami. W celu izolacji EVs, komórki VSMCs wysiewano do 5 butelek hodowlanych (powierzchnia butelki 75 cm²) w gęstości 8 tys/cm². Na dobę przed izolacją, usuwano pożywkę, komórki przepłukiwano PBS i wymieniano pożywkę na pożywkę pozbawioną surowicy. Do każdej butelki dodawano po 12 ml świeżej pożywki. Po 24 godzinach pożywkę z nad komórek (określana w dalszej części pracy jako pożywka kondycjonowana) zbierano do falkonów umieszczonych na lodzie, a komórki liczone. Zebraną pożywkę najpierw wirowano przez 10 min przy 1280 x g w temperaturze 4°C przy użyciu wirówki MPW-350R. Supernatant przenoszono do specjalnych poliwęglanowych probówek i najpierw wirowano przez 40 min przy 26 200 x g w temperaturze 4°C, a następnie supernatant przenoszono do świeżych probówek i wirowano przez 100 min przy 142 000 x g w temperaturze 4°C. Korzystano z ultrawirówki Beckman Coulter Optima XPN-100 i rotora typu 45 Ti. Po zakończonym wirowaniu, supernatant zbierano i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszej analizy, jako pożywkę pozbawioną EVs. Uzyskany pelet pęcherzyków zawieszano w 50µl świeżego, sterylnego PBS i przechowywano do dalszych analiz w temperaturze -80°C.

3.2.8.2 Wizualizacja wyizolowanych EVs metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

W celu wizualizowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, świeżo wyizolowane EVs utrwalano w roztworze zawierającym 2% PFA w PBS. Następnie 5 µl zawiesiny przenoszono na miedzianą siatkę pokrytą formvarem i inkubowano przez 20 min. Następnie na kawałek parafilmu nanoszono kroplę wody podwójnie destylowanej o objętości 200 µl i na tę kroplę przenoszono miedzianą siatkę, w taki sposób, aby zawiesina pęcherzyków znajdująca się na powierzchni siatki była skierowana do kropli wody. Następnie siatkę przenoszono na kroplę 4% wodnego roztworu octanu uranylu o objętości 100 µl i inkubowano przez 10 min na lodzie. Na koniec siatkę delikatnie osuszano z nadmiaru roztworu na bibule filtracyjnej Whatmana i przechowywano w odpowiednich pudełkach. Gotowe siatki obrazowano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 (JEOL Co.) wyposażonego w kamerę MORADA G2 (EMSIS GmbH).

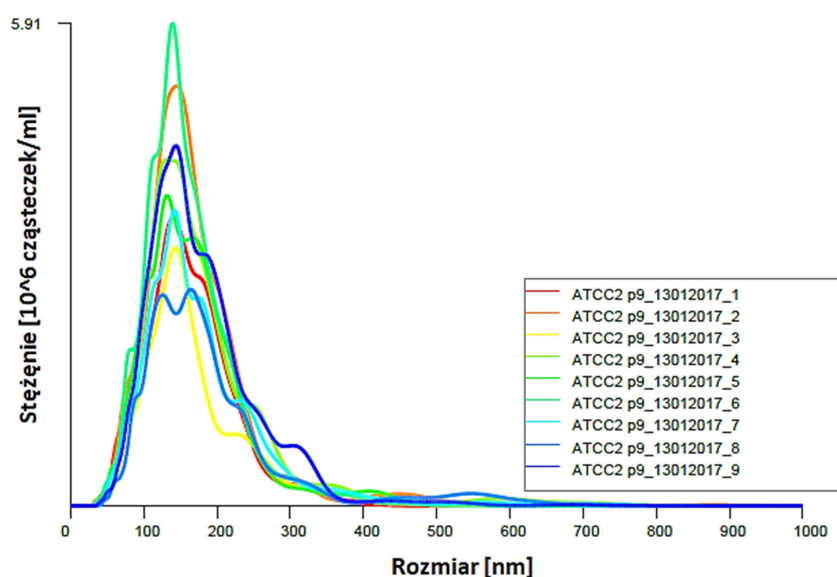
3.2.8.3 Pomiar wielkości i ilości wyizolowanych pęcherzyków

Średni rozmiar oraz stężenie wyizolowanych pęcherzyków mierzono techniką NTA (ang. Nanoparticle Tracking Analysis) za pomocą aparatu NanoSight NS500 (Malvern Instruments) znajdującego się w Instytucie Wysokich Ciśnień PAN w Warszawie. Metoda NTA polega na analizie wielkości nanocząstek zawieszonych w cieczy. Cząstki poruszające się w cieczy ruchami Browna są oświetlane promieniem lasera i obserwowane jako punkty świetlne. Rejestrowany przez kamerę film jest następnie analizowany przez wbudowane oprogramowanie i wyliczany jest współczynnik dyfuzji dla poszczególnych cząstek. Wielkość nanocząstek wyznaczana jest z równania Stokesa-Einsteina:

$$D_t = \frac{K_B T}{3\pi\eta d_h}$$

Gdzie: D_t – współczynnik dyfuzji, obliczony jako średni kwadrat przesunięcia nanocząstki w dwóch płaszczyznach: $D_t = \frac{\overline{(x,y)^2}}{4}$; K_B – stała Boltzmana; T – temperatura, η – lepkość, d_h – średnica hydrodynamiczna, równoważna średnicy nanocząstki

Każdą próbkę rozcieńczano 1:500 w PBS i mierzono poprzez rejestrowanie dziewięciu 1 minutowych filmów i analizowano za pomocą wbudowanego oprogramowania NanoSight NTA 3.2 Build 3.2.16 (Ryc. 3.4). Liczbę wydzielanych przez komórki EVs obliczano dzieląc stężenie cząstek w danej próbce przez liczbę komórek, z nad której wyizolowano pęcherzyki.



Ryc.3.4 Przykładowy wykres przedstawiający rozkład wielkości EVs oraz ich stężenie. Na wykresie zaznaczone są wyniki dla pojedynczych dziewięciu pomiarów analizowanej próbki.

3.2.8.4 ExoElisa

Liczbę pęcherzyków z ekspresją białka CD63 analizowano przy użyciu zestawu ExoElisa-Ultra CD63 (System Biosciences). Test ExoElisa jest czułym i bezpośrednim testem ELISA służącym do ilościowego określenia liczby egzosomów w danej próbce. Egzosomy są wychwytywane w nienaruszonym stanie na specjalnych płytkach o wysokim stopniu wiązania białek. Dołki płytki inkubuje się z pierwszorzędowym przeciwciałem anti-CD63, które rozpoznaje białko tetraspaniny na powierzchni egzosomu. Do amplifikacji sygnału stosuje się drugorzędowe przeciwciało związane z peroksydazą chrzanową, a do odczytu stosuje się kolorymetryczny substrat. Akumulacja barwnego produktu jest proporcjonalna do ilości antygeny CD63 obecnego w poszczególnym dołku.

Specjalne płytki oraz niezbędne bufony były dołączone do zestawu dostarczonego przez producenta, a przygotowanie próbek do analizy prowadzono według dostarczonego protokołu. W skrócie: na płytkę naniesiono po 50 µl próbek zawierających EVs oraz roztwory krzywej wzorcowej i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie płytkę przepłukano trzykrotnie po 5 minut buforem do płukania dołączonym do zestawu i nałożono po 50 µl przeciwciała pierwszorzędowego anti-CD63 rozcieńczonego 1:100 w buforze do blokowania i inkubowano przez 1 godzinę w temp. pokojowej na wytrząsarce. Następnie płytkę trzykrotnie przepłukano i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, rozcieńczonym 1: 5000, w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę na wytrząsarce. Płytkę ponownie przepłukano trzykrotnie po 5 min buforem do płukania, a następnie dodano substrat kolorymetryczny i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Po tym od razu dodano bufor stopujący. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Sunrise (Tecan) i analizowano za pomocą oprogramowania X-fluor 4.

3.2.8.5 Western blotting

Ilościowe oznaczenie białka przy użyciu kwasu bis-cynchonianowego (BCA)

Próbki zawierające pęcherzyki zewnątrzkomórkowe rozcieńczano 10-krotnie w PBS i nanoszono po 5 µl w trzech powtórzeniach na płytkę 96-dołkową. Następnie dodawano 100 µl roztworu siarczanu (VI) miedzi (II) w kwasie bis-cynchoninowym rozcieńczonego w stosunku 1:50 i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 min. Wartości absorbancji próbek mierzono przy długości fali 560 nm przy użyciu spektrofotometru Tecan Sunrise (Tecan) i analizowano za pomocą oprogramowania X-fluor 4. Na podstawie odczytów

absorbancji z krzywej wzorcowej standardu albuminy z surowicy bydlęcej BSA (zakres 0 - 1 mg/ml) obliczono wartość stężenia białka w próbkach.

Przygotowanie próbek

Roztwory EVs poddano lizie w buforze SB z dodatkiem 0,2% błękitu bromofenolowego i 100 mM DTT i denaturowano przez 10 min w temperaturze 95°C. W przypadku wizualizacji białek CD63 i CD81, pelety pęcherzyków poddawano lizie w buforze SB bez dodatku DTT (warunki niedenaturujące). Na żel nakładano taką samą ilość białka (po 20 µg) lub ilość wyizolowanego białka z pęcherzyków, które były wydzielane przez taką samą liczbę komórek.

Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym, transfer na membranę oraz wizualizacja białek były przeprowadzone analogicznie, jak zostało to już opisane w rozdziałach 3.2.5.2 oraz 3.2.5.3.

3.2.8.6 Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Ilościową analizę proteomiczną białek znajdujących się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych przeprowadzono przy użyciu izobarycznych znaczników fragmentacyjnych TMT (ang. *tandem mass tag*). Zastosowanie znakowanych standardów polega na wprowadzeniu (metabolicznie, chemicznie lub enzymatycznie) różnych znaczników masowych, które zmieniają masę białka lub peptydu. Następnie próbki łączy się w jedną, a porównanie ilościowe przeprowadza się porównując względną intensywność jonów produktu peptydowego. Znaczniki TMT reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, dzięki czemu możliwe jest efektywne znakowanie peptydów powstałych w wyniku hydrolizy białek. Identyfikacja peptydów możliwa jest przy użyciu tandemowej spektrometrii masowej i metoda ta pozwala na ilościowe określenie względnej zawartości białek z maksymalnie 10 różnych próbek.

Analizę proteomiczną przeprowadzono w Pracowni Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, przy użyciu systemu nanoAcquity UPLC (Waters) sprzężonego ze spektrometrem masowym Orbitrap Q Exactive (Thermo Fisher Scientific). Szczegółowy opis przygotowania i pomiaru próbek znajduje się w publikacji (Gluchowska i wsp. 2022). Do wizualizacji uzyskanych danych wykorzystano programy FunRich 3.1.3 oraz Cytoscape 2.5.8 z pakietem ClueGo.

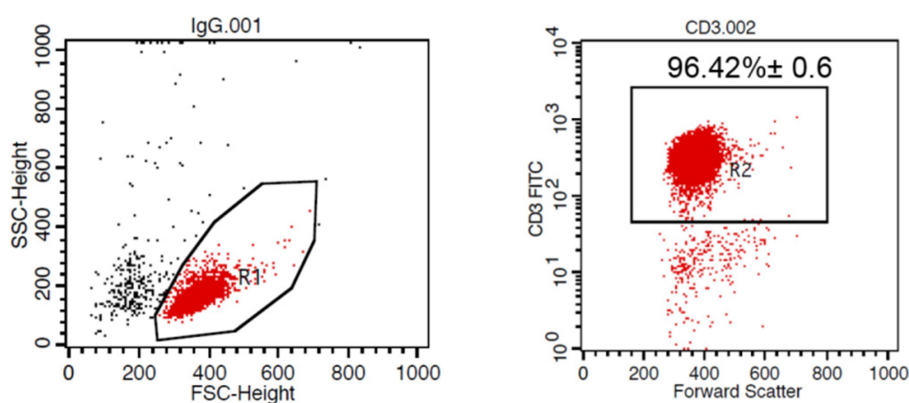
3.2.9 Izolacja limfocytów T z kożuszka leukocytarno - płytkowego i ich aktywacja

Limfocyty T (CD3+) izolowano w wyniku negatywnej selekcji za pomocą zestawu RosetteSep Human T Cell Enrichment Cocktail (szczegółowy opis zestawu zamieszczono w rozdziale 3.1.1.5). Do odpowiedniej objętości kożuszka leukocytarno-płytkowego dodawano koktajl przeciwciał (stężenie 25 $\mu\text{l/ml}$) i inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę rozcieńczono PBS bez jonów wapnia i magnezu z dodatkiem 2% FBS w stosunku 1:2. Rozcieńczony roztwór nakładano na Ficoll w stosunku 3:1 i wirowano przy 2800 rpm (1200 x g) przez 20 min. Powstałą „interfazę” utworzoną przez wyselekcjonowane komórki (CD3+) zbierano za pomocą pipety pasterowskiej i trzykrotnie płukano PBS; jeden raz PBS z dodatkiem 2% FBS i dwukrotnie PBS bez surowicy. Komórki za każdym razem wirowano przez 5 min przy 1500 rpm (400 x g). Następnie komórki liczone przy użyciu komory Neubauera i zawieszano w PBS bez surowicy w gęstości 20 mln komórek na 1 ml PBS. Przy jednoczesnym worteksowaniu zawiesiny komórek stopniowo dodawano barwnik do proliferacji o stężeniu 20 μM i następnie inkubowano przez 10 min w temperaturze 37°C w ciemności. W celu zastopowania barwienia dodano 4 objętości zimnej pożywki RPMI – 1640 z dodatkiem 10% FBS, 2mM glutaminy, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny i 50 U/ml penicyliny i inkubowano 5 min na lodzie. Następnie komórki wirowano trzykrotnie przez 5 min przy 1500 rpm (400 x g) w obecności pożywki.

Uzyskane w wyniku izolacji limfocyty T aktywowano w obecności kulek do aktywacji (T cell activation/ expansion kit, Miltenyi Biotec). Zakłada się, że kulki pokryte biotynylowanymi przeciwciałami naśladują działanie komórek prezentujących antygen, prowadząc do aktywacji spoczynkowych limfocytów T. W tym celu przygotowano mieszaninę przeciwciał składającą się ze 100 μl przeciwciała anti-CD2, 100 μl przeciwciała anti-CD3 oraz 100 μl przeciwciała anti-CD28. Po dokładnym wymieszaniu dodano do niej 500 μl zawiesiny kulek antybiotynowych i 200 μl buforu. Następnie mieszaninę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 2-8°C stale mieszając przy użyciu rotatora z predkością ok 4 rpm. W celu aktywacji limfocytów T, pobrano odpowiednią objętość roztworu kulek (25 μl mieszaniny na 5×10^6 komórek), dodano 100-200 μl pożywki RPMI i zwirowano przez 5 min przy 300 x g. Supernatant zlano, a kulki zawieszono w 100 μl świeżej pożywki. Limfocyty T zawieszono w 900 μl pożywki, dodano do nich 100 μl przygotowanego roztworu kulek i dokładnie mieszano. Komórki hodowano w szalkach 24-dołkowych, w gęstości 1 mln komórek/1 ml pożywki na dołek.

3.2.9.1 Ocena czystości wyizolowanej frakcji limfocytów CD3+

Czystość wyizolowanej frakcji limfocytów CD3+ określono za pomocą cytometru przepływowego. W tym celu 1 mln limfocytów wyizolowanych z kożuszka leukocytno-płytkowego zawieszono w PBS i zwirowano przez 5 min przy 1500 rpm. Następnie osad komórkowy inkubowano przez 20 minut w 50 μ l roztworu przeciwciała anti-CD3 (przeciwciała rozcieńczano w PBS w stosunku 1:200). Po tym czasie komórki przepłukano, dodając 1 ml PBS i zwirowano przez 5 min przy 1500 rpm. Osad komórkowy zawieszano w 200 μ l PBS i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur (Ryc. 3.5). Wyizolowana z kożuszka leukocytno - płytkowego frakcja limfocytów składała się w ponad 95% z populacji komórek limfocytów T (CD3+).



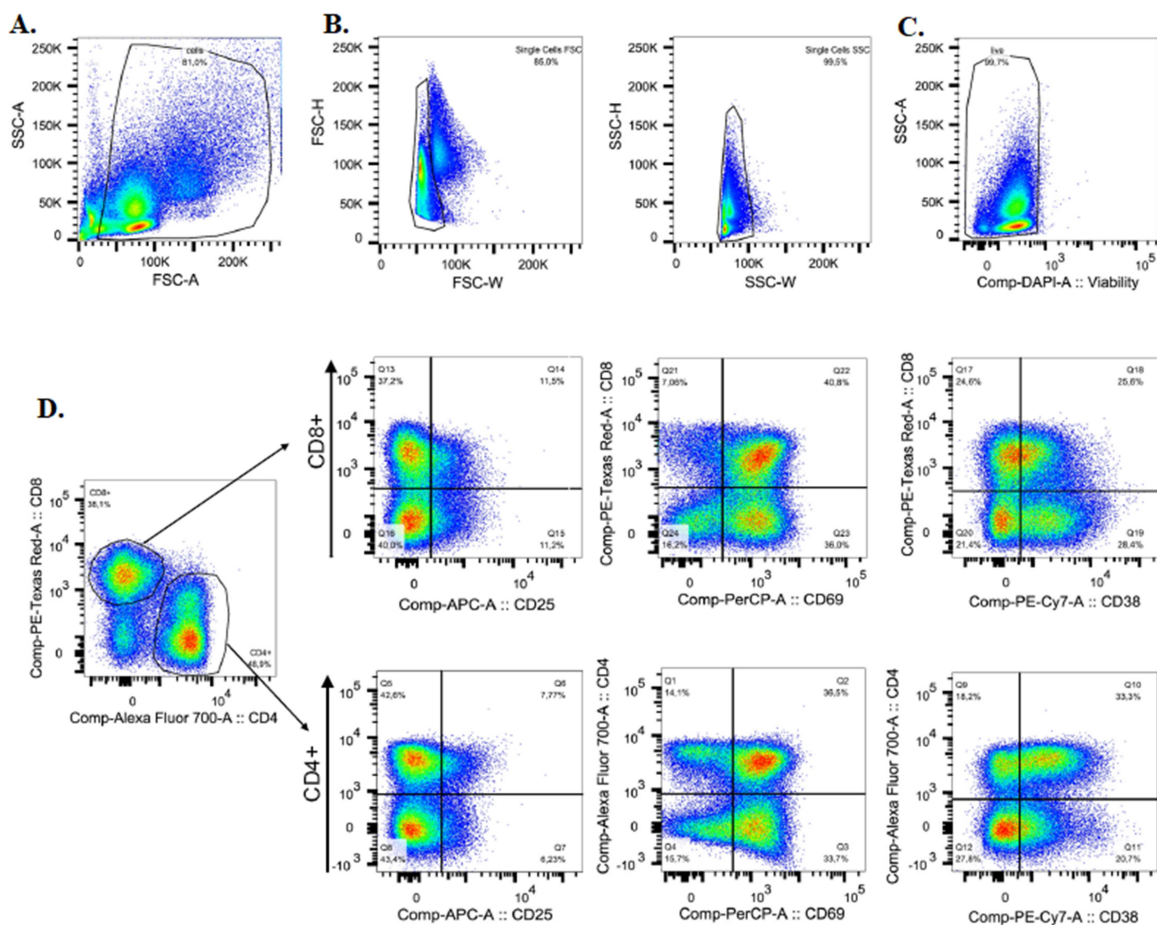
Ryc. 3.5 Przykładowy wykres punktowy (*dot-plot*) przedstawiający procentową liczbę limfocytów T (CD3+) wyizolowanych z kożuszka leukocytno - płytkowego.

3.2.9.2 Pomiar poziomu aktywacji limfocytów T

Wyizolowane z kożuszka leukocytno-płytkowego limfocyty T, po inkubacji z barwnikiem stosowanym do pomiaru proliferacji oraz zaaktywowane przy pomocy kulek do aktywacji, hodowane były w różnych warunkach (w zależności od schematu doświadczenia). Poziom aktywacji mierzono po 24 i 72 godzinach, a proliferację po 96 godzinach hodowli za pomocą cytometru przepływowego.

W celu dobrania właściwego stężenia przeciwciał wykorzystanych do znakowania, w pierwszej kolejności przeprowadzono analizę rozcieńczeń przeciwciał tzw. *antibody titration*. Następnie, w celu oceny efektu skompensowania nakładających się widm emisji fluorescencji poszczególnych fluochromów, przeprowadzono kontrole FMO-1 (ang. *fluorescence-minus-one*).

Poziom aktywacji limfocytów T mierzono na podstawie ekspresji CD25, CD69 oraz CD38. W tym celu po 24 i 72 godzinach hodowli zbierano zawiesinę komórkową, dodawano do niej 1 ml PBS i wirowano przez 5 min przy 1500 rpm. Po zwirowaniu, limfocyty zawieszano w 1 ml PBS z dodatkiem barwnika na przeżywalność (0,5 μ l przeciwciała na 1 ml PBS) i inkubowano 20 minut w temperaturze 4°C w ciemności. Następnie dodano PBS i ponownie zwirowano j.w. Limfocyty zawieszano w 50 μ l mieszaniny przeciwciał: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD69 i anti-CD38 (każde przeciwciało rozcieńczano 1:200 w PBS) i inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Następnie do komórek dodano PBS i ponownie zwirowano j.w. Pelet komórkowy zawieszano w 220 μ l PBS i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Dane analizowano za pomocą programu FlowJo (Ryc. 3.6).



Ryc. 3.6 Schemat bramkowania limfocytów T. A – ustalenie bramki dla limfocytów w oparciu o parametry FSC/SSC, B – bramkowanie w celu eliminacji dubletów, C- bramkowanie komórek żywych, D – bramkowanie subpopulacji CD4 i CD8 po ustaleniu bramki na populacji żywych limfocytów oraz ustawienie bramek na subpopulacji limfocytów CD8+/CD25+, CD8+/CD69+, CD8+/CD38+, CD4+/CD25+, CD4+/CD69+, CD4+/CD38+.

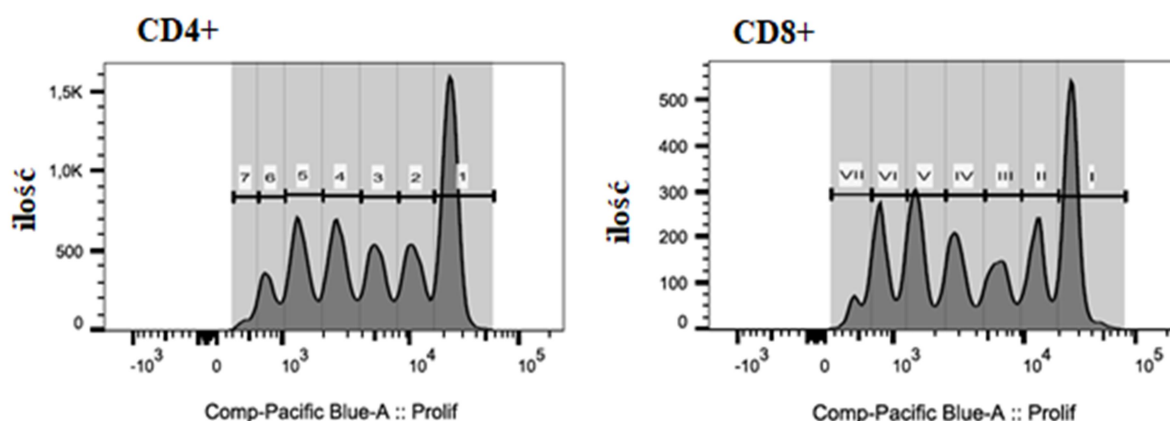
3.2.9.3 Pomiar proliferacji limfocytów T

W przypadku oceny proliferacji, komórki przygotowywano na analizę analogicznie jak przy pomiarach aktywacji. Po zebraniu zawiesiny komórkowej, zwirowano ją. Następnie komórki inkubowano najpierw z barwnikiem na przeżywalność, a następnie z przeciwciałami anti-CD4 i anti-CD8 (rozcieńczenie 1:200 w PBS). Po zwirowaniu, limfocyty zawieszano w 220 µl PBS i mierzono przy użyciu cytometru przepływowego BD LSRFortessa (Ryc. 3.7). Na podstawie zebranych pomiarów obliczano wskaźnik podziału (DI, ang. *Division Index*) oraz wskaźnik proliferacji (PI, ang. *Proliferation Index*), według poniższych wzorów:

$$DI = \frac{\sum_0^i i \cdot \frac{N_i}{2^i}}{\sum_0^i \frac{N_i}{2^i}} \quad PI = \frac{\sum_1^i i \cdot \frac{N_i}{2^i}}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$$

Gdzie: i – numer podziału, N_i – liczba komórek znajdujących się w danym podziale

Wskaźnik podziału (DI) to średnia liczba wykonanych podziałów przez wszystkie komórki znajdujące się w hodowli, natomiast wskaźnik proliferacji (PI) określa średnią liczbę wykonanych podziałów wyłącznie przez komórki, które weszły w podziały.



Ryc. 3.7 Przykładowe histogramy przedstawiające proliferację limfocytów T CD4+ i CD8+ analizowaną po 96h hodowli.

3.2.10 Badanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty na limfocyty T

W celu zbadania wpływu czynników wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, wyizolowane i zaaktywowane limfocyty T hodowane były w obecności pożywki zebranej z komórek VSMC (pożywka kondycjonowana, CM). W tym celu komórki VSMC wysiewane były na dołki w szalkach 24-dołkowych w gęstości 10 tys. komórek na dołek i po 24 godzinach indukowano w nich starzenie dodając H₂O₂ o stężeniu

końcowym 150 μ M. Komórki hodowano następnie przez 7 dni (SIPS I) lub przez 4 tygodnie (SIPS IV). Przed planowanym doświadczeniem dosiewano na szalkach komórki stare replikacyjnie (RS) oraz komórki mięśni gładkich naczyń wyizolowane z blaszek miażdżycowych (AP) również w gęstości 10 tys./dołek. Komórki kontrolne, będące na wczesnych pasażach dosiewano na dwa dni przed planowanym doświadczeniem w gęstości 8 tys./dołek. Komórki te były następnie hodowane przez 24 godziny w świeżej pożywce, zawierającej surowicę oraz suplementy. Po 24 godzinach, pożywkę z nad komórek zbierano i zawieszano w niej świeżo wyizolowane z kożuszka leukocytarno - płytkowego i zaktywowane limfocyty T. Pomiar przy użyciu cytometru przepływowego wykonywano codziennie przez 4 dni. Poziom aktywacji limfocytów T analizowano na podstawie pomiarów wykonanych po 24 i 72 godzinach, natomiast proliferację na podstawie danych po 96 h.

3.2.10.1 Oznaczenie ilości wydzielanych cytokin przez limfocyty T

W celu oceny ilości cytokin wydzielanych przez limfocyty T hodowane w różnych warunkach korzystano z gotowego zestawu do analizy poziomu cytokin Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences). 200 μ l pożywki zebrano po 72 godzinach od aktywacji, zwirowano przy 300 x g przez 5 minut i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu pomiaru. Test przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Pomiar cytokin: IL-17a, IL-10, IL-2, IL-4, TNF i IFN- γ przeprowadzono za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Otrzymane dane analizowano przy użyciu programu BD FCAP ArrayTM 3.0.

3.2.10.2 Ocena migracji limfocytów T

Wyizolowane z kożuszka leukocytarno – płytkowego limfocyty T zaktywowano za pomocą kulek do aktywacji i wysiewano w gęstości 1mln/ml. Po 24 godzinach, komórki liczono i przenoszono do specjalnych szalek typu trans-well w gęstości 100 tys./ml. Po 4 godzinach zbierano i liczono komórki, które pod wpływem obecnych w dolnej komorze czynników pochodzących z pożywki z hodowli komórek VSMC, nie przeemigrowały z komory górnej do dolnej. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniach zastosowano chemokinę CCL4 dodaną do czystej pożywki w trzech różnych stężeniach – 1 ng/ml, 10 ng/ml oraz 50 ng/ml.

3.2.10.3 Pobieranie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez limfocyty T

W celu oceny zdolności pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez limfocyty T, wyizolowane na świeżo EVs inkubowano z 7,5 μ M CFSE (Invitrogen) rozpuszczonym w PBS

z dodatkiem 0,5% BSA przez pół godziny w temperaturze 37°C. Następnie wybarwione pęcherzyki zawieszono w pożywce pozbawionej surowicy i ponownie wirowano przez 100 minut przy 142 000 x g przy użyciu ultrawirówki Beckman Coulter Optima XPN-100 i rotora typu 45 Ti przy temp. 4°C. Otrzymany pelet EVs (~30 µg) zawieszano w 100 µl pożywki i inkubowano z aktywowanymi limfocytami T przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Wychwyty pęcherzyków przez limfocyty wizualizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica SP8) w świetle przechodzącym oraz fluorescencji (488 nm).

3.2.11 Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki stanowią wartości średnie z co najmniej trzech powtórzeń. Dokładna liczba powtórzeń (n) została umieszczona w opisach rycin. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD) lub ze standardowym błędem pomiaru (SEM). Do określenia normalności rozkładu zmiennej używano testu Shapiro-Wilka, do porównania grup – test t-student lub jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Za statystycznie istotne przyjęto wyniki dla $p < 0.05$. Istotność oznaczano względem odpowiedniej kontroli * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$); **** ($p < 0.0001$). Do obliczeń korzystano z oprogramowania GraphPad Prism 8.3.1.

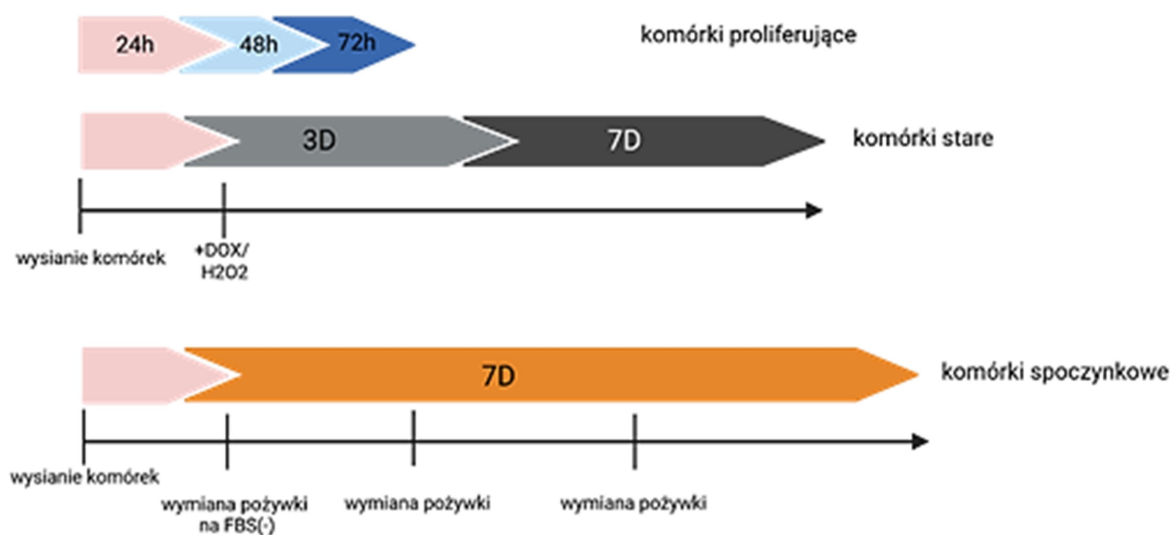
4. Wyniki

4.1 Charakterystyka ludzkich komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu przyspieszonemu indukowanemu stresem

W celu indukcji starzenia w doświadczeniach wykorzystano dwa związki. Pierwszy z nich – dokсорubicyna (DOX) jest związkiem powszechnie stosowanym w terapii przeciwnowotworowej (w chemioterapii) i działa jako inhibitor topoizomerazy II, co w efekcie prowadzi między innymi do powstania pęknięć dwuniciowego DNA. Drugi związek – nadtlenek wodoru (H_2O_2) powoduje stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzeń różnych makrocząsteczek, w tym także w DNA. Obydwa związki są powszechnie stosowane w celu indukcji przyspieszonego starzenia komórkowego w różnych typach komórek prawidłowych jak i nowotworowych (Duan i wsp. 2005, Sliwiska i wsp. 2009, Przybylska i wsp. 2016, Bojko i wsp. 2019).

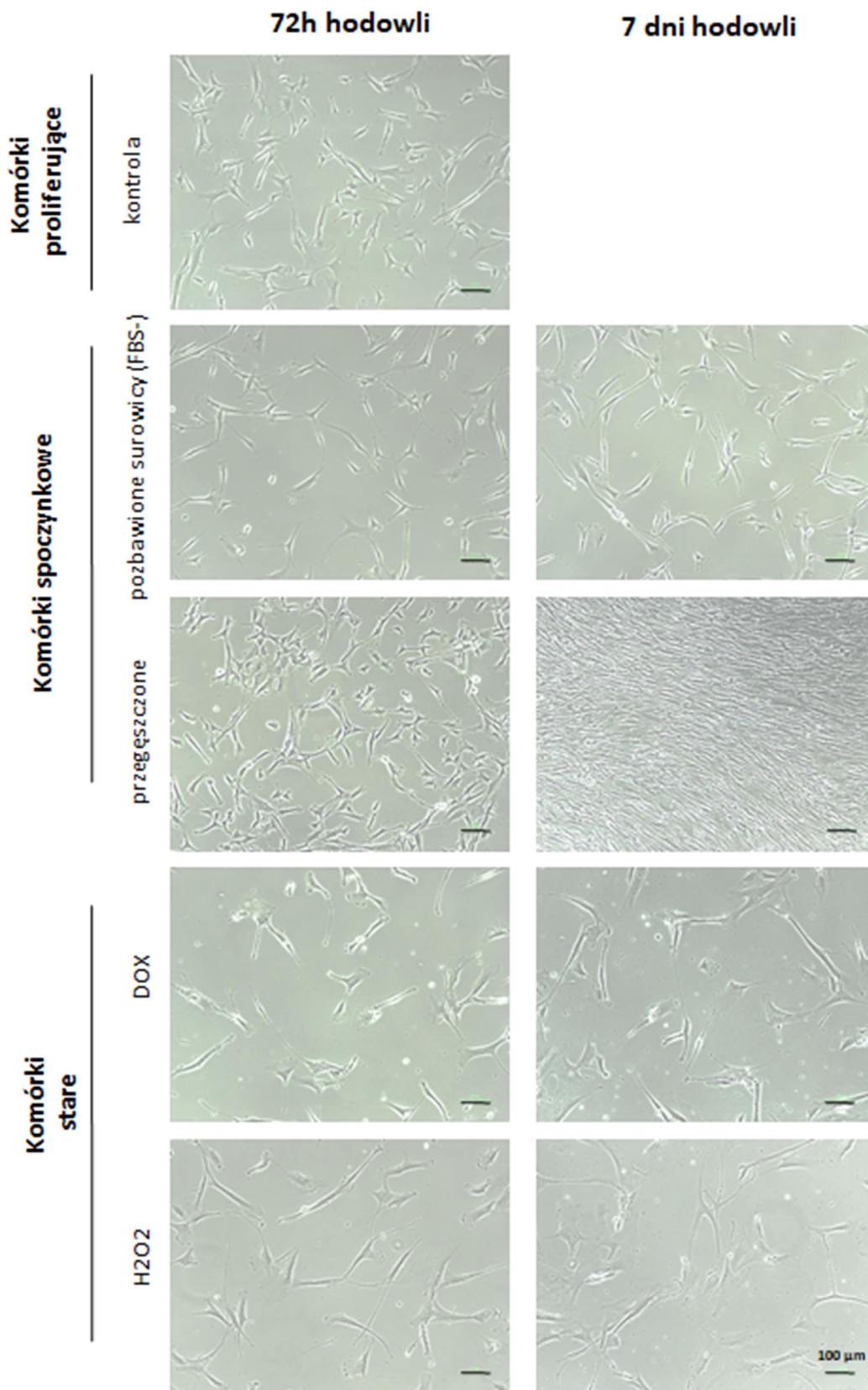
Komórki będące na wczesnych pasażach (między 5 a 8 pasażem) wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm², a następnie po 24 godzinach od wysiania traktowano je dokсорubicyną w stężeniu 150 nM lub H_2O_2 w stężeniu 150 μ M. Przy wyborze stężeń kierowano się wynikami wcześniejszych badań przeprowadzonych w Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia (Przybylska, 2016). Komórki analizowano po 3 i 7 dniach od podania związków. Jedną z podstawowych cech komórek starych, ulegających starzeniu replikacyjnemu, jak i starzeniu przyspieszonemu jest ich trwale i nieodwracalne zahamowanie proliferacji. W przeprowadzonych badaniach zastosowano dwie grupy komórek kontrolnych. Pierwszą z nich były komórki proliferujące, natomiast drugą komórki, których proliferacja została przejściowo zatrzymana i były w stanie spoczynku. Stan spoczynku (ang. *quiescence state*) to stan, w którym komórka wyszła z cyklu komórkowego i weszła w fazę G0. Komórki takie pozostają zdolne do ponownego wejścia w cykl pod wpływem odpowiedniego bodźca (Marescal i Cheeseman 2020). W poniższych doświadczeniach wykorzystano dwie różne metody zahamowania proliferacji komórek i wprowadzenia ich w stan spoczynku. W pierwszej metodzie komórki po 24 godzinach od wysiania były hodowane przez 7 kolejnych dni w pożywce pozbawionej surowicy, którą wymieniano co 3 dni. Pożywka pozbawiona surowicy zawierała wybrane czynniki wzrostu, które standardowo dodawane są do pożywki hodowlanej wykorzystywanej do tych komórek. Wstępne doświadczenia wykazały, że hodowla komórek zarówno bez surowicy jak i czynników wzrostu prowadziła do ich śmierci. W dalszej części pracy komórki hodowane w pożywce bez surowicy

opisywane są jako komórki „FBS (-)”. W drugiej metodzie wprowadzania komórek w stan spoczynku, komórki hodowano przez 8 dni w tym samym naczyniu hodowlanym do momentu ich przegęszczenia, wymieniając co 3 dni pożywkę na świeżą (Ryc. 4.1).



Ryc. 4.1 Schemat doświadczenia. Komórki będące na wczesnych pasażach wysiewano, a następnie zbierano po 24, 48 i 72 godzinach (komórki kontrolne – proliferujące). W celu indukcji starzenia, komórki kontrolne traktowano po 24 godzinach doksorubicyną (DOX) lub nadtlakiem wodoru (H_2O_2), a następnie zbierano po 3 i 7 dniach od traktowania. Komórki spoczynkowe uzyskiwano poprzez hodowanie ich przez 8 dni w celu osiągnięcia pełnej konfluencji (wariant przegęszczone) lub po 24 godzinach od wysiania hodowane były kolejne 7 dni w pożywce pozbawionej surowicy (wariant FBS (-)).

Na każdym etapie hodowli stan komórek oraz ich poziom konfluencji był monitorowany. Na rycinie 4.2 przedstawiono wybrane zdjęcia z hodowli komórek VSMC wykonane po 3 oraz 7 dniach od rozpoczęcia doświadczeń.

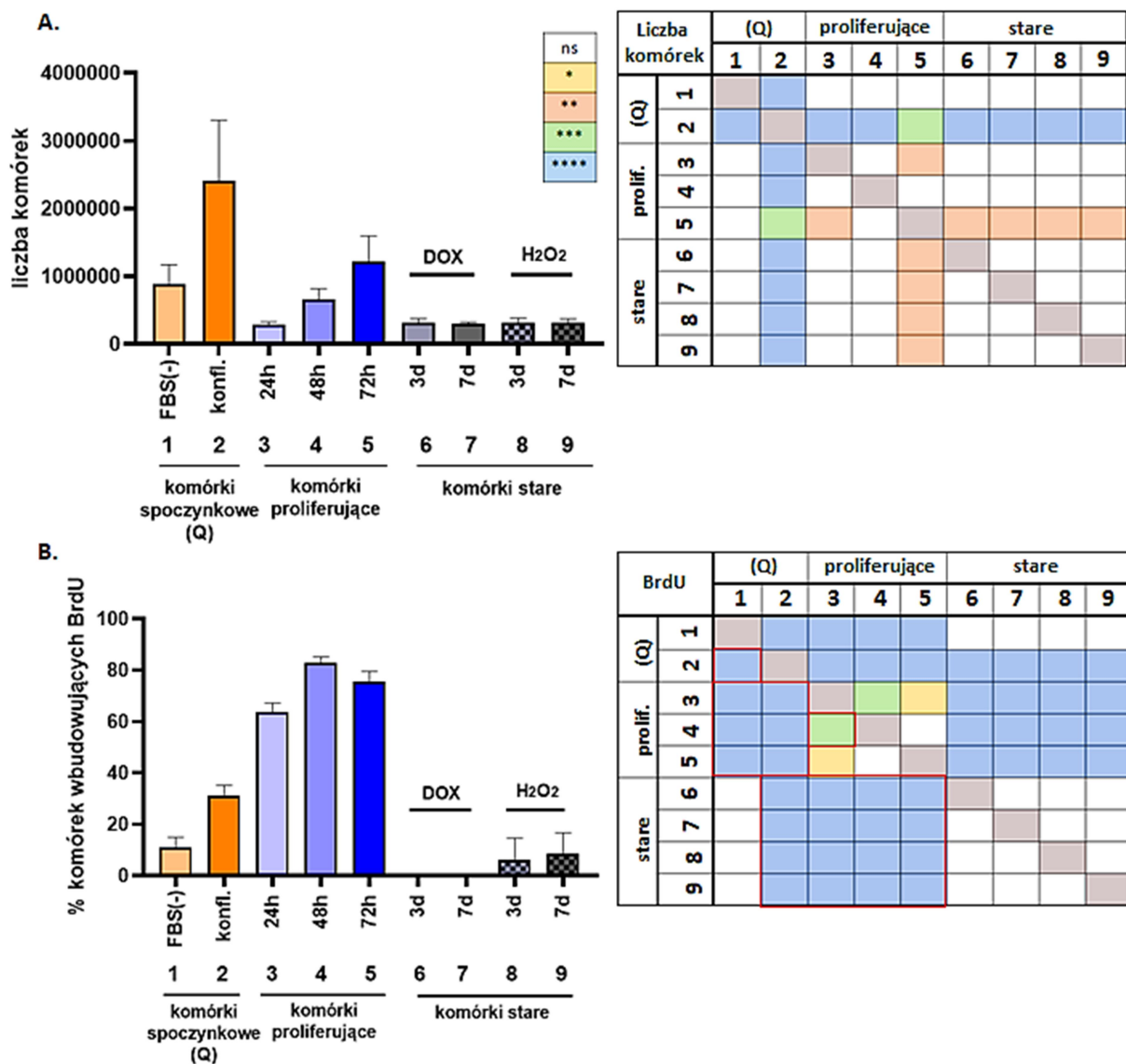


Ryc. 4.2. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające hodowlę komórek VSMC w określonych warunkach doświadczalnych. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μm .

4.1.1 Ocena zahamowania proliferacji w komórkach indukowanych do starzenia oraz w komórkach głodzonych i przegęszczonych

W celu oceny efektywności zahamowania proliferacji, komórki zbierano w kilku punktach czasowych i liczono. Liczba komórek, po 3 i 7 dniach od podania doksorubicyny lub nadtlenu wodoru była zbliżona do liczby komórek kontrolnych w tym samym dniu, w którym podawano te związki. Nie zaobserwowano spadku liczby komórek indukowanych do starzenia, co świadczy o cytostatycznym działaniu doksorubicyny i nadtlenu wodoru w wybranych stężeniach. Liczba komórek hodowanych przez 7 dni w pożywce FBS (-) wzrosła bardzo nieznacznie względem komórek kontrolnych zebranych po 48 godzinach i nie różniła się istotnie statystycznie od liczby komórek ulegających starzeniu. Dowodzi to, że również w tym wariantcie eksperymentalnym doszło do efektywnego ograniczenia ich proliferacji (Ryc. 4.3A).

Zahamowanie podziałów komórkowych związane jest ze spadkiem liczby komórek zdolnych do syntezy DNA. Za pomocą testu włączania BrdU określono procent komórek zdolnych do wbudowywania tego nukleozydu (Ryc. 4.3B). Analiza wyników pokazała, że w ciągu pierwszych 24 godzin od wysiania, w ok. 60% komórek zachodzi replikacja, a w kolejnych 48 i 72 godzinach liczba ta istotnie wzrasta do 80%. W przypadku komórek traktowanych doksorubicyną, już po 3 dniach nie zaobserwowano komórek zdolnych do syntezy DNA, natomiast podanie nadtlenu wodoru zahamowało syntezę DNA (brak wbudowania BrdU) w ok. 92% komórek. W komórkach będących w stanie spoczynku również zaobserwowano istotny spadek zdolności syntezy DNA w porównaniu do komórek proliferujących. Jedynie ok. 10% komórek hodowanych w pożywce pozbawionej surowicy było zdolnych do wbudowywania BrdU, natomiast wśród komórek przegęszczonych (konfl.) w ok. 30% zachodziła replikacja. Komórki ulegające starzeniu i komórki spoczynkowe (FBS-) nie różniły się istotnie statystycznie pod względem liczby komórek zdolnych do syntezy DNA.

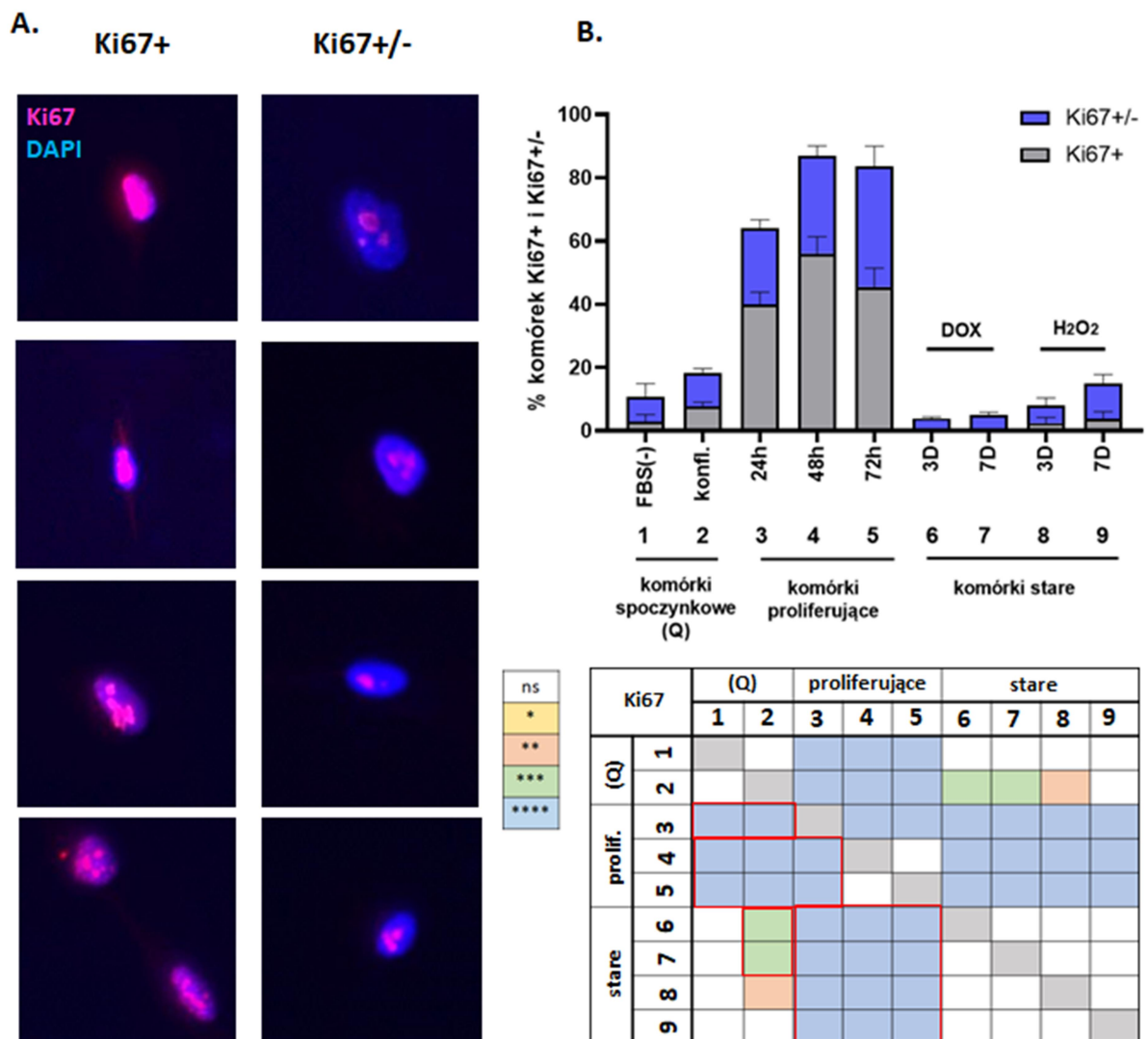


Ryc. 4.3 Porównanie aktywności proliferacyjnej VSMC. A. Wykres przedstawiający średnią liczbę komórek VSMC zebranych w poszczególnych dniach doświadczenia. B. Analiza ilościowa komórek VSMC zdolnych do syntezy DNA (komórki wbudowujące BrdU). Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=4. Tabele umieszczone obok wykresów ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001). Czerwonymi ramkami zaznaczono różnice o najwyższej istotności statystycznej.

4.1.2 Analiza poziomu białka Ki67

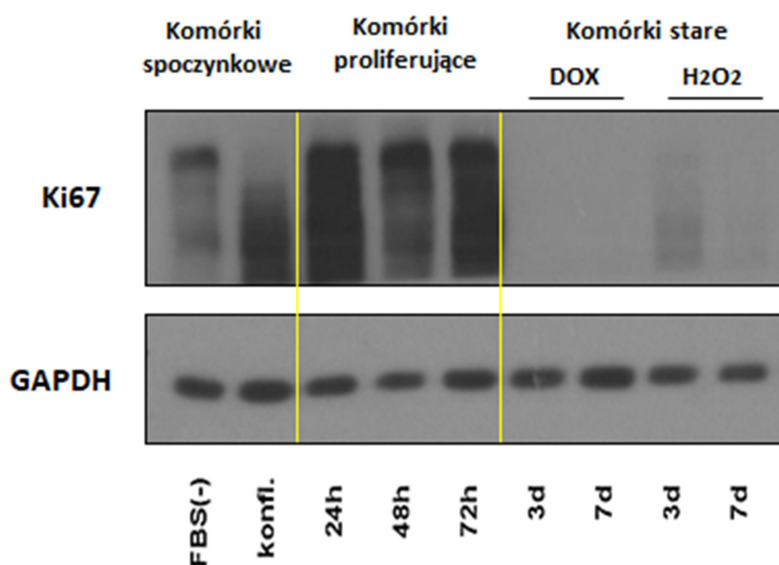
Potencjał proliferacyjny komórek określano także na podstawie analizy poziomu białka Ki67, które jest markerem komórek będących w cyklu (Scholzen, 2000). Uważa się, że brak ekspresji Ki67 jest charakterystyczny dla komórek nieproliferujących. Na podstawie uzyskanych wyników wyróżniono dwie grupy komórek, w których identyfikowano obecność białka Ki67: komórki Ki67+, które charakteryzowały się wysokim poziomem tego białka oraz komórki Ki67+/-, w których obserwowano obniżony poziom białka Ki67 (Ryc. 4.4A).

W przypadku komórek proliferujących, w pierwszej dobie hodowli 64% komórek wykazywało ekspresję Ki67, z czego 2/3 tych komórek charakteryzowało się wysokim poziomem tego białka (Ki67+). W kolejnych 48 i 72 godzinach hodowli liczba komórek z wyznakowanym białkiem Ki67 istotnie zwiększała się i wynosiła ponad 80%. Zarówno komórki traktowane doksorubicyną lub nadtlaniem wodoru, jak i komórki będące w stanie spoczynku charakteryzowały się istotnym spadkiem potencjału proliferacyjnego. Wśród tych komórek obserwowano jedynie niewielki procent komórek o obniżonym poziomie białka Ki67 (Ryc. 4.4B).



Ryc. 4.4 Porównanie poziomu białka Ki67 w komórkach VSMC. A. Reprezentatywne zdjęcia komórek wyznakowanych przeciwciałem anti-Ki67, obrazujące różną ilość i lokalizację tego białka, na podstawie których dokonano analizy ilościowej. B. Analiza ilościowa komórek VSMC z ekspresją Ki67 z uwzględnieniem różnego poziomu tego białka w komórkach. Na wykresie przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=4. Tabela umieszczona poniżej wykresu ilustruje wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001). Czerwonymi ramkami zaznaczono różnice o najwyższej istotności statystycznej.

Co ciekawe odsetek komórek, w których stwierdzono obecność tego białka był podobny w przypadku obu grup badanych, podczas gdy analiza Western blotting wykazała, że komórki stare miały znacząco obniżony poziom Ki67 w porównaniu do komórek w stanie spoczynku (Ryc. 4.5). Zgodnie z analizą immunocytochemiczną poziom białka Ki67 był najwyższy w komórkach proliferujących. Przeprowadzona analiza Western blotting dowiodła istnieniu różnic w poziomie białka Ki67 pomiędzy komórkami nieproliferującymi, a ulegającymi starzeniu, co sugeruje, że samo zatrzymanie komórek w cyklu nie jest jedynym powodem obniżenia ekspresji badanego markera.



