

Wpływ wieku biologicznego na czynność komórek progenitorowych śródbłónka

The influence of the biological age on function of endothelial progenitor cells

Eugeniusz Hrycek, Wojciech Wojakowski

III Katedra Kardiologii, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Starzenie według biologii organizmu polega na stopniowej utracie jego potencjału regeneracyjnego. Wiek biologiczny stanowi przedmiot zainteresowania wielu nauk, takich jak genetyka, nefrologia czy onkologia. Komórki progenitorowe śródbłónka (EPCs) odpowiadają za regenerację endotelium. Istotnym ogniwem rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego jest dysfunkcja EPCs, która wydaje się konsekwencją starzenia biologicznego. Polega ona na zmniejszeniu liczby, zdolności do migracji oraz osłabieniu potencjału różnicowania EPCs. Celem artykułu jest scharakteryzowanie niektórych istotnych aspektów starzenia komórek progenitorowych śródbłónka na podstawie doniesień na temat wieku biologicznego. Artykuł definiuje założenia wieku biologicznego. Ponadto przedstawia charakterystykę wybranych markerów wieku biologicznego (telomerów, białek regulujących cykl komórkowy, proteaz) oraz czynników go modulujących, takich jak stosowane leki czy spożywane związki chemiczne. Szczególny nacisk położono na przedstawienie tych działań lekarskich, które powodują ingerencję w wiek biologiczny EPCs.

Słowa kluczowe: wiek biologiczny, starzenie biologiczne, komórki progenitorowe śródbłónka, telomery

Abstract

Aging in relation to organism biology is a gradual loss of restoration potential. Biological age is a subject of interest in many fields as genetics, nephrology and oncology. Endothelial progenitor cells (EPCs) are responsible for regeneration of endothelium. The dysfunction of EPCs, which seems to be the consequence of the aging process, may lead to the development of cardiovascular disorders. EPCs disturbances may reduce EPCs number, impair the migration ability and clonogenic potential of EPCs. This paper presents some aspects of aging process of EPCs according to the latest reports concerning the biological age. It contains the description of biological age conception. Moreover it shows the chosen markers of biological age (telomeres, proteins regulating cell cycle, proteases) and modulating factors like administered medications and ingested chemical compounds. Some therapeutic actions which may interfere in biological age are also presented.

Key words: biological age, senescence, endothelial progenitor cells, telomeres

Kardiol Pol 2010; 68, supl. V: 405–411

WSTĘP

Postęp w dziedzinie genetyki oraz biologii molekularnej umożliwił zdefiniowanie pojęcia procesu starzenia komórek i tkanek. Obecnie uważa się, że starzenie jest m.in. konsekwencją stopniowego wyczerpania się potencjału regeneracyjnego organizmu. W układzie sercowo-naczyniowym procesy re-

generacji zachodzą przez całe życie człowieka, a dzięki badaniom prowadzonym w ostatnich latach można identyfikować komórkowe markery procesu starzenia. Tematem niniejszego artykułu jest charakterystyka i znaczenie procesów starzenia dla czynności komórek progenitorowych śródbłónka naczyniowego.

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Wojciech Wojakowski, III Katedra Kardiologii, SUM, ul. Ziołowa 45–47, 40–635 Katowice, e-mail: wojtek.wojakowski@gmail.com

POWIĄZANIA SZLAKÓW PRO- I ANTYAPOPTYCZNYCH

Apoptoza jest programową śmiercią komórki. Apoptozę rozpoczynają zarówno komórki o wyczerpanym potencjale regeneracyjnym, jak i komórki nowotworowe. Apoptoza może przebiegać w wielu mechanizmach:

- zewnątrzkomórkowym;
- wewnątrzkomórkowym;
- związanym z retikulum endoplazmatycznym.

Wybrane szlaki pro- i antyapoptyczne przedstawiono na rycinie 1. Niezależnie od mechanizmu apoptoza przebiega w 3 etapach: 1. faza inicjacji, 2. faza wykonawcza, 3. faza zniszczenia.

Autofagia natomiast jest mechanizmem polegającym na trawieniu wybranych fragmentów komórki w lizosomach. Autofagię można podzielić na:

- makroautofagię — trawione są organella lub ich fragment;
- mikroautofagię — trawione są fragmenty błony komórkowej;
- autofagię przebiegającą z udziałem białek opiekuńczych — chaperonów.

Do induktorów aktywności szlaków proapoptycznych należą między innymi: TNF-alfa, czynnik Fas, uszkodzenie DNA oraz deficyt związków odżywczych. Istotną rolę w indukcji proapoptycznych szlaków odgrywa białko p53. Nasila ono między innymi ekspresję białek hamujących cykl komórkowy (p21), białek naprawczych DNA (GADD45) oraz wielu białek proapoptycznych: BAX, NOXA, kompleks PUMA. Białko p53 wykazuje zdolność hamowania kinazy PI3K/AKT w wyniku indukcji ekspresji fosfatazy PTEN. Ponadto białko to należy do induktorów aktywacji kinazy AMPK. Jest to kinaza serynowo-treoninowa, której aktywność zależy od dostępności składników energetycznych. Jest ona aktywowana przez wzrost stężenia AMP, co jest równoznaczne dla komórki ze stanem niedoboru składników odżywczych. Kompleks AMPK wykazuje działania w zakresie regulacji metabolizmu, aktywuje również kompleks hamartyna/tuberyna (TSC1, 2), który w konsekwencji zyskuje aktywność białka aktywującego GTP-azy. Z kolei GTP-aza, w wyniku przekształcenia GTP-zależnego białka GTP-RHEB w białko GDP-RHEB, inaktywuje antyapoptyczną kinazę mTOR.

