

## MOLEKULARNE MECHANIZMY PROCESÓW ANGIOGENNYCH I ICH UDZIAŁ W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY

MOLECULAR ASPECTS OF ANGIOGENESIS AND ITS ROLE IN  
ARTHEROSCLEROSIS

Piotr ZAWIERUCHA<sup>1,2</sup>, Bartosz KEMPISTY<sup>1,2</sup>, Patrycja SOSIŃSKA<sup>3</sup>,  
Karolina WOJTOWICZ<sup>1</sup>, Michał NOWICKI<sup>1</sup>, Wojciech WITKIEWICZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

<sup>3</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

<sup>4</sup>Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu

*Streszczenie:* Arterioskleroza jest jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie spowodowanych chorobą niedokrwienną serca. Pomimo znacznego postępu jaki dokonał się w medycynie oraz naukach pokrewnych przez ostatnie 25 lat, nadal nie zostały wyjaśnione przyczyny tych procesów. Obecnie jedynym środkiem zaradczym dla pacjentów objętych zaawansowanymi zmianami arteriosklerotycznymi jest leczenie chirurgiczne. Podejście to niesie jednak za sobą pewne ryzyko powikłań, ponieważ nie da się przewidzieć stanu pacjenta po operacji. Istnieją co prawda zalecenia dotyczące profilaktyki układu krążenia, jednak są one często bardzo ogólne. Brakuje natomiast markerów progresji choroby na etapie już powstałej zmiany miażdżycowej naczyń tętniczych. Angiogeneza jest to proces polegający na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych z puli już istniejących. Szereg badań wykazało wpływ wielu czynników angiogennych w patogenezie arteriosklerozy. Wśród nich HIF1 $\alpha$ , VEGF, ANGPT1 i 2 czy eNOS wpływają w sposób znaczący na przebieg arteriosklerozy i mogą stanowić markery progresji choroby. W artykule opisany został proces angiogenezy w kontekście jego potencjału oraz w odniesieniu do udziału czynników stymulujących go w arteriosklerozie. Omówiono także komórkowe mechanizmy regulacji genów wspólnych dla obu tych procesów.

*Słowa kluczowe:* angiogeneza, arterioskleroza, miRNA, potencjał angiogeny

*Summary:* Arteriosclerosis is one of the most common reason of death in modern world caused by ischemic heart disease. Despite advances in medicine and related disciplines of science in last 25 years still mechanism of this process in unknown. Today surgical approach is the best method to help pa-

tients with ischemic heart problems. Unfortunately this approach is dangerous and result of operation do not give any insurance of patient condition. From the other hand there are some recommendations to prevent circulatory systems failure but those recommendations are usually very general. There is a lack of markers of disease progression on established arteriosclerotic plaque state. Angiogenesis is a process of developing new blood vessels from preexisting one. Many results indicate influence angiogenic factors in progression of arteriosclerosis disease. Proteins including HIF1 $\alpha$ , VEGF, ANGPT1 and 2 or eNOS have high influence on disease progression and they can be used as biomarkers. In this article we describe angiogenesis process in relation to its potential and its influence in arteriosclerosis disease. Additionally we describe some regulatory mechanism of genes that are common for both processes.

*Key words:* angiogenesis, atherosclerosis, miRNA, angiogenic potential

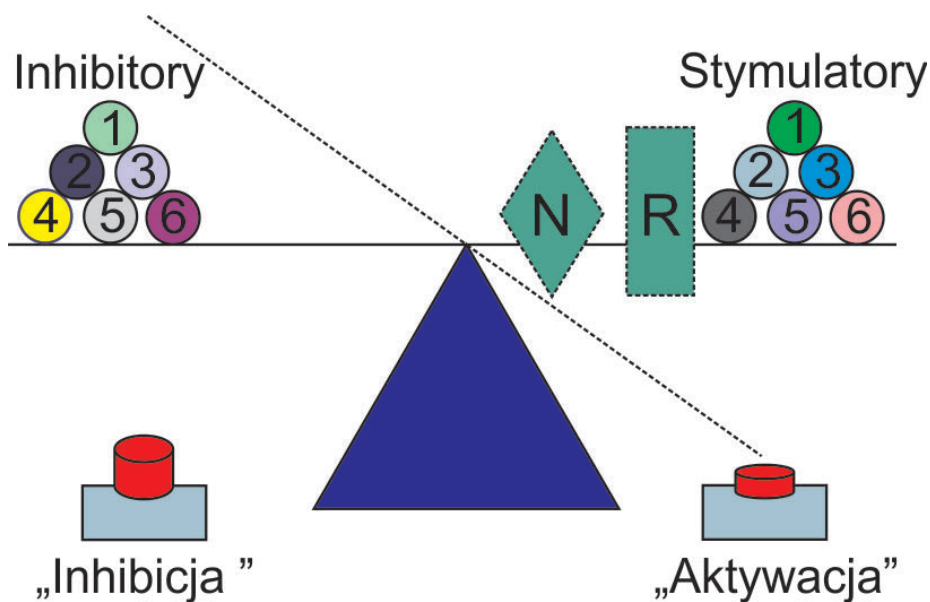
## WSTĘP

Choroby układu krążenia są najczęstszymi przyczynami zgonów na świecie. Wśród nich, arterioskleroza powoduje rocznie blisko 30 tysięcy zgonów w Polsce ([www.nationmaster.com/graph/mor\\_ath-mortality-atherosclerosis](http://www.nationmaster.com/graph/mor_ath-mortality-atherosclerosis)). Wczesne rozpoznanie choroby poprzez monitorowanie czynników ryzyka, do których zalicza się: palenie tytoniu, otyłość, hipercholesterolemie oraz nadciśnienie tętnicze, pozwala na ograniczenie rozwoju zmian miażdżycowych w oparciu o kompleksowe leczenie, polegające na zmianie trybu życia oraz przyjmowaniu odpowiednich leków. W momencie gdy zmiany chorobowe powodują 75% zwężenie światła tętnic wieńcowych, 60-75% zwężenie tętnicy wieńcowej prawej wraz z towarzyszącymi zmianami w innych gałęziach tętnicy (okalającej prawej, międzykomorowej przedniej i tylnej), zwężenie powyżej 50% pnia lewej tętnicy wieńcowej oraz zwężenie gałęzi międzykomorowej przedniej i okalającej, chory kierowany jest na leczenie chirurgiczne. Stosowane w takich przypadkach zabiegi polegają na przeprowadzeniu angioplastyki oraz pomostowania aortalno-wieńcowego (ang. *by-pass*). W obu przypadkach ww. zabiegi wiążą się z nadwyrężeniem bądź uszkodzeniem śródbłonna naczyniowego oraz powstaniem stanów zapalnych, choć ostatnie badania przeprowadzone z wykorzystaniem ludzkiej albuminy dają obiecujące wyniki w zakresie metodyki przeciwwzapalnej [25]. Uszkodzenia te mogą powodować upośledzenie zdolności regeneracji uszkodzonego naczynia, jak również mogą być przyczyną tworzenia zakrzepów [86]. Takie powikłania pociągają za sobą potrzebę ponownego zabiegu, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu pacjenta. Pomimo znacznego postępu w kardiologii, nadal brakuje wymiernego wskaźnika pozwalającego określić molekularny stopień zróżnicowania zmian miażdżycowych. Zasadnym wydaje się uznanie za takie wskaźniki czynniki angiogenne procesu angiogenezy, ponieważ rosnąca liczba dowodów zdaje się potwierdzać hipotezę o udziale tego procesu w patogenezie arteriosklerozy [75].

W artykule opisany został proces angiogenezy oraz punkty krytyczne mogące posłużyć jako biomarkery potencjału angiogennego, oraz ich udział w patogenezie arteriosklerozy. Omówione zostały także czynniki regulujące ekspresję genów kluczowych dla procesu neowaskularyzacji oraz arteriosklerozy.

## ANGIOGENEZA – CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH CZYNNIKÓW PROANGIOGENNYCH

Każda komórka żywego organizmu potrzebuje stałego dopływu tlenu oraz substancji odżywczych w postaci związków organicznych. Wymiana substancji między komórkami oraz możliwość pozbywania się zbędnych produktów przemiany materii są niezbędnymi cechami charakteryzującymi możliwość reagowania oraz adaptacji w tak złożonym systemie jakim jest organizm żywy. Stały przepływ związków drobnocząsteczkowych odbywa się dzięki obecności systemu naczyń krwionośnych. Wszystkie komórki organizmu są „podłączone” do tego systemu lub znajdują się nie dalej niż 200  $\mu\text{m}$  od najbliższego naczynia, z uwagi na to, że jest to maksymalna odległość swobodnej dyfuzji tlenu.



RYCINA 1. Równowaga pomiędzy stymulatorami oraz inhibitorami angiogenezy. Linia przerywana obrazuje aktywację angiogenezy pod wpływem czynników: N – nowotworzenie, R – gojenie się ran  
FIGURE 1. Balance between stimulators and inhibitors of angiogenesis. Dotted line shows activation of angiogenesis under factors: N – carcinogenesis, R – wound healing

Angiogeneza jest procesem polegającym na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, mających za zadanie dostarczenie składników odżywczych do odległych rejonów organizmu. W odróżnieniu od waskulogenezy, definiowanej jako tworzenie naczyń krwionośnych z komórek progenitorowych krwi (hemangioblastów), czy arteriogenezy opisującej tworzenie nowej tętnicy, powstałej z połączonych tętniczek w wyniku okluzji pierwotnego naczynia [14]. Aktywność tego procesu jest wypadkową działania czynników pro- i antyangiogennych, pełniących zarazem funkcje markerów procesu [66]. W warunkach hemostazy równowaga tych czynników przechylna jest nieznacznie w stronę angiogenezy [94, 95].