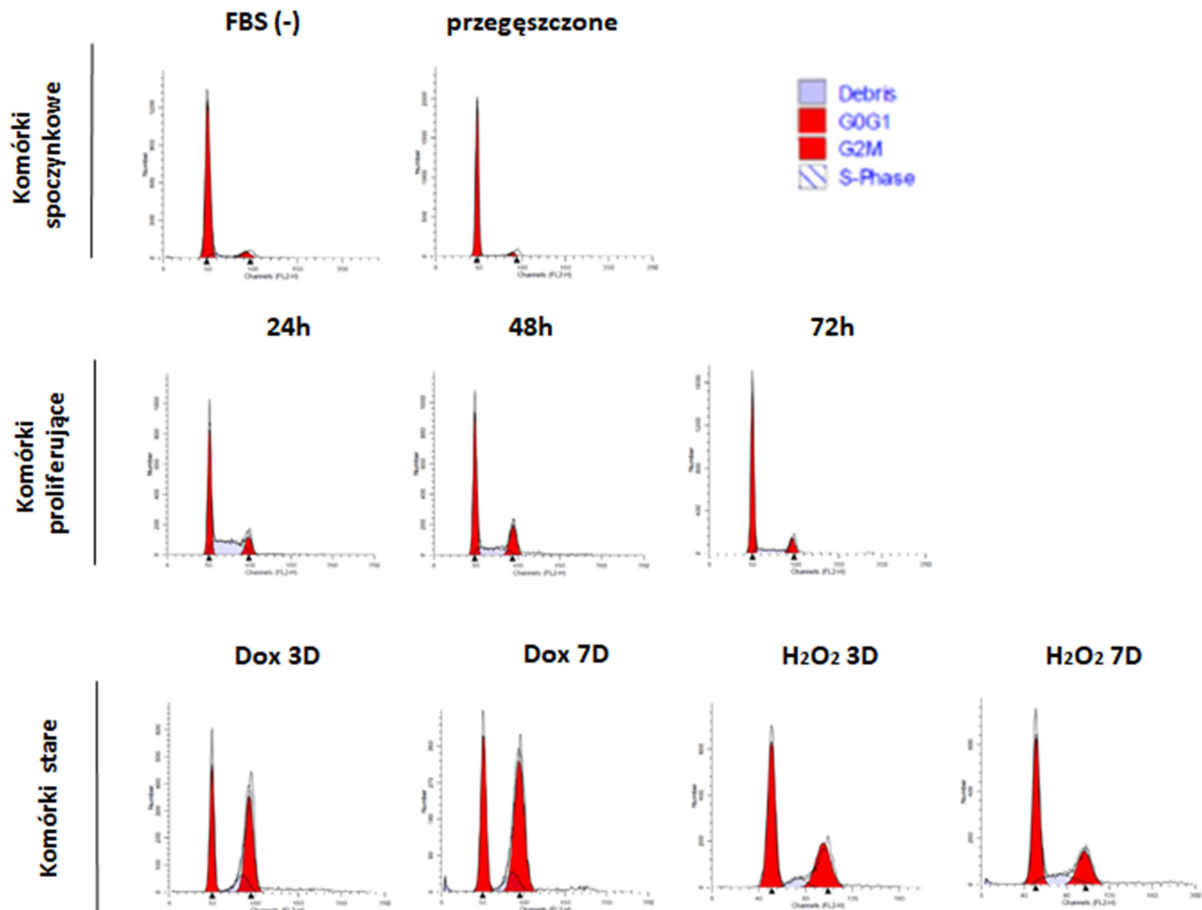
Ryc. 4.5 Analiza poziomu białka Ki67 metodą Western blotting w komórkach VSMC. Na rycinie przedstawiono reprezentatywny dla trzech powtórzeń blot.

4.1.3 Analiza cyklu komórkowego

Kolejnym etapem badań było określenie różnic w cyklu pomiędzy komórkami proliferującymi, spoczynkowymi oraz ulegającymi starzeniu.

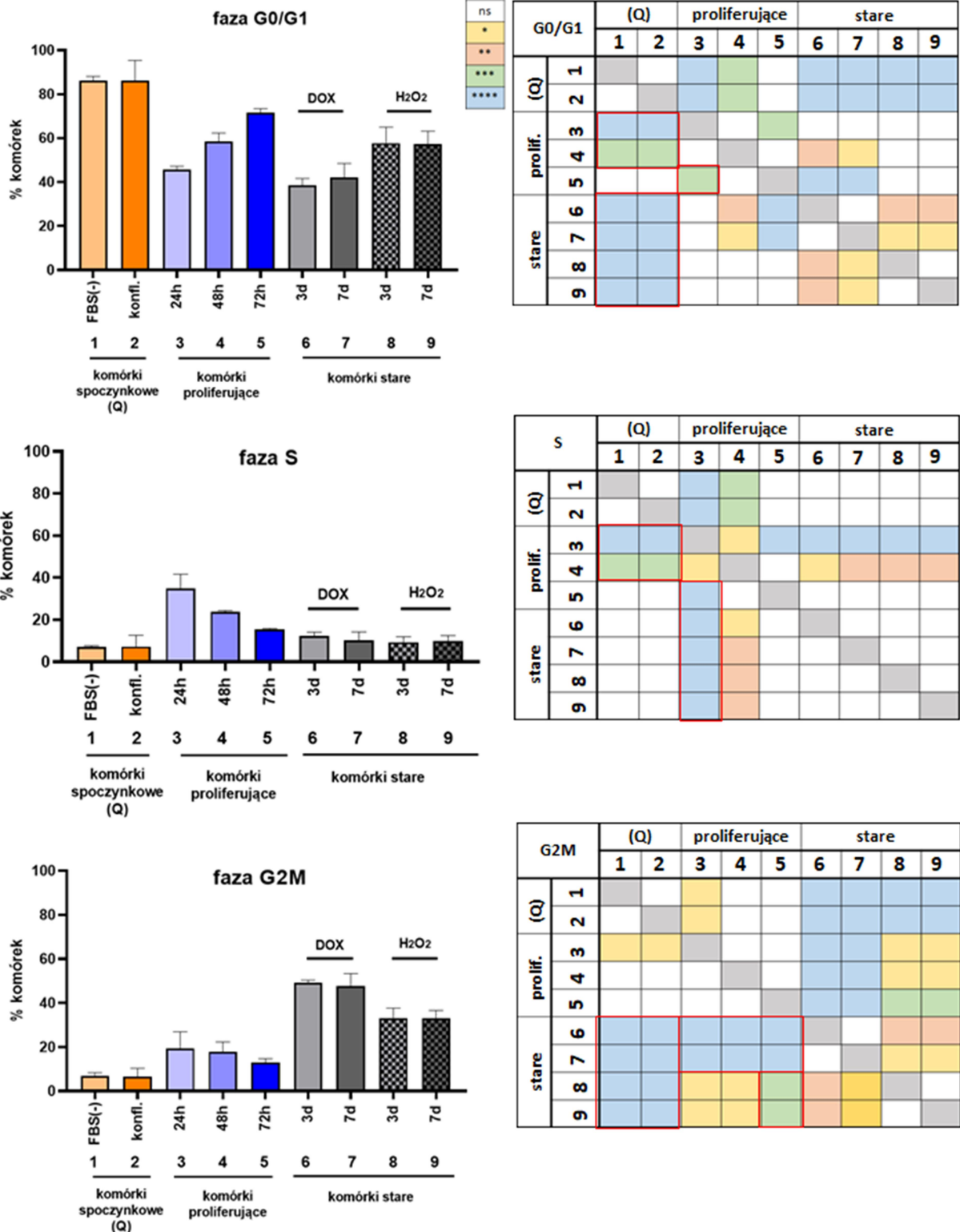
Zaobserwowano, że komórki nieproliferujące, czyli spoczynkowe oraz stare różniły się pod względem faz cyklu komórkowego. Pierwsze z nich gromadziły się w fazie G0/G1 (ok. 90%), podczas gdy komórki stare były zatrzymane zarówno w fazie G0/G1 jak i G2/M, przy czym wyższy odsetek komórek w fazie G2/M zaobserwowano dla komórek poddanych działaniu DOX aniżeli H₂O₂ (Ryc. 4.6). Dalsza analiza wykazała istotne różnice w rozkładzie komórek w cyklu pomiędzy komórkami traktowanymi DOX a H₂O₂. Wyższy odsetek komórek w fazie G0/G1 zaobserwowano dla komórek poddanych działaniu H₂O₂ (ok. 60%), aniżeli DOX (ok. 40%). Z kolei w fazie G2/M zatrzymanych było ok. 50% komórek indukowanych do

starzenia za pomocą doksorubicyny i ok. 30% komórek indukowanych nadtlenkiem wodoru (Ryc. 4.7). Różnica pomiędzy liczbą komórek w fazie G2/M zidentyfikowanych wśród komórek starych i spoczynkowych, a tych występujących w komórkach proliferujących wykazywała najwyższą istotność statystyczną, chociaż była ona obserwowana tylko w przypadku indukcji starzenia doksorubicyną.



Ryc. 4.6 Cytometryczna analiza cyklu komórkowego. Przykładowe histogramy przedstawiające rozkład komórek VSMC w poszczególnych fazach cyklu w zależności od wariantu doświadczenia.

Cytometryczna analiza cyklu komórkowego VSMC wykazała także wyraźnie istotny spadek komórek w fazie S, zarówno w przypadku komórek indukowanych do starzenia, jak i komórek spoczynkowych w porównaniu do komórek proliferujących. Stopniowy i istotny spadek liczby komórek w fazie S obserwowano także w komórkach proliferujących w kolejnych dobach hodowli. Odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego wśród komórek kontrolnych po 72 godzinach hodowli był zbliżony do liczby komórek w fazie S, które były indukowane do starzenia. (Ryc. 4.7).

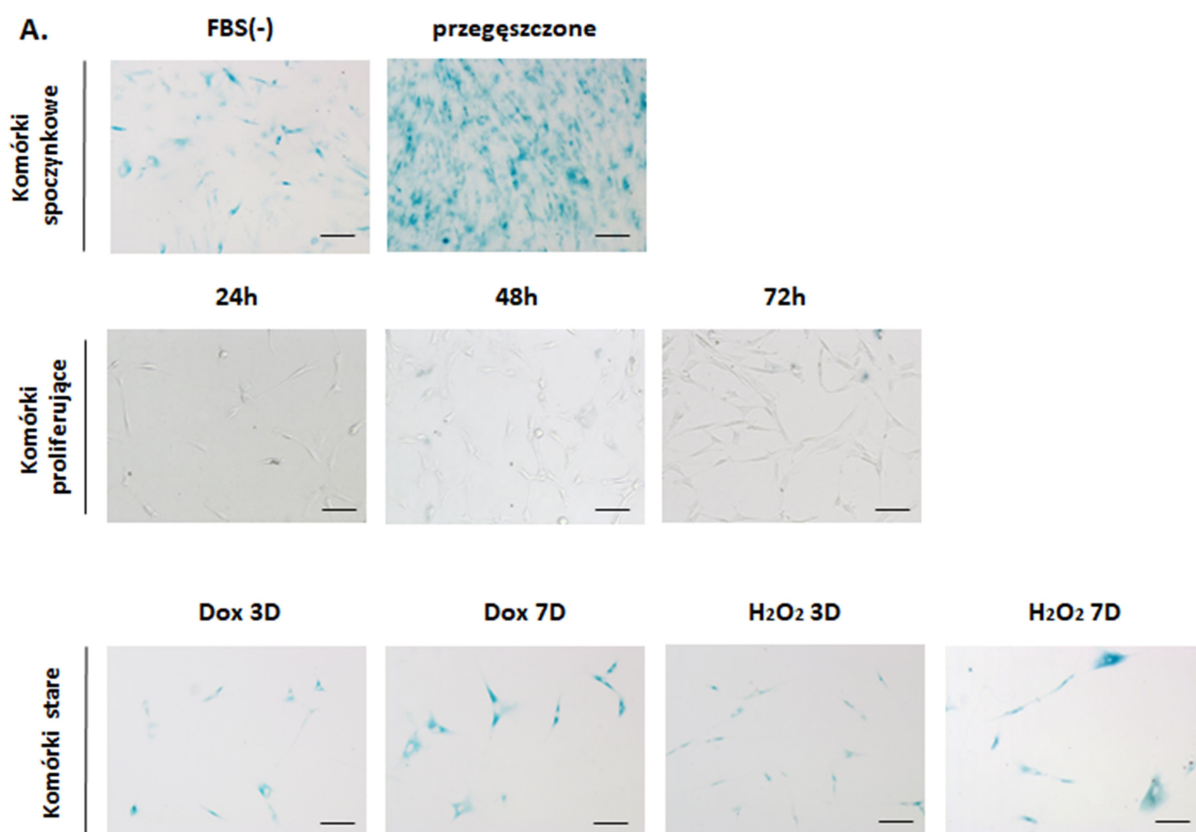


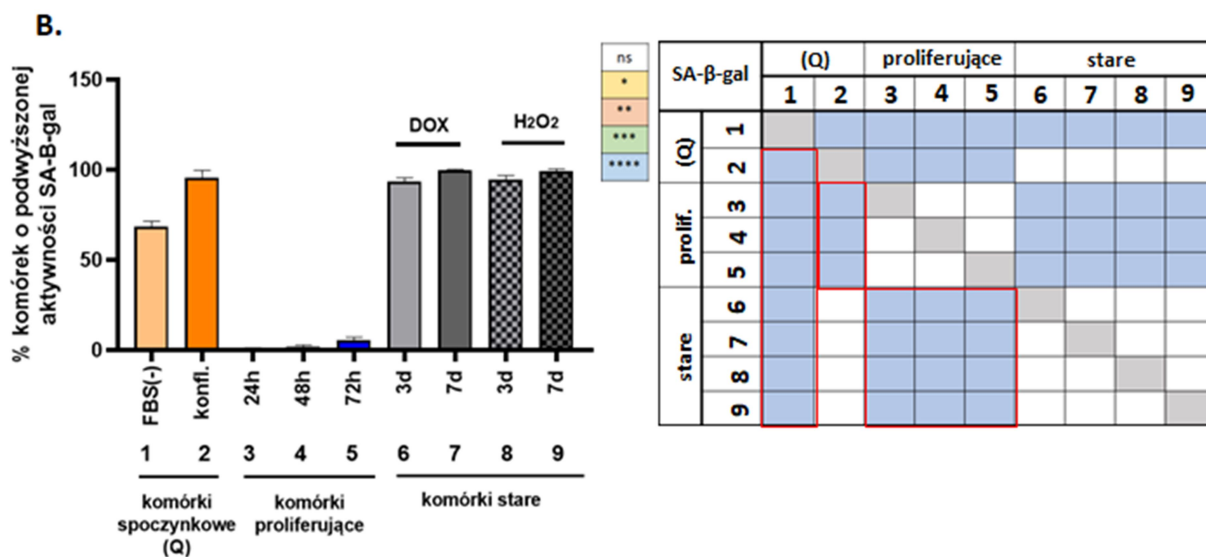
Ryc. 4.7 Porównanie zmian w cyklu komórkowym komórek proliferujących, spoczynkowych i starych. Analiza ilościowa przedstawiająca procent komórek VSMC w poszczególnych fazach cyklu dla danych wariantów doświadczenia. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SEM, n=3. Tabele umieszczone obok wykresów ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001). Czerwonymi ramkami zaznaczono różnice o najwyższej istotności statystycznej.

4.1.4 Ocena aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal)

Podwyższona aktywność enzymu lizosomalnego SA- β -gal, jest podstawowym markerem starzenia komórkowego, powszechnie wykorzystywanym w badaniach, w celu oszacowania liczby komórek starych w populacji.

Zaobserwowano, że już w trzeciej dobie od podania zarówno dokсорubicyny, jak i nadtlenu wodoru, niemal 100% komórek, po wykonaniu testu cytochemicznego na aktywność SA- β -galaktozydazy, miało niebieskie zabarwienie świadczące o zwiększonej aktywności enzymu. Po 7 dniach hodowli zabarwienie to było bardziej intensywne (Ryc. 4.8 A). Analiza ilościowa wykazała, że w ok. 70% komórkach FBS(-) oraz ok. 95% komórkach przegęszczonych także obserwowano wzrost aktywności enzymu lizosomalnego (Ryc. 4.8 B).

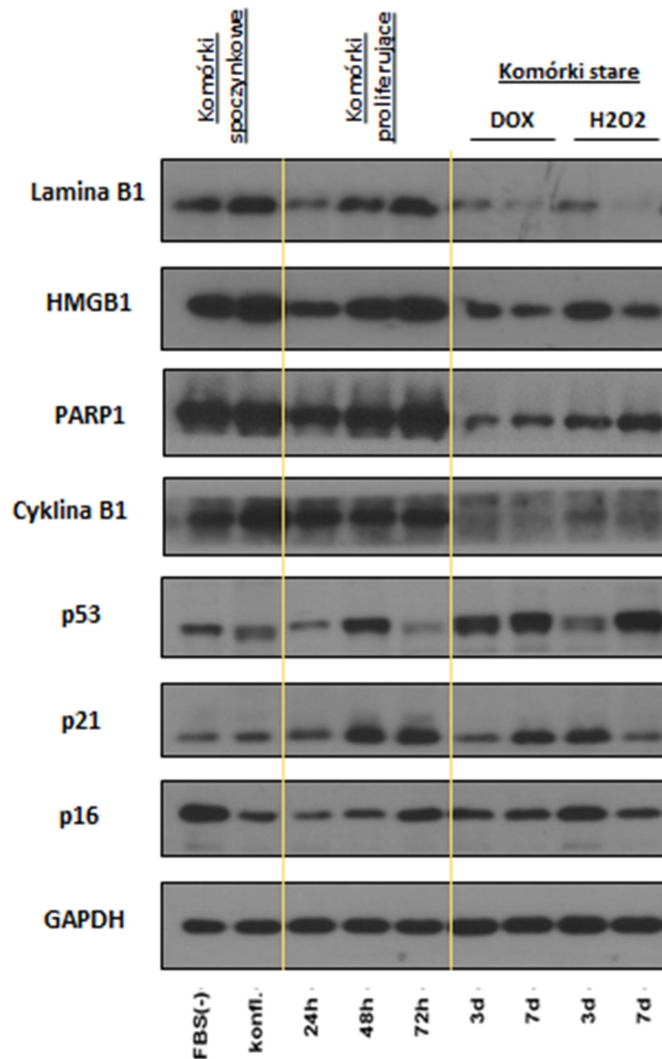




Ryc. 4.8 Ocena aktywności SA-β-gal w komórkach VSMC. A. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające aktywność SA-β-gal w komórkach VSMC w poszczególnych wariantach doświadczenia. Skala na zdjęciach wynosi 20 μm. B. Analiza ilościowa komórek o podwyższonej aktywności SA-β-gal. Na wykresach przedstawiono średnie wartości ± SD, n=4. Tabela umieszczona obok wykresu ilustruje wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001). Czerwonymi ramkami zaznaczono różnice o najwyższej istotności statystycznej.

4.1.5 Analiza poziomu białek związanych ze starzeniem

W celu dalszej charakterystyki porównawczej komórek proliferujących i nieproliferujących (komórki w stanie spoczynku oraz komórki stare) przeprowadzono analizę poziomu wybranych białek. Zmiany w poziomie tych białek są często wykorzystywane do identyfikacji komórek starych. Warto jednak zaznaczyć, że zwykle analizuje się tylko kilka z nich, stąd przeprowadzone badania miały na celu wybranie tych, które najlepiej definiują komórkę starą. Na Ryc. 4.9 zaprezentowano wyniki przykładowej analizy białek metodą Western blotting.



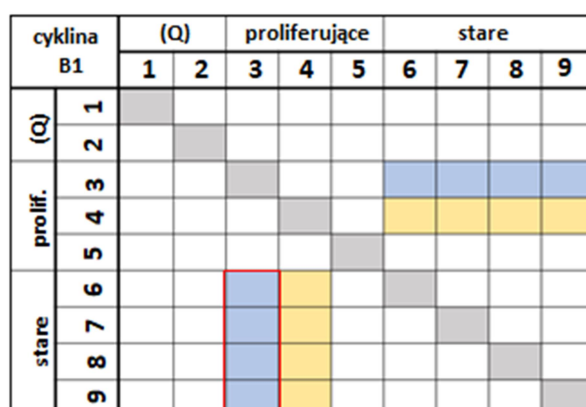
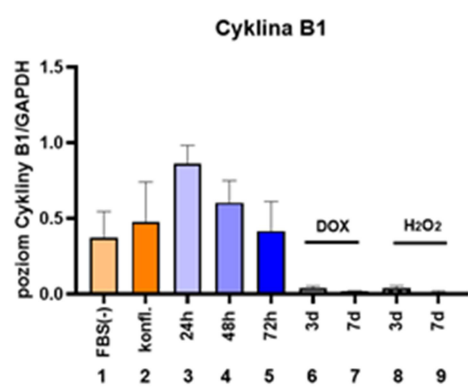
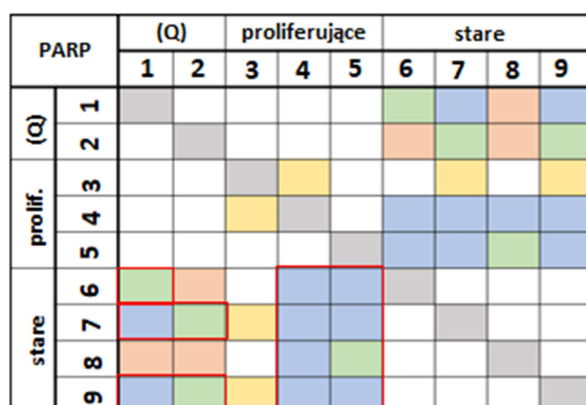
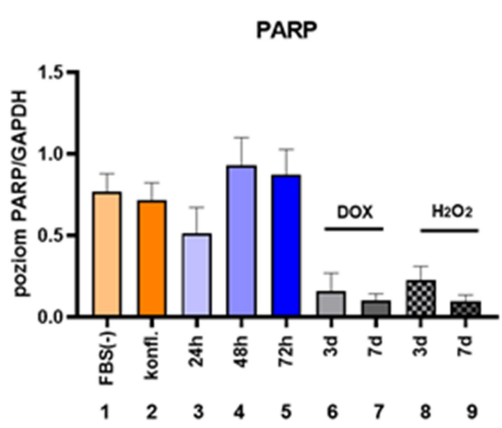
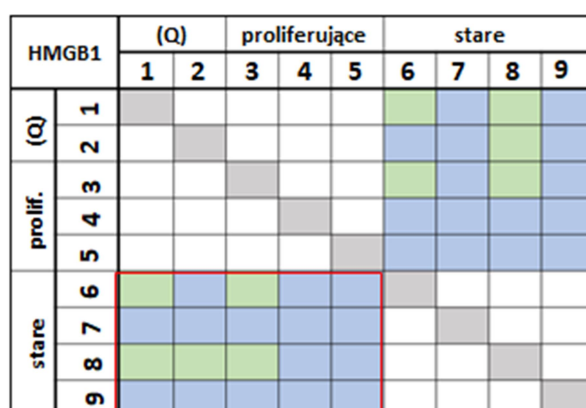
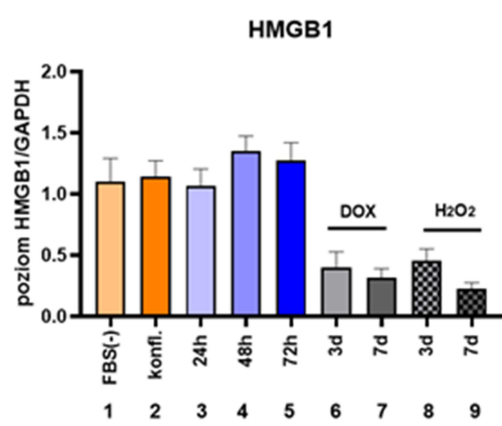
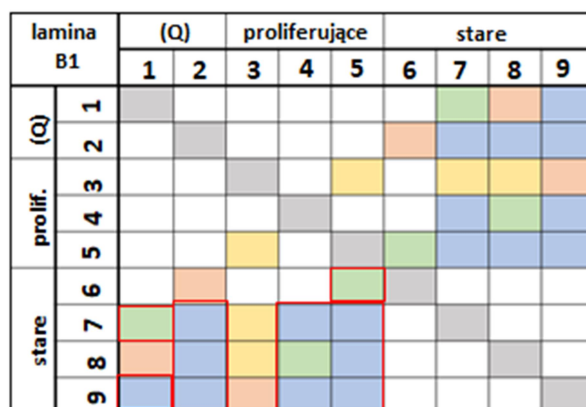
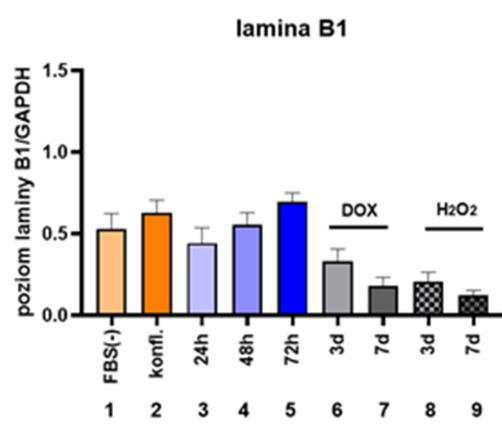
Ryc. 4.9 Analiza poziomu białek za pomocą techniki Western Blotting. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne dla ośmiu powtórzeń bloty.

Jednym z badanych białek była lamina B1, która wchodzi w skład blaszki jądrowej, a spadek jej ekspresji w komórkach starych zakłóca integralność otoczki jądrowej. Innym białkiem, które pełni rolę w utrzymaniu homeostazy jądrowej jest, należące do rodziny białek o dużej ruchliwości, białko HMGB1. Poziom HMGB1 zmienia się w trakcie starzenia komórkowego. Z kolei białko PARP1 uczestniczy w wielu procesach komórkowych, między innymi w naprawie uszkodzeń DNA, czy utrzymaniu stabilności genomu. Rycina 4.10 prezentuje uśrednione wyniki analizy densytometrycznej. W przypadku laminy B1, HMGB1, jak i białka PARP1 obserwowano istotny spadek poziomu tych białek już w trzeciej dobie po indukcji starzenia, w porównaniu do poziomu tych białek w komórkach proliferujących. Co więcej, poziom tych białek w 7 dobie po indukcji starzenia był niższy niż w 3 dobie. Poziom białek

HMGB1, laminy B1 oraz PARP1 nie zmieniał się w komórkach spoczynkowych (FBS- oraz przegęszczonych) i był na tym samym poziomie, co w komórkach proliferujących.

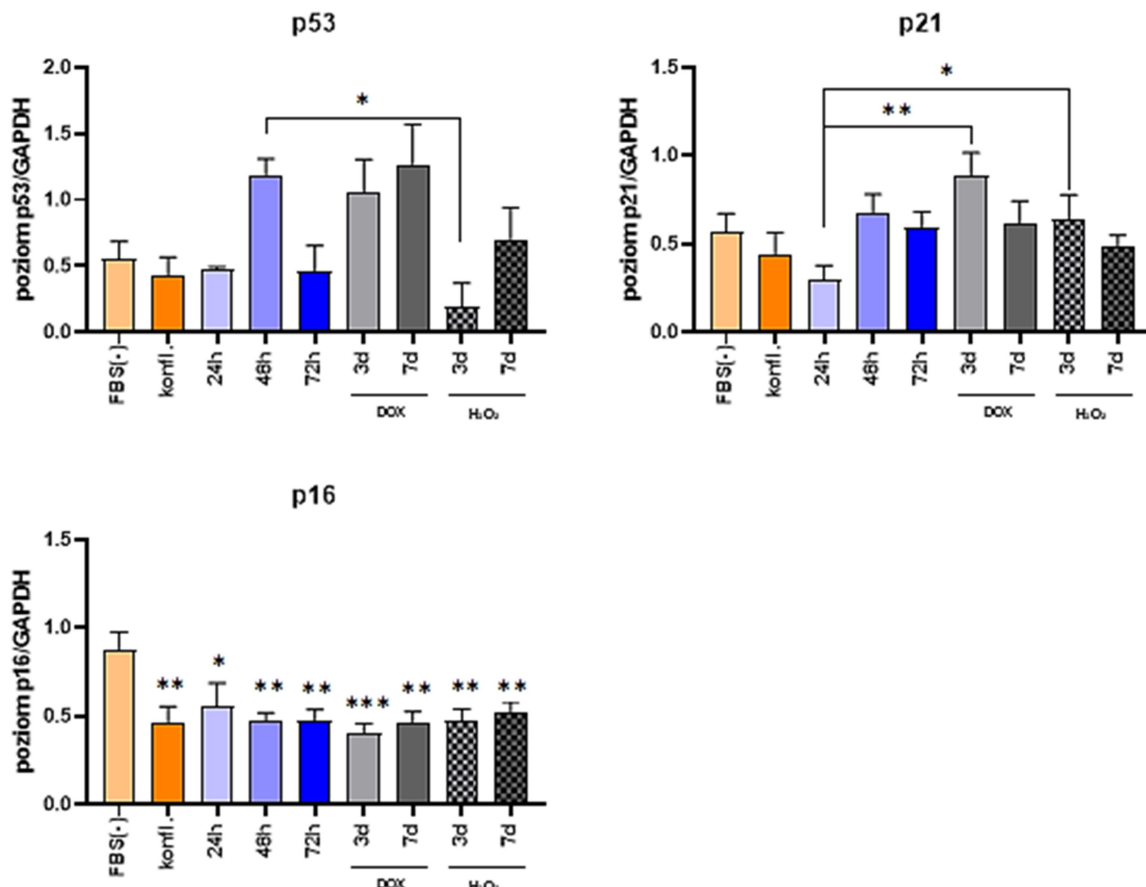
Całkowity spadek poziomu cykliny B1 w komórkach starych wskazuje na zanik aktywności mitotycznej. Stopniowy spadek tego białka obserwowano także w kolejnych dobach hodowli w komórkach proliferujących, co jest powiązane ze stopniowym spadkiem odsetka komórek w fazie S i stopniowym wzrostem odsetka komórek w fazie G1/G0 cyklu komórkowego. Co ciekawe, komórki będące w stanie spoczynku miały zdecydowanie wyższy poziom cykliny B1 niż komórki stare, pomimo wyraźnych cech zahamowania proliferacji (niski poziom białka Ki67, akumulacja komórek w fazie G1/G0, niski poziom wbudowywania BrdU).

Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej wskazują, że spadek poziomu białek HMGB1, PARP1 i laminy B1 w komórkach mięśni gładkich ulegających starzeniu, był znaczący w porównaniu do komórek proliferujących i nie był obserwowany w przypadku komórek o przejściowo zatrzymanej proliferacji.



Ryc. 4.10. Analiza densytometryczna wyników uzyskanych metodą Western Blotting. Wykresy przedstawiają poziom białek znormalizowany względem poziomu białka GAPDH. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SEM, n=8. Tabele umieszczone obok wykresów ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001). Czerwonymi ramkami zaznaczono różnice o najwyższej istotności statystycznej.

Zbadano również poziom białka p16 i p21, które są inhibitorami cyklinozależnych kinaz. Ponadto p21 wraz z białkiem p53 zaliczane są do białek ścieżki aktywowanej uszkodzeniami DNA (DDR) (Ryc. 4.11). Uważa się, że obecność nienaprawionych uszkodzeń DNA oraz długotrwała aktywacja szlaku są charakterystyczne dla procesu starzenia komórkowego. Przeprowadzone analizy Western blotting wykazały relatywnie niski poziom białka p53 w komórkach proliferujących, po 24 i 72 godzinach hodowli, oraz w komórkach nieproliferujących, będących w stanie spoczynku. Poziom tego białka wzrastał w komórkach starych. W przypadku komórek traktowanych dokсорubicyną wzrost poziomu białka p53 obserwowano już w 3 dobie po indukcji starzenia, w komórkach traktowanych H₂O₂, niewielki wzrost poziomu p53 obserwowano dopiero po 7 dniach od podania związku. Co ciekawe, wzrost poziomu tego białka zaobserwowano także w komórkach proliferujących po 48 godzinach hodowli i był on porównywalny z poziomem tego białka w komórkach traktowanych dokсорubicyną. Podwyższony poziom białek p16 i/lub p21 jest jednym z częściej stosowanych markerów starzenia. Poziom białka p21 był istotnie wyższy w komórkach starych w 3 dobie po indukcji starzenia w porównaniu do komórek kontrolnych zebranych po 24 godzinach i spadał w 7 dobie. Poziom p21 rósł też w komórkach proliferujących wraz z czasem hodowli, podczas gdy w komórkach nieproliferujących pozostawał na niskim poziomie. W przypadku białka p16 nie zaobserwowano różnic w poziomie tego białka pomiędzy komórkami proliferującymi, a komórkami starymi. Jedynie komórki, które były hodowane w pożywce bez surowicy wykazywały wzrost poziomu tego białka. Wzrost ten był statystycznie istotny w porównaniu z komórkami proliferującymi, jak i starymi.



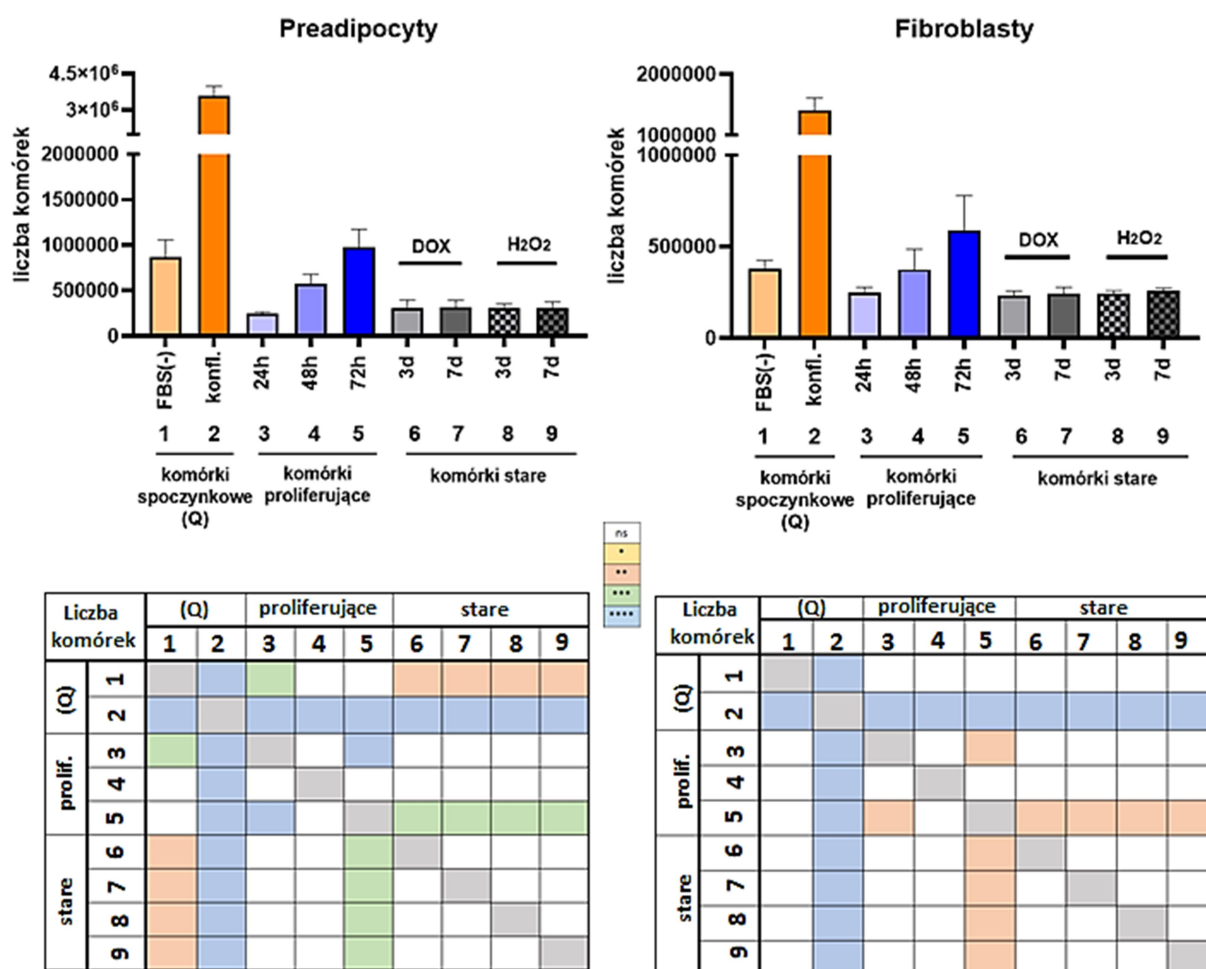
Ryc. 4.11. Analiza densytometryczna wyników uzyskanych metodą Western blotting. Wykresy przedstawiają poziom białek znormalizowany względem poziomu białka GAPDH. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SEM, n=8. Istotności statystyczne pomiędzy poszczególnymi wariantami sprawdzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA.

4.1.6 Porównanie procesu przyspieszonego starzenia indukowanego stresem w fibroblastach, preadipocytach oraz VSMC

W celu pogłębienia analizy markerów starzenia, które w sposób najbardziej wiarygodny pozwalają na rozróżnienie komórek starych od komórek o przejściowo zatrzymanej proliferacji oraz komórek proliferujących przebadano te same, co dla komórek VSMC, markery w fibroblastach i preadipocytach.

Zarówno w preadipocytach jak i fibroblastach, podobnie jak w VSMC, liczba komórek, w których indukowano starzenie była zbliżona do liczby komórek kontrolnych zebranych w tym samym dniu, w którym dodawano do komórek doksorubicynę lub nadtlenek wodoru. Potwierdza to efektywne działanie obu związków również na inne typy komórek. W przypadku komórek, które hodowane były przez 7 dni w pożywce pozbawionej surowicy

(preadipocyty) bądź zawierającej 0,5% FBS (fibroblasty), ich liczba po 7 dniach nie przekroczyła liczby komórek kontrolnych zebranych po 72 godzinach.

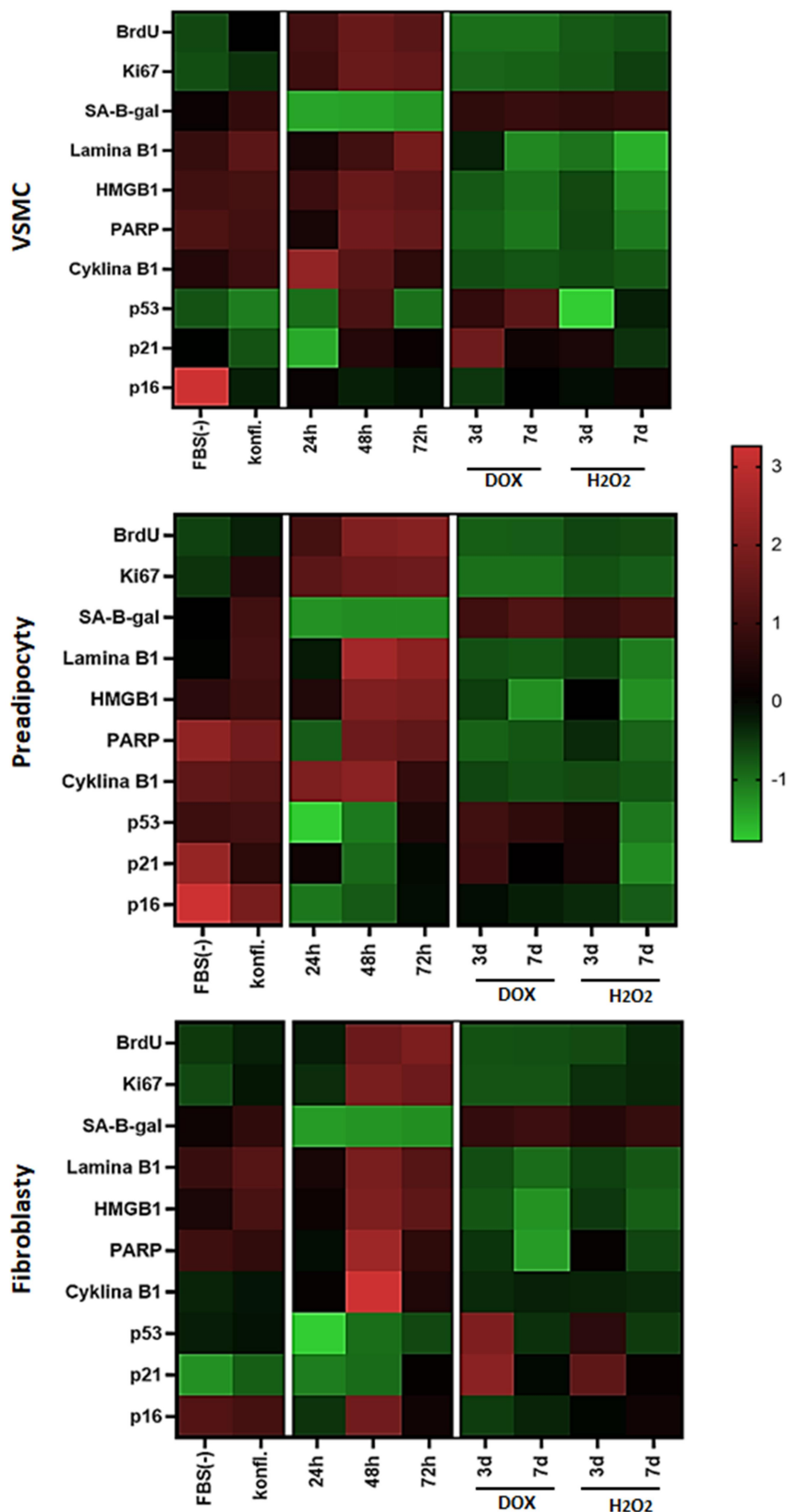


Ryc. 4.12 Porównanie proliferacji preadipocytów i fibroblastów. Wykresy przedstawiają średnią liczbę komórek zebranych w poszczególnych dniach doświadczenia. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=3. Tabele umieszczone pod wykresami ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001).

Następnie, zarówno w preadipocytach, jak i fibroblastach, oceniono poziom zahamowania proliferacji za pomocą testu wbudowywania BrdU. Wykorzystując analizę poziomu białka Ki67 zbadano potencjał proliferacyjny komórek kontrolnych, starych oraz będących w stanie spoczynku. Oceniono aktywność β -galaktozydazy związanej ze starzeniem we wszystkich wariantach doświadczenia, a także przeprowadzono analizę poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem metodą Western blotting. Wyniki poddano analizie densytometrycznej a otrzymane dane wraz z wynikami ilościowej analizy BrdU i Ki67 i SA- β -gal przedstawiono w formie zbiorczych map ciepła (Ryc. 4.13). Szczegółowe wyniki

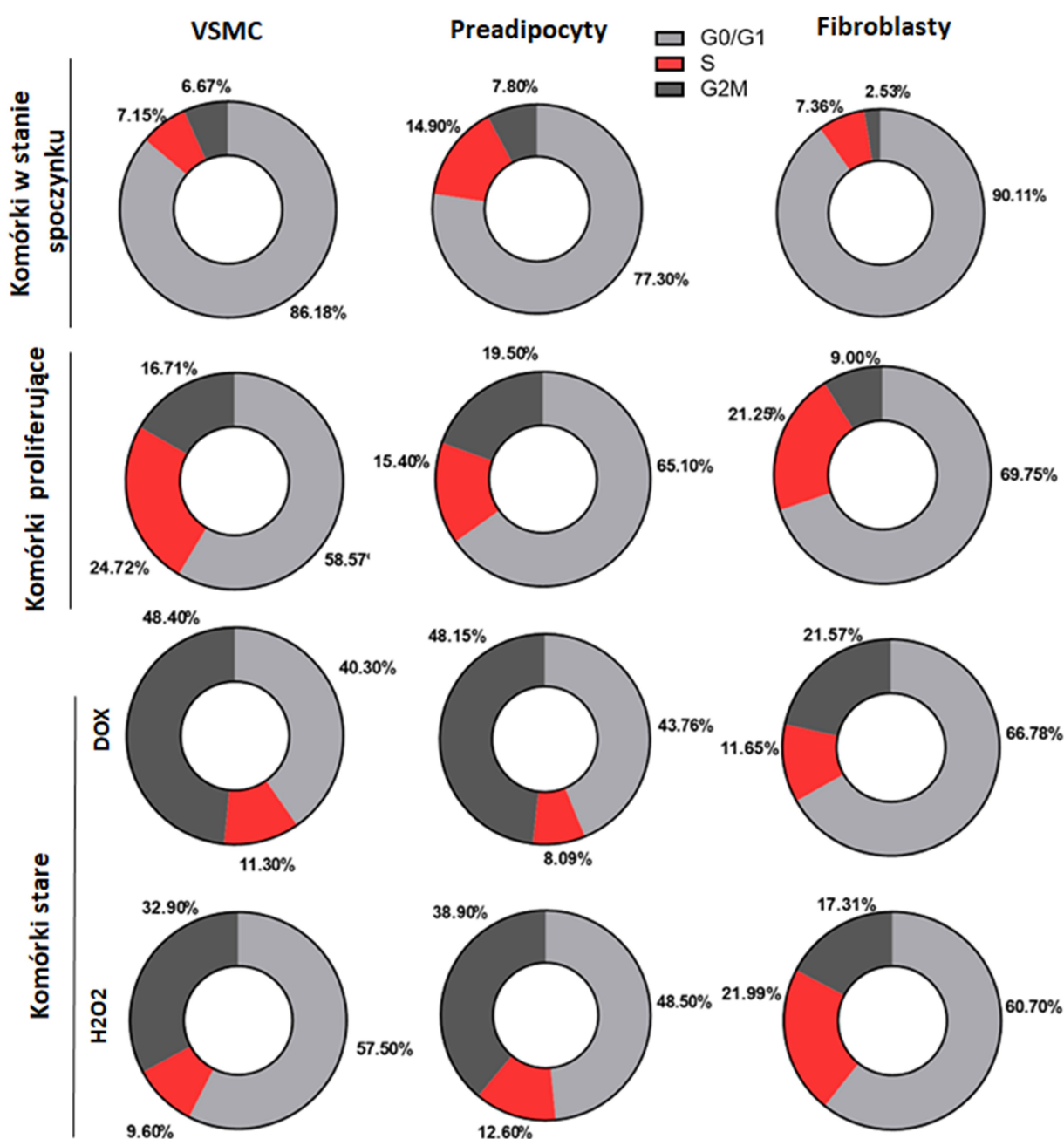
przeprowadzonych doświadczeń dla preadipocytów oraz fibroblastów zamieszczono w suplemencie niniejszej rozprawy (Ryc. S.1 – S.3)

We wszystkich trzech typach komórek, populacja komórek proliferujących charakteryzowała się wysokim odsetkiem komórek Ki67 pozytywnych oraz BrdU pozytywnych, przy jednocześnie znikomej aktywności SA- β -gal w tych komórkach. Odwrotną zależność obserwowano zarówno w komórkach starych oraz komórkach będących w stanie spoczynku. W komórkach tych odnotowano niewielki procent komórek zdolnych do proliferacji i wysoką aktywność SA- β -gal. Analiza poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem, pozwoliła na jednoznaczne odróżnienie komórek starych od komórek przejściowo zatrzymanych w cyklu oraz komórek proliferujących we wszystkich badanych typach komórek. Komórki w stanie spoczynku oraz proliferujące charakteryzowały się wysokim poziomem białek: lamina B1, HMGB1, cyklina B1 oraz PARP1, podczas gdy w komórkach starych poziom tych białek był znacznie niższy. Podwyższony poziom białek p53 oraz p21 zaobserwowano w komórkach starych zebranych po 3 dniach od indukcji starzenia, niemniej jednak spadał on po 7 dniach. Co więcej, w przypadku preadipocytów również w komórkach spoczynkowych poziom tych białek był wyższy w porównaniu do poziomu w komórkach proliferujących i porównywalny do poziomu w komórkach starych. Możemy zatem stwierdzić, że oba te białka, które powszechnie uważane są za markery starzenia nie pozwalają na jednoznaczne rozróżnienie komórek trwale od tych przejściowo zatrzymanych w cyklu. Podobnie jest w przypadku białka p16, najwyższy poziom obserwowano wyłącznie w komórkach spoczynkowych.



Ryc. 4.13 Analiza porównawcza wybranych markerów starzenia dla poszczególnych wariantów eksperymentalnych (komórki spoczynkowe, proliferujące i ulegające starzeniu) w komórkach VSMC, preadipocytach i fibroblastach przedstawiona za pomocą map ciepła. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z. Liczba powtórzeń dla VSMC $n > 4$, dla preadipocytów i fibroblastów $n = 3$. Skala barw zamieszczona przy VSMC odnosi się do wszystkich trzech map ciepła.

Analizie porównawczej poddano także cykl komórkowy (Ryc. 4.14). We wszystkich trzech typach komórek zaobserwowano różnice w rozkładzie komórek w cyklu wśród komórek nieproliferujących. Komórki spoczynkowe gromadziły się głównie w fazie G0/G1, podczas gdy komórki stare były zatrzymane zarówno w fazie G0/G1 jak i G2M. W przypadku VSMC i preadipocytów zaobserwowano wyraźne różnice w rozkładzie komórek w cyklu w zależności od czynnika indukującego starzenie. Komórki traktowane dokсорubicyną gromadziły się w fazie G2/M, natomiast komórki traktowane nadtlenkiem wodoru w fazie G0/G1. W przypadku starych fibroblastów nie zaobserwowano znaczących różnic w rozkładzie komórek w cyklu w zależności od czynnika indukującego starzenie.

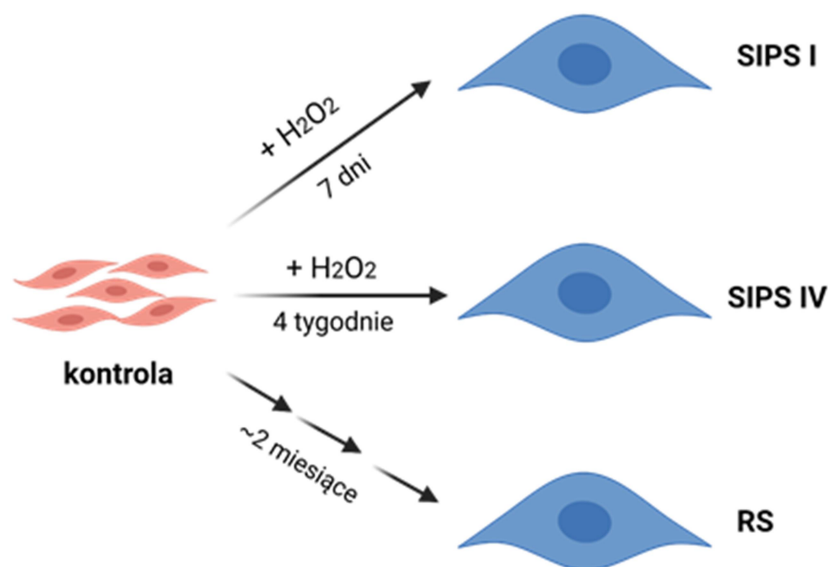


Ryc. 4.14 Wykresy kołowe przedstawiające uśrednione dane z trzech powtórzeń dla komórek spoczynkowych (FBS(-) i przegęszczone), komórek proliferujących (kontrola 24h, 48h i 72h) oraz komórek starych w zależności od czynnika indukującego starzenie: doksorubicyna (3D i 7D) oraz nadtlenuk wodoru (3D i 7D).

4.2 Charakterystyka ludzkich komórek mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu *in vitro* i *in vivo*

Wcześniejsze prace pokazały, że w trakcie rozwoju miażdżycy dochodzi do akumulacji starych komórek mięśni gładkich w blaszkach miażdżycowych (Gorenne i wsp. 2006). Co więcej, komórki te mają istotny wpływ na rozwój blaszki, przyczyniając się m.in. do zmniejszenia jej stabilności, zwiększając ryzyko udarów u osób cierpiących na miażdżycę.

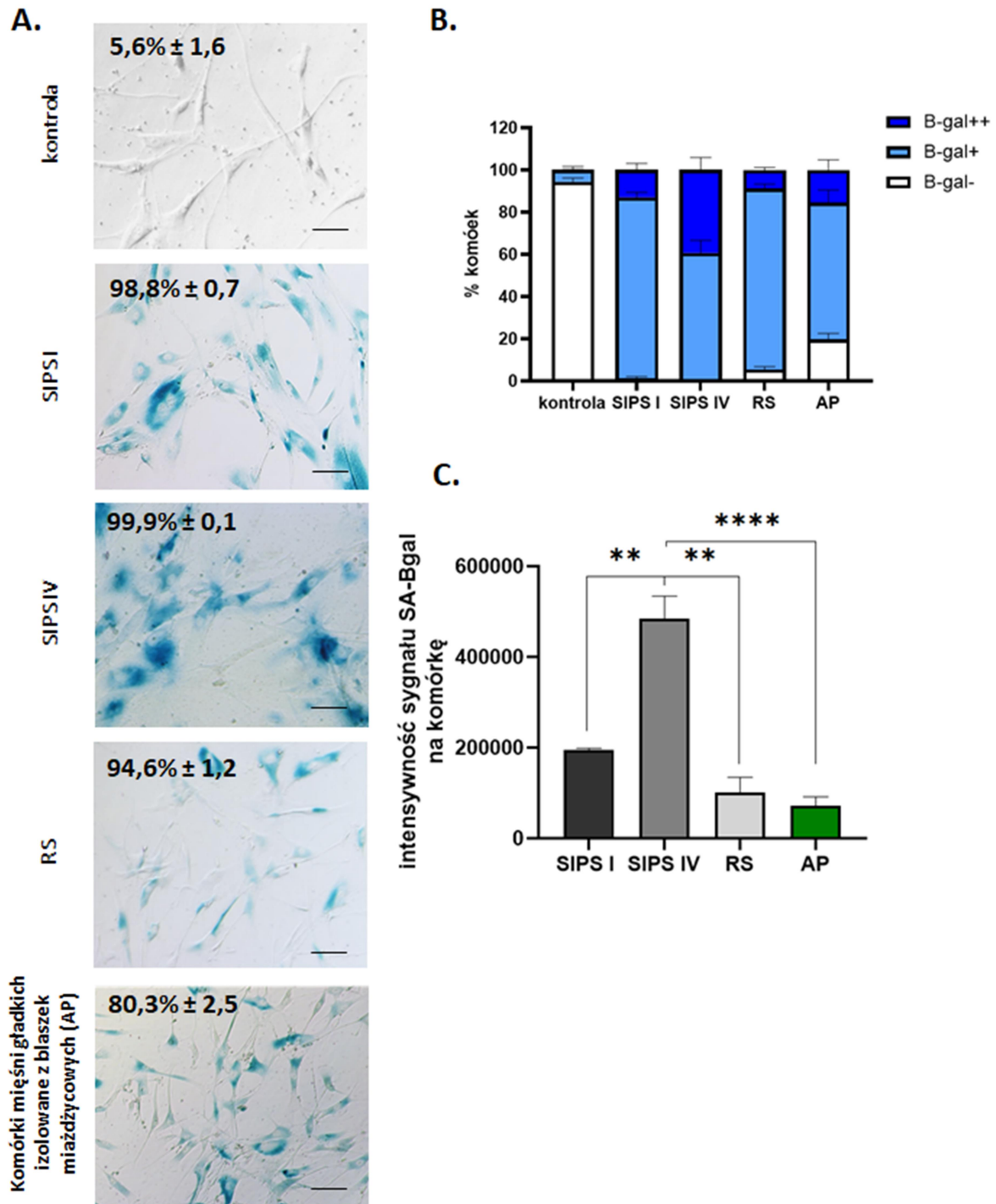
Mając na uwadze cele podjętych badań zmierzających do wyjaśnienia potencjalnej roli czynników wydzielanych przez stare komórki mięśni gładkich w rozwoju miażdżycy, postanowiłam scharakteryzować i porównać komórki mięśni gładkich ulegających starzeniu w warunkach hodowli *in vitro* z komórkami pochodzącymi z blaszki miażdżycowej (starzenie *in vivo*). W tym celu analizowałam komórki mięśni gładkich izolowane z blaszek miażdżycowych pobranych od pacjentów w wyniku endarterektomii tętnicy szyjnej, komórki mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz przyspieszonemu, które było indukowane nadtlenukiem wodoru (SIPS). W celu uzyskania komórek, które uległy starzeniu replikacyjnemu prowadzono długotrwałe hodowle, aż do momentu wyczerpania potencjału replikacyjnego (brak zwiększania liczby komórek w hodowli pomiędzy kolejnymi pasażami). Indukcję starzenia przeprowadzano poprzez jednokrotne traktowanie H₂O₂ (150 μM) komórek intensywnie proliferujących na wczesnych pasażach. Ponieważ starzeniu organizmu towarzyszy gromadzenie się komórek starych, które pozostają w tkankach przez długi czas, do analizy postanowiono wykorzystać komórki, które po potraktowaniu H₂O₂ hodowane były przez 7 dni, jako model wczesnego etapu starzenia komórkowego (SIPS I) oraz przez 4 tygodnie jako późny etap starzenia komórkowego (SIPS IV) (Ryc. 4.15)



Ryc. 4.15 Schemat doświadczenia w modelu starzenia *in vitro*. Komórki kontrolne będące na wczesnym pasażu traktowano jednorazowo nadtlakiem wodoru w stężeniu 150 μ M a następnie hodowano przez 7 dni (SIPS I) jako model wczesnego etapu starzenia bądź przez 4 tygodnie (SIPS IV) jako model późnego etapu starzenia. W celu uzyskania komórek starych replikacyjnie (RS) komórki hodowano do momentu wyczerpania potencjału replikacyjnego (ok. 2 miesiące).

