

UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKA W FORMOWANIU SIĘ NACZYŃ

THE ROLE OF ENDOTHELIUM IN VESSELS FORMATION

Kamil Marek LIPSKI¹, Kazimierz OSTROWSKI², Janusz KOMENDER¹,
Dariusz ŚLADOWSKI¹

¹Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, ²Katedra i Zakład Histologii
i Embriologii, Centrum Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: W niniejszym artykule przedstawiono pokrótce stan wiedzy na temat funkcji śródbłonka oraz jego roli w formowaniu się naczyń zarówno w rozwoju zarodkowym, jak i w procesach regeneracyjnych i chorobowych późniejszego życia osobniczego.

Słowa kluczowe: śródbłonek, angiogeneza, VEGF, komórki prekursorowe, komórki macierzyste.

Summary: The paper describes function of endothelium and its role in vessels formation during embryonic development and regenerative or pathological processes of further life.

Key words: endothelium, angiogenesis, VEGF, progenitor cells, stem cells.

Wykaz skrótów: **ACE** (*angiotensin-converting enzyme*) – enzym konwertujący angiotensynę, **Ang** – angiopoetyna, **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*) – zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu, **CD** (*cluster of differentiation*) – gronko różnicowania, **CDK** (*cyklin-dependent kinase*) – kinaza zależna od cyklin, **CEPs** (*circulating endothelial progenitor cells*) – krążące prekursorowe komórki śródbłonka, **CLA** (*cutaneous leukocyte antigen*) – antygen leukocytów skóry, **COX** – cyklooksygenaza, **Cx** (*connexin*) – koneksyna, **CXCR-CXC** (*chemokine receptor*) – receptor dla chemokin CXC, **ECM** (*extracellular matrix*) – substancja pozakomórkowa, **ECs** (*endothelial cells*) – komórki śródbłonka, **EGF** (*epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu, **EPCs** (*endothelial progenitor (precursor) cells*) – komórki prekursorowe śródbłonka, **ESL** (*E-selectin ligand*) – ligand dla E-selektyny, **ET** (*endothelin*) – endotelina, **FGF** (*fibroblast growth factor*) – fibroblastyczny czynnik wzrostu, **HIF** (*hypoxia-inducible factor*) – czynnik indukowany hipoksją, **HRE** (*hypoxia response elements*) – elementy odpowiedzi na hipoksję, **HSCs** (*hematopoietic stem cells*) – komórki macierzyste układu krwiotwórczego, **ICAM** (*intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej, **ID** (*inhibitors of differentiation*) – inhibitory różnicowania, **IGF** (*insulin-like growth factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu, **IL** (*interleukin*) – interleukina, **ILR** (*interleukin receptor*) – receptor dla interleukiny, **KDR** (*kinase domain region*) – region domeny kinazy, **KGF** (*keratinocyte growth factor*) – czynnik wzrostu keratynocytów, **LFA** (*leukocyte function associated antigen*) – antygen związany z funkcją leukocytów, **LYVE** (*lymphatic vascular endothelial*) – receptor śródbłonka naczyń limfatycznych, **MAC** (*macrophage antigen*) – antygen makrofagalny, **MCP** (*monocyte chemoattractant protein*) –

białko chemotaktyczne monocytów, **MMPs** (*matrix metalloproteinases*) – metaloproteinazy macierzy, **nAChRs** (*nicotinic acetylcholine receptors*) – receptory nikotynowe, **NLPZ** – niesteroidowe leki przeciwzapalne, **NO** – tlenek azotu, **PAI** (*plasminogen activator inhibitor*) – inhibitor aktywatora plazminogenu, **PDGF** (*platelet-derived growth factor*) – płytkowopochodny czynnik wzrostu, **PDGFR** (*platelet-derived growth factor receptor*) – receptor dla płytkowopochodnego czynnika wzrostu, **PECAM** (*platelet/endothelial cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna płytek/komórek śródbłonka, **PEX** (*C-terminal hemopexin-like domain*) – C-końcowa domena podobna do hemopeksyny, blokująca MMP-2, **PF** (*platelet factor*) – czynnik płytkowy, **PI** – fosfatydyloinozytol, **PIGF** (*placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu, **PPARs** (*peroxisome proliferator-activated receptors*) – receptory peroksysomalnego czynnika proliferacyjnego, **PSGL** (*P-selectin glycoprotein ligand*) – glikoproteinowy ligand dla P-selektyny, **SMCs** (*smooth muscle cells*) – komórki mięśniówki gładkiej, **TGF $\alpha\beta$** (*transforming growth factor $\alpha\beta$*) – transformujący czynnik wzrostu $\alpha\beta$, **TIMPs** (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) – tkankowe inhibitory metaloproteinaz, **TRF** (*TTAGGG repeat binding factor*) – czynnik wiążący sekwencje TTAGGG, **TSP** (*thrombospondin*) – trombospondyna, **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) – śródbłonkowy czynnik wzrostu, **VEGFR** (*vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor dla śródbłonkowego czynnika wzrostu, **vWF** (*von Willebrand factor*) – czynnik von Willebranda.

WSTĘP

Układ krwionośny stanowi ważny element spajający poszczególne tkanki i narządy w jeden organizm. Jego rola dostrzegalna jest szczególnie w stanach patologicznych, kiedy zakłócenie funkcji tego układu powoduje zaburzenie działania innych tkanek. Przykładem może być miażdżycza prowadząca często do takich powikłań, jak zawały serca czy udary mózgu [37].