Inny podział tego procesu obejmuje angiogenezę fizjologiczną oraz patologiczną. Pierwsza jest powszechna i zachodzi podczas cyklu menstruacyjnego u kobiet, w krezce jelita, podczas implantacji zarodka oraz w trakcie tworzenia łożyska. Druga, wg postulatu Folkmana, jest niezbędnym etapem wzrostu guza nowotworowego o objętości ponad 1 mm<sup>3</sup> [30]. U dorosłego człowieka neowaskularyzacja fizjologiczna jest powolna, cykl aktywności angiogennej śródbłonna wynosi 1000 dni [24]. Ze względu na złożoność, cały proces można podzielić na pięć funkcjonalnych etapów.

## ETAP 1.

W pierwszej fazie dochodzi do aktywacji śródbłonna. Najsilniejszym aktywatorem śródbłonna jest niedotlenienie znoszące ubikwintynalną degradację podjednostki  $\alpha$  czynnika indukowanego niedotlenieniem 1 (ang. *Hypoxia Induced Factor 1*, HIF1). W warunkach normoksji podjednostka  $\alpha$  HIF1 jest ściśle kontrolowana poprzez degradację, natomiast podjednostka  $\beta$  ulega konstytutywnej ekspresji. Podczas hipoksji brak degradacji podjednostki  $\alpha$  sprawia, że dimeryzuje ona z podjednostką  $\beta$  tworząc aktywny czynnik transkrypcyjny. Obecnie zidentyfikowano trzy izoformy HIF 1 $\alpha$ : I.3 – ubikwintynalną, odpowiedzialną za aktywność transkrypcyjną podczas niedotlenienia, I.2 – ulegającą ekspresji głównie w jądrach i działającą przeciwstawnie do izoformy I.1 oraz I.3 – ulegającą ekspresji w grasicy w aktywowanych komórkach T oraz leukocytach [63]. Ze względu na podwyższoną ekspresję tej podjednostki, np. w raku prostaty, może być przydatna jako biomarker progresji nowotworu [93]. Ponadto, Grammas i wsp.[33] wykazali znaczący udział czynnika HIF-1 $\alpha$  we wczesnych etapach choroby Alzheimerera. Naczynia wyizolowane z mózgu tych chorych cechował znaczny wzrost ekspresji genów kodujących białka związane z procesem angiogenezy, jak IL-6 (ang. *Interleukin 6*), IL-8, VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) oraz genów kodujących białka z rodziny MMP (ang. *Matrix Metalloproteinases*). Niektóre z nich, jak VEGF są bezpośrednio aktywowane przez HIF-1 $\alpha$ . Ponadto wykazano, że takie czynniki jak: reaktywne formy azotu i tlenu, cytokiny, czynniki wzrostu oraz stymulacja receptorów komórek T, powodują zwiększoną transkrypcję podjednostki  $\alpha$  w warunkach normoksji [63]. Do grupy tej zalicza się tak-

że czynniki pochodzenia wirusowego bądź bakteryjnego, działające przez receptor TLR (ang. *Toll-Like Receptor*). Receptory te odpowiedzialne są także za indukcję kaskady prozapalnej, niezależnej od działania czynników patogennych [3]. Ostatnie badania potwierdziły ich dodatkową funkcję w procesie transformacji nowotworowej. W komórkach nowotworowych rola tych białek polega na blokowaniu cyklu komórkowego, wspomaganie wzrostu guza oraz unikaniu odpowiedzi immunologicznej jak i zahamowaniu ścieżki proapoptotycznej [43, 51, 64]. Aktywność HIF jest ściśle kontrolowana poprzez enzymy monitorujące poziom tlenu, do których należą białka PHD (ang. *Prolyl-4-Hydroxylase*) oraz inhibitor HIF- FIH (ang. *Factor Inhibiting HIF*) [39]. W warunkach odpowiedniego nasycenia tlenem PHD wykorzystują go do hydroksylacji proliny wchodzącej w skład HIF, co aktywuje proces proteosomalnej degradacji przez kompleks von Hoppel-Lindau (VHL). FIH natomiast hydrolizuje konserwatywną asparaginę wchodzącą w skład HIF1 $\alpha$ , co uniemożliwia interakcję HIF1 $\alpha$  z kofaktorem p300 i tym samym obniża aktywność transkrypcyjną HIF1 $\alpha$  [28]. Tym samym dochodzi do zatrzymania sygnału aktywacji transkrypcji genów regulowanych przez ten czynnik [49]. Do tej pory wyróżniono trzy geny proangiogenne, których ekspresja zależna jest od aktywności HIF 1, należą do nich; *VEGF*, *GLUT-1* (ang. *Glucose Transporter 1*) oraz *EPO* (ang. *Erythropoetin*). Białko VEGF należy do rodziny chemokin wydzielanych przez śródbłonek i jest pierwszym odkrytym czynnikiem stymulującym angiogenezę. Za jego pośrednictwem dochodzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń, poszerzenia naczyń, stymulacji produkcji tlenku azotu (NO) przez komórki śródbłonka naczyniowego, stymulacji produkcji metaloproteinaz (MMP), remodelingu oraz ochrony śródbłonka przed apoptozą. U człowieka wyizolowano dziesięć izoform VEGF: 121, 138, 145, 148, 162, 162b, 165, 183, 189 i 206, z których najważniejsze to 121 oraz 165. Do istotnych czynników nasilających ekspresję VEGF, obok niedotlenienia, zaliczyć należy temperaturę, poziom glukozy, prostogladyn, estrogenów oraz cytokin [85]. Jednak najsilniejszym aktywatorem ekspresji VEGF jest niedotlenienie, gdzie poziom transkryptu jest odwrotnie proporcjonalny do ciśnienia parcjalnego tlenu na zewnątrz komórki. Wzrost poziomu VEGF, jak i innych czynników inicjujących, włączając EPO, odbywa się poprzez HIF1, który łączy się z konserwatywnym regionem regulatorowym HRE w obrębie promotora genu [41]. Angiogeneza połączona jest także z innymi procesami, takimi jak procesy metaboliczne, głównie za pośrednictwem tlenu. Aby móc się przemieszczać i tworzyć zawiązki nowego naczynia, komórki śródbłonka potrzebują energii pochodzącej z metabolizmu tlenu. Quintero i wsp. [70] wykazali, że pomimo bezpośredniego dostępu komórek śródbłonka do tlenu pochodzącego ze światła naczynia, większość energii pozyskiwana jest anaerobowo na drodze glikolizy. Pirogronian powstały w wyniku metabolizmu glukozy staje się substratem do produkcji laktonu. Lakton z kolei hamuje działanie PHD, co nasila działanie HIF. Tylko znikoma ilość pirgronianu trafia na szlak fosforylacji oksydacyjnej, prowadzącej do powstania reaktywnych form tlenu, także hamujących PHD. Taki mechanizm pozyskiwania energii znany jest jako efekt

Warburga i jest często spotykany w komórkach nowotworowych [87]. W przypadku angiogenezy, śródbłonek nie wykorzystując tlenu zapewnia jego dostateczny poziom komórkom leżącym dalej od światła naczynia. Badania *in vitro* wykazały ponadto, że ekspozycja hodowli śródbłoneka naczyniowego na zwiększone stężenie glukozy, skutkuje dodatkowym obniżeniem pobierania tlenu. Proces ten znany jako efekt Crabtree dodatkowo nasila pozyskiwanie energii na drodze glikolizy [47].

## ETAP 2.

Drugi etap procesu obejmuje degradację błony podstawnej naczynia oraz macierzy pozakomórkowej (ang. *Extra Cellular Matrix*, ECM). Odbywa się to za sprawą enzymów z rodziny metaloproteinaz (MMP), wydzielanych przez komórki śródbłoneka naczyniowego. Enzymy te, których aktywność zależy od stężenia jonów żelaza oraz wapnia, dzielą się na błonowe oraz wydzielane w postaci nieaktywnych proenzymów aktywowanych przez odcięcie cząsteczki stanowiącej prodomenę. Regulacja ekspresji MMP odbywa się głównie na poziomie transkrypcji pod wpływem takich czynników jak: cytokiny, czynniki wzrostu, hormony, oddziaływania komórka-komórka, komórka-ECM oraz czynników fizycznych, takich jak np. promieniowanie UV [12]. Wykazano także istnienie pozytywnej pętli aktywacyjno-modyfikującej pomiędzy MMP oraz czynnikami wzrostu i cytokinami [16]. MMP trawiąc ECM uwalniają szereg czynników o działaniu zarówno pro, jak i antyangiogennym. Poprzez degradację kolagenu typu IV, który jest składnikiem błony podstawnej, dochodzi do odsłonięcia na nim miejsca uchwytu integryn, zaliczanych do niezbędnych czynników migracji [61].

## ETAP 3.

W trzecim etapie dochodzi do proliferacji i migracji komórek śródbłoneka głównie za sprawą dwóch rodzajów integryn  $\alpha_v\beta_3$  oraz  $\alpha_v\beta_5$ . Aktywność izoformy VEGF<sub>165</sub> uruchamia szlak migracji komórkowej zależny od PLC $\beta$ 3 (ang. *1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3*) oraz Cdc42 (ang. *Cell division control protein 42 homolog*) aktywując właściwości motoryczne lamelopodiów. Struktury te zbudowane są głównie z włókien aktynowych nazwanych „zębrami” oraz regularnych włókien aktynowych tworzących początkowo mikrowybrzuszenie, a następnie wyraźnie zaznaczające się fillopodium [76]. W tworzeniu sieci lamelopodiów i fillopodiów biorą udział małe białka o właściwościach GTPaz z rodziny Rho, do których należą białka Rac1 (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) i Cdc42 [20]. Aktywacja tych czynników może podlegać regulacji ze strony czynników wzrostu oraz integryn.