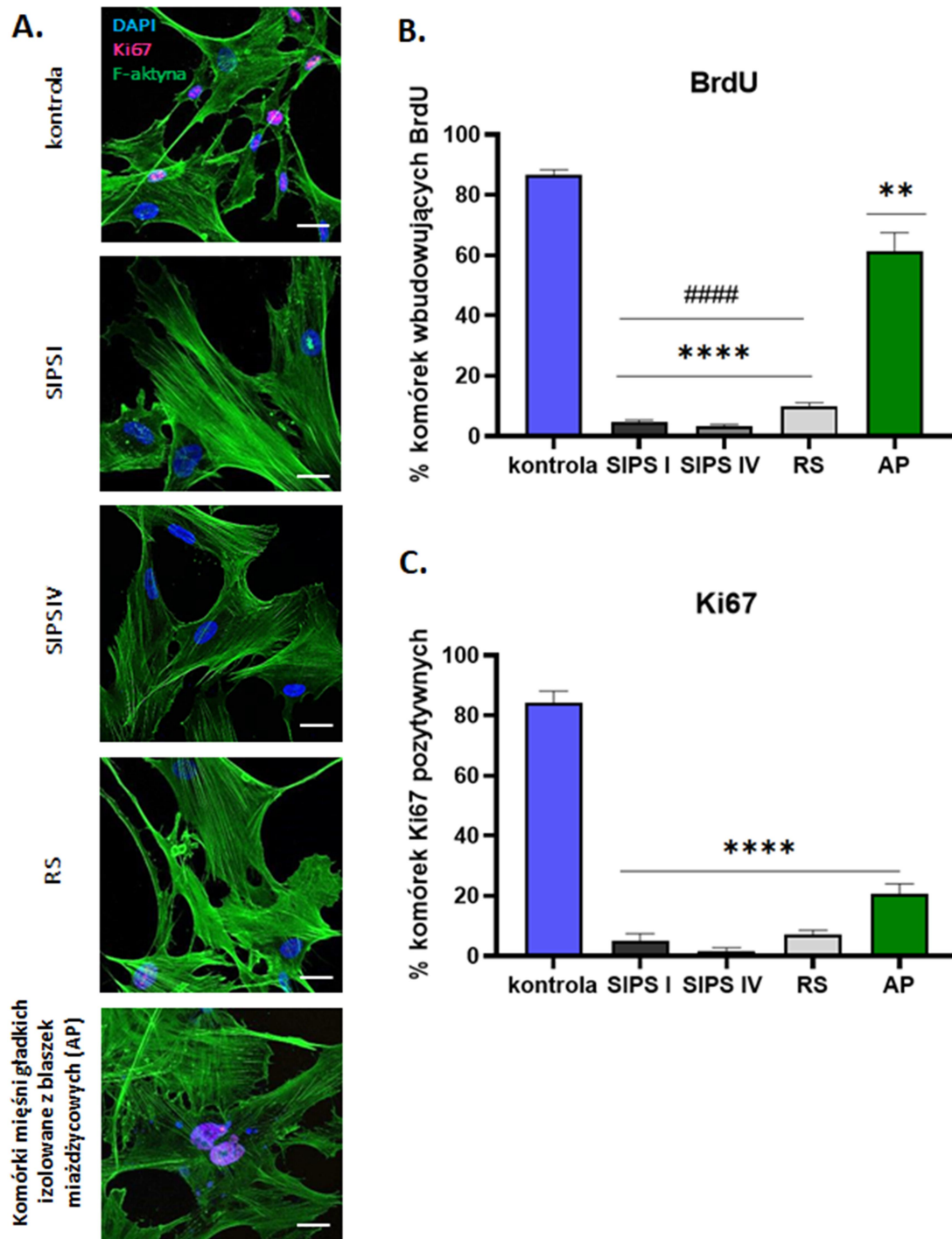
4.2.1 Analiza wybranych markerów w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na wczesnym i późnym etapie tego procesu w modelu *in vitro* oraz komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych

Jednym z powszechnie stosowanych znaczników starzenia komórkowego jest wzrost aktywności SA- β -gal. Wzrost aktywności tego enzymu lizosomalnego obserwowano w komórkach już po 3 dniach od indukcji starzenia, a w 7 dni po podaniu nadtlaku wodoru niemal 100% komórek wykazywało podwyższoną aktywność SA- β -gal. Podobny wynik uzyskano dla komórek będących na późnych pasażach, które zatrzymały proliferację. Około 80% komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych wykazywały podwyższoną aktywność SA- β -gal (Ryc. 4.16 A). Co więcej w komórkach, które były hodowane przez 4 tygodnie od indukcji starzenia obserwowano wyraźny wzrost intensywności zabarwienia (Ryc. 4.16 B). Istotną różnicę w poziomie intensywności sygnału SA- β -gal w komórkach SIPS IV odnotowano zarówno względem komórek SIPS I jak i RS jak i względem komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych. Uzyskane wyniki dowodzą narastającej stopniowo aktywności SA- β -galaktozydazy towarzyszącej rozwojowi fenotypu starzenia.



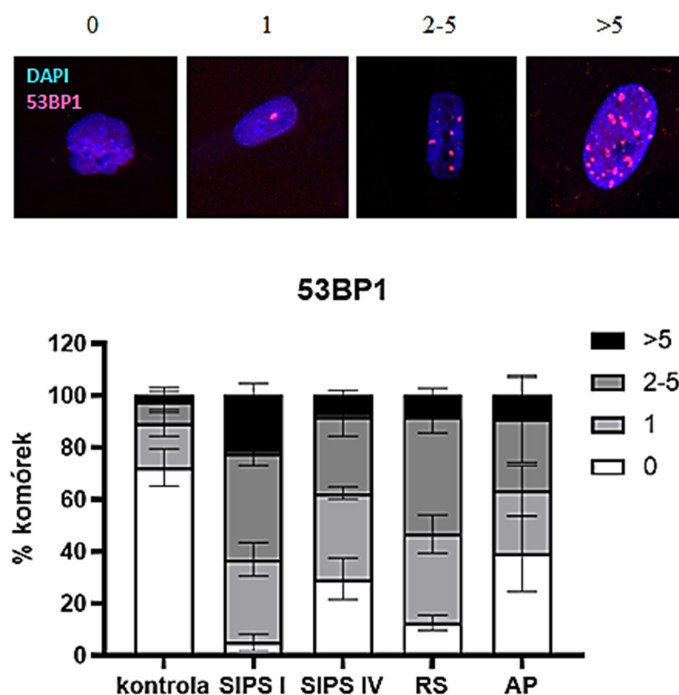
Ryc. 4.16. Zmiany w poziomie aktywności SA-β-gal w komórkach mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu w warunkach *in vitro* i *in vivo*. A. Przykładowe zdjęcia przedstawiające aktywność SA-β-gal w komórkach VSMC. Skala na zdjęciach oznacza 20μm. B. Wykres przedstawiający procent komórek SA-β-gal pozytywnych z uwzględnieniem intensywności zabarwienia komórek na niebiesko. C. Wykres przedstawiający zintegrowaną gęstość sygnału SA-β-gal w przeliczeniu na komórkę. Na wykresach przedstawiono średnie wartości ± SD, n=4 (dla SIPS I, SIPS IV i RS) oraz n=6 dla komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

Barwienia immunocytochemiczne komórek na F-aktynę ilustrują znaczące powiększenie komórek starych hodowanych w warunkach *in vitro* jak i komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych (Ryc. 4.17 A). Analiza poziomu białka Ki67 oraz test wbudowywania BrdU, wykazały wyraźny spadek liczby komórek zdolnych do proliferacji zarówno wśród komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu, jak i przyspieszonemu (Ryc. 4.17 B i C). W komórkach będących na późnym etapie starzenia (SIPS IV) obserwowano utrzymujące się zahamowanie podziałów porównywalne z tym obserwowanym na wczesnych etapach tego procesu. Co ciekawe, w przypadku komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych niemal 60% komórek jest zdolnych do wbudowywania BrdU, przy czym jedynie ok 20% komórek to komórki Ki67 pozytywne. Wskazuje to, że w przypadku starzenia *in vivo* korelacja pomiędzy wybranymi markerami starzenia SA- β -gal i BrdU (+) nie jest tak silna, jak w przypadku modelu starzenia *in vitro*.



Ryc. 4.17 Ocena potencjału proliferacyjnego VSMC ulegających starzeniu w warunkach *in vitro* i *in vivo*. A. Reprezentatywne zdjęcia komórek mięśni gładkich przedstawiające morfologię oraz poziom Ki67 w komórkach proliferujących (kontrola) i ulegających starzeniu. Skala na zdjęciach wynosi 20 μ m. B. Wykres przedstawiający analizę ilościową komórek zdolnych do wbudowywania BrdU. C. Wykres przedstawiający analizę ekspresji białka Ki67. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=4 (dla SIPS I, SIPS IV i RS) oraz n=6 dla komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta, (*) oznaczono istotności względem kontroli, (#) oznaczono istotności względem AP.

Innym markerem starzenia jest wzrost liczby pęknięć w dwuniciowym DNA (ang. *double strand break* – DSB), które można wizualizować poprzez immunocytochemiczną detekcję białka 53BP1. Białko to bierze udział w naprawie DNA i lokalizuje się w miejscu pęknięcia nici DNA tworząc obecne w jądrze skupiska. Około 70% komórek młodych, będących na wczesnych pasażach (kontrola) nie posiadało żadnych widocznych skupisk 53BP1, a w pozostałych 30% obserwowano w większości pojedyncze skupiska tego białka. Zarówno w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu, jak i przyspieszonemu zdecydowana większość miała wyraźnie widoczne skupiska 53BP1, a w ponad 50% jąder tych komórek obserwowano więcej niż 1 skupisko. Co ciekawe, w komórkach które po traktowaniu nadtlakiem wodoru hodowane były przez 4 tygodnie, zaobserwowano wzrost liczby komórek nieposiadających skupisk białka 53BP1 w porównaniu do komórek hodowanych 7 dni od indukcji starzenia. Może to świadczyć o aktywacji systemów naprawy uszkodzeń DNA w trakcie rozwoju fenotypu komórki starszej. Rozkład komórek z określoną liczbą skupisk 53BP1 wśród komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych był zbliżony do tego obserwowanego w komórkach na późnym etapie starzenia przyspieszonego (SIPS IV) (Ryc. 4.18).

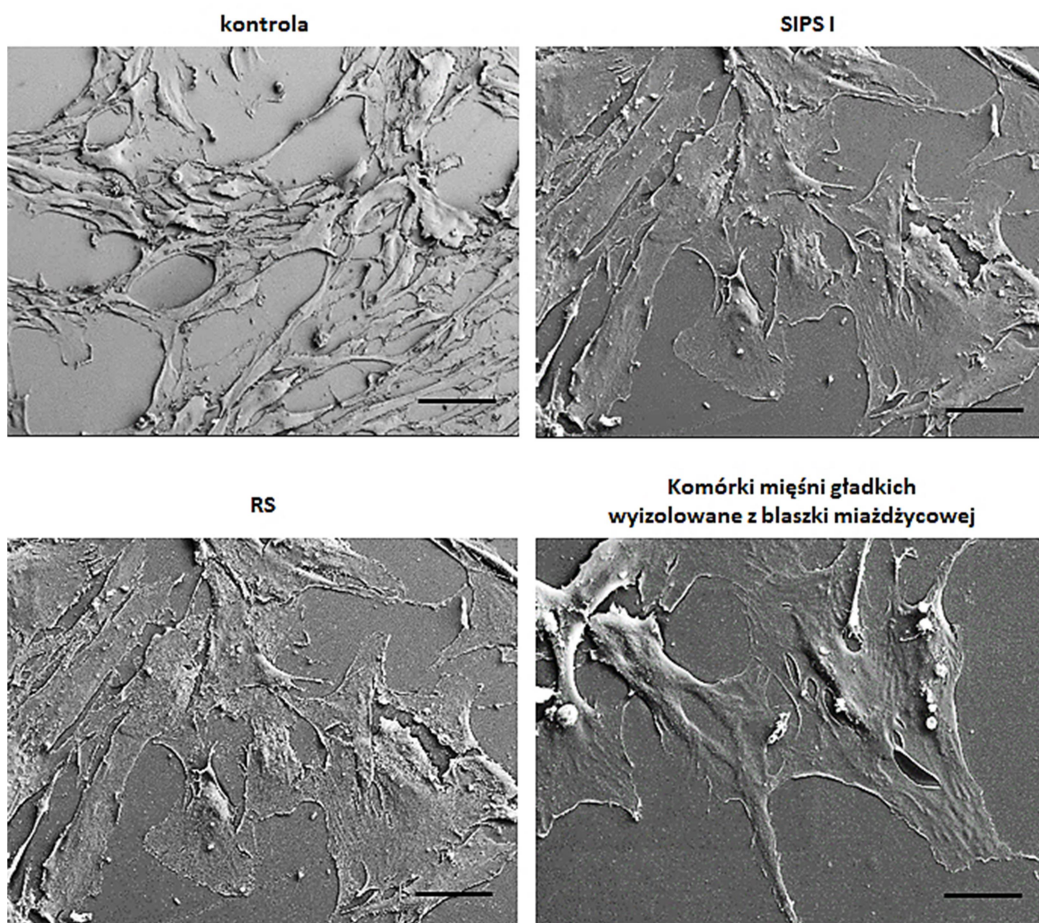


Ryc. 4.18. Analiza uszkodzeń DNA na podstawie lokalizacji białka 53BP1. Zdjęcia przedstawiają przykładowe jądra z różną liczbą skupisk 53BP1. Wykres przedstawia analizę liczby skupisk białka 53BP1 w komórkach VSMC ulegających starzeniu w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=4 dla wszystkich wariantów. Wartości liczbowe umieszczone w legendzie wykresu odnoszą się do liczby skupisk 53BP1 w jądrze.

Na podstawie zaprezentowanych do tej pory wyników analizy wybranych markerów (analiza aktywności SA- β -gal, BrdU, Ki67, 53BP1) można stwierdzić, że w przypadku komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych mamy do czynienia z populacją komórek znacznie wzbogaconą w komórki stare. Możemy założyć, że znacząca większość tych komórek uległa starzeniu w organizmie chorego (starzenie *in vivo*).

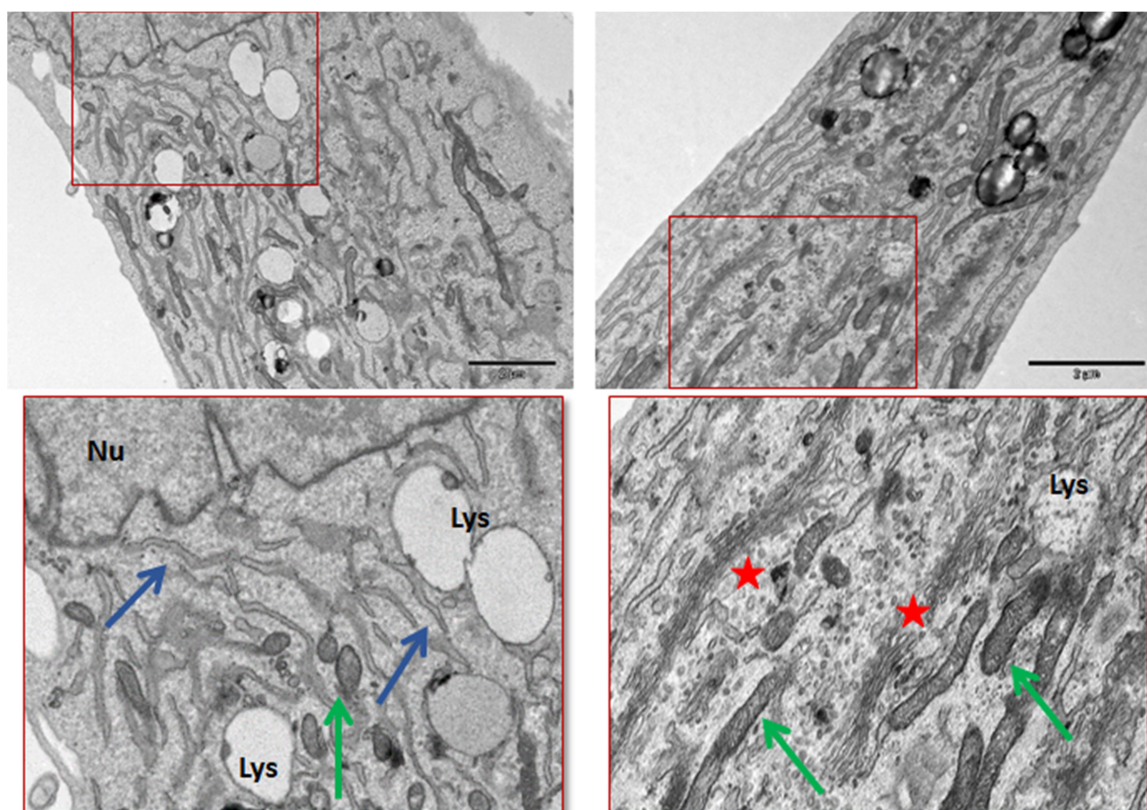
4.2.2 Porównanie zmian morfologicznych i ultrastrukturalnych komórek ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo* w oparciu o badanie z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej

W wyniku starzenia zmianie ulega morfologia komórki. Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) pozwoliło na zwizualizowanie tych zmian w komórkach mięśni gładkich aorty, które uległy starzeniu przyspieszonemu (SIPS I) oraz replikacyjnemu (RS) w porównaniu do komórek kontrolnych. Komórki stare były większe od komórek kontrolnych oraz bardziej płaskie (Ryc. 4.19). Podobne zmiany obserwowano również w komórkach wyizolowanych z blaszek miażdżycowych.



Ryc. 4.19 Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające morfologię komórek mięśni gładkich aorty przy użyciu SEM. Skala na zdjęciach odpowiada 100 μ m (powiększenie 450x).

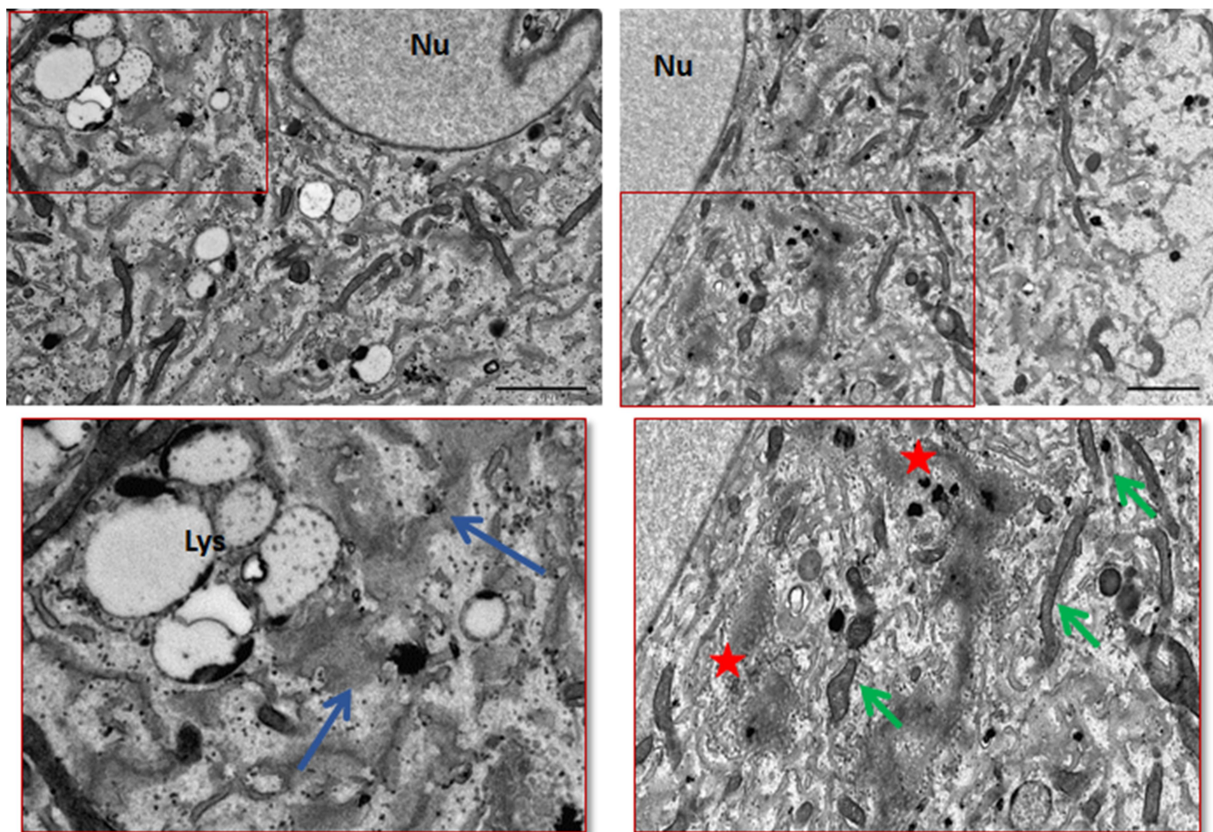
Pogłębionej analizy i oceny zmian na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo* dokonano przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Na podstawie wykonanych zdjęć zaobserwowano wyraźne zmiany w strukturze takich organelli jak mitochondria, siateczka śródplazmatyczna, czy aparat Golgiego w komórkach ulegających starzeniu. Zarówno w komórkach ulegających starzeniu przyspieszonemu na wczesnym (Ryc. 4.21) oraz późnym (Ryc. 4.22) etapie tego procesu, jak i w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu (Ryc. 4.23) obserwowano wydłużone oraz uszkodzone mitochondria (mitochondria zostały zaznaczone na zdjęciach zielonymi strzałkami) w porównaniu do tych obserwowanych w komórkach kontrolnych (Ryc. 4.20). Co więcej, w komórkach starych można było dostrzec fragmentację aparatu Golgiego (aparat Golgiego - czerwone gwiazdki) oraz napęczniałą siateczkę śródplazmatyczną (siateczka śródplazmatyczna - niebieskie strzałki). Aparat Golgiego oraz siateczka śródplazmatyczna odpowiadają w komórce za syntezę i transport składników budulcowych i odżywczych. Zmiany w strukturze tych organelli mogą świadczyć o zaburzeniach energetycznych towarzyszących starzeniu komórkowemu.



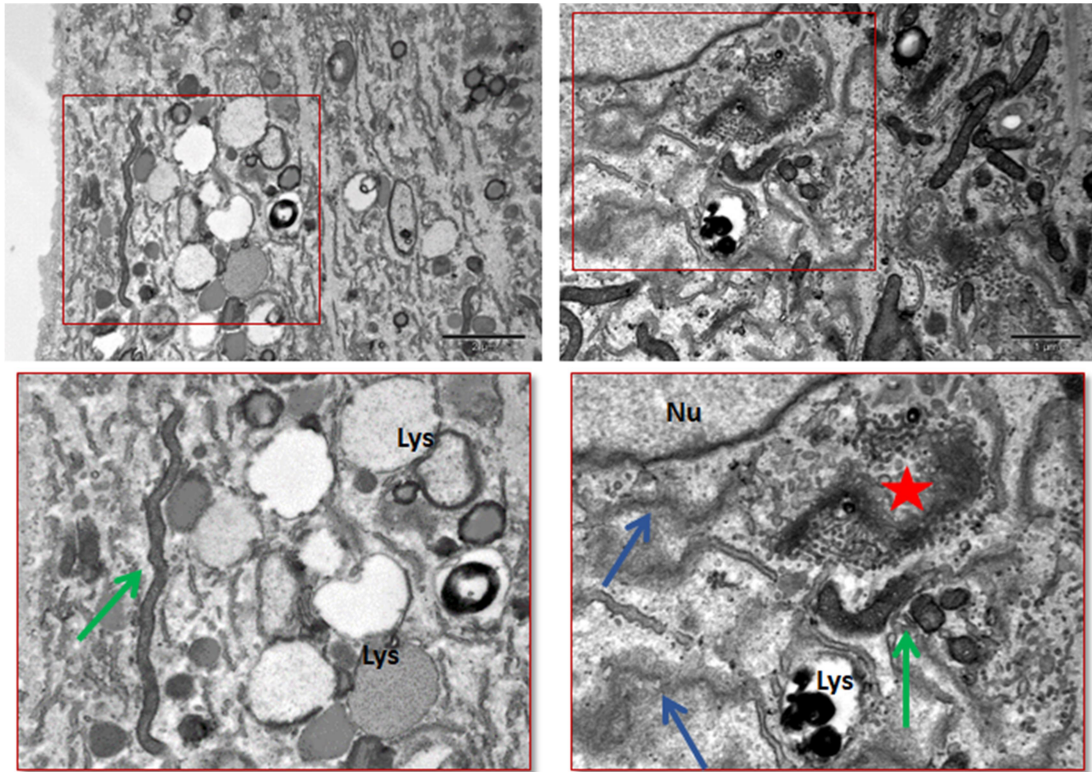
Ryc. 4.20 Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające morfologię komórek kontrolnych VSMC. Skala na zdjęciach w górnym panelu wynosi 2 μ m. W dolnym panelu przedstawiono

powiększone fragmenty zdjęć zaznaczone czerwonymi prostokątami. Nu – jądro komórkowe, Lys – lizosomy; niebieską strzałką zaznaczono siateczkę śródplazmatyczną, zieloną strzałką zaznaczono mitochondria, czerwoną gwiazdką zaznaczono aparat Golgiego.

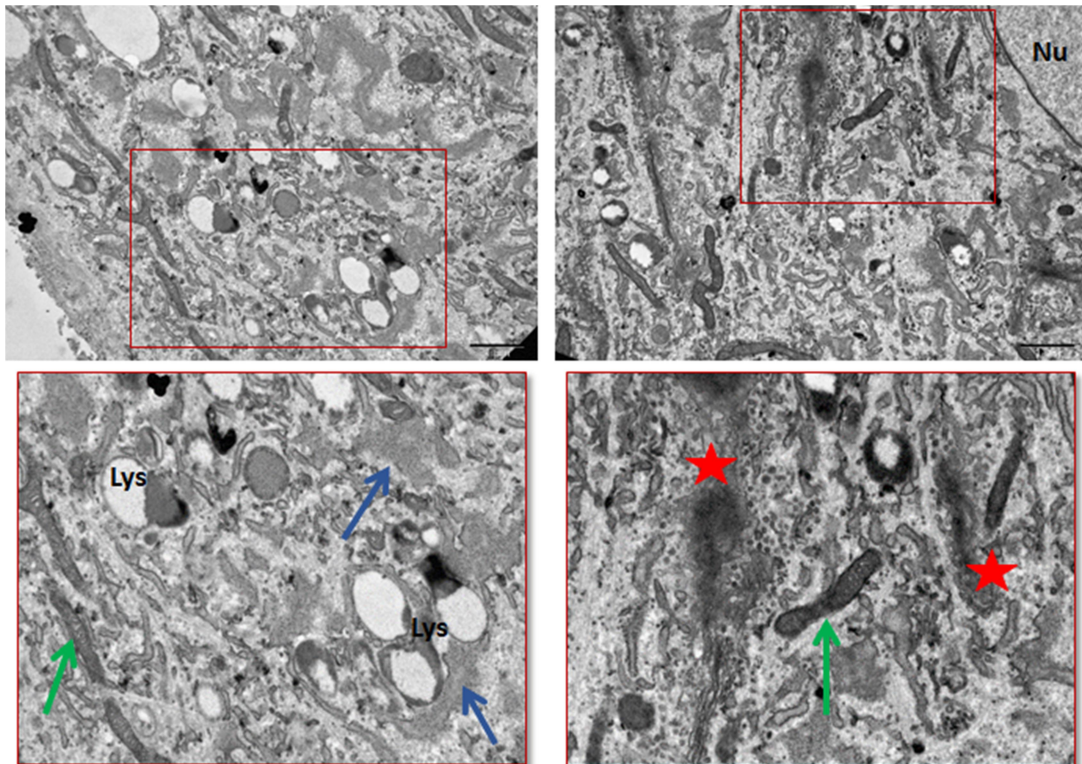
Rolą lizosomów jest degradacja wadliwych lub uszkodzonych składników komórkowych, chroniąc w ten sposób komórki przed toksycznym efektem gromadzenia się dysfunkcyjnych organelli i białek. Obserwowana w komórkach starych zwiększona liczba lizosomów oraz struktur lizosomalnych zawierających wewnątrz niestrawione fragmenty może świadczyć z jednej strony, o zwiększonym nagromadzeniu się dysfunkcyjnych organelli, a z drugiej strony o zaburzeniach w procesie autofagii, do których również dochodzi w procesie starzenia komórkowego.



Ryc. 4.21 Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające morfologię komórek VSMC indukowanych do starzenia będących na wczesnym etapie tego procesu (SIPS I). Skala na zdjęciach w górnym panelu wynosi 2 μ m. W dolnym panelu przedstawiono powiększone fragmenty zdjęć zaznaczone czerwonymi prostokątami. Nu – jądro komórkowe, Lys – lizosomy; niebieską strzałką zaznaczono siateczkę śródplazmatyczną, zieloną strzałką zaznaczono mitochondria, czerwoną gwiazdką zaznaczono aparat Golgiego.

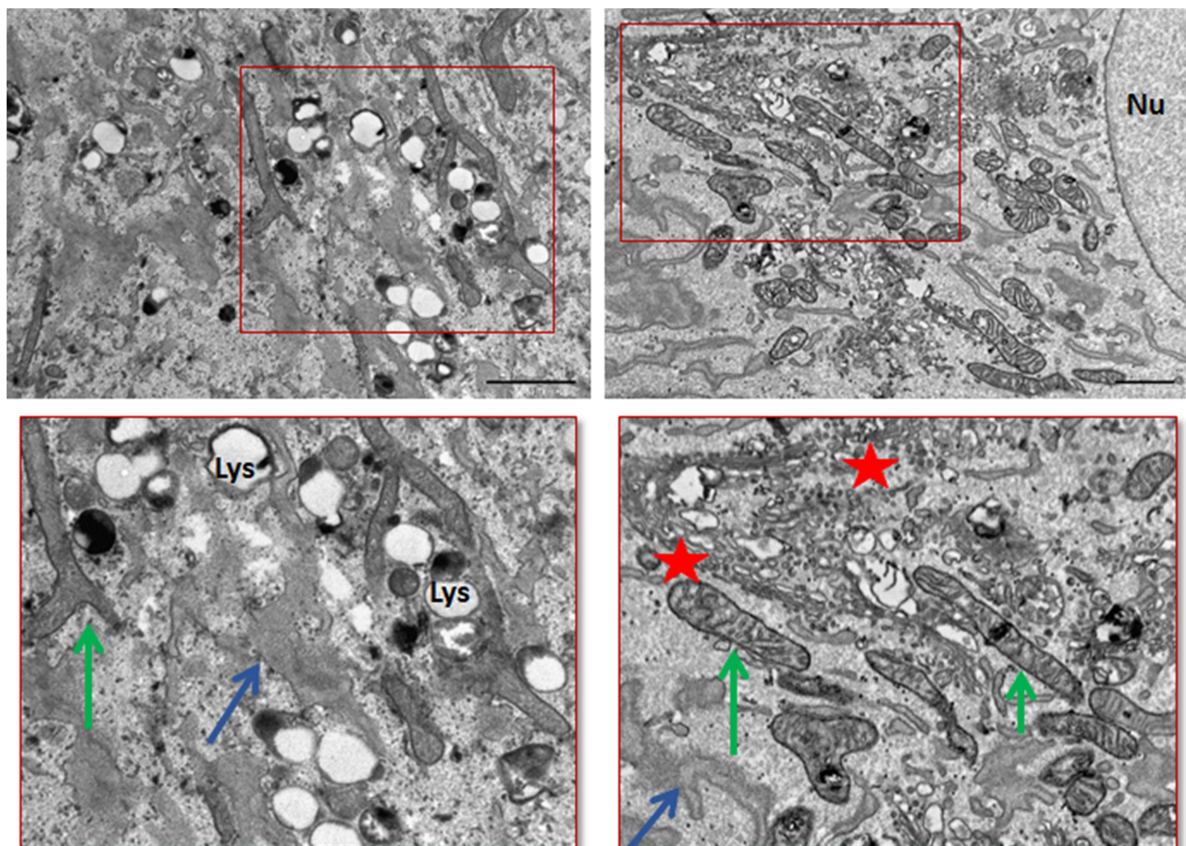


Ryc. 4.22 Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające morfologię komórek VSMC indukowanych do starzenia będących na późnym etapie tego procesu (SIPS IV). Skala na zdjęciach w górnym panelu: na zdjęciu po lewej wynosi 2 μm , na zdjęciu po prawej 1 μm . W dolnym panelu przedstawiono powiększone fragmenty zdjęć zaznaczone czerwonymi prostokątami. Nu – jądro komórkowe, Lys – lizosomy; niebieską strzałką zaznaczono siateczkę śródplazmatyczną, zieloną strzałką zaznaczono mitochondria, czerwoną gwiazdką zaznaczono aparat Golgiego.



Ryc. 4.23 Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające morfologię komórek VSMC ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS). Skala na zdjęciach w górnym panelu wynosi 1 μm . W dolnym panelu przedstawiono powiększone fragmenty zdjęć zaznaczone czerwonymi prostokątami. Nu – jądro komórkowe, Lys – lizosomy; niebieską strzałką zaznaczono siateczkę śródplazmatyczną, zieloną strzałką zaznaczono mitochondria, czerwoną gwiazdką zaznaczono aparat Golgiego.

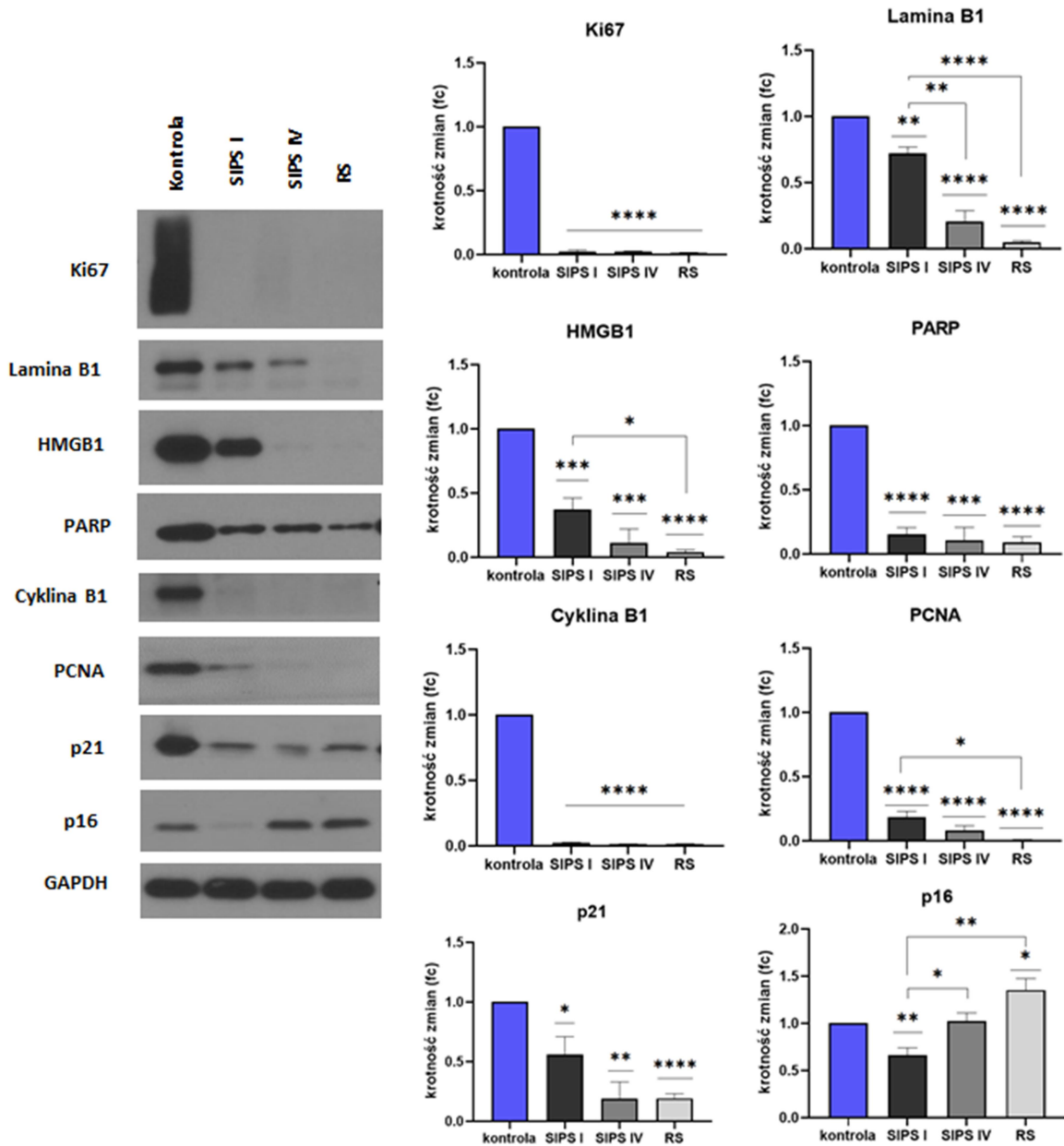
Analogiczną analizę, z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, przeprowadzono również dla komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. W komórkach tych, także zaobserwowano wydłużone oraz uszkodzone mitochondria, fragmentację aparatu Golgiego oraz zmiany w wyglądzie siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 4.24). Co więcej, mnogość nagromadzonych lizosomów oraz struktur pochodzenia lizosomalnego była podobna jak w komórkach starych hodowanych w warunkach *in vitro*.



Ryc. 4.24 Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu elektronowego przedstawiające morfologię komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Skala na zdjęciach w górnym panelu wynosi 1 μm . W dolnym panelu przedstawiono powiększone fragmenty zdjęć zaznaczone czerwonymi prostokątami. Nu – jądro komórkowe, Lys – lizosomy; niebieską strzałką zaznaczono siateczkę śródplazmatyczną, zieloną strzałką zaznaczono mitochondria, czerwoną gwiazdką zaznaczono aparat Golgiego.

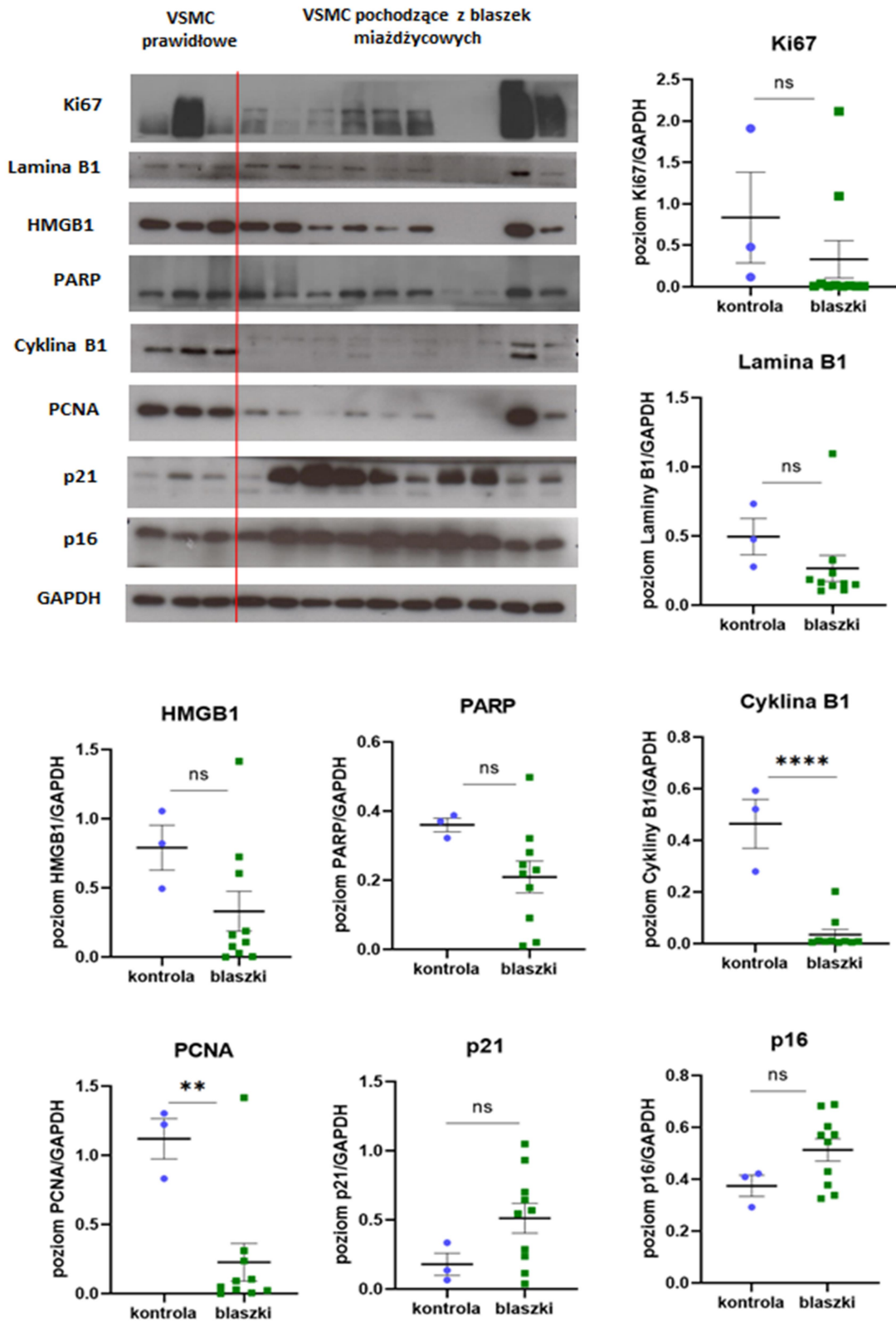
4.2.3 Porównanie poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem w VSMC ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo*

W celu dalszej charakterystyki komórek ulegających starzeniu zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* przeprowadzono analizę poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem. Analiza wyników otrzymanych metodą Western blotting wykazała znaczące obniżenie poziomu białka Ki67 oraz cykliny B1 we wszystkich trzech grupach komórek starych: przyspieszonego na wczesnym (SIPS I) i późnym (SIPS IV) etapie oraz starzenia replikacyjnego (Ryc. 4.25). Zaobserwowano istotny spadek poziomu białka laminy B1, HMGB1 oraz PARP1 w komórkach starych. Uzyskane wcześniej wyniki dotyczące analizy poziomu białka HMGB1 oraz laminy B1 w modelu starzenia przyspieszonego indukowanego doksorubicyną bądź H₂O₂ po 3 i 7 dniach, wykazały stopniowy spadek poziomu tych białek w czasie (Ryc. 4.10). Przeprowadzona poniżej analiza pokazuje dalszy spadek poziomu tych białek w komórkach będących na późnym etapie starzenia (SIPS IV) w porównaniu do poziomu tego białka w komórkach SIPS I oraz kontrolnych. Co więcej, najniższy poziom tych białek obserwowano w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Podobne zmiany obserwowano także w poziomie białka PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*; marker proliferacji). Zaobserwowano także istotny spadek poziomu białka p21 we wszystkich wariantach doświadczenia. Indukcja starzenia za pomocą H₂O₂ powodowała również obniżenie poziomu białka p16 w komórkach starych na wczesnych etapach starzenia (SIPS I) w porównaniu do komórek kontrolnych. Co ciekawe, w komórkach hodowanych 4 tygodnie po indukcji starzenia zaobserwowano istotny wzrost poziomu tego białka w porównaniu do poziomu białka p16 w komórkach SIPS I, niemniej był on zbliżony do poziomu p16 w komórkach kontrolnych. Jedynie w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu obserwowano istotny wzrost poziomu p16 względem kontroli. Uzyskany wynik dowodzi, że białko p16, chociaż powszechnie uznawane za marker starzenia, może ulegać zwiększonej ekspresji tylko w określonym czasie lub przy indukcji określonego typu starzenia.



Ryc. 4. 25 Analiza poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem w modelu *in vitro*. Na rycinie po lewej stronie przedstawiono reprezentatywne dla czterech powtórzeń błoty. Po prawej stronie zamieszczono wykresy przedstawiające krotność zmian poziomu analizowanego białka względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=4$. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta i oznaczano na wykresie zaznaczając porównywane grupy lub porównywano grupę eksperymentalną (SIPS I, SIPS IV, RS) z kontrolą.

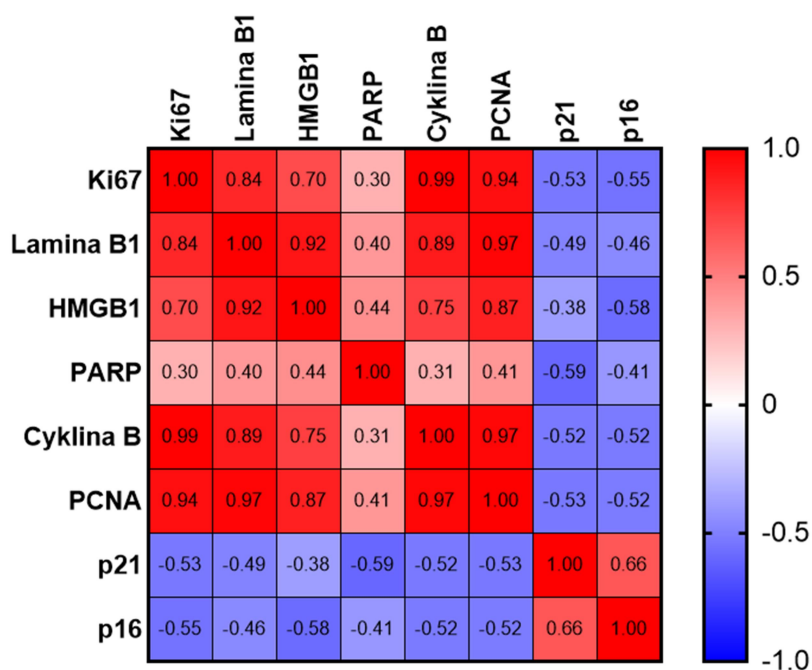
W dalszej części przeprowadzono analogiczną analizę poziomu wybranych białek w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych. Do analizy wykorzystano komórki z blaszek miażdżycowych pochodzących od 10 różnych pacjentów. Poziom ekspresji białek w komórkach pochodzących z blaszek, porównywano z poziomem ekspresji białek w komórkach mięśni gładkich pochodzących z prawidłowych naczyń krwionośnych (kontrola). Zaobserwowano istotny spadek poziomu białka cykliny B1 oraz PCNA w komórkach wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Poziom białek: Ki67, laminy B1, HMGB1 oraz PARP1 również był niższy w porównaniu do komórek kontrolnych VSMC. Spadek poziomu tych samych białek obserwowano także w komórkach ulegających starzeniu w warunkach *in vitro*. Co ciekawe, w przypadku komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych zaobserwowano wzrost poziomu białka p21 oraz p16 (Ryc. 4.26).



Ryc. 4.26 Analiza poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem w modelu *in vivo*. Przedstawione wyniki uzyskano, badając białka wyizolowane z komórek mięśni gładkich pochodzące z blaszek miażdżycowych od 10 pacjentów (10 blaszek). Jako kontrolę wykorzystano białka izolowane z komórek VSMC na wczesnych pasażach, pochodzące z trzech różnych hodowli. Na wykresach przedstawiono poziom analizowanego białka względem poziomu białka GAPDH dla komórek VSMC prawidłowych (kontrola) oraz

komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych (oznaczone na wykresach jako „blaszki”). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta .

Przeprowadzone analizy markerów starzenia dowiodły istnienia heterogenności komórek uzyskiwanych z blaszek miażdżycowych. Tym niemniej, przedstawione na Ryc. 4.26 wyniki dla pojedynczych próbek wskazują na zależność pomiędzy spadkiem poziomu białek takich jak cyklina B1, PCNA czy lamina B1, a wzrostem poziomu białka p16 oraz p21. Wyznaczone współczynniki korelacji Pearsona wskazują na średni ($0,3 \leq r_{xy} < 0,5$) bądź znaczny ($0,5 \leq r_{xy} < 0,7$) stopień współzależności pomiędzy poziomem białek p21 i p16 a Ki67, lamina B1, PCNA, HMGB1 czy cyklina B1. Natomiast wysoki ($0,7 \leq r_{xy} < 0,9$) bądź bardzo wysoki ($0,9 \leq r_{xy} < 1$) stopień współzależności poziomu białek Ki67, PCNA, HMGB1, cyklina B1 oraz lamina B1. (Ryc. 4.27). Uzyskany wynik wskazuje, że populacja komórek uzyskanych w trakcie izolacji z poszczególnych blaszek miażdżycowych miała zróżnicowany odsetek komórek starych, przy czym poziom markerów uznanych w toku prowadzonych przez nas badań, jako najbardziej wiarygodnych do oceny starzenia komórkowego (HMGB1, lamina B1, cyklina B1, Ki67), był analogiczny do ich poziomu w komórkach ulegających starzeniu *in vitro*. Fakt istnienia pewnych różnic (podwyższony poziom białka p21) sugeruje, że podczas starzenia *in vivo*, komórki mogą podlegać również innym zmianom, nieobserwowanym w warunkach *in vitro*.

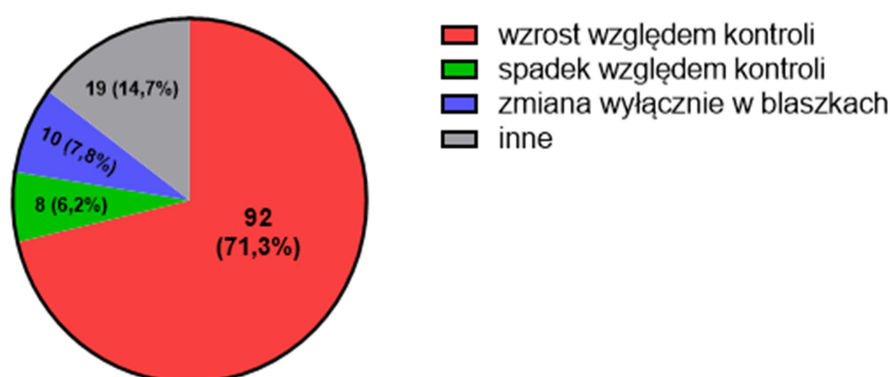


Ryc. 4.27 Mapa ciepła przedstawiająca wyznaczone współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy poszczególnymi poziomami białek w próbkach komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Za słaby

stopień współzależności przyjmuje się $0 < r_{xy} < 0,3$; średni: $0,3 \leq r_{xy} < 0,5$; znaczny: $0,5 \leq r_{xy} < 0,7$; wysoki: $0,7 \leq r_{xy} < 0,9$ oraz bardzo wysoki: $0,9 \leq r_{xy} < 1$.

4.2.4 Analiza profilu wydzielniczego komórek VSMC ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo*

Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP, ang. *Senescence Associated Secretory Phenotype*) jest niewątpliwie najważniejszą cechą komórek starych, która determinuje ich rolę w organizmie. SASP polega na zwiększonym wydzielaniu wielu biologicznie aktywnych czynników takich jak cytokiny prozapalne, chemokiny, czynniki wzrostu czy enzymy modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową itp. Przeprowadzone do tej pory badania dowiodły, że istotną cechą SASP jest jego ogromne zróżnicowanie zależne na przykład od typu komórki oraz czynnika indukującego starzenie. Podjęte przeze mnie badania miały na celu jakościową i ilościową analizę profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu w oparciu o mikromacierze białkowe. Analizie poddano pożywkę pozbawioną surowicy, zebraną po 24 godzinach z nad tej samej liczby komórek kontrolnych (komórki proliferujące, będące na wczesnych pasażach), komórek indukowanych do starzenia nadtlenkiem wodoru i hodowanych przez 7 dni (SIPS I) oraz 4 tygodnie (SIPS IV), komórek replikacyjnie starych (RS) oraz komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych pochodzących od 10 pacjentów (AP, *atherosclerotic plaque*). Sprawdzano poziom 130 czynników należących do chemokin, czynników prozapalnych, czynników wzrostu oraz metaloproteinaz. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że w sekretomie komórek starych około 70% badanych białek występuje na poziomie wyższym niż w sekretomie komórek kontrolnych (Ryc. 4.28).



Ryc. 4.28 Wykres kołowy przedstawiający rozkład procentowy poszczególnych białek, których poziom był wyższy lub niższy w sekretomie komórek starych w porównaniu do sekretomu komórek kontrolnych, lub których podwyższony poziom wykryto tylko w sekretomie komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych.

Czynniki zakwalifikowane do grupy „inne” nie zmieniały się w sekretomie komórek starych względem kontroli, bądź zmiany obserwowano w pojedynczych wariantach eksperymentalnych.