Za aktywację szlaków antyapoptycznych odpowiadają kinazy AKT i mTOR. Szlak PI3k/AKT, którego składowymi są wymienione kinazy, jest aktywowany przez różne czynniki wzrostu, insulinę oraz macierz pozakomórkową (w wyniku interakcji z integrynymi oraz indukcji szlaku aktywności kinazy FAK1). Kinazy AKT oraz mTOR w wyniku fosforylacji inaktywują wiele proapoptycznych czynników, takich jak AMPK, kompleks TSC1, 2, białka p27 i p21. Ponadto fosforylacja białka MDM powoduje rozkład białka p53 poprzez ubiquitytację. Szlak PI3k/AKT wpływa również na białka rodziny Bcl-2 oraz na kaspazy — w wyniku fosforylacji blokuje bezpośrednio, a także pośrednio, poprzez stymulację kinazy mTOR, proapoptyczne czynniki BIM, BAD oraz kaspazę 9. Kinaza Akt blokuje także syntezę proapoptycznych białek

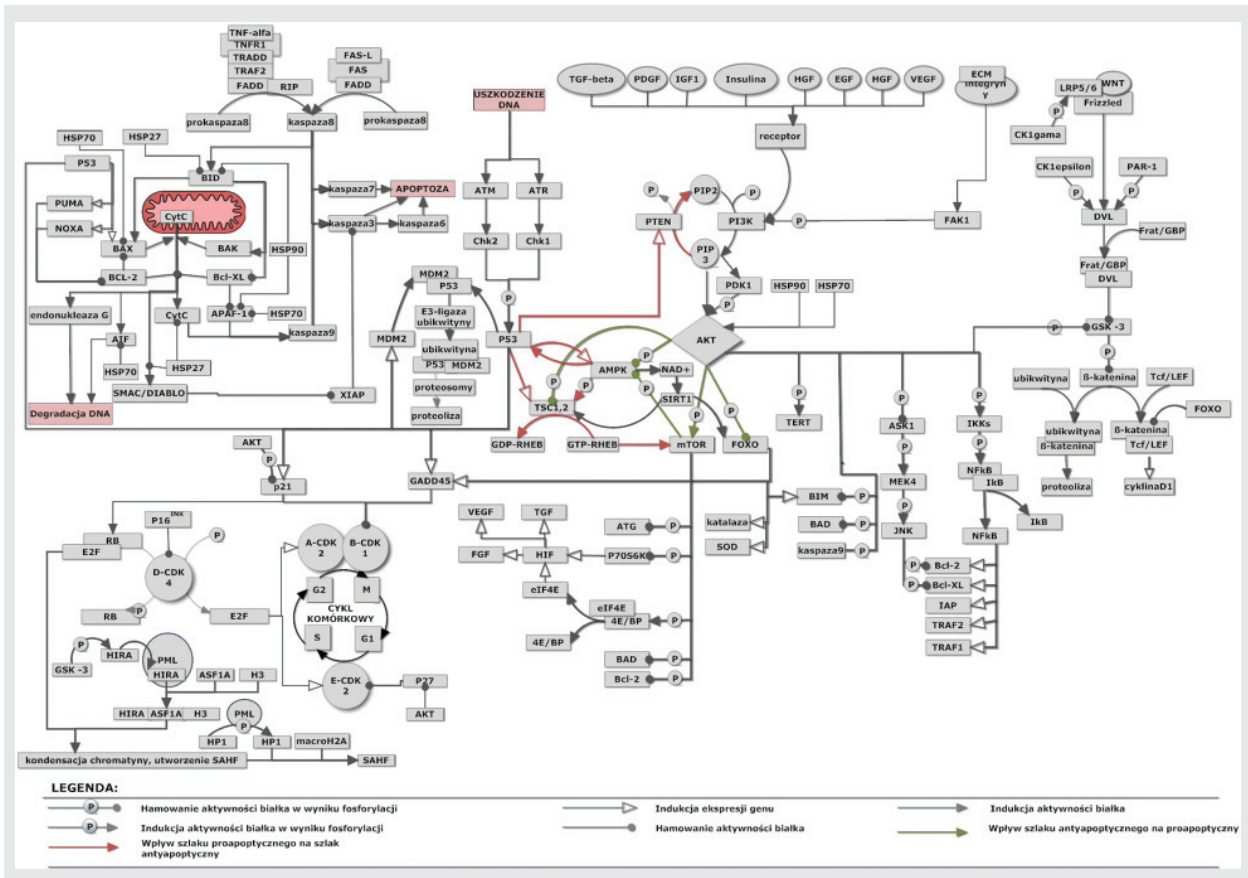
rodziny BCL-2 w wyniku supresji czynników rodziny FOXO. Fosforylacja indukuje utrzymanie białek FOXO w cytoplazmie, hamując tym samym transkrypcję. Szlak PI3K/Akt indukuje również syntezę oraz wzrost aktywności antyapoptycznych białek rodziny Bcl-2 w wyniku stymulacji czynnika NFkappa-B oraz hamowania kinazy JNK. Do innych mechanizmów protekcyjnego wpływu na wiek biologiczny kinazy AKT należy stymulacja: kompleksu TERT, czynnika NFkappa-B oraz syntezy cykliny D1 (w efekcie pobudzenia szlaku WNT).

