

Alicja Targońska

**Starzenie komórek mięśni gładkich aorty - związek między autofagią a
sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Molekularnych Podstaw
Starzenia oraz w Pracowni Cytometrii
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

**Dr hab. Grażyna Mosieniak,
prof. Instytutu Nenckiego PAN**



Warszawa, 2026

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus kierowanego przez dr hab. Grażynę Mosieniak pt. „Rola autofagii w regulacji wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz białek przez komórki mięśni gładkich naczyń na różnych etapach procesu starzenia” (2018/31/B/NZ3/02931), w którym autorka pełniła rolę wykonawcy.

Pragnę serdecznie podziękować

dr hab. Grażynie Mosieniak

za opiekę naukową, nieskończone pokłady cierpliwości i wyrozumiałości
oraz za wszystkie przeprowadzone dyskusje, nie tylko te naukowe

prof. dr hab. Ewie Sikorze

za wsparcie merytoryczne oraz codzienną życzliwość

prof. dr hab. Katarzynie Piwockiej

za życzliwość oraz umożliwienie skończenia doktoratu
w Pracowni Cytometrii w niezwykle sprzyjających warunkach

dr Karolinie Staniak

za wprowadzenie mnie w świat autofagii,
owocne dyskusje naukowe oraz nieocenione wsparcie

mgr inż. Dawidowi Stępnikowi

za pomoc i nieocenione wsparcie przy analizach wielkoskalowych

dr Małgorzacie Śliwińskiej

za pomoc w analizach z zastosowaniem mikroskopii elektronowej

dr Adrianowi Konopko

za wsparcie i wspólne doświadczenia przy niezliczonych filiżankach kawy
i hektolitrach buforu do elektroforezy

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Molekularnych Podstaw Starzenia

za codzienną życzliwość, wsparcie i cudowną atmosferę pracy

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Cytometrii

za ciepłe przyjęcie i miłą atmosferę w pracy

Mężowi oraz Mamie

za wiarę i wsparcie w chwilach zwątpienia

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	11
STRESZCZENIE	15
ABSTRACT	17
1. Wstęp	19
1.1. Starzenie komórkowe.....	20
1.1.1. Starzenie replikacyjne (RS).....	20
1.1.2. Starzenie przyspieszone indukowane stresem (SIPS).....	22
1.2. Markery starzenia.....	22
1.3. Fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, SASP (ang. senescence-associated secretory phenotype).....	26
1.3.1. Mechanizmy wzmożonej produkcji czynników SASP.....	27
1.4. Udział komórek VSCM w rozwoju blaszki miażdżycowej.....	29
1.4.1. Powstawanie i rozwój blaszki miażdżycowej.....	29
1.4.1.1. Budowa i stabilność blaszki miażdżycowej.....	30
1.4.1.2. Rola wapnienia i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs).....	31
1.4.1.3. Fenotypowa plastyczność VSMC.....	31
1.4.1.4. Starzenie komórkowe a stabilność w blaszki miażdżycowej.....	32
1.5. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.....	32
1.5.1. Klasyfikacja, biogeneza i wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	33
1.5.2. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako element fenotypu sekrecyjnego komórek starych.....	36
1.5.3. Rola pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w rozwoju miażdżycy.....	37
1.6. Autofagia.....	39
1.6.1. Rola i przebieg autofagii w komórkach.....	40
1.6.2. Udział autofagii w starzeniu komórkowym.....	43
1.6.3. Autofagia a sekrecja.....	45
1.7. Rola statyn w starzeniu komórkowym.....	47
2. Cele pracy	51
3. Materiały i metody	53
3.1. Materiały.....	53
3.1.1. Hodowla komórek in vitro.....	53

3.1.2. Przeciwciała.....	53
3.1.3. Odczynniki i roztwory.....	56
3.1.3.1. Związki wykorzystywane do traktowania komórek.....	56
3.1.3.2. Roztwory stosowane do oznaczania poziomu aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal)	56
3.1.3.3. Roztwory wykorzystywane w barwieniach cytochemicznych.....	57
3.1.3.4. Roztwory wykorzystywane w metodzie Western blot.....	57
3.1.3.5. Roztwory do przygotowywania żeli poliakrylamidowych.....	58
3.1.3.6. Bufory i roztwory stosowane w przygotowywaniu preparatów do mikroskopii elektronowej.....	59
3.1.4. Sondy molekularne.....	60
3.1.5. Zestawy odczynników.....	61
3.2. Metody.....	61
3.2.1. Ocena potencjału proliferacyjnego komórek w oparciu o skumulowaną liczbę podwojeń populacji (cPD)	61
3.2.2. Indukcja starzenia z wykorzystaniem doksorubicyny.....	61
3.2.3. Wyznaczanie indeksu autofagicznego.....	62
3.2.4. Hamowanie wydajności autofagii.....	62
3.2.5. Badanie poziomu białek metodą Western blot.....	62
3.2.5.1. Przygotowanie ekstraktów całokomórkowych.....	63
3.2.5.2. Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym, transfer białek na membranę i wizualizacja białek.....	63
3.2.6. Barwienia cytochemiczne.....	64
3.2.6.1. Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal)	64
3.2.6.2. Barwienie F-aktyny w komórkach.....	65
3.2.6.3. Wizualizacja i pomiar lizosomów oraz aktywnej katepsyny B.....	65
3.2.7. Barwienia immunocytochemiczne.....	65
3.2.7.1. Oznaczanie zdolności komórek do wbudowywania bromodeoksyurydyny do DNA.....	66
3.2.7.2. Analiza liczby uszkodzeń DNA w oparciu o wizualizację skupisk 53BP1 oraz γ H2AX.....	66
3.2.8. Mikroskopia elektronowa	67
3.2.8.1. Obrazowanie struktur komórkowych.....	67

3.2.8.2. Immunodetekcja białka CD63 za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej.....	68
3.2.9. Analiza wydzielania wybranych cytokin.....	69
3.2.9.1. Test ELISA.....	69
3.2.9.2. Analiza cytometryczna.....	70
3.2.10. Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)	70
3.2.10.1. Pomiar wielkości i ilości wyizolowanych pęcherzyków.....	71
3.2.11. Sekwencjonowanie RNA (RNAseq)	72
3.2.11.1. Izolacja RNA.....	72
3.2.11.2. Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania mRNA.....	72
3.2.11.3. Przetwarzanie wstępne danych i analiza.....	74
3.2.12. Analiza proteomiczna.....	75
3.2.12.1. Przygotowanie próbek.....	75
3.2.12.2. Znakowanie TMTpro.....	76
3.2.12.3. Oczyszczanie i frakcjonowanie peptydów.....	76
3.2.12.4. Analiza LC–MS/MS.....	77
3.2.12.5. Analiza danych.....	77
3.2.13. Analiza porównawcza oraz wizualizacja danych transkryptomycznych i proteomicznych.....	78
3.2.14. Analiza statystyczna.....	78
4. Wyniki.....	79
4.1. Charakterystyka starzenia komórek VSMC przeprowadzona na podstawie wybranych markerów.....	80
4.1.1. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach VSMC na różnych etapach procesu starzenia indukowanego stresem oraz replikacyjnego.....	80
4.1.2. Zmiany w poziomie wybranych markerów starzenia w komórkach VSMC ulegających starzeniu indukowanemu stresem oraz replikacyjnemu.....	84
4.1.3. Analiza ekspresji genów oraz poziomu białek, uznawanych za markery starzenia	88
4.1.4. Zmiany markerów starzenia towarzyszących SASP.....	93
4.2. Analiza porównawcza transkryptomu komórek VSMC na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.....	99
4.3. Analiza porównawcza proteomu komórek VSMC na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.....	111

4.4. Analiza porównawcza proteomu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki VSMC będących na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu.....	118
4.5. Proteom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako reprezentacja proteomu komórkowego	127
4.6. Analiza procesu autofagii w komórkach VSMC na różnych etapach procesu starzenia.....	131
4.6.1. Ocena ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z autofagią.....	131
4.6.2. Analiza ilości i aktywności lizosomów.....	137
4.6.3. Ocena poziomu białek związanych z dojrzewaniem autofagosomów i degradacją.....	139
4.6.4. Analiza wydajności przebiegu autofagii.....	141
4.6.5. Modulacja wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych poprzez inhibicję procesu autofa.....	143
4.7. Wpływ simwastatyny na wydzielanie czynników SASP.....	153
5. Dyskusja.....	157
5.1. Zachodzące w czasie zmiany w fenotypie komórek starych analizowane w oparciu o zdefiniowane markery starzenia.	158
5.2. Różnice w transkryptomie komórek na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.....	161
5.3. Różnice w proteomie komórek na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.....	164
5.4. Różnice w proteomie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielonych przez komórki na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.	167
5.5. Modulacja autofagii i jej wpływ na sekrecję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	170
5.6. Wpływ simwastatyny na wydzielanie czynników SASP przez komórki VSMC po indukcji starzenia doksorubicyną.....	173
6. Podsumowanie i wnioski.....	175
Bibliografia.....	177
Spis publikacji autorki rozprawy.....	201

WYKAZ SKRÓTÓW

53BP1 - *p53 binding protein*, białko wiążące p53

AMPK - *5'AMP-activated protein kinase*, kinaza AMPK

ALR - *autophagic lysosome reformation*, autofagiczna odnowa lizosomów

APS - *amonium persulfate*, nadsiarczan amonu

ATG - *autophagy-related gene*, gen związany z autofagią

ATM - *ataxia-telangiectasia mutated*, białko zmutowane w ataksji-teleangiektazji

ATR - *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

BCL-2 - *B-cell lymphoma 2*, białka z rodziny BCL-2

BrdU - *5-bromo-2'-deoxyuridine*, 5-bromo-2-deoksyurydyna

BSA - *bovine serum albumin*, albumina surowicy bydłowej

CCFs - *cytoplasmic chromatin fragments*, cytoplazmatyczne fragmenty chromatyny

CCL - *C-C motif chemokine ligand*, chemokiny z rodziny CCL

CHK - *checkpoint kinase*, kinaza punktu kontrolnego

CMA - *chaperone-mediated autophagy*, autofagia zależna od białek opiekuńczych

cPD - *cumulative population doubling*, skumulowana liczba podwojeń populacji

DAMPs - *damage-associated molecular patterns*, cząsteczki sygnałowe związane z uszkodzeniem

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*, 4',6-diamidyno-2-fenylindol

DMSO - *dimethyl sulfoxide*, dimetylosulfotlenek

DDR - *DNA damage response*, odpowiedź na uszkodzenia DNA

DEG - *differentialy expressed genes*, geny o zróżnicowanej ekspresji

DNASE2 - *deoxyribonuclease 2*, deoksyrybonukleaza 2

DSBs - *double strand breaks*, uszkodzenia podwójne nici DNA

DTT - *dithiothreitol*, ditiotreitol

ECM – *extracellular matrix*, macierz zewnątrzkomórkowa

ER – *endoplasmic reticulum*, siateczka śródplazmatyczna

ESCRT - *endosomal sorting complex required for transport*, endosomalny kompleks sortujący odpowiedzialny za transport

EVs - *extracellular vesicles*, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

FBS - *Fetal Bovine Serum*, surowica płodowa cielęca

FC - *fold change*, krotność zmiany

FDR - *false discovery rate*, współczynnik fałszywych odkryć

HDL – *high density lipoprotein*, lipoproteiny o wysokiej gęstości

IL – *interleukin*, interleukina

ILVs - *intraluminal vesicles*, pęcherzyki wewnątrzendosomalne powstające poprzez wgłębienie błony endosomu