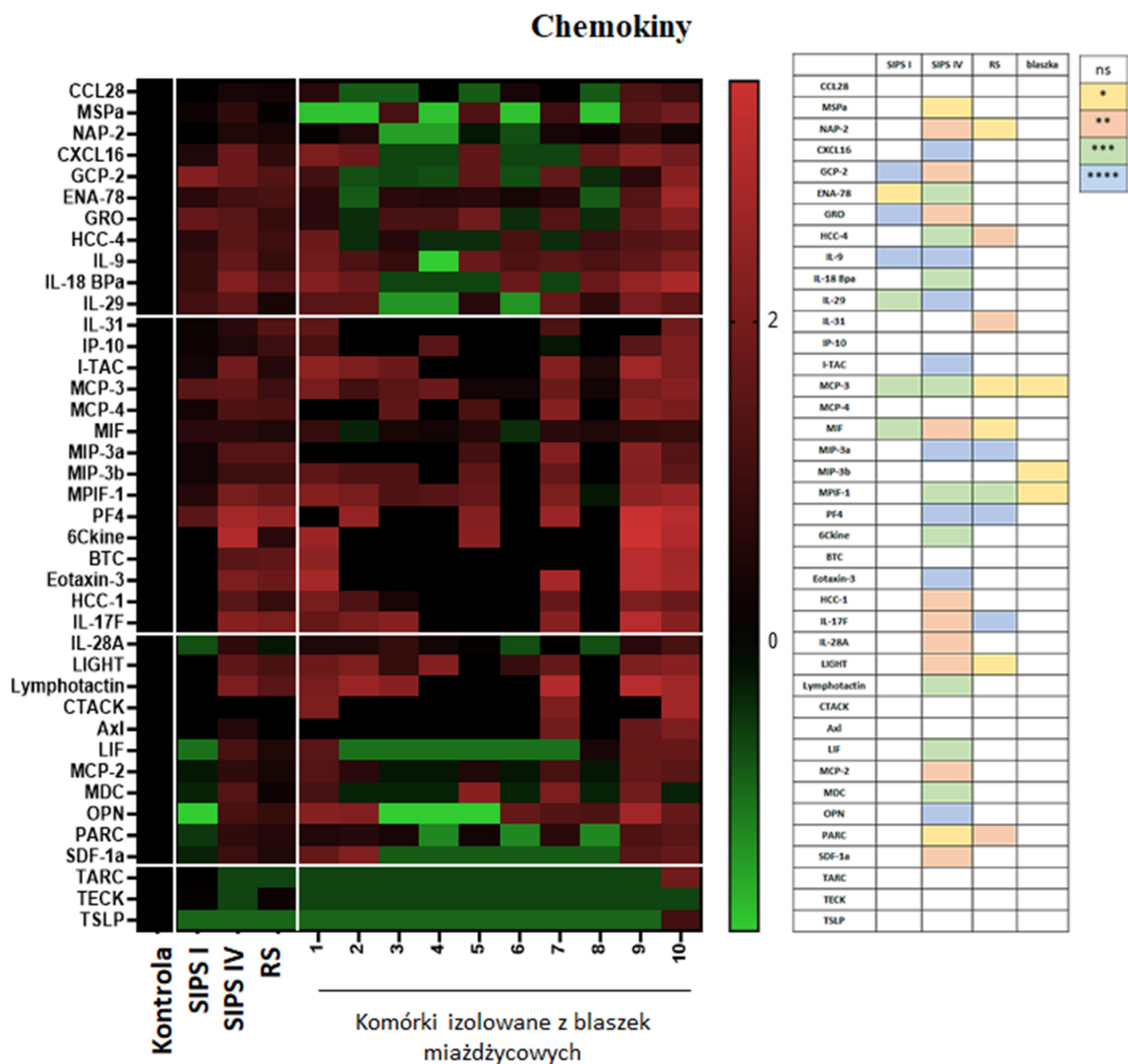
Wyróżniono również czynniki, których zmianę poziomu względem kontroli zaobserwowano wyłącznie w próbkach zebranych z komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych (7,8% wszystkich analizowanych czynników). W tabeli 4.1 przedstawiono czynniki, które przyporządkowano do poszczególnych grup. Pojedyncze wykresy przedstawiające zmiany poziomu wydzielania poszczególnych czynników względem kontroli zamieszczono w suplemencie pracy (Ryc. S.4 – S.13)

Tabela 4.1 Tabela przedstawiająca analizowane czynniki przyporządkowane do poszczególnych grup w zależności od obserwowanych zmian w ich poziomie względem kontroli.

wzrost poziomu cytokin wzgl. kontroli	SIPS I, SIPS IV, RS, AP	BMP-4, β -NGF, EG-VEGF, FGF-4, FGF-7, GH, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, NT-3, PIGF, TGF α , TGF β 3, VEGF R2, CXCL16, ENA-78, GCP-2, GRO, HCC-4, IL-9, IL-18Bpa, IL-29, IL-31, IP-10, I-TAC, MCP-3, MCP-4, MIF, MIP-3a, MIP-3b, MPIF-1, PF4, GM-CSF, IL-4, IL-8, IL-11, IL-12p40, IL-13, IL-17, TNF α , MMP-10, MMP-13, TIMP-2, TIMP-4
	SIPS IV, RS i AP	BMP-5, EGF R, GDF-15, GDNF, HGF, IGFBP-4, IGFBP-6, IGF-I, Insulin, MCSF R, NGF R, NT-4, OPG, PDGF-AA, VEGF, VEGF R3, 6Ckine, BTC, Eotaxin-3, HCC-1, IL-17F, LIGHT, Lymphotactin, MCP-2, MDC, OPN, PARC, SDF-1a, IL-1ra, IL-6sR, IL-15, MMP-1, MMP-3, TIMP-1
	SIPS I i SIPS IV	TGF β 1, MIG
	SIPS IV i AP	SCF, Axl, IL-28a, IL-6, IL-5, MIP-1b, MMP-2
	RS i AP	BDNF, BMP-7, IL-1a, IL-2
spadek poziomu cytokin wzgl. kontroli	SIPS I, SIPS IV, RS, AP	AR, TARC, TSLP, Eotaxin-2, G-CSF, IL-1b, IL-10
zmiany poziomu wyłącznie w AP	wzrost poziomu	bFGF, EGF, CTACK, BLC, I-309, ICAM-1, MIP-1a, RANTES, MMP-9
	spadek poziomu	PDGF-BB
inne		HB-EGF, SCF R, VEGF-D, CCL28, LIF, MSPa, NAP-2, TECK, Eotaxin, IFN γ , IL-7, IL-12p70, IL-16, MCP-1, MIP-1d, MCSF, TNF RI, TNF RII, MMP-8

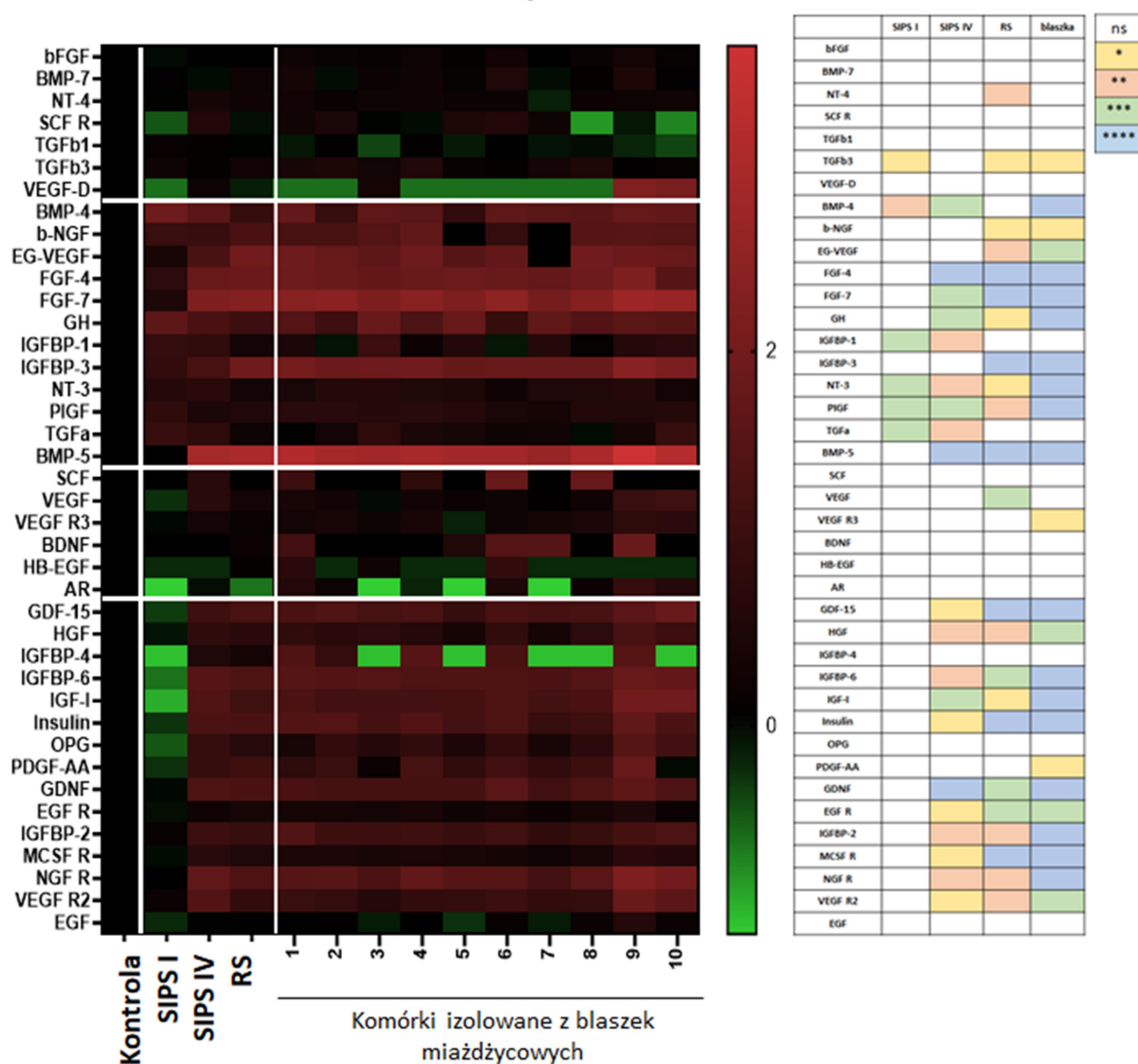
Uzyskane wyniki ilościowe dla poszczególnych czynników znormalizowano za pomocą standaryzacji Z i przedstawiono w postaci map ciepła (Ryc. 4.29-4.32). Wynik tej analizy pozwolił stwierdzić, że profil wydzielniczy komórek mięśni gładkich wyizolowanych

z blaszek miażdżycowych jest w znacznym stopniu zbliżony do profilu wydzielniczego komórek ulegających starzeniu w warunkach *in vitro*, w szczególności komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz przyspieszonemu, ale będącemu na późnym etapie (SIPS IV). Niemniej jednak poziom cytokin w poszczególnych próbkach uzyskanych z komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych jest zróżnicowany. W dołączonych do map ciepła po prawej stronie tabelach zaznaczono istotne statystycznie zmiany w poziomie wydzielania poszczególnych czynników względem kontroli.



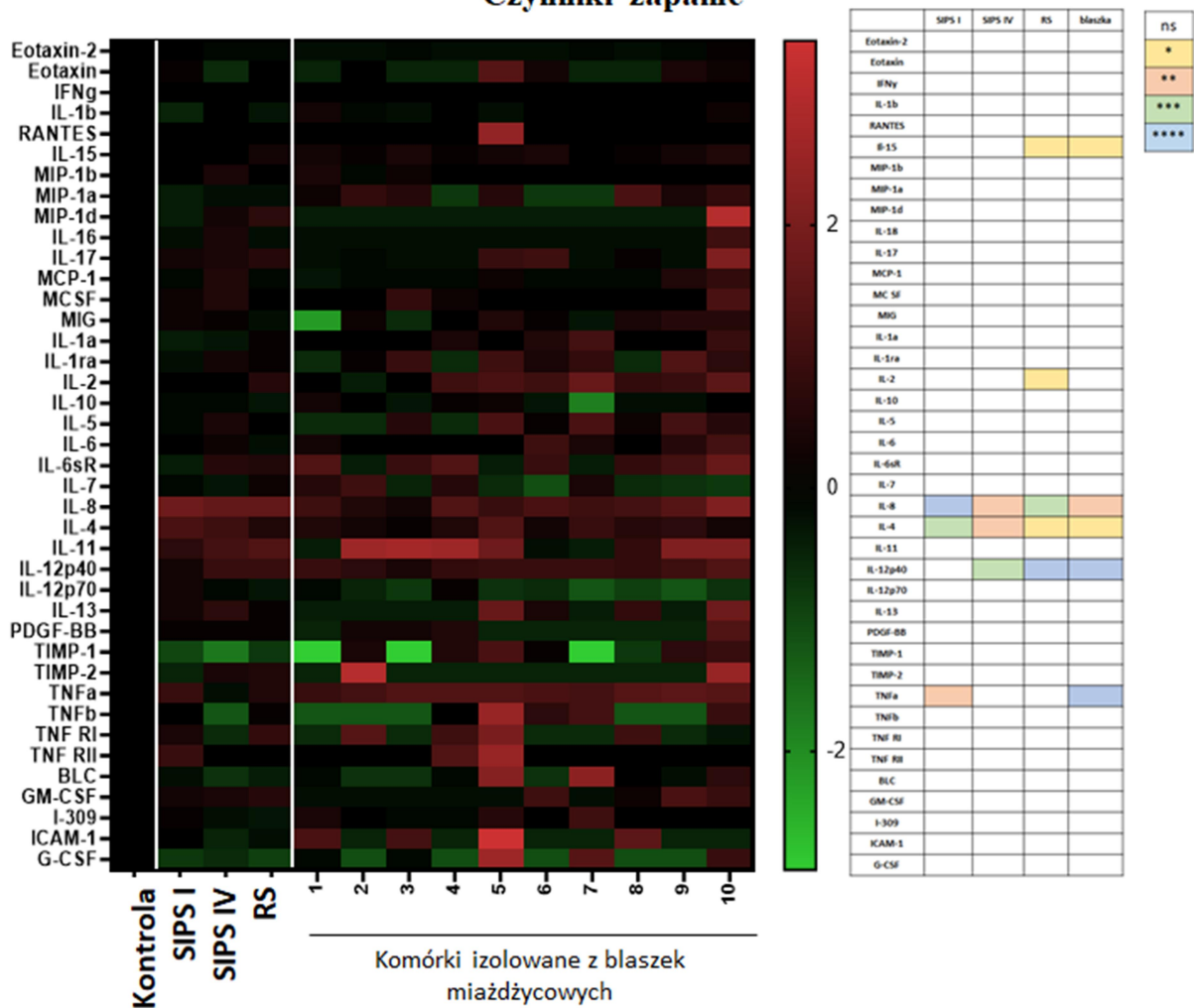
Ryc. 4.29 Mapa ciepła przedstawiająca analizę porównawczą poziomu wydzielanych czynników należących do chemokin. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z poszczególnych wyników. W przypadku wariantów SIPS I, SIPS IV i RS oraz kontroli przedstawiono uśrednione wyniki dla trzech powtórzeń. Cyfry od 1 do 10 oznaczają poszczególne próbki (pożywka kondycjonowana) zebrane z komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Skala mapy ciepła odniesiona do średniej po normalizacji danych surowych. Po prawej stronie zamieszczono tabelę uwzględniającą istotne zmiany w poziomie wydzielanych czynników względem kontroli. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

Czynniki wzrostu



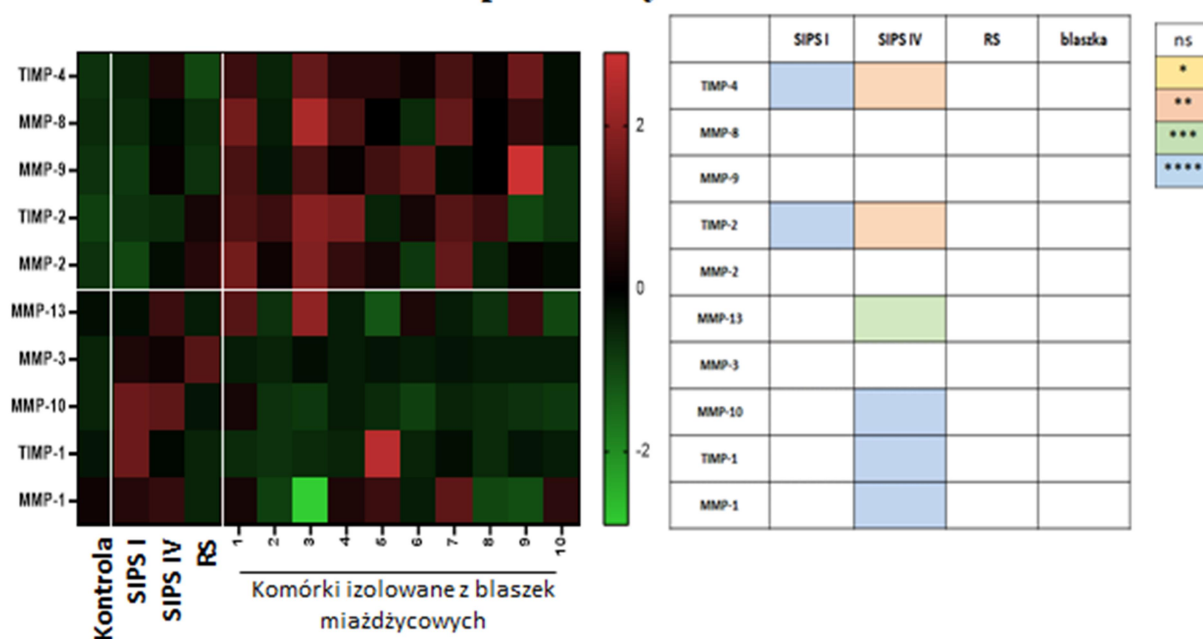
Ryc. 4.30 Mapa ciepła przedstawiająca analizę porównawczą poziomu wydzielanych czynników należących do czynników wzrostu. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z poszczególnych wyników. W przypadku wariantów SIPS I, SIPS IV i RS oraz kontroli przedstawiono uśrednione wyniki dla trzech powtórzeń. Cyfry od 1 do 10 oznaczają poszczególne próbki (pożywka kondycjonowana) zebrane z komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Skala mapy ciepła odniesiona do średniej po normalizacji danych surowych. Po prawej stronie zamieszczono tabelę uwzględniającą istotne zmiany w poziomie wydzielanych czynników względem kontroli. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

Czynniki zapalne



Ryc. 4.31 Mapa ciepła przedstawiająca analizę porównawczą poziomu wydzielanych czynników należących do czynników zapalnych. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z poszczególnych wyników. W przypadku wariantów SIPS I, SIPS IV i RS oraz kontroli przedstawiono uśrednione wyniki dla trzech powtórzeń. Cyfry od 1 do 10 oznaczają poszczególne próbki (pożywka kondycjonowana) zebrane z komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Skala mapy ciepła odniesiona do średniej po normalizacji danych surowych. Po prawej stronie zamieszczono tabelę uwzględniającą istotne zmiany w poziomie wydzielanych czynników względem kontroli. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

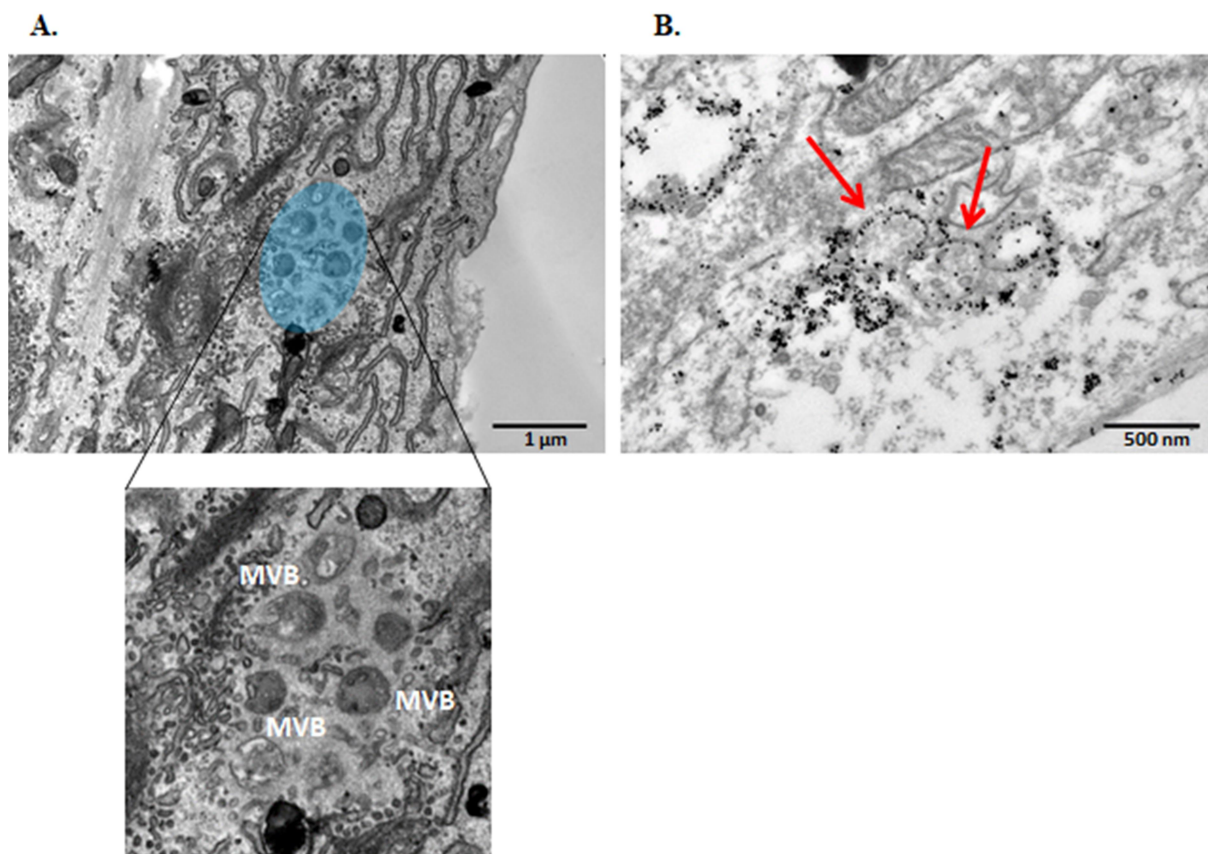
Metaloproteinazy



Ryc. 4.32 Mapa ciepła przedstawiająca analizę porównawczą poziomu wydzielanych czynników należących do metaloproteinaz. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z poszczególnych wyników. W przypadku wariantów SIPS I, SIPS IV i RS oraz kontroli przedstawiono uśrednione wyniki dla trzech powtórzeń. Cyfry od 1 do 10 oznaczają poszczególne próbki (pożywka kondycjonowana) zebrane z komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych. Skala mapy ciepła odniesiona do średniej po normalizacji danych surowych. Po prawej stronie zamieszczono tabelę uwzględniającą istotne zmiany w poziomie wydzielanych czynników względem kontroli. Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta.

4.3 Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty

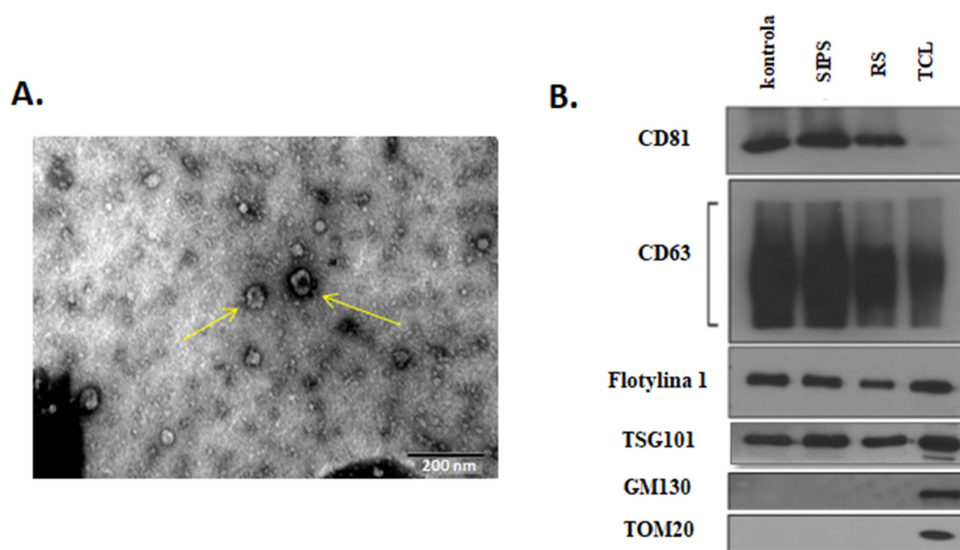
Badania ostatnich lat zwróciły uwagę na udział pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs, ang. *extracellular vesicles*), jako ważny element sekretomu komórek starych. Ze względu na swoją budowę i zróżnicowany ładunek, który przenoszą, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają niezwykle istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Jedną z kategorii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są egzosomy, które powstają w wyniku wewnętrznego pączkowania późnego endosomu, zwanego ciałkiem wielopęcherzykowym (MVB). Pęcherzyki określane jako ILVs pączkują do wnętrza światła endosomu i następnie na drodze fuzji MVB z błoną plazmatyczną komórki, zostają uwalniane na zewnątrz. MVB zwizualizowano wykorzystując transmisyjną mikroskopię elektronową połączoną z immunodetekcją białka CD63 (białko z rodziny tetraspanin, występujące w endosomach, marker egzosomów) przeciwciałem sprzężonym z nanocząstkami złota. (Ryc. 4.33).



Ryc. 4.33 Wizualizacja egzosomów w komórkach mięśni gładkich z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. A. Reprezentatywne zdjęcie przedstawiające ciała wielopęcherzykowe (MVBs) obecne w komórkach VSMC; B. Reprezentatywne zdjęcie przedstawiające immunodektekcję białka CD63 w MVB z wykorzystaniem nanocząstek złota. Czerwona strzałka potwierdza obecność białka CD63 (czarne punkty) w ciałkach wielopęcherzykowych.

W dalszych etapach badań prowadzono analizę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych metodą ultrawirowania z pożywki pozbawionej surowicy, w której przez 24 godziny hodowane były VSMC. Wyizolowane pęcherzyki zwizualizowano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (Ryc. 4.34A). Porównywano pęcherzyki wydzielane przez komórki będące na wczesnych pasażach (kontrola) oraz przez komórki ulegające starzeniu indukowanemu (SIPS) lub replikacyjnemu (RS). Analiza Western blotting potwierdziła w wyizolowanych pęcherzykach obecność kanonicznych markerów egzosomalnych, takich jak białka CD63, CD81, TSG101 oraz flotyliny 1 (Ryc. 4.34B). TSG101 jest białkiem związanym z białkami szlaku ESCRT, które odgrywają kluczową rolę w sortowaniu ubikwitynowych receptorów błonowych w kierunku lizosomów (Wallis i wsp. 2020), natomiast flotylina-1 jest białkiem zaangażowanym w fuzję błon i transport pęcherzykowy. CD63 i CD81 należą do białek z rodziny tetraspanin i znajdują się na błonie pęcherzyków. Obecność wymienionych białek w izolatach dowodzi wzbogacenia

frakcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w egzosomy. Dodatkowo czystość wyizolowanej frakcji pęcherzyków potwierdzono poprzez stwierdzenie braku obecności białka macierzy cis-Golgi 130 (GM130) oraz translokazy zewnętrznej błony mitochondrialnej 20 (TOMM20), znanych jako markery aparatu Golgiego i mitochondriów. Ekspresja obu białek była widoczna tylko w lizacie komórkowym. Dobór powyższych markerów jest zgodny z wytycznymi opublikowanymi przez International Society for Extracellular Vesicles w 2018 roku (They i wsp. 2018) dotyczącymi charakterystyki EVs.

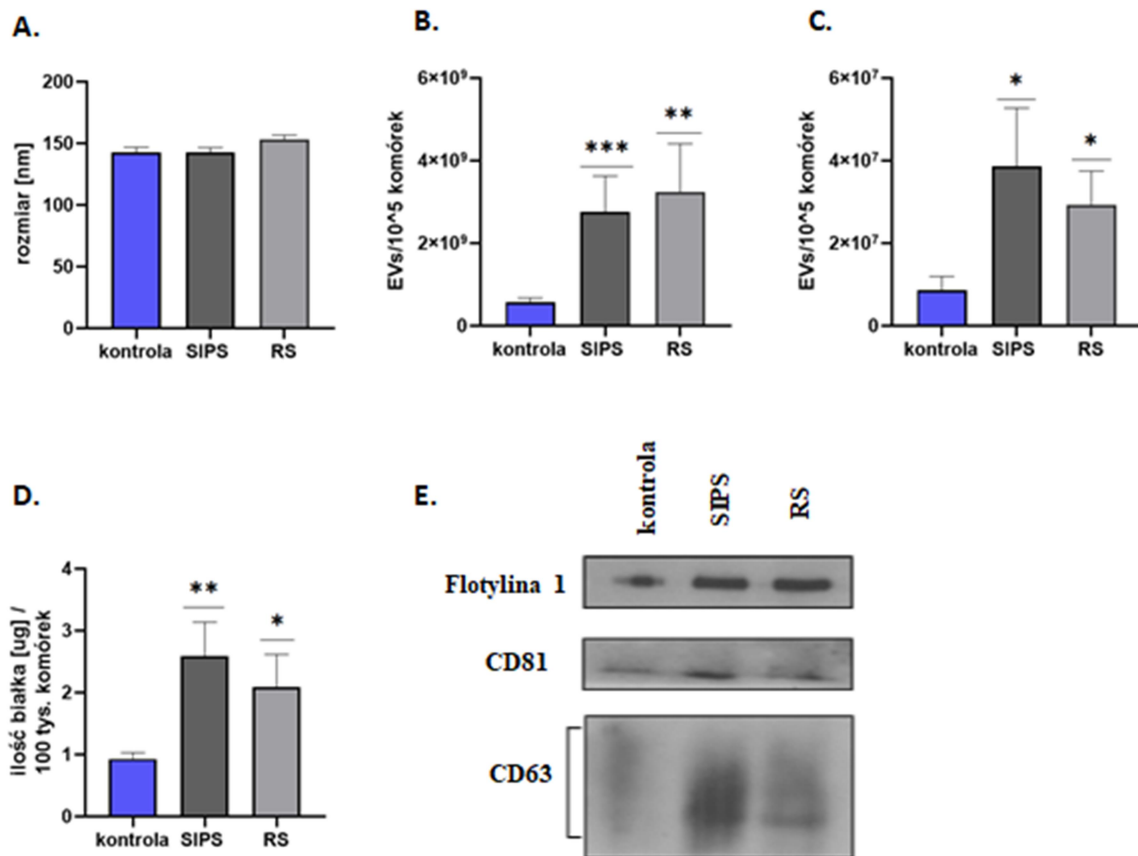


Ryc 4.34 Charakterystyka wyizolowanych z pożywki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych A. Reprezentatywne zdjęcie przedstawiające wyizolowane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (zaznaczone żółtą strzałką). B. Analiza Western blotting markerów egzosomalnych (CD81, CD63, flotylna 1 oraz TSG101) we frakcjach pęcherzeków zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z komórek VSMC kontrolnych oraz ulegających starzeniu przyspieszonemu i replikacyjnemu. Czystość wyizolowanych pęcherzyków potwierdzono brakiem obecności białka GM130 (białko macierzy cis-Golgi) oraz białka Tom20 (marker mitochondriów) w analizowanych próbkach. TCL (*ang. total cell lysate*) – lizat całokomórkowy. W każdym wariancie naniesiono po 20µg białka.

Stosując technikę opartą na Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) zmierzono wielkość oraz określono liczbę pęcherzyków wydzielanych przez komórki młode (kontrola) i komórki stare (SIPS i RS). Nie zaobserwowano żadnych różnic w wielkości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Ryc. 4.35A).

Wykazano natomiast istotny wzrost liczby pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki ulegające zarówno starzeniu przyspieszonemu, jak i replikacyjnemu (Ryc. 4.35B.). Ten wzrost ogólny liczby wydzielanych pęcherzyków przekładał się na wzrost liczby egzosomów (pęcherzyki zawierające białko CD63)

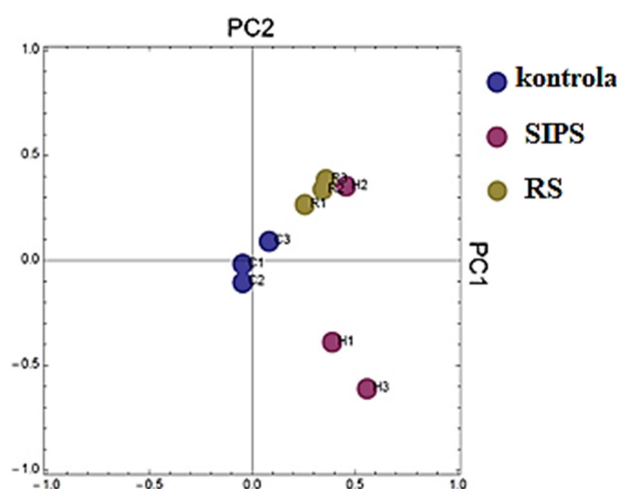
wydzielanych przez komórki stare, a także na ilość białka (Ryc. 4.35C i D). Potwierdziła to również analiza Western blotting identyfikująca flotylinę 1, CD81 i CD63 w ekstraktach białkowych przygotowanych z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Ryc. 4.35E). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w liczbie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki mięśni gładkich ulegających starzeniu przyspieszonemu i replikacyjnemu.



Ryc. 4.35 Charakterystyka jakościowa i ilościowa pęcherzyków wydzielanych przez komórki VSMCs
A. Wykres przedstawiający rozmiar średnią wielkość wyizolowanych EVs zmierzony metodą NTA za pomocą aparatu NanoSight. B. Wykres przedstawiający liczbę wydzielanych EVs przez 100 tys. komórek kontrolnych oraz komórek ulegających starzeniu SIPS i RS zmierzoną za pomocą aparatu NanoSight. C. Porównanie ilości pęcherzyków CD63 pozytywnych (egzosomów) wydzielanych przez tę samą liczbę komórek kontrolnych i starych (analiza przeprowadzona za pomocą testu ExoElisa). D. Wykres przedstawiający średnią ilość białka wydzielaną w postaci egzosomów przez komórki kontrolne oraz ulegające starzeniu SIPS i RS. E. Reprezentatywne bloty przedstawiające porównanie poziomu flotyliny-1, CD81 i CD63 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez tę samą liczbę (200 tys.) komórek kontrolnych i starych. Na wykresach przedstawiono średnie wartości ± SEM, liczba powtórzeń n>6.

4.3.1 Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez młode i stare komórki VSMC

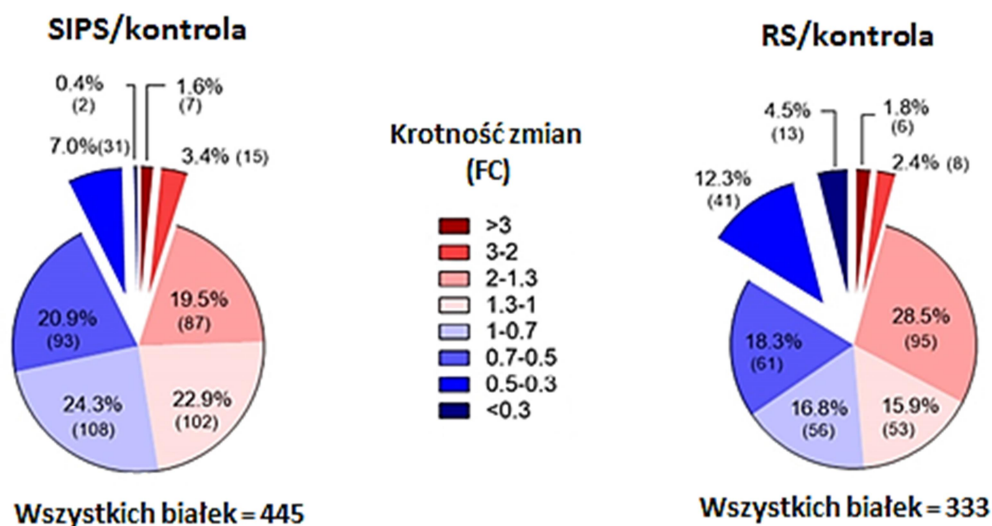
Zastosowanie tandemowej spektrometrii masowej umożliwiło przeprowadzenie jakościowej i ilościowej analizy białek znajdujących się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Zbadano podobieństwa i różnice między pęcherzykami wydzielanymi przez komórki proliferujące (kontrolne) oraz komórki stare, a także porównano białka obecne w pęcherzykach wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz starzeniu przyspieszonemu (SIPS). Zidentyfikowano 975 białek w wyizolowanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Za pomocą analizy składowych głównych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) i przy użyciu pierwszych dwóch wymiarów PCA, wykazano istnienie różnic w proteomie pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare oraz komórki kontrolne. Stwierdzono również, że proteom pęcherzyków wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu różni się od proteomu pęcherzyków wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu. Co więcej, proteom pęcherzyków wydzielanych przez komórki RS w większym stopniu przypomina proteom pęcherzyków wydzielanych przez komórki kontrolne (Ryc 4.36).



Ryc. 4.36 Analiza składowych głównych (PCA) składu białkowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki kontrolnych, komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu (SIPS) oraz replikacyjnemu (RS).

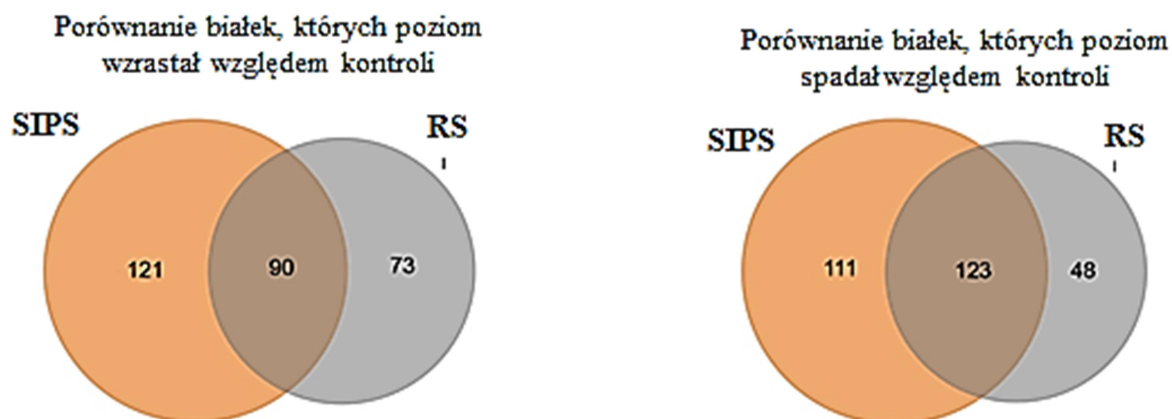
Następnie przeanalizowano ilościowe różnice w proteomie pęcherzyków kontrolnych i pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare. Wyodrębniono 445 białek, których poziom zmieniał się istotnie ($p < 0.05$) w EVs wydzielanych przez komórki SIPS oraz 333 białka w EVs wydzielanych przez komórki RS. Poziom większości tych białek zmieniał się względem EVs wyizolowanych z komórek kontrolnych umiarkowanie lub nieznacznie

(FC, ang. *fold change*) - FC między 0,5 a 2 (Ryc. 4.37). Średnio około 30% białek zidentyfikowanych w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare zmieniało się w stopniu znacznym lub umiarkowanym - krotność zmian FC >1.3 i <0.5.



Ryc. 4.37 Wykresy kołowe przedstawiające rozkład krotności zmian (FC) poziomu białek zidentyfikowanych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC względem komórek proliferujących (kontrolnych). Do analizy wzięto białka, których poziom zmieniał się istotnie ($p < 0,05$) względem kontroli.

Pośród białek, których poziom istotnie wzrastał względem kontroli, 90 było wspólnych dla pęcherzyków wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu. Poziom 121 białek istotnie wzrastał wyłącznie w pęcherzykach SIPS, a 73 białek w pęcherzykach RS. W przypadku białek, których poziom spadał względem kontroli, 123 były wspólne dla obu wariantów, 111 wyłącznie SIPS, a 48 wyłącznie RS (Ryc. 4.38).



Ryc. 4.38 Diagramy Venna przedstawiające rozkład białek unikalnych i wspólnych, których poziom rósł lub spadał istotnie statystycznie w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare (SIPS i RS) względem białek zidentyfikowanych w pęcherzykach wydzielanych przez komórki kontrolne.

W celu bardziej szczegółowego opisu składu białkowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, wytypowano grupy białek określone jako „białka TOP”, które zidentyfikowano w EVsach pochodzących z obu typów komórek starych (SIPS i RS) lub unikalne dla każdego typu starzenia. Do białek „TOP” zostały przypisane jedynie te, których poziom wzrósł co najmniej dwukrotnie w porównaniu z kontrolą. Uwzględniono również takie białka, których poziom wzrósł przynajmniej o 30%, ale najbardziej istotnie ($p < 0.001$) (Tabela 4.2).

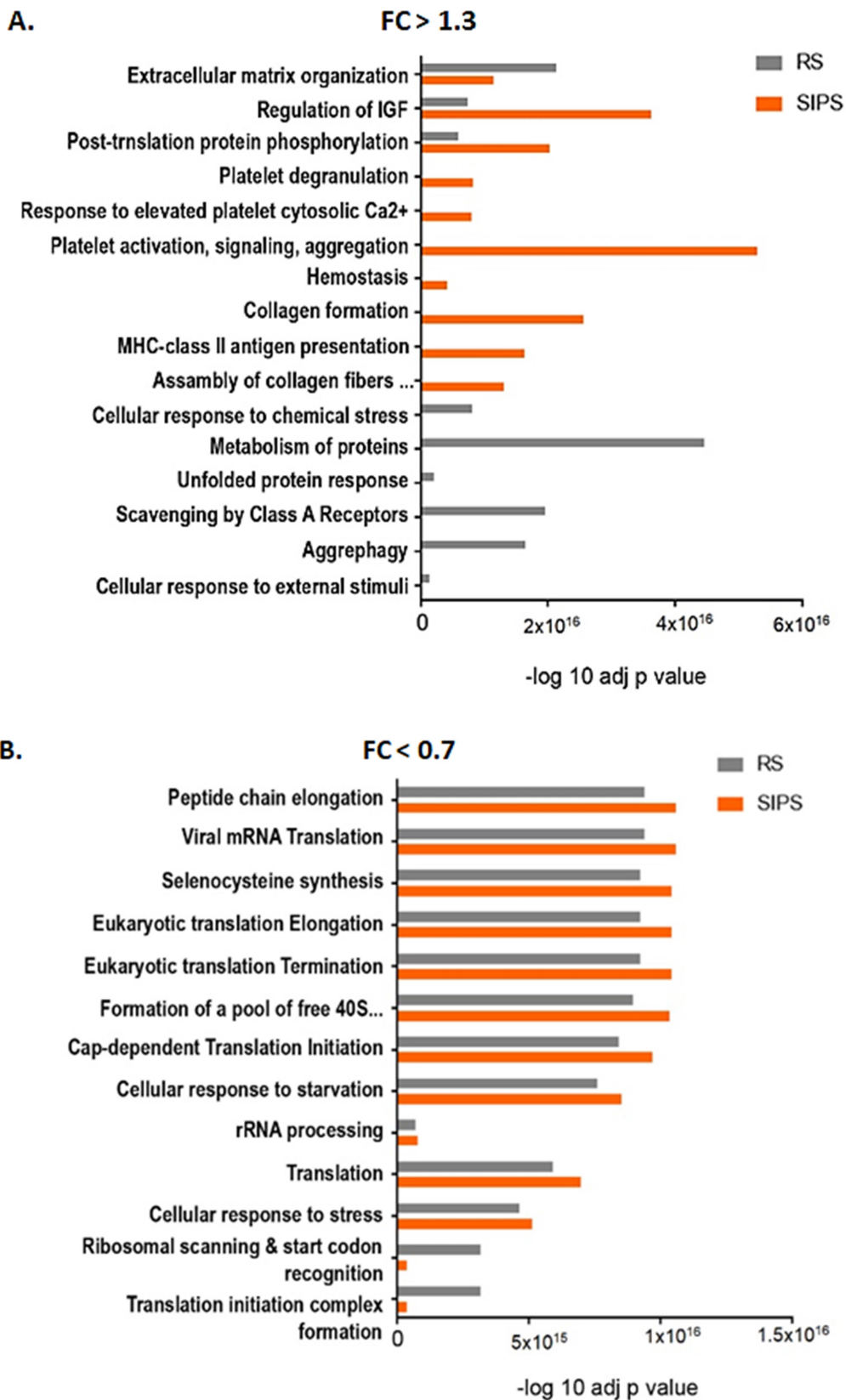
Tabela 4.2 Lista białek „TOP” zidentyfikowanych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek starych replikacyjnie (RS) oraz indukowanych do starzenia (SIPS). W tabeli przedstawiono białka wspólne dla obu wariantów (SIPS i RS) oraz unikalne dla poszczególnych typów komórek starych, których poziom wzrósł co najmniej dwukrotnie ($FC \log_2 > 1$) lub mniej ($FC \log_2 > 0,39$). Pogrubioną czcionką zaznaczono te białka, które zmieniały się najbardziej istotnie ($p < 0.001$)

Nazwa białka	ID	Krotność zmian (FC log ₂)	
		SIPS	RS
Białka „TOP” wytypowane dla SIPS i RS			
cDNA FLJ55489	<u>RIPOR3</u>	19,08	17,8
Hydroxysteroid dehydrogenase 10 isoform 1	HSD17B10	2,41	2,49
Lipoma HMGIC fusion partner-like 2	LHFPL2	7,74	2,09
cDNA. FLJ93871. highly similar melanoma antigen. family B	<u>MAGEB2</u>	1,70	1,36

cDNA FLJ51509. highly similar to Alpha-fetoprotein	<u>AFP</u>	1,45	1,41
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	1,41	1,07
Serpin peptidase inhibitor. clade C (Antithrombin)	SERPINC1	1,32	0,73
Cytoskeleton-associated protein 4.	CKAP4	1,00	0,87
Keratin. type I cytoskeletal 16	KRT16	0,47	1,09
Vimentin	VIM	0,64	0,56
Heat shock protein beta-1	HSPB1	0,63	0,55
Białka „TOP” wytypowane wyłącznie dla SIPS			
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3	SIRT3	8,78	
Protein Wnt	WNT5A	3,34	
CXADR-like membrane protein	CLMP	1,4	
highly similar to cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	<u>COMP</u>	1,32	
Dynamin-2	DNM2	1,18	
Vacuolar protein sorting 37B	VPS37B	1,08	
Uncharacterized protein KIAA1683	KIAA1683	1,07	
Metalloendopeptidase	BMP1	0,9	
Prostaglandin F2 receptor negative regulator	PTGFRN	0,89	
Protocadherin Fat 1	FAT1	0,85	
Inter-alpha (Globulin) inhibitor H2	ITIH2	0,84	
EH-domain containing 4. isoform CRA_a	EHD4	0,47	
EH-domain containing 2. isoform CRA_a	EHD2	0,46	
Kinesin light chain 1	KLC1	0,39	
Białka „TOP” wytypowane wyłącznie dla RS			
Arginase-1	ARG1		2,27
Truncated profilaggrin	FLG		1,31
Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5		1,01
Splicing factor. arginine/serine-rich 2.	SFRS2		0,98
highly similar to receptor alpha (translocon-associated protein alpha) (SSR1).	<u>SSR1</u>		0,98
Superoxide dismutase	SOD2		0,98
Catalase	CAT		0,98

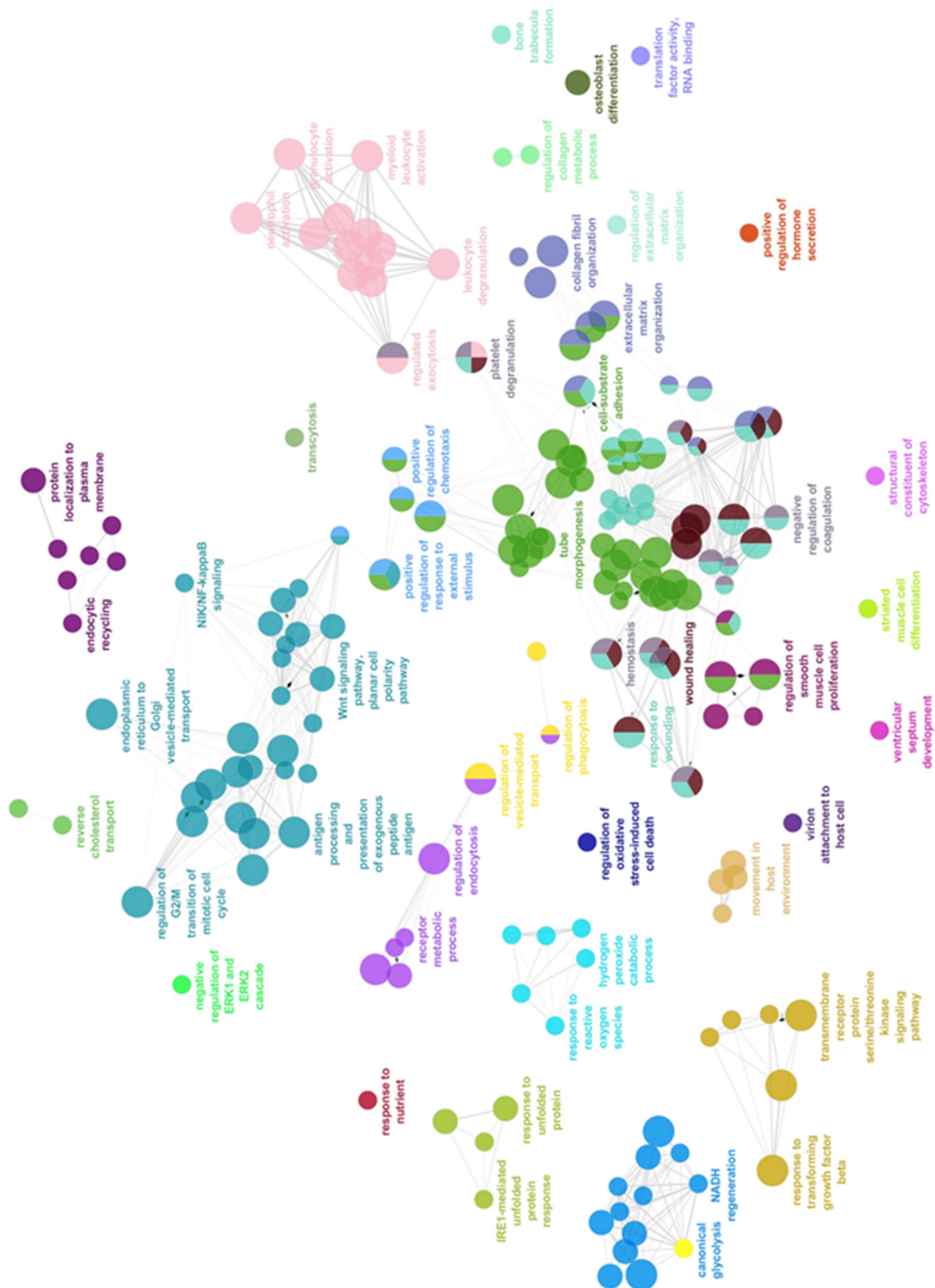
Splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2	0,98
Endoplasmin	HSP90B1	0,75
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	0,71
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	0,6
Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	0,55
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	0,38

Przy użyciu narzędzia g:Profiler i bazy Reactome Pathways przeprowadzono dalszą analizę bioinformatyczną ponad 200 białek, których poziom wzrastał ($FC > 1.3$) w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki stare. Zaobserwowano wyraźne różnice pomiędzy EVs wydzielanymi przez komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu i replikacyjnemu (Ryc. 4.39). Analiza wzbogacenia procesów biologicznych przeprowadzona na podstawie zidentyfikowanych w pęcherzykach białek, wykazała istnienie znaczących różnic pomiędzy SIPS i RS. Szlaki, które były najsilniej reprezentowane w pęcherzykach-SIPS, były związane z aktywacją, sygnalizacją i agregacją płytek krwi, ale także tworzeniem kolagenu i prezentacją antygeny MHC klasy II jak również regulacją zależną od IGF. W przypadku pęcherzyków-RS, nadreprezentowane były białka związane z metabolizmem białek, wychwytem przez receptory klasy A i agregacją. Dodatkowo przy użyciu tych samych narzędzi bioinformatycznych porównano ze sobą białka, których poziom spadał ($FC < 0.7$) w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare względem kontroli. Co ciekawe, w przypadku białek, których poziom w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare spadał względem białek identyfikowanych w pęcherzykach kontrolnych, nadreprezentowane były białka m.in. związane z translacją i obróbką rRNA (Ryc. 4.39).