#### ETAP 4.

Czwarty etap procesu angiogenezy polega na tworzeniu zawiązków przyszłego naczynia. Migrujące komórki śródbłónka tworzą rurkowate struktury zgodnie z gradientem stężenia czynników proangiogennych. Proces migracji nie jest jednakowy dla wszystkich komórek. Można wyróżnić komórki wiodące, znajdujące się na szczycie rurkowatej struktury oraz komórki podążające. Badania wykazały, że komórki wiodące nie ulegają proliferacji. Służą natomiast jako komórki rozkładające ECM, głównie za sprawą białek MMP1. Proliferacji natomiast ulegają komórki znajdujące się w bezpośrednim kontakcie z komórkami wiodącymi i to one napędzają wzrost naczynia. Stosunek stężenia receptorów dla VEGF (VEGFR1/VEGFR2) decyduje, która z komórek będzie wiodącą, a która podążającą, wpływając na kaskadę sygnałną Dll4 – Notch (ang. *Delta-like 4*) [37, 48]. Nie jest jeszcze znany model tworzenia zawiązków nowego naczynia, jednak badania nad formowaniem rurkowatych struktur i migracji śródbłónka u *Danio* pręgowanego (łac. *Danio rerio*), wykazały wakuolarny mechanizm tworzenia światła naczynia. Zgodnie z nim wewnątrzkomórkowe wakuole o charakterze pinocytarnym stopniowo rozrastają się zajmując znaczną część komórki. Dochodzi wówczas do połączenia przestrzeni zajmowanych przez wakuole między dwoma sąsiednimi komórkami. Dodatkowo, podczas fuzji komórek śródbłónka nie dochodzi do wymieszania sąsiednich przestrzeni cytoplazmatycznych [11, 50]. Kamei i wsp. [50] badając *Danio rerio* wykazali, że zaproponowany model tworzenia światła naczynia jest najbardziej prawdopodobny, ponieważ mechanizmy oparte o apoptozę, sugerujące kawitację naczyniową nie zostały potwierdzone. W celu wizualizacji progresji tworzenia rurkowatych struktur nowego naczynia w oparciu o teorie wakuoli zastosowano kropki kwantowe przemieszczające się zgodnie z kierunkiem tworzenia naczynia. Blum i wsp. [11] opierając się na wcześniejszych badaniach Kamei i wsp. [50] wykazali ponadto, że w łączenie dwóch komórek wiodących, pochodzących z odrębnych gałęzi powstającego naczynia zaangażowane są dwa białka błonowe: obwódki zamykającej 1 (łac. *Zona Occludens 1*, ZO-1) oraz kadheryny VE (CDH5). Kolokalizacja obydwu białek ograniczona jest wyłącznie do rozrastającego się naczynia.

#### ETAP 5.

W ostatniej fazie, przyszłe naczynie zbudowane jeszcze wyłącznie na bazie komórek śródbłónka naczyniowego ulega dojrzewaniu. Proces ten polega na rekrutacji i łączeniu tzw. komórek ościennych, do których zalicza się głównie komórki mięśniówki gładkiej oraz perycyty [31, 81]. W proces łączenia zaangażowane są takie czynniki jak angiopoetyna 1 (Ang 1) oraz angiopoetyna 2 (Ang 2),





które stanowią ligandy dla receptora błonowego Tie 2 (ang. *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2*) znajdującego się na powierzchni komórek śródbłonna. Cały proces rozpoczyna się z chwilą parakrynowego wydzielania płytkowego czynnika wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) przez komórki śródbłonna. PDGF działa stymulująco na pobliskie komórki ościenne, inicjując ich migrację oraz adhezję do powierzchni komórek śródbłonna [55]. Weins i wsp. [88] wykazali udział PDGF w tworzeniu naczyń także na poziomie embrionalnym co wskazuje na dodatkową rolę tego czynnika, nie opartą wyłącznie o właściwości chemoatraktanta. Ponadto, autorzy wykazali wyraźny ubytek komórek mięśniówki oraz perycytów u embrionów z wyciszoną ekspresją PDGF-B oraz jego receptora PDGFR- $\beta$ . Rozmiar ubytku był widoczny podczas organogenezy co wskazuje na selekcyjną, a nie indukcyjną rolę tego czynnika.

Ludzki system angiopoetyna-Tie składa się z dwóch receptorów o właściwościach kinazy tyrozynowej oraz trzech ligandów: Angpt1, 2 oraz Angpt4 (ang. *Angiopoetins*) [45]. Ostatni z wymienionych ligandów bierze udział w obronie przeciw zakażeniu nicieniami z gatunku *Trichuris muris* [21]. Ang1 ulega konstytutywnej ekspresji we wszystkich organach. Dodatkowo bierze udział w kaskadzie immunologicznej poprzez modulację bariery tworzonej przez komórki śródbłonna oraz wpływa na integralność naczynia [44]. Natomiast Ang2 jest odpowiedzialna za remodeling naczynia. Ponadto bierze udział w indukcji przylegania leukocytów do naczynia, jak i ich migracji z naczyń [29]. Nowotwory charakteryzujące się podwyższoną ekspresją Ang2 wykazują silniejsze unaczynienie. Wysokie stężenie tego białka w naczyniach pochodzących z mózgu szczurów, z wyindukowaną chorobą Alzheimera, świadczy o udziale tego czynnika w patogenezie choroby.

Po uformowaniu nowego naczynia, procesy angiogenne ustają. Następuje regresja procesu, która w przypadku gojenia się ran jest wynikiem spadku poziomu czynników proangiogennych pod wpływem słabnącego niedotlenienia. Równowaga przechyla się w stronę czynników antyangiogennych. Perycyty stabilizujące naczynie krwionośne, uwalniają inhibującą formę zaktywowanego transformującego czynnika wzrostu (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* ), która wpływa hamująco na proliferację komórek. Także interferon- $\beta$  produkowany przez naskórek wpływa na zahamowanie angiogenezy. Dodatkowy efekt hamujący wywiera również wazostatyna oraz endostatyna – produkt enzymatycznego cięcia kolagenu typu VIII. W tabeli 1 zestawiono czynniki pro- i antyangiogenne, także te nie omawiane w tym artykule. Wymienione na każdym opisanym powyżej etapie czynniki mogą stanowić biomarkery aktywności angiogenezy. Tworząc z nich panel genów oraz uwzględniając część wspólną z procesami arteriosklerotycznymi, można otrzymać wskaźnik pozwalający monitorować postęp zatoru miażdżycowego.

TABELA 1. Wykaz czynników pro- i antyangiogennych. Kolorowe symbole odpowiadają tym umieszczonym na ryc. 1. VEGF – ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, NO – ang. *Nitric Oxidate*, HGF – ang. *Hepatarular Growth Factor*, FGF – ang. *Fibroblast Growth Factor*, TNF  $\alpha$  – ang. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , PEX – *C-terminal hemopexin-like domain of MMP-2*, IP-10 – *Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10*

TABLE 1. List of pro- and antiangiogenic factors. Colored symbols correlates with those on fig. 1. VEGF- vascular endothelial growth factor, NO – nitric oxidate, HGF – hepatarular growth fator, FGF – fibroblast growth factor, TNF  $\alpha$ - tumor necrosis factor  $\alpha$ , PEX – C-terminal hemopexin-like domain of MMP-2, IP-10 – Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10

CHARAKTER	SYMBOL	NAZWA	FUNKCJA	REFERENCJA
STYMULATORY	 1.	VEGF	Główny aktywator procesu	Olsson AK i wsp. [62]
	 2.	NO	Relaksacja naczyń krwionośnych	Näslund I i wsp. [60]
	 3.	HGF	Stymulacja wzrostu EC i migracji SMC	Perin EC i wsp. [67]
	 4.	FGF	Wzrost naczynia	Woad KJ i wsp. [89]
	 5.	Integryny	Adhezja EC podczas migracji	Arjonen A i wsp. [6]
	 6.	TNF $\alpha$	Migracja EC	Yang H i wsp. [91]
INHIBITORY	 1.	Interferon $\alpha/\beta$	Inhibicja transdukcji sygnału VEGF	Zheng H i wsp. [92]
	 2.	PEX	Inhibicja proliferacji i migracji EC	Kim SK i wsp. [52]
	 3.	Troponina I	Inhibicja proliferacji EC	Quilang X i wsp. [69]
	 4.	Heparyna	Inhibitor dla miR-10b	Shen X i wsp. [74]
	 5.	Prolaktyna	Inhibicja wzrostu EC	Lee J i wsp. [56]
	 6.	IP-10	Zatrzymanie cyklu komórkowego	Belperio JA i wsp. [10]