Mechanizmy antyapoptyczne są mediowane przez kinazę serynowo-treoninową mTOR, która jest aktywowana przez kinazę AKT. Do wspomnianych mechanizmów należą: hamowanie autofagii w wyniku fosforylacji białek ATG, aktywacja białek indukujących translację (eIF4E, P70S6K), indukcja angiogenezy oraz inaktywacja białek proapoptycznych (BAD). U ssaków kinaza mTOR jest blokowana pośrednio przez rapamycynę i dlatego jest nazywana także ssaczym celem rapamycyny. Wynika to z tego, że rapamycyna (sirolimus) w wyniku interakcji z białkiem FKBP12 blokuje mTOR.

Do grupy antyapoptycznych czynników zalicza się także sirtuiny, które są białkami należącymi do grupy NAD⁺ zależnych deacetylaz histonów. Indukują one zmiany strukturalne w obrębie histonów, regulując w ten sposób ekspresję genów. Wydaje się to częściowo wyjaśniać mechanizmy ochronnego wpływu na wiek biologiczny między innymi diety ubogokalorycznej, która powoduje zwiększenie ilości NAD⁺ kosztem NADH. Sirtuina 1 jest przedstawicielem omawianych enzymów występującym w jądrze komórkowym. Stymuluje ona między innymi czynnik FOXO, indukując syntezę białek naprawczych (GADD45), dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Ponadto w wyniku deacetylacji powoduje inaktywację białka p53 oraz spadek aktywności czynnika NFkappa-B. W najnowszych pracach sugeruje się także, że sirtuina 1 może być zaangażowana w hamowanie całego szlaku mTOR poprzez stymulację kompleksu TSC1/2.

DŁUGOŚĆ TELOMERÓW I INNE MARKERY WIEKU BIOLOGICZNEGO

Telomery są kompleksami białek oraz kwasów dezoksyrybonukleinowych, które odpowiadają za stabilizację chromosomów komórek eukariotycznych. Pozwalają one również w pełni odtworzyć strukturę DNA podczas replikacji. Każdy gatunek charakteryzuje niepowtarzalna sekwencja nukleotydów w obrębie telomeru. W przypadku ludzi jest to sekwencja TTAGGG. Wiek biologiczny organizmu można określić na podstawie długości telomerów w leukocytach krwi obwodowej (LTL, *leucocyte telomere length*). Istnieje między nimi odwrotna zależność. Należy podkreślić, że telomery chronią DNA komórek zarówno dzielących się intensywnie, jak i pozostałych. Znajdują się one na obu końcach chromosomów, gdzie tworzą przestrzenne struktury, w których skład wchodzi pętla D oraz T. Istnieje wiele białek oddziałujących z telomerami. Intensywnie badany jest TRF-2 (*telomeric repeat binding factors 2*). Białko to łączy się z telomerami oraz reguluje ich długość [1].