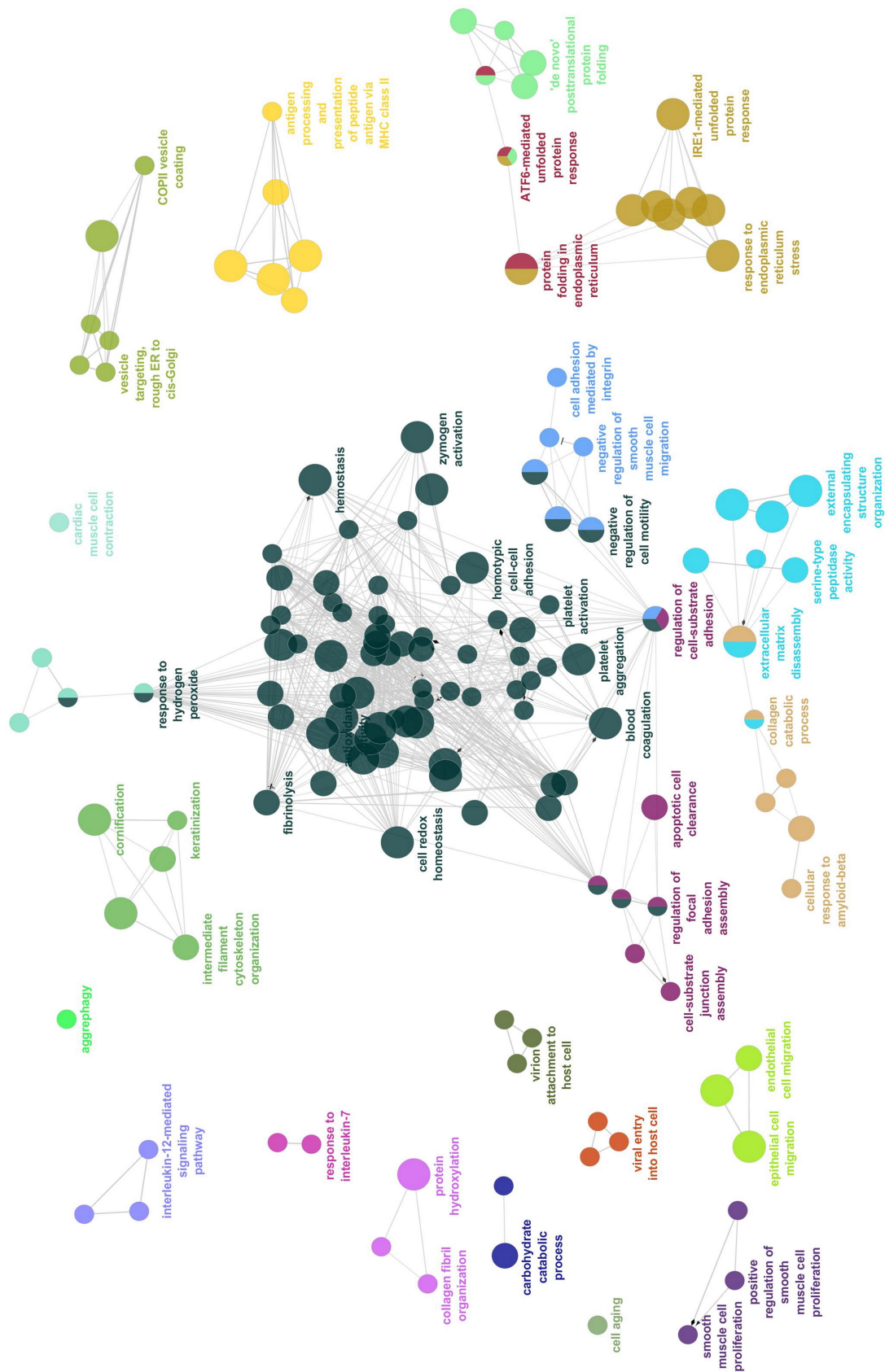


Ryc. 4.39 Analiza szlaków białek, za pomocą bazy Reactome Pathways, których poziom znacząco wzrósł (A.) lub zmalał (B.) w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z komórek ulegających starzeniu (SIPS i RS) w porównaniu do EVs kontrolnych.

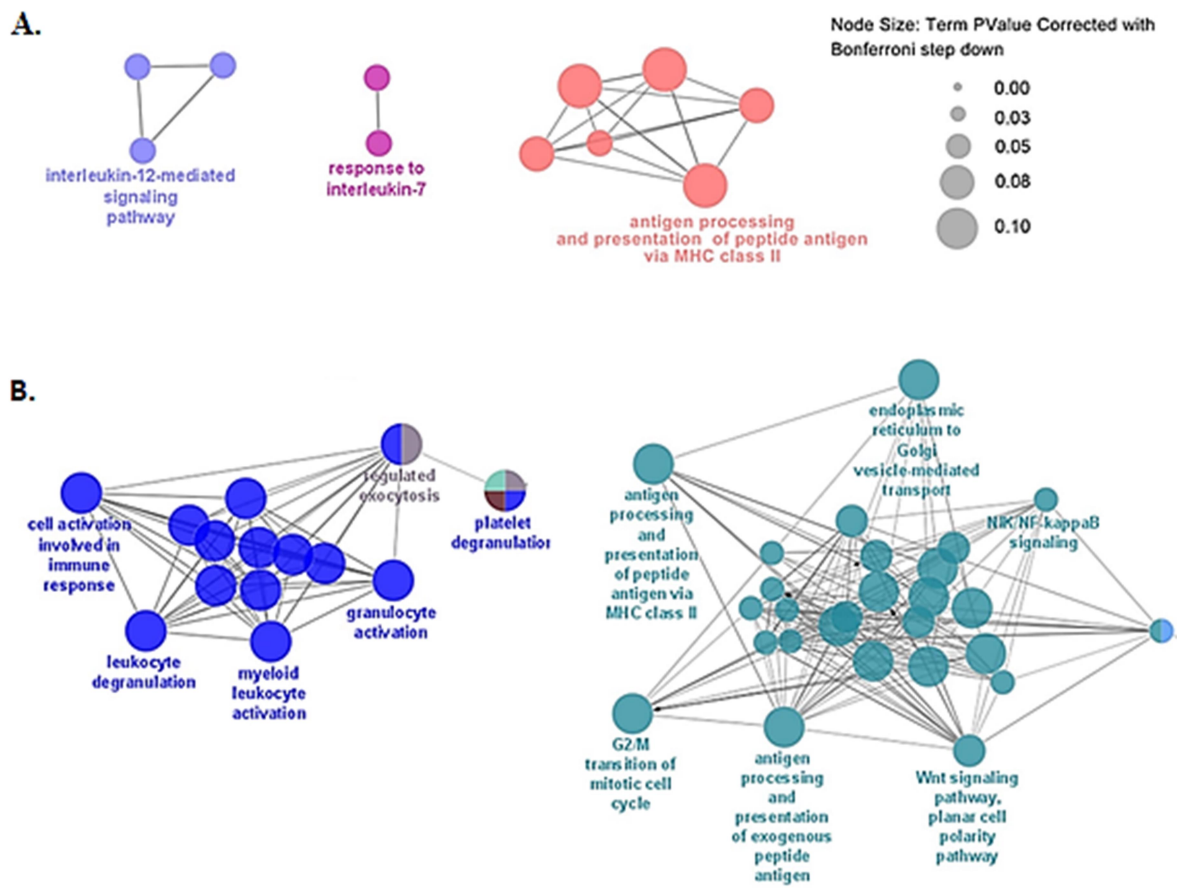
Dodatkowo, korzystając z programu Cytoscape i pakietu ClueGO przeprowadzono wizualizację sieci oddziaływań jakie tworzą białka, których poziom w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare był wyższy niż w pęcherzykach kontrolnych (Ryc. 4.40 i 4.41). Wśród białek, których poziom wzrastał w EVs wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki wyróżniono funkcjonalnie powiązane sieci białek zaangażowanych w regulację funkcji komórek odpornościowych (Ryc. 4.42). Za pomocą narzędzia g:Profiler wyróżniono białka przypisane do określonych kategorii procesów związanych z układem odpornościowym (Tabela S.1 w suplemencie pracy).



Ryc. 4.40 Analiza ClueGo szlaków białek zaangażowanych w procesy biologiczne (ClueGo Biological Processes), których poziom istotnie wzrastał w EVs wyizolowanych z komórek ulegających starzeniu przyspieszonemu (SIPS) względem kontroli.



Ryc. 4.41 Analiza ClueGo szlaków białek zaangażowanych w procesy biologiczne (ClueGo Biological Processes), których poziom istotnie wzrastał w EVs wyizolowanych z komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS) względem kontroli.



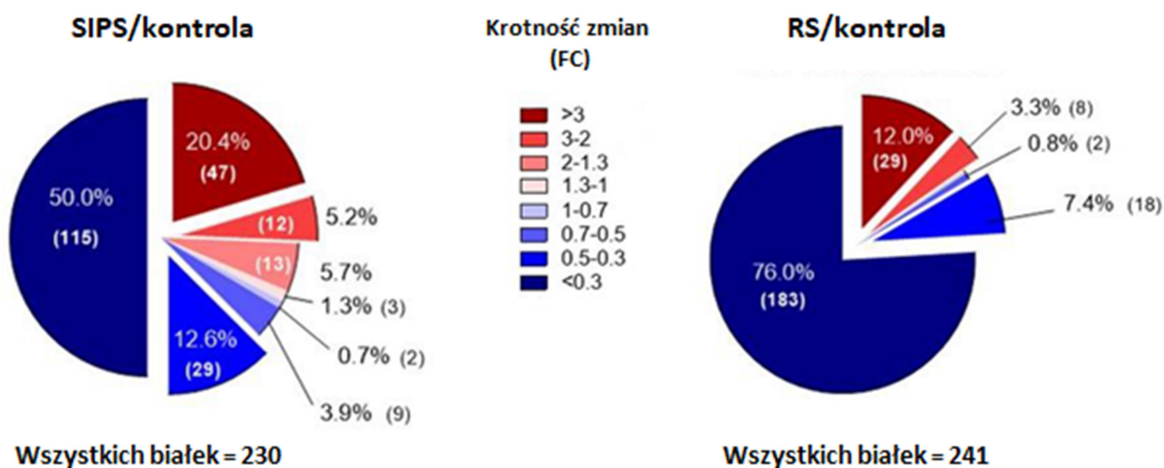
Ryc. 4.42 Analiza ClueGo wzbogaconych szlaków oraz sieci białek, których poziom istotnie wzrósł w pęcherzykach wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu replikacyjnemu (A.) oraz przyspieszonemu (B.), które zaangażowane są w regulację układu odpornościowego.

Podsumowując, przeprowadzona analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozwoliła na wykazanie i opisanie różnic w składzie proteomu pomiędzy pęcherzykami kontrolnymi oraz pęcherzykami wydzielanymi przez komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu oraz te wydzielane przez komórki podlegające starzeniu replikacyjnemu. Różnice te przekładały się na odmienne procesy na jakie potencjalnie mogą wpływać pęcherzyki.

4.3.2 Analiza proteomiczna czynników rozpuszczalnych wydzielanych przez młode i stare komórki VSMC

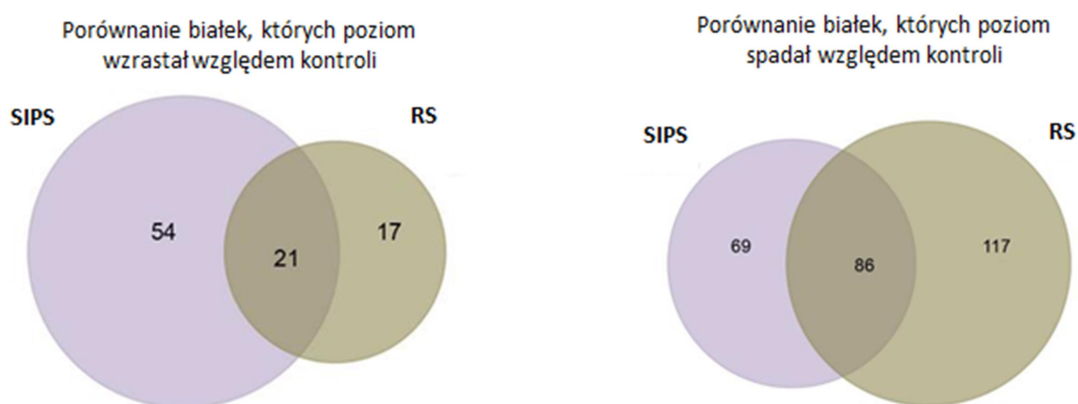
Oprócz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, analizie proteomicznej poddano także czynniki rozpuszczalne (sSASP) znajdujące się w pożywce zebranej z nad komórek młodych i ulegających starzeniu, która pozostała po odwirowaniu EVs. Pośród 876 zidentyfikowanych białek, wyodrębniono 230 białek których poziom istotnie ($p < 0,05$) zmieniał się w wariancie

SIPS oraz 241 białek, których poziom istotnie zmieniał się w wariancie RS. Co ciekawe, w porównaniu do analiz przeprowadzonych dla EVs, w przypadku czynników rozpuszczalnych poziom większości białek zmieniał się względem sSASP komórek kontrolnych w sposób znaczący (FC poniżej 0,5 lub powyżej 2) (Ryc. 4.43).



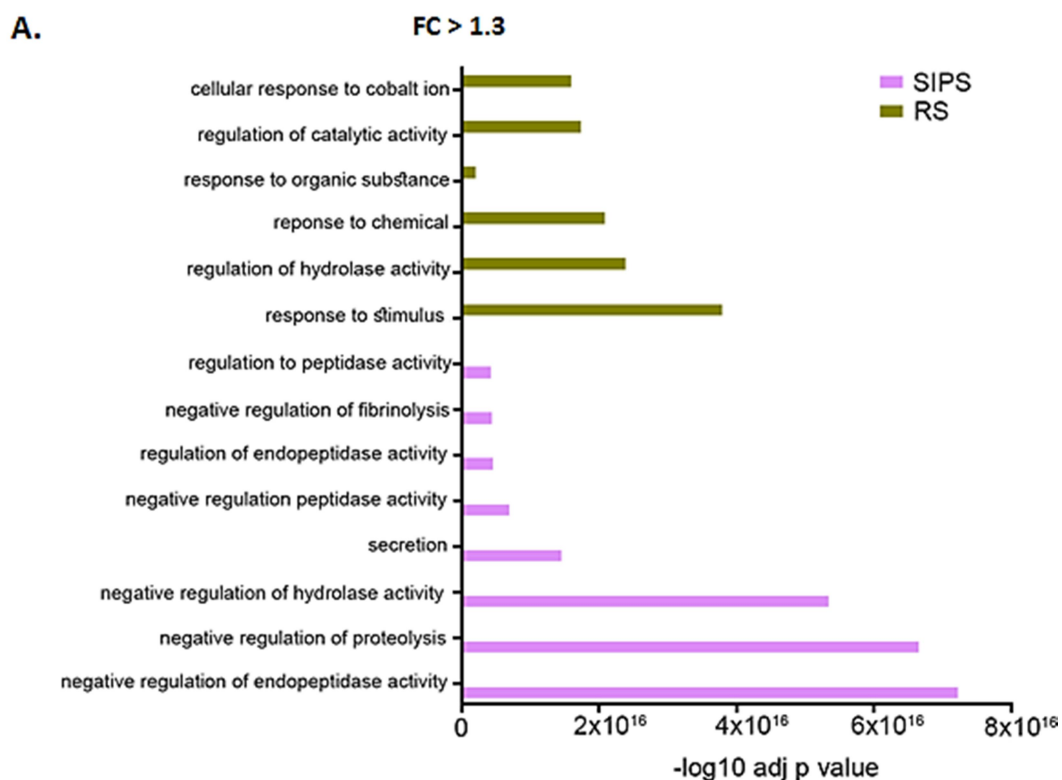
Ryc. 4.43 Wykresy kołowe przedstawiające rozkład krotności zmian (FC) poziomu białek zidentyfikowanych jako czynniki rozpuszczalne (sSASP) wydzielane przez ulegające starzeniu komórki VSMC względem komórek proliferujących (kontrolnych). Analizowano białka, których poziom zmieniał się istotnie ($p < 0,05$) względem kontroli.

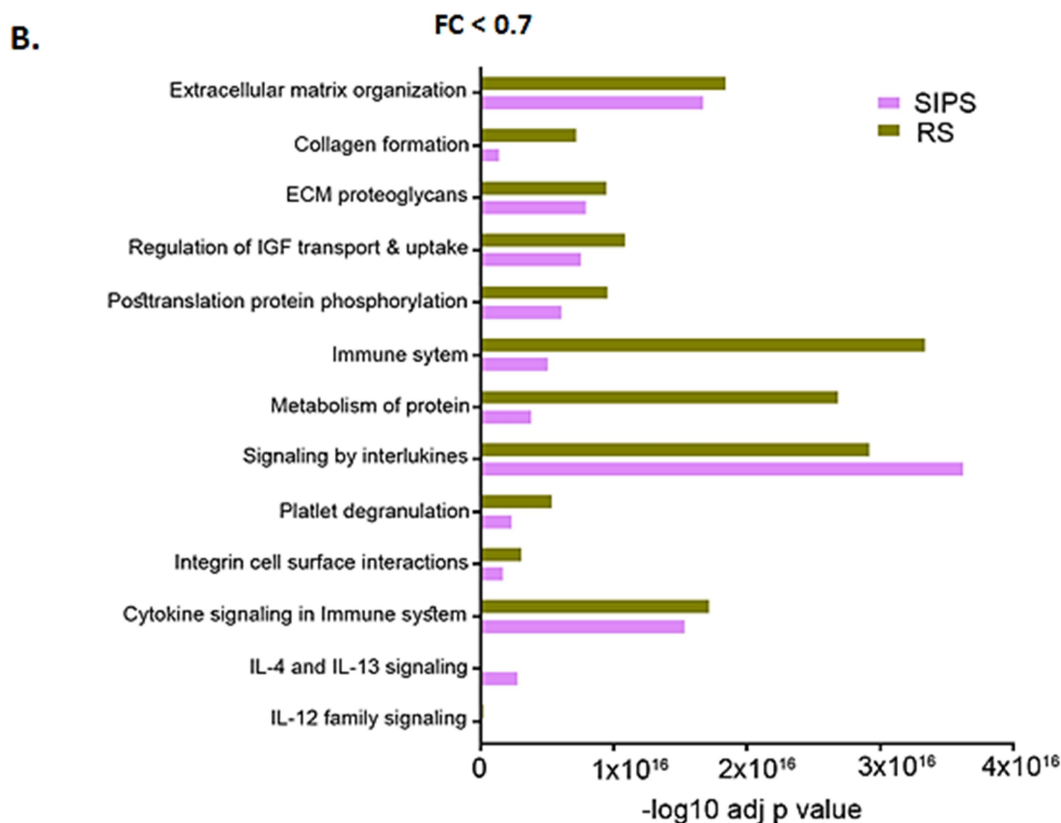
Pośród białek, których poziom istotnie wzrastał względem kontroli, 21 było wspólnych dla sSASP wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu. Poziom 54 białek istotnie wzrastał wyłącznie w wariancie SIPS, a 17 białek w wariancie RS. W przypadku białek, których poziom spadał względem kontroli, 86 były wspólne dla obu wariantów, 69 wyłącznie SIPS, a 117 wyłącznie RS (Ryc. 4.44).



Ryc. 4.44 Diagramy Venna przedstawiające rozkład białek unikalnych i wspólnych, których poziom rósł lub spadał istotnie statystycznie w sekretomie komórek starych (SIPS i RS) białek zidentyfikowanych w sekretomie (sSASP) komórek kontrolnych

Przy użyciu narzędzia g:Profiler i bazy Reactome Pathways przeprowadzono analogiczną analizę bioinformatyczną, jak w przypadku pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Podobnie jak dla EVs, zaobserwowano wyraźne różnice pomiędzy czynnikami wydzielanymi przez komórki stare, których poziom wzrastał ($FC > 1.3$) względem kontroli. Analiza wzbogacenia procesów biologicznych przeprowadzona na podstawie zidentyfikowanych białek, wykazała istnienie znaczących różnic pomiędzy SIPS i RS. Szlaki, które były najsilniej reprezentowane w sSASP-SIPS, były związane z negatywną regulacją aktywności wielu enzymów, takich jak: hydrolazy, peptydazy, endopeptydazy oraz szlak związany z sekrecją. W przypadku sSASP-RS były to szlaki związane z odpowiedzią na bodźce, substancje organiczne czy też chemiczne. A także szlaki związane z regulacją aktywności katalitycznej czy hydrolazy. Co ciekawe, podobnie jak w przypadku EVs, białka zidentyfikowane dla SIPS czy RS, których poziom spadał względem kontroli należały do tych samych szlaków, które związane były z organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, tworzeniem kolagenu oraz układem odpornościowym, sygnalizacją cytokin w układzie odpornościowym oraz degranulacją płytek krwi (Ryc. 4.45).



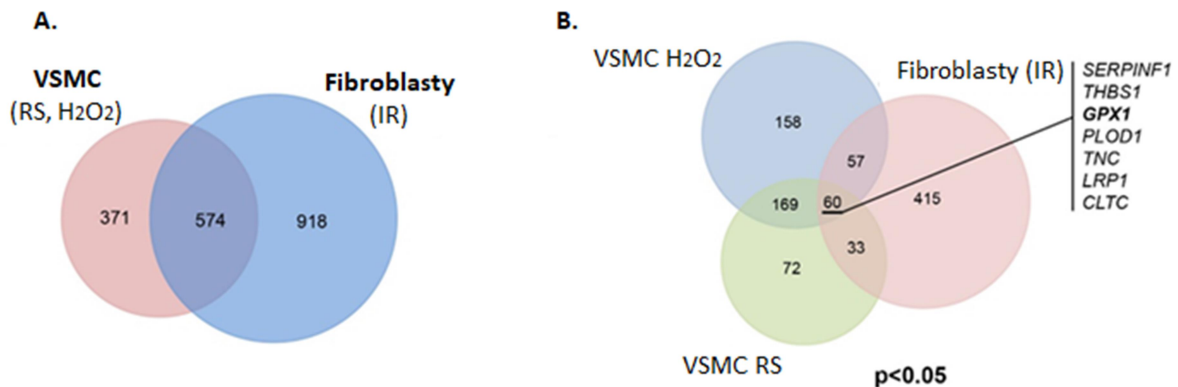


Ryc. 4.45 Analiza szlaków białek, za pomocą bazy Reactome Pathways, których poziom znacząco wzrósł (A.) lub zmalał (B.) wśród czynników rozpuszczalnych wyizolowanych z pożywki zebranej z komórek ulegających starzeniu (SIPS i RS) w porównaniu do kontroli.

4.3.3 Analiza porównawcza czynników wydzielanych przez różne typy komórek

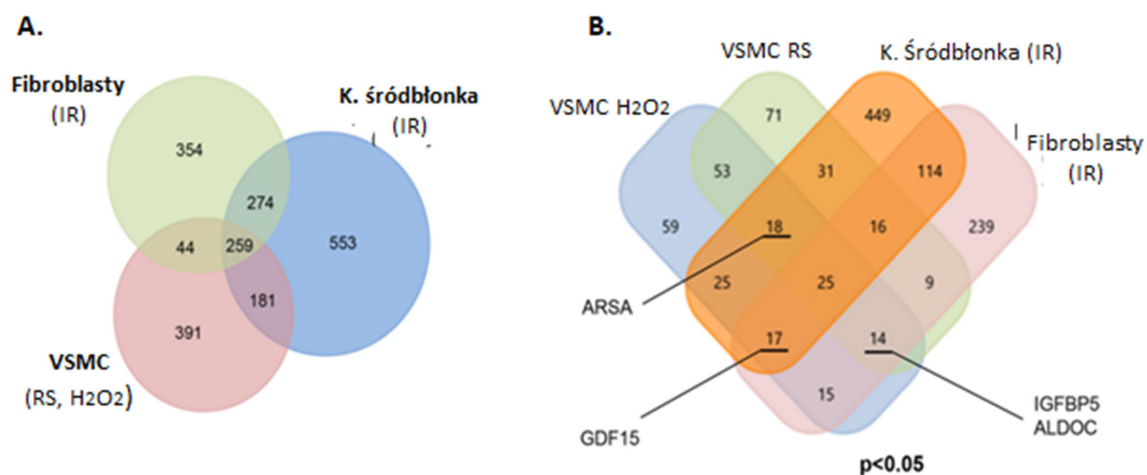
W 2020 roku opublikowana została praca Basisty i wsp. dotycząca m. in. analizy proteomicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu fibroblasty indukowane promieniowaniem X (IR) (Basisty i wsp. 2020). W oparciu o przeprowadzone analizy został stworzony tzw. atlas SASP. W związku z tym porównaliśmy zestaw białek zidentyfikowanych w pęcherzykach wydzielanych przez stare komórki VSMC z białkami zidentyfikowanymi przez Basisty i wsp. Co ważne, procedura izolacji EVs wykorzystana do tworzenia Atlasu SASP była podobna do tej zastosowanej przy izolacji pęcherzyków wydzielanych przez komórki mięśni gładkich aorty. Stwierdziliśmy, że około 60% białek obecnych w EV wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC było wspólnych z białkami obecnymi w EV wydzielanych przez ulegające starzeniu fibroblasty (Ryc. 4.46A.). Spośród białek, które zmieniały się w sposób istotny ($p < 0.05$), 150 było wspólnych dla pęcherzyków wydzielanych przez VSMC i fibroblasty. Co więcej, profile białkowe pęcherzyków wydzielanych przez VSMC ulegające starzeniu przyspieszonemu

i replikacyjnemu były do siebie bardziej podobne niż te pomiędzy VSMC i fibroblasty. Jedynie tylko 7 białek: serpina F (SERPINF1), trombospondyna 1 (THBS1), peroksydaza glutationowa 1 (GPX1), polimeraza DNA Delta 1 (POLD1), tenascyna C (TNC), białko związane z receptorem LDL 1 (LRP1) oraz klatryna (CLTC) występowały na podwyższonym poziomie w pęcherzykach wydzielanych przez komórki stare (VSMC i fibroblasty) w porównaniu do pęcherzyków kontrolnych (Ryc. 4.46B).



Ryc. 4.46 Porównanie proteomu pęcherzyków wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich aorty i fibroblasty. A. Analiza porównawcza wszystkich białek zidentyfikowanych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu (SIPS i RS) komórki VSMC oraz EVs wydzielanych przez fibroblasty indukowane do starzenia poprzez IR (Basisty i wsp. 2020). B. Analiza porównawcza białek zidentyfikowanych w EVs, których poziom istotnie zmienił się ($p < 0,05$) względem kontroli. Po prawej stronie wymienione zostały białka, których poziom wzrósł we wszystkich trzech wariantach.

Podobną analizę porównawczą przeprowadzono dla białek rozpuszczalnych (sSASP) wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu indukowanemu nadtlaniem wodoru i starzeniu replikacyjnemu oraz przez komórki nabłonkowe i fibroblasty indukowane do starzenia za pomocą IR. Na podstawie przeprowadzonej analizy zaobserwowano, że około jedna trzecia wszystkich zidentyfikowanych białek obecnych w sSASP VSMC była wspólna dla sSASP fibroblastów i komórek nabłonkowych, jednakże proteom komórek VSMC był znacznie bardziej podobny do proteomu komórek nabłonkowych (ryc. 4.47A). Co ciekawe, mniej niż 10% białek wspólnych dla wszystkich trzech typów komórek ulegających starzeniu zmieniło się znacząco względem kontroli i tylko kilka z nich występowało na podwyższonym poziomie w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.47B). Białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 5 (IGFB5) oraz aldolaza fruktozo-bisfosforanowa C (ALDOC) uległy wzrostowi w wariacie VSMC RS, VSMC SIPS (H₂O₂) oraz fibroblasty IR; czynnik wzrostu/różnicowania 15 (GDF15) ulegał zwiększonej ekspresji w wariantach VSMC SIPS, fibroblasty IR oraz komórki nabłonka, natomiast arylosulfataza A (ARSA) w wariantach VSMC RS, VSMC SIPS oraz komórki nabłonka.



Ryc. 4.47 Porównanie proteomu czynników rozpuszczalnych (sSASP) wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich aorty (VSMC), fibroblasty i komórki śródbłonna. A. Analiza porównawcza wszystkich zidentyfikowanych białek wydzielanych przez ulegające starzeniu (SIPS i RS) komórki VSMC oraz przez fibroblasty i komórki śródbłonna indukowane do starzenia poprzez IR (Basisty i wsp. 2020). B. Analiza porównawcza białek zidentyfikowanych jako czynniki rozpuszczalne, których poziom istotnie zmienił się ($p < 0,05$) względem kontroli. Wymienione zostały białka, których poziom wzrósł w poszczególnych wariantach.

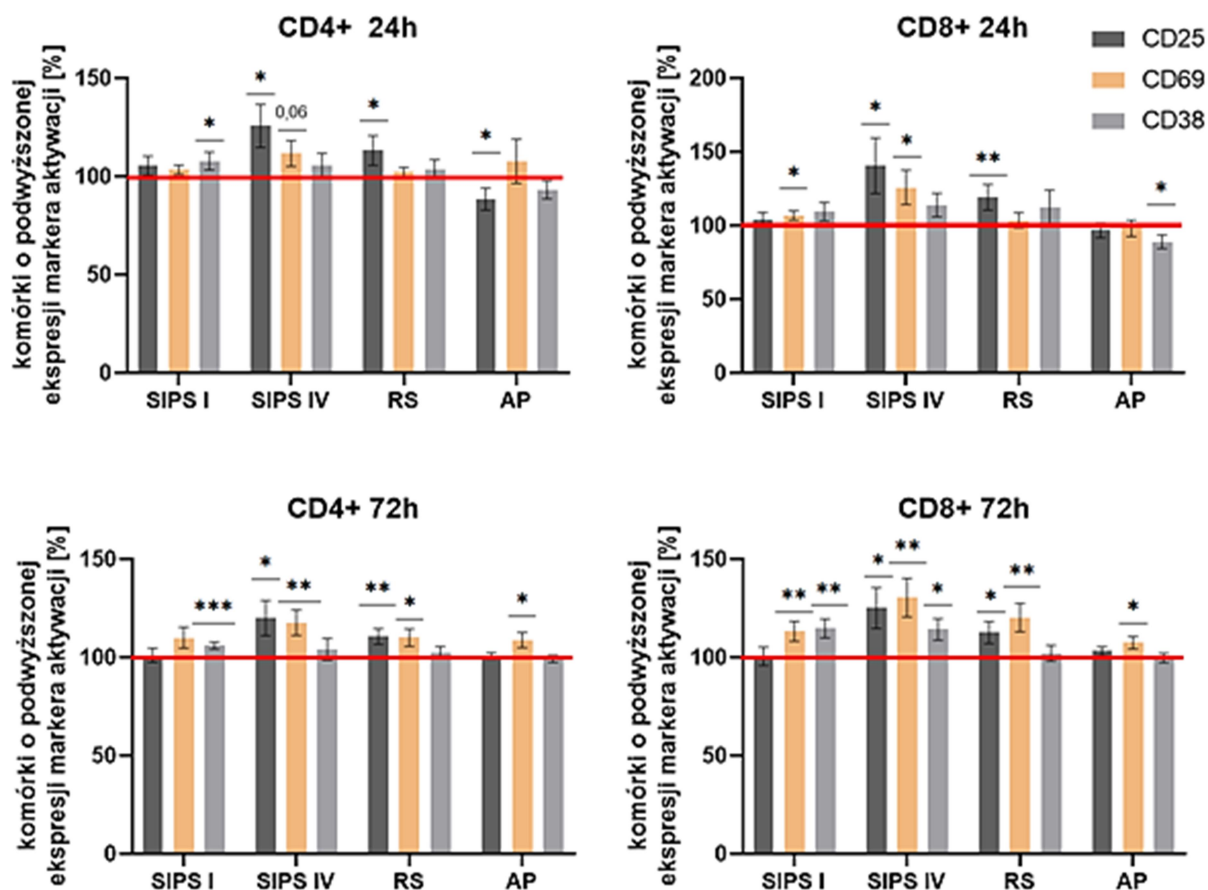
4.4 Badanie wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na aktywację i proliferację limfocytów T

Wydzielane przez stare komórki czynniki SASP mogą wpływać na sąsiadujące komórki i przez to modyfikować mikrośrodowisko tkanki, przyczyniając się między innymi do promowania stanu zapalnego. W powstaniu i rozwoju blaszki miażdżycowej istotną rolę odgrywają komórki układu odpornościowego. Fakt, że również ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich uczestniczą w tym procesie, skłonił nas do podjęcia badań nad rolą czynników SASP w modulowaniu wybranych funkcji limfocytów T.

W tym celu komórki VSMC były indukowane do starzenia nadtlaniem wodoru i hodowane 7 dni (SIPS I) bądź 4 tygodnie (SIPS IV). Do badań wykorzystano również hodowle komórek VSMC, które uległy starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz komórki wyizolowane z blaszek miażdżycowych (AP). Jako kontrolę wykorzystano komórki proliferujące, będące na wczesnych pasażach. Gęstość komórek w hodowli we wszystkich wariantach była zbliżona. Z tak przygotowanych hodowli komórek przygotowywano tzw. pożywkę kondycjonowaną, czyli pożywkę, w której hodowano komórki mięśni gładkich przez 24h. Następnie aktywowano limfocyty T wyizolowane z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego w pożywce kondycjonowanej zebranej z hodowli młodych i starych komórek VSMC. Jako kontrolę

uwzględniono również limfocyty T aktywowane w świeżej pożywce stosowanej do hodowli komórek VSMC (pożywka SmBM), która nie miała kontaktu z komórkami. Po 24 i 72 godzinach analizowano aktywację limfocytów T. Miarą aktywacji był poziom ekspresji białek CD25, CD69 oraz CD38. Analizowano odsetek komórek o podwyższonej ekspresji tych markerów. Wpływ czynników SASP oceniano porównując poziom aktywacji limfocytów hodowanych w pożywce kondycjonowanej znad komórek starych z poziomem aktywacji limfocytów T hodowanych w pożywce kondycjonowanej znad komórek proliferujących.

Już po 24 godzinach aktywacji zaobserwowano istotny wzrost liczby komórek CD4+CD25+ oraz CD8+CD25+ hodowanych w pożywce kondycjonowanej zebranej znad komórek ulegających starzeniu przyspieszonemu (SIPS IV) oraz replikacyjnemu (RS), w porównaniu do odsetka limfocytów CD4+CD25+ oraz CD8+CD25+ aktywowanych w pożywce znad kontrolnych komórek VSMC. Po 3 dobach zaobserwowano także istotny wzrost odsetka komórek CD4+CD69+ oraz CD8+CD69+. W przypadku limfocytów aktywowanych w pożywce zebranej znad komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych, po pierwszych 24 godzinach obserwowano spadek liczby komórek CD4+CD25+, CD8+CD38+ natomiast po 72 godzinach poziom ten wzrósł i był zbliżony do kontroli. Jedynie po 72 godzinach odnotowano istotny wzrost odsetka komórek CD4+CD69+ i CD8+CD69+ w limfocytach aktywowanych w pożywce zebranej znad komórek wyizolowanych z blaszek miażdżycowych (Ryc. 4.48).

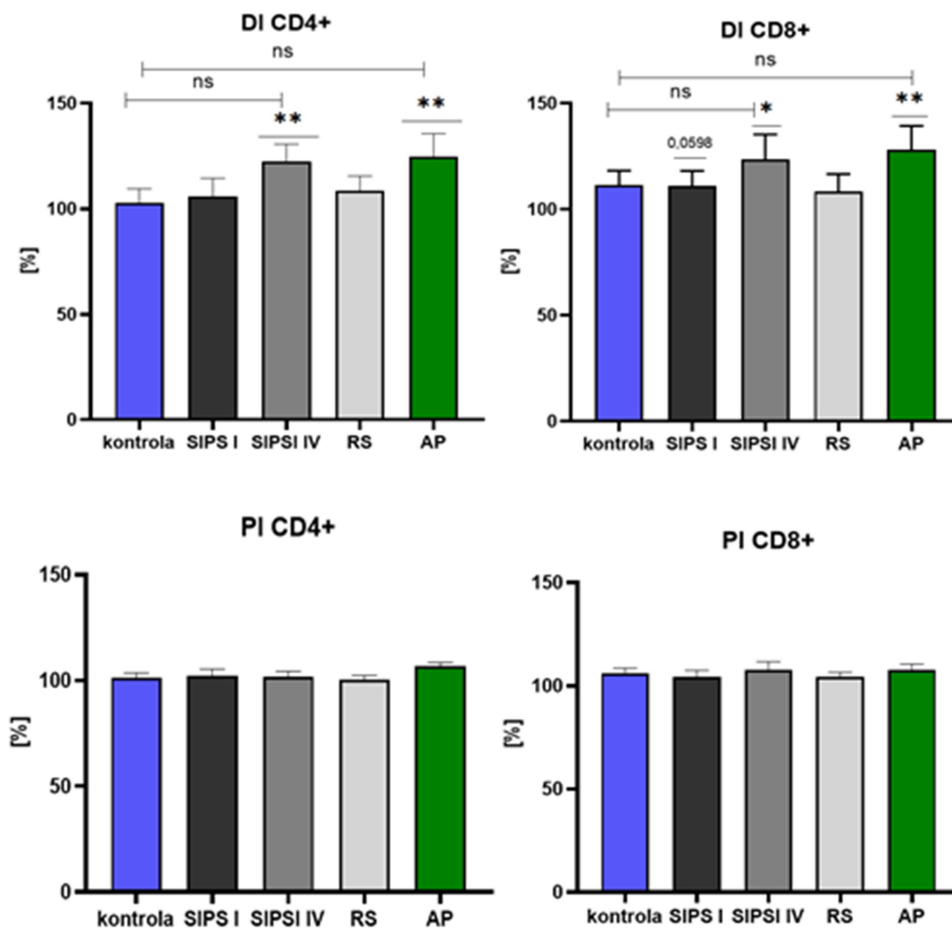


Ryc. 4.48 Analiza ekspresji CD25, CD69 i CD38 w populacjach CD4+ i CD8+ limfocytów T aktywowanych w obecności pożywki zebranej znad komórek kontrolnych i ulegających starzeniu *in vitro* (SIPS I, SIPS IV i RS) oraz *in vivo* (AP- komórki wyizolowane z blaszek miażdżycowych). Odsetek komórek z ekspresją danego markera mierzono po 24 i 72 godzinach od aktywacji i normalizowano do liczby aktywowanych limfocytów T hodowanych w pożywce znad komórek kontrolnych. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-studenta. Liczba powtórzeń dla SIPS I, SIPS IV i RS n = 16 różnych dawców, dla AP n = 20 różnych dawców.

W związku z zaobserwowanym pozytywnym wpływem czynników SASP na aktywację limfocytów T, analizie poddano również wpływ pożywek kondycjonowanych na proliferację tych komórek. Porównano wskaźnik podziałów (DI, *ang. division index*) oraz wskaźnik proliferacji (PI, *ang. proliferation index*). Wskaźnik podziału (DI) to średnia liczba wykonanych podziałów przez wszystkie komórki znajdujące się w hodowli, natomiast wskaźnik proliferacji (PI) określa średnią liczbę wykonanych podziałów wyłącznie przez komórki, które rozpoczęły proliferację.

W analizie uwzględniono dodatkową grupę kontrolną, którą stanowiły limfocyty T aktywowane w świeżej pożywce wykorzystywanej do hodowli komórek VSMC i do niej relatywizowano wszystkie wyniki. Zaobserwowano brak wpływu na wartość wskaźnika PI w każdym z badanych wariantów, co sugeruje brak wpływu czynników wydzielanych zarówno przez komórki stare jak i młode (proliferujące) na proliferację limfocytów T

w badanym układzie eksperymentalnym. Niemniej istotny wzrost wskaźnika DI w populacji limfocytów CD4+ i CD8+ hodowanych w obecności pożywki znad komórek SIPS IV oraz znad komórek wyizolowanych z blaszek, świadczy o pozytywnym wpływie na rozpoczęcie proliferacji limfocytów T czynników wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu przyspieszonemu i będące na późnym etapie starzenia oraz przez komórki ulegające starzeniu *in vivo*. Co ciekawe, czynniki wydzielane przez komórki proliferujące (kontrola), jak również komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu, będące na wczesnych etapach tego procesu (SIPS I) oraz ulegające starzeniu replikacyjnnemu, także stymulowały limfocyty T do rozpoczęcia proliferacji (wzrost powyżej 100% wskaźnika DI), przy czym wpływ ten nie był istotny statystycznie. Nie zaobserwowano istotnie statystycznie różnic pomiędzy czynnikami wydzielanymi przez komórki proliferujące (kontrola) i komórki stare (SIPS I, SIPS IV, RS) (Ryc. 4.49).

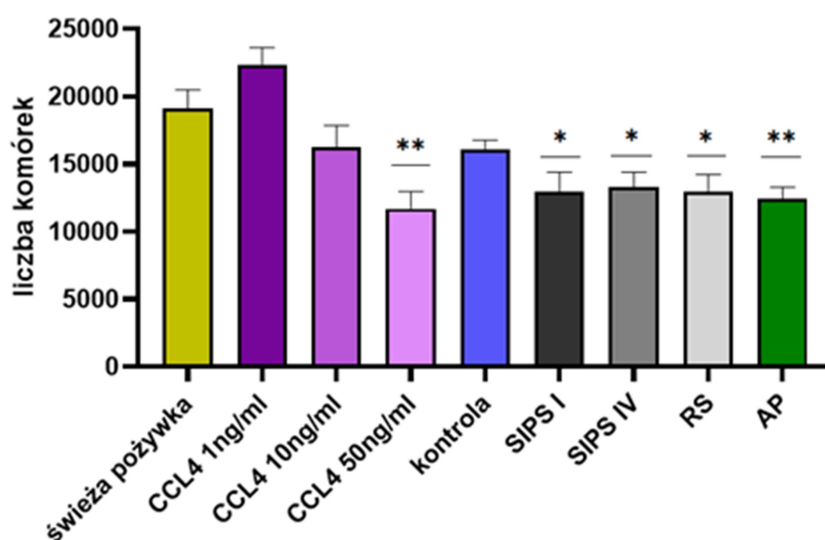


Ryc. 4.49 Analiza wskaźnika podziałów (DI) oraz proliferacji (PI) populacji limfocytów T CD4+ i CD8+ po 96h hodowli w pożywkach zebranych znad komórek mięśni gładkich naczyń. Wartości wskaźników dla poszczególnych wariantów relatywizowano do wartości tych parametrów mierzonych dla limfocytów T proliferujących w świeżej pożywce (pożywka, która nie miała kontaktu z komórkami VSMC). Liczba powtórzeń

dla SIPS I, SIPS IV i RS: n = 15; dla AP n = 18. Istotność statystyczną sprawdzono testem t-studenta względem świeżej pożywki oraz względem kontroli.

4.4.1 Ocena wpływu czynników wydzielanych przez komórki stare na migrację limfocytów T

Oprócz analizy wpływu na proliferację limfocytów T czynników wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu zbadano także wpływ na ich migrację. W tym celu wyizolowane i zaktywowane limfocyty T (24 godziny po aktywacji) hodowano w pożywce kondycjonowanej zebranej z komórek VSMC w specjalnych szalkach typu trans-well. Po 4 godzinach zbierano i liczono komórki, które pod wpływem obecnych w dolnej komorze czynników pochodzących z pożywki hodowli komórek VSMC nie wyemigrowały z komory górnej do dolnej. Jako kontrolę pozytywną w doświadczeniu zastosowano chemokinę CCL4 dodaną do czystej pożywki w trzech różnych stężeniach, której pozytywny wpływ na migrację limfocytów T był opisywany w literaturze (Berencsi i wsp. 2011, Hua i Tian 2017). Na podstawie przeprowadzonych pomiarów można wnioskować, że czynniki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu przyspieszonemu będące na wczesnym (SIPS I) oraz późnym etapie (SIPS IV), starzeniu replikacyjnym oraz komórki izolowane z blaszek miażdżycowych promują migrację limfocytów T, przy czym ten pozytywny wpływ nie różni się istotnie od wpływu czynników wydzielanych przez proliferujące komórki VSMC (Ryc. 4.50).

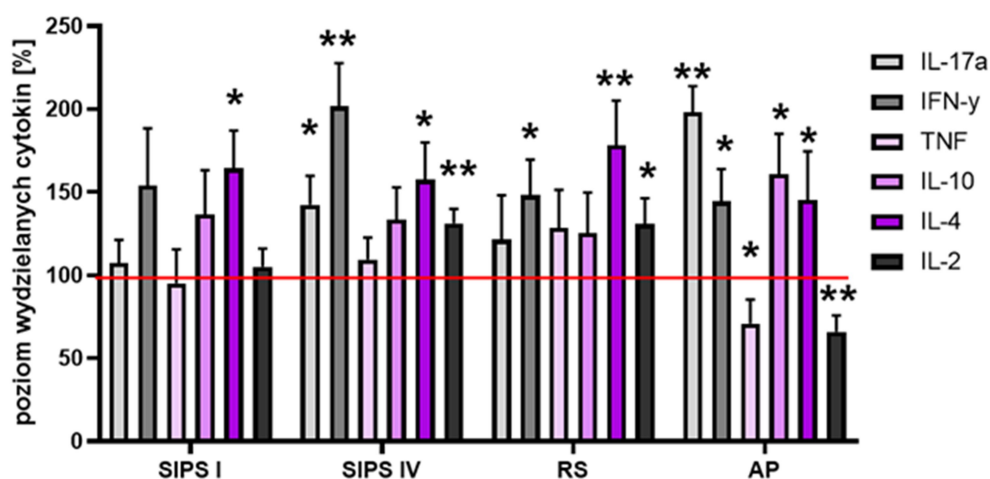


Ryc. 4.50 Analiza migracji limfocytów T pod wpływem czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC. Wykresy przedstawiają liczbę limfocytów T jaka pozostała w górnej szalce (komórki, które nie migrowały) po 4 godzinach inkubacji z pożywką zebraną z komórek VSMC. Istotność statystyczną sprawdzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Liczba powtórzeń n=9. (*) oznacza istotności względem świeżej pożywki.

4.4.2 Analiza cytokin wydzielanych przez limfocyty T pod wpływem komórek starych

W celu dalszej oceny wpływu czynników wydzielanych przez stare komórki VSMC na limfocyty T, przeprowadzono analizę poziomu wydzielanych cytokin przez limfocyty T. Zaktywowane limfocyty T hodowano w obecności pożywki kondycjonowanej zebranej z komórek kontrolnych oraz ulegających starzeniu w modelu *in vitro* oraz *in vivo*. Po 72 godzinach zebrano pożywkę z hodowli limfocytów T, a ilość wydzielanych cytokin zmierzono za pomocą testu CBA (*Cytokine Based Array*).

Stwierdzono, że czynniki wydzielane przez stare komórki VSMC (SIPS I, SIPS IV, RS, AP) istotnie statystycznie podnoszą poziom IL-4 wydzielanej przez limfocyty T. Hodowla limfocytów T w pożywce zebranej z komórek ulegających starzeniu przyspieszonemu i będących na późnych etapach tego procesu (SIPS IV) oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS) prowadziła do wzrostu poziomu wydzielania przez limfocyty T niemal wszystkich cytokin, a istotne zmiany odnotowano dla IFN γ , IL-4, IL-2 oraz IL-17a (tylko w SIPS IV). Co więcej, czynniki wydzielane przez komórki izolowane z blaszek miażdżycowych przyczyniały się do istotnie statystycznie zwiększonej sekrecji IL-17a, IFN γ , IL-10 oraz IL-4 przez limfocyty T oraz również istotnie obniżały poziom wydzielania IL-2 oraz TNF (Ryc. 4.51).



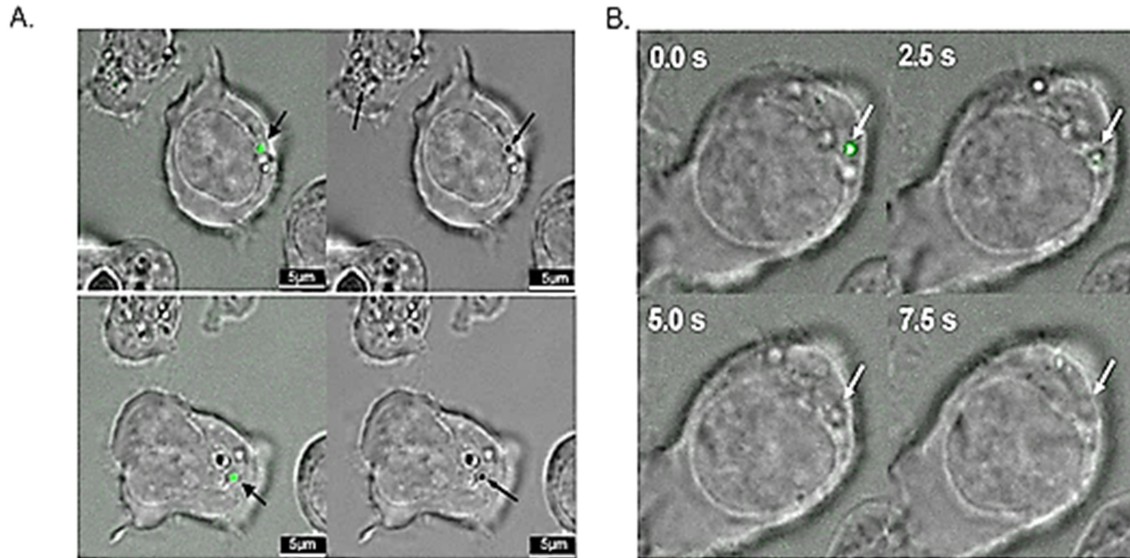
Ryc. 4.51 Analiza ilości IL-17a, IFN γ , TNF, IL-10, IL-4 oraz IL-2 wydzielanych przez limfocyty T aktywowane w obecności pożywki kondycjonowanej zebranej z komórek ulegających starzeniu. Ilość każdej cytokiny relatywizowano do ilości tej cytokiny wydzielanej przez limfocyty T hodowane w obecności pożywki zebranej z komórek kontrolnych VSMC. Istotność statystyczną sprawdzono testem t-studenta. Wykres przedstawia średnią wartość \pm SEM, liczba powtórzeń $n \geq 14$.

4.4.3 Badanie wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na aktywację limfocytów T

Wyniki analizy wpływu pożywek pochodzących z hodowli komórek VSMC na aktywację i proliferację limfocytów T oraz na sekrecję cytokin produkowanych przez limfocyty T pozwoliły na stwierdzenie istotnego wpływu czynników SASP na badane procesy. Dlatego też, w kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić, która ze składowych fenotypu sekrecyjnego komórek starych – białka rozpuszczalne czy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe - mogą być odpowiedzialne za obserwowany efekt.

Ponadto, na podstawie przeprowadzonej analizy proteomicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zidentyfikowano białka zaangażowane w regulację funkcji komórek odpornościowych, a poziom tych białek istotnie wzrastał w pęcherzykach wyizolowanych z komórek starych (senEVs). Stanowiło to dodatkową wskazówkę sugerującą, że pęcherzyki mogą wpływać na funkcjonowanie limfocytów T.

W celu sprawdzenia, czy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki VSMC mogą aktywnie wpływać na limfocyty T, podjęto próbę zwizualizowania oddziaływania pomiędzy pęcherzykami, a limfocytami T. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wybarwiono CFSE, a następnie podano do hodowli aktywowanych limfocytów T. Taką ko-hodowlę prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 37°C, a następnie przy pomocy mikroskopu konfokalnego wykonano obrazowanie w czasie rzeczywistym. Zdjęcia zamieszczone na ryc. 4.52A przedstawiają na powierzchni limfocytów T pęcherzyki wybarwione CFSE (zielone punkty zaznaczone strzałką). Zaobserwowana zmieniona struktura błony cytoplazmatycznej w miejscu kontaktu komórki z pęcherzykiem, świadczy o bezpośredniej interakcji między nimi (czarne strzałki zaznaczone na ryc. 4.52A). Zdjęcia zamieszczone na ryc. 4.52B przedstawiają zależną od czasu internalizację pęcherzyka zewnątrzkomórkowego do limfocytu T.

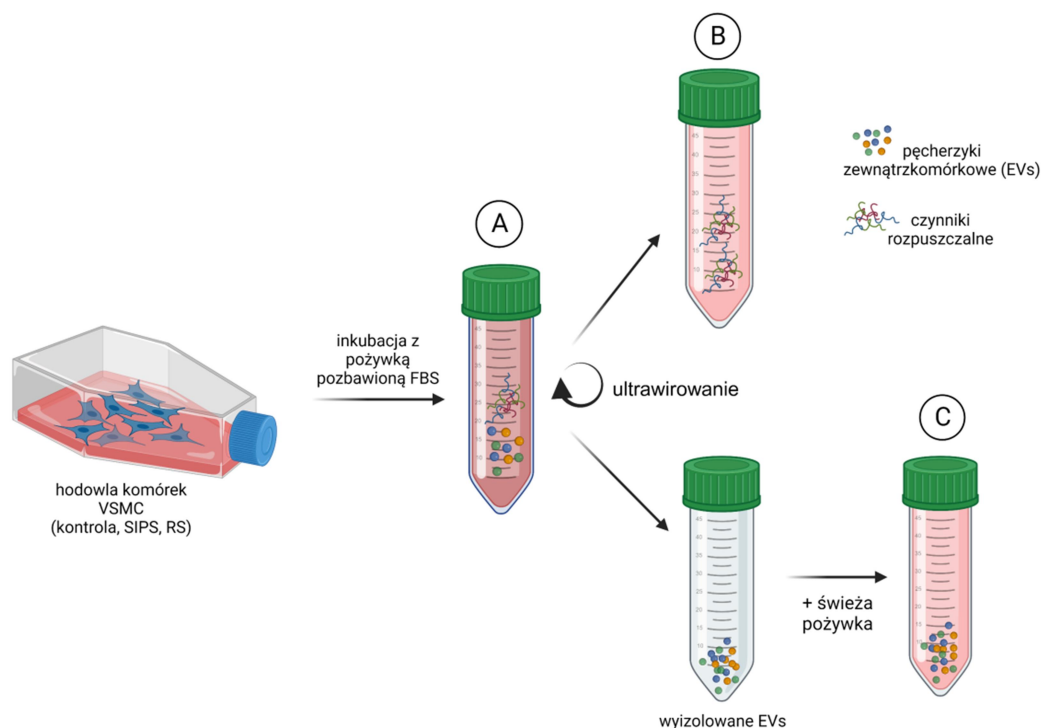


Ryc. 4.52 A. Wizualizacja pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez limfocyty T. Limfocyty T hodowano w obecności pęcherzyków wybarwionych CFSE przez 4 godziny w 37°C i analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego w świetle przechodzącym oraz fluorescencji. B. Analiza w czasie wnikania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych do limfocytów T.

W celu analizy wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na aktywację limfocytów T, wyizolowane z kożuszka leukocytno-płytkowego komórki aktywowano i hodowano w:

- A. pożywce kondycjonowanej – pożywka uzyskana po 24-godzinnej hodowli komórek VSMC kontrolnych (kontrola), replikacyjne starych (RS) oraz indukowanych do starzenia H_2O_2 i hodowanych 7 dni (SIPS I) lub 4 tygodnie (SIPS IV);
- B. pożywce pozbawionej EVs – pożywka uzyskana po 24-godzinnej hodowli komórek VSMC zawierająca wyłącznie czynniki rozpuszczalne a pozbawiona, po ultrawirowaniu, pęcherzyków zewnątrzkomórkowych;
- C. świeżej pożywce, którą wzbogacono o pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wyizolowane z pożywki kondycjonowanej znad komórek kontrolnych i ulegających starzeniu;
- D. świeżej pożywce, która nie miała kontaktu z komórkami (VSMC).

Schemat przedstawiony na Ryc. 4.53 ilustruje uzyskiwanie pożywek wykorzystywanych do doświadczeń.



Ryc. 4.53 Schemat doświadczenia badania wpływu czynników wydzielanych przez komórki VSMC na funkcje limfocytów T. Jako A oznaczono pożywkę kondycjonowaną (pozbawioną surowicy) zebraną po 24 godzinach hodowli, B – pożywka pozbawiona EVs, która pozostała po odwirowaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, C – wyizolowane EVs zawieszony w świeżej pożywce dedykowanej do hodowli VSMC.

Ze względu na wymaganą dużą liczbę komórek w celu przeprowadzenia izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, nie możliwe było uzyskanie EVs z komórek pochodzących z blaszek miażdżycowych i zbadanie ich wpływu na limfocyty T.