Komórki śródbłonka, oglądane od strony światła naczynia, mają kształt wydłużonych wielokątów (najczęściej sześciokątów) o wymiarach ok. 10 x 30 μm , z osią długą, równoległą do osi naczynia. Grubość cytoplazmy wynosi ok. 0,2 μm , a cytoplazmy i jądra ok. 3 μm . Niektóre komórki śródbłonka żył, tętnic i kapilar (np. w mózgu, grasicy) tworzą połączenia typu *occludens i neksus*, które sprawiają, że jest on szczelny (wymiana substancji odbywa się poprzez transcytozę). Przechodzenie jonów między komórkami zapewniają połączenia typu neksus. Połączenia te ulegają czasem zerwaniu, zwłaszcza podczas migracji ECs związanej z tworzeniem nowych naczyń, prawidłowych oraz patologicznych nowotworu (w tych ostatnich zwykle nie ulegają ponownemu odtworzeniu) [6]. Także VEGF oraz działająca z nim synergistycznie Ang-2 powodują rozszerzenie tych połączeń, natomiast Ang-1 działa przeciwnie. W przypadku braku tej kostymulacji może dojść do obumarcia komórek śródbłonka [19, 41].

Śródbłonek, szczególnie kapilar i małych tętnic zawiera liczne pory powstałe przez fuzję pęcherzyków, służące do transportu makrocząsteczek [51]. Swoistymi strukturami cytoplazmy endotelium wsierdca, tętnic i żył są pałeczkowate twory o wymiarze 0,2 x 0,4 μm , otoczone błoną – ciała Weibela-Palade'a. Zawierają białko von Willebranda oraz mikrotubule. Śródbłonek, dzięki obecności kompleksów aktyny i miozyny, ma zdolność kurczenia się. Dzięki temu zwiększa się jego przepuszczalność. Na wolnej powierzchni komórek, szczególnie nad jądrami, znajdują się grupy mikrokosmków, a w błonie komórkowej liczne glikoproteiny (tab. 1) [9, 51].

TABELA 1. Glikoproteiny powierzchniowe komórek śródbłónka

Glikoproteiny	Niektóre ich ligandy
Adresyna, CD15	selektyny CD62E,P,L
CD15s; CD34	
CD36	trombospondyna, kolagen
CD39; CD44	
CD 49e	fibronektyna
CD51	
CD54 (ICAM-1)	LFA-1, MAC-1
CD58 (LFA-3)	CD2
CD62E (selektyna E)	ESL-1, CLA, CD62P
CD62P (selektyna P)	PSGL-1, CD24, CD62E
CD73; CDw92 (VIM 15); CD93	
CD102 (ICAM-2)	LFA-1
CD105; CD109; CD121 (IL-1R1); CD 124 (IL-4R α IL-13R α ; CD140b (PDGFR α); CD142 (czynnik tkankowy); CD143 (ACE); CD144 (VE-kadheryna); CDw145; CD146; CD147; CD157; CD166	

Śródbłonek bierze udział w transporcie gazów i substancji chemicznych, w sposób bierny – zgodny z gradientem stężeń (np. O₂, CO₂) lub czynny – głównie przez transcytozę. Przez pory oraz przestrzenie międzykomórkowe mogą przechodzić leukocyty i erytrocyty – diapedeza.

Komórki syntetyzują i uwalniają hormony miejscowe: prostacyklinę PGI₂ (przeciwdziała agregacji płytek i rozszerza naczynia), inne prostaglandyny oraz endoteliny ET-1, ET-2, ET-3 (21-aminokwasowe peptydy powstające z 200-aminokwasowych proendotelin, kurczące mięśniówkę naczyń oraz będące mitogenami).

Śródbłonek wytwarza również tlenek azotu NO, przez który działają rozkurczająco na naczynia takie substancje, jak: acetylocholina, histamina, bradykinina, substancja P i inne. Endotelium wydziela także Ang1 i Ang2 oraz konwertazę powodującą przejście angiotensyny-1 w angiotensynę-2. PDGFB, uwalniany z ECs po stymulacji VEGF, wpływa głównie na tworzenie się i dojrzewanie ściany naczyń.

RÓŻNICE POMIĘDZY ŚRÓDBŁONKIEM TĘTNICZYM, ŻYLNYM I LIMFATYCZNYM

Śródbłonek wyścięła naczyń krwionośne, limfatyczne i jamy serca. Nie wszystkie jego komórki są identyczne. Istnieją różnice pomiędzy EC tętnic i żył [3]. Szlak Notch, aktywowany ligandami (Delta-like-4, Jagged-1, Jagged-2) łączącymi się z receptorami (Notch-1, Notch-3, Notch-4) promuje wystąpienie fenotypu tętniczego, hamuje natomiast różnicowanie się w kierunku śródbłonka żylnego [34, 67]. Aktywowany jest także przez elementy innych szlaków, np. Sonic Hedgehog, VEGF czy Gridlock [35]. Ta plastyczność ECs, umożliwiająca zmianę fenotypu, występuje także poza okresem płodowym, u noworodków (m.in. w siatkówce) oraz u osobników dorosłych (np. w sercu) [55, 60].

Odkryte zostały specyficzne antygeny (z systemu Eph-Ephrin) dla śródbłonka tętniczego i żylnego. Obecność EphrinB2 jest charakterystyczna dla nabłonka i mięśniówki gładkiej tętniczej oraz kapilar, natomiast EphB4 (receptor dla EphrinB2) – dla śródbłonka żylnego. System EphrinB2-EphB4 zapobiega przenikaniu i migracji ECs na granicy tętniczo-żylny w tworzeniu się anastomoz tętniczo-żylnych [17, 61, 66]. W patologicznej angiogenezie, na powierzchni nabłonka niektórych nowych naczyń występuje EphrinB2, co stoi w sprzeczności z uznawaną powszechnie teorią, że naczynia guza powstają z żyłek pozakapilarnych [12, 52].