Rycina 1. Wybrane szlaki zaangażowane w starzenie komórek

4E/BP — białko wiążące czynnik eIF4E; A-CDK2 — kompleks cykliny A oraz kinazy zależnej od cyklin 2; AIF — białko AIF; AKT — kinaza AKT; AMPK — kinaza AMPK; APAF-1 — białko APAF-1; ASF1A — białko ASF1A; ASK1 — kinaza ASK-1; ATF — czynnik indukujący apoptozę; ATG — białko ATG; ATM — białko ATM; ATR — białko ATR; BAD — białko BAD; BAK — białko BAK; BAX — białko BAX; B-CDK1 — kompleks cykliny B oraz kinazy zależnej od cyklin 1; Bcl-2 — białko Bcl-2; Bcl-XL — białko Bcl-XL; BIM — białko BIM; Chk1 — kinaza CHK1; Chk2 — kinaza CHK2; CK1epsilon 1 — kinaza CK1epsilon; CK1gamma — kinaza CK1gamma; CytC — cytochrom C; D-CDK4 — kompleks cykliny D oraz kinazy zależnej od cyklin 4; DVL — białko DVL; E2F — czynnik E2F; E3 — ligaza ubikwityny; E-CDK2 — kompleks cykliny E oraz kinazy zależnej od cyklin 2; ECM — macierz pozakomórkowa; EGF — czynnik wzrostu naskórka; eIF4E — eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E; FADD — białko FADD; FAK1 — kinaza FAK1; FAS — białko FAS; FAS-L — ligand FAS; FGF — czynnik wzrostu fibroblastów; FOXO — czynnik FOXO; FRAT1 — białko FRAT1; Frizzled — receptor Frizzled; GADD45 — białko GADD45; GBP — białko GBP; GDP-RHEB — kompleks guanozynodiforanu i białka RHEB; GSK-3 — kinaza syntezy glikogenu 3; GTP-RHEB — kompleks guanozynotrifosforanu i białka RHEB; G1 — faza G1 cyklu komórkowego; G2 — faza G2 cyklu komórkowego; H3 — histon H3; HGF — czynnik wzrostu hepatocytów; HIRA — białko HIRA; HP1 — białko HP1; HSP70, HSP90, HSP27 — białka szoku cieplnego; IAP — białko inhibitorowe kappa B; NOXA — białko NOXA; P16INK — białko P16INK; p21 — białko p21; P27 — białko P27; p53 — białko p53; P70S6K — kinaza p70S6; PAR-1 — kinaza PAR-1; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostu; PDK1 — kinaza PDK1; PI3K — kinaza fosfatydylo-3-inozytolu; PIP2 — 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu; PIP3 — fosfatydyloinozytolu-3,4,5-trifosforan; PML — białko jądrowe PML; PTEN — fosfataza PTEN; PUMA — białko PUMA; RB — białko retinoblastoma; RHEB — białko RHEB; RIP — białko RIP; S — faza S cyklu komórkowego; SAHF — kompleks SAHF; SIRT1 — sirtuina 1; SMAC/DIABLO — kompleks SMAC/DIABLO; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; TCF — czynnik TCF; TERT — podjednostka katalityczna telomerazy; TGF — transformujący czynnik wzrostu; TGF-beta — transformujący czynnik wzrostu beta; TNF-alfa — czynnik martwicy nowotworów typu alfa; TNFR1 — receptor dla TNF-alfa; TRADD — białko TRADD; TRAF — czynnik TRAF; TRAF2 — białko TRAF2; TSC1 — hamartyna; TSC2 — tuberyna; VEGF — czynnik wzrostu śródblonka naczyń; WNT — białko WNT; XIAP — białko XIAP

Telomeraza jest enzymem odpowiedzialnym za wydłużanie telomerów. Należy ona do grupy odwrotnych transkryptaz oraz charakteryzuje się złożoną budową. W jej skład wchodzi między innymi podjednostka o aktywności katalitycznej (TERT, *telomerase reverse transcriptase*) oraz RNA (TERC, *telomerase RNA component*) pełniący rolę matrycy dla wspomnianej jednostki [2]. Telomeraza występuje jedynie w komórkach wykazujących intensywną aktywność mitotyczną: w komórkach macierzystych oraz nowotworowych.

W dojrzałych komórkach nie dochodzi do ekspresji telomerazy bądź jej aktywność jest znikoma.

Drugą grupę markerów procesu starzenia stanowią niektóre białka regulatorowe cyklu komórkowego, których funkcja polega na hamowaniu podziałów potencjalnie dysfunkcyjnej komórki. Hamują one działanie białek katalizujących przejścia między kolejnymi fazami cyklu — tzw. kinaz zależnych od cyklin (CDK, *cyclin-dependent kinases*), do których należą białka p16, p53 oraz p27 [3–5]. Kolejnym markerem

jest tak zwana SA-beta-galaktozydaza (*senescence-associated beta-galactosidase*), która jest enzymem pochodzenia lizosomalnego [6]. Jej obecność świadczy o tym, że dysfunkcyjna komórka weszła na szlak apoptozy.

Podsumowując, stare komórki charakteryzują się zmniejszoną zdolnością do migracji i różnicowania. Cechują je krótkie telomery, zmniejszona aktywność telomerazy oraz nasilenie ekspresji regulatorów cyklu komórkowego (p27, p16, p53), której zadaniem jest uniemożliwienie podziałów potencjalnie niewydolnej komórki.

Charakterystyczną cechą DNA komórek o upośledzonej funkcji telomerów jest powstawanie podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs, *double-strand breaks*). Kolejną cechą DNA komórek starzejących się jest obecność odcinków heterochromatyny, zwanych SAHF (*senescence associated heterochromatin foci*). Odcinki SAHF inaktywują geny indukujące proliferację (stymulowane między innymi przez czynnik E2F), które się wyciszają w wyniku tworzenia się SAHF. W formowaniu SAHF uczestniczą: histon macroH2A i histon H3, białko HP1, ciała jądrowe PML oraz białka chaperonowe (*HIRA i ASF1A*). Proces formowania SAHF przedstawiono na rycinie 1. Należy zaznaczyć, że zależy on od aktywności białka GSK3 będącego również supresorem szlaku WNT [7]. Ponadto w komórkach starzejących się dochodzi do uwolnienia lizosomalnej SA-beta-galaktozydazy w celu sfinalizowania apoptozy. Jedną z głównych płaszczyzn przyszłego praktycznego zastosowania markerów wieku biologicznego są przeszczepy autogeniczne komórek macierzystych. Wiek biologiczny komórek, który jest wyznacznikiem ich sprawności, może poważnie się przyczynić do izolacji komórek o oczekiwanym potencjale regeneracyjnym, gdyż istotnie wpływa na ich funkcję klonogenną, żywotność oraz liczbę.