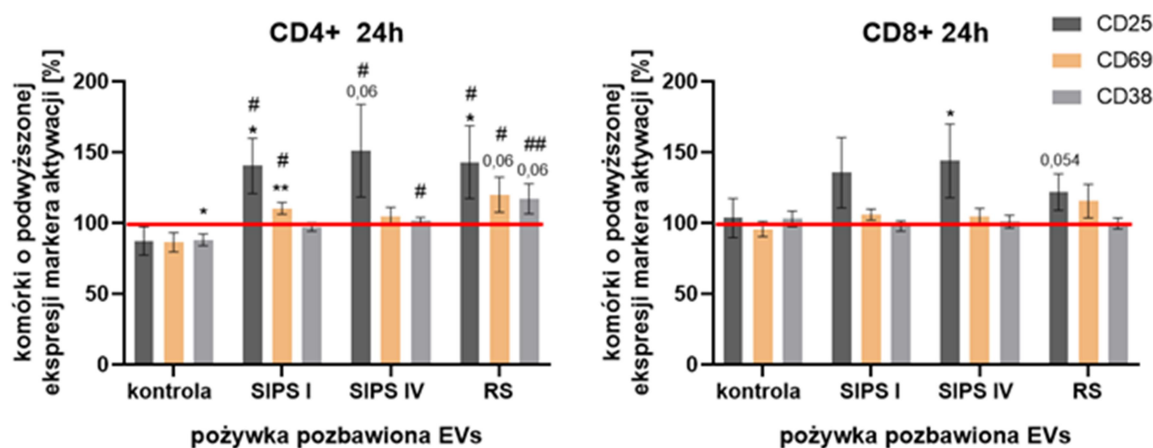
Analizę ekspresji markerów aktywacji przeprowadzono po 24 godzinach hodowli. Wpływ czynników rozpuszczalnych na poziom ekspresji markerów aktywacji oceniano porównując odsetek komórek CD25⁺, CD69⁺ i CD38⁺ aktywowanych w pożywce kondycjonowanej pozbawionej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (B) z odsetkiem komórek CD25⁺, CD69⁺ i CD38⁺ aktywowanych w pożywce kondycjonowanej (A). Analogicznie, wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na poziom ekspresji markerów aktywacji oceniano porównując odsetek komórek CD25⁺, CD69⁺ i CD38⁺ aktywowanych w pożywce świeżej wzbogaconej o pęcherzyki (C) z odsetkiem komórek CD25⁺, CD69⁺ i CD38⁺ aktywowanych w świeżej pożywce (D). Zaobserwowano, że aktywacja limfocytów T w pożywce pozbawionej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zebranej z komórek ulegających starzeniu prowadziła do zwiększonej ekspresji CD25 w komórkach CD4⁺

i CD8+ oraz CD69 w komórkach CD4+ (w SIPS I i RS). Co ciekawe, pożywka pozbawiona EVs pochodząca z komórek kontrolnych nieznacznie zmniejszała liczbę limfocytów z markerami aktywacji. Co więcej odnotowano także istotne różnice we wpływie na aktywację limfocytów T pomiędzy czynnikami rozpuszczalnymi wydzielanymi przez komórki ulegające starzeniu, a przez komórki kontrolne (Ryc. 4.54A).

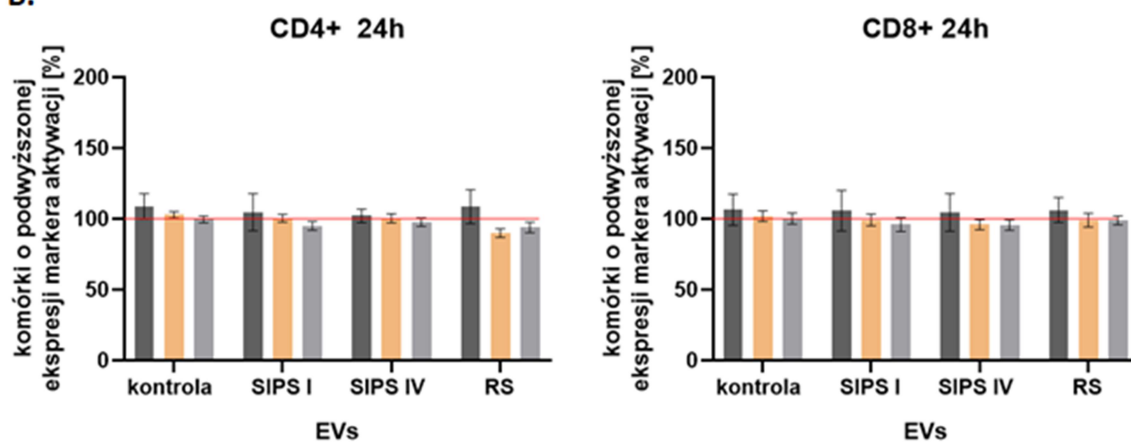
Wzbogacenie czystej pożywki w pęcherzyki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu (SIPS IV) powodowało niewielki spadek liczby komórek CD4+CD69+ i CD4+CD38+ oraz CD8+CD69+ i CD8+CD38+. Nie zaobserwowano także istotnego wpływu pęcherzyków wydzielanych przez komórki kontrolne oraz SIPS I (Ryc. 4.54B).

Uzyskane wyniki wskazują, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki stare mają hamujący wpływ na aktywację limfocytów, podczas gdy czynniki rozpuszczalne promują aktywację.

A.



B.

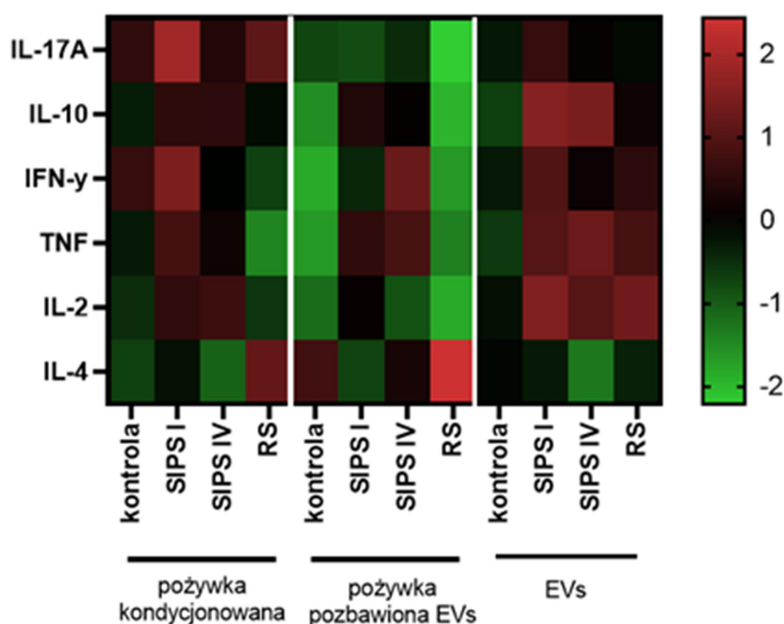


Ryc. 4.54 Analiza ekspresji CD25, CD69 i CD38 w populacjach CD4+ i CD8+ limfocytów T aktywowanych w obecności pożywki pozbawionej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (A) lub pożywki czystej wzbogaconej o EVs wydzielanych przez komórki kontrolne i ulegające starzeniu (B). Procent komórek o podwyższonej ekspresji danego markera mierzono po 24 od aktywacji i normalizowano do liczby limfocytów T CD25+ lub CD69+ lub CD38+ hodowanych w pożywce kondycjonowanej (A.) bądź pożywce, która nie miała kontaktu z komórkami, tzw. świeżej (B.). Limfocyty T wyizolowane od co najmniej 9 dawców. Wykres pokazuje średnią wartość \pm SEM, Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-studenta. Istotność statystyczna oznaczona (*) odnosi się do porównania wpływu pożywki pozbawionej EVsów do pożywki kondycjonowanej, oraz wartości liczbowe odnoszą się względem pożywki kondycjonowanej; istotność statystyczna oznaczona (#) odnosi się do porównania wpływu pożywki znad komórek starych do pożywki znad komórek kontrolnych.

4.4.4 Badanie wpływu EVs na wydzielanie cytokin przez limfocyty T

W celu analizy wpływu EVs na wydzielanie przez limfocyty T cytokin, zaktywowane komórki hodowano w obecności pożywki kondycjonowanej, pożywki pozbawionej EVs oraz świeżej pożywki wzbogaconej w pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zebrane znad komórek kontrolnych oraz ulegających starzeniu VSMC. Po 72 godzinach zebrano pożywkę z hodowli

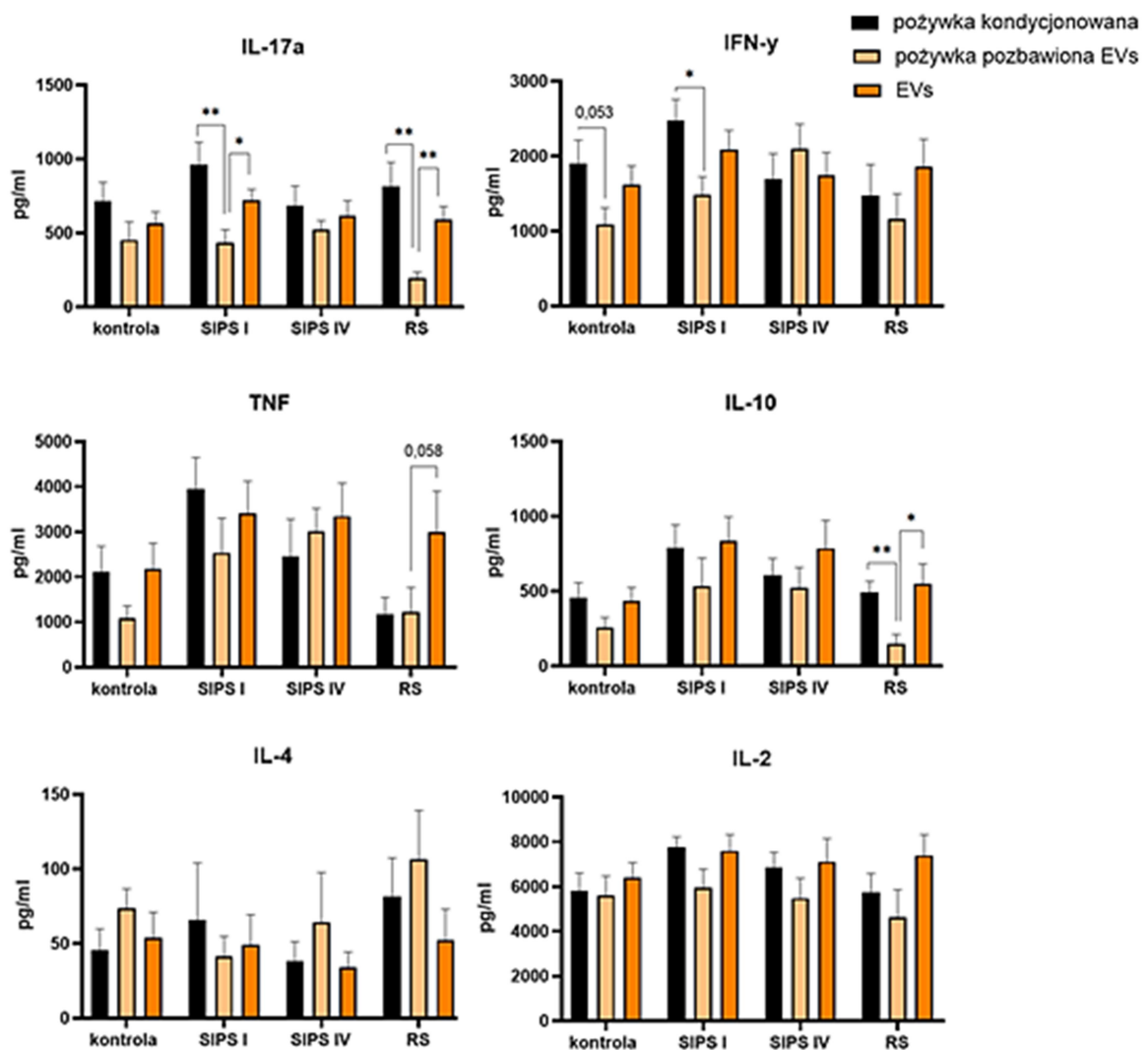
limfocytów T, a poziom wydzielanych cytokin zmierzono za pomocą testu CBA. Przeprowadzona analiza wykazała, że usunięcie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z pożywki kondycjonowanej zmniejszyło poziom wydzielania większości testowanych cytokin (IL-17a, IL-10, IFN γ , TNF α , IL-2), podczas gdy hodowla limfocytów T w czystej pożywce wzbogaconej o EVs powodowała wzrost wydzielania cytokin (Ryc. 4.55). Co ciekawe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki stare (zarówno SIPS I, SIPS IV oraz RS) miały wyraźnie większy wpływ na wzrost produkcji cytokin niż pęcherzyki z komórek kontrolnych.



Ryc. 4.55 Mapa ciepła przedstawiająca zależności pomiędzy poziomami poszczególnych cytokin wydzielanych przez limfocyty T hodowanych w pożywce kondycjonowanej, pożywce pozbawionej EVs oraz czystej pożywce wzbogaconej o EVs zebranych znad komórek VSMC kontrolnych oraz ulegających starzeniu SIPS I, SIPS IV oraz RS. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z poszczególnych danych.

Przeprowadzona dalsza analiza dla poszczególnych cytokin wykazała, że zmiany obserwowane w poziomie cytokin wydzielanych przez limfocyty T hodowane w pożywce pozbawionej pęcherzyków oraz w pożywce wzbogaconej o nie w wariacie SIPS I i RS były istotne statystycznie dla IL-17a (Ryc. 4.56). Hodowla limfocytów T w pożywce pozbawionej EVs zebranej znad ulegających starzeniu VSMC powodowała spadek ilości wydzielanej IL-17a o ponad połowę (56%) w przypadku SIPS I oraz 75% dla RS w porównaniu z pożywką kondycjonowaną (zawierającą zarówno czynniki rozpuszczalne jak i EVs). Z kolei wzbogacenie czystej pożywki o pęcherzyki wydzielane przez komórki ulegające starzeniu powodowała istotne statystycznie zwiększenie wydzielania IL-17. W przypadku EVs pochodzących z pożywki SIPS I, IL-17a wzrosła do 75%, a w przypadku EVs z pożywki RS

do 72% względem IL-17a wydzielanej przez limfocyty T hodowane w pożywce kondycjonowanej (odpowiednio SIPS I i RS). Istotne zmiany odnotowano również analizując poziom IL-10, gdy limfocyty T hodowano w pożywce pozbawionej pęcherzyków lub pożywce zawierającej pęcherzyki wydzielanych przez komórki RS. Wykazano również istotny spadek wydzielanego IFN γ gdy limfocyty T hodowano w pożywce pozbawionej pęcherzyków wydzielanych przez komórki SIPS I. W przypadku pozostały badanych cytokin (TNF α , IL-4, IL-2) nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomie produkowanych przez limfocyty cytokin w zależności od warunków hodowli.



Ryc. 4.56 Analiza ilości cytokin wydzielanych przez limfocyty T w różnych warunkach hodowli. Wykresy przedstawiają wartości uśrednione \pm SEM dla pomiarów przeprowadzonych w oparciu o limfocyty T wyizolowane od co najmniej 8 różnych dawców. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA.

5. Dyskusja

5.1 Uniwersalne markery starzenia komórkowego

Biogerontologia (coraz częściej nazywana geronauką), czyli nauka zajmująca się poznawaniem biologicznych podstaw starzenia, jest dziedziną nauki, która rozwija się niezwykle dynamicznie, a jej odkrycia niosą za sobą nadzieje na skuteczne leczenie chorób związanych z wiekiem oraz wydłużenie ludzkiego życia. U podstaw starzenia organizmu leży starzenie komórkowe, proces, który po raz pierwszy został zaobserwowany w warunkach hodowli komórek *in vitro* i opisany w 1961 roku przez Leonarda Hayflicka (Hayflick i Moorhead 1961). Dalsze badania nad tym zjawiskiem wskazywały, że może ono także brać udział w starzeniu całego organizmu (Campisi 2001, Wiley i Campisi 2021). Obecnie udowodniono, że komórki stare występują w tkankach starzejącego się organizmu (Sedelnikova i wsp. 2004, Baker i wsp. 2016), co więcej identyfikuje się je także w zmienionych patologicznie narządach, gdzie ich obecność przyczynia się do rozwoju różnych chorób związanych z wiekiem (Childs i wsp. 2015, Ogródnik i wsp. 2019). Postęp wiedzy i technologii dał naukowcom możliwość eliminowania komórek starych z organizmu zwierząt doświadczalnych, zwiększając tym samym ich długość życia i eliminując bądź opóźniając rozwój chorób związanych z wiekiem (Sikora i wsp. 2019). Niemniej pomimo postępu w zrozumieniu roli starzenia komórkowego w starzeniu się organizmu, wciąż trudno o jednoznaczną definicję i opis fenotypu starzenia komórkowego (Sikora i wsp. 2021). Napływ nowych danych na przestrzeni ostatniego dziesięciolecia, zaowocował stworzeniem zestawu cech określanych mianem markerów starzenia (van Deursen 2014, Gorgoulis i wsp. 2019). Naukowcy zgadzają się, że żaden z markerów nie jest unikalny, specyficzny i wystarczający do identyfikacji komórek starych, zwłaszcza że proces ten wydaje się być bardzo dynamiczny, a właściwości komórek starych zmieniają się w czasie i mogą zależeć chociażby od rodzaju tkanki, z której pochodzą (Gorgoulis i wsp. 2019, Lee i wsp. 2019, von Zglinicki i wsp. 2021). Obecnie trwają badania kliniczne związków zwanych senolitykami, które selektywnie zabijają komórki stare, co może spowalniać rozwój chorób związanych ze starzeniem lub nawet przyczyniać się do ich leczenia (Kirkland i Tchkonja 2020). W procesie oceny skuteczności zastosowanej terapii senolitykami niezwykle ważne staje się poprawne zidentyfikowanie komórek starych, których zanik świadczyłby o efektywności terapii. Stąd też znalezienie najbardziej powszechnie występującej cechy lub cech, które można by przypisać komórkom starym bez względu na ich pochodzenie i bodziec indukujący proces starzenia czy też mechanizm cały czas pozostaje kluczowe.

Dotychczas większość badań dotyczących charakterystyki procesu starzenia komórkowego oraz określenia specyficznych znaczników komórek starych została przeprowadzona na fibroblastach. To właśnie na tym modelu komórkowym Hayflick po raz pierwszy zaobserwował zjawisko utraty potencjału replikacyjnego komórek prawidłowych (Hayflick i Moorhead 1961). Co więcej, podwyższoną aktywność SA- β -gal (Dimri i wsp. 1995), fenotyp wydzielniczy (Rodier i wsp. 2009) czy obecność DNA-SCARS w komórkach ulegających starzeniu (Rodier i Campisi 2011) także wykazano w doświadczeniach przeprowadzonych na fibroblastach. Zdecydowanie mniej badań dotyczy charakterystyki starzenia komórek prawidłowych innych niż fibroblasty.

W niniejszej pracy postanowiłam wykorzystać trzy różne typy komórek prawidłowych i dokonać charakterystyki porównawczej indukowanego stresem przyspieszonego procesu starzenia w oparciu o wybrane, najczęściej stosowane markery. Do analizy wykorzystałam ludzkie komórki mięśni gładkich aorty, preadipocyty oraz fibroblasty. Wiadomo, że starzenie komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych przyczynia się do rozwoju miażdżycy, która jest jedną z najczęstszych chorób układu sercowo-naczyniowego występującą u osób w podeszłym wieku. Wraz z wiekiem dochodzi w organizmie także do zaburzeń metabolicznych, a otyłość, która jest efektem tych zaburzeń, przyczynia się do rozwoju różnych chorób. Badania pokazują, że wraz z wiekiem dochodzi do zmian w funkcjonowaniu preadipocytów, które to są progenitorami komórek tłuszczowych. Obserwowano spadek replikacji preadipocytów oraz zmniejszoną adipogenezę (Kirkland i wsp. 1990), a także zwiększoną podatność na lipotoksyczność (Guo i wsp. 2007) oraz zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych, chemokin czy elementów odpowiedzi na stres (Tchkonia i wsp. 2007, Cartwright i wsp. 2010).

Do indukcji starzenia wykorzystałam doksorubicynę oraz nadtlenek wodoru. Oba te związki były już wcześniej szeroko stosowane jako induktory starzenia w fibroblastach (Caldini i wsp. 1998, Frippiat i wsp. 2002, Demidenko i Blagosklonny 2008, Li i wsp. 2012). Niemniej niewiele zostało opublikowanych do tej pory badań dotyczących wpływu doksorubicyny na VSMC czy preadipocyty i indukowanym w ten sposób starzeniu. Należy zaznaczyć, że doksorubicyna jest chemioterapytykiem wykorzystywanym w terapii przeciwnowotworowej, co sprawia, że na jej działanie narażonych jest szereg komórek organizmu, szczególnie komórki budujące naczynia krwionośne. Z kolei zastosowanie nadtlenu wodoru prowadziło do stresu oksydacyjnego, który sprzyja rozwojowi wielu chorób związanych z wiekiem, w tym miażdżycy. Model indukcji starzenia za pomocą

doksorubicyny i H_2O_2 w komórkach VSMC został opracowany i częściowo scharakteryzowany w naszej pracowni. W komórkach VSMC traktowanych dox i H_2O_2 obserwowano zahamowanie proliferacji wyrażonej jako zmniejszenie liczby komórek zdolnych do wbudowywania BrdU, wzrost aktywności SA- β -gal, a także wzrost poziomu wydzielanych cytokin IL-6, IL-8 i VEGF (Bielak-Zmijewska i wsp. 2014, Przybylska i wsp. 2016).

W niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy dokonano porównania i charakterystyki procesu przyspieszonego starzenia komórkowego indukowanego stresem na trzech różnych typach komórek z wykorzystaniem dwóch różnych induktorów. Zaobserwowano, że oba związki (doksorubicyna oraz nadtlenek wodoru) skutecznie hamowały proliferację we wszystkich trzech typach komórek. Starzenie komórkowe definiuje się jako trwałe i nieodwracalne zatrzymanie cyklu komórkowego spowodowane uszkodzeniem DNA i innymi czynnikami stresowymi. Ponieważ część białek uznawanych za markery starzenia bierze udział w regulacji cyklu komórkowego, a ich poziom może zmieniać się również w komórkach, których potencjał proliferacyjny tylko przejściowo jest obniżony, dlatego też w doświadczeniach, oprócz komórek proliferujących, wykorzystano komórki o przejściowo zahamowanej proliferacji, tzw. spoczynkowe. Podobnie jak w przypadku komórek indukowanych do starzenia, komórki spoczynkowe charakteryzowały się znacznym spadkiem liczby komórek zdolnych do syntezy DNA, co było spodziewanym wynikiem.

Dodatkowo do oceny potencjału proliferacyjnego wykorzystano białko Ki67, które jest markerem komórek będących w cyklu (Scholzen i Gerdes 2000) i powszechnie stosowane jest jako marker komórek nowotworowych (Li i wsp. 2015). Udowodniono, że w komórkach ulegających starzeniu nie stwierdza się obecności białka Ki67 (Sobecki i wsp. 2017). W badaniach przeprowadzonych na komórkach VSMC, wykazano postępujący spadek liczby komórek Ki67 dodatnich wraz ze wzrostem liczby pasaży w hodowli (Burton i wsp. 2007). Przeprowadzona przeze mnie analiza wykazała, że zarówno komórki traktowane doksorubicyną lub nadtlenkiem wodoru, jak i komórki spoczynkowe charakteryzowały się spadkiem potencjału proliferacyjnego w porównaniu do komórek kontrolnych. Wśród tych komórek obserwowano jedynie niewielki procent komórek o obniżonym poziomie białka Ki67 (Ki67 $^{+/-}$). Brak ekspresji białka Ki67 obserwowano także w spoczynkowych ludzkich limfocytach T, w których dopiero po zastymulowaniu do proliferacji dochodziło do pojawienia się białka Ki67 (Korwek i wsp. 2012). Przeprowadzona przez nas analiza Western blot dowiodła istnieniu różnic w poziomie białka Ki67 pomiędzy komórkami spoczynkowymi

a ulegającymi starzeniu. W komórkach traktowanych doxorubicyną lub nadtlakiem wodoru wykazano brak ekspresji tego białka. Na podstawie zebranych wyników można wnioskować, że samo zatrzymanie komórek w cyklu nie jest jedynym powodem obniżenia poziomu badanego markera. Być może w trakcie starzenia dochodzi do efektywnego i trwałego zahamowania jego ekspresji. Nie można jednak wykluczyć, że różnice w poziomie Ki67 obserwowane pomiędzy komórkami spoczynkowymi i komórkami ulegającymi starzeniu przyspieszonemu indukowanemu stresem wiążą się z różnym rozkładem komórek w cyklu komórkowym, co potwierdziła przeprowadzona przez nas analiza. Obecnie wiadomo, że zmiany w poziomie białka Ki67 w komórkach opierają się na dwóch przeciwstawnych mechanizmach zależnych od regulatorów cyklu komórkowego. Z jednej strony kinazy Cdk4/Cdk6 poprzez fosforylację Rb umożliwiają ekspresję mRNA Ki67 w fazie G1 (Sobecki i wsp. 2016, Sobecki i wsp. 2017). Z drugiej strony degradacja białka Ki67 zachodzi w późnej mitozie i wczesnej fazie G1 poprzez kompleks ubikwityna – proteasom APC/C-Cdh1 (Chierico i wsp. 2017, Sobecki i wsp. 2017, Sun i Kaufman 2018).

Zarówno spoczynkowe fibroblasty, preadipocyty oraz komórki VSMC zatrzymane były w fazie G0/G1, co na podstawie dotychczasowej charakterystyki komórek spoczynkowych (Marescal i Cheeseman 2020) było spodziewanym wynikiem. Komórki indukowane do starzenia zatrzymane były zarówno w fazie G0/G1 jak i G2/M, zgodnie z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi między innymi w naszej pracowni (Bielak-Zmijewska i wsp. 2014), przy czym obserwowany efekt był zależny od czynnika indukującego starzenie – doxorubicyna prowadziła do akumulacji większej liczby komórek zawierających 4N DNA (faza G2/M). Pierwotnie sądzono, że ulegające starzeniu komórki są zatrzymane głównie w fazie G1 cyklu (Smith i wsp. 1996). Z czasem jednak udowodniono, że komórki stare mogą być zatrzymane nie tylko w fazie G1, ale także w fazie G2. Wykazano m.in. że ludzkie fibroblasty ulegające starzeniu replikacyjnemu gromadzą się w fazie G2 (Mao i wsp. 2012).

W celu dalszej charakterystyki komórek starych i oszacowania ich liczby zastosowano test cytochemiczny na aktywność enzymu lizosomalnego SA- β -galaktozydazy. Podwyższona aktywność tego enzymu jest podstawowym, choć nie specyficznym, markerem starzenia komórkowego. Już w trzeciej dobie od indukcji starzenia obserwowano zwiększoną aktywność tego enzymu. Co ciekawe, niebieskie zabarwienie świadczące o podwyższonej aktywności SA- β -gal, odnotowano także w komórkach przegęszczonych oraz hodowanych w pożywce pozbawionej surowicy. Niemniej wynik tej analizy możemy uznać za fałszywie pozytywny. Opublikowana przez Severino praca dowiodła, że w komórkach będących na

wczesnych pasażach, w których doszło do inhibicji kontaktowej, stwierdza się podwyższony poziom β -galaktozydazy. Z kolei pasaż redukcyjny przegęszczonych komórek odwracał ten efekt (Severino i wsp. 2000). Warto jednak zauważyć, że wzrost aktywności tego enzymu w komórkach spoczynkowych (przejściowo zatrzymanych w cyklu) może wynikać z warunków hodowli (głodzenie, zakwaszenie pożywki spowodowane dużym zagęszczeniem komórek) i być obserwowane tylko w doświadczeniach *in vitro*.

Możemy zatem wnioskować, że na podstawie oceny potencjału proliferacyjnego (analiza BrdU oraz Ki67) oraz aktywności SA- β -galaktozydazy jesteśmy w stanie rozróżnić komórki proliferujące od nieproliferujących. Jednak za pomocą wymienionych powyżej markerów nie jesteśmy w stanie odróżnić komórek ulegających starzeniu od komórek o przejściowo zahamowanej proliferacji – spoczynkowych.

Przeprowadzona analiza poziomu wybranych białek pozwoliła wytypować te, które potencjalnie mogłyby być uznane za uniwersalne markery starzenia komórkowego. We wszystkich trzech typach komórek niezależnie od induktora odnotowano spadek poziomu laminy B1, HMGB1 oraz PARP1 w komórkach starych. Z kolei poziom tych białek w komórkach spoczynkowych był porównywalny z poziomem obserwowanym w komórkach proliferujących. Wcześniejsze prace dowiodły, że towarzyszący starzeniu komórkowemu spadek poziomu laminy B1 jest kluczowym czynnikiem wyzwalającym lokalne i globalne zmiany chromatyny, które wpływają na ekspresję genów, starzenie oraz powstawanie nowotworów (Shah i wsp. 2013). Innym istotnym składnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie integralności genomu jest białko PARP1, które odgrywa znaczącą rolę w naprawie uszkodzeń DNA. PARP1 wiąże się do DNA w miejscu pęknięcia nici, ulega aktywacji i zaczyna kowalencyjnie modyfikować białka jądrowe (Wesierska-Gadek i wsp. 2005). W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że niedobór PARP1 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i starzenie komórkowe (Kelleher i wsp. 2021). Co ciekawe niektóre badania sugerują że PARP1 może być czynnikiem zapewniającym długowieczność. Wykazano, że u stulatków (100-107 lat) zdolność do inicjowania naprawy uszkodzeń DNA w odpowiedzi na indukowane nadtlenkiem wodoru uszkodzenia i aktywacja PARP1 była podobna do zdolności w komórkach uzyskanych od młodych osób (19-26 lat). Podczas gdy w komórkach pochodzących od osób starszych (69-75 lat) zjawisko to było opóźnione lub zmniejszone (Chevanne i wsp. 2007).

Do tej pory najwięcej badań poświęconych białku HMGB1 w kontekście starzenia dotyczy wydzielania tego białka przez komórki stare i poddane stresowi. Pełni ono wówczas rolę tzw. alarminy (Palumbo i wsp. 2007, Davalos i wsp. 2013). Białko HMGB1 jest zlokalizowane w jądrze komórkowym, gdzie bierze udział m.in. w replikacji i transkrypcji DNA oraz reguluje aktywność transkrypcyjną p53 (Lu i wsp. 2019). Pod wpływem stresu HMGB1 przemieszcza się pomiędzy jądrem a cytoplazmą, a transport i translokacja HMGB1 jest powiązana ze starzeniem komórkowym (Cardoso i wsp. 2018). Co ciekawe, wbrew temu czego można byłoby się spodziewać, poziom HMGB1 w ludzkiej surowicy znacząco spadał wraz z wiekiem (Fu i wsp. 2016).

Wiele opublikowanych badań dotyczących charakterystyki procesu starzenia komórkowego wskazuje na podwyższony poziom białek p21 oraz p16 w komórkach starych jako powszechnych markerów tego procesu. Uzyskane przeze mnie wyniki nie potwierdzają tych doniesień. Podwyższony poziom p21 obserwowałam jedynie w komórkach starych w 3 dobie po indukcji starzenia, a wzrost ten widoczny był wyłącznie względem komórek kontrolnych zebranych po 24 godzinach. Co ciekawe, wzrost poziomu tego białka obserwowałam także w komórkach proliferujących w kolejnych dobach hodowli. Poziom białka p16 w komórkach starych praktycznie nie różnił się od tego obserwowanego w komórkach proliferujących. Jedynie w komórkach spoczynkowych odnotowałam podwyższony poziom tego białka. Niemniej uzyskane przeze mnie wyniki mogą znaleźć potwierdzenie w opublikowanej w 1999 roku pracy Gretchen Stein i wsp. (Stein i wsp. 1999). Wykazali oni bowiem, że wzrost p21 inicjuje zatrzymanie cyklu komórkowego związanego ze starzeniem i wraz z osiągnięciem przez komórki fenotypu starzenia jego poziom spada. Z kolei podwyższony poziom białka p16 jest istotny w długotrwałym utrzymaniu tego zahamowania w cyklu.

5.2 Charakterystyka procesu starzenia komórkowego *in vitro* oraz *in vivo*

Starzenie komórkowe jest dynamicznym i wieloetapowym procesem, podczas którego właściwości komórek starych nieustannie ewoluują. Proces ten niewątpliwie przyczynia się do starzenia organizmu oraz występowania chorób związanych z wiekiem, w tym miażdżycy. Udowodniono, że w rozwoju miażdżycy kluczową rolę odgrywają komórki mięśni gładkich. W opublikowanych w 2001 roku badaniach po raz pierwszy zaobserwowano podwyższoną aktywność enzymu SA- β -gal w komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich, które budują blaszkę miażdżycową (Vasile i wsp. 2001). W dalszych badaniach prowadzonych na komórkach mięśniowych pochodzących z blaszek miażdżycowych wykazano oprócz wzrostu

aktywności SA- β -gal, wzrost poziomu inhibitorów kinaz zależnych od cyklin oraz niższy potencjał replikacyjny. Co więcej, w komórkach tych obserwowano krótsze telomery oraz uszkodzenia DNA wynikające z podwyższonego poziomu RFT oraz stresu oksydacyjnego (Matthews i wsp. 2006).

W związku z tym w dalszej części rozprawy dokonałam charakterystyki komórek mięśni gładkich aorty ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu w warunkach *in vitro*, które mogą stanowić model badania starzenia zachodzącego w organizmie. Co więcej, w niniejszej pracy po raz pierwszy scharakteryzowałam i porównałam komórki będące na wczesnym i późnym etapie przyspieszonego starzenia indukowanego stresem.

Zarówno w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu jak i przyspieszonemu odnotowaliśmy znaczący spadek liczby komórek zdolnych do proliferacji (analiza Ki67 oraz BrdU). W komórkach będących na późnym etapie starzenia obserwowano utrzymujące się zahamowanie podziałów. Komórki stare charakteryzowały się także podwyższoną aktywnością enzymu SA- β -gal. Opracowana i opublikowana przez nas metoda analizy obrazu (Krzystyniak i wsp. 2023) umożliwiła pomiar intensywności sygnału SA- β -gal w komórkach starych i wykazanie różnic w intensywności zabarwienia komórek po 3 oraz 7 dniach od indukcji starzenia, co według nas jest efektem zwiększającej się aktywności i/lub poziomu badanego enzymu. W niniejszej rozprawie po raz pierwszy zbadano i porównano intensywność sygnału SA- β -gal w komórkach będących na wczesnym oraz późnym etapie starzenia oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu. Wykazaliśmy, że w komórkach starych utrzymywanych w hodowli dłuższy czas (SIPS IV – 4 tygodnie od podania H₂O₂) dochodzi do wyraźnego wzrostu intensywności sygnału SA- β -gal w porównaniu do komórek będących na wczesnym etapie tego procesu (SIPS I – 7 dni od podania H₂O₂). Ponadto zauważyliśmy, że w komórkach będących na późnym etapie starzenia, może dochodzić do aktywacji systemów naprawy uszkodzeń DNA. Świadczy o tym wzrost, w porównaniu do komórek będących na wczesnym etapie starzenia (SIPS I), liczby komórek, w jądrach których nie stwierdziliśmy skupisk białka 53BP1. Białko 53BP1 lokalizuje się w miejscu pęknięcia nici DNA i świadczy o obecności podwójnych pęknięć. Wynik ten potwierdza opublikowane w 2006 badania, w których wykazano że skupiska białka γ H2AX stają się bardzo liczne, gdy komórki wchodzi w proces starzenia, ale ich liczba znacznie zmniejsza się gdy hodowle utrzymywane są przez dłuższy czas (Lou i Chen 2006).

Pojęcie głębokiego (ang. *deep*) lub późnego (ang. *late*) etapu starzenia zostało już użyte w literaturze przez innych badaczy (Baker i Sedivy 2013). W 2010 roku Passos zaproponował, że trwała reakcja na uszkodzenia DNA wyzwała ciągłą produkcję reaktywnych form tlenu, tworząc dynamiczną pętlę sprzężenia zwrotnego, która aktywnie utrzymuje stan głębokiego starzenia (Passos i wsp. 2010). Z kolei De Cecco wykazał wzrost ekspresji transpozonu L1 w komórkach starych utrzymywanych przez dłuższy czas w hodowli (De Cecco i wsp. 2013). Coraz więcej mówi się także o zmianach w profilu wydzielniczym komórek będących na wczesnym oraz późnym etapie starzenia (Herranz i Gil 2018). Wykazano, że w komórkach starych dochodzi do wzrostu ekspresji genów związanych z SASP takich jak: CCL2, IL-8, MMP1, MMP3, a poziom ekspresji tych genów w komórkach będących na późnym etapie starzenia był wyższy aniżeli w komórkach na wczesnym etapie (De Cecco i wsp. 2019). Przeprowadzona analiza proteomiczna czynników SASP wydzielanych przez mezenchymalne komórki zrębowe (MSC) także wykazała różnice w profilu wydzielniczym komórek będących na wczesnym oraz późnym etapie starzenia (Alessio i wsp. 2023). Pomimo rosnącej świadomości naukowców odnośnie dynamiki procesu starzenia i zmian jakie zachodzą w komórkach, wciąż jednak niewiele można znaleźć badań dotyczących porównania tego procesu na wczesnych i późnych jego etapach. Odnosząc się do powyższego, prezentowane przeze mnie wyniki badań po raz pierwszy przedstawiają pogłębioną charakterystykę oraz porównanie zmian jakie zachodzą w komórkach starych.

Pokazaliśmy, że w wyniku starzenia dochodzi do powiększenia rozmiarów komórki oraz jej rozplaszczenia, co jest zmianą powszechnie obserwowaną w starzeniu komórkowym badanym *in vitro*. Opublikowane badania donoszą o zwiększeniu rozmiarów starzejących się komórek nie tylko *in vitro*, lecz także *in vivo*, co pokazały wyniki doświadczeń prowadzonych na myszach (Biran i wsp. 2017). Analiza na poziomie ultrastrukturalnym komórek ulegających starzeniu pozwoliła zaobserwować wyraźne zmiany w strukturze organelli, takich jak: mitochondria, aparat Golgiego czy siateczka śródplazmatyczna, które mogą świadczyć o zaburzeniach energetycznych towarzyszących starzeniu komórkowemu. W młodej, prawidłowo funkcjonującej komórce integralność proteomu jest utrzymywana między innymi dzięki prawidłowo funkcjonującej makroautofagii, która kontroluje eliminację uszkodzonych organelli powstałych w wyniku stresu oksydacyjnego. W komórkach starych mechanizm ten wydaje się być upośledzony (Grootaert i wsp. 2015, Wong i wsp. 2020). Potwierdza to obserwowana przez nas w komórkach starych zwiększona liczba lizosomów

oraz struktur lizosomalnych zawierających wewnątrz niestrawione fragmenty organelli komórkowych.

Przeprowadzone przez nas badania potwierdziły zmienny charakter fenotypu starzenia badany na wczesnym i późnym etapie tego procesu, jak i w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Pewne cechy, takie jak na przykład odsetek komórek o podwyższonej aktywności SA- β -gal, liczba komórek niezdolnych do syntezy DNA (BrdU -) lub tych, w których nie stwierdzono obecności białka Ki67, osiągał maksymalną wartość już w kilka dni po indukcji starzenia podczas gdy inne zmieniały się w czasie (np. poziom białek p21, HMGB1, lamina B1). Ciekawego wyniku dostarczyła wykonana przeze mnie analiza poziomu białka p16 – powszechnie uznawanego za marker starzenia komórkowego wykorzystywanego między innymi do selektywnej eliminacji komórek starych w modelach zwierzęcych. W przeprowadzonych doświadczeniach obserwowaliśmy spadek poziomu białka p16 w komórkach będących na wczesnych etapach starzenia (SIPS I). Poziom ten wzrastał istotnie statystycznie po dłuższym czasie hodowli komórek starych jak również był stosunkowo wysoki w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Warto zauważyć, że również poziom aktywności/ekspresji SA- β -gal wzrastał w komórkach będących na późnych etapach starzenia. Nasze obserwacje potwierdzają hipotezę zaprezentowaną przez Ogrodnika w jego pracy przeglądowej (Ogrodnik 2021) mówiącą o tym, że wysoki poziom SA- β -gal i p16 są cechami charakterystycznymi dla komórek zatrzymanych w cyklu komórkowym i będących w tzw. głębokim starzeniu (ang. *deep senescence*). Zauważył, że w różnych tkankach myszy mniej niż 10% komórek miało podwyższony poziom białka p16 i aktywności SA- β -gal, podczas gdy znacznie więcej komórek (20-80%) było naznaczonych uszkodzeniami, w tym DSB. Uzyskane przez nas wyniki w modelu *in vitro* wydają się potwierdzać te obserwacje. W początkowym etapie starzenia (SIPS I) komórki charakteryzowały się bardzo dużą liczbą pęknięć w dwuniciowym DNA oraz podwyższoną aktywnością SA- β -gal, przy czym nie obserwowaliśmy wzrostu poziomu białka p16. W trakcie dłuższego trzymywania komórek w hodowli (SIPS IV) obserwowaliśmy spadek liczby uszkodzeń, przy jednoczesnym wzroście intensywności SA- β -gal i poziomu p16. Wysoki poziom białka p16 zaobserwowany również w komórkach RS nie korelował jednak z wyższą aktywnością SA- β -gal ani większą liczbą komórek pozbawionych podwójnych pęknięć nici DNA (komórki bez skupisk białka 53BP1), co wskazuje, że te zmiany nie są ze sobą powiązane.

Starzenie komórek mięśni gładkich naczyń sprzyja rozwojowi miażdżycy. Wykazano, że komórki VSMC znajdujące się w blaszce miażdżycowej charakteryzują się podwyższoną aktywnością SA- β -gal, której towarzyszy także podwyższony poziom białek p16, p21 oraz p27 (Matthews i wsp. 2006). Również komórki mięśni gładkich pochodzące z blaszek miażdżycowych i umieszczone w hodowli wykazywały szereg cech charakterystycznych dla starzenia, takich jak podwyższony poziom SA- β -gal, białka p16 i p21, spadek fosforylowanego Rb, a także wzrost liczby uszkodzeń DNA (Matthews i wsp. 2006, Gray i wsp. 2015). Doświadczenia przeprowadzone przeze mnie na komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych potwierdziły, że mamy do czynienia z populacją komórek znacznie wzbogaconą w komórki stare. Na podstawie przeprowadzonej analizy poziomu wybranych białek związanych ze starzeniem wykazałam, że w komórkach izolowanych z blaszek miażdżycowych, podobnie jak w komórkach indukowanych do starzenia nadtlenkiem wodoru czy ulegających starzeniu replikacyjnemu, obserwuje się spadek poziomu Ki67, cykliny B1, HMGB1, PARP1 oraz PCNA. W przypadku komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych obserwowaliśmy również wzrost poziomu białka p21 oraz p16.

Na podstawie uzyskanych wyników możemy wnioskować, że fenotyp związany ze starzeniem komórek izolowanych z blaszek miażdżycowych bardziej przypomina fenotyp komórek, które w warunkach *in vitro* ulegają starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późniejszym etapie. Wniosek ten potwierdzają również przeprowadzone przez nas analizy składu sekretomu komórek ulegających starzeniu *in vitro* i *in vivo* (w blaszkach).

5.3 Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem

Fenotyp wydzielniczy związany ze starzeniem (SASP) jest niewątpliwie najważniejszą cechą wszystkich komórek starych, ponieważ aktywnie wpływa na mikrośrodowisko tkanek i w efekcie na funkcjonowanie narządów. Wydzielanie czynników bioaktywnych przez ulegające starzeniu komórki zostało powszechnie uznane za jeden z głównych czynników przyczyniających się do starzenia się organizmu i rozwoju chorób związanych z wiekiem. Miażdżycy jest doskonałym przykładem choroby zapalnej związanej z wiekiem, na progresję której wpływa wiele różnych czynników wydzielanych przez komórki znajdujące się w blaszce miażdżycowej. W związku z tym za pomocą mikromacierzy białkowych przeprowadziliśmy analizę czynników wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu *in vitro* oraz *in vivo*. Uzyskane za pomocą mikromacierzy białkowych

wyniki wskazywały wzrost poziomu ponad 70% badanych białek w sekretomie komórek starych w porównaniu do sekretomu komórek kontrolnych. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdziły także zróżnicowanie profilu wydzielniczego w zależności od czynnika indukującego starzenie (nadtlenek wodoru oraz wyczerpanie potencjału replikacyjnego). Wykazałam także istnienie różnic w profilu wydzielniczym pomiędzy komórkami będącymi na wczesnym oraz późnym etapie starzenia. Wynik ten w połączeniu z wcześniejszą analizą ekspresji wybranych białek potwierdza fakt, że starzenie komórkowe jest procesem złożonym, który ewoluuje w czasie i pewne zmiany w profilu ekspresji oraz wydzielniczym obserwowane są dopiero na późniejszych etapach tego procesu.

Na podstawie analizy profilu wydzielniczego komórek mięśni gładkich wyizolowanych z blaszek miażdżycowych można stwierdzić, że profil wydzielniczy tych komórek jest w znacznym stopniu zbliżony do profilu wydzielniczego komórek ulegających starzeniu w warunkach *in vitro*, w szczególności komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz przyspieszonemu, ale będącemu na późnym etapie (SIPS IV).

Pośród wszystkich przeanalizowanych czynników wytypowałam sześć, których poziom sekrecji istotnie wzrastał we wszystkich modelach starzenia (SIPS I, SIPS IV, RS i AP), a najwyższy wzrost odnotowano w komórkach będących na wczesnym etapie tego procesu (SIPS I). Możemy zatem wnioskować, że czynniki te mogą posłużyć jako markery wczesnego stanu zapalnego pojawiającego się w organizmie. Do czynników tych należały: interleukina 8 (IL-8) oraz interleukina 4 (IL-4), transformujący czynnik wzrostu alfa ($TGF\alpha$), białko morfogenetyczne kości 4 (BMP-4), łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF) oraz hormon wzrostu (GH).

Białka, których wzrost poziomu obserwowano w komórkach ulegających starzeniu w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, należały w większości do chemokin, czynników wzrostu oraz metaloproteinaz. Czynniki wzrostu i chemokiny indukują rekrutację makrofagów, płytek krwi i leukocytów na powierzchni komórek śródbłonna, w związku z czym wzmagają stan zapalny i sprzyjają tworzeniu się blaszki miażdżycowej. W literaturze opisanych zostało wiele metaloproteinaz macierzy (MMP), które odgrywają rolę w angiogenezie oraz proliferacji komórek w miażdżycy (Ribatti i wsp. 2008). Na przykład za przebudowę naczyń zachodzącą podczas angiogenezy i w miażdżycy odpowiedzialny jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), który bezpośrednio zwiększa wydzielanie MMP (Celletti i wsp. 2001), a hamowanie ekspresji tego czynnika ogranicza rozwój miażdżycy (Sueishi i wsp. 1997).

W przeprowadzonych przez nas analizach obserwowaliśmy wzrost wydzielania tego czynnika przez komórki SIPS IV, RS oraz komórki izolowane z blaszek miażdżycowych. Podobnie jak VEGF również płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) był wydzielany na wyższym poziomie przez komórki SIPS IV, RS i pochodzące z blaszek. Według jednej z hipotez, zmiany miażdżycowe powstają w wyniku ogniskowego uszkodzenia komórek śródbłonka, w następstwie którego następuje agregacja płytek krwi (Ross 1976). Podczas powstałej reakcji wydzielany jest przez płytki krwi płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), który wspomaga odpowiedź proliferacyjną komórek mięśni gładkich. Możemy zatem sądzić, że wydzielanie PDGF przez stare komórki VSMC może działać na sąsiadujące komórki mięśni gładkich prowadząc do ich przyspieszonej proliferacji, a w konsekwencji również starzenia. Może to przyczyniać się do zwiększonej akumulacji komórek starych w patologicznie zmienionym naczyniu.

Wykazano, że w miażdżycy chemokina RANTES wydzielana jest głównie przez płytki krwi oraz komórki mięśni gładkich. Dzięki swojej zdolności do wiązania się z receptorami CCR1 i CCR5 obecnymi na powierzchni limfocytów T i monocytów, RANTES może prowadzić do adhezji i transmigracji tych komórek przez ścianę śródbłonka (Suffee i wsp. 2011). W przeprowadzonej przez nas analizie zaobserwowaliśmy, że chemokina ta wydzielana jest wyłącznie przez komórki mięśni gładkich wyizolowane z blaszek miażdżycowych.

Osteopontyna (OPN) i osteoprotegeryna (OPG) należą do grupy niekolagenowych białek macierzy pierwotnie zidentyfikowanych jako istotne w mineralizacji kości. Ulegają także ekspresji w makrofagach, komórkach śródbłonka i komórkach mięśni gładkich w blaszkach (O'Brien i wsp. 1994, Dhore i wsp. 2001, Golledge i wsp. 2004). Wykazano, że ekspresja OPN i OPG jest większa w objawowych (niestabilnych) niż bezobjawowych (stabilnych) blaszkach miażdżycowych tętnic szyjnych (Golledge i wsp. 2004, Strobescu-Ciobanu i wsp. 2020). Wzrost sekrecji tych białek odnotowano w wariantach SIPS IV, RS oraz komórkach pochodzących z blaszek miażdżycowych, co dowodzi, że ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich mogą przyczyniać się do niestabilności blaszki miażdżycowej i w konsekwencji jej pęknięcia.

Najważniejszymi cytokinami przeciwzapalnymi w miażdżycy, które hamują szereg MMP, w tym MMP-9 i MMP-12, są interleukina 10 (IL-10) oraz transformujący czynnik wzrostu β (TGF β). Udowodniono, że w obszarach blaszki miażdżycowej, w których ekspresja cytokin prozapalnych przeważa nad IL-10 i TGF β , może dojść do zaburzenia czapeczki

i w konsekwencji przyspieszyć pęknięcie blaszki miażdżycowej (Tedgui i Mallat 2006). Odnotowaliśmy spadek poziomu IL-10 we wszystkich czterech modelach doświadczalnych, co sugeruje, że ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich przyczyniają się do zwiększenia niestabilności blaszki. Co ciekawe, wykazano, że wysoki poziom IL-10 w surowicy stulatków koreluje z niskim poziomem IL-6, co może być jedną z przyczyn długowieczności tych osób (Franceschi i wsp. 2005).

Przeprowadzone przez nas analizy dowodzą, że duża różnorodność sekretomu starych komórek mięśni gładkich może bez wątpienia odgrywać istotną rolę w rozwoju miażdżycy, działając na różne typy komórek pochodzących zarówno z tkanki naczyniowej, jak i z układu immunologicznego. Powyższe przykłady stanowią jedynie próbę wskazania możliwych efektów działania sekretomu komórek starych na mikrośrodowisko tkanki. Dowodem na to, że taki wpływ istnieje jest praca opublikowana przez Childs i wsp., która pokazała, że usunięcie komórek starych, a co się z tym wiąże obniżenie poziomu czynników SASP, zmniejsza liczbę i rozmiar zmian miażdżycowych w aortach myszy Ldlr^{-/-} (Childs i wsp. 2016).

5.4 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich

W 2008 roku po raz pierwszy wykazano, że ulegające starzeniu komórki raka prostaty charakteryzują się zwiększonym wydzielaniem EVs (Lehmann i wsp. 2008). Późniejsze badania potwierdziły podobne zjawisko w innych typach komórek, głównie w fibroblastach (Takahashi i wsp. 2017, Terlecki-Zaniewicz i wsp. 2018, Borghesan i wsp. 2019, Basisty i wsp. 2020), komórkach nowotworowych (Kavanagh i wsp. 2017) i HUVEC (Mensa i wsp. 2020, Riquelme i wsp. 2020). My po raz pierwszy wykazaliśmy, że ulegające starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu komórki VSMC wydzielają większą ilość EVs aniżeli komórki młode. Co więcej, na podstawie ekspresji markerów białkowych (CD63, CD81, TSG101, flotylina-1) udowodniliśmy, że frakcja wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest wzbogacona w egzosomy. Biorąc pod uwagę zebrane dotychczas wyniki oraz te uzyskane przez nas, można wnioskować, że zwiększone wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest uniwersalną cechą fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem wszystkich komórek.

Kolejnym etapem prowadzonych doświadczeń była analiza proteomiczna sekretomu ulegających starzeniu komórek mięśni gładkich aorty. Postanowiliśmy przeprowadzić osobną analizę frakcji pęcherzykowej oraz frakcji zawierającej białka rozpuszczalne (sSASP). Wyniki naszych badań potwierdziły obserwowane przez nas już wcześniej (analiza mikromacierzy białkowych) znaczące różnice w składzie proteomicznym SASP w zależności od czynnika indukującego starzenie (starzenie replikacyjne a przyspieszone indukowane H₂O₂). Na podstawie analizy PCA wykazaliśmy, że skład białkowy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu jest bardziej podobny do EVs wydzielanych przez komórki kontrolne, podczas gdy EVs wydzielane przez komórki indukowane do starzenia różnią się swoją zawartością zarówno od tych wydzielanych przez komórki młode, proliferujące (kontrola), jak i komórki RS. Świadczy to o tym, że szybki i ograniczony w czasie proces indukcji starzenia prowadzi do silniej wyrażonych zmian w składzie sekretomu. Co więcej, ilość białek zidentyfikowanych w pęcherzykach pochodzących z komórek starych (senEVs), które różnią się istotnie względem EVs kontrolnych jest większa w wariancie SIPS niż RS. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazaliśmy, że poziom co najmniej połowy białek zidentyfikowanych w senEVs był niższy w porównaniu do kontroli. Wynikać to może ze spadku globalnego poziomu translacji, który został opisany dla mysich fibroblastów ulegających starzeniu replikacyjnemu (Wu i wsp. 2019). Z drugiej strony, wykazano że poziom większości białek zidentyfikowanych w EVs pochodzących z ludzkich fibroblastów indukowanych do starzenia poprzez nadekspresję onkogenu Ras był wyższy w porównaniu z EVs wydzielanymi przez komórki kontrolne (Borghesan i wsp. 2019). W przeprowadzonej przez nas analizie zaobserwowaliśmy, że większość białek o najbardziej istotnie obniżonej ekspresji w senEVs to białka rybosomalne. Wynik ten może świadczyć o reorganizacji aparatu translacyjnego w ulegających starzeniu komórkach VSMC. Potwierdza to obserwowany spadek biogenezy rybosomów (Lessard i wsp. 2018) oraz spadek ekspresji białek rybosomalnych (Seshadri i wsp. 1993) w komórkach starych.