ISEV - *International Society for Extracellular Vesicles*

LADs - *lamin-associated domains*, domeny powiązane z laminą

LAMP - *lysosome-associated membrane protein*, białko związane z błoną lizosomu

LDELS - *LC3-dependent EV loading and secretion*, LC3-zależne ładowanie i wydzielanie EVs

LDL – *low density lipoprotein*, lipoproteiny o niskiej gęstości

LIR - *LC3-interacting region*, region oddziałujący z LC3

MAP1 LC3 - *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

MDC1 - *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

MMP – *matrix metalloproteinase*, metaloproteinaza macierzy

MRN - *protein complex consisting of: Mre11, Rad50 and Nbs1*, kompleks białkowy

(Mre11, Rad50, Nbs1)

mTOR - *mechanistic Target Of Rapamycin*

MS - *mass spectrometry*, spektrometria mas

MVBs - *multivesicular bodies*, ciała wielopęcherzykowe

NBR1 - *neighbour of BRCA1 gene 1 protein*

NF- κ B - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

N_h - *cell harvest number*, liczba zebranych komórek

N_i - *inoculum number*, liczba wysianych komórek

NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*, analiza śledzenia ruchu nanocząstek

OIS - *oncogene-induced senescence*, starzenie przyspieszone indukowane onkogenami

OPTN - *optineurin*, optyneuryna

p70S6K1 - *ribosomal protein S6 kinase beta-1*

PARP1 - *poly [ADP-ribose] polymerase 1*

PAS - *phagophore assembly site*, miejsce tworzenia się fagoforu

PBS - *phosphate buffered saline*, roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym

PCA - *Principal Component Analysis*, analiza głównych składowych

PD - *population doubling*, podwojenie populacji

PE – *phosphatidylethanolamine*, fosfatydyloetanolamina

PFA – *paraformaldehyde*, paraformaldehyd

PI3K III - *class III phosphatidylinositol 3-kinase*, kinaza 3 fosfatydyloinozytolu klasy III

PIP3 - *phosphatidylinositol 3-phosphate*, fosfatydyloinozytol-3-fosforanu

RBPs - *RNA-binding proteins*, białka wiążące RNA

RS - *replicative senescence*, starzenie replikacyjne

SA- β -gal - *senescence-associated β -galactosidase*, β -galaktozydaza związana ze starzeniem

SAHFs - *senescence-associated heterochromatin foci*, skupiska heterochromatyny związane ze starzeniem

SASP – *senescence associated secretory phenotype*, fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem

SCAFs – *senescence-cell adhesion fragments*, komórkowe fragmenty “przylegające” do komórek starych

SDS - *sodium dodecyl sulfate*, siarczan dodecyłu sodu

SIPS - *stress-induced premature senescence*, starzenie przyspieszone indukowane stresem

SQSTM1/p62 - *sequestome-1/ubiquitin-binding protein p62*, białko p62

SSBs - *single strand break*, uszkodzenie pojedynczej nici DNA

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*

TBST – *tris-buffered saline Tween-20*, roztwór soli fizjologicznej w buforze tris z dodatkiem Tween-20

TCH - *tiocarbohydrazide*, tiokarbohydrazyd

TCL - *total cel lysate*, lizat całokomórkowy

TEMED - *N',N',N',N'-tetramethylenediamine*, N',N',N',N'-tetrametyloetylenodiamina

TMT - *tandem mass tag*, znacznik tandemowej spektrometrii mas

UBA - *ubiquitin-associated*, domena rozpoznająca ubikwitynę na substracie

ULK1/2 - *unc-51 like autophagy activating kinase 1/2*, kinaza ULK1/2

UPR - *unfolded protein response*, odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka

VSMC - *vascular smooth muscle cells*, komórki mięśni gładkich naczyń

x-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopiranozyd

STRESZCZENIE

Starzenie komórkowe jest odpowiedzią na stres charakteryzującą się trwałym zahamowaniem proliferacji oraz głęboką przebudową morfologiczną, metaboliczną i funkcjonalną komórek. Zjawisko to można podzielić na etapy wczesny i późny, które wiążą się z zachodzeniem dynamicznych zmian w fenotypie. Nagromadzenie starzejących się komórek w tkankach przyczynia się do starzenia organizmu oraz do rozwoju chorób związanych z wiekiem, w tym miażdżycy. Wykazano, że komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMC) ulegające starzeniu sprzyjają rozwojowi blaszki miażdżycowej, m.in. poprzez zwiększoną sekrecję biologicznie aktywnych czynników, określanych terminem *Senescence Associated Secretory Phenotype* (SASP).

Jednym z procesów towarzyszącym starzeniu jest autofagia. Proces ten jest zaangażowany w utrzymanie homeostazy komórkowej poprzez usuwanie uszkodzonych organelli lub białek, co zapobiega starzeniu komórkowemu. Gdy stres komórkowy staje się przewlekły, autofagia może wspierać rozwój fenotypu starzenia, między innymi poprzez wspieranie SASP.

Celem mojej pracy było zbadanie zmian zachodzących w komórkach VSMC na różnych etapach starzenia indukowanego stresem oraz replikacyjnego, ze szczególnym uwzględnieniem udziału autofagii w regulacji sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs).

W pierwszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę fenotypu starzenia. Analiza klasycznych markerów tego procesu została uzupełniona o badania transkryptomyczne i proteomiczne, które pozwoliły na wykazanie różnic i podobieństw pomiędzy różnymi typami starzenia (starzenie indukowane i starzenie replikacyjne), jak też w zależności od etapu starzenia (wczesny *versus* późny). Analiza transkryptomu wykazała globalny spadek ekspresji genów w komórkach starych, zwłaszcza tych zaangażowanych w regulację proliferacji i naprawę DNA. Dodatkowo stwierdzono, że pogłębianiu się starzenia towarzyszą zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących białka związane z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Analiza proteomu ujawniła znacznie wyższą liczbę białek istotnie zmieniających się w komórkach VSMC będących na późnych etapach starzenia oraz komórkach starzejących się replikacyjnie. Wśród nich nadreprezentowane były białka zaangażowane w regulację metabolizmu oraz odpowiedzi odpornościowej.

Analizie poddano również pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki na poszczególnych etapach starzenia. Wykazano, że stare komórki VSMC wydzielają istotnie więcej EVs niż komórki młode, a ich liczba rośnie wraz z pogłębianiem się procesu starzenia. Wraz z upływem czasu od indukcji starzenia, proteom EVs wydzielanych przez komórki stare ulega większemu zróżnicowaniu, co wskazuje na dynamiczną przebudowę sekretomu. Porównanie proteomu komórek ulegających starzeniu z proteomem EVs pozwoliło na wytypowanie markerów tego procesu występujących w pęcherzykach, co potencjalnie może

być wykorzystane do oceny poziomu starzenia komórkowego w chorobach układu krążenia w oparciu o analizę EVs obecnych w krwi.

Wykazano, że zarówno starzenie replikacyjne, jak i indukowane komórek VSMC wiąże się ze spadkiem wydajności autofagii. Spadkowi wydajności autofagii towarzyszyła postępująca w czasie starzenia akumulacja pęcherzyków uczestniczących w tym procesie, czego dowiodła analiza morfologii komórek na poziomie ultrastrukturalnym oraz analiza proteomu komórkowego. Zahamowanie autofagii przy użyciu bafilomycyny A1 znacząco zwiększa sekrecję EVs przez komórki VSMC. Największy wzrost wydzielania EVs pod wpływem bafilomycyny A1 odnotowano dla komórek będących na późnych etapach starzenia. Wskazuje to na funkcjonalny związek między zaburzeniami autofagii a zwiększonym wydzielaniem pęcherzyków przez komórki stare.

Zbadano również wpływ simwastatyny, związku należącego do grupy leków powszechnie stosowanych w zapobieganiu i leczeniu chorób układu krążenia, na sekretom komórek starzejących się. Stwierdzono, że lek ten obniża wydzielanie przez stare komórki VSMC rozpuszczalnych czynników SASP, nie mając jednak wpływu na poziom wydzielanych EVs.

Podsumowując, rozprawa ta przedstawia wyniki przyczyniające się do lepszego poznania zmian zachodzących w trakcie starzenia komórek VSMC i stanowi punkt wyjścia do badań nad wykorzystaniem markerów starzenia do diagnostyki oraz oceny efektów leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego, którym towarzyszy gromadzenie się komórek starych. Ponadto moje badania wskazują na powiązanie zaburzeń procesu autofagii w komórkach starych z sekrecją EVs.

ABSTRACT

Cellular senescence is a stress response characterized by irreversible cell cycle arrest and intense morphological, metabolic, and functional remodeling. This phenomenon can be divided into early and late stage, each associated with dynamic phenotypic changes. Accumulation of senescent cells in tissues contributes to aging of a whole organism and the development of age-related diseases, including atherosclerosis. It has been demonstrated that vascular smooth muscle cells (VSMC) undergoing senescence promote atherosclerotic plaque progression, including through the increased secretion of bioactive factors collectively referred to as the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP).

One of the processes accompanying senescence is autophagy. This process is involved in maintaining cellular homeostasis, preventing senescence by removing damaged organelles or proteins. When cellular stress becomes chronic, autophagy may support the development of the senescent phenotype, including by sustaining SASP.

The aim of my study was to investigate changes occurring in vascular smooth muscle cells at different stages of stress-induced and replicative senescence, with particular emphasis on the role of autophagy in the regulation of extracellular vesicles (EVs) secretion.

In the first stage of the study, I characterized the senescent phenotype. Analysis of classical markers of this process was complemented with transcriptomic and proteomic studies, which enabled identification of differences and similarities between different types of senescence (induced vs replicative), as well as between its stages (early vs late). Transcriptome analysis revealed a global decrease in gene expression in senescent cells, particularly of genes involved in the regulation of proliferation and DNA repair. Additionally, I found that the progression of senescence is accompanied by changes in the expression of genes encoding proteins associated with extracellular matrix remodeling. Proteomic analysis revealed a substantially higher number of significantly altered proteins in VSMC at late stages of senescence and in replicative senescent cells. Among these, proteins involved in metabolic regulation and immune responses were overrepresented.

Next, I analyzed extracellular vesicles secreted by cells at different stages of senescence. I demonstrated that senescent VSMC release significantly more EVs than young cells, and their number increases with senescence progression. Over time, following senescence induction, the proteome of EVs released by senescent cells becomes increasingly diversified, indicating dynamic remodeling of the secretome. Comparison of the cellular proteome with the EVs proteome allowed me to identify potential markers of this process present in extracellular vesicles, which could potentially be used to assess cellular senescence levels in cardiovascular diseases based on EVs circulating in the blood.

I showed that both replicative and stress-induced senescence in VSMC are associated with reduced autophagic activity. Inhibition of autophagy using bafilomycin A1 markedly increased

EVs secretion in VSMC, indicating a functional link between impaired autophagy and elevated vesicle release by senescent cells.

I also examined the effect of simvastatin, a widely used drug for the prevention and treatment of cardiovascular diseases, on the secretome of senescent cells. I found that this drug reduces the secretion of soluble SASP factors by senescent VSMC, but does not affect the level of EVs release.

In summary, this dissertation presents findings that contribute to a better understanding of the changes occurring during vascular smooth muscle cell senescence and provides a foundation for future studies on the use of senescence markers for diagnosis and evaluation of therapeutic outcomes in vascular diseases associated with the accumulation of senescent cells. Moreover, my research indicates a link between autophagy impairment observed in senescent cells and EVs secretion.