Nie jest do końca jasne pochodzenie śródbłonka naczyń limfatycznych: czy wywodzi się on z naczyń żylnych, które przekształciły się we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego, czy z limfangioblastów mezenchymy [28, 63, 64]. Na endotelium naczyń limfatycznych znajdują się charakterystyczne receptory VEGFR3 i LYVE1 [62]. Aktywacja szlaku Syk-SLP76 powoduje płodową separację sieci naczyń krwionośnych i limfatycznych. Odpowiedź komórek śródbłonka naczyń limfatycznych na pozostałe cytokiny jest podobna jak ich odpowiedników w układzie krwionośnym [27].

RÓŻNICE NARZĄDOWE

Endotelium naczyń różnych narządów ma na swojej powierzchni specyficzne dla danego organu antygeny. Przykładem może być nabłonek, pochodzący z płuc, gruczołów piersiowych czy prostaty, mający odpowiednio: błonową dipeptydazę, aminopeptydazę P oraz IL-11. Dla śródbłonka naczyń nowotworowych charakterystyczna jest natomiast aminopeptydaza N. Ta specyficzność antygenowa może mieć przyszłe implikacje terapeutyczne, np. możliwość zastosowania przeciwciał monoklonalnych z przytwierdzonymi do nich radioizotopami, chemioterapeutykami bądź inhibitorami angiogenezy wybiórczo hamującymi rozwój nowotworu, czy inne metody podawania leku bezpośrednio do miejsc docelowych. Terapia taka zapewniłaby większą wybiórczość, a co za tym idzie, zmniejszyłaby liczbę działań niepożądanych [5].

W szczególnych przypadkach śródbłonek może być zastąpiony przez: cytotrofoblast w macznych tętnicach spiralnych podczas tworzenia się łożyska (pseudowaskulogeneza),

komórki mięśniówki gładkiej tworzące neointymę w przypadku niekompletnej odbudowy śródbłonka po uszkodzeniu, czy komórki nowotworowe (mimikra naczyniowa) [54].

Śródbłonek większości naczyń krwionośnych jest jednowarstwowy, płaski i leży na błonie podstawnej. W zatokach śledziony i żyłkach węzła limfatycznego, kępek Peyera i migdałków jest nabłonkiem jednowarstwowym sześciennym. W przypadku kłębuszków nerkowych, porowaty śródbłonek naczyń włosowatych stanowi jeden z elementów filtra kłębuszkowego, zatrzymującego komórki, cząstki i makrocząsteczki, a przepuszczającego płyn i molekuly o masie cząsteczkowej do 1 mln. Wytwarza również kolejny ze składników systemu filtracyjnego – błonę podstawną.

Istnieją również różnice w ekspresji genów pomiędzy różnego rodzaju ECs (zarówno tych pochodzących z prawidłowych tkanek, jak i tych z naczyń nowotworowych, z naczyń embrionalnych oraz przebudowujących, gojących się). Zagadnienia te zostały wstępnie scharakteryzowane, jednak wymagają dalszego dogłębnego zbadania.

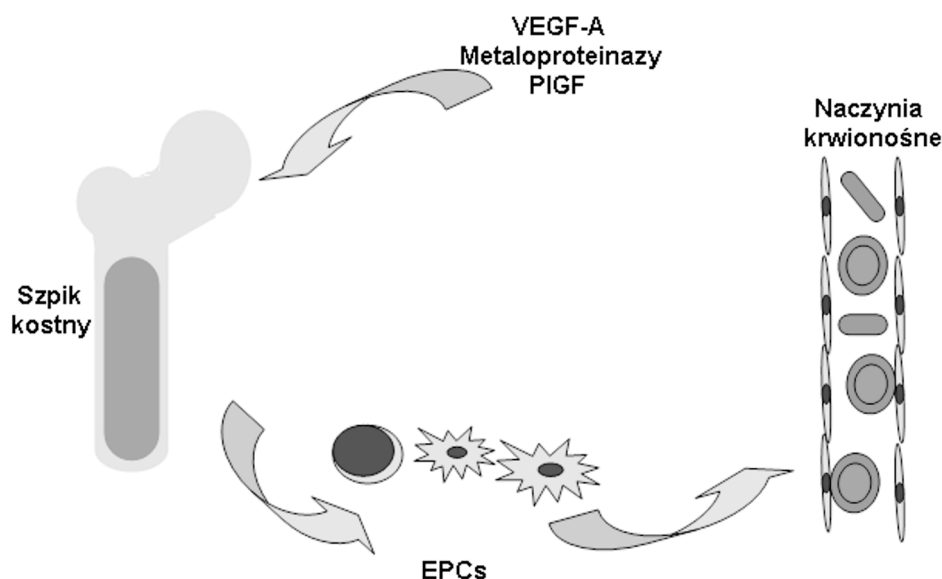
REGENERACJA ŚRÓDBŁONKA

Średni czas życia komórek śródbłonka wynosi ok. 100 dni, w związku z tym konieczne jest ich ciągle odtwarzanie w celu utrzymania ciągłości tej warstwy ściany naczynia.