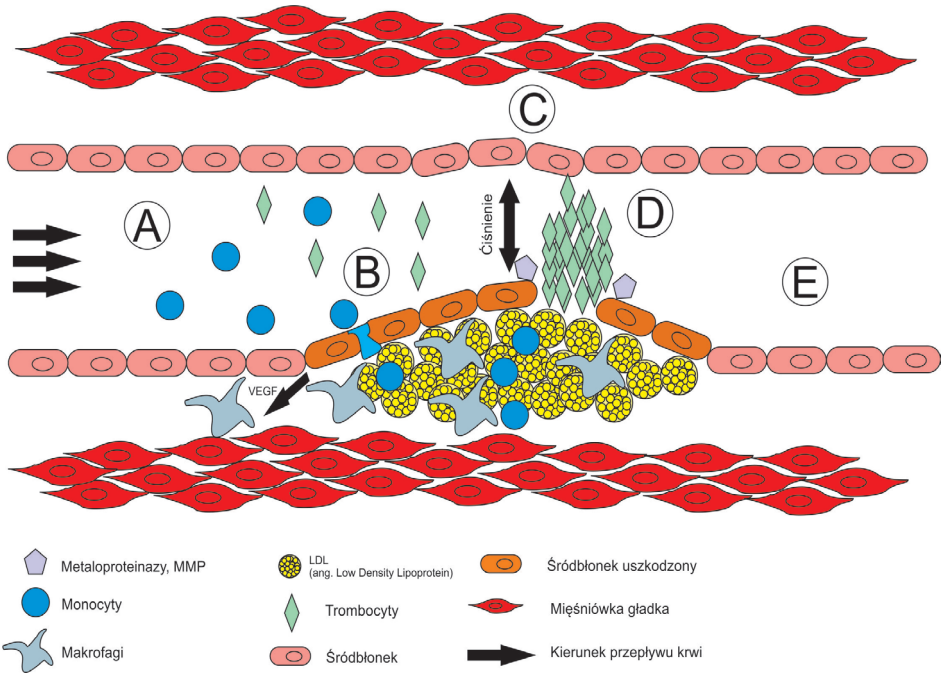
## ARTERIOSKLEROZA A ANGIOGENEZA

Proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych to złożona sieć wzajemnie powiązanych oddziaływań na poziomie genów oraz białek. Wiele spośród czynników odgrywających kluczową rolę w tym procesie bierze również udział w patogenezie procesów miażdżycowych, zarówno na etapie formowania blaszki miażdżycowej, jak i późniejszych etapach skutkujących zaburzeniem funkcji naczynia.

Arterioskleroza jest chorobą, której przebieg łączy się z obniżeniem wydolności naczynia w skutek tworzącej się na jego błonie wewnętrznej blaszki miażdżycowej.

wej. Postępujące zwężenie naczynia powoduje spadek ilości tlenu dostarczanego przez krew do miejsc będących w jego zasięgu. Zmniejszenie światła naczynia wymusza zwiększenie ciśnienia krwi w tej części naczynia, co powoduje powstanie siły działającej z jednej strony na niezajętą ścianę naczynia, a z drugiej na komórki śródbłonna pokrywające blaszkę miażdżycową [40]. W zależności od rozmiaru blaszki oraz skurczu błony mięśniowej może dojść do rozerwania blaszki, co skutkuje powstaniem zakrzepu i/lub embolizacją naczynia. W takich warunkach przewlekłe niedotlenienie uruchamia procesy angiogenezy. Skutkiem uszkodzenia ściany naczynia spowodowanego powstaniem płytki miażdżycowej jest uwalnianie przez śródbłonek szeregu cytokin oraz czynników adhezji komórkowej rekrutujących w miejsce uszkodzenia makrofagi, płytki krwi, leukocyty oraz limfocyty [7, 77]. Calletti i wsp. [15] wykazali bezpośredni udział makrofagów w zwiększaniu powierzchni blaszki miażdżycowej. Głównym czynnikiem przyciągającym makrofagi jest VEGF. Jego ekspresja jest stymulowana poprzez niedotlenienie, które z kolei aktywuje HIF-1 $\alpha$ . Wraz ze składnikami morfotycznymi krwi do obszaru blaszki dostają się także limfocyty T, które staną się źródłem proangiogennych aktywatorów (IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$  oraz VEGF). Powstaje zatem pętla o charakterze dodatniego sprzężenia zwrotnego w procesie angiogenezy.

Utlenione fosfolipidy, wchodzące w skład LDL oraz czynnik transkrypcyjny ETS-1 (ang. *protein C-ets-1*) wpływają na produkcję metaloproteinaz przez makrofagi [14]. Stwierdzono podwyższoną ekspresję MMP-2 i MMP-9 u pacjentów z uszkodzoną blaszką miażdżycową, co sugeruje udział tych enzymów w degradacji kolagenu oraz zwiększonym ryzyku powstania zakrzepu [38]. Poziom MMP-2 oraz MMP-9 jest dobrym czynnikiem prognostycznym przy arteriosklerozie, ponieważ podwyższona ekspresja genów kodujących te białka może posłużyć jako marker selekcyjny klasyfikujący pacjentów do operacji. Markery te są jednak wiarygodny tylko w przypadku zakrzepu na tle miażdżycowym. Gutte i wsp. [36] przeprowadzili doświadczenia mające zweryfikować skuteczność szeregu biomarkerów, w tym MMP-9, używanych w diagnostyce zatorowości płucnej. Wyniki wskazywały na efektywność MMP-9 jako markera, jednak nie w przypadku gdy pacjent cierpiał na zaawansowaną miażdżycę naczyń. W ocenie progresji choroby bierze się również pod uwagę poziom innych enzymów z rodziny MMP. MMP-8 jest jedną z trzech metaloproteinaz odpowiedzialnych za wstępne rozplecenie potrójnej nici kolagenu typu I [23]. Pomimo nakładającej się specyficzności substratowej tej rodziny enzymów, MMP-8 ma trzykrotnie większą specyficzność w porównaniu do MMP-1 oraz MMP-13. Djurić i wsp. [23] wykazali zależność między ekspresją genu kodującego białka MMP-8 a obecnością dwóch polimorfizmów w obrębie promotora genu. Pacjenci z wariantem -381G oraz -799T posiadali więcej kopii mRNA MMP-8 w porównaniu z grupą kontrolną typu dzikiego oraz z grupą posiadającą warianty -381A -781C, co było pozytywnie skorelowane z częstością występowania blaszki miażdżycowej.



RYCINA 2. Schemat przedstawiający przekrój podłużny naczynia objętego procesem miażdżycowym. A – obszar prawidłowego przepływu krwi, B – obszar rekrutacji monocytów oraz makrofagów do rdzenia blaszki, C – odkształcenie śródbłonka pod wpływem ciśnienia krwi, D – skrzep trombotyczny, E – obszar niedotlenienia. VEGF- ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego), LDL – ang. *Low Density Lipoprotein* (lipoproteiny o niskiej gęstości)  
 FIGURE 2. Diagram showing the longitudinal cross-section of blood vessel covered by arteriosclerosis process. A – stable blood flow area, B – area of recruitment for monocytes and macrophages, C – deformation of endothelium caused by blood pressure, D – thrombosis, E – ischemic area. VEGF – vascular endothelial growth factor, LDL- low density lipoprotein

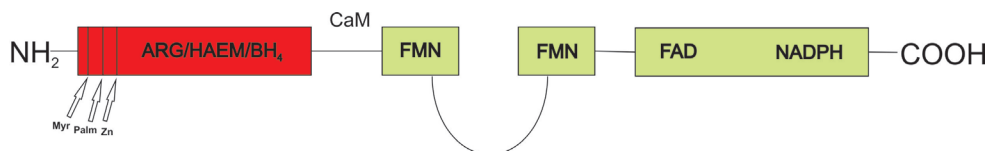
Tlenek azotu (ang. *Nitrous Oxide*, NO) jest cząsteczką pełniącą szereg biologicznych funkcji – działa jako neurotransmitter, cząsteczka sygnałowa poza CUN, ma również zastosowania terapeutyczne. NO jest syntetyzowany przez trzy izoformy syntazy tlenu azotu: neuronalną, indukowaną oraz śródbłonkową. Budowę śródbłonkowej syntazy tlenu azotu przedstawia rycina 3. Enzymy te katalizują konwersję L-argininy i tlenu cząsteczkowego do L-cytruliny oraz NO [73]. Dodatkowo tlenek azotu produkowany przez śródbłonkową syntazę NO (ang. *endothelial Nitrous Oxidate Synthetase*, eNOS) odgrywa ważną rolę jako czynnik powodujący rozszerzanie naczyń krwionośnych podczas wzrostu ciśnienia krwi. Uczestniczy także w inhibicji agregacji płytek, pośredniczy w adhezji leukocytów oraz wpływa na proliferację mięśni gładkich [83]. Mechanizm działania tlenu azotu polega na propagacji kaskady sygnałowej poprzez stymulację produkcji cGMP (ang. *cyclic*