1. Wstęp

Starzenie jest jednym z procesów, który dotyczy większości żywych organizmów. Już w starożytności próbowano powiązać proces ten z chorobami i ogólnym osłabieniem w podeszłym wieku [Papirus Ebersa, Hipokrates, Kanon medycyny Żółtego Cesarza]. Przez kolejne stulecia kontynuowano poszukiwania biologicznych podstaw procesu starzenia. Sformułowano szereg teorii próbujących wyjaśnić to zjawisko. Awicenna w XI w. wiązał dbanie o zdrowie z długowiecznością co prawie po dziesięciu wiekach okazało się być prawdą, ponieważ dzięki ogólnej poprawie warunków życia w ostatnim stuleciu wzrosła średnia długość życia. Paracelsus w swoich badaniach już w XVI w. szukał złotego środka na długowieczność. Jednak dopiero wiek XIX okazał się być przełomowy w poznawaniu procesu starzenia. W 1858 roku Rudolf Virchow opublikował dzieło zatytułowane "Patologia komórkowa w jej uzasadnieniu na podstawie fizjologii i patologii tkanek", w którym przedstawił swoje teorie dotyczące m.in. starzenia. Jedną z nich była teoria patologii komórkowej, według której podłożem wszelkich procesów życiowych, a więc również starzenia oraz chorób, są zmiany w komórkach, które powstają tylko poprzez podział. Przedstawił to na przykładzie między innymi miążdżycy i zwłóknień narządów. Dodatkowo jego obserwacje sugerowały, iż przewlekły stan zapalny przyspiesza proces starzenia, co potwierdzają współczesne badania. Kolejną kluczową teorią było powiązanie starzenia z uszkodzeniami komórkowymi wywołanymi przez wolne rodniki. Głównym źródłem tych cząsteczek są mitochondria, które w wyniku uszkodzeń wydzielają więcej reaktywnych form tlenu ¹. Swój znaczący udział w pogłębianiu wiedzy o starzeniu na poziomie komórkowym ma również Elizabeth Blackburn i prowadzone przez nią badania nad telomerami. W 1978 roku odkryła, iż końcowe fragmenty chromosomów mają powtarzalne sekwencje, co sugerowało ich funkcję ochronną ², a z kolei te badania były podstawą do odkrycia w 1984 roku przez Elizabeth Blackburn i Carol Greider telomerazy – enzymu zaangażowanego w odbudowę telomerów ³. Kluczowym odkryciem w badaniach nad starzeniem było stwierdzenie, że komórki pochodzące z tkanek naszego organizmu posiadają potencjał proliferacyjny, który ulega wyczerpaniu. A zatem podziały komórkowe podlegają tzw. limitowi Hayflicka ⁴. Co więcej, komórki, które osiągnęły limit podziałowy to komórki stare, nazywane również w literaturze komórkami senescentnymi. Wyniki prac prowadzonych w kolejnych latach

pokazały obecność komórek starych w starzejącym się organizmie, jak też w tkankach dotkniętych chorobami występującymi najczęściej u ludzi w podeszłym wieku, takimi jak choroby neurodegeneracyjne czy choroby układu sercowo-naczyniowego⁵. Obecnie istnieją już dowody naukowe świadczące o tym, że gromadzenie się komórek starych prowadzi do starzenia się organizmu oraz sprzyja rozwojowi chorób związanych z wiekiem⁶.

1.1. Starzenie komórkowe

Starzenie komórkowe można określić jako stan stałego i nieodwracalnego zatrzymania podziałów z jednoczesnym zachowaniem funkcji metabolicznych komórki, następujący w odpowiedzi na czynniki stresowe. Jednak, biorąc pod uwagę napływ nowych informacji pojawiający się w miarę rozwoju badań nad starzeniem komórkowym, warto rozwinąć definicję starzenia i zwrócić uwagę, że jest to dynamiczny, wieloetapowy proces, podczas którego komórki ciągle ulegają zmianom⁷. Zmiany te dotyczą morfologii, które są najłatwiejsze do zaobserwowania, ale również aktywacji szeregu ścieżek sygnałowych, które skutkują zmianami w ekspresji genów⁶. Istotną cechą komórek, które podlegają zmianom w procesie starzenia jest fenotyp sekrecyjny, poprzez który komórki stare oddziałują na mikrośrodowisko tkanki w której się gromadzą. Biorąc pod uwagę fakt, że elementami fenotypu sekrecyjnego komórek starych są m.in. czynniki prozapalne, akumulacja komórek starych przyczynia do powstania stanu zapalnego, który z kolei sprzyja rozwojowi chorób związanych z wiekiem⁸.

1.1.1. Starzenie replikacyjne (RS)

Pierwszym, opisanym typem starzenia było zaobserwowane przez Hayflicka i Moorhead'a starzenie replikacyjne, które obalało dotychczasową hipotezę o nieskończonym potencjale proliferacyjnym komórek hodowanych *in vitro*⁹.

Po przeprowadzeniu szeregu doświadczeń na fibroblastach i analizie zebranych informacji Hayflick wyróżnił trzy fazy w trakcie „życia” komórek. Faza pierwsza charakteryzuje się intensywną proliferacją komórek do momentu osiągnięcia pełnej konfluencji w naczyniu hodowlanym. Dochodzi wówczas do tzw. inhibicji kontaktowej, w efekcie której komórki przestają się dzielić. W celu ponownego wznowienia proliferacji konieczne jest przeprowadzenie pasażu redukcyjnego. Stymuluje to komórki do intensywnych podziałów

charakterystycznych dla drugiej fazy hodowli. Podczas tego okresu, komórki są pasażowane kilkakrotnie, za każdym razem po osiągnięciu pełnej konfluencji w naczyniu hodowlanym. W zależności od rodzaju komórek faza ta trwa od 2 do 10 miesięcy, przy czym najdłużej proliferują komórki, które były pasażowane przed osiągnięciem pełnej konfluencji. Z czasem komórki wykazują mniejszą zdolność do podziałów mitotycznych, co rozpoczyna fazę trzecią – terminalną. Poza spowolnioną proliferacją, a co za tym idzie wydłużonym czasem osiągnięcia pełnej konfluencji, Hayflick zauważył również towarzyszące temu zmiany morfologii komórek. Obecność „śmiec” komórkowych w pożywce hodowlanej, powiększone jądra komórkowe oraz nieodwracalne zahamowanie proliferacji charakteryzują fazę trzecią, w której to komórki są uznawane za stare. Odkrycie to dało podwaliny do dalszych badań nad zrozumieniem starzenia komórkowego. Kolejnym kluczowym odkryciem było powiązanie wyczerpywania potencjału proliferacyjnego komórek ze skracaniem telomerów, następującego po każdym podziale komórki ¹⁰⁻¹⁴. Telomery odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury chromosomów, m.in. zapobiegają zlepianiu się ich ze sobą, co mogłoby prowadzić do uszkodzeń chromosomów i ich nieprawidłowego rozdziału do komórek potomnych ¹⁰. Telomery składają się z krótkich, powtarzalnych i niekodujących sekwencji TTAGGG, które ulegają stopniowemu skracaniu przy każdej rundzie syntezy DNA o odcinek odpowiadający długości startera polimerazy DNA ¹⁵. Niektóre komórki, takie jak komórki macierzyste, progenitorowe, ale również nowotworowe charakteryzują się obecnością aktywnej telomerazy, która jest enzymem rybonukleoproteinowym zdolnym do odbudowywania skróconego końca 3' DNA ^{2,3}. Jednakże w większości komórek pierwotnych poziom aktywności telomerazy jest niewystarczający, żeby zapobiec skracaniu telomerów. Po prawie 30 latach od tych odkryć, dowiedziono, że obniżona aktywność telomerazy i krytycznie skrócone telomery, są przyczyną starzenia komórkowego związanego z wyczerpywaniem potencjału proliferacyjnego ^{12,16,17}.

Krytycznie skrócone telomery są rozpoznawane w komórce jako miejsca uszkodzenia DNA i w związku z tym prowadzą do aktywacji ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA damage response*), opisanej szczegółowo w podrozdziale 1.2. W efekcie dochodzi do aktywacji białka p53, które jest zaangażowane w zatrzymanie cyklu komórkowego oraz naprawę DNA. Zatrzymanie cyklu komórkowego jest możliwe dzięki indukcji zależnej od p53

transkrypcji genu kodującego inhibitor cyklinozależnych kinaz - p21^{Cip1/Waf1} (p21) ¹⁸. Tak rozpoczyna się pierwszy etap starzenia, który wiąże się z zatrzymaniem proliferacji.

1.1.2. Starzenie przyspieszone indukowane stresem (SIPS)

Chociaż starzenie komórkowe najczęściej kojarzone jest ze skracaniem telomerów, może ono wystąpić również po ekspozycji komórek na czynniki stresowe, takie jak reaktywne formy tlenu, promieniowanie czy też różne związki chemiczne, m.in. chemioterapeutyki. Stresory te nie powodują skracania telomerów, ale powodują dwuniciowe (DSBs, ang. *double strand breaks*) lub jednoniciowe (SSBs, ang. *single strand break*) pęknięcia DNA w losowych miejscach ¹⁹. Ten rodzaj starzenia określa się jako starzenie przyspieszone indukowane stresem (SIPS, ang. *stress-induced premature senescence*), które następuje w ciągu zaledwie kilku dni od zadziałania czynnika stresowego.

Szczególnym rodzajem starzenia przyspieszonego jest starzenie indukowane onkogenami (OIS, ang. *oncogene-induced senescence*). Pionierska praca opublikowana w 1997 roku ²⁰ dowiodła, że ekspresja onkogenu Ras (H-RASG V12) w fibroblastach prowadzi, wbrew przewidywaniom, do zatrzymania proliferacji i starzenia w przeciągu zaledwie tygodnia. W późniejszych latach wykazano, że aktywacja protoonkogenów, takich jak NRas, Raf czy BRAF, również może prowadzić do starzenia ²¹. Podobnie jak w przypadku aktywacji onkogenów, również mutacja w genach supresorowych nowotworu, na przykład PTEN, VHL czy NF-1, prowadząca do ich inaktywacji, indukuje starzenie komórkowe ^{22,23}.

Indukcja starzenia pod wpływem onkogenów zapobiega transformacji nowotworowej komórek ²⁰.

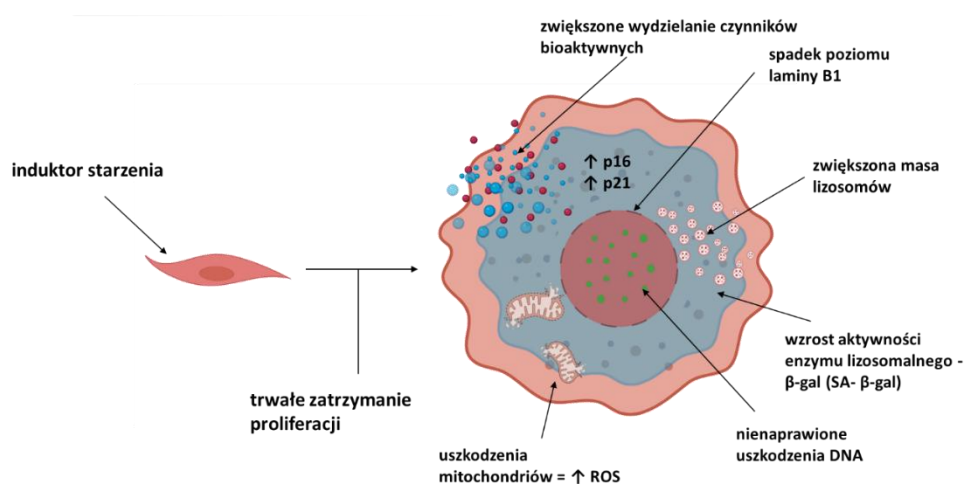
1.2. Markery starzenia

Odkrycie procesu starzenia niosło za sobą potrzebę identyfikacji komórek starych i odróżnienia ich od komórek proliferujących. Ciągłe zmiany zachodzące w komórkach starych uniemożliwiają rozpoznanie ich na podstawie tylko jednej cechy ²⁴. W związku z dużym zróżnicowaniem komórek starych naukowcy zwracają uwagę na konieczność wykorzystywania szeregu znaczników oraz metod pozwalających na poprawne zidentyfikowanie komórek starych ²⁵. Znaczniki/markery starzenia możemy podzielić na morfologiczne, molekularne

i funkcjonalne. Poniżej przedstawiono najczęściej wykorzystywane w badaniach cechy komórek starych (Ryc. 1.1).