Jednym ze spostrzeżeń poczynionych w badaniach *in vivo* jest obserwacja dotycząca szybszego skracania się telomerów w komórkach śródbłonka naczyń, które najczęściej są dotknięte zmianami miażdżycowymi (takie jak np. tętnice wieńcowe). Istnieją miejsca, np. tętnice biodrowe, gdzie śródbłonek jest szczególnie narażony na działanie sił hemodynamicznych. Występuje w nich znaczna proliferacja komórek, a w jej następstwie szybsze skracanie telomerów i zwiększone ryzyko wystąpienia miażdżycy [30]. W hodowlach *in vitro*, ECs z zaburzoną funkcją telomerów (wyłączonym genem dla białka TRF2) mają zahamowaną proliferację oraz zmieniony fenotyp. Są powiększone, zwiększa się ekspresja inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (*cyclin-dependent kinase*, CDK), ICAM-1, spada natomiast produkcja tlenku azotu przez śródbłonkową syntetazę tlenku azotu. Podobne zmiany występują także w replikacyjnym starzeniu się niezmiennych komórek (po około 50 podziałach). Komórki te mają również większą aktywność β -galaktozydazy, enzymu charakterystycznego dla „starych” komórek [43].

W niekorzystnych warunkach, takich jak: zmniejszenie przepływu czy stężenia różnych substancji (np. VEGF, bFGF, MMPs, PDGF czy NO), może nastąpić regresja naczyń. Przykładem może być zanik kłębuszków nerkowych w przypadku braku VEGF [15, 32].

Komórki śródbłonka pochodzą z angioblastów płodu (podobne pochodzenie jak komórek krwi) [42] oraz z komórek prekursorowych śródbłonka (mogą także wydzielać czynniki wzrostu naczyń) [48] i komórek macierzystych szpiku u dorosłych [39, 49]. Wszystkie te rodzaje komórek mają podobne antygeny, receptory dla podobnych cytokin (np. VEGF, PlGF, angiopoetyny (Ang)-1, ID) oraz mogą przekształcać się jedne w drugie (np. HSCs mogą powstawać w życiu płodowym z komórek śródbłonka, a leukocyty i HSCs mogą zarówno przekształcać się w EC, jak i stymulować formowanie naczyń), różnią się natomiast czasem i miejscem występowania [16, 18, 21, 39, 40, 57].



RYCINA 1. Regeneracja śródbłonna naczyń przy pomocy EPCs (*endothelial progenitor (precursor) cells* – komórek prekursorowych śródbłonna)

Także w późniejszych etapach życia istnieje grupa komórek: krążące śródbłonkowe komórki prekursorowe, wywodząca się głównie ze szpiku i mająca znaczenie w naprawie uszkodzonych naczyń oraz wzroście guzów. Ludzkie EPCs charakteryzują się obecnością antygenów powierzchniowych, takich jak np. CD31, CD34, CD133, CD146, CXCR4, c-Kit, *VE-cadherin*, VEGFR2, vWF. W stanie spoczynku CEPs VEGFR⁺ stanowią tylko 0,01% jądrzastych komórek krwi. Jeżeli konieczny jest wzrost śródbłonna, następuje mobilizacja tych komórek (ich liczba we krwi w ciągu 24 godzin wzrasta do 12%), po czym osiadają one w miejscach, gdzie został odsłonięty kolagen i fibronektyna, a następnie, w zależności od działających na nie czynników, przekształcają się w śródbłonek (pod wpływem VEGF-A) lub mięśniówkę gładką (dzięki obecności PDGF). Uważa się, że VEGF-A, metaloproteinazy oraz PIGF są odpowiedzialne za uwalnianie komórek prekursorowych ze szpiku (ryc. 1). Komórki prekursorowe mają zdecydowanie większe zdolności proliferacyjne niż dojrzałe ECs [47].

WPŁYW LOKALNYCH CZYNNIKÓW REGULACYJNYCH NA ŚRÓDBŁONEK I FORMOWANIE SIĘ NACZYŃ

Jednym z czynników sterujących procesem kształtowania się naczyń jest różna ekspresja i działanie ogólnoustrojowych cytokin regulujących angiogenezę, takich jak VEGF czy Ang-1 (w tkankach (guzach), z naczyniami o niskiej przepuszczalności

występuje wysoki poziom Ang-1 oraz niski VEGF, natomiast w tych z dużą przepuszczalnością często brakuje Ang-1) [26]. VEGF działa w tym przypadku przez zwiększenie stężenia wapnia w komórce, jej obkurczenie i fenestrację. Ang-1 stymuluje angiogenezę w skórze, natomiast działa na nią hamująco w sercu [56].

Innymi poznanymi cytokinami specyficznymi dla narządów i tkanek są *blood vessel/epicardium substance* i fibulina-2 w sercu oraz EG-VEGF i prokinocytyna-2 w gruczołach endokrynych [36].

Ważnymi cytokinami działającymi na komórki śródbłonna jest rodzina VEGF, składająca się z: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PlGF. VEGF-A wpływa głównie na wzrost naczyń krwionośnych, natomiast VEGF-C i VEGF-D regulują wzrost naczyń limfatycznych [10, 33]. W doświadczeniach *in vitro* VEGF zapobiega apoptozie ECs (przez receptor VEGFR-2) także w warunkach braku surowicy. Dzieje się tak dzięki uaktywnieniu szlaku: kinaza fosfatydylinozytolowa (PI-3 – Akt [13] oraz zwiększeniu ekspresji białek antyapoptotycznych: Bcl-2 i A1 [14]. Działanie to zmienia się wraz z wiekiem (np. u myszy, blokowanie VEGF prowadzi do apoptozy ECs u noworodków, ale nie u dorosłych osobników). VEGF powoduje również, w sposób zależny od dawki, rozszerzenie naczyń poprzez stymulację wydzielania śródbłonkowego tlenu azotu.