WPLYW WYBRANYCH PATOLOGII UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO NA BIOLOGICZNY WIEK KOMÓREK PROGENITOROWYCH ŚRÓDBŁONKA

Komórki progenitorowe śródbłonka wywodzą się ze szpiku kostnego. Mogą pochodzić również z komórek CD14+ linii mieloidalnej. Mają zdolność do podziałów, migracji, proliferacji oraz różnicowania do komórek wyścielających naczynia. Charakteryzują się błonową ekspresją białka CD34 oraz receptora drugiego dla czynnika wzrostu naczyń (EGFR-2). Biorą udział w niezwykle istotnych dla organizmu procesach, takich jak naprawa śródbłonka czy angiogeneza. Istotą wpływu progresji wieku biologicznego na EPCs jest zmniejszenie ich liczby oraz upośledzenie funkcji. W związku z tym starzenie się EPCs uważa się za jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój miażdżycy [8–9]. Teorię tę wydają się potwierdzać wyniki badań, w których wykazano skrócenie długości telomerów w EPCs u pacjentów z zespołem metabolicznym i chorobą wieńcową. Należy zaznaczyć, że największa progresja wieku biologicznego dotyczyła pacjentów z przebyłym zawałem serca [10]. Ponadto zaobserwowano, że progresja wie-

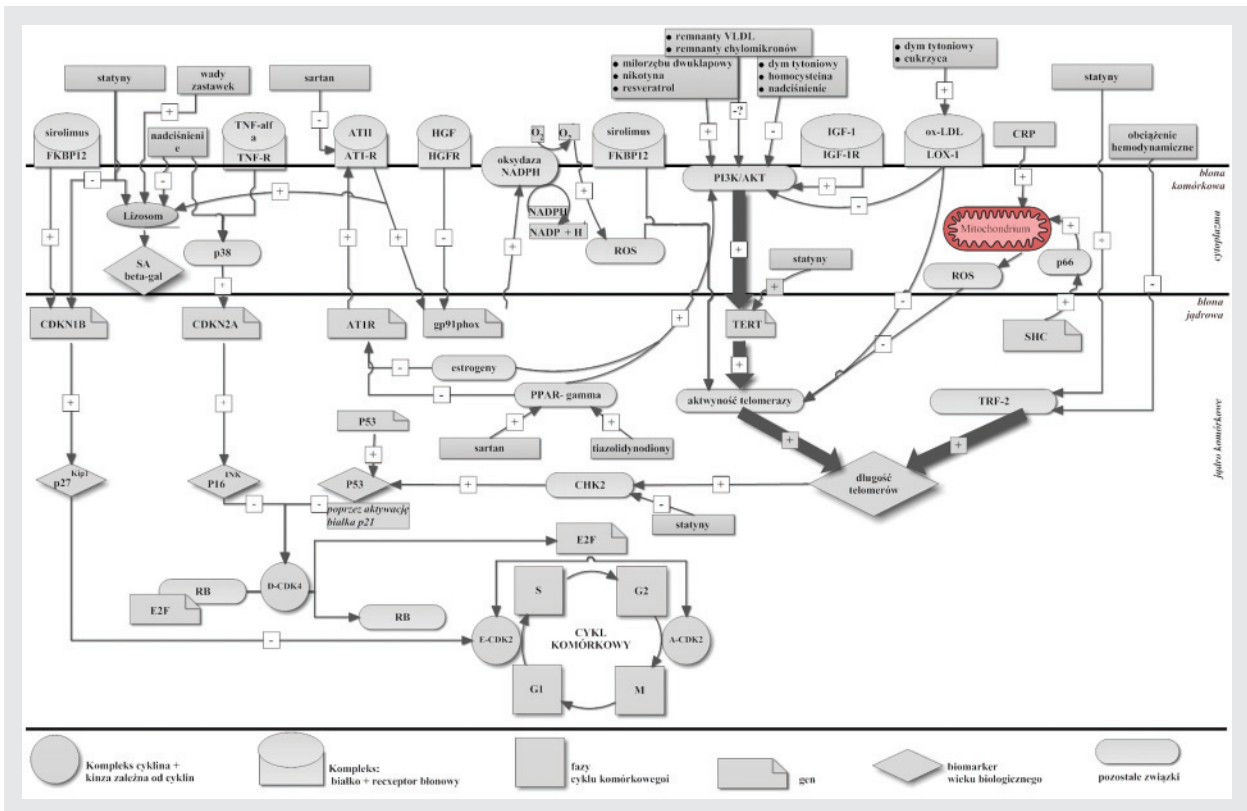
ku biologicznego może być indukowana przez nadciśnienie, cukrzycę oraz wady zastawek [11–12]. W komórkach śródbłonka pochodzących ze zwężonych zastawek aortalnych stwierdzono zwiększoną ekspresję beta-galaktozydazy. U pacjentów ze stenozą aortalną występowała natomiast zmniejszona liczba EPCs, które charakteryzowały mniej nasiloną ekspresją TRF-2 oraz zmniejszona zdolność do migracji [13].