Zmiana kształtu i rozmiaru komórki

W trakcie starzenia dochodzi do znaczących zmian w morfologii komórki. Ciało komórki powiększa się i rozpłaszcza²⁶. W powiększonych komórkach, na skutek rozcieńczenia cytoplazmy dochodzi do zmiany stosunku powierzchni do objętości oraz stosunku ilości DNA do cytoplazmy²⁷. W powiększających się komórkach dochodzi również do zwiększenia rozmiarów jądra komórkowego oraz mitochondriów²⁸. Wzrasta również objętość siateczki śródplazmatycznej oraz wakuol²⁹. Zwiększenie rozmiarów komórki może przyczyniać się do starzenia komórkowego^{27,30} i/lub być wynikiem tego procesu³¹. Zwiększeniu objętości komórki towarzyszą zmiany zachodzące w błonie komórkowej, która przechodząc szereg zmian organizacji charakteryzuje się większą sztywnością³². Zwiększona sztywność dotyczy również cytoszkieletu, gdzie modyfikacjom ulegają białka go budujące, takie jak aktyna i tubulina, których poziom w komórkach starych spada, czy wimentyna, której poziom w starzeniu rośnie³³⁻³⁵.



Ryc. 1.1. Schemat ilustrujący zmiany zachodzące w komórce po indukcji starzenia. Stara komórka charakteryzuje się powiększeniem i spłaszczeniem ciała. Wzrasta masa lizosomów oraz aktywność β -galaktozydazy związanej ze starzeniem. Dochodzi do akumulacji uszkodzonych mitochondriów, co prowadzi do zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu. Starzenie komórkowe prowadzi również do zmian w strukturze jądra komórkowego: spadku poziomu laminy B1 oraz wzrostu liczby nienaprawionych uszkodzeń DNA – DNA-SCARS (ang. *DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*). Komórki stare charakteryzują się także fenotypem wydzielniczym związanym ze starzeniem (SASP), w którego skład wchodzi szereg czynników bioaktywnych. Wykonano przy użyciu BioRender.com.

Obecność nienaprawionych uszkodzeń DNA i aktywacja szlaku odpowiedzi na te uszkodzenia

Uszkodzenia DNA, w tym pęknięcia dwuniciowe DNA (DSB, ang. *double strand DNA damage*) są jednym z podstawowych czynników prowadzących do starzenia. Stąd też aktywacja ścieżki odpowiedzi na te uszkodzenia jest powszechnie identyfikowana w komórkach ulegających starzeniu. Pierwszym etapem rozpoznania pęknięcia nici DNA jest tworzenie kompleksu białek MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), które rozpoznają miejsce uszkodzenia podwójnej nici DNA^{36,37}. Aktywują one kinazę ATM (ang. *ataxia-telangiectasia mutated*), która jest głównym regulatorem ścieżki odpowiedzi indukowanej uszkodzeniami DNA (DDR, ang. *DNA-damage response*)³⁸. Interakcja MRN/ATM w miejscach pęknięć wzmacnia aktywność kinazy ATM, umożliwiając jej fosforylację kilku substratów, w tym histonu H2AX w Ser 139 (γ H2AX). Stanowi to pierwszy etap rekrutacji kolejnych mediatorów ścieżki DDR, takich jak MDC1, 53BP1 i BRCA1, które gromadzą się jako ogniska w regionach megabazowych wokół pęknięć, ułatwiając ich naprawę^{39,40}. Kinaza ATM aktywuje kinazy punktu kontroli cyklu komórkowego, CHK1 i CHK2 (ang. *checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2*), które fosforylują białko p53, co prowadzi do jego aktywacji i ekspresji p21 - inhibitora kinaz zależnych od cyklin. W efekcie dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego, przez co komórka ma czas na naprawę uszkodzeń i wznowienie podziałów. Natomiast, kiedy uszkodzenia są zbyt liczne i/lub niemożliwe do naprawy, komórka ulega apoptozie lub przechodzi w stan trwałego zahamowania proliferacji - starzenia, z czym wiąże się wzrost poziomu białka p16^{INK4a} (p16), które podobnie jak p21 jest inhibitorem cyklu komórkowego. Oba białka hamują kinazy fosforylujące Rb, co zapobiega wejściu w fazę S komórki z uszkodzonym DNA. Zmiany poziomów białek odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego są wykorzystywane jako markery starzenia, a inhibitory kinaz cyklinozależnych, takie jak p16 i p21 należą do grupy klasycznych znaczników procesu starzenia.

Zwiększona masa lizosomów

Jedną ze zmian towarzyszących starzeniu komórkowemu jest wzrost masy lizosomów. Wzrost liczby tych organelli wiąże się z powszechnie identyfikowaną w starych komórkach zwiększoną aktywnością, ale również i poziomem jednego z enzymów lizosomalnych - SA- β -galaktozydazy (SA- β -gal, ang. *senescence-associated β -galactosidase*), która wykazuje aktywność w pH 6.0.

Choć enzym ten nie ma żadnego znaczenia w procesie starzenia to ocena podwyższonego poziomu jego aktywności jest podstawowym markerem starzenia ⁴¹.

Akumulacja dysfunkcyjnych mitochondriów i wzrost produkcji reaktywnych form tlenu

W komórkach starych dochodzi do akumulacji uszkodzonych mitochondriów, co daje możliwość wykorzystania tego zjawiska jako marker starzenia. W celu wizualizacji mitochondriów używa się najczęściej lipofilowego, fluorescencyjnego barwnika MitoTracker ^{42,43}. Dodatkowo za pomocą mikroskopii elektronowej można dokonać analizy kształtu i struktury mitochondriów, która w komórkach starych ulega znaczącym zmianom ⁴⁴.

Zmiany morfologii jądra komórkowego

W trakcie starzenia dochodzi też do znaczących zmian w strukturze jądra komórkowego. Dochodzi między innymi do spadku poziomu laminy B1 – białka otoczki jądrowej ⁴⁵. Obserwuje się również reorganizację chromatyny, spadek heterochromatyny oraz pojawianie się fragmentów chromatyny w cytoplazmie tzw. CCFs (ang. *cytoplasmic chromatin fragments*) ⁴⁶. Z drugiej strony, w niektórych typach starzenia dochodzi do tworzenia skupisk heterochromatyny związanej ze starzeniem, tzw. SAHFs (ang. *senescence-associated heterochromatic foci*), w których obecne są między innymi metylowane na lizynach białka histonowe H3K9me3 i H3K27me3 ⁴⁷. Reorganizacji ulega również jąderko - dochodzi do jego powiększenia i fragmentacji, również rośnie liczba i rozmiar ciałek jądrowych PML. Wszystkie te zmiany mają istotne znaczenie dla funkcjonowania komórki ulegającej starzeniu ⁴⁸.

Oporność na apoptozę

Jedną z istotnych cech komórek starych jest ich oporność na apoptozę, co sprawia, że mogą pozostawać w tkance przez dłuższy czas ⁴⁹. Wykazano, że obniżona podatność na programowaną śmierć komórki starej wynika z podwyższonego poziomu białek - inhibitorów apoptozy takich jak BCL-W, BCL-XL czy BCL-2. Obniżenie poziomu białek antyapoptotycznych poprzez użycie związków będących inhibitorami białek z rodziny BCL (np. ABT-737) zabija specyficznie komórki stare, co zostało wykorzystane w badaniach związanych z opracowywaniem strategii przeciwstarzeniowych ^{50,51}.

Należy podkreślić, że dynamika procesu starzenia i zróżnicowanie fenotypu komórek starych, uniemożliwia wybranie jednego uniwersalnego markera i wymusza konieczność wykorzystywania kombinacji różnych markerów oraz różnych technik ich wykrywania do identyfikacji komórek starych ^{22,25}.

1.3. Fenotyp sekrecyjny związany ze starzeniem, SASP (ang. *senescence-associated secretory phenotype*)

Niezwykle istotną cechą komórek starych jest ich fenotyp sekrecyjny, czyli zdolność do wydzielania zwiększonej ilości różnego rodzaju cząsteczek bioaktywnych mających znaczący wpływ na mikrośrodowisko ⁵². Składniki SASP mogą oddziaływać na komórki sąsiadujące poprzez aktywację szeregu receptorów powierzchniowych i aktywować szlaki sygnałowe prowadzące do określonej i bardzo różnorodnej, w zależności od kontekstu, odpowiedzi komórkowej. Składniki fenotypu sekrecyjnego można podzielić na dwie główne grupy: czynniki rozpuszczalne (np. interleukiny, chemokiny, czynniki wzrostu, enzymy modyfikujące macierz zewnątrzkomórkową) oraz nierozpuszczalne (pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, białka nierozpuszczalne oraz fragmenty macierzy zewnątrzkomórkowej) ⁵³. Dodatkowo do składników SASP można zaliczyć również ceramidy, czynniki hemostatyczne, bradykininy oraz cząsteczki sygnałowe związane z uszkodzeniem (DAMPs, ang. *damage-associated molecular patterns*) ^{54,55}.

Jednymi z najpowszechniej badanych składników SASP są cytokiny prozapalne, którym przypisuje się udział w powstawaniu chronicznego stanu zapalnego towarzyszącego starzeniu organizmu. Pośród licznych cytokin szczególną rolę odgrywa IL-1 α , która stymuluje produkcję czynników SASP. Przecięta przez kaspazę 5 lub 11, interleukina 1 α , może aktywować transkrypcję innych prozapalnych czynników SASP, dzięki przemieszczaniu się z powierzchni komórki do jądra komórkowego ^{56,57}. Wykazano również, że IL-1 α i IL-1 β mogą być wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, aktywując IL-6 i IL-8. One z kolei oddziałują na komórkę starą, przez którą są wydzielane i wzmacniają blokadę proliferacji. Interleukiny 6 i 8, działając parakrynnie, indukują starzenie komórek sąsiadujących i przyczyniają się do rozprzestrzeniania tego stanu w komórkach młodych. Podobny efekt „rozsiewania” starzenia komórkowego na komórki niepoddane działaniu czynnika indukującego starzenie wywołują również inne składniki SASP, takie jak: czynniki wzrostu - TGF- β , VEGF, IGFBP-7 oraz chemokiny

- CCL2 i CCL20, co pokazano w różnych modelach starzenia. IL-6 i IL-8 pośredniczą również w indukcji odpowiedzi immunologicznej, co jest istotnym elementem oddziaływania komórek starych na mikrośrodowisko tkankowe⁵⁸⁻⁶⁰.