VEGF działa przez kilka receptorów: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (*KDR-kinase domain region*, FLK-1 (nie wiąże VEGF-B)) należące do rodziny kinaz tyrozynowych, VEGFR-3 (Flt-4 (wiąże VEGF-C i VEGF-D)) oraz rodzinę ko-receptorów – neurofiliny.

VEGFR-1, którego ekspresję zwiększa hipoksja (przez wzrost poziomu HIF), jest receptorem dla VEGF-A, VEGF-B oraz PlGF. Poza odpowiedzią związaną z fosforylacją tyrozyn proponuje się także możliwość funkcjonowania VEGFR-1 jako receptora-pułapki (występuje również w rozpuszczalnej formie), wiążącego VEGF i uniemożliwiającego jego połączenie z innymi receptorami (np. VEGFR-2). Nie jest do końca jasne czy receptor ten ma działanie anty- (ma w swojej budowie motyw zapobiegający aktywacji kinazy PI-3) czy promitogenne (np. przez aktywację antyapoptotycznego genu dla *surwiwiny*).

Myszy ze zmutowanym genem dla VEGFR-1 giną we wczesnym okresie życia płodowego w wyniku braku tworzenia się cewek naczyniowych. Następuje natomiast silna proliferacja angioblastów (co dodatkowo przemawia za antymitogennym działaniem VEGFR-1). Poza tym VEGFR-1 stymuluje komórki śródbłonna do wydzielania metaloproteinaz macierzy (MMP9) oraz innych enzymów proteolitycznych.

Inne działanie ma natomiast VEGFR-2. Powoduje on proliferację oraz migrację komórek biorących udział w angiogenezie. Po połączeniu się z ligandem receptor ulega dimeryzacji i następuje fosforylacja reszt tyrozynowych w białkach, takich jak: fosfolipaza C- γ , kinaza PI-3, białko aktywujące GTPazę Ras czy rodzinę protein Src. Aktywowany jest również szlak Raf-Mek-Erk (przy pomocy kinazy C, ale bez użycia Ras).

Istnieje szereg czynników zwiększających wydzielanie VEGF. Są to: EGF, TGF- α i - β , KGF, IGF-1, FGF, PDGF, cytokiny zapalne: IL-1 α , IL-6 (jest to jeden z możliwych mechanizmów promujących zwiększenie unaczynienia zmienionych zapalnie i nowotworowo tkanek) oraz niektóre hormony (np. testosteron).

Kolejnym czynnikiem stymulującym angiogenezę jest hipoksja, stymulująca komórki do wydzielania takich substancji, jak: VEGF, PDGF czy HIF.

HIF-1 jest heterodimerem $\alpha\beta$, który został odkryty jako indukowane przez hipoksję białko wiążące się z DNA, zwiększające poziom promotora genu dla erytropoetyny. Jednak jego obecność stwierdzono również w komórkach nieprodukujących erytropoetyny, co sugerowało także inne jego funkcje. Podjednostki α i β są izoformami kodowanymi przez geny z różnych loci. Podjednostka HIF-1 β jest konstytutywnym białkiem jądrowym, natomiast HIF- α jest indukowana przez niedotlenienie. Z trzech izoform HIF- α , dwie (HIF-1 α i HIF-2 α) indukują (wspólnie z HRE) transkrypcję, natomiast HIF-3 α ją hamuje. Jednym z głównych mechanizmów działania proangiogenetycznego HIF (a zwłaszcza HIF-1) jest zwiększenie ekspresji VEGF. Po zwiększeniu dostępności tlenu do komórek HIF szybko ulega proteolizie [46].

Cytokiny z rodziny TGF- β mogą wpływać na dojrzewające naczynia w sposób zależny od stężenia. W niskim stężeniu TGF- β 1 promuje angiogenezę przez zwiększenie ekspresji innych cytokin oraz proteaz, natomiast w wysokich dawkach hamuje wzrost śródbłonna oraz sprzyja różnicowaniu SMCs i przebudowie błony podstawnej.

Ostatnio wykazano, że także nikotyna może promować angiogenezę przez aktywację receptorów nikotynowych na powierzchni komórek śródbłonna. Mekamylamina, bloker nAChR, powoduje zniesienie tego efektu. Aktywacja tego receptora powoduje również wzrost poziomu VEGF. Nikotyna stymuluje także produkcję takiego promotora angiogenezy, jak MCP1 [22].

Kolejnym szlakiem metabolicznym wpływającym na angiogenezę jest układ związany z PPARs – jest to rodzina 3 izotypów receptorów (α , β i γ), będących wewnątrzkomórkowymi „czujnikami” dla kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, transkrypcyjnie regulujących metabolizm tłuszczów i glukozy. Aktywacja tych receptorów powoduje zahamowanie angiogenezy poprzez zatrzymanie proliferacji ECs (a przy większych stężeniach ligandów nawet ich apoptozę), blokowanie ich migracji i formowania się tub. Jako molekularny mechanizm wyjaśnienia tego zjawiska postuluje się wpływ szlaku PPARs na dezorganizację cytoszkieletu aktynowego, zmniejszenie indukowanej przez bFGF aktywacji Akt i ekspresji genu dla COX-2 oraz zmniejszenie produkcji chemokin z rodziny CXC. Niektóre aktywatory PPARs (np. fenofibrat) mogą znaleźć kliniczne zastosowanie, np. przy hamowaniu angiogenezy nowotworowej [11, 31, 44, 59].