*Guanosine Monophosphate*) przez cyklazę guanylanową, co wiąże się ze spadkiem komórkowego poziomu  $Ca^{2+}$ . Spadek poziomu wapnia przyczynia się do relaksacji włókien mięśni gładkich, poszerzenia światła naczynia oraz spadku ciśnienia krwi. Nieprawidłowe działanie eNOS powoduje różnicę w poziomie NO oraz reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Komórki wykształciły ewolucyjnie mechanizmy obronne przeciw powstawaniu ROS. Należą do nich głównie enzymy z grupy peroksydaz oraz katalaz [65]. Jednak produkcja reaktywnych form tlenu ponad możliwości obronne komórki powoduje szereg nieprawidłowości w jej funkcjonowaniu. Zwiększone stężenie ROS powoduje uszkodzenie nici DNA oraz przyczynia się do progresji miażdżycy [34]. Podstawowym źródłem reaktywnych form tlenu mogą być związki z grupy nadtlenuków, do których zaliczyć można nadtlenek wodoru czy anion ponadtlenkowy. W normalnych warunkach związki te są obojętne dla DNA, jednak gdy zgodnie z mechanizmem reakcji Fentona ulegną konwersji do formy rodnikowej, powodują znaczne uszkodzenia DNA, zarówno jądrowego jak i mitochondrialnego [8]. Defekty te obejmują złamania jednej lub obydwu nici DNA, uszkodzenie cukrów wchodzących w skład nukleotydów oraz negatywny wpływ na procesy naprawcze. Efekt ten jest podtrzymywany poprzez rodnikowy cykl Habera – Weissa. Komórki z licznymi uszkodzeniami DNA mogą wejść na szlak apoptozy oraz zwiększać pulę martwych komórek tworzących jądro nekrotyczne blaszki miażdżycowej. Jednym z kofaktorów niezbędnych dla wydajnej produkcji NO przez eNOS jest związek z rodzaju biopteryn – tetrahydrobiopteryna (ang. *tetrahydrobiopterin*, BH4). Vasquez- Vivar i wsp. [84] wykazali wpływ BH4 na równowagę produkcji NO/ROS w komórce. W przypadku niedoboru BH4, eNOS w formie niezwiązanej nie może z normalną wydajnością produkować NO. Dodatkowo brak biopteryny powoduje propagację stanu nienatywnego, gdyż w tej formie enzym produkuje nadtlenuki utleniające pozostałe cząsteczki BH4. Nadtlenuki mogą także wchodzić w reakcje z NO tworząc peroksynitryl [9]. Peroksynitryl z kolei utlenia BH4 do BH3, dodatkowo zmniejszając jego pulę w komórce. Związek ten jest także toksyczny dla białek o charakterze enzymatycznym, szczególnie dla kinaz, ponieważ powoduje nieodwracalne nitrowanie reszt tyrozyny. Antoniadou i wsp. [5] badając wpływ poziomu BH4 w patogenezie miażdżycy wykazali różnicę w jej poziomie między osoczem a śródbłonkiem. Poziom BH4 w osoczu był pozytywnie skorelowany z nienatywnym stanem eNOS oraz z nieprawidłowym funkcjonowaniem śródbłonka. W wyniku badań nad genem cyklohydrolazy trifosforanu guanidyny 1 (ang. *Guanidine Trophosphate Cyclohydrolase-1*, GTPCH-1) – kluczowego enzymu szlaku syntezy BH<sub>4</sub> – wyodrębniono haplotyp obejmujący mutację typu SNP w obrębie promotora, intronu 1 oraz regionu 3'UTR tego genu. Występowanie tego haplotypu jest związane z dysfunkcją śródbłonka niezależnie od innych czynników [59] promiażdżycowych. Obecnie uważa się, że różnice w haplotypie GTPCH 1 mogą świadczyć o różnej biodostępności BH<sub>4</sub>, a co za tym idzie tłumaczyć zróżnicowanie w przebiegu choroby u pacjentów.

Do wspólnych czynników wpływających na angiogenezę oraz miażdżycę zaliczyć można białka z rodziny angiopoetyn. Udział angpt-1 oraz 2 w angiogenezie został dobrze opisany, jednak ich funkcja w rozwoju miażdżycy nadal pozostaje niewyjaśniona. Z jednej strony działają one jako czynniki prozapalne gdzie angpt 2 uczuła komórki na działanie  $TNF\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor \alpha*).  $TNF\alpha$  jako cytokina o działaniu pleiotropowym przyczynia się do podwyższenia ekspresji białek adhezyjnych oraz wprowadza komórkę na szlak apoptozy poprzez inhibicję surwiwiny połączonej z aktywacją kaspaz. Obumarłe komórki odkładając się w jądze nekrotycznym blaszki przyczyniają się do jej powiększenia.

Z drugiej strony badania Ahmeda i wsp. [2] na myszach z wyidukowanym brakiem ekspresji genu *ApoE* (ang. *Apolipoprotein E*) odpowiedzialnym za katabolizm trójglicerydów, wykazały antymiażdżycowe działanie angpt 2. Wyniki wskazały na istotną redukcję blaszki arteriosklerotycznej po transfekcji komórek myszy adenowirusowym wektorem zawierającym insert angpt 2. Dodatkowo zaobserwowano spadek poziomu białka MDA2 (ang. *Malondialdehydelysine 2*) markera dla utlenionego LDL (ang. *Low Density Lipoprotein*). Badania *in vitro* pozwoliły ustalić, że angpt 2 zmniejsza utlenianie LDL przez NO, co pociąga za sobą redukcję w ich wchłanianiu przez makrofagi [2].

Angpt 1 pełni funkcje protekcyjne przeciw arteriosklerozie poprzez dodatni wpływ na ekspresję apeliny. Apelina jest białkiem produkowanym głównie przez komórki śródbłonka i działającym jako antagonistą angiopotetyny 2 [18]. Stwierdzono pozytywną korelację między stymulacją angpt1 a poziomem apeliny [82]. Lepper i wsp. [58] wykazali udział apeliny w zmniejszaniu światła naczyń krwionośnych, utrzymaniu elastyczności naczynia oraz właściwości kolagenu wchodzącego



RYCINA 3. Domenowa budowa śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS). Myr – miejsce mirystylacji, Palm – miejsce palmitynacji, Zn – miejsce ligacji cystein poprzez cynk, ARG – miejsce przyłączenia L-Argininy, HAEM – grupa hemowa,  $BH_4$  – tetrahydrobiopteryna, CaM – kłמודulina, FMN – mononukleotyd flavinowy, FAD – dinukleotyd flavinoadeninowy, NADPH – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

FIGURE 3. Domain build of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Myr – myristilation area, Palm – palmitoylation area, Zn – area of cystein ligation mediated by zinc, ARG – L- Arginin join area, HAEM – heme group,  $BH_4$  – tetrahydrobiopterin, CaM – calmodulin, FMN – flavin mononucleotide, FAD – flavin adenine dinucleotide, NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

w skład błony podstawnej naczyń, redukcji cząsteczek adhezyjnych oraz komórek prozapalnych. Angpt 1 wpływa także na ochronę przeszczepów serca przez aktywację kaskady prowadzącej do rozwoju arteriosklerozy. Mechanizm ochronny w tym przypadku polega na redukcji napływu leukocytów do przeszczepu co zmniejsza ryzyko powstania stanu zapalnego [58].

## REGULACJA EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW WSPÓLNYCH DLA PROCESÓW ANGIOGENEZY ORAZ ARTERIOSKLEROZY

Jedną z cech odróżniających poszczególne komórki żywego organizmu, pomimo posiadania przez nie tego samego zestawu genów, jest szczegółowy i bardzo dokładnie skoordynowany mechanizm regulacji ich ekspresji. Specjalizacja regulacji ekspresji genów jest tak wysoka, że różnica w ich aktywności jest widoczna nawet w obrębie jednej tkanki. Regulacja może także zachodzić na różnych poziomach poprzez działanie miRNA, białek regulatorowych oraz globalnie na poziomie epigenetycznym.

miRNA (ang. *microRNA*) stanowią krótkie, niekodujące fragmenty RNA o długości 18-22 nt. Dojrzałe miRNA powstają w wyniku enzymatycznej działalności enzymów z grupy RNaz III Drosha i Dicer [46, 57]. W następnym etapie miRNA łączą się z kompleksem RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*) [35], by ostatecznie połączyć się z regionem 3'UTR docelowego genu. Obecnie uważa się, że do regulacji ekspresji określonych genów wystarczy parowanie miRNA-3'UTR na poziomie 7 nukleotydów. Szereg badań wykazał ponadto wpływ niedoskonałego parowania zasad sekwencji miRNA z rejonem docelowym, co może wpływać na stopień efektywności regulacji ekspresji genów [13]. Yamakuchi i wsp. [90] zasugerowali, że miRNA-22 wpływa na ekspresję HIF1 $\alpha$ . W badaniach przeprowadzonych na liniach komórek nowotworowych okrężnicy, wykazali oni nadekspresję czynnika transkrypcyjnego c-Myc, powszechnie występującego także w innych typach komórek nowotworowych. W wyniku nadekspresji c-Myc obniżona zostaje ekspresja wielu miRNA, w tym miRNA-22. W związku z powszechnie przyjętym postulatem mówiącym o kluczowej roli tlenu we wzroście nowotworu, w przypadku hipoksji dochodzi do wzmożonej ekspresji HIF1 $\alpha$ . W regionie 3'UTR tego genu występuje siedmionukleotydomiejsce wiążące miRNA-22. Sekwencja łącząca genu HIF1 $\alpha$  z miRNA zawiera dodatkowo miejsce parowania G-A. miRNA-22 działa jako represor angiogeny poprzez inhibicję aktywności HIF1 $\alpha$ . Hamowanie to wpływa na poziom VEGF – głównej cytokiny proangiogennej, co w znacznym stopniu inaktywuje proces angiogenezy [90].

miRNA-221 oraz 222 również modulują proces angiogenezy. Suarez i wsp. [80] wykazali, że nadekspresja tych cząsteczek prowadzi do pośredniego obniżenia ekspresji eNOS. Ze względu na rolę jaką pełni eNOS w komórkach śródbłonka, upośledzona funkcja tego białka prowadzi do nieprawidłowości w migracji oraz formowaniu rurkowatych zawiązków nowego naczynia. Dodatkowo miRNA-221 i 222 obniżają poziom białka c-kit, będącego stymulatorem angiogenezy poprzez blokadę translacji. Nie wpływają natomiast na poziom transkryptu tego białka [54, 68]. Ze względu na redukcję aktywności dwóch czynników proangiogennych, kombinacja obydwu mikroRNA może stanowić potencjalne narzędzie hamujące proces neowaskularyzacji w nowotworach.