Ostatnie badania donoszą, iż składnikami fenotypu sekrecyjnego są również leukotrieny i prostaglandyny. Leukotrieny stanowią element SASP, który promuje stan zapalny i zwłóknienie tkanki przyczyniając się do rozwoju chorób związanych z wiekiem, takich jak osteoporoza⁶¹ oraz idiopatyczne zwłóknienie płuc⁶². Z kolei prostaglandyny wydzielane przez komórki stare przeciwdziałają stanowi zapalnemu wspomagając gojenie ran skóry, regenerację uszkodzeń nerek i miokardium oraz przeciwdziałając zwłóknieniu płuc^{63,64}.

1.3.1. Mechanizmy wzmożonej produkcji czynników SASP

Dynamika zmian i złożoność fenotypu sekrecyjnego związanego ze starzeniem obrazuje różnorodność funkcji biologicznych procesu starzenia. Zestaw wydzielanych przez stare komórki białek zależy od takich czynników jak rodzaj komórek, czas od indukcji starzenia czy rodzaj induktora. Nie dziwi zatem fakt, że istnieje szereg mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wzmożoną produkcję czynników SASP.

Do najważniejszych ścieżek sygnałowych oraz białek zaangażowanych w regulację SASP należą: ścieżka DDR oraz czynnik transkrypcyjny NF- κ B, ścieżki p53-p21 i p16-Rb, ścieżki związane z kinazami p38 MAPK i mTOR oraz ścieżka cytozolowa DNA-cGAS-STING.

Głównym regulatorem ekspresji wielu różnych składników fenotypu sekrecyjnego jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach starych wiąże się z uszkodzeniami DNA i aktywowaną w odpowiedzi na nie ścieżką DDR, w której pośredniczą kinazy ATM, CHK2 i ATR, jak również białko PARP1 (ang. *poly [ADP-ribose] polymerase 1*), biorące udział w naprawie DNA. Oprócz wyżej wymienionych białek, aktywowanych w odpowiedzi na uszkodzenia DNA również inne, niezależne od obecności uszkodzeń DNA, białka pełnią rolę w aktywacji NF- κ B. Należą do nich białka powierzchniowe CD36 oraz CD40L^{65,66} oraz kinaza MAP p38, której udział w aktywacji NF- κ B prowadzącej do wzrostu ekspresji czynników SASP, niezależnej od uszkodzeń DNA, potwierdzono już na początku badań fenotypu sekrecyjnego komórek starych⁶⁷.

W regulację wydzielania czynników SASP zaangażowane są również ścieżki p53-p21 i p16-Rb. Białko p53, choć uczestniczy w indukcji starzenia, hamuje SASP. Wykazano, że obniżenie poziomu p53 w starych fibroblastach powoduje wzrost poziomu wydzielanych cytokin, natomiast stabilizacja i aktywacja p53 działa odwrotnie ^{56,68}.

Udział ścieżki p16-Rb w regulacji SASP wykazano wykorzystując nadekspresję p16 lub długotrwałe traktowanie inhibitorami CDK4 lub CDK6. W tych warunkach dochodzi do indukcji starzenia bez uszkodzeń DNA i bez wydzielania czynników prozapalnych, ale z unikalnym, zależnym od p53 profilem SASP, który zawiera między innymi białka wiążące się z IGF - IGFBP3 oraz białka ścieżki interferonu - ISG15 ^{69,70}. Zarówno białko p21, jak i p16 wpływają też bezpośrednio na SASP. Wykazano, że p21 wspomaga SASP na wczesnym etapie sekrecji, przyczyniając się do zwiększonego wydzielania CXCL14 i IGFBP3 ⁷¹. Z kolei obniżenie poziomu p16 zmniejsza ekspresję *IL6* i *CXCL8* w różnych modelach eksperymentalnych ⁷².

Oprócz kinazy p38 również kinaza mTOR jest jednym z kluczowych regulatorów SASP, w szczególności jego prozapalnych elementów. mTOR wpływa na zwiększoną translację IL-1 α , a w konsekwencji zwiększoną aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz wpływa na stabilizację transkryptów wybranych składników SASP w tym również IL-1 α . Zastosowanie rapamycyny, która po związaniu się do receptora FKBP12 hamuje działanie kinazy mTOR, obniża SASP ⁷³.

Ścieżka aktywowana cytozolem DNA, w której uczestniczą białka cGAS-STING reguluje SASP w odpowiedzi na działanie interferonu. Wykazano, że w komórkach starych dochodzi do obniżenia poziomu deoksyrybonukleazy 2 (DNASE2, ang. *deoxyribonuclease 2*), co wpływa na obniżoną degradację, a przez to akumulację fragmentów DNA w cytoplazmie w formie tak zwanych cytoplazmatycznych fragmentów chromatyny (CCFs). Prowadzi to do aktywacji ścieżki cGAS-STING ⁷⁴, i dzięki białkom TOP1cc i G3BP1, pozwala na rozpoznanie CCFs i produkcję składników SASP ^{74,75}. Również uszkodzone w trakcie starzenia mitochondria są źródłem uwalnianego do cytoplazmy mtDNA, które działa podobnie do CCFs aktywując ścieżkę cGAS-STING ^{76,77}.

Biorąc pod uwagę różnorodność składu SASP wynikającą między innymi z różnorodnych, często wzajemnie powiązanych ścieżek regulujących ekspresję komponentów SASP,

oczywistym jest fakt pleiotropowego efektu działania SASP, który jest bardzo uzależniony od kontekstu tkankowego. Choć część tych efektów jest bez wątpienia korzystna dla organizmu, jak na przykład udział w gojeniu się ran ⁷⁸, przeprogramowaniu komórek w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki ⁷⁹ czy aktywacji komórek układu odpornościowego, to jednak w badaniach związanych ze starzeniem częściej koncentrujemy się na niepożądanych skutkach wzmożonej sekrecji będącej następstwem gromadzących się wraz z wiekiem w tkankach komórek starych. Starzeniu organizmu towarzyszy tzw. chroniczny stan zapalny, który określamy jest w literaturze terminem *inflammaging* ⁸⁰. *Inflammaging* jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi wszystkich chorób związanych z wiekiem. Jedną z przyczyn obserwowanego chronicznego stanu zapalnego rozwijającego się u osób starszych są zaburzenia w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Obecnie istnieją też jednoznaczne dowody naukowe, że drugim czynnikiem zwiększającym zapalenie są czynniki wydzielane przez komórki stare. Wykazano na przykład, iż usunięcie komórek starych redukuje poziom prozapalnych cytokin u starych myszy ⁸¹. Dodatkowo badania opublikowane przez grupę Xu, dowodzą, iż przeszczep już niewielkiej liczby komórek starych młodym myszom nasila stan zapalny oraz powoduje dysfunkcyjne zmiany w organizmie. Wykazano również, że usunięcie komórek starych prowadzi do obniżenia poziomu stanu zapalnego ⁸².

1.4. Udział komórek VSCM w rozwoju blaszki miażdżycowej

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą tętnic, stanowiącą główną przyczynę chorób układu sercowo-naczyniowego i zgonów w krajach rozwiniętych. Istotną rolę w jej rozwoju odgrywają komórki mięśni gładkich naczyń (VSMC, ang. *vascular smooth muscle cells*), które stanowią główny składnik błony środkowej naczyń i uczestniczą w przebudowie ściany naczynia podczas rozwoju miażdżycy ⁸³.

1.4.1. Powstawanie i rozwój blaszki miażdżycowej

Proces miażdżycowy rozpoczyna się od uszkodzenia lub utraty integralności śródbłonna, wywołanej m.in. hiperlipidemią lub nadciśnieniem. Prowadzi to do zwiększonej przepuszczalności naczyń, napływu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *low density lipoprotein*) pod warstwę śródbłonna oraz ich oksydacji. Utlenione LDL (oxLDL) indukują stres oksydacyjny i reakcję zapalną, co powoduje rekrutację monocytów i ich różnicowanie

w makrofagi. Te z kolei fagocytują lipidy, tworząc komórki piankowe — wczesny element blaszki miażdżycowej^{84,85}.

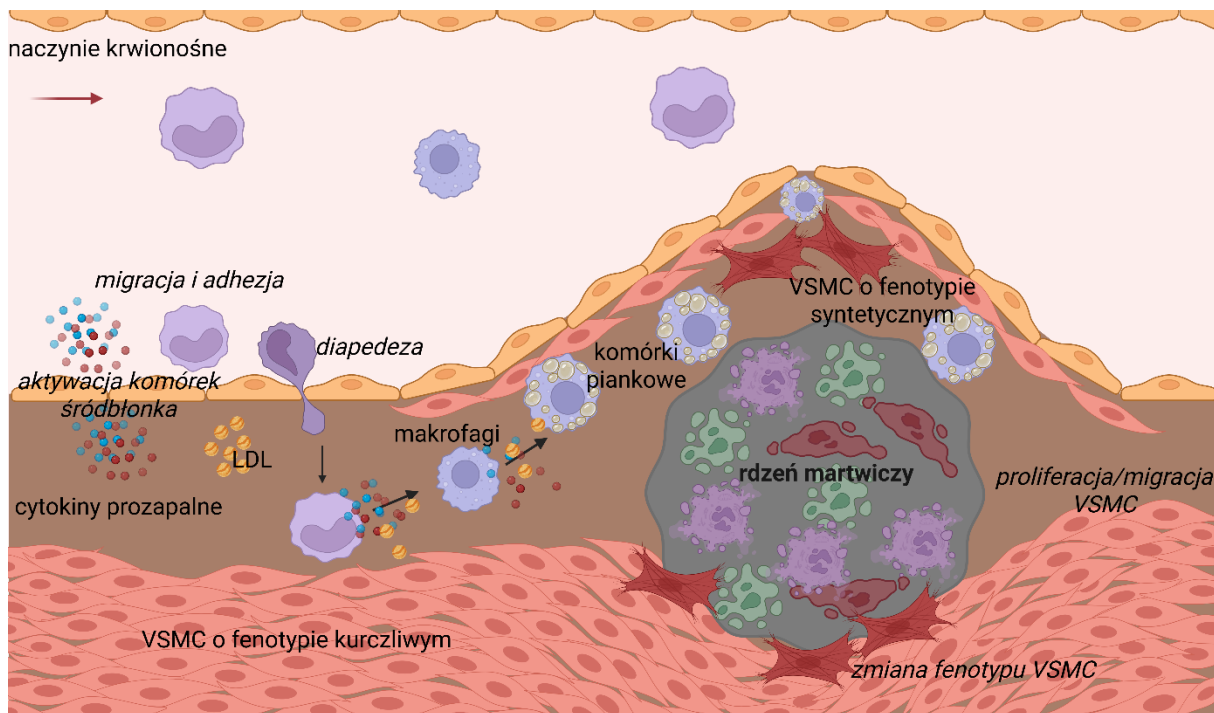
Uszkodzenie śródbłonna i aktywacja komórek zapalnych prowadzą do zwiększenia ekspresji cząsteczek adhezyjnych, takich jak VCAM-1 i ICAM-1, oraz obniżenia syntezy tlenu azotu (NO), co sprzyja skurczowi naczyń i rozwojowi środowiska prozapalnego⁸⁶. Komórki układu odpornościowego, w tym makrofagi, limfocyty T, komórki dendrytyczne, tworzą złożoną sieć interakcji, równoważąc procesy zapalne i naprawcze⁸⁷.

Makrofagi typu M1, dominujące w obszarach bogatych w lipidy, wydzielają cytokiny prozapalne (IL-6, IL-1 β , TNF), podczas gdy makrofagi M2, obecne w bardziej stabilnych obszarach, wydzielają cytokiny przeciwzapalne (np. IL-10)^{88,89}.