Z układem PPARs związane są COX-1 i COX-2 – izoenzymy biorące udział w przemianach kwasu arachidonowego i jego pochodnych. Produkty tych przemian (np. prostaglandyny) znane są ze swego proangiogenego działania (zwiększają proliferację i migrację ECs), m.in. przez: aktywację mediowanej przez integrynę $\alpha_v\beta_3$ i zależnej od cAMP/PKA GTPazy Rac i Cdc42; zwiększenie ekspresji CXCR4. Istnieje również interakcja między COX (głównie COX-2) a innymi proangiogennymi czynnikami, takimi jak VEGF, bFGF – substancje te pobudzają wzajemnie swoją syntezę. Jest to prawdopodobnie jedna z przyczyn nadmiernej angiogenezy obserwowanej w miejscach objętych przewlekłym procesem zapalnym oraz guzach nowotworowych (w niektórych potwierdzono doświadczalnie zwiększoną ekspresję COX-2). Zahamowanie tego działania przy użyciu NLPZ (blokujących COX), takich jak np. kwas acetylosalicylowy, może być jednym z mechanizmów przeciwnowotworowej aktywności tej grupy leków [4, 7, 8, 29, 50, 58, 65].

WPLYW SKŁADNIKÓW MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ NA TWORZENIE SIĘ NACZYŃ

Ważnym czynnikiem wpływającym na proliferację i różnicowanie komórek śródbłonka, a także na formowanie się nowych naczyń jest ECM, składająca się m.in. z: kolagenu IV, lamininy, fibronektyny, fibryny, kolagenu I, elastyny. Podczas tworzenia się nowych wypustek naczyniowych substancje, takie jak: aktywatory i inhibitory plazminogenu (np. urokinaza, PAI-1), MMPs, TIMPs, heparyny, chymazy, tryptazy oraz katepsyny, nie tylko degradują istotę międzykomórkową, tworząc przestrzeń dla nowych naczyń, ale także odsłaniają epitopy (np. kolagen IV), uwalniają z macierzy cytokiny (zarówno te aktywujące: bFGF, VEGF, TGF- β , IL-1 β , jak i hamujące angiogenezę: TSP-1, kanstatynę, tumstatynę, endostatynę oraz PF-4) oraz zmieniają strukturę okolicznych białek (np. kolagenu fibrylarnego), co dodatkowo stymuluje i kierkuje migrację komórek śródbłonka i mięśniówki gładkiej. Ta ich plejotropowa aktywność może zależeć od stężenia oraz miejsca, w którym działają [2, 20, 25, 38, 45].

Na kierunek ruchu komórek śródbłonka w czasie angiogenezy wpływa również obecność lub brak pewnych substancji istoty międzykomórkowej – osteopontyny oraz kwasu hialuronowego, które przejściowo wiąże się z błonową glikoproteiną komórek śródbłonka – CD44.

Także integryny (zwłaszcza $\alpha_v\beta_3$ oraz $\alpha_v\beta_5$), będące powierzchniowymi receptorami dla specyficznych ligandów macierzy pozakomórkowej, modulują proces waskulogenezy [1, 23, 24]. Ich działanie nie jest jednak do końca jasne. Próby z użyciem ich antagonistów wskazują na działanie stymulujące, natomiast doświadczenia z wyłączeniem funkcji kodujących je genów sugerują zahamowanie angiogenezy (prawdopodobnie w drodze zmniejszenia przeżycia ECs mediowanego przez VEGF i Flk-1, blokowania innych integryn, przekazywania antyangiogenetycznej aktywności TSPs, tumstatyny, endostatyny, angiostatyny oraz PEX).

Komórki endotelium tego samego typu łączą się przez CD31 (PECAM) oraz Cx (koneksyny), dodatkowo umożliwiające ich wzajemną komunikację. Zmniejszenie poziomu Cx37 i Cx40 powoduje tworzenie naczynek jamistych, a brak Cx43 zaburza formowanie tętnic wieńcowych [53].