VEGF jako główny czynnik proangiogeny również posiada swoje regulatory aktywności w postaci miRNA. Należą do nich miRNA-15b oraz 16. Wykazano związek między obniżeniem ekspresji tych cząsteczek w wyniku hipoksji z jednoczesnym wzrostem ekspresji VEGF [42]. Potwierdzono ponadto wpływ miRNA-15b i 16 na indukcję apoptozy poprzez oddziaływanie na białko Bcl-2 [19]. Ciekawym faktem dotyczącym cytokiny VEGF jest jej charakter regulatorowy w odniesieniu do kilku miRNA. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy wykazały wpływ VEGF na regulację mikroRNA: 191, 155, 31, 17, 18, 20, z niewielkim wpływem na miRNA-221 i 222 [79]. Niewielki wpływ na ostatnie miRNA można tłumaczyć przez to, że VEGF stymuluje produkcję NO przez śródbłonek. Brak wpływu na poziom aktywności supresorów eNOS może świadczyć o niezależnej stymulacji produkcji NO w śródbłonku, być może bardziej bezpiecznej dla komórki. Wynikać to może z podwójnego działania tych miRNA, których dysfunkcja mogłaby indukować pętle o charakterze dodatniego sprzężenia zwrotnego między stymulacją procesu angiogenezy, a poziomem VEGF. Takie wzmocnienie procesu mogłoby z kolei negatywnie wpłynąć na bilans działania eNOS poprzez niedomiar BH4, co spowodowałoby akumulację ROS.

Zastosowanie podejścia bioinformatycznego w analizie potencjalnych miejsc wiązania miRNA, pozwoliło ustalić jedno takie miejsce w obrębie regionu 3'UTR genu *angiopoetyny 1*. Aktywność *angpt 1* jest regulowana przez miR-211. Nieefektywna regulacja aktywności *angpt1* ze strony miRNA-211 prowadzi do zwiększonego ryzyka występowania zakrzepów [17]. Badania przeprowadzone na populacji chińskiej wykazały dodatkowo, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu A→T genu *angpt 1* zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia skrzepu w porównaniu z grupą kontrolną.

Regulacja ekspresji genów niezależnej od ich aktywności oraz mechanizmów dziedziczenia stanowi złożony zbiór modyfikacji chemicznych chromatyny jądrowej. Acetylacja histonów jest jednym z głównych epigenetycznych mechanizmów regulacji transkrypcji. Zmiany poziomu acetylacji wpływają na stopień upakowania nici DNA oraz na rekrutację czynników transkrypcyjnych. Dutta i wsp. [26] wykazali wpływ acetylacji lizyny w pozycji 56 (K56) histonu H3 wspomaganą

przez białko opiekuńcze HIRA na poziom transkrypcyjnej aktywności genów zaangażowanych w przebieg angiogenezy. Poziom acetylacji chromatyny w pobliżu genu *Vegfr1* wzrastał w odpowiedzi na stymulację linii komórkowych czynnikami angiogennymi [27]. Jednocześnie nie wykryto zmian aktywności genów *Vegfr2*, *Tie2* oraz *Angpt1* – kluczowych genów proangiogennych [26]. Świadczyć to może o innym mechanizmie aktywacji, niezależnym od HIRA, do którego być może zaliczyć można białka DAXX (ang. *death domain-associated protein*) oraz ATRX odpowiedzialne za remodeling chromatyny [32].

HADAC (ang. *Histone Deacetylase*) to grupa związków wpływających na obniżenie aktywności deacetylazy histonów. Wykazano wpływ tych związków na poziom transkrypcyjnej aktywności trzech najważniejszych genów angiogenezy *VEGF-HIF1 $\alpha$ -VHL* [72]. Badania z wykorzystaniem trichostatyny A (ang. *trichostatin A*, TSA), inhibitora HADAC pozwoliły stwierdzić zmniejszoną ekspresję genów *Vegf*, *Hif-1 $\alpha$*  oraz zwiększoną ekspresję *Vhl* w komórkach nowotworowych w warunkach hipoksji. Natomiast Kim i wsp. [53] zasugerowali silnie proangiogenne działanie HADAC. Upośledzenie aktywności inhibitorów deacetylaz prowadzi do braku transdukcji sygnału angiogenezy przez ścieżkę niedotlenienia, inhibicję syntezy DNA oraz migrację komórek śródbłonka. Dodatkowo TSA wpływa na zmniejszenie oddziaływania komórek śródbłonka naczyniowego z macierzą pozakomórkową [53]. Nadekspresja receptorów VEGFR1 i 2 wskutek działania VEGF jest także hamowana przez TSA, co sugeruje udział HADAC w stymulacji ekspresji VEGF [22].

Ekspresja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu także ulega zmniejszeniu wskutek inhibicji aktywności HADAC. Jednakże stwierdzono wpływ TSA na zwiększenie aktywności promotora genu *eNOS*. Świadczy to o wpływie TSA na etapie posttranskrypcyjnej modyfikacji mRNA. Rossig i wsp. [71] potwierdzili udział TSA w destabilizacji mRNA na poziomie modyfikacji posttranskrypcyjnej. Poziom *Angpt2* oraz *Tie2*, zarówno mRNA, jak i białka, ulega obniżeniu na skutek inhibicji HADAC.

Regulacja procesu angiogenezy odbywa się również na poziomie białek. Zidentyfikowano szereg naturalnych inhibitorów angiogenezy w sytuacji gdy wskazane jest ustanie procesów angiogennych. Do tej grupy białek zaliczyć można trombospondynę 1 (ang. *Thrombospondin 1*, TSP1). Białko to jest glikoproteiną połączoną z macierzą pozakomórkową, uczestniczy w komunikacji międzykomórkowej oraz komórka-macierz pozakomórkowa. TSP1 blokuje migrację komórek śródbłonka, wpływa na indukcję apoptozy oraz całkowicie blokuje proliferację komórek śródbłonka indukowaną przez VEGF [1, 72]. Tkankowy inhibitor metaloproteinazy 3 (TIMP3) należy do dużej rodziny białek TIMP ale w przeciwieństwie do innych przedstawicieli tej rodziny pozostaje związany z ECM. TIMP3 hamuje aktywność metaloproteinaz poprzez kowalencyjne wiązanie się z miejscem aktywnym tych enzymów [7]. Kolejną grupą białek wpływających na zatrzymanie procesu neowaskularyzacji są chemokiny. Grupa chemokin CXC,

nazwana tak ze względu na obecność dwóch cystein przedzielonych pojedynczym aminokwasem na końcu N białka, moduluje proces angiogenezy [78, 81]. Jednak o charakterze pro- lub antyangiogennym świadczy obecność dodatkowego łańcucha trójaminokwasowego złożonego z sekwencji glutamina-leucyna-arginina (ELR) [95]. Chemokiny zawierające ten motyw (ELR+) działają proangiogenicznie poprzez stymulację receptora CXCR1 oraz CXCR2, co wpływa na proliferację i migrację EC. Natomiast chemokiny nie zawierające tego motywu są inhibitorami angiogenezy. Do tego rodzaju cząsteczek należą płytkowy czynnik 4, monokina indukowana przez interferon g (MIG) oraz proteina 10 indukowana przez interferon  $\gamma$  (IP-10) [81].

Regulacja aktywności genów wspólnych dla miażdżycy i angiogenezy zachodzi na wiele sposobów. Obecnie pojawia się coraz więcej prac poświęconych mechanizmom regulacji czynników biorących udział w angiogenezie oraz arteriosklerozie. Znajomość dokładniej regulacji obu procesów może pozwolić na opracowanie leków pozwalających je kontrolować, co w znacznym stopniu może wpłynąć na zastosowanie równoczesnych metod leczenia w chorobach układu krążenia, chorobach nowotworowych oraz wielu innych schorzeniach u podłoża których występuje proces miażdżycy oraz angiogenezy.

## PODSUMOWANIE

Postęp jaki dokonuje się w biologii molekularnej oraz efektywnej analizie dużej ilości danych, pozwala na lepsze zrozumienie problemów związanych z patomechanizmami choroby niedokrwiennej serca. Postęp ten pozwala także na znalezienie związków pomiędzy na pozór różnymi procesami, jakimi są angiogeneza i arterioskleroza. Dalsze badania oparte o wykorzystanie mikromacierzy oraz najnowszych metod sekwencjonowania, mogą pozwolić na bardziej szczegółową analizę aktywności genów wspólnych dla obu tych procesów oraz identyfikację mutacji wpływających na ich aktywność, a co za tym idzie być może pozwolą na opracowanie nowych metod leczenia arteriosklerozy w oparciu o możliwości terapeutyczne, jakie wiążą się z procesem angiogenezy. Byłoby to podejście nowatorskie dające lekarzom oraz klinicyście nowe narzędzie w walce z stale narastającym problemem arteriosklerozy.

## PODZIĘKOWANIA

Publikacja jest częścią projektu „Wrovasc – Zintegrowane Centrum Sercowo-Naczyniowe”, współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, w ramach projektu Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013. „Inwestujemy w twoją przyszłość.”