1.4.1.1. Budowa i stabilność blaszki miażdżycowej

Dojrzała blaszka miażdżycowa składa się z komórek VSMC, włókien kolagenowych i elastynowych, komórek układu odpornościowego, lipidów oraz martwiczego rdzenia otoczonego włóknistą czapeczką, zlokalizowanych pomiędzy pojedynczą warstwą komórek śródbłonna a błoną środkową tętnicy⁹⁰ (Ryc. 1.2).

Ze względu na budowę wyróżnia się blaszki stabilne i niestabilne⁹¹. Blaszki stabilne charakteryzują się grubą czapeczką włóknistą, niewielkim rdzeniem lipidowym i obecnością złogów wapnia, co zwiększa ich odporność mechaniczną i zmniejsza ryzyko pęknięcia⁹¹. Natomiast niestabilne blaszki mają cienką czapeczkę, wykazują oznaki krwawienia wewnątrzblaszkowego i są podatne na pęknięcie⁹². W wyniku pęknięcia blaszki miażdżycowej dochodzi do uwolnienia do światła naczynia materiału trombogenicznego i powstania skrzepu. Skrzep, po oderwaniu od powierzchni blaszki miażdżycowej może być przyczyną zawału serca lub udaru — jednych z najbardziej niebezpiecznych zdarzeń będących konsekwencją miażdżycy⁹³.



Ryc. 1.2. Rozwój blaszki miażdżycowej. Zmiany miażdżycowe rozwijają się w miejscu uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, prowadząc do zwiększenia ekspresji cząsteczek ułatwiających migrację i adhezję leukocytów. Komórki mięśni gładkich (VSMC) proliferują i migrują do zmiany, ulegając zmianie fenotypu z kurczliwego na syntetycznych. W odpowiedzi na bodźce proaterogenne w ścianie naczynia, makrofagi przekształcają się w komórki piankowe obciążone lipidami, które znacząco przyczyniają się do progresji zmiany. Zmodyfikowano w Biorender.com na podstawie Vartak, 2022 ³¹¹.

1.4.1.2. Rola wapnienia i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)

Wraz z postępowaniem choroby w obrębie blaszki dochodzi do odkładania wapnia. Wapnienie tętnic rozpoczyna się od powstawania mikrozwapnień, które następnie przekształcają się w większe złogi wapniowe ⁹⁴. Wczesne mikrozwapnienia mogą wynikać z apoptozy komórek VSMC, które wydzielają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) o składzie przypominającym pęcherzyki chondrocytów, inicjujące mineralizację ⁹⁵. Komórki VSMC o fenotypie syntetycznym wydzielają EVs o wysokim potencjale prokalcyfikacyjnym, co sprzyja wapnieniu naczyń ^{96,97}.

1.4.1.3. Fenotypowa plastyczność VSMC

Komórki VSMC w zdrowych naczyniach wykazują fenotyp kurczliwy, charakteryzujący się niską proliferacją i utrzymaniem integralności ściany naczynia. Jednak w odpowiedzi na stres, uszkodzenie lub czynniki zapalne, mogą ulegać przejściowej konwersji do fenotypu syntetycznego ⁹⁸. Fenotyp syntetyczny cechuje się utratą ekspresji markerów kurczliwości i wzrostem ekspresji genów prozapalnych oraz metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej,

co zwiększa migrację, proliferację i wydzielanie cytokin⁹⁹. Zmiana fenotypu ma znaczenie adaptacyjne, wspierając naprawę uszkodzeń naczyń, jednak przewlekła aktywacja tego procesu przyczynia się do rozwoju miażdżycy i wapnienia naczyń.

1.4.1.4. Starzenie komórkowe a stabilność w blaszki miażdżycowej

W trakcie rozwoju blaszki miażdżycowej dochodzi do starzenia komórek VSMC. Wykazano, że komórki pochodzące ze starych naczyń lub zaawansowanych blaszek miażdżycowych wykazują wydłużony czas podwojenia populacji, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 oraz zwiększoną ekspresję białek p16 i p21, a także aktywność β -galaktozydazy związanej ze starzeniem¹⁰⁰⁻¹⁰². Ten ograniczony potencjał proliferacyjny komórek VSMC odgrywa istotną rolę w zmniejszonej zdolności do naprawy uszkodzonej blaszki zwiększając tym samym prawdopodobieństwo jej pęknięcia. Ponadto stare komórki poprzez wydzielanie różnorodnych cytokin prozapalnych oraz chemokin podtrzymują stan zapalny w blaszce miażdżycowej oraz przyczyniają się do wzmożonej rekrutacji komórek układu odpornościowego. Starzenie VSMC przyspiesza zatem progresję miażdżycy i zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzeń neurologicznych oraz sercowych⁹⁰.

1.5. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

W ostatnich latach zainteresowanie pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (EVs, ang. *extracellular vesicles*) znacząco wzrosło, a liczba publikacji ich dotycząca gwałtownie rośnie od 2010 roku¹⁰³. Jednak odkrycia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych dokonano już w drugiej połowie lat 40. XIX w., kiedy to Erwin Chargaff i Randolph West zaobserwowali, iż ze wirowanego przy dużej prędkości (31 000xg) osocza można wyizolować cząstki tworzące pelet¹⁰⁴. Pod koniec lat 60. ubiegłego wieku Peter Wolf w swojej publikacji nazwał je „pyłem płytkowym”¹⁰⁵, a Webber i Johnson odkryli, że ziarnistości alfa (*α -granules*), które zawierają różne czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny oraz czynniki krzepnięcia^{106,107} są przekształcane w pęcherzyki, które uwalniane są na zewnątrz komórki¹⁰⁸. W roku 1983 po raz pierwszy wykazano, że pęcherzyki są uwalniane przez retikulocyty i są nośnikami receptora dla transferyny. Badane pęcherzyki zdefiniowano jako egzosomy, uznając iż pełnią one rolę w usuwaniu badanego receptora w trakcie dojrzewania retikulocytów¹⁰⁹. Te pionierskie i, jak po latach stwierdziła Johnstone, częściowo przypadkowe¹¹⁰ badania, położyły podwaliny pod

przyszłe prace naukowe poświęcone pęcherzykom zewnątrzkomórkowym, które stanowią ogólną nazwę tej heterogenicznej grupy. Dzisiaj wiadomo, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pośredniczą w komunikacji międzykomórkowej na poziomie lokalnym oraz na poziomie całego organizmu i są wydzielane przez większość typów komórek, zarówno prawidłowych, jak i nowotworowych ¹¹¹. Wyizolować je można z płynów ustrojowych takich jak krew, surowica, mocz, ślina czy mleko ¹¹². Obecne są również w tkankach oraz w mediach wykorzystanych do hodowli komórkowej.

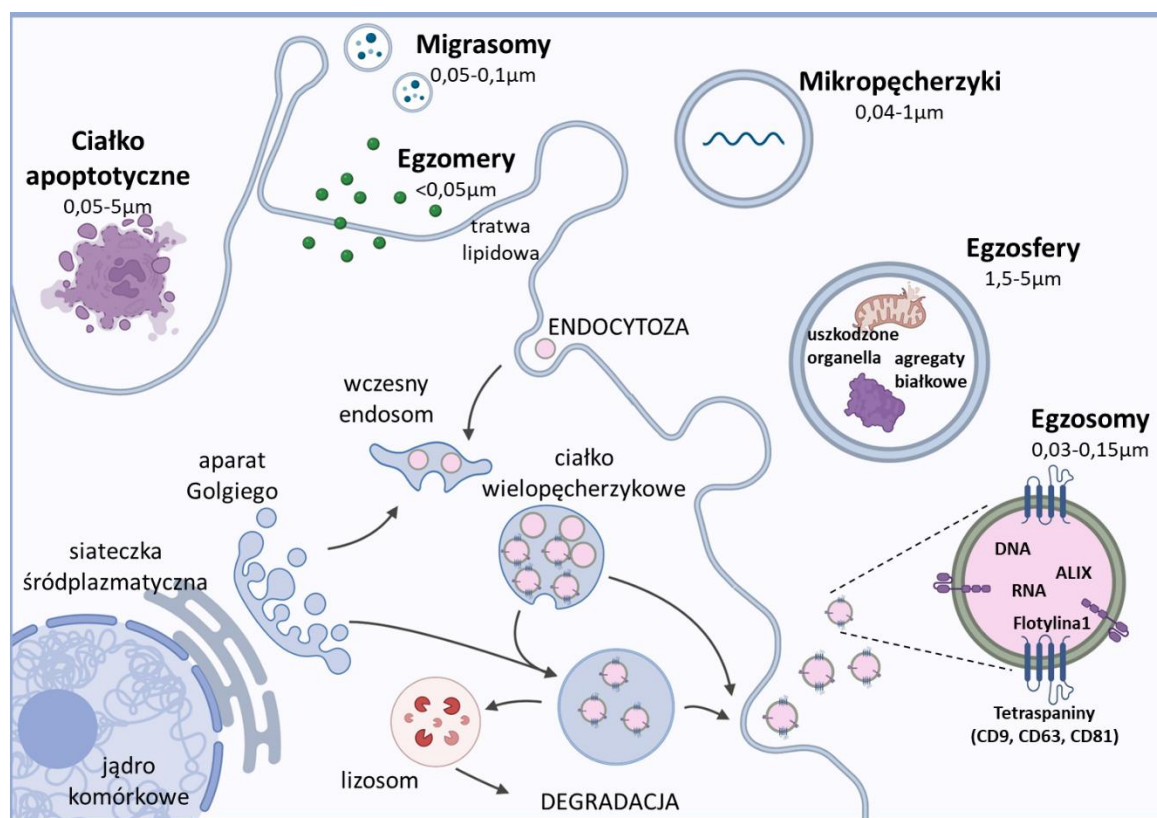
1.5.1. Klasyfikacja, biogeneza i wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Powstałe w 2011 roku stowarzyszenie ISEV (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*) definiuje EVs jako cząstki wydzielane przez komórki, otoczone dwuwarstwą lipidową, które nie są zdolne do samodzielnej replikacji. W grupie tej wyróżnia się kilka subpopulacji różniących się biogenezą (egzosomy, mikropęcherzyki, ciała apoptotyczne), zawartością (onkosomy, pęcherzyki macierzy, migrasomy) oraz wielkością (małe EVs i duże EVs) ¹¹³. Egzosomy (wielkość 50-150 nm) pochodzą z dojrzałych endosomów, które ulegają fuzji z błoną komórkową i uwalniają swoją zawartość do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Mikropęcherzyki powstają z uwypuklenia błony komórkowej na zewnątrz i uwolnienia pęcherzyka (wielkość ~ 150-1000 nm). Ciała apoptotyczne powstają w procesie programowanej śmierci komórki jako obłonione fragmenty umierającej komórki (wielkość 1-10 µm). Jest to najbardziej klasyczny podział, który pozwala na jednoznaczne odróżnienie określonej grupy EVs na podstawie ich biogenezy, jednak jednoznaczne ich rozróżnienie w oparciu o wielkość jest praktycznie niemożliwe, gdyż przypisywane im zakresy wielkości są jedynie orientacyjne, pokrywając się częściowo dla poszczególnych kategorii EVs ¹¹⁴ (Ryc. 1.3).