W powyższej pracy omówiono tylko niektóre spośród wielu zjawisk, w jakie zaangażowany jest śródbłonek. Odgrywa on ważną rolę w trakcie formowania się naczyń zarówno w rozwoju zarodkowym, jak i w procesach regeneracyjnych oraz chorobowych późniejszego życia osobniczego. Dlatego też konieczne są dalsze badania nad jego funkcją oraz udziałem w przemianach biologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMIEC J, OFICJALSKA-MŁYŃCZAK J. Rola komórkowych cząsteczek adhezyjnych w rozwoju proliferacyjnej retinopatii cukrzycowej. *Klin Oczna* 2005; **107**: 330–333.
- [2] BEDNARSKA-CHABOWSKA D, ADAMIEC R, PAWLIKOWSKI A, ADAMIEC J. Wybrane problemy funkcjonowania śródbłonna. II. Rola selekty w uszkodzeniach śródbłonna naczyń. *Pol Merkuriusz Lek* 2002; **12**: 329–332.
- [3] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; **9**: 653–660.
- [4] CHU J, LLOYD FL, TRIFAN OC, KNAPP B, RIZZO MT. Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; **2**: 1–7.
- [5] CLEAVER O, MELTON DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003; **9**: 661–668.
- [6] CORADA M, ZANETTA L, ORSENIKO F, BREVIARIO F, LAMPUGNANI MG, BERNASCONI S, LIAO F, HICKLIN DJ, BOHLEN P, DEJANA E. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 2002; **100**: 905–911.
- [7] DAVIES G, SALTER J, HILLS M, MARTIN LA, SACKS M, DOWSETT M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 2651–2656.
- [8] DORMOND O, RUEGG C. Regulation of endothelial cell integrin function and angiogenesis by COX-2, cAMP and Protein Kinase A. *Thromb Haemost* 2003; **90**: 577–585.
- [9] FELESZKO W. Załącznik – wykaz cząsteczek CD. W: Jakóbsiak M. Immunologia. Warszawa: Wydaw. Naukowe PWN 1998: 653–663.
- [10] FERRARA N, GERBER HP, LeCOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**: 669–676.
- [11] GACKA M, ADAMIEC R. Mutacje genu receptora aktywowanego przez proliferatory peroksydomów γ (PPAR γ) – implikacje kliniczne. *Post Hig Med Dosw (Online)* 2004; **58**: 483–489.
- [12] GALE NW, BALUK P, PAN L, KWAN M, HOLASH J, DECHIARA TM, McDONALD DM, YANCOPOULOS GD. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 2001; **230**: 151–160.
- [13] GERBER HP, MCMURTREY A, KOWALSKI J, YAN M, KEYT BA, DIXIT V, FERRARA N. VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 30343–30366.
- [14] GERBER HP, DIXIT V, FERRARA N. Vascular endothelial growth factor induces expression of antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13313–13316.
- [15] GERBER HP, HILLAN KJ, RYAN AM, KOWALSKI J, KELLER GA, RANGELL L, WRIGHT BD, RADTKE F, AGUET M, FERRARA N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; **126**: 1149–1159.
- [16] GERBER HP, MALIK AK, SOLAR GP, SHERMAN D, LIANG XH, MENG G, HONG K, MARSTERS JC, FERRARA N. VEGF regulates haemopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002; **417**: 954–958.
- [17] GERETY SS, WANG HU, CHEN ZF, ANDERSON DJ. Symmetrical mutant phenotypes of receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand EphrinB2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 1999; **4**: 403–414.
- [18] GRANT MB, MAY WS, CABALLERO S, BROWN GA, GUTHRIE SM, MAMES RN, BYRNE BJ, VAUGHT T, SPOERRI PE, PECK AB, SCOTT EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; **8**: 607–612.
- [19] HACKETT SF, WIEGAND S, YANCOPOULOS G, CAMPOCHIARO PA. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol* 2002; **192**: 182–187.
- [20] HANGAI M, KITAYA N, XU J, CHAN CK, KIM JJ, WERB Z, RYAN SJ, BROOKS PC. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol* 2002; **161**: 1429–1437.
- [21] HATTORI K, HEISSIG B, WU Y, DIAS S, TEJADA R, FERRIS B, HICKLIN DJ, ZHU Z, BOHLEN P, WITTE L, HENDRIKX J, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, WERB Z, LYDEN D, RAFII S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1⁺ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; **8**: 841–849.
- [22] HECHT SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **4**: 733–744.
- [23] HOOD JD, CHERESH DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 91–100.

- [24] HYNES RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med* 2002; **8**: 918–921.
- [25] JACKSON C. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; **11**: 295–299.
- [26] JAIN RK, MUNN LL. Leaky vessels? Call Ang-1! *Nat Med* 2000; **6**: 131–132.
- [27] JAIN RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; **9**: 685–693.
- [28] JELTSCH M, TAMMELA T, ALITALO K, WILTING J. Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 2003; **314**: 69–84.
- [29] JOO YE, REW JS, SEO YH, CHOI SK, KIM YJ, PARK CS, KIM SJ. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; **37**: 28–33.
- [30] KAZMIERSKI R. Biomechaniczne siły ścinania występujące w tętnicach szyjnych a rozwój miażdżycy. *Post Hig Med Dosw* 2003; **57**: 713–725.
- [31] KESHAMOUNI VG, ARENBERG DA, REDDY RC, NEWSTEAD MJ, ANTHWAL S, STANDIFORD TJ. PPAR- γ activation inhibits angiogenesis by blocking ELR+CXC chemokine production in non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005; **7**: 294–301.
- [32] KITAMOTO Y, TOKUNAGA H, TOMITA K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J Clin Invest* 1997; **99**: 2351–2357.
- [33] KOWALCZYK J, PASYK S. Śródbłonkowy czynnik wzrostu i jego zastosowanie w terapii chorób sercowo-naczyniowych. *Pol Merkuriusz Lek* 2002; **13**: 74–78.
- [34] LAWSON ND, SCHEER N, PHAM VN, KIM CH, CHITNIS AB, CAMPOS-ORTEGA JA, WEINSTEIN BM. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001; **128**: 3675–3683.
- [35] LAWSON ND, VOGEL AM, WEINSTEIN BM. Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 2002; **3**: 127–136.
- [36] LeCOUTER J, KOWALSKI J, FOSTER J, HASS P, ZHANG Z, DILLARD-TELM L, FRANTZ G, RANGELL L, DeGUZMAN L, KELLER GA, PEALE F, GURNEY A, HILLAN KJ, FERRARA N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001; **412**: 877–884.
- [37] LESNIAK W, KOLASINSKA-KLOCH W, KIEC B. Śródbłonek naczyń – funkcja, zaburzenia i kliniczne próby modyfikacji. *Folia Med Cracov* 2001; **42**: 5–14.
- [38] LUTTUN A, DEWERCHIN M, COLLEN D, CARMELIET P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep* 2000; **2**: 407–416.
- [39] LUTTUN A, CARMELIET G, CARMELIET P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; **12**: 88–96.
- [40] LYDEN D, HATTORI K, DIAS S, COSTA C, BLAIKIE P, BUTROS L, CHADBURN A, HEISSIG B, MARKS W, WITTE L, WU Y, HICKLIN D, ZHU Z, HACKETT NR, CRYSTAL RG, MOORE MA, HAJJAR KA, MANOVA K, BENEZRA R, RAFII S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; **7**: 1194–1201.
- [41] MAISONPIERRE PC, SURIC, JONES PF, BARTUNKOVA S, WIEGAND SJ, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, MCCLAIN J, ALDRICH TH, PAPAPOULOS N, DALY TJ, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997; **277**: 55–60.
- [42] MIKKOLA HK, ORKIN SH. The search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; **11**: 9–17.
- [43] MINAMINO T, MIYAUCHI H, YOSHIDA T, ISHIDA Y, YOSHIDA H, KOMURO I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; **105**: 1541–1544.
- [44] PANIGRAHY D, SINGER S, SHEN LQ, BUTTERFIELD CE, FREEDMAN DA, CHEN EJ, MOSES MA, KILROY S, DUENSING S, FLETCHER C, FLETCHER JA, HLATKY L, HAHNFELDT P, FOLKMAN J, KAIPAINEN A. PPAR- γ ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; **110**: 923–932.
- [45] PEPPER MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; **86**: 346–355.
- [46] PUGH CW, RATCLIFF PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the Hif system. *Nat Med* 2003; **9**: 677–684.
- [47] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**: 702–712.
- [48] REHMAN J, LI J, ORSCHELL CM, MARCH KL. Peripheral blood „endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; **107**: 1164–1169.