## LITERATURA

- [1] ADAMS JC. Thrombospondins: Multifunctional regulators of cell interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; **17**: 25-51.
- [2] AHMED A, FUJISAWA T, NIU XL, AHMAD S, AL-ANI B, CHUDASAMA K, ABBAS A, POTLURI R, BHANDARI V, FINDLEY CM, LAM GK, HUANG J, HEWETT PW, CUDMORE M, KONTOS CD. Angiopoietin-2 confers Athero-protection in apoE<sup>-/-</sup> mice by inhibiting LDL oxidation via nitric oxide. *Circ Res.* 2009; **104**: 1333-1336.
- [3] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; **124**: 783-801.
- [4] ANAND-APTE B, BAO L, SMITH R, IWATA K, OLSEN BR, ZETTER B, APTE SS. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochemistry and Cell Biology* 1996; **74**: 859-862.
- [5] ANTONIADES C, SHIRODARIA C, CRABTREE M, RINZE R, ALP N, CUNNINGTON C, DIESCH J, TOUSOULIS D, STEFANADIS C, LEESON P, RATNATUNGA C, PILLAI R, CHANNON KM. Circulation. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation. 2007; **116**: 2851-2859.
- [6] ARJONEN A, KAUKONEN R, IVASKA J. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh Migr* 2011; **5**: 421-430.
- [7] ARMSTRONG AW, VOYLES SV, ARMSTRONG EJ, FULLER EN, RUTLEDGE JC. Angiogenesis and oxidat ive stress: common mechanisms linking psoriasis with atherosclerosis. *J Dermatol Sci* 2011; **63**: 1-9.
- [8] BARBUSIŃSKI K. Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem Eng S* 2009; **16**: 347-358.
- [9] BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxidate, superoxidate, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; **271**: 1424-1437.
- [10] BELPERIO JA, KEANE MP, ARENBERG DA, ADDISON CL, EHLERT JE, BURDICK MD, STRIETER RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2000; **68**: 1-8.
- [11] BLUM Y, BELTING HG, ELLERTSDOTTIR E, HERWIG L, LÜDERS F, AFFOLTER M. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 2008; **316**: 312-322.
- [12] BOGACZEWICZ J., CHODOROWSKA G., KRASOWSKA D. Rola metaloproteaz macierzy i tkankowych inhibitorów w układzie odpornościowym skóry. *Przegl. Dermatol.* 2005; **92**: 139-142.
- [13] BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL RB, COHEN SM. Principles of microRNA- target recognition. *PLoS Biol* **3**: e85.
- [14] CAI W, SCHAPER W. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; **8**: 681-692.
- [15] CALLETTI FL, WAUGH JM, AMABILE PG, BRENDOLAN A, HILFIKER PR, DAKE MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001; **7**: 425-429.
- [16] CHASE AJ, NEWBY AC. Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 2003; **40**: 329-343.
- [17] CHEN J, YANG T, YU H, SUN K, SHI K, SONG W, BAI Y, WANG X, LOU K, ZHANG Y, HUI R. A functional variant in the 3'-UTR of angiopoietin-1 might reduce stroke risk by interfering with the binding efficiency of microRNA 211. *Hum Mol Gene* 2010; **19**: 2525-2533.
- [18] CHUN HJ, ALI ZA, KOJIMA Y, KUNDU RK, SHEIKH AY, AGRAWAL R, ZHENG L, LEEPER NJ, PEARL NE, PATTERSON AJ, ANDERSON JP, TSAO PS, LENARDO MJ, ASHLEY EA, QUERTERMUS T. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3343-3354.
- [19] CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, IORIO MV, FERRACIN M, SHIMIZU M, WOJCIK SE, AQEILAN RI, ZUPO S, DONO M, RASSENTI L, ALDER H, VOLINIA S, LIU CG, KIPPS TJ, NEGRINI M, CROCE CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natal Acad Sci USA* 2005; **102**: 13944-13949.
- [20] COLE CL, HANSEN SU, BARÁTH M, RUSHTON G, GARDINER JM, AVIZIENYTE E, JAYSON GC. Synthetic heparan sulfate oligosaccharides inhibit endothelial cell functions essential for angiogenesis. *PLoS One.* 2010 **21**; **5**: e11644.

- [21] D'ELIA R, DESCHOOLMEESTER ML, ZEEF LA, WRIGHT SH, PEMBERTON AD, ELSE KJ. Expulsion of *Trichuris muris* is associated with increased expression of angiogenin 4 in the gut and increased acidity of mucins within the goblet cell. *BMC Genomics* 2009; **10**: 492.
- [22] DEROANNE CF, BONJEAN K, SERVOTTE S, DEVEY L, COLIGE A, CLAUSSE N, BLACHER S, VERDIN E, FOIDART JM, NUSGENS BV, CASTRONOVO V. Histone deacetylases inhibitors as antiangiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 2002; **21**: 427-436.
- [23] DJURIĆ T, STANKOVIĆ A, KONČAR I, RADAK D, DAVIDOVIĆ L, ALAVANTIĆ D, ZIVKOVIĆ M. Association of MMP-8 promoter gene polymorphisms with carotid atherosclerosis: Preliminary study. *Atherosclerosis* 2011; **219**: 673-678.
- [24] DONEKAMP J. Vascularendothelium as the vulnerable element in tumors. *Acta Radiol Oncol* 1984; **23**: 31-67.
- [25] DOUGET F, TAMION F, GUILLOU V, BUBENHEIM M, THUILLEZ CH, RICHARD V, BESSOU JP. Albumin Limits Mesenteric Endothelial Dysfunction and Inflammatory Response in Caediopulmonary Bypass. *Artificial Organs* 2012 – w druku.
- [26] DUTTA D, RAY S, HOME P, SAHA B, WANG S, SHEIBANI N, TAWFIK O, CHENG N, PAUL S. Regulation of angiogenesis by histone chaperone HIRA-mediated incorporation of lysine 56-acetylated histone H3.3 at chromatin domains of endothelial genes. *J Biol Chem*. 2010 31; **285**: 41567-41577.
- [27] DUTTA D, RAY S, VIVIAN J, PAUL S. Activation of the VEGFR1 chromatin domain: an angiogenic signal-ETS1/HIF-2 $\alpha$  regulatory axis. *J Biol Chem* 2008; **283**: 25404-25413.
- [28] FENG W, YE F, XUE W, ZHOU Z, KANG YJ. Copper Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 Activity. *Mol Pharmacol* 2009; **75**: 174-182.
- [29] FIEDLER U, REISS Y, SCHARPFENECHER M, GRUNOW V, KOIDL S, THURSTON G, GALE NW, WITZENRATH M, ROSSEAU S, SUTTORP N, SOBKE A, HERRMANN M, PREISSNER KT, VAJKOCZY P, AUGUSTIN HG. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- $\alpha$  and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006; **12**: 235-239.
- [30] FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: role in regulation of tumor growth. *Symp Soc Dev Biol* 1974; **30**: 43-52.
- [31] FOLKMAN J, D'AMORE PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996 27; **87**: 1153-1155.
- [32] GOLDBERG AD, BANASZYŃSKI LA, NOH KM, LEWIS PW, ELSAESSER SJ, STADLER S, DEWELL S, LAW M, GUO X, LI X, WEN D, CHAPGIER A, DEKELVER RC, MILLER JC, LEE YL, BOYDSTON EA, HOLMES MC, GREGORY PD, GREALLY JM, RAFII S, YANG C, SCAMBLER PJ, GARRICK D, GIBBONS RJ, HIGGS DR, CRISTEA IM, URNOV FD, ZHENG D, ALLIS CD. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* 2010; **140**: 678-691.
- [33] GRAMMAS P, TRIPATHY D, SANCHEZ A, YIN X, LOU J. Brain microvasculature and hypoxia-related proteins in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; **4**: 616-627.
- [34] GRAY K, BENNETT M. Role of DNA damage in atherosclerosis-bystander or participant? *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 693-700.
- [35] GREGORY RI, CHENDRIMADA TP, COOCH N, SHIEKHATTAR R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; **123**: 631-640.
- [36] GUTTE H, MORTENSEN J, HAG AM, JENSEN CV, KRISTOFFERSEN US, BRINTH L, KJAER A. Limited value of novel pulmonary embolism biomarkers in patients with coronary atherosclerosis. *Clin Physiol Funct Imaging* 2011; **31**: 452-457.
- [37] HELLSTORM M, PHNG LK, HOFMANN JJ, WALLGARD E, COULTAS L, ALVA J, NILSSON AK, KARLSSON L, GAIANO N, YOON K, IRUELA-ARISPE ML, KALEN M, GERHARDT H, BETSHOLTZ CH. DII4 signaling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007; **455**: 776-780.
- [38] HEO SH, CHO CH, KIM HO, JO YH, YOON KS, LEE JH, PARK JC, PARK KC, AHN TB, CHUNG KC, YOON SS, CHANG DI. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol*. 2011; **7**: 69-76.
- [39] HERRMANN J, LERMAN LO, MUKHOPADHYAY D, NAPOLI C, LERMAN A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; **26**: 1948-1957.