Dzisiaj wiadomo już, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pełnią rolę mediatorów komunikacji międzykomórkowej ¹¹⁵⁻¹¹⁷. Biorą udział w odpowiedzi immunologicznej, na przykład poprzez prezentację kompleksów MHC klasy I limfocytom T ^{118,119}, a grupa Lötvalla w 2007 wykazała obecność mRNA i miRNA w egzosomach. Wybrane mRNA obecne w EVs mogą być tłumaczone na białka w komórkach docelowych, co sugeruje transfer informacji genetycznej ¹²⁰.

Ze względu na istotne znaczenie biologiczne wynikające z bardzo różnorodnego ładunku, grupą pęcherzyków, która budzi największe zainteresowanie są egzosomy. Egzosomy

pochodzą ze szlaku endosomalnego, gdzie formowane są jako pęcherzyki wewnątrz-endosomalne (ILVs, ang. *intraluminal vesicles*), poprzez wgłębienie błony endosomu. Podczas tego procesu białka cytozolowe, kwasy rybonukleinowe i lipidy są sortowane do tych małych struktur. Późne endosomy zawierające wiele ILVs nazywane są ciałkami wielopęcherzykowymi (MVBs, ang. *multivesicular bodies*). Mogą one łączyć się z lizosomami, jeśli ich zawartość przeznaczona jest do degradacji lub łączyć się z błoną komórkową, uwalniając ILVs do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako egzosomy ¹²¹.



Ryc. 1.3. Rodzaje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki. Ilustracja przedstawia ogólną charakterystykę różnych subpopulacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Przedstawiono również markery egzosomów. Rycinę zmodyfikowano na podstawie Aafreen, 2023 ³¹².

Formowanie się ILVs w obrębie MVBs wymaga dwóch odrębnych procesów. W pierwszym, błona endosomu ulega reorganizacji poprzez wzbogacenie w tetraspaniny – białka odpowiedzialne między innymi za selektywną rekrutację białek do ILVs, z których za kluczowe uważa się CD9, CD63 oraz CD81 ^{122,123}. W drugim natomiast, w miejscu formowania się ILVs, rekrutowane są endosomalne kompleksy sortujące (ESCRT, ang. *endosomal sorting complex required for transport*) ¹²⁴. Zidentyfikowano cztery różne kompleksy, które kolejno biorą udział w tworzeniu MVBs, są to: ESCRT 0, I, II oraz III. ESCRT 0 rozpoznaje ubikwitynowane białka na

zewnątrz błony endosomu i inicjuje pączkowanie do wewnątrz. Kompleks ESCRT I oraz ESCRT II są rekrutowane do zewnętrznej strony błony endosomu i razem tworzą kompleks w kształcie siodła, który jest niezbędny do rekrutacji ESCRT III ¹²⁵. Po hydrolizie ATP przez VPS4 (ang. *vacuolar protein sorting-associated protein 4*), podjednostki ESCRT III ulegają polimeryzacji i powodują deformację i rozszczepienie błony endosomu, co ostatecznie prowadzi do powstania ILVs ¹²⁶. Znany jest również szlak niezależny od ESCRT, w którym dzięki obecności ceramidów powstałych w wyniku hydrolizy sfingomieliny przez nSMase2 (neutralna sfingomielinaza 2) dochodzi do wpuklenia błony endosomu co prowadzi do powstania ILVs ¹²⁷.

Obecność kilku szlaków prowadzących do wytworzenia ILVs wpływa na sortowanie i pakowanie określonego ładunku do ich wnętrza ¹²⁸. Co istotne, białka związane z kompleksami ESCRT (np. TSG101, Alix), jak też tetraspaniny (CD9, CD63 oraz CD81) uczestniczące w formowaniu ILVs, są powszechnie wykorzystywane jako markery egzosomów ¹²⁹.

Materiał, który jest sortowany do MVBs zależy od stanu w jakim znajduje się komórka, a profile wydzielanych egzosomów zmieniają się dynamicznie, co wskazuje na wysoką selektywność i ścisłą regulację ¹³⁰. Białka mogą być sortowane poprzez różnorodne ścieżki, wiele z nich jest sortowanych poprzez bezpośrednią interakcję z ESCRT lub niezależną (jak opisano to wyżej). RNA jest sortowane dzięki obecności białek wiążących RNA (RBPs, ang. *RNA-binding proteins*) ¹³¹.

Dalsza droga MVBs w komórce zależy w głównej mierze od białek z rodziny Rab, które związane są z błonami różnych organelli. Główne białka transportujące pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to Rab7, Rab11, Rab27 oraz Rab35. Rab7 kieruje MVBs do degradacji biorąc udział w ich transporcie do lizosomów, gdzie dzięki zawartości enzymów hydrolitycznych są one strawione. Rab11 jest odpowiedzialne za kierowanie MVBs w pobliże błony komórkowej, a Rab27 oraz Rab35 pośredniczą w dokowaniu i fuzji MVBs z błoną komórkową, co ostatecznie wiąże się z uwolnieniem ich zawartości i od tego momentu ILVs stają się egzosomami ^{132,133}. Ostatnim kluczowym elementem uwalniania zawartości ciałek wielopęcherzykowych są białka z rodziny SNARE, które pośredniczą w rozpoznaniu i fuzji pęcherzyka z błoną komórkową.

Ciałka wielopęcherzykowe (MVBs) mogą również ulegać fuzji z autofagosomami, w wyniku czego powstaje nowe organelum komórkowe, zwane amfisomem ¹³⁴. Podobnie jak w powyższych procesach, do fuzji potrzebne są białka SNARE, GTPazy Rab oraz kompleksy ESCRT. Amfisomy stanowią połączenie ścieżki autofagicznej ze ścieżką endosomalną ¹³⁵. Te z kolei, w celu degradacji materiału znajdującego się wewnątrz, łączą się z lizosomami ^{136,137}. Nie jest to jednak jedyna droga na jaką mogą być skierowane. Część badań sugeruje wydzielniczą rolę amfisomów. Wykazano, że w komórkach kubkowych jelit, amfisomy zaangażowane są w wydzielanie śluzu co zapewnia ochronę przed drobnoustrojami jelitowymi ¹³⁸, a w komórkach nabłonka płuc stymulowanych interferonem- γ pozwala na sekrecję aneksyny A2 ¹³⁹. Inne badania pokazują, iż amfisomy mogą pośredniczyć w sekrecji interleukiny- 1β ¹⁴⁰.

Komórki pobierają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe poprzez fuzję z błoną komórkową lub poprzez endocytozę. Wchłanianie przez endocytozę można podzielić na endocytozę zależną od klatryn, endocytozę zależną od kaweoliny, makropinocytozę oraz fagocytozę. Sposób pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zależy od rodzaju oraz stanu fizjologicznego komórki, od zgodności ligandów obecnych na EVs z receptorami na powierzchni komórki ¹⁴¹. Komórki w większości przypadków pobierają egzosomy z przestrzeni pozakomórkowej w niespecyficzny sposób, jednak obecność specyficznych białek na powierzchni EVs oraz ich zawartość sprawiają, że wpływają one w określony sposób na komórkę pobierającą pęcherzyki ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Uwalnianie oraz wydajność wychwytu egzosomów są uzależnione między innymi od rodzaju komórek, pH i temperatury ^{145,146}.

1.5.2. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako element fenotypu sekrecyjnego komórek starych

Choć egzosomy, a szerzej EVs, zostały opisane już wiele lat temu to wykazanie, że stanowią one również istotny element fenotypu sekrecyjnego komórek starych nastąpiło dopiero w roku 2008. Lehmann i wsp. zaobserwowali zwiększoną liczbę EVs wydzielanych przez starzejące się komórki raka prostaty, co więcej, opisali oni również różnicę w składzie pęcherzyków wydzielanych przez proliferujące i stare komórki ¹⁴⁷. Późniejsze badania prowadzone na fibroblastach poddanych starzeniu indukowanemu onkogenami oraz terapią (napromieniowaniem) i fibroblastach ulegających starzeniu replikacyjnemu wskazują, że

podobnie jak w przypadku rozpuszczalnych składników sekretomu, zwiększa się sekrecja EVs przez komórki stare ^{54,148–152}.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki stare mogą pełnić różnorodne funkcje zależne od kontekstu biologicznego. Wykazano, że białka obecne w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wydzielonych przez starzejące się komórki nabłonka barwnikowego siatkówki oraz fibroblasty, powodowały wzrost proliferacji komórek raka piersi MCF-7, a usunięcie tych pęcherzyków z medium hodowlanego osłabiało potencjał proliferacyjny komórek, co sugeruje, że EVs mogą wspierać wzrost nowotworu ¹⁵¹. Uważa się, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, a nie tylko czynniki rozpuszczalne SASP, pośredniczą w przekazywaniu między fibroblastami sygnałów prowadzących do starzenia. Wykazano, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko IFITM3 (indukowane interferonem transbłonowe białko 3), które może prowadzić do indukcji ekspresji p16 w komórkach sąsiadujących. Ponadto zahamowanie wydzielania EVs ograniczało „rozprzestrzenianie” się starzenia ¹⁴⁸. Podobną prostarzeniową funkcję przypisano również EVs wydzielanym przez starzejące się komórki śródbłonka. EVs te transportują miR-21 i miR-217, które wpływały na ekspresję metylotransferazy 1 (DNMT1) oraz deacetylazy (SIRT1) prowadząc do obniżenia proliferacji i indukcji starzenia ¹⁵⁰. Z kolei EVs wydzielane przez stare fibroblasty przyspieszają zarastanie rasy w hodowli keratynocytów. Za obserwowany efekt odpowiedzialne był obecny w pęcherzykach miR-23a-3p ¹⁵³. Oprócz regulatorowych kwasów nukleinowych w EVs może też występować DNA. Dowiedziono, że komórki, za pośrednictwem EVs mogą usuwać uszkodzone DNA, a zahamowanie sekrecji EVs prowadzi do akumulacji uszkodzonego DNA w komórce, o czym świadczył podwyższony poziom histonu γ H2AX, który jest markerem uszkodzeń DNA. Badania te dowodzą, iż EVs wspomagają utrzymanie homeostazy komórkowej zarówno w trakcie starzenia, jak i w komórkach, które nie uległy starzeniu ¹⁵⁴. To tylko niektóre funkcje przypisywane EVs wydzielanym przez komórki stare.

1.5.3. Rola pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w rozwoju miażdżycy

Choć naukowcy nie są zgodni co do zmian poziomu wydzielania EVs wraz z wiekiem, jednakże pewnym jest, że skład pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ulega zmianie wraz ze starzeniem organizmu ¹⁵⁵. Wykazano jednak, że u pacjentów cierpiących na miażdżycę wzrasta poziom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych obecnych w surowicy, co może być powiązane

z rozwojem tej choroby ¹⁵⁶. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wpływają na procesy biologiczne w powstającej blaszce miażdżycowej, takie jak stan zapalny śródbłonna, aktywacja makrofagów, zmiany fenotypu komórek mięśni gładkich naczyń, angiogeneza, zakrzepica oraz pęknięcie blaszki. Ten plejotropowy efekt działania EVs wiąże się z ich różnorodnym pochodzeniem. Obecnie wiadomo, że w blaszce miażdżycowej EVs są wydzielane przez różne komórki, takie jak neutrofile, monocyty, płytki krwi, makrofagi, komórki budujące ścianę naczynia a nawet hematocyty. Można również zaobserwować EVs pochodzące z tkanki kostnej. Działanie EVs jest zróżnicowane - zarówno sprzyjające rozwojowi miażdżycy, jak i ją hamujące. Wydaje się, że negatywny efekt wywierają przede wszystkim EVs wydzielane przez komórki, które uległy patologicznym zmianom w trakcie rozwoju choroby, podczas gdy EVs pochodzące ze zdrowych komórek, takich jak prawidłowo funkcjonujące komórki śródbłonna czy też mezenchymalne komórki macierzyste, spowalniają rozwój choroby ¹⁵⁷.