- [49] REYES M, DUDEK A, JAHAGIRDAR B, KOODIE L, MARKER PH, VERFAILLIE CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; **109**: 337–346.
- [50] SALCEDO R, ZHANG X, YOUNG HA, MICHAEL N, WASSERMAN K, MA WH, MARTINS-GREEN M, MURPHY WJ, OPPENHEIM JJ. Angiogenic effect of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; **102**:1966–1977.
- [51] SAWICKI W. Śródbłonek. W: Sawicki W. Histologia. Wydaw. Lekarskie PZWL, Warszawa 2003: 236–239.
- [52] SHIN D, GARCIA-CARDENA G, HAYASHI S, GERETY S, ASAHARA T, STAVRAKIS G, ISNER J, FOLKMAN J, GIMBRONE MA Jr, ANDERSON DJ. Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* 2001; **230**: 139–150.
- [53] SIMON AM, McWHORTER AR. Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction protein connexin37 and connexin40. *Dev Biol* 2002; **251**: 206–220.
- [54] SOOD AK, FLETCHER MS, HENDRIX MJ. The embryonic-like properties of aggressive human tumor cells. *J Soc Gynecol Investig* 2002; **9**: 2–9.
- [55] STALMANS I, NG YS, ROHAN R, FRUTTIGER M, BOUCHE A, YUCE A, FUJISAWA H, HERMANS B, SHANI M, JANSEN S, HICKLIN D, ANDERSON DJ, GARDINER T, HAMMES HP, MOONS L, DEWERCHIN M, COLLEN D, CARMELIET P, D'AMORE PA Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 2002; **109**: 327–336.
- [56] SURI C, McCLAIN J, THURSTON G, McDONALD DM, ZHOU H, OLDMIXON EH, SATO TN, YANCOPOULOS GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998; **282**: 468–471.
- [57] TAKAKURA N, WATANABE T, SUENOBU S, YAMADA Y, NODA T, ITO Y, SATAKE M, SUDA T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; **102**: 199–209.
- [58] TAMURA M, SEBASTIAN S, GURATES B, YANG S, FANG Z, BULUN SE. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3505–3507.
- [59] VARET J, VINCENT L, MIRSHAHI P, PILLE JV, LEGRANDE E, OPOLOP P, MISHAL Z, SORIA J, LI H, SORIA C. Fenofibrate inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 810–819.
- [60] VISCONTI RP, RICHARDSON CD, SATO TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8219–8224.
- [61] WANG HU, CHEN ZF, ANDERSON DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; **93**: 741–753.
- [62] WAS H. Charakterystyka antygenów i czynników wzrostu śródbłonna limfatycznego. *Post Biochem* 2005; **51**: 209–214.
- [63] WILTING J, PAPOUTSI M, BECKER J. The lymphatic vascular system: secondary or primary? *Lymphology* 2004; **37**: 98–106.
- [64] WILTING J, TOMAREV SI, CHRIST B, SCHWEIGERER L. Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003; **1**: 33–40.
- [65] YAZAWA K, TSUNO NH, KITAYAMA J, KAWAIK, OKAJI Y, ASAKAGE M, SUNAMI E, KAISAKI S, HORI N, WATANABE T, TAKAHASHI K, NAGAWA H. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 inhibits endothelial cell proliferation by induction of cell cycle arrest. *Int J Cancer* 2005; **113**: 541–548.
- [66] ZHANG XQ, TAKAKURA N, OIKE Y, INADA T, GALE NW, YANCOPOULOS GD, SUDA T. Stromal cells expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells. *Blood* 2001; **98**: 1028–1031.
- [67] ZHONG TP, CHILDS S, LEU JP, FISHMAN MC. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001; **414**: 216–220.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.10.2005 r.

Przyjęto: 15.12.2005 r.

ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

klipski@ib.amwaw.edu.pl