- [40] HIYAMA T, TANAKA T, ENDO S, KOMINE K, KUDO T, KOBAYASHI H, SHIOKAWA Y. Angiogenesis in atherosclerotic plaque obtained from carotid endarterectomy: association between symptomatology and plaque morphology. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2010; **50**: 1056-1061.
- [41] HOEBEN A, LANDUYT B, HIGHLEY MS, WILDERS H, OOSTEROM AT, BRUIJN DE. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; **56**: 549-580.
- [42] HUA Z, LV Q, YE W., WONG CHA, CAI G, GU D, JI Y, ZHAO CH, WANG J, YANG BB, ZHANG Y. miRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLOS ONE* 2006; **1**: e116.
- [43] HUANG B, ZHAO J, LI H, HE KL, CHEN Y, CHEN SH, MAYER L, UNKELESS JC, XIONG H. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005 **15**; **65**: 5009-5014.
- [44] HUANG H, BHAT A, WOODNUTT G, LAPPE R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 575-585.
- [45] HUANG H, LAI JY, DO J, LIU D, LI L, DEL ROSARIO J, DOPPALAPUDI VR, PIRIE-SHEPHERD S, LEVIN N, BRADSHAW C, WOODNUTT G, LAPPE R, BHAT A. Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2011; **17**: 1001-1011.
- [46] HUTVAGNER G, McLACHLAN J, PASQUINELLI AE, BALINT E, TUSCHL T, ZAMORE PD. A cellular function the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; **293**: 834-838.
- [47] IBSEN KH. The Crabtree Effect: A Review. *Cancer Res* 1961; **21**: 829-841.
- [48] JAKOBSSON L, FRANCO CA, BENTLEY K, COLLINS RT, PONSIOEN B, ASPALTER IM, ROSEWELL I, BUSSE M, THURSTON G, MEDVINSKY A, SCHULTE-MERKER S, GERHARDT H. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature Cell Biology* 2010; **12**: 943-953.
- [49] KAEHLIN WG JR, RATCLIFFE PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008 **23**; **30**: 393-402.
- [50] KAMEI M, SAUNDERS WB, BAYLESS KJ, DYE L, DAVIS GE, WEINSTEIN BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 2006; **442**: 453-456.
- [51] KELLY MG, ALVERO AB, CHEN R, SILASI DA, ABRAHAMS VM, CHAN S, VISINTIN I, RUTHERFORD T, MOR G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2006; **66**: 3859-3868.
- [52] KIM SK, JEON JW, PARK JJ, CHA JM, JOO KR, LEE JI, CHUNG JH, SHIN DH, SHIN HP. Associations of EPHB1 polymorphisms with hepatocellular carcinoma in the Korean population. *Hum Immunol.* 2011; **72**: 916-920.
- [53] KIM MS, KWON HJ, LEE YM, BAEK JH, JANG JE, LEE SW, MOON EJ, KIM HS, LEE SK, CHUNG YCH, KIM CW, KIM KW. Histone deacetylase induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine* 2001; **7**: 437-443.
- [54] KUEHBACHER A, URBICH C, DIMMELER S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2008; **29**: 12-15.
- [55] LASCHKE MW, ELITZSCH A, VOLLMER B, VAJKOCZY P, MENGER MD. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppress angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum. Reprod.* 2006; **21**: 262-268.
- [56] LEE J, MAJUMDER S, CHATTERJEE S, MURALIDHAR K. Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* 2011; **36**: 341-354.
- [57] LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RADMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; **425**: 415-419.
- [58] LEPPER NJ, TEDESCO MM, KOJIMA Y, SCHULTZ GM, KUNDU RK, ASHLEY EA, TSAO PS, DALMAN RL, QUERTERMOUS T. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; **296**: 1329-1335.
- [59] LOTSCH J, BELFER I, KIRCHHOFF A, MISHRA BK, MAX MB, DOEHRING A, COSTIGAN M, WOOLF CJ, GEISSLINGER G, TEGEDER I. Reliable screening for pain-protective haplotype in the GTP cyclohydrolase 1 gene (CGH1) through the use of 3 or fewer single nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 2007; **53**: 1010-1015.

- [60] NÄSLUND I, NORRBY K. NO and de novo mammalian angiogenesis: further evidence that NO inhibits bFGF-induced angiogenesis while not influencing VEGF165-induced angiogenesis. *APMIS* 2000; **108**: 29-37.
- [61] NISATO RE, HOSSEINI G, SIRRENBORG, BUTLER GS, CRABBE T, DOCHERTY AJ, WIESNER M, MURPHY G, OVERALL CM, GOODMAN SL, PEPPER MS. Dissecting the Role of Matrix Metalloproteinases (MMP) and Integrin  $\alpha_3\beta_3$  in Angiogenesis In vitro: Absence of Hemopexin C Domain Bioactivity, but Membrane-Type 1- MMP and  $\alpha_3\beta_3$  Are Critical. *Cancer Res* 2005; **65**: 9377-9387.
- [62] OLSSON AK, DIMBERG A, KREUGER J, CLAESSON-WELSH L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 359-371.
- [63] PAONE A, GALLI R, GABELLINI C, LUKASHEV D, STARACE D, GORLACH A, DE CESARIS P, ZIPARO E, DEL BUFALO D, SITKOVSKY MV, FILIPPINI A, RICCIOLI A. Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Neoplasia*. 2010; **12**: 539-549.
- [64] PAONE A, STARACE D, GALLI R, PADULA F, DE CESARIS P, FILIPPINI A, ZIPARO E, RICCIOLI A. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis*. 2008; **29**: 1334-1342.
- [65] PARK JG, OH GT. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *BMB Rep* 2011; **44**: 497-505.
- [66] PAULUS P, JENNEWAIN C, ZACHAROWSKI K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 2011; doi:10.3109/1354750X.2011.587893.
- [67] PERIN EC, SILVA GV, VELA DC, ZHENG Y, BAIMBRIDGE F, GAHREMANPOUR A, QUAN X, HAHN W, KIM J, WOOD K, KITAMURA M. Human hepatocyte growth factor (VM202) gene therapy via transendocardial injection in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Card Fail*. 2011; **17**: 601-611.
- [68] POLISENO L, TUCCOLI A, MARIANI L, EVANGELISTA M, CITTI L, WOODS K, MERCATANTI A, HAMMOND S, RAINALDI G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 2006; **108**: 3068-3071.
- [69] QIULING X, SHENG Y, XIAOJIA CH, LIHUI X, WENDAN P, LING Z, QIHAO Z, XU-FANG L, AN H. A polypeptide from shark troponin I can inhibit angiogenesis and tumor growth. *Mol Biol Rep* doi: 10.1007/s11033-011-0887-y.
- [70] QUINTERO M, COLOMBO SL, GODFREY A. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Moncada S.Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**: 5379-5384.
- [71] RÖSSIG L, LI H, FISSLTHALER B, URBICH C, FLEMING I, FÖRSTERMANN U, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. *Circ Res*. 2002; **91**: 837-844.
- [72] SAHIN M, SAHIN E, GUMUSULU S, ERDOĞAN A, GÜLTEKIN M. DNA methylation or histone modification status in metastasis and angiogenesis-related genes: a new hypothesis on usage of DNMT inhibitors and S-adenosylmethionine for gene stability. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 655-676.
- [73] SCHMIDT HH, NAU H, WITTFOHT W, PRESCHER KE, KLEIN MM. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1988; **154**: 213-216.
- [74] SHEN X, FANG J, LV X, PEI Z, WANG Y, JIANG S, DING K. Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b. *J Biol Chem*. 2011; **286**: 26616-26627.
- [75] SLUIMER JC, DAEMEN MJ. Novel concepts in arteriogenesis: angiogenesis and hypoxia in arteriosclerosis. *J Pathol* 2009; **218**: 7-29.
- [76] SMALL JV, STRADAL T, VIGNAL E, ROTTNER K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology* 2002; **3**: 112-120.
- [77] STANNARD AK, KHURANA R, EVANS IM, SOFRA V, HOLMES DI, ZACHARY I. Vascular endothelial growth factor synergistically, enhances induction of E-selectin by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 494-502.
- [78] STRIETER RM, BURDICK MD, GOMPERS BN, BELPERIO JA, KEANE MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**: 593-609.

- [79] SUÁREZ Y, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, YU J, GERBER SA, HARRISON KD, POBER JS, IRUELA-ARISPE ML, MERKENSCHLAGER M, SESSA WC. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 14082-14087.
- [80] SUÁREZ Y, FERNÁNDEZ-HERNANDO C, POBER JS, SESSA WC. Dicer dependent microRNA regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007; **100**: 1164-1173.
- [81] TAKAKURA N. Role of intimate interactions between endothelial cells and the surrounding accessory cells in the maturation of blood vessels. *J Thromb Haemost* 2011; **9**: 144-150.
- [82] TROLLOPE AF, GOLLEDGE J. Angiopoietins, abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011; **214**: 237-243.
- [83] VANHOUTTE PM. How we Learned to say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1156-1160.
- [84] VASQUEZ-VIVAR J, KALYANARAMAN B, MARTASEK P. The role of Tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic. Res.* 2003; **37**: 121-127.
- [85] VEIKKOLA T, KARKKAINEN M, CLAESSEON-WELSH L, ALITALO K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000 **15**; **60**: 203-212.
- [86] VERRIER ED, MORGAN EN. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery. *Ann Thorac Surg* 1998; **66**: 17-19.
- [87] WARBURG O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956 **10**; **124**: 269-270.
- [88] WIENS KM, LEE HL, SHIMADA H, METCALF AE, CHAO MY, LIEN CL. Platelet-derived growth factor receptor beta is critical for zebrafish intersegmental vessel formation. *PLoS One* 2010; **5**: e11324.
- [89] WOAD KJ, HUNTER MG, MANN GE, LAIRD M, HAMMOND AJ, ROBINSON RS. Iroblast growth factor (FGF) 2 is a key determinant of vascular sprouting during bovine luteal angiogenesis. *Reproduction* 2011; DOI:10.1530/REP-11-0277.
- [90] YAMAKUCHI M, YAGI S, ITO T, LOWENSTEIN CJ. MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. *PLoS One* 2011; **6**: e20291.
- [91] YANG H, WANG Y, QIAN H, ZHANG P, HUANG C. Pim protein kinase-3 is regulated by TNF- $\alpha$  and promotes endothelial cell sprouting. *Mol Cells* 2011; **32**: 235-241.
- [92] ZHENG H, QIAN J, CARBONE CJ, LEU NA, BAKER DP, FUCHS SY. Vascular endothelial growth factor-induced elimination of the type 1 interferon receptor is required for efficient angiogenesis. *Blood.* 2011; **118**: 4003-4006.
- [93] ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, LIM M, HILTON DA, ZAGZAG D, BUECHLER P, ISAACS WB, SEMENZA GL, SIMONS JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 **15**; **59**: 5830-5835.
- [94] ZIELONKA TM. Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2003; **8**: 169-174.
- [95] ZIELONKA TM. Angiogeneza – Część II. Czynniki modulujące proces powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia* 2004; **9**: 25-31.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 29.08.2012*

*Przyjęto: 31.10.2012*

*Piotr Zawierucha*

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii*

*Uniwersytet Medyczny w Poznaniu*

*ul. Świącickiego, 60-781 Poznań*

*tel.: 61 854-64-55*

*e-mail: Piotr\_Zawierucha@wp.pl softabiol@poczta.onet.pl*