WPLYW STOSOWANYCH LEKÓW NACZYNIOWYCH NA WYZNACZNIKI STARZENIA EPCS

Inny aspekt badań nad czynnością EPCs stanowi wpływ stosowanych leków na ich wiek. Wybrane procesy metaboliczne zaangażowane w starzenie się EPCs przedstawiono na rycinie 2. Istotną rolę w protekcyjnym działaniu prawdopodobnie odgrywa TRF-2. W 2004 roku wykazano *ex vivo* na ludzkich EPCs, że statyny zapobiegają skracaniu telomerów poprzez posttranskrypcyjną modyfikację ekspresji TRF-2 oraz działanie antyoksydacyjne [14, 15]. Potwierdzono doświadczalnie, że wdrożenie intensywnej terapii hipolipemizującej u pacjentów z chorobą wieńcową (CAD) powodowało prewencję skracania telomerów EPCs [16]. Drugą badaną grupą leków w aspekcie protekcyjnego działania na wiek biologiczny są tiazolidynodiony. Należy tu podkreślić, że PPAR-gamma, którego agonistami są tiazolidynodiony, przeciwdziała starzeniu na wielu metabolicznych płaszczyznach. Zaobserwowano między innymi prewencję apoptozy indukowaną pioglitazonem [17]. Scharakteryzowano ponadto protekcyjny wpływ pioglitazonu indukowany ingerencją w układ renina-angiotensyna oraz w metabolizm reaktywnych form tlenu. Pioglitazon powoduje zmniejszenie ekspresji genu AT1R. Istotnym działaniem wspomnianego receptora wydaje się nasilenie stresu oksydacyjnego. Jest ono konsekwencją indukcji ekspresji genu gp91phox, który koduje białko wchodzące w skład kompleksu oksydazy NADPH [18, 19]. Pioglitazon w wyniku hamowania opisanego mechanizmu niweluje negatywny wpływ indukowanego przez AT1R stresu oksydacyjnego na długość telomerów [20, 21]. Kolejnym protekcyjnym mechanizmem, który indukuje PPAR-gamma, jest nasilenie aktywności PI3K/AKT. Udokumentowano również protekcyjny wpływ sartanów [22]. Jest on mediowany poprzez blokowanie receptora AT1R. W aktualnych doniesieniach sugeruje się, że blokada AT1R może działać protekcyjnie na wiek biologiczny również poprzez stymulację PPAR-gamma [23]. W przeciwieństwie do wymienionych leków sirolimus powoduje progresję wieku biologicznego. Poprzez białko FKBP12 indukuje on zmniejszenie aktywności telomerazy oraz nasilenie ekspresji p27(kip1) [24].

ZNACZENIE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW W PROGRESJI WIEKU BIOLOGICZNEGO EPCS

Opisano także wpływ wielu związków na wiek biologiczny EPCs. W tym przypadku należy zwrócić uwagę na rolę układu białek PI3K/AKT. Układ białek PI3K/AKT ma prawdopo-



Rycina 2. Starzenie się komórek progenitorowych śródbłonka naczyniowego

A-CDK2 — kompleks cykliny A oraz kinazy zależnej od cyklin 2; ATII — angiotensyna II; AKT — kinaza białkowa B; AT1R — receptor 1 dla angiotensyny II; CDKN1B — inhibitor CDKN1B kinaz zależnych od cyklin; CDKN2A — inhibitor CDKN2A kinaz zależnych od cyklin; CRP — białko C-reaktywne; D-CDK4 — kompleks cykliny D oraz kinazy zależnej od cyklin 4; A-CDK2 — kompleks cykliny A oraz kinazy zależnej od cyklin 2; E-CDK2 — kompleks cykliny E oraz kinazy zależnej od cyklin 2; FKBP — białka wiążące FK506; G1 — faza G1 cyklu komórkowego; G2 — faza G2 cyklu komórkowego; gp91phox — gen gp91phox; HGF — czynnik wzrostowy hepatocytów; HGFR — receptor dla czynnika wzrostowego hepatocytów; IGF1 — insulinopodobny czynnik wzrostu; IGF-1R — receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1; LOX-1R — receptor LOX-1R; M — faza M cyklu komórkowego; NAPDH — dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; Ox-LDL — utlenione cząsteczki LDL; p27Kip1 — białko p27Kip1; P16INK — białko p16INK; P53 — białko P53; PI3K — kinaza fosfatydyloinozytolu; PPAR — receptory aktywowane przez proliferatory peroksyosomów; RB — białko retinoblastoma; ROS — reaktywne formy tlenu; S — faza S cyklu komórkowego; SA beta-gal — SA-beta-galaktozydaza; TERT — podjednostka katalityczna telomerazy; TNF-alfa — czynnik martwicy nowotworów typu alfa; TNF-R — receptor dla czynnika martwicy nowotworów; TRF-2 — białko telomerowe 2; VLDL — lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