Co więcej, uzyskane przez nas wyniki analizy składu sekretomu komórek VSMC porównaliśmy z atlasem SASP stworzonym przez Basisty'ego. Zaobserwowaliśmy wyraźne różnice w składzie fenotypu sekrecyjnego zależne od typu komórek oraz rodzaju czynnika indukującego starzenie. Zidentyfikowaliśmy 7 białek, których poziom był istotnie wyższy w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC i fibroblasty. Jednym z nich była trombospodyna (THBS1), której akumulacja

w macierzy zewnątrzkomórkowej przyczynia się do starzenia i chorób związanych z wiekiem, takimi jak: niewydolność serca, zawał czy tętnicze nadciśnienie płuc (Isenberg i Roberts 2020). Co więcej, wykazano, że ulegające starzeniu komórki mezotelialne otrzewnej wydzielają zwiększoną ilość THBS1, która jest głównym aktywatorem TGF β , prowadząc do zależnego od TGF β rozprzestrzeniania się fenotypu starzenia (Mikula-Pietrasik i wsp. 2013).

W przypadku rozpuszczalnych czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC, fibroblasty i komórki śródbłonna zidentyfikowaliśmy jedynie białko GDF15 (różnicujący czynnik wzrostu 15) jako te ulegające zwiększonej sekrecji przez różne typy komórek indukowanych do starzenia. Białko to uczestniczy w szeregu procesów patologicznych, między innymi promuje stan zapalny, przewlekłe choroby naczyniowe oraz miażdżycę (Kempf i wsp. 2006, Schindowski i wsp. 2011). Podwyższone stężenie GDF15 w surowicy świadczy o zwiększonym ryzyku ostrych zespołów wieńcowych (Wollert i wsp. 2007). Badania przeprowadzone na mysim modelu miażdżycy wykazały znacząco wyższą ekspresję GDF15 w zaawansowanych stadiach blaszek miażdżycowych niż w stabilnych zmianach chorobowych. Co więcej, GDF15 zwiększał postęp choroby, a obniżenie ekspresji GDF15 poprawiało stabilność blaszek oraz ograniczało powstawanie nowych (de Jager i wsp. 2011). Z drugiej strony, pojawiają się także doniesienia o działaniu przeciwzapalnym i kardioprotekcyjnym GDF15 (Hsiao i wsp. 2022). Wykazano, że GDF15 łagodził uszkodzenie serca w mysim modelu niedokrwienia oraz hamował apoptozę w hodowanych *in vitro* kardiomiocytach poddanych niedokrwieniu (Kempf i wsp. 2006).

5.5 Wpływ czynników wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich na limfocyty T

Miażdżyca jest chorobą zapalną, która charakteryzuje się intensywną lokalną aktywnością komórek układu odpornościowego. Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich dwóch dekad zwróciły dużą uwagę na potencjalną rolę limfocytów T jako istotnych czynników napędzających i modyfikujących patogenezę miażdżycy. Co więcej, badania oparte na analizach proteomicznych i transkryptomicznych wykazały, że limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ występujące w blaszce miażdżycowej mają wyższy poziom aktywacji niż limfocyty na obwodzie (Grivel i wsp. 2011, Fernandez i wsp. 2019). Wyniki przeprowadzonych przez nas badań dotyczących wpływu SASP na aktywację limfocytów *in vitro* sugerują, że to właśnie

komórki stare mogą, przynajmniej częściowo, być odpowiedzialne za obserwowane zmiany w limfocytach.

W związku z zaobserwowanym wpływem czynników wydzielanych przez stare komórki mięśni gładkich na aktywację limfocytów i sekrecję określonych cytokin przeanalizowaliśmy wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC na powyższe procesy. W przeprowadzonych przez nas badaniach wykazaliśmy, że EVs pochodzące od starych komórek VSMC ograniczały aktywację limfocytów T. Wzrost poziomu markerów aktywacji obserwowaliśmy wśród limfocytów hodowanych w obecności pożywki zebranej z nad komórek starych, która była pozbawiona pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Nie udało się zaobserwować odwrotnego efektu po podaniu EVsów do świeżej pożywki, co sugeruje, że za wzrost aktywacji w pożywce pozbawionej EVsów odpowiadają obecne w medium kondycjonowanym czynniki wydzielane przez stare komórki VSMC.

W przeprowadzonej przez nas analizie proteomicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC, zidentyfikowaliśmy szereg białek, które mogą regulować funkcje komórek odpornościowych. Jednym z potencjalnych kandydatów odpowiedzialnych za obserwowany efekt może być THSB1, której podwyższony poziom wykazaliśmy w EVs wydzielanych przez ulegające starzeniu replikacyjnemu jak i przyspieszonemu komórki VSMC. Trombospondyna, w zależności od interakcji z wieloma receptorami, może odgrywać rolę prozapalną jak również przeciwzapalną w wielu chorobach (Lopez-Dee i wsp. 2011). Wykazano, że THSB1 działa jako inhibitor aktywacji limfocytów T obniżając ekspresję CD69 i poziomu IL-2 w tych komórkach (Li i wsp. 2001). Z kolei badania Vallejo i wsp. dowiodły, że trombospondyna może być wykorzystywana przez limfocyty T jako alternatywny niezależny od CD28 kostymulator TCR/CD3 w reumatoidalnym zapaleniu błony maziowej (Vallejo i wsp. 2001). Ponadto Li i wsp. Wykazał, że EVs wydzielane przez mezenchymalne komórki zrębowe grasicy (tMSC) traktowane LPS zawierają podwyższony poziom THSB1 w porównaniu z nietraktowanymi tMSC. Hodowanie limfocytów CD4⁺ z EVs pochodzącymi z LPS-tMSC powodowało zahamowanie proliferacji limfocytów T i sprzyjało różnicowaniu CD4⁺ w komórki Th1 i Th17 (Li i wsp. 2021).

Wyniki naszych doświadczeń sugerują zatem, że trombosondyna obecna w sekretomie ulegających starzeniu komórek mięśni gładkich może być jednym z białek potencjalnie zaangażowanym w regulację aktywacji limfocytów T.

W ramach prowadzonych przez nas badań analizowaliśmy także wpływ czynników SASP na migrację limfocytów T. Wykazaliśmy, że czynniki wydzielane przez ulegające starzeniu komórki VSMC (SIPS I, SIPS IV, RS) oraz komórki izolowane z blaszek miażdżycowych promują migrację limfocytów T. Niemniej wpływ ten nie różnił się istotnie od wpływu czynników wydzielanych przez młode komórki VSMC. Uzyskane przez nas wyniki stoją w sprzeczności z danymi opublikowanymi przez Gardner'a i wsp. (Gardner i wsp. 2015), którzy to pokazali istotny wpływ czynników wydzielanych przez stare komórki mięśni gładkich na zwiększoną migrację monocytów i limfocytów. Warto jednak zauważyć, że w badaniach prowadzonych przez Gardnera i wsp. do indukcji starzenia komórek mięśni gładkich wykorzystywano bleomycynę. Biorąc pod uwagę dużą zmienność sekretomu zależną również od induktora starzenia, różnice w uzyskanych przez nas i Gardnera wynikach można częściowo przypisać właśnie temu czynnikowi.

Komórki układu odpornościowego, w tym limfocyty T, znajdujące się w blaszce miażdżycowej wykazują oznaki aktywacji, a aktywacja limfocytów T może prowadzić do kilku typów odpowiedzi efektorowych i wydzielania szeregu cytokin (Hansson i wsp. 2006). Liczne badania przeprowadzone na mysich modelach doświadczalnych, a także na próbkach *ex vivo* pobranych od pacjentów, wykazały obecność w blaszce miażdżycowej różnych subpopulacji limfocytów T, które miały potencjał promiażdżycowy lub przeciwmiażdżycowy. Wykazaliśmy, że czynniki wydzielane przez komórki VSMC ulegające starzeniu w warunkach *in vitro*, zwłaszcza SIPS IV i RS, powodują wzrost sekrecji niemal wszystkich analizowanych cytokin przez limfocyty T. Zaobserwowaliśmy, że czynniki wydzielane przez komórki SIPS IV, RS oraz pochodzące z blaszek miażdżycowych (AP) istotnie statystycznie podnoszą poziom wydzielanego przez limfocyty T interferonu gamma ($IFN\gamma$). $IFN\gamma$ jest cytokiną prozapalną, która sprzyja tworzeniu się blaszki miażdżycowej i wydzielana jest przez typ limfocytów T pomocniczych, który jest najbardziej rozpowszechniony w miażdżycy (Hansson i wsp. 2006). Zaobserwowaliśmy także istotny wzrost poziomu IL-17A wydzielanej przez limfocyty T eksponowane na czynniki wydzielane przez komórki SIPS IV oraz pochodzące z blaszek (AP). Badania przeprowadzone na ludziach nie dają jednoznacznej odpowiedzi dotyczącej roli IL-17A w miażdżycy (Akhavanpoor i wsp. 2017). Z jednej strony IL-17A może przyczyniać się do niestabilności blaszek miażdżycowych i rozwoju choroby

(Erbel i wsp. 2011), z drugiej zaś wykazano, że IL-17A stymulowała produkcję kolagenu przez ludzkie komórki mięśni gładkich naczyń, przyczyniając się tym samym do stabilizacji blaszki (Gistera i wsp. 2013). Wyższy poziom wydzielanej IL-17A i IFN- γ wykazano również w hodowli ludzkich limfocytów T pochodzących z blaszki w porównaniu z limfocytami T wyizolowanymi z naczyń zdrowych po stymulacji poliklonalnej (Eid i wsp. 2009), co sugeruje, że to właśnie komórki stare obecne w blaszkach mogą przyczynić się do stymulacji produkcji powyższych cytokin *in vivo*. Wykazaliśmy także, iż czynniki wydzielane przez stare komórki VSMC (SIPS I, SIPS IV, RS, AP) istotnie statystycznie podnoszą poziom wydzielanej przez limfocyty T IL-4. W badaniach genetycznie modyfikowanych, hipercholesterolemicznych myszy apoE^{-/-} i Ldlr^{-/-} wykazano proaterogenne działanie tej interleukiny (King i wsp. 2002, Davenport i Tipping 2003).

Zbadaliśmy także wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na produkcję określonych cytokin przez limfocyty T. Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazaliśmy, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez ulegające starzeniu VSMC sprzyjają zwiększonej produkcji IL-17a przez limfocyty T. Wykazaliśmy również, iż senEVs indukują wydzielanie INF- γ (SIPS) i IL-10 (RS). Co ciekawe, INF- γ jest cytokiną prozapalną pełniącą rolę proaterogenną, podczas gdy IL-10 działa ochronnie (Saigusa i wsp. 2020).

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych analiz wykazaliśmy, że czynniki wydzielane przez ulegające starzeniu komórki VSMC, a w szczególności pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, mogą zwiększać wydzielanie określonych cytokin przez limfocyty T i w ten sposób aktywnie modulować środowisko zapalne blaszki miażdżycowej.

Oprócz limfocytów T, najliczniejszymi komórkami odpornościowymi występującymi w blaszce miażdżycowej są monocyty i makrofagi. Odgrywają one szczególną rolę w akumulacji cholesterolu, przebudowie macierzy, wydzielaniu cytokin oraz usuwaniu resztek martwych komórek. Monocyty naciekające blaszkę miażdżycową mogą różnicować w makrofagi zapalne lub przeciwzapalne. W opublikowanej przez nas pracy (Gluchowska i wsp. 2022) wykazaliśmy także wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC na różnicowanie monocytów o polaryzacji M1/M2, które charakteryzują się prozapalnymi właściwościami. Co więcej, senEVs wydzielane przez VSMC znacząco zwiększały poziom TNF- α wydzielanego przez monocyty pośrednie (CD14⁺CD16⁺) i nieklasyczne (C14⁺CD16⁺⁺). Wykazano, że TNF- α odgrywa kluczową

rolę w rozwoju miażdżycy (Branen i wsp. 2004), a jej niedobór przyczynia się do zmniejszenia stanu zapalnego blaszki miażdżycowej (Ohta i wsp. 2005).

Przeprowadzone przez nas badania wskazują, że składniki SASP, w tym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wydzielane przez ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich naczyń wpływają na funkcje komórek układu odpornościowego. Co więcej, mogą przyczyniać się do powstawania stanu zapalnego poprzez stymulację wydzielania cytokin prozapalnych przez limfocyty T i monocyty. Zatem uzyskane przez nas wyniki wzmacniają rolę komórek starych VSMC jako ważnego czynnika wywołującego stan zapalny w miażdżycy.

6. Podsumowanie i wnioski

6.1 Podsumowanie

- Scharakteryzowano i porównano fenotyp starzenia przyspieszonego ludzkich komórek mięśni gładkich aorty, preadipocytów oraz fibroblastów indukowanych za pomocą doksorubicyny oraz nadtlenu wodoru.
- Wykazano, że zarówno komórki indukowane do starzenia, jak i będące w stanie spoczynku, charakteryzowały się spadkiem potencjału proliferacyjnego. Niemniej, populacje tych komórek różniły się rozkładem komórek w różnych fazach cyklu komórkowego.
- Wykazano różnice w poziomie wybranych białek pomiędzy komórkami proliferującymi i częściowo zatrzymanymi w cyklu, a komórkami starymi, nieproliferującymi.
- Scharakteryzowano i porównano starzenie replikacyjne i przyspieszone ludzkich komórek mięśni gładkich aorty na wczesnym i późnym etapie tego procesu.
- Wykazano, że fenotyp komórek starych zmienia się, a pewne zmiany obserwowane na wczesnych etapach pogłębiają się w miarę upływu czasu od zatrzymania proliferacji i osiągnięcia maksymalnego poziomu starzenia w badanej populacji, definiowanych jako największa liczba komórek o podwyższonej aktywności SA- β -gal i najmniejsza liczba komórek zdolnych do wbudowywania BrdU. Cechami fenotypu starzenia, które zmieniały się wraz z czasem były: aktywność SA- β -gal, spadek poziomu białka HMGB1 i laminy B1 oraz wzrost poziomu białka p16. Co więcej fenotyp komórek starych, będących na późnym etapie jest zbliżony do fenotypu komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu i różni się od komórek na wczesnych etapach starzenia.
- Wykazano, że ludzkie komórki mięśni gładkich wyizolowane z blaszek miażdżycowych są wzbogacone o populację komórek starych (starzenie *in vivo*).
- W komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych wykazano spadek poziomu białek: Ki67, laminy B1, HMGB1, cykliny B1, PCNA, który obserwowano także w komórkach VSMC ulegających starzeniu w warunkach *in vitro*. W komórkach tych obserwowano także podwyższony poziom białek p21 oraz p16.
- Wykazano, że komórki mięśni gładkich ulegające starzeniu *in vitro* oraz *in vivo* charakteryzują się zwiększonym wydzielaniem określonych białek. Co więcej, biorąc pod uwagę skład białkowy sekretomu, stwierdzono, że profil wydzielniczy komórek mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych w znacznym stopniu przypomina profil wydzielniczy komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz przyspieszonemu na późnym etapie tego procesu

- Wykazano, że ulegające starzeniu komórki mięśni gładkich aorty (RS i SIPS) wydzielają zdecydowanie więcej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych aniżeli komórki młode. Nie zaobserwowano różnic w ilości wydzielanych EVs pomiędzy tymi dwoma typami starzenia.
- Analiza proteomiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz czynników rozpuszczalnych wykazała różnice w składzie sekretomu komórek młodych i starych, jak i pomiędzy starymi (RS vs SIPS).
- Wykazano, że czynniki wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty wpływają na aktywację ludzkich limfocytów T, niemniej EVs mogą regulować aktywację komórek układu odpornościowego poprzez częściowe jej hamowanie.
- Czynniki wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty, w tym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, promują sekrecję niektórych cytokin produkowanych przez limfocyty T.

6.2 Wnioski

1. Białka lamina B1, HMGB1, PARP1 oraz cyklina B1 są uniwersalnymi markerami rozróżniającymi komórki stare od komórek proliferujących i częściowo zatrzymanych w cyklu komórkowym.
2. Podwyższony poziom białka p16 może występować na określonym etapie procesu starzenia, lub być zależnym od czynnika wywołującego starzenie. Kwestionuje to wykorzystanie analizy poziomu tego białka, jako wiarygodnego markera komórek starych.
3. Podwyższony poziom białek p21 i p16 w komórkach mięśni gładkich izolowanych z blaszek miażdżycowych może świadczyć o różnicach w procesie starzenia zachodzącego w warunkach hodowli *in vitro* i w organizmie.
4. Fenotyp sekrecyjny komórek starych różni się ilościowo i jakościowo pod względem wydzielanych czynników w czasie i w zależności od rodzaju starzenia, co dowodzi jego złożoności i różnorodności, jak również może wskazywać na odmienne funkcje pełnione w tkance.
5. Czynniki wydzielane przez stare komórki mięśni gładkich aorty, w tym pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wpływają na funkcjonowanie limfocytów T, promując rozwój stanu zapalnego bezpośrednio w blaszkach miażdżycowych.

7. Bibliografia

- Aird, K. M. and R. Zhang (2013). "Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)." Methods Mol Biol **965**: 185-196.
- Akhavanpoor, M., H. Akhavanpoor, C. A. Gleissner, S. Wangler, A. O. Doesch, H. A. Katus and C. Erbel (2017). "The Two Faces of Interleukin-17A in Atherosclerosis." Curr Drug Targets **18**(7): 863-873.
- Alessio, N., M. B. Acar, T. Squillaro, D. Aprile, S. Ayaz-Guner, G. Di Bernardo, . . . U. Galderisi (2023). "Progression of irradiated mesenchymal stromal cells from early to late senescence: Changes in SASP composition and anti-tumour properties." Cell Prolif **56**(6): e13401.
- Alvarez, D., N. Cardenes, J. Sellares, M. Bueno, C. Corey, V. S. Hanumanthu, . . . M. Rojas (2017). "IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **313**(6): L1164-L1173.
- Armanios, M. (2009). "Syndromes of telomere shortening." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 45-61.
- Baietti, M. F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, . . . G. David (2012). "Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes." Nat Cell Biol **14**(7): 677-685.
- Baker, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, . . . J. M. van Deursen (2016). "Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan." Nature **530**(7589): 184-189.
- Baker, D. J. and J. M. Sedivy (2013). "Probing the depths of cellular senescence." J Cell Biol **202**(1): 11-13.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, . . . J. M. van Deursen (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." Nature **479**(7372): 232-236.
- Bakhshian Nik, A., J. D. Hutcheson and E. Aikawa (2017). "Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification." Front Cardiovasc Med **4**: 78.
- Basatemur, G. L., H. F. Jorgensen, M. C. H. Clarke, M. R. Bennett and Z. Mallat (2019). "Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **16**(12): 727-744.
- Basisty, N., A. Kale, O. H. Jeon, C. Kuehnemann, T. Payne, C. Rao, . . . B. Schilling (2020). "A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development." PLoS Biol **18**(1): e3000599.
- Bennett, M. R. and J. J. Boyle (1998). "Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis." Atherosclerosis **138**(1): 3-9.

Bennett, M. R., G. I. Evan and S. M. Schwartz (1995). "Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques." J Clin Invest **95**(5): 2266-2274.

Bennett, M. R., S. Sinha and G. K. Owens (2016). "Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis." Circ Res **118**(4): 692-702.

Berencsi, K., P. Rani, T. Zhang, L. Gross, M. Mastrangelo, N. J. Meropol, . . . R. Somasundaram (2011). "In vitro migration of cytotoxic T lymphocyte derived from a colon carcinoma patient is dependent on CCL2 and CCR2." J Transl Med **9**: 33.

Bhat, R., E. P. Crowe, A. Bitto, M. Moh, C. D. Katsetos, F. U. Garcia, . . . C. Torres (2012). "Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease." PLoS One **7**(9): e45069.

Bielak-Zmijewska, A., W. Grabowska and D. Przybylska (2014). "[Impact of cellular senescence on organismal aging and age-related diseases]." Postepy Biochem **60**(2): 147-160.

Bielak-Zmijewska, A., M. Wnuk, D. Przybylska, W. Grabowska, A. Lewinska, O. Alster, . . . E. Sikora (2014). "A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta." Biogerontology **15**(1): 47-64.

Biran, A., L. Zada, P. Abou Karam, E. Vadai, L. Roitman, Y. Ovadya, . . . V. Krizhanovsky (2017). "Quantitative identification of senescent cells in aging and disease." Aging Cell **16**(4): 661-671.

Blasco, M. A. (2007). "Telomere length, stem cells and aging." Nat Chem Biol **3**(10): 640-649.

Bojko, A., J. Czarnecka-Herok, A. Charzynska, M. Dabrowski and E. Sikora (2019). "Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents." Cells **8**(12).

Borghesan, M., J. Fafian-Labora, O. Eleftheriadou, P. Carpintero-Fernandez, M. Paez-Ribes, G. Vizcay-Barrena, . . . A. O'Loughlen (2019). "Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3." Cell Rep **27**(13): 3956-3971 e3956.

Branen, L., L. Hovgaard, M. Nitulescu, E. Bengtsson, J. Nilsson and S. Jovinge (2004). "Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2137-2142.

- Burton, D. G., A. N. Sheerin, E. L. Ostler, K. Smith, P. J. Giles, J. Lowe, . . . R. G. Faragher (2007). "Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells." Ann N Y Acad Sci **1119**: 20-31.
- Caldini, R., M. Chevanne, A. Mocali, D. Tombaccini and F. Paoletti (1998). "Premature induction of aging in sublethally H₂O₂-treated young MRC5 fibroblasts correlates with increased glutathione peroxidase levels and resistance to DNA breakage." Mech Ageing Dev **105**(1-2): 137-150.
- Campisi, J. (2001). "From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture?" Exp Gerontol **36**(4-6): 607-618.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 685-705.
- Cardoso, A. L., A. Fernandes, J. A. Aguilar-Pimentel, M. H. de Angelis, J. R. Guedes, M. A. Brito, . . . A. U. Trendelenburg (2018). "Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases." Ageing Res Rev **47**: 214-277.
- Carrel, A. and A. H. Ebeling (1921). "The Multiplication of Fibroblasts in Vitro." J Exp Med **34**(4): 317-337.
- Cartwright, M. J., K. Schlauch, M. E. Lenburg, T. Tchkonina, T. Pirtskhalava, A. Cartwright, . . . J. L. Kirkland (2010). "Aging, depot origin, and preadipocyte gene expression." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(3): 242-251.
- Celletti, F. L., J. M. Waugh, P. G. Amabile, A. Brendolan, P. R. Hilfiker and M. D. Dake (2001). "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." Nat Med **7**(4): 425-429.
- Chambers, C. R., S. Ritchie, B. A. Pereira and P. Timpson (2021). "Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer." Mol Oncol **15**(12): 3242-3255.
- Chevanne, M., C. Calia, M. Zampieri, B. Cecchinelli, R. Caldini, D. Monti, . . . P. Caiafa (2007). "Oxidative DNA damage repair and parp 1 and parp 2 expression in Epstein-Barr virus-immortalized B lymphocyte cells from young subjects, old subjects, and centenarians." Rejuvenation Res **10**(2): 191-204.
- Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, . . . S. W. Lowe (2011). "Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity." Genes Dev **25**(20): 2125-2136.
- Chierico, L., L. Rizzello, L. Guan, A. S. Joseph, A. Lewis and G. Battaglia (2017). "The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells." PLoS One **12**(2): e0171815.
- Childs, B. G., D. J. Baker, T. Wijshake, C. A. Conover, J. Campisi and J. M. van Deursen (2016). "Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis." Science **354**(6311): 472-477.
- Childs, B. G., M. Durik, D. J. Baker and J. M. van Deursen (2015). "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." Nat Med **21**(12): 1424-1435.

- Chinta, S. J., G. Woods, M. Demaria, A. Rane, Y. Zou, A. McQuade, . . . J. K. Andersen (2018). "Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease." Cell Rep **22**(4): 930-940.
- Choi, E. J., I. S. Kil and E. G. Cho (2020). "Extracellular Vesicles Derived from Senescent Fibroblasts Attenuate the Dermal Effect on Keratinocyte Differentiation." Int J Mol Sci **21**(3).
- Christ, A., S. Bekkering, E. Latz and N. P. Riksen (2016). "Long-term activation of the innate immune system in atherosclerosis." Semin Immunol **28**(4): 384-393.
- Cohn, R. L., N. S. Gasek, G. A. Kuchel and M. Xu (2023). "The heterogeneity of cellular senescence: insights at the single-cell level." Trends Cell Biol **33**(1): 9-17.
- Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response." Nat Rev Cancer **8**(7): 512-522.
- Davalos, A. R., M. Kawahara, G. K. Malhotra, N. Schaum, J. Huang, U. Ved, . . . J. Campisi (2013). "p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes." J Cell Biol **201**(4): 613-629.
- Davenport, P. and P. G. Tipping (2003). "The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Am J Pathol **163**(3): 1117-1125.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, P. H. Nguyen, G. Lagna and A. Hata (2009). "Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype." J Biol Chem **284**(6): 3728-3738.
- De Cecco, M., S. W. Criscione, E. J. Peckham, S. Hillenmeyer, E. A. Hamm, J. Manivannan, . . . J. M. Sedivy (2013). "Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements." Aging Cell **12**(2): 247-256.
- De Cecco, M., T. Ito, A. P. Petrashen, A. E. Elias, N. J. Skvir, S. W. Criscione, . . . J. M. Sedivy (2019). "L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation." Nature **566**(7742): 73-78.
- de Jager, S. C., B. Bermudez, I. Bot, R. R. Koenen, M. Bot, A. Kavelaars, . . . E. A. Biessen (2011). "Growth differentiation factor 15 deficiency protects against atherosclerosis by attenuating CCR2-mediated macrophage chemotaxis." J Exp Med **208**(2): 217-225.
- de Magalhaes, J. P. and J. F. Passos (2018). "Stress, cell senescence and organismal ageing." Mech Ageing Dev **170**: 2-9.
- Demaria, M., M. N. O'Leary, J. Chang, L. Shao, S. Liu, F. Alimirah, . . . J. Campisi (2017). "Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse." Cancer Discov **7**(2): 165-176.

- Demidenko, Z. N. and M. V. Blagosklonny (2008). "Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked." Cell Cycle **7**(21): 3355-3361.
- Dhore, C. R., J. P. Cleutjens, E. Lutgens, K. B. Cleutjens, P. P. Geusens, P. J. Kitslaar, . . . M. J. Daemen (2001). "Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(12): 1998-2003.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, . . . et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Duan, J., J. Duan, Z. Zhang and T. Tong (2005). "Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening." Int J Biochem Cell Biol **37**(7): 1407-1420.
- Durak-Kozica, M., Z. Baster, K. Kubat and E. Stepien (2018). "3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells." Cell Mol Biol Lett **23**: 57.
- Eid, R. E., D. A. Rao, J. Zhou, S. F. Lo, H. Ranjbaran, A. Gallo, . . . G. Tellides (2009). "Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells." Circulation **119**(10): 1424-1432.
- Eitan, E., C. Suire, S. Zhang and M. P. Mattson (2016). "Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release." Ageing Res Rev **32**: 65-74.
- Erbel, C., T. J. Dengler, S. Wangler, F. Lasitschka, F. Bea, N. Wambsganss, . . . C. A. Gleissner (2011). "Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability." Basic Res Cardiol **106**(1): 125-134.
- Feng, D., W. L. Zhao, Y. Y. Ye, X. C. Bai, R. Q. Liu, L. F. Chang, . . . S. F. Sui (2010). "Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis." Traffic **11**(5): 675-687.
- Fernandez, D. M., A. H. Rahman, N. F. Fernandez, A. Chudnovskiy, E. D. Amir, L. Amadori, . . . C. Giannarelli (2019). "Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques." Nat Med **25**(10): 1576-1588.
- Franceschi, C., F. Olivieri, F. Marchegiani, M. Cardelli, L. Cavallone, M. Capri, . . . D. Monti (2005). "Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians." Mech Ageing Dev **126**(2): 351-361.
- Frippiat, C., J. Dewelle, J. Remacle and O. Toussaint (2002). "Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts." Free Radic Biol Med **33**(10): 1334-1346.
- Fu, G. X., A. F. Chen, Y. Zhong, J. Zhao and Y. J. Gu (2016). "Decreased serum level of HMGB1 and MyD88 during human aging progress in healthy individuals." Ageing Clin Exp Res **28**(2): 175-180.

Fulop, T., A. Le Page, H. Garneau, N. Azimi, S. Baehl, G. Dupuis, . . . A. Larbi (2012). "Aging, immunosenescence and membrane rafts: the lipid connection." Longev Healthspan **1**: 6.

Fumagalli, M., F. Rossiello, M. Clerici, S. Barozzi, D. Cittaro, J. M. Kaplunov, . . . F. d'Adda di Fagagna (2012). "Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation." Nat Cell Biol **14**(4): 355-365.

Fumagalli, M., F. Rossiello, C. Mondello and F. d'Adda di Fagagna (2014). "Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation." PLoS One **9**(10): e110969.

Gardner, S. E., M. Humphry, M. R. Bennett and M. C. Clarke (2015). "Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1alpha-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(9): 1963-1974.

Garrido, A. M., A. Kaistha, A. K. Uryga, S. Oc, K. Foote, A. Shah, . . . M. Bennett (2022). "Efficacy and limitations of senolysis in atherosclerosis." Cardiovasc Res **118**(7): 1713-1727.

Gistera, A., A. K. Robertson, J. Andersson, D. F. Ketelhuth, O. Ovchinnikova, S. K. Nilsson, . . . G. K. Hansson (2013). "Transforming growth factor-beta signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway." Sci Transl Med **5**(196): 196ra100.

Gluchowska, A., D. Cysewski, M. Baj-Krzyworzeka, R. Szatanek, K. Weglarczyk, P. Podszycal, . . . G. Mosieniak (2022). "Unbiased proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by senescent human vascular smooth muscle cells reveals their ability to modulate immune cell functions." Geroscience **44**(6): 2863-2884.

Gluck, S., B. Guey, M. F. Gulen, K. Wolter, T. W. Kang, N. A. Schmacke, . . . A. Ablasser (2017). "Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence." Nat Cell Biol **19**(9): 1061-1070.

Golledge, J., M. McCann, S. Mangan, A. Lam and M. Karan (2004). "Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis." Stroke **35**(7): 1636-1641.

Gorenne, I., M. Kavurma, S. Scott and M. Bennett (2006). "Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis." Cardiovasc Res **72**(1): 9-17.

Gorgoulis, V., P. D. Adams, A. Alimonti, D. C. Bennett, O. Bischof, C. Bishop, . . . M. Demaria (2019). "Cellular Senescence: Defining a Path Forward." Cell **179**(4): 813-827.

Gray, K., S. Kumar, N. Figg, J. Harrison, L. Baker, J. Mercer, . . . M. Bennett (2015). "Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis." Circ Res **116**(5): 816-826.

Grivel, J. C., O. Ivanova, N. Pinegina, P. S. Blank, A. Shpektor, L. B. Margolis and E. Vasilieva (2011). "Activation of T lymphocytes in atherosclerotic plaques." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(12): 2929-2937.

Grootaert, M. O., P. A. da Costa Martins, N. Bitsch, I. Pintelon, G. R. De Meyer, W. Martinet and D. M. Schrijvers (2015). "Defective autophagy in vascular smooth muscle cells

accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis." Autophagy **11**(11): 2014-2032.

Grootaert, M. O. J. and M. R. Bennett (2021). "Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment." Cardiovasc Res **117**(11): 2326-2339.

Grootaert, M. O. J., M. Moulis, L. Roth, W. Martinet, C. Vindis, M. R. Bennett and G. R. Y. De Meyer (2018). "Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis." Cardiovasc Res **114**(4): 622-634.

Guescini, M., S. Genedani, V. Stocchi and L. F. Agnati (2010). "Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA." J Neural Transm (Vienna) **117**(1): 1-4.

Guo, W., T. Pirskhalava, T. Tchkonina, W. Xie, T. Thomou, J. Han, . . . J. L. Kirkland (2007). "Aging results in paradoxical susceptibility of fat cell progenitors to lipotoxicity." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(4): E1041-1051.

Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.

Hansson, G. K., A. K. Robertson and C. Soderberg-Naucler (2006). "Inflammation and atherosclerosis." Annu Rev Pathol **1**: 297-329.

Hashimoto, Y., H. Sugiura, S. Togo, A. Koarai, K. Abe, M. Yamada, . . . M. Ichinose (2016). "27-Hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **310**(11): L1028-1041.

Hayflick, L. (1965). "Tissue cultures and mycoplasmas." Tex Rep Biol Med **23**: Suppl 1:285+.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

Herranz, N. and J. Gil (2018). "Mechanisms and functions of cellular senescence." J Clin Invest **128**(4): 1238-1246.

Hsiao, Y. T., I. Shimizu, Y. Yoshida and T. Minamino (2022). "Role of circulating molecules in age-related cardiovascular and metabolic disorders." Inflamm Regen **42**(1): 2.

Hua, F. and Y. Tian (2017). "CCL4 promotes the cell proliferation, invasion and migration of endometrial carcinoma by targeting the VEGF-A signal pathway." Int J Clin Exp Pathol **10**(11): 11288-11299.

Isenberg, J. S. and D. D. Roberts (2020). "Thrombospondin-1 in maladaptive aging responses: a concept whose time has come." Am J Physiol Cell Physiol **319**(1): C45-C63.

Ivanov, A., J. Pawlikowski, I. Manoharan, J. van Tuyn, D. M. Nelson, T. S. Rai, . . . P. D. Adams (2013). "Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence." J Cell Biol **202**(1): 129-143.

Johnson, J. L. (2014). "Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis." Cardiovasc Res **103**(4): 452-460.

- Kavanagh, E. L., S. Lindsay, M. Halasz, L. C. Gubbins, K. Weiner-Gorzel, M. H. Z. Guang, . . . A. McCann (2017). "Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells." Oncogenesis **6**(10): e388.
- Kee, N., S. Sivalingam, R. Boonstra and J. M. Wojtowicz (2002). "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis." J Neurosci Methods **115**(1): 97-105.
- Kelleher, A. M., R. Setlem, F. Dantzer, F. J. DeMayo, J. P. Lydon and W. L. Kraus (2021). "Deficiency of PARP-1 and PARP-2 in the mouse uterus results in decidualization failure and pregnancy loss." Proc Natl Acad Sci U S A **118**(40).
- Kempf, T., M. Eden, J. Strelau, M. Naguib, C. Willenbockel, J. Tongers, . . . K. C. Wollert (2006). "The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury." Circ Res **98**(3): 351-360.
- Kettler, K., P. Krystek, C. Giannakou, A. J. Hendriks and W. H. de Jong (2016). "Exploring the effect of silver nanoparticle size and medium composition on uptake into pulmonary epithelial 16HBE14o-cells." J Nanopart Res **18**: 182.
- King, V. L., S. J. Szilvassy and A. Daugherty (2002). "Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 456-461.
- Kirkland, J. L., C. H. Hollenberg and W. S. Gillon (1990). "Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors." Am J Physiol **258**(2 Pt 1): C206-210.
- Kirkland, J. L. and T. Tchkonja (2020). "Senolytic drugs: from discovery to translation." J Intern Med **288**(5): 518-536.
- Kong, P., Z. Y. Cui, X. F. Huang, D. D. Zhang, R. J. Guo and M. Han (2022). "Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention." Signal Transduct Target Ther **7**(1): 131.
- Korwek, Z., T. Sewastianik, A. Bielak-Zmijewska, G. Mosieniak, O. Alster, M. Moreno-Villanueva, . . . E. Sikora (2012). "Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells." DNA Repair (Amst) **11**(11): 864-873.
- Koumangoye, R. B., A. M. Sakwe, J. S. Goodwin, T. Patel and J. Ochieng (2011). "Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading." PLoS One **6**(9): e24234.
- Krizhanovsky, V., W. Xue, L. Zender, M. Yon, E. Hernando and S. W. Lowe (2008). "Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 513-522.
- Krzystyniak, A., A. Gluchowska, G. Mosieniak and E. Sikora (2023). "Fiji-Based Tool for Rapid and Unbiased Analysis of SA-beta-Gal Activity in Cultured Cells." Biomolecules **13**(2).

- Kuhn, D. A., D. Vanhecke, B. Michen, F. Blank, P. Gehr, A. Petri-Fink and B. Rothen-Rutishauser (2014). "Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages." Beilstein J Nanotechnol **5**: 1625-1636.
- Larsson, L. G. (2011). "Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence." Semin Cancer Biol **21**(6): 367-376.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, . . . E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." Aging Cell **5**(2): 187-195.
- Lee, S. H., J. H. Lee, H. Y. Lee and K. J. Min (2019). "Sirtuin signaling in cellular senescence and aging." BMB Rep **52**(1): 24-34.
- Lehmann, B. D., M. S. Paine, A. M. Brooks, J. A. McCubrey, R. H. Renegar, R. Wang and D. M. Terrian (2008). "Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells." Cancer Res **68**(19): 7864-7871.
- Lessard, F., S. Igelmann, C. Trahan, G. Huot, E. Saint-Germain, L. Mignacca, . . . G. Ferbeyre (2018). "Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway." Nat Cell Biol **20**(7): 789-799.
- Li, L. T., G. Jiang, Q. Chen and J. N. Zheng (2015). "Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review)." Mol Med Rep **11**(3): 1566-1572.
- Li, P., M. Hou, F. Lou, M. Bjorkholm and D. Xu (2012). "Telomere dysfunction induced by chemotherapeutic agents and radiation in normal human cells." Int J Biochem Cell Biol **44**(9): 1531-1540.
- Li, Q., J. Li, L. Sun, Y. Sun, F. Zhao, P. Liu, . . . Y. Du (2021). "Exosomes derived from LPS-stimulated human thymic mesenchymal stromal cells enhance inflammation via thrombospondin-1." Biosci Rep **41**(10).
- Li, Z., L. He, K. Wilson and D. Roberts (2001). "Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation." J Immunol **166**(4): 2427-2436.
- Lopez-Dee, Z., K. Pidcock and L. S. Gutierrez (2011). "Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation." Mediators Inflamm **2011**: 296069.
- Lou, Z. and J. Chen (2006). "Cellular senescence and DNA repair." Exp Cell Res **312**(14): 2641-2646.
- Lu, H., Z. Zhang, P. A. Barnie and Z. Su (2019). "Dual faced HMGB1 plays multiple roles in cardiomyocyte senescence and cardiac inflammatory injury." Cytokine Growth Factor Rev **47**: 74-82.
- Lujambio, A., L. Akkari, J. Simon, D. Grace, D. F. Tschaharganeh, J. E. Bolden, . . . S. W. Lowe (2013). "Non-cell-autonomous tumor suppression by p53." Cell **153**(2): 449-460.
- Mao, J., X. Li, W. Chen, B. Xu, H. Zhang, H. Li, . . . L. Chen (2012). "Cell cycle-dependent subcellular distribution of ClC-3 in HeLa cells." Histochem Cell Biol **137**(6): 763-776.

- Marescal, O. and I. M. Cheeseman (2020). "Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence." Dev Cell **55**(3): 259-271.
- Mateos, J. T., J. Fernandez-Saez, J. Marcos-Marcos, C. Alvarez-Dardet, C. Bambra, J. Popay, . . . F. Baum (2022). "Gender Equality and the Global Gender Gap in Life Expectancy: An Exploratory Analysis of 152 Countries." Int J Health Policy Manag **11**(6): 740-746.
- Matthews, C., I. Gorenne, S. Scott, N. Figg, P. Kirkpatrick, A. Ritchie, . . . M. Bennett (2006). "Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress." Circ Res **99**(2): 156-164.
- McHugh, D. and J. Gil (2018). "Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues." J Cell Biol **217**(1): 65-77.
- Mensa, E., M. Guescini, A. Giuliani, M. G. Bacalini, D. Ramini, G. Corleone, . . . F. Olivieri (2020). "Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells." J Extracell Vesicles **9**(1): 1725285.
- Mikula-Pietrasik, J., P. Sosinska, J. Janus, B. Rubis, M. Brewinska-Olchowik, K. Piwocka and K. Ksiazek (2013). "Bystander senescence in human peritoneal mesothelium and fibroblasts is related to thrombospondin-1-dependent activation of transforming growth factor-beta1." Int J Biochem Cell Biol **45**(9): 2087-2096.
- Minamino, T. (2010). "Role of cellular senescence in lifestyle-related disease." Circ J **74**(12): 2527-2533.
- Minamino, T., M. Orimo, I. Shimizu, T. Kunieda, M. Yokoyama, T. Ito, . . . I. Komuro (2009). "A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance." Nat Med **15**(9): 1082-1087.
- Moller, A. and R. J. Lobb (2020). "The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer." Nat Rev Cancer **20**(12): 697-709.
- Mori, H., S. Torii, M. Kutyna, A. Sakamoto, A. V. Finn and R. Virmani (2018). "Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean?" JACC Cardiovasc Imaging **11**(1): 127-142.
- Mosieniak, G., M. Adamowicz, O. Alster, H. Jaskowiak, A. A. Szczepankiewicz, G. M. Wilczynski, . . . E. Sikora (2012). "Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy." Mech Ageing Dev **133**(6): 444-455.
- Mosieniak, G., M. A. Sliwinska, O. Alster, A. Strzeszewska, P. Sunderland, M. Piechota, . . . E. Sikora (2015). "Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence." Neoplasia **17**(12): 882-893.
- Mulcahy, L. A., R. C. Pink and D. R. Carter (2014). "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake." J Extracell Vesicles **3**.
- Munoz, M., G. Penarossa, J. N. Caamano, C. Diez, T. A. Brevini and E. Gomez (2015). "Research with parthenogenetic stem cells will help decide whether a safer clinical use is possible." J Tissue Eng Regen Med **9**(4): 325-331.

- Nakano-Kurimoto, R., K. Ikeda, M. Uraoka, Y. Nakagawa, K. Yutaka, M. Koide, . . . H. Matsubara (2009). "Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(5): H1673-1684.
- Niccoli, T. and L. Partridge (2012). "Ageing as a risk factor for disease." Curr Biol **22**(17): R741-752.
- Nishio, K. and A. Inoue (2005). "Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts." Histochem Cell Biol **123**(3): 263-273.
- O'Brien, E. R., M. R. Garvin, D. K. Stewart, T. Hinohara, J. B. Simpson, S. M. Schwartz and C. M. Giachelli (1994). "Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques." Arterioscler Thromb **14**(10): 1648-1656.
- Ogrodnik, M. (2021). "Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo." Aging Cell **20**(4): e13338.
- Ogrodnik, M., Y. Zhu, L. G. P. Langhi, T. Tchkonina, P. Kruger, E. Fielder, . . . D. Jurk (2019). "Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis." Cell Metab **29**(5): 1061-1077 e1068.
- Ohta, H., H. Wada, T. Niwa, H. Kirii, N. Iwamoto, H. Fujii, . . . M. Seishima (2005). "Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Atherosclerosis **180**(1): 11-17.
- Ostrowski, M., N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, . . . C. Thery (2010). "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway." Nat Cell Biol **12**(1): 19-30; sup pp 11-13.
- Otsuka, F., M. Joner, F. Prati, R. Virmani and J. Narula (2014). "Clinical classification of plaque morphology in coronary disease." Nat Rev Cardiol **11**(7): 379-389.
- Palumbo, R., B. G. Galvez, T. Pusterla, F. De Marchis, G. Cossu, K. B. Marcu and M. E. Bianchi (2007). "Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation." J Cell Biol **179**(1): 33-40.
- Pan, B. T. and R. M. Johnstone (1983). "Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor." Cell **33**(3): 967-978.
- Passos, J. F., G. Nelson, C. Wang, T. Richter, C. Simillion, C. J. Proctor, . . . T. von Zglinicki (2010). "Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence." Mol Syst Biol **6**: 347.
- Paudel, K. R., N. Panth and D. W. Kim (2016). "Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression." Scientifica (Cairo) **2016**: 8514056.
- Peng, M., X. Liu and G. Xu (2020). "Extracellular Vesicles as Messengers in Atherosclerosis." J Cardiovasc Transl Res **13**(2): 121-130.

Piechota, M., P. Sunderland, A. Wysocka, M. Nalberczak, M. A. Sliwinska, K. Radwanska and E. Sikora (2016). "Is senescence-associated beta-galactosidase a marker of neuronal senescence?" Oncotarget **7**(49): 81099-81109.

Proudfoot, D., J. N. Skepper, L. Hegyi, M. R. Bennett, C. M. Shanahan and P. L. Weissberg (2000). "Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies." Circ Res **87**(11): 1055-1062.

Przybylska, D., D. Janiszewska, A. Gozdzik, A. Bielak-Zmijewska, P. Sunderland, E. Sikora and G. Mosieniak (2016). "NOX4 downregulation leads to senescence of human vascular smooth muscle cells." Oncotarget **7**(41): 66429-66443.

Ribatti, D., F. Levi-Schaffer and P. T. Kovanen (2008). "Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword." Ann Med **40**(8): 606-621.

Riquelme, J. A., K. Takov, C. Santiago-Fernandez, X. Rossello, S. Lavandero, D. M. Yellon and S. M. Davidson (2020). "Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells." J Cell Mol Med **24**(8): 4871-4876.

Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." J Cell Biol **192**(4): 547-556.

Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, . . . J. Campisi (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." Nat Cell Biol **11**(8): 973-979.

Rognoni, A., C. Cavallino, A. Veia, S. Bacchini, R. Rosso, M. Facchini, . . . A. S. Bongo (2015). "Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **13**(1): 10-13.

Ross, R. (1976). "Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors." Triangle **15**(2-3): 45-51.

Ruiz, J. L., S. Weinbaum, E. Aikawa and J. D. Hutcheson (2016). "Zooming in on the genesis of atherosclerotic plaque microcalcifications." J Physiol **594**(11): 2915-2927.

Saigusa, R., H. Winkels and K. Ley (2020). "T cell subsets and functions in atherosclerosis." Nat Rev Cardiol **17**(7): 387-401.

Sauerzweig, S., K. Baldauf, H. Braun and K. G. Reymann (2009). "Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker." J Neurosci Methods **177**(1): 149-159.

Savina, A. and S. Amigorena (2007). "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells." Immunol Rev **219**: 143-156.

Savina, A., M. Vidal and M. I. Colombo (2002). "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2505-2515.

Schafer, M. J., T. A. White, K. Iijima, A. J. Haak, G. Ligresti, E. J. Atkinson, . . . N. K. LeBrasseur (2017). "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease." Nat Commun **8**: 14532.

Schindowski, K., O. von Bohlen und Halbach, J. Strelau, D. A. Ridder, O. Herrmann, A. Schober, . . . K. Unsicker (2011). "Regulation of GDF-15, a distant TGF-beta superfamily member, in a mouse model of cerebral ischemia." Cell Tissue Res **343**(2): 399-409.

Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.

Schorey, J. S. and C. V. Harding (2016). "Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story." J Clin Invest **126**(4): 1181-1189.

Sedelnikova, O. A., I. Horikawa, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, W. M. Bonner and J. C. Barrett (2004). "Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks." Nat Cell Biol **6**(2): 168-170.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.

Seshadri, T., J. A. Uzman, J. Oshima and J. Campisi (1993). "Identification of a transcript that is down-regulated in senescent human fibroblasts. Cloning, sequence analysis, and regulation of the human L7 ribosomal protein gene." J Biol Chem **268**(25): 18474-18480.

Severino, J., R. G. Allen, S. Balin, A. Balin and V. J. Cristofalo (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" Exp Cell Res **257**(1): 162-171.

Shah, P. P., G. Donahue, G. L. Otte, B. C. Capell, D. M. Nelson, K. Cao, . . . S. L. Berger (2013). "Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape." Genes Dev **27**(16): 1787-1799.

Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska and G. Mosieniak (2019). "Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy." Ageing Res Rev **55**: 100941.

Sikora, E., A. Bielak-Zmijewska and G. Mosieniak (2021). "A common signature of cellular senescence; does it exist?" Ageing Res Rev **71**: 101458.

Sliwinska, M. A., G. Mosieniak, K. Wolanin, A. Babik, K. Piwocka, A. Magalska, . . . E. Sikora (2009). "Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells." Mech Ageing Dev **130**(1-2): 24-32.

Smith, E. J., G. Leone, J. DeGregori, L. Jakoi and J. R. Nevins (1996). "The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state." Mol Cell Biol **16**(12): 6965-6976.

Sobecki, M., K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisi, E. Nicolas, D. Lleres, . . . D. Fisher (2016). "The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin." Elife **5**: e13722.

Sobecki, M., K. Mrouj, J. Colinge, F. Gerbe, P. Jay, L. Krasinska, . . . D. Fisher (2017). "Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels." Cancer Res **77**(10): 2722-2734.

Soehnlein, O. and P. Libby (2021). "Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic." Nat Rev Drug Discov **20**(8): 589-610.

Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Souillard and V. Dulic (1999). "Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts." Mol Cell Biol **19**(3): 2109-2117.

Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, . . . W. M. Keyes (2013). "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning." Cell **155**(5): 1119-1130.

Strobescu-Ciobanu, C., S. E. Giusca, I. D. Caruntu, C. Amalinei, A. Rusu, E. Cojocaru, . . . C. D. Lupascu (2020). "Osteopontin and osteoprotegerin in atherosclerotic plaque - are they significant markers of plaque vulnerability?" Rom J Morphol Embryol **61**(3): 793-801.

Strzeszewska, A., O. Alster, G. Mosieniak, A. Ciolko and E. Sikora (2018). "Insight into the role of PIKK family members and NF-small ka, CyrillicB in DNA damage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells." Cell Death Dis **9**(2): 44.

Stuffers, S., C. Sem Wegner, H. Stenmark and A. Brech (2009). "Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs." Traffic **10**(7): 925-937.

Sueishi, K., Y. Yonemitsu, K. Nakagawa, Y. Kaneda, M. Kumamoto and Y. Nakashima (1997). "Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor." Ann N Y Acad Sci **811**: 311-322; 322-314.

Suffee, N., B. Richard, H. Hlawaty, O. Oudar, N. Charneau and A. Sutton (2011). "Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5." Biochem Soc Trans **39**(6): 1649-1653.

Sun, X. and P. D. Kaufman (2018). "Ki-67: more than a proliferation marker." Chromosoma **127**(2): 175-186.

Suram, A., J. Kaplunov, P. L. Patel, H. Ruan, A. Cerutti, V. Boccardi, . . . U. Herbig (2012). "Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions." EMBO J **31**(13): 2839-2851.

Takahashi, A., R. Okada, K. Nagao, Y. Kawamata, A. Hanyu, S. Yoshimoto, . . . E. Hara (2017). "Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells." Nat Commun **8**: 15287.

Takasugi, M. (2018). "Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging." Aging Cell **17**(2).

Takasugi, M., R. Okada, A. Takahashi, D. Virya Chen, S. Watanabe and E. Hara (2017). "Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2." Nat Commun **8**: 15729.

Takasugi, M., Y. Yoshida, E. Hara and N. Ohtani (2023). "The role of cellular senescence and SASP in tumour microenvironment." FEBS J **290**(5): 1348-1361.

Tan, F. C., E. R. Hutchison, E. Eitan and M. P. Mattson (2014). "Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders?" Biogerontology **15**(6): 643-660.

- Tchkonia, T., T. Pirtskhalava, T. Thomou, M. J. Cartwright, B. Wise, I. Karagiannides, . . . J. L. Kirkland (2007). "Increased TNFalpha and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein with aging predispose preadipocytes to resist adipogenesis." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(6): E1810-1819.
- Tchkonia, T., Y. Zhu, J. van Deursen, J. Campisi and J. L. Kirkland (2013). "Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities." J Clin Invest **123**(3): 966-972.
- Tedgui, A. and Z. Mallat (2006). "Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways." Physiol Rev **86**(2): 515-581.
- Terlecki-Zaniewicz, L., I. Lammermann, J. Latreille, M. R. Bobbili, V. Pils, M. Schosserer, . . . J. Grillari (2018). "Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype." Aging (Albany NY) **10**(5): 1103-1132.
- They, C., S. Amigorena, G. Raposo and A. Clayton (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 22.
- They, C., K. W. Witwer, E. Aikawa, M. J. Alcaraz, J. D. Anderson, R. Andriantsitohaina, . . . E. K. Zuba-Surma (2018). "Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines." J Extracell Vesicles **7**(1): 1535750.
- Tkach, M. and C. They (2016). "Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go." Cell **164**(6): 1226-1232.
- Tomas-Loba, A., I. Flores, P. J. Fernandez-Marcos, M. L. Cayuela, A. Maraver, A. Tejera, . . . M. A. Blasco (2008). "Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice." Cell **135**(4): 609-622.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, . . . M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.
- Vallejo, A. N., C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2001). "Functional disruption of the CD28 gene transcriptional initiator in senescent T cells." J Biol Chem **276**(4): 2565-2570.
- van der Vorst, E. P. C., R. J. de Jong and M. Donners (2018). "Message in a Microbottle: Modulation of Vascular Inflammation and Atherosclerosis by Extracellular Vesicles." Front Cardiovasc Med **5**: 2.
- van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." Nature **509**(7501): 439-446.

- Vasile, E., Y. Tomita, L. F. Brown, O. Kocher and H. F. Dvorak (2001). "Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis." FASEB J **15**(2): 458-466.
- von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." Trends Biochem Sci **27**(7): 339-344.
- von Zglinicki, T., T. Wan and S. Miwa (2021). "Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging?" Antioxid Redox Signal **34**(4): 308-323.
- Wallis, R., H. Mizen and C. L. Bishop (2020). "The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype." Mech Ageing Dev **189**: 111263.
- Wang, J., A. K. Uryga, J. Reinhold, N. Figg, L. Baker, A. Finigan, . . . M. Bennett (2015). "Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability." Circulation **132**(20): 1909-1919.
- Weiner-Gorzal, K., E. Dempsey, M. Milewska, A. McGoldrick, V. Toh, A. Walsh, . . . F. Furlong (2015). "Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells." Cancer Med **4**(5): 745-758.
- Wesierska-Gadek, J., C. Ranftler and G. Schmid (2005). "Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence." J Physiol Pharmacol **56 Suppl 2**: 77-88.
- Wiley, C. D. and J. Campisi (2021). "The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention." Nat Metab **3**(10): 1290-1301.
- Wiley, C. D., S. Liu, C. Limbad, A. M. Zawadzka, J. Beck, M. Demaria, . . . P. Kapahi (2019). "SILAC Analysis Reveals Increased Secretion of Hemostasis-Related Factors by Senescent Cells." Cell Rep **28**(13): 3329-3337 e3325.
- Witwer, K. W., E. I. Buzas, L. T. Bemis, A. Bora, C. Lasser, J. Lotvall, . . . F. Hochberg (2013). "Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research." J Extracell Vesicles **2**.
- Wollert, K. C., T. Kempf, T. Peter, S. Olofsson, S. James, N. Johnston, . . . L. Wallentin (2007). "Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome." Circulation **115**(8): 962-971.
- Wong, S. Q., A. V. Kumar, J. Mills and L. R. Lapierre (2020). "Autophagy in aging and longevity." Hum Genet **139**(3): 277-290.
- Wu, S., S. Xu, R. Li, K. Li, X. Zhong, Y. Li, . . . F. Liu (2019). "mTORC1-Rps15 Axis Contributes to the Mechanisms Underlying Global Translation Reduction During Senescence of Mouse Embryonic Fibroblasts." Front Cell Dev Biol **7**: 337.
- Yao, Z., Y. Qiao, X. Li, J. Chen, J. Ding, L. Bai, . . . Z. Yuan (2018). "Exosomes Exploit the Virus Entry Machinery and Pathway To Transmit Alpha Interferon-Induced Antiviral Activity." J Virol **92**(24).