dobnie istotne znaczenie w kontroli cyklu życia komórek. Białko PI3K jest kinazą fosfoinozytydów, natomiast białko AKT jest kinazą serynowo-treoninową, zwaną również kinazą białkową B (PKB). Są one zaangażowane między innymi w remodeling miokardium czy neoangiogenezę po zawale [25–27]. W kontekście protekcyjnego wpływu na wiek biologiczny układ ten stymuluje telomerazę. Do substancji działających protekcyjnie w wyniku indukcji opisanego mechanizmu należą: wyciąg z miłorzębu dwuklapowego (gingko biloba), resveratrol (występujący w winach) oraz, paradoksalnie, nikotyna [28–30]. Mechanizm protekcyjnego wpływu resveratrolu na wiek biologiczny prawdopodobnie tłumaczy doniesienia o sirtuinach. Wynika to z faktu, że opisany związek należy do stymulatorów sirtuin. Udokumentowano też, że chociaż nikotyna nasila mobilizację EPCs, to poprzez modyfikację cząsteczek LDL dym tytoniowy indukuje zahamowanie ich różnicowania oraz zmniejszenie aktywności telomerazy w wyniku upośledzenia fosforylacji Akt [31]. Hamo-

wanie szlaku PI3k/AKT przez frakcję L5 cholesterolu LDL przyczynia się także do upośledzenia czynności EPCs w wyniku supresji szlaku WNT. Na marginesie należy zaznaczyć, że homocysteina podobnie działa na wiek EPCs [32].

**WYBRANE PATOMECHANIZMY
ZAANGAŻOWANE W STARZENIE EPCS**

Poznano kilka mechanizmów zaangażowanych w starzenie EPCs oraz jego prewencję. Proces zapalny jest jednym z głównych czynników powodujących starzenie organizmu. Zjawisko to wykazano na przykładzie TNF-alfa, który należy do rodziny cytokin prozapalnych. Jego działanie jest mediowane przez białko p38 (kinazę aktywowaną mitogenami). Mimo że w populacjach EPCs ekspozowanych na TNF-alfa nie odnotowano skrócenia telomerów, to cechowały się one zwiększonym stężeniem p16(INK4a) [33]. Białko C-reaktywne indukuje natomiast powstawanie reaktywnych form tlenu, które działają hamująco na telomerazę [34]. Innymi czynnikami

powodującymi nasilenie starzenia EPCs są działanie angiotensyny mediowane przez receptor AT1R oraz ekspresja genu SHC, który koduje białko p66. Estrogeny działają antagoniście w stosunku do angiotensyny II, co wpływa na wiek biologiczny. Efekt jest mediowany przez układ PI3K/Akt i wiąże się przede wszystkim z indukcją ekspresji jednostki katalitycznej telomerazy (TERT) [35]. Estrogeny ingerują również w układ renina–angiotensyna poprzez zmniejszenie ekspresji receptora AT1R, a w konsekwencji regresję ekspresji genu gp91phox [36]. Podobne protekcyjne działanie, które jest mediowane przez układ PI3K/Akt, wykazuje IGF-1 [37]. Czynniki wzrostu hepatocytów natomiast powoduje spadek ekspresji gp91phox [38].

Należy zaznaczyć, że na starzenie EPCs wpływa też proces interferencji RNA. Mediatorami starzenia są w tym wypadku cząstki mikroRNA (miR). MikroRNA są jednoniciowymi cząstkami RNA o długości około 20 nukleotydów, które mogą specyficznie blokować translację. Związek ten wykazano między innymi na przykładzie miR 34a, które hamuje syntezę antyapoptycznych genów. W wyniku supresji SIRT1 wspomniana cząstka mikroRNA upośledza działanie czynnika FOXO1 i hamuje syntezę indukowanych przez niego genów. Ponadto stwierdzono, że statyny mogą zapobiegać ekspresji proapoptycznych cząstek mikroRNA: miR 221 oraz miR 222 w EPCs. Natomiast cząstką, która wpływa protekcyjnie na czynność EPCs, jest prawdopodobnie miR27b.