Zakharova, L., M. Svetlova and A. F. Fomina (2007). "T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor." J Cell Physiol **212**(1): 174-181.

Zhu, Y., X. Xian, Z. Wang, Y. Bi, Q. Chen, X. Han, . . . R. Chen (2018). "Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation." Biomolecules **8**(3).

8. Lista publikacji autorki rozprawy

***Gluchowska A**, Cysewski D, Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Węglarczyk K, Podrzywałow-Bartnicka P, Sunderland P, Kozłowska E, Śliwińska MA, Dąbrowski M, Sikora E, Mosieniak G. „Unbiased proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by senescent human vascular smooth muscle cells reveals their ability to modulate immune cell functions.” *Geroscience*. 2022 Dec;44(6):2863-2884.

Gluchowska A, Kalenik B, Kulawiak B, Wrzosek A, Szewczyk A, Bednarczyk P, Mosieniak G. “Lack of activity of the mitochondrial large-conductance calcium-regulated potassium channels in senescent vascular smooth muscle cells.” *Mech Ageing Dev*. 2023 Sep 7:111871.

Mierzejewska J, Kowalska P, Marlicka K, Dworakowska S, Sitkiewicz E, Trzaskowski M, **Gluchowska A**, Mosieniak G, Milner-Krawczyk M. „Exploring Extracellular Vesicles of Probiotic Yeast as Carriers of Biologically Active Molecules Transferred to Human Intestinal Cells.” *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 12;24(14):11340.

Krzystyniak A, **Gluchowska A**, Mosieniak G, Sikora E. „Fiji-Based Tool for Rapid and Unbiased Analysis of SA-β-Gal Activity in Cultured Cells.” *Biomolecules*. 2023 Feb 14;13(2):362.

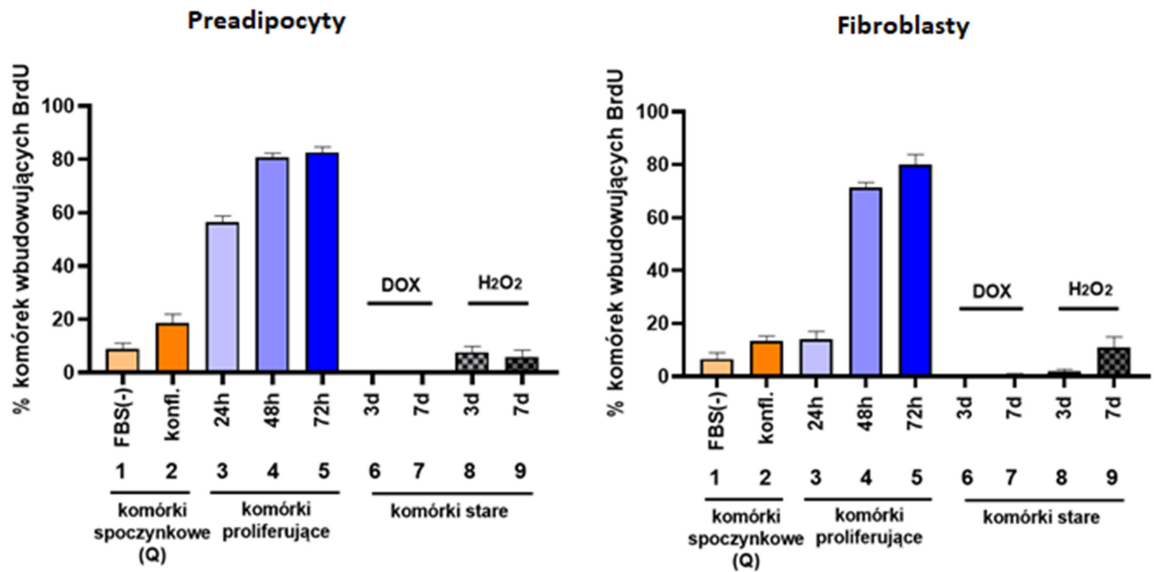
Ruzycka-Ayoush M, Nowicka AM, Kowalczyk A, **Gluchowska A**, Targonska A, Mosieniak G, Sobczak K, Donten M, Grudzinski IP. „Exosomes derived from lung cancer cells: Isolation, characterization, and stability studies.” *Eur J Pharm Sci*. 2023 Feb 1;181:106369.

Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, **Ciolko A**, Bojko A, Mosieniak G, Bijoch Ł, Sikora E. „The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing.” *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 12;20(5):1239.

Strzeszewska A, Alster O, Mosieniak G, **Ciolko A**, Sikora E. „Insight into the role of PIKK family members and NF-κB in DNA damage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells.” *Cell Death Dis*. 2018 Jan 19;9(2):44.

(*) zaznaczono publikację zawierającą wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie

9. Supplement pracy

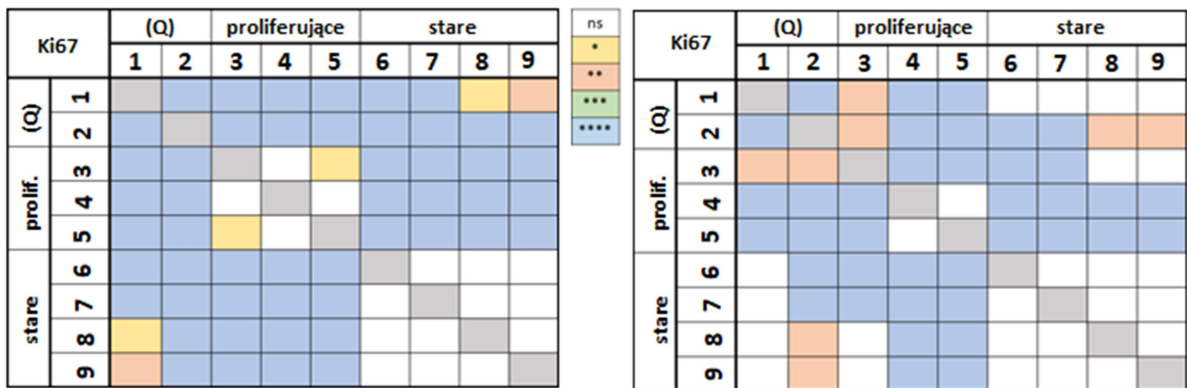
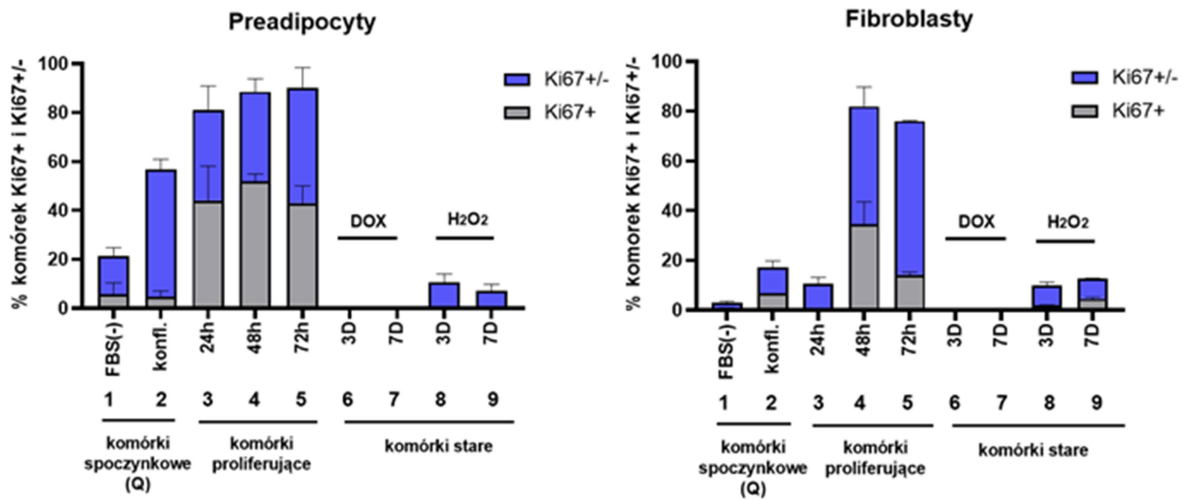


BrdU		Preadipocyty								
		(Q)		proliferujące			stare			
(Q)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

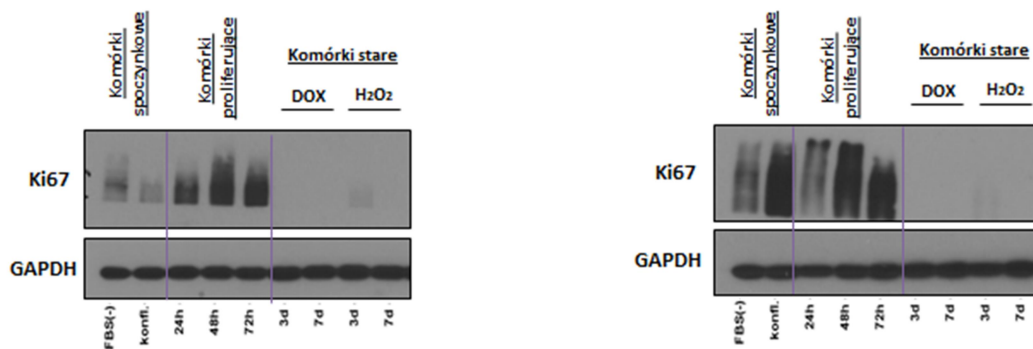
BrdU		Fibroblasty								
		(Q)		proliferujące			stare			
(Q)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
9	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Ryc. S.1 Analiza ilościowa preadipocytów i fibroblastów zdolnych do syntezy DNA (komórki wbudowujące BrdU). Na wykresach przedstawiono średnie wartości \pm SD, n=3. Tabele umieszczone pod wykresami ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 i **** p<0.0001).

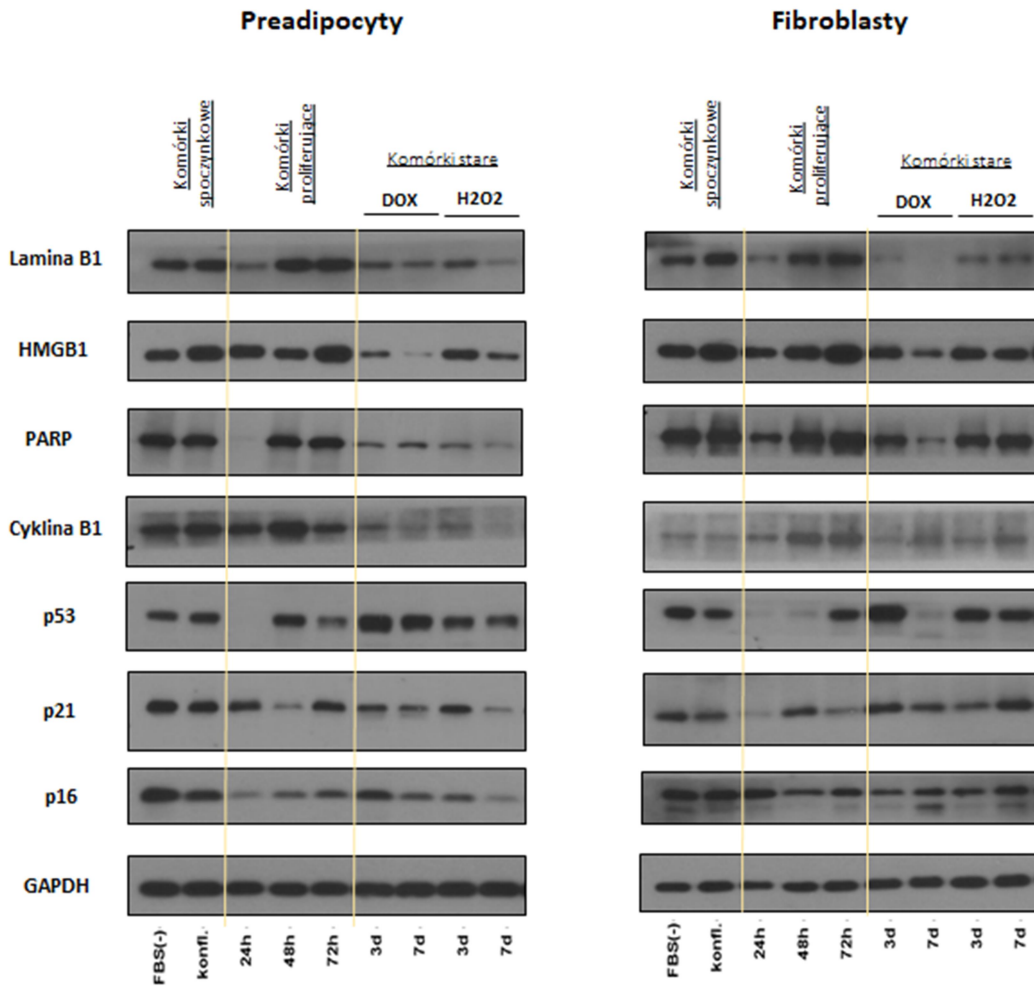
A.



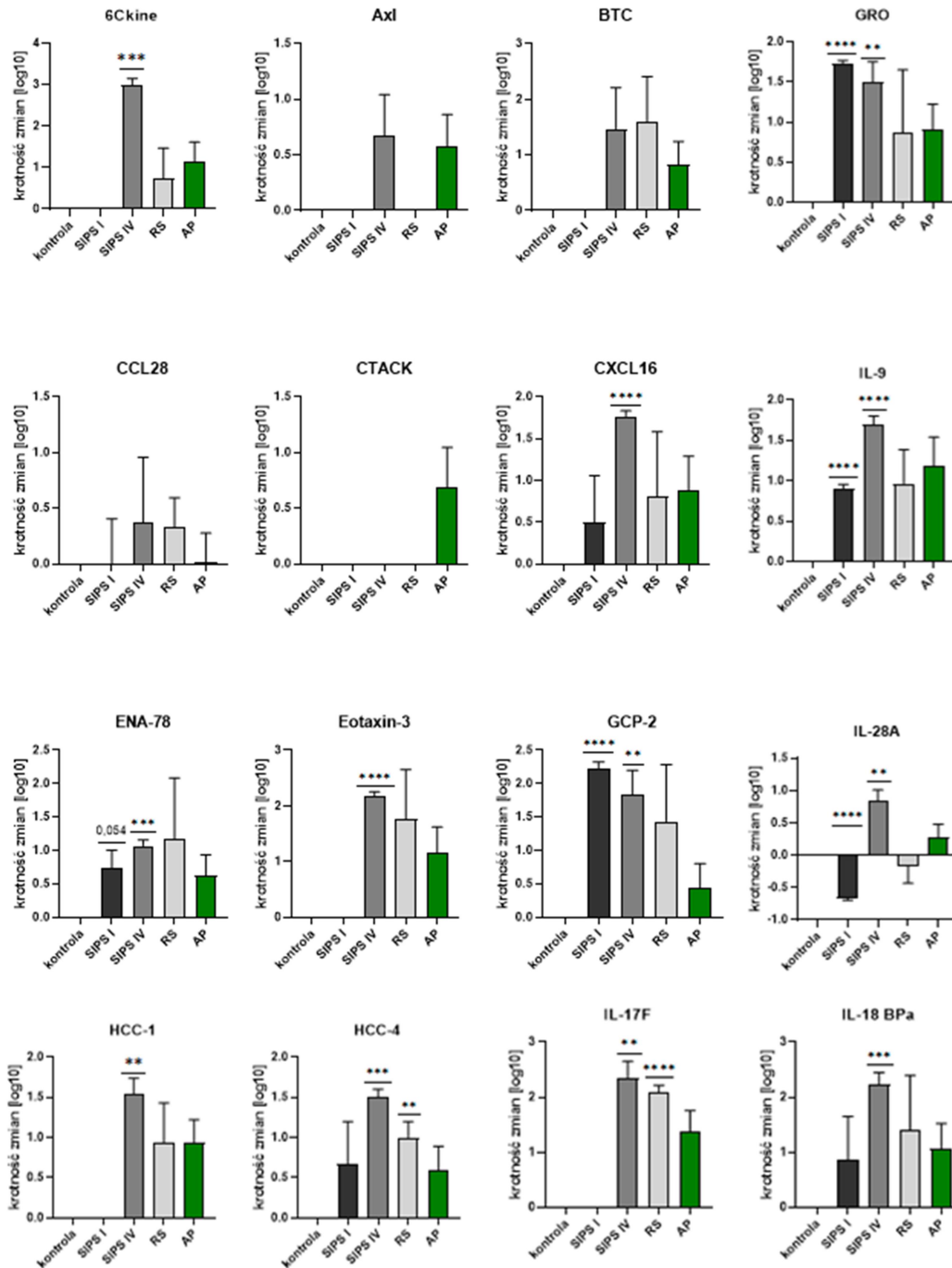
B.



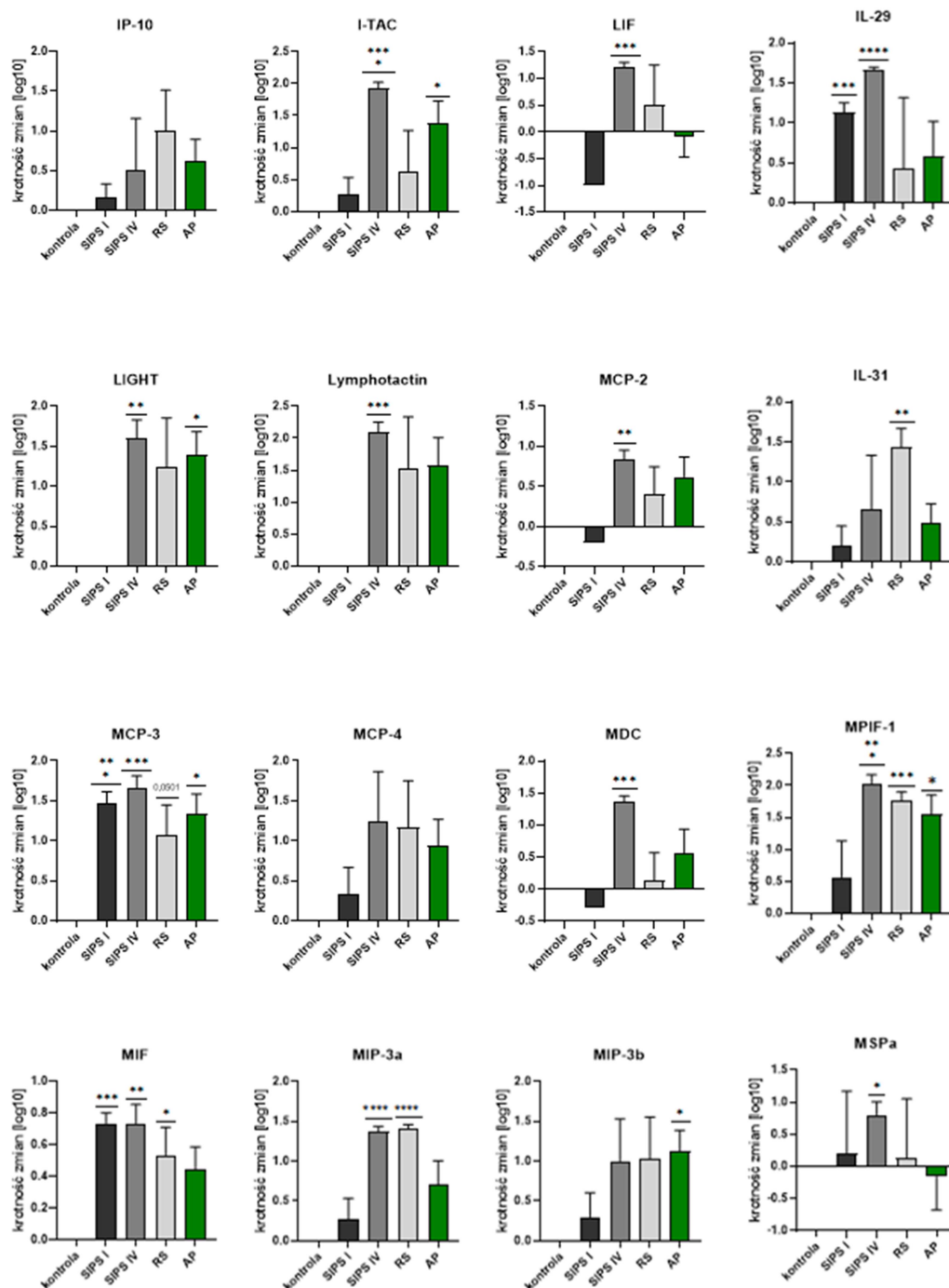
Ryc. S.2 A. Analiza ilościowa preadipocytów i fibroblastów z ekspresją Ki67 z uwzględnieniem różnego poziomu tego białka w komórkach. Na wykresie przedstawiono średnie wartości \pm SD, $n=3$. Tabele umieszczone poniżej wykresów ilustrują wynik analizy statystycznej wykonanej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ i **** $p<0.0001$). B. Analiza poziomu białka Ki67 metodą Western blotting w preadipocytach (lewa strona) oraz fibroblastach (prawa strona). Na rycinie przedstawiono reprezentatywny dla trzech powtórzeń blot.



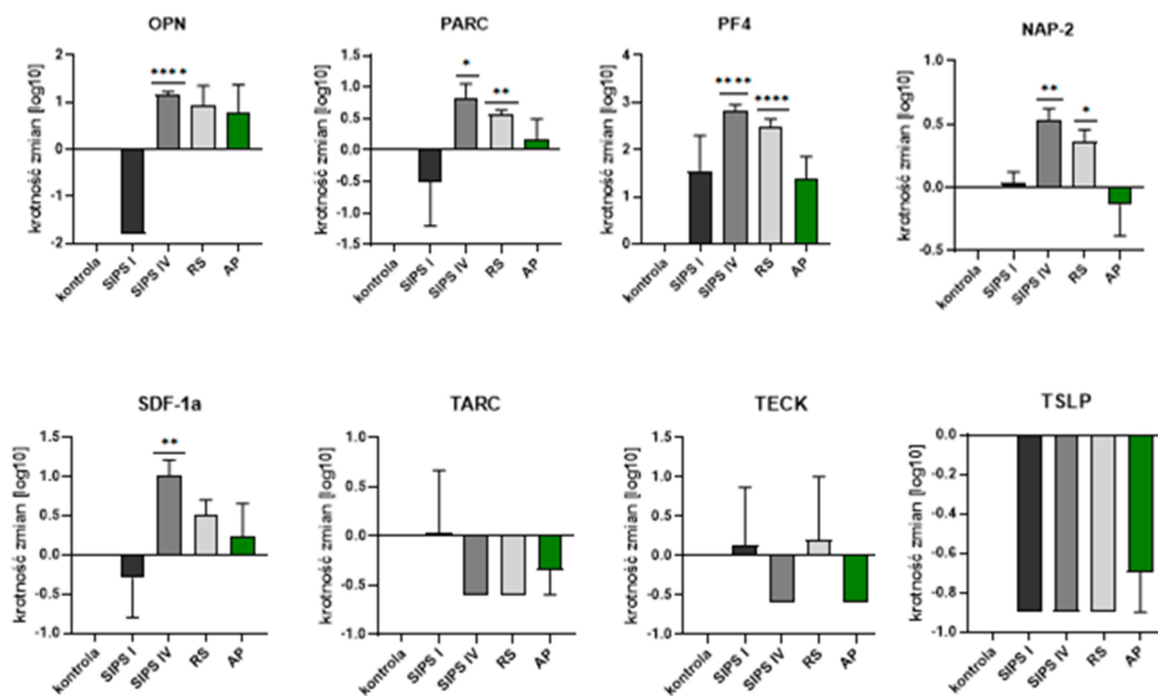
Ryc. S.3 Analiza poziomu białek za pomocą techniki Western Blot w preadipocytach i fibroblastach. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne dla trzech powtórzeń bloty.



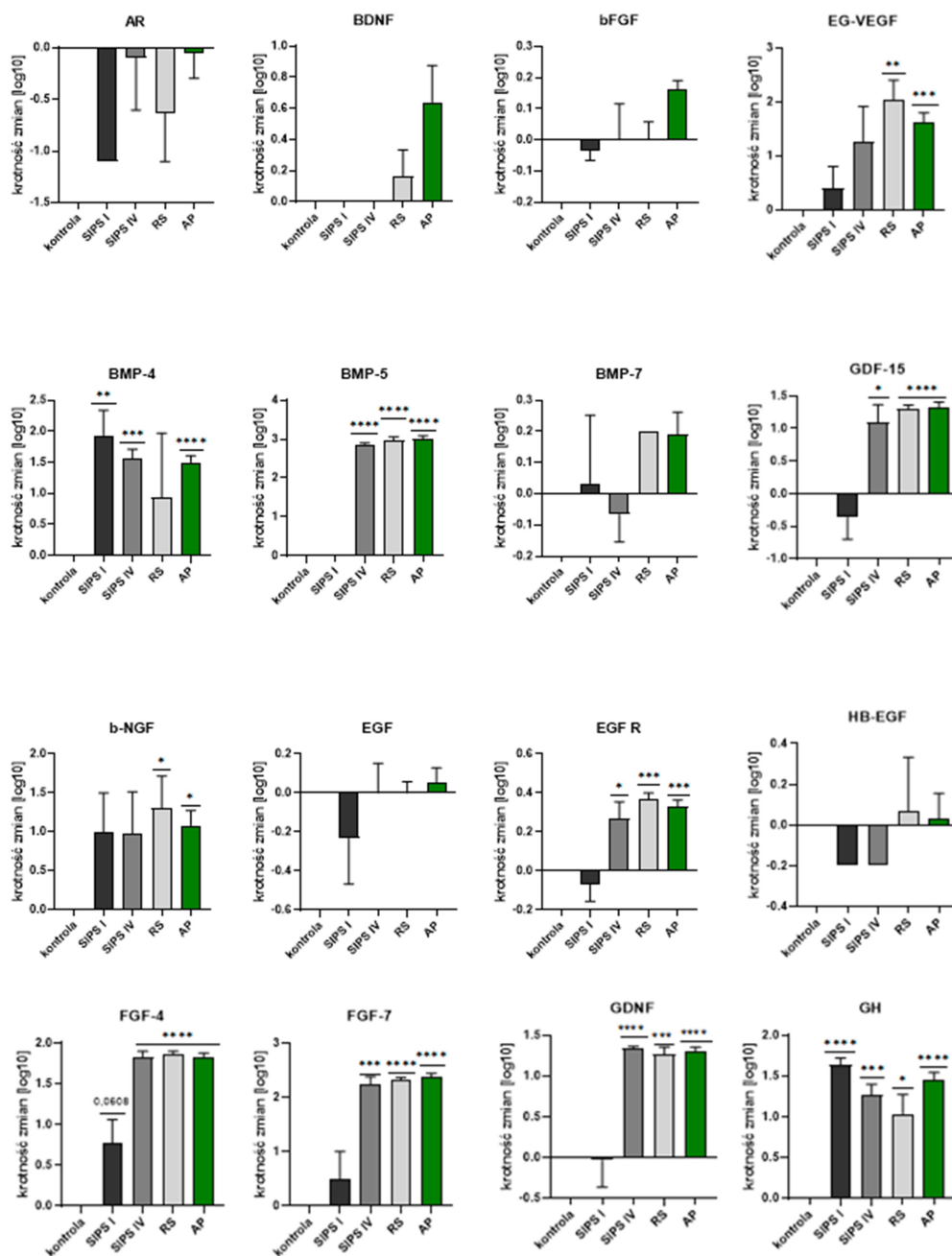
Ryc. S.4 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do chemokin. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *6Ckine* (CCL21) – ligand chemokiny CC21; *Axl* – receptor kinazy tyrozynowej; *BTC* - betacelulina; *GRO* – onkogen związany ze wzrostem; *CCL28* – ligand chemokiny CC28; *CTACK* (CCL27) – ligand chemokiny CC27, *CXCL16* – ligand chemokiny 16, *IL-9/28A/17F* – interleukina 9/28A/17F; *ENA-78* – peptyd aktywujący neutrofile; *Exotaxin-3* – eotaksyna 3; *GCP-2* – białko chemotaktyczne granulocytów; *HCC-1/4* – ludzka chemokina CC-1/ CC-4



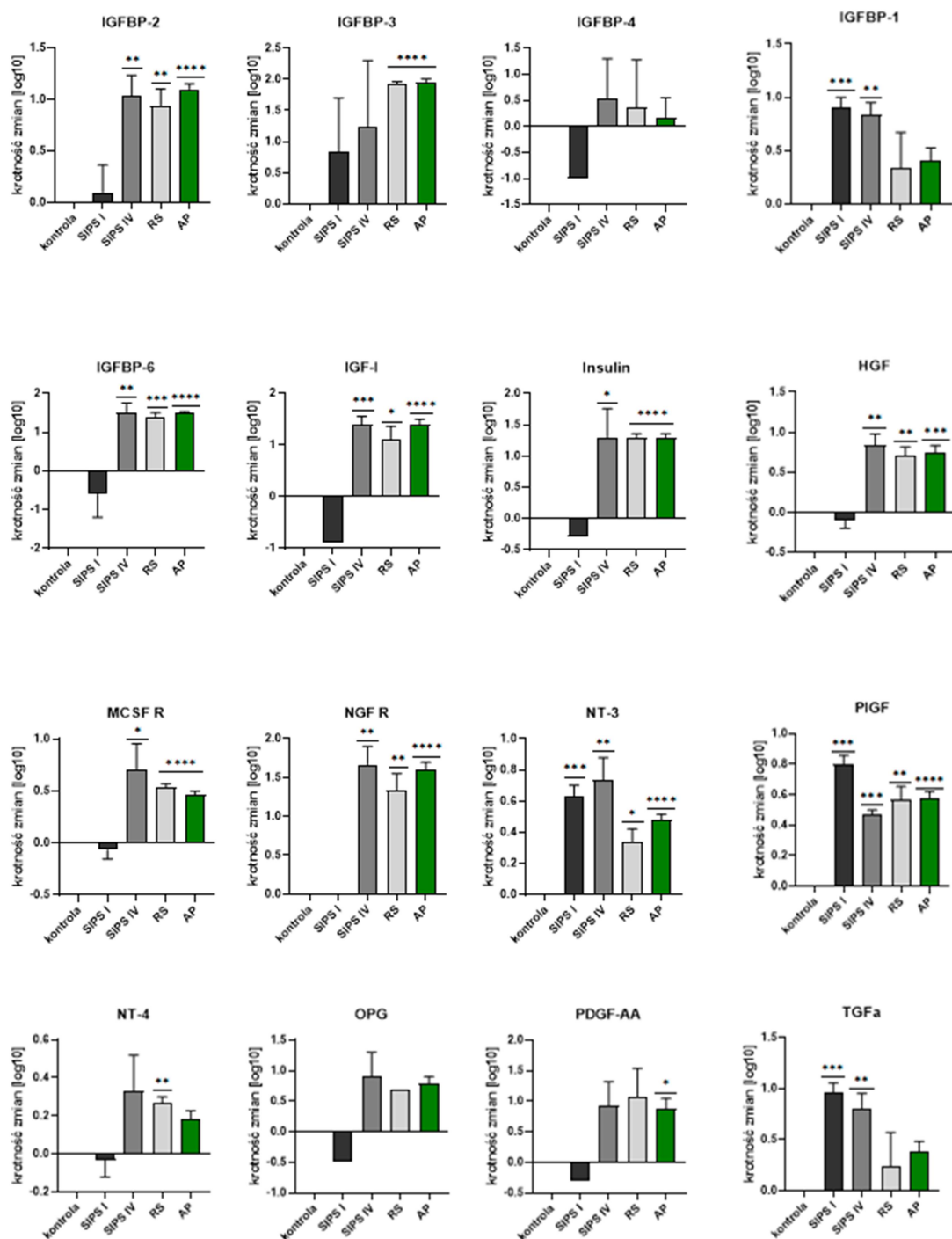
Ryc. S.5 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do chemokin. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *IP-10* – białko indukowalne interferonem γ ; *I-TAC* – indukowany interferonem alfa chemoatraktant komórek T; *LIF* – czynnik hamujący białaczkę; *IL-29/31* – interleukina 29/31; *LIGHT* – członek nadrodziny ligandówczynnika martwicy nowotworu 14; *Lymphotoctin* - limfotaktyna; MCP-2/3/4 – białko chemotaktyczne monocytów 2/3/4; *MDC* – chemokina pochodząca z makrofagów; *MPIF-1* – mieloidowy progenitorowy czynnik hamujący - 1; *MIF* – czynnik hamujący migrację makrofagów; *MIP-3a/3b* – makrofagowe białko zapalne 3a/3b; *MSPa* – białko rusztowania błonowego alfa



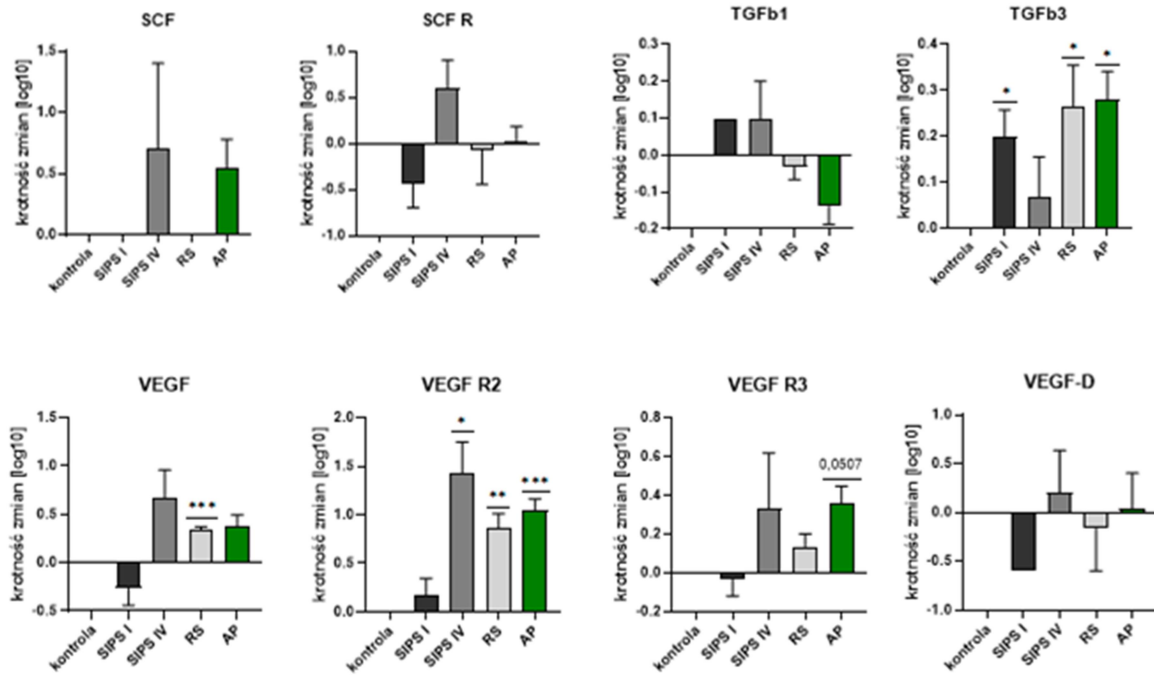
Ryc. S.6 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do chemokin. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *OPN* – osteopontyna; *PARC* – chemokina płucna regulowana aktywacją; *PF4* – czynnik płytkowy 4; *NAP-2* – peptyd aktywujący neutrofile; *SDF-1a* – czynnik pochodzący z komórek zrębowych; *TARC* – chemokina grasicy regulowana aktywacją; *TECK (CCL25)* – chemokina wyrażana w grasicy, ligand chemokiny 25; *TSLP* – limfopoetyna zrębu grasicy.



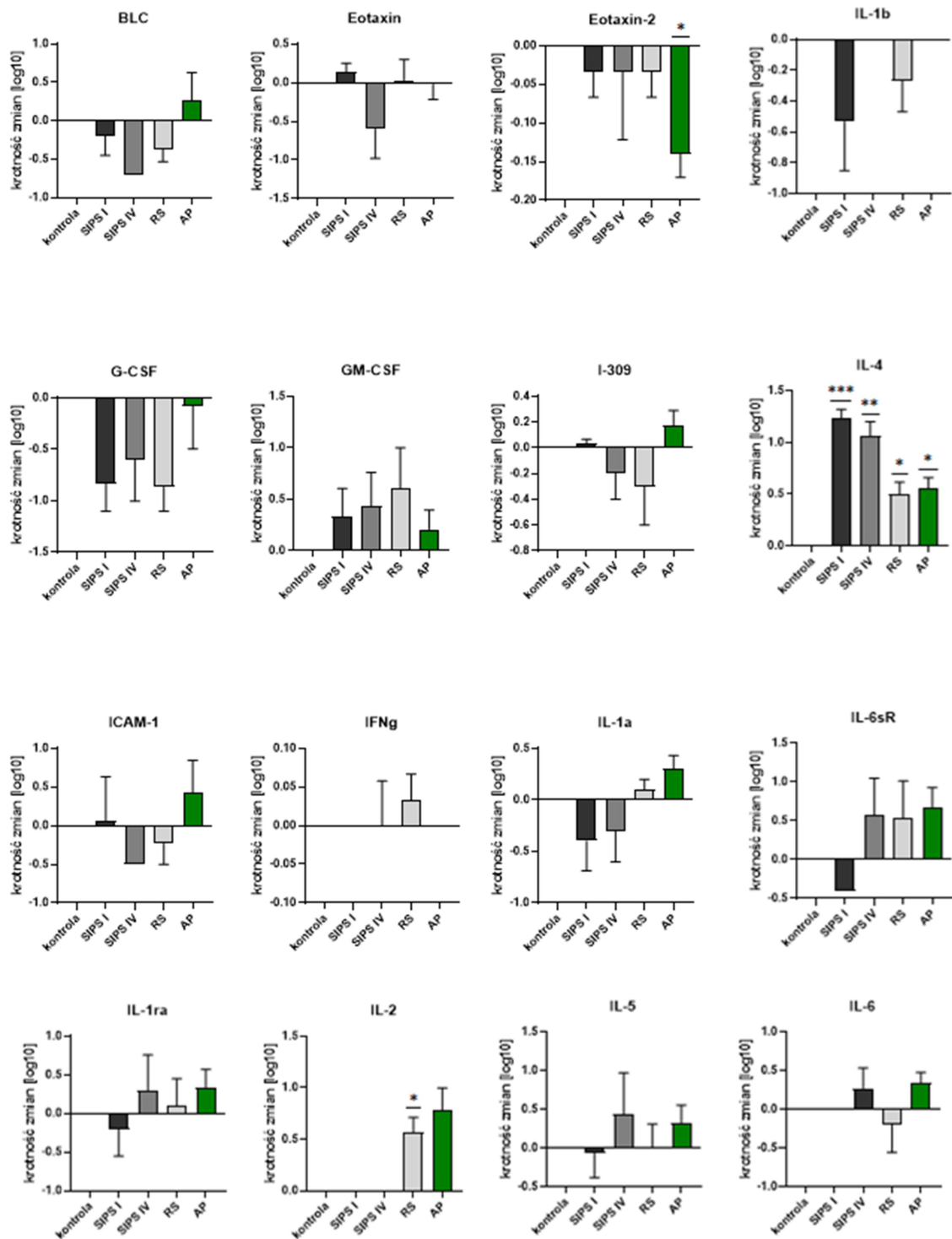
Ryc. S.7 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników wzrostu. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *AR* – receptor androgenowy; *BDNF* – czynnik neurotroficzny pochodzący z mózgu; *bFGF* – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów; *EG-VEGF* – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń pochodzący z gruczołów dokrewnych; *BMP-4,5,7* – białko morfogenetyczne kości; *GDF-15* – różnicujący czynnik wzrostu 15; *b-NGF* – czynnik wzrostu beta nerwów; *EGF* – naskórkowy czynnik wzrostu; *HB-EGF* – naskórkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę; *FGF-4,7* – czynnik wzrostu fibroblastów 4, 7; *GDNF* – czynnik neurotroficzny pochodzący z komórek glejowych; *GH* – hormon wzrostu.



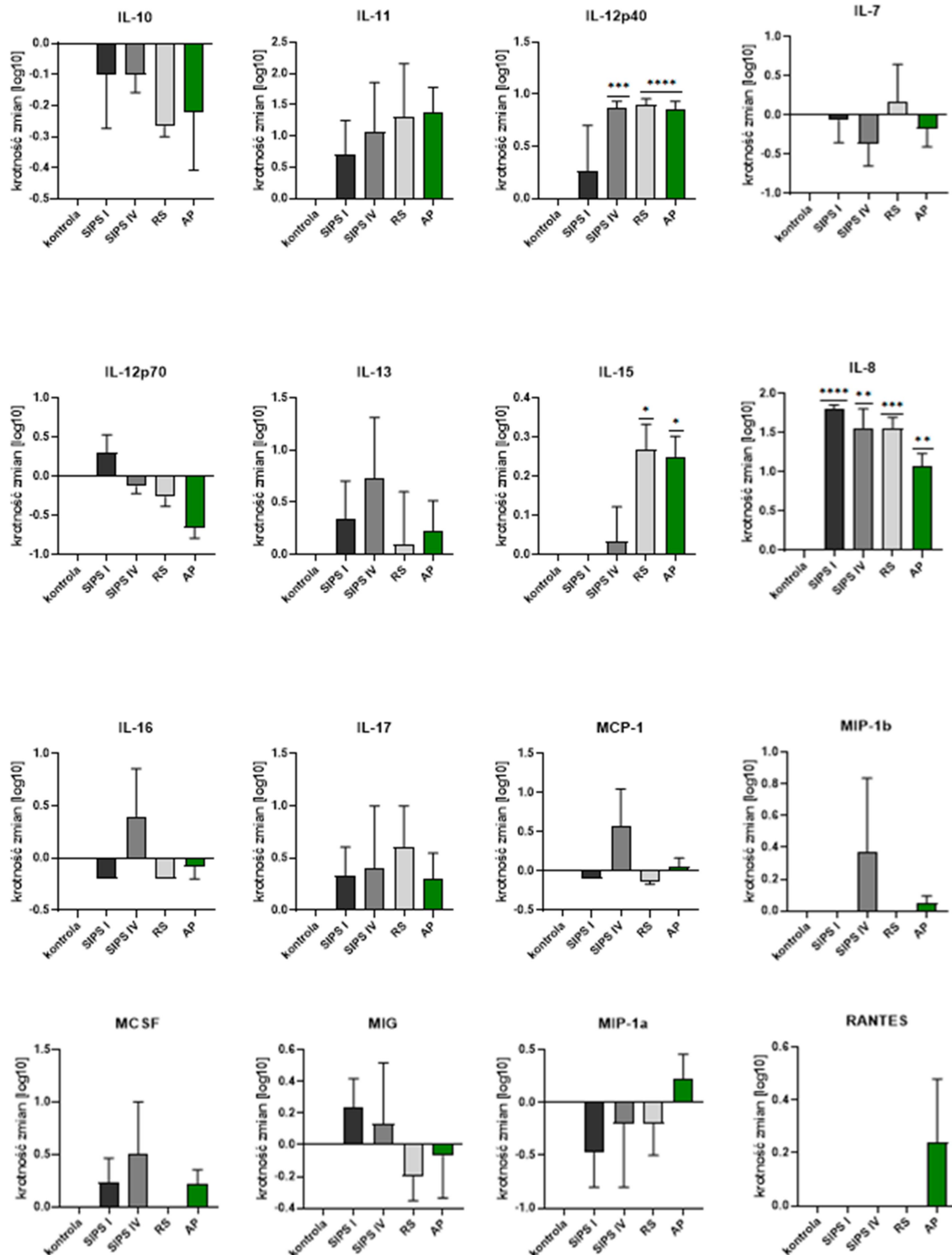
Ryc. S.8 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników wzrostu. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPS I, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *IGFBP* – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu; *IGF* – insulinopodobny czynnik wzrostu; *HGF* – czynnik wzrostu hepatocytów; *MCSF R* – czynnik stymulujący kolonię makrofagów; *NGF* – czynnik wzrostu nerwów; *NT* – neurotrofina; *PIGF* – łożyskowy czynnik wzrostu; *OPG* – osteoprotegeryna; *PDGF* – płytkopochodny czynnik wzrostu; *TGFa* – transformujący czynnik wzrostu alfa.



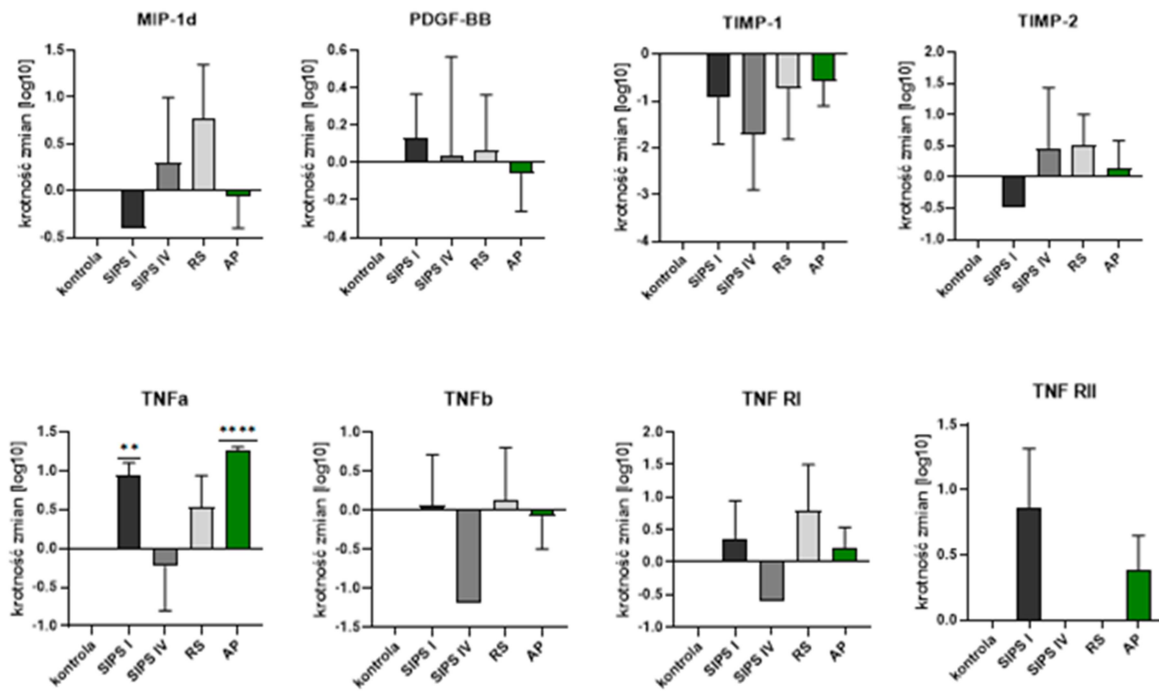
Ryc. S.9 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników wzrostu. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *SCF* – czynnik komórek macierzystych; *TGFb* – transformujący czynnik wzrostu; *VEGF* – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.



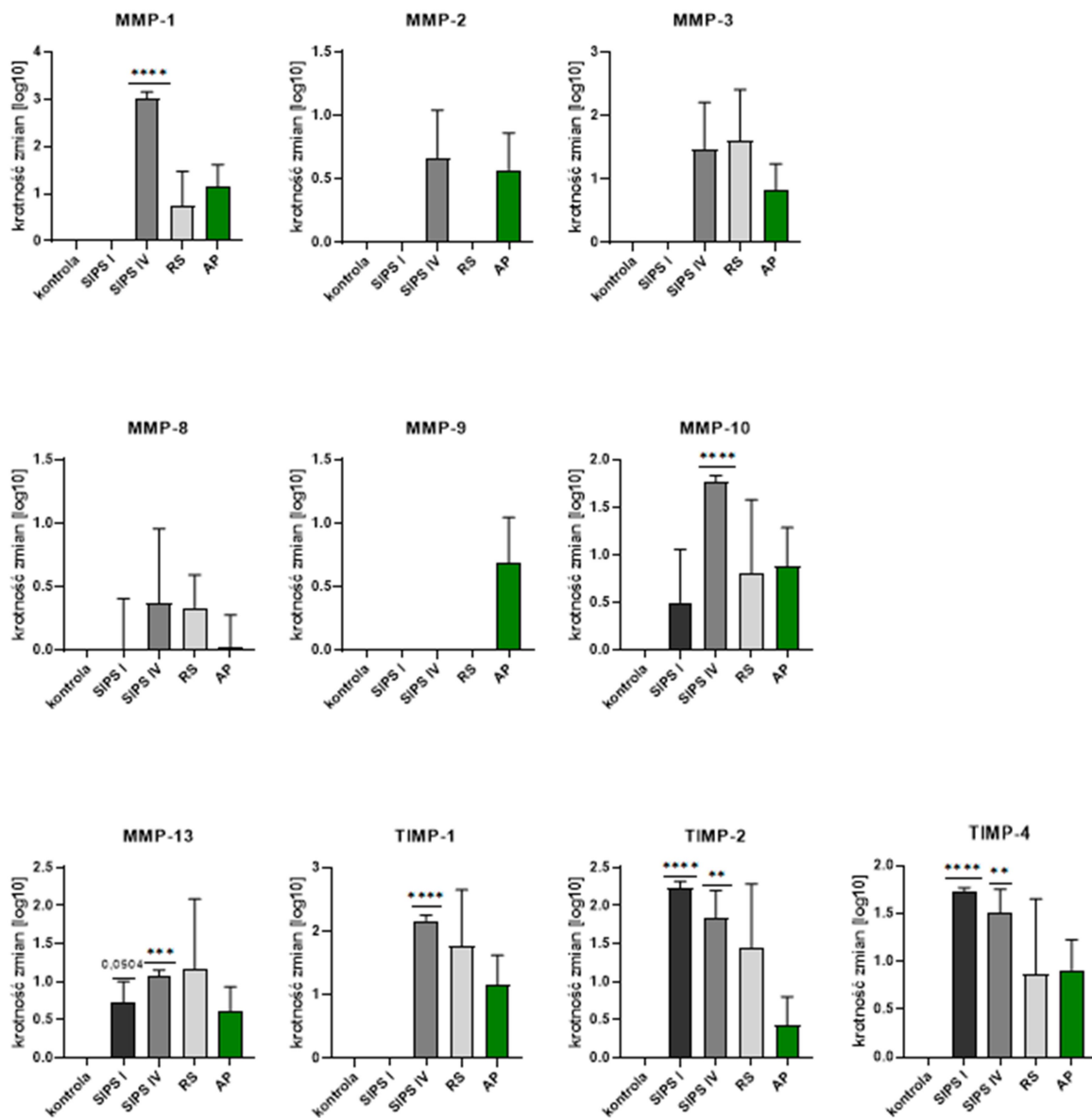
Ryc. S.10 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników zapalnych. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *BLC* – chemoatraktant limfocytów B; *IL* – interleukina; *G-CSF* – czynnik stymulujący kolonię granulocytów; *GM-CSF* – czynnik stymulujący kolonię granulocytów i makrofagów; *I-309* (*CCL1*) – ligand chemokiny 1; *ICAM-1* – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna; *IFNg* – interferon gamma.



Ryc. S.11 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników zapalnych. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPSI, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *IL* – interleukina; *MCP-1* – białko chemoatrakcyjne dla monocytów; *MIP-1b* – białko zapalne makrofagów; *MCSF* – czynnik stymulujący kolonię makrofagów; *MIG* (CXCL9) – monokina indukowana przez interferon gamma; *RANTES* – chemokina limfocytów T regulowana aktywacją.



Ryc. S.12 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do czynników zapalnych. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPS I, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *MIP-1d* – białko zapalne makrofagów; *PDGF-BB* – płytkowy czynnik wzrostu; *TIMP* – tkankowe inhibitory metaloproteinaz; *TNF* – czynnik martwicy nowotworu.



Ryc. S.13 Analiza poziomu wydzielanych przez komórki mięśni gładkich naczyń czynników należących do metaloproteinaz. Wykresy przedstawiają krotność zmian poziomu analizowanego czynnika względem kontroli. Wykresy przedstawiają wartości średnie \pm SEM, liczba powtórzeń $n=3$ (SIPS I, SIPS IV i RS) i $n=10$ (AP). Istotność statystyczną sprawdzano testem t-studenta wobec poszczególnych wariantów doświadczenia. *MMP* – metaloproteinaza macierzy; *TIMP* – tkankowe inhibitory metaloproteinaz

Tabela S.1 Lista białek o istotnie ($p < 0.05$) zwiększonym poziomie sekrecji zidentyfikowanych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez ulegające starzeniu komórki VSMC, które zostały przypisane do kategorii: Procesy układu odpornościowego (GeneOntology Immune System Processes GO:0.002.376).

wspólne dla SIPS i RS	wyłącznie w SIPS	wyłącznie w RS
SERPINC1, KRT-16, HTRA1, THSB1, GAS6, FGB, DYNCIL12, MME, PYGL, VIM, SERPINE1, PRDX2, PGM1, GSN, GLB1, CTSB, KTF5B, DPP4, GPX1, DYNC1H1, LRP1, ACTR 1A, CLTC, NBCTIN2, RAB6A, ITGB3, DCTN1, TNFRSF10B, FLNA, CKAP4	WNT5A, A2M, DNM2, CLU, C5, HBB, THBS4, PRKG1, CAPN1, PTX3, PSMB8, AIMP1, PXDN, ACTNI, RRAS, COLIA1, ZYX, DSC1, PFKL, GREM1, KLCL, FTL, ALDOC, COLIA2, APOA4, AP2B1, CIR, SEC3IL1, FTH1, CIS, TUBB, DCTN2, PKM, XRCC6, DYNCHIJ I, C3, ANPEP, AHCY, SSC5D, MTHFD1, PSMC2, PSMD1, PSMD12, EMLIN1, CCT2, PSMC5, VAT 1	ARG1, PRSS3, TXNDC5, CAT, HRNR, CALR, PDIA3, CANX, CTSD, DSG1, CTSA, HEXB, PRDX1, PARK7, PRNP, PSMD4, APOB, PBEF1, SEC22B, PRDX3, VCP, HSPA9, PGM3, FLNB, VCL, APEH