PODSUMOWANIE

Dysfunkcja EPCs odgrywa istotną rolę w rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. U podstawy działań w prewencji zarówno pierwotnej, jak i wtórnej wspomnianych chorób niejednokrotnie leży protekcyjny wpływ na wiek biologiczny EPCs. Czynniki ryzyka, takie jak: palenie tytoniu, cukrzyca, zaburzenia lipidowe czy nadciśnienie, indukują progresję wieku biologicznego EPCs. Powoduje to zmniejszenie zarówno ich liczby, jak i zdolności proliferacyjnej komórek, a tym samym upośledza ich funkcję naprawczą. Z drugiej strony jednak istnieją substancje znajdujące zastosowanie w prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego o udowodnionym działaniu protekcyjnym w stosunku do wieku biologicznego, takie jak: statyny, sartany, tiazolidynodiony, wyciąg z miłorzębu dwuklapowego czy resveratrol. Niezwykle istotny dla starzenia się EPCs jest prawdopodobnie układ PI3K/AKT. Wiek biologiczny może być interesującym markerem, ponieważ odzwierciedla skutki działania szerokiego spektrum czynników. W przyszłości może się stać parametrem, który będzie wpływał na decyzje podejmowane w praktyce klinicznej.

Finansowanie: Grant Ministerstwa Edukacji i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007–2013 (POIG-01.01.02-00-109/09) oraz granty PBZ-KBN-0651/P01/2007/32, PBZ-KBN-2422/P01/2007/32.

Piśmiennictwo

1. Fuster JJ, Andrés V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2006; 99: 1167–1180.
2. Wong LS, de Boer RA, Samani NJ et al. Telomere biology in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2008; 10: 1049–1056.
3. Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW et al. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol*, 2002; 22: 3497–3508.
4. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 24: 13742–13747.
5. Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem*, 2000; 275: 21960–21968.
6. Lee BY, Han JA, Im JS et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 2006; 5: 187–195.
7. Adams PD. Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene*, 2007; 397: 84–93.
8. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res*, 2007; 100: 15–26.
9. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004; 95: 343–353.
10. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y et al. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2008; 198: 347–353.
11. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T et al. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens*, 2005; 23: 1831–1837.
12. Rosso A, Balsamo A, Gambino R et al. p53 Mediates the accelerated onset of senescence of endothelial progenitor cells in diabetes. *J Biol Chem*, 2006; 281: 4339–4347.
13. Matsumoto Y, Adams V, Walther C et al. Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J*, 2009; 30: 346–355.
14. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation*, 2004; 110: 3136–3142.
15. Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF et al. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ Res*, 2004; 94: 768–775.
16. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y et al. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*, 2009; 116: 827–835.
17. Gensch C, Clever YP, Werner C et al. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*, 2007; 192: 67–74.
18. Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress. *Curr Cardiol Rev*, 2008; 4: 275–286.
19. Urao N, Inomata H, Razvi M et al. Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res*, 2008; 103: 212–220.
20. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens*, 2005; 23: 97–104.

21. Imanishi T, Kobayashi K, Kuroi A et al. Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced senescence of endothelial progenitor cell. *Hypertens Res*, 2008; 31: 757–765.
22. Kobayashi K, Imanishi T, Akasaka T. Endothelial progenitor cell differentiation and senescence in an angiotensin II-infusion rat model. *Hypertens Res*, 2006; 29: 449–455.
23. Honda A, Matsuura K, Fukushima N et al. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPAR-gamma-dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis*, 2009; 205: 376–384.
24. Imanishi T, Kobayashi K, Kuki S et al. Sirolimus accelerates senescence of endothelial progenitor cells through telomerase inactivation. *Atherosclerosis*, 2006; 189: 288–296.
25. Damilano F, Perino A, Hirsch E. PI3K kinase and scaffold functions in heart. *Ann NY Acad Sci*, 2010; 1188: 39–45.
26. Siragusa M, Katare R, Meloni M et al. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in angiogenesis and healing of experimental myocardial infarction in mice. *Circ Res*, 2010; 106: 757–768.
27. Somanath PR, Razorenova OV, Chen J et al. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle*, 2006; 5: 512–518.
28. Dong XX, Hui ZJ, Xiang WX et al. Ginkgo biloba extract reduces endothelial progenitor-cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007; 49: 111–115.
29. Xia L, Wang XX, Hu XS et al. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol*, 2008; 155: 387–394.
30. Junhui Z, Xiaojing H, Binquan Z et al. Nicotine-reduced endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity via the PI3K/Akt pathway. *Cytotherapy*, 2009; 11: 485–491.
31. Tang D, Lu J, Walterscheid JP et al. Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1. *J Lipid Res*, 2008; 49: 33–47.
32. Zhu JH, Chen JZ, Wang XX et al. Homocysteine accelerates senescence and reduces proliferation of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2006; 40: 648–652.
33. Zhang Y, Herbert BS, Rajashekhar G et al. Premature senescence of highly proliferative endothelial progenitor cells is induced by tumor necrosis factor-alpha via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FASEB J*, 2009; 23: 1358–1365.
34. Fujii H, Li SH, Szmitko PE et al. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 2476–2482.
35. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*, 2005; 23: 1699–1706.
36. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells. *Hypertens Res*, 2005; 28: 263–271.
37. Thum T, Hoeber S, Froese S et al. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res*, 2007; 100: 434–443.
38. Sanada F, Taniyama Y, Azuma J et al. Hepatocyte growth factor, but not vascular endothelial growth factor, attenuates angiotensin II-induced endothelial progenitor cell senescence. *Hypertension*, 2009; 53: 77–82.