Śródbłonek naczyń odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy naczyniowej, regulując przepływ krwi, napięcie naczyń, selektywny transport cząsteczek i wpływa na komórki układu odpornościowego ¹⁵⁸. Przez bezpośredni kontakt z przepływającą krwią, komórki śródbłonna narażone są na uszkodzenia, które upośledzają ich funkcje i stanowią fundament rozwoju blaszki miażdżycowej ¹⁵⁹. Badania *in vitro* sugerują, że EVs pochodzące z różnych typów komórek mogą oddziaływać na śródbłonek naczyń i sprzyjać jego dysfunkcji, między innymi powodując zmniejszoną produkcję tlenku azotu (NO), co z kolei prowadzi do skurczu naczyń krwionośnych i wzrostu ciśnienia ^{160,161}. Wykazano, że EVs indukują dysfunkcję śródbłonna, stan zapalny i proliferację komórek poprzez transport miRNA. Wiele badań pokazało, że EVs zwiększają uwalnianie prozapalnych cytokin z komórek śródbłonna oraz leukocytów, a w szczególności IL-6 i IL-8, co sprzyja adhezji monocytów oraz ich migracji do blaszki miażdżycowej ¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Badania *in vitro* wykazały, że pochodzące z komórek śródbłonna EVs zwiększają tropizm monocytów oraz przekształcanie ich w komórki piankowe ¹⁶⁵. Co więcej, EVs pochodzące z innych tkanek mogą znacząco wpływać na tworzenie się komórek piankowych. Wykazano, że taki efekt wywierały EVs wydzielone przez aktywowane limfocyty T ¹⁶⁶. Badania przeprowadzone przez Chen i współpracowników wykazały, że EVs pochodzące ze

stłuszczonych hepatocytów wzbogacone są w miR-30-3p, przyczyniają się do akumulacji cholesterolu w makrofagach i przekształcaniu ich w komórki piankowe ¹⁶⁷.

W prawidłowo funkcjonujących naczyniach komórki mięśni gładkich utrzymują odpowiednią kurczliwość naczyń oraz biorą udział w ich przebudowie. Wszystko to przez fenotyp kurczliwy jakim się charakteryzują. W trakcie rozwoju miażdżycy fenotyp komórek mięśni gładkich ulega zmianie z kurczliwego na syntetyczny. Zmianie fenotypu towarzyszy zwiększona proliferacja i zdolność do migracji. Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe pochodzące z komórek piankowych, które powstały z makrofagów mogą promować migrację i adhezję VSMC poprzez transfer miR-146a ¹⁶⁸.

Chorobom sercowo-naczyniowym często towarzyszy zwapnienie naczyń, które może przyczyniać się do niestabilności blaszki. Dowiedziono, że w tworzeniu ognisk zwapnień powstających w blaszce miażdżycowej uczestniczą EVs. W warunkach fizjologicznych EVs wydzielane przez VSMC zawierają składniki hamujące wapnienie, takie jak fetuina-A. Z kolei komórki mięśni gładkich naczyń o fenotypie syntetycznym, promują wydzielanie EVs bogatych w białka biorące udział w mineralizacji ściany naczynia ^{169,170}. EVs promują również proces wapnienia blaszki miażdżycowej poprzez indukcję apoptozy, która prowadzi do uwolnienia pęcherzyków oraz resztek komórkowych, które mogą być miejscem odkładania się kryształów hydroksyapatytu. A zatem, niedobór inhibitorów mineralizacji oraz wzrost wydzielania czynników sprzyjających mineralizacji przez komórki mięśni gładkich oraz śródbłonna naczyń przyczyniają się do wapnienia blaszki miażdżycowej ¹⁷¹.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają kluczową rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej podczas miażdżycy – wpływają zarówno na proces mineralizacji, jak i degradacji. Białka takie jak ANXA5 czy TNAP sprzyjają nukleacji hydroksyapatytu i powstawaniu mikrozwapnień w ECM ⁹⁵. Z kolei obecność metaloproteinaz na powierzchni EVs przyczynia się do degradacji kolagenu i elastyny, prowadząc do destabilizacji blaszek miażdżycowych ¹⁷².

1.6. Autofagia

Autofagia (z gr. αὐτός (autós) – sam i gr. φαγεῖν (fagein) – jeść, zjadać; tłumaczone jako samozjadanie) jest katabolicznym procesem, podczas którego dochodzi do kontrolowanego

rozkładu niepotrzebnych składników lub struktur komórkowych. Proces autofagii, poprzez wewnątrzkomórkową degradację, umożliwia recykling uszkodzonych organelli oraz nieprawidłowo sfałdowanych białek. Jest to wysoce zachowany w toku ewolucji mechanizm przetrwania komórki, który pomaga utrzymać jej homeostazę w różnych, często niekorzystnych warunkach ¹⁷³. Na podstawie mechanizmu dostarczania materiału do degradacji w lizosomie wyróżnia się trzy główne typy tego procesu: autofagię zależną od białek opiekuńczych (CMA, ang. *chaperone-mediated autophagy*), mikroautofagię oraz makroautofagię.

W niniejszej rozprawie badano jeden typ autofagii – makroautofagię, dlatego też postanowiono przedstawić informacje tylko jej dotyczące.

1.6.1. Rola i przebieg autofagii w komórkach

Makroautofagia jest najlepiej poznanym typem autofagii. Proces ten polega na otaczaniu fragmentu cytoplazmy z ładunkiem przeznaczonym do degradacji dwuwarstwową błoną fagoforu, który ostatecznie tworzy pęcherzyk zwany autofagosomem. Substratami makroautofagii są uszkodzone organelle, białka cytozolowe lub nawet inwazyjne drobnoustroje ¹⁷⁴. Następnie dochodzi do fuzji autofagosomu z lizosomem i degradacji substratów oraz wewnętrznej błony autofagosomu, a produkty uwalniane są do cytozolu i ponownie wykorzystywane do syntezy makrocząsteczek ¹⁷⁵. Autofagia może być nieselektywna - występuje w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych oraz selektywna, kiedy dochodzi do degradacji określonych, ubikwitynowanych białek. W selektywnej autofagii wyróżnia się między innymi: mitofagię, w trakcie której dochodzi do degradacji mitochondriów z udziałem receptorów, takich jak NDP52, OPTN, TAX1BP1; ER-fagię odpowiedzialną za degradację siateczki śródplazmatycznej, w której uczestniczą receptory FAM134B, SEC63; ksenofagię, zachodzącą z udziałem NDP52 i TOLLIP, prowadzącą do degradacji bakterii ¹⁷⁶.

Proces autofagii jest dynamiczny i wieloetapowy, a analiza jego przebiegu opiera się nie tylko na obecności określonych białek, ale też identyfikacji i charakterystyce poszczególnych typów pęcherzyków autofagicznych.

Faza inicjacji autofagii

Autofagia jest indukowana przez kinazę AMPK, która reguluje metabolizm komórkowy i odpowiada za utrzymanie homeostazy energetycznej. Z kolei hamowana jest przez kinazę mTOR, która jest regulatorem wzrostu komórek i odpowiada na zmiany dostępności składników odżywczych. W warunkach niedoboru glukozy, AMPK wzmaga proces autofagii, aktywując ULK1 poprzez jego fosforylację na Ser317 i Ser777. Natomiast w warunkach optymalnego dostępu do składników odżywczych, aktywność mTOR zapobiega aktywacji ULK1 poprzez fosforylację na Ser757, co zakłóca interakcję ULK1-AMPK¹⁷⁷.

W warunkach głodu, substraty oraz białka uczestniczące w przebiegu autofagii przemieszczają się do miejsca tworzenia się fagoforu (PAS, ang. *phagophore assembly site*). Tworzenie się fagoforu zapoczątkowuje kompleks inicjujący utworzony przez białka ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101^{177,178}.

Tworzenie autofagosomu

W tworzeniu błon autofagosomalnych bierze udział ULK1/2, który fosforyluje składniki kompleksu 1 kinazy 3-fosfatydylinozytolu klasy III (PI3K, ang. *class III phosphatidylinositol 3-kinase*), obejmującego ATG14, beklinę 1, VPS34 i VPS15. Kompleks ten produkuje fosfatydylinozytolo-3-fosforan (PI3P, ang. *phosphatidylinositol 3-phosphate*), który jest prekursorem błony autofagosomu¹⁷⁴. Do tworzenia fagoforu wykorzystywana jest błona tworząca siateczkę śródplazmatyczną¹⁷⁹ lub aparat Golgiego, a nawet mitochondrium^{180–182}. W proces ten zaangażowane są też pęcherzyki zawierające białko ATG9 i pochodzące z aparatu Golgiego, których zadaniem jest dostarczanie składników błon do formujących się autofagosomów¹⁸³. Następnie rekrutowane są białka z rodziny WIPI wiążące fosfolipidy oraz białka przenoszące lipidy - ATG2A/B. Białko WIPI2 jest odpowiedzialne za przyłączenie kompleksu ATG12-ATG5-ATG16L, który jest niezbędny do wydłużania błony fagoforu, po czym oddysocjowuje od dojrzałego autofagosomu^{184,185}. Kompleks ATG12-ATG5-ATG16L bierze również udział we wbudowywaniu białka MAP1LC3 (zwane dalej LC3) do błony autofagosomu¹⁸⁶. Następnie enzymy ATG3 i ATG7 katalizują przyłączenie grupy aminowej fosfatydyletanolaminy (PE, ang. *phosphatidylethanolamine*) do białka LC3-I, w wyniku czego powstaje forma LC3-II¹⁸⁷. Jest to kluczowy etap biogenezy autofagosomów, ponieważ dzięki

obecności LC3-II znajdującego się na wewnętrznej błonie autofagosomu, możliwe jest rozpoznanie przeznaczonego do degradacji ładunku (organelli lub ich fragmentów) wyznakowanego białkami adaptorowymi, posiadającymi motyw LIR (ang. *LC3-interacting region*). Określone białka adaptorowe, specyficzne dla ładunku o określonym pochodzeniu, rozpoznają ubikwitynowane substraty¹⁸⁸. Najczęściej występującym białkiem zaangażowanym w rozpoznanie przeznaczonego do degradacji substratu, występującego w różnych typach autofagii, jest SQSTM1/p62. Dzięki domenie UBA (ang. *ubiquitin-associated domain*) wiążącej łańcuchy ubikwityny, białko SQSTM1/p62 może pełnić funkcję pomostową pomiędzy LC3-II a cząsteczkami przeznaczonymi do degradacji^{189,190}. Lipidacja białka LC3-I i tworzenie formy LC3-II są ściśle skorelowane z liczbą nowopowstałych autofagosomów w komórce, a zmiany w poziomie tego białka są jedną z metod badania procesu autofagii¹⁹¹. U ssaków wyróżnia się izoformy: LC3A, LC3B i LC3C,¹⁹² jednak to LC3B (zidentyfikowane jako pierwsze) jest najbardziej powszechnie wykorzystywanym markerem autofagii¹⁹³.

Zamknięcie i dojrzewanie

Ostatnim etapem dojrzewania autofagosomu jest hydroliza wiązania LC3-PE znajdującego się na zewnętrznej stronie pęcherzyka. Jest za to odpowiedzialne białko ATG4, a proces ten umożliwia ponowne wykorzystanie białka LC3¹⁹⁴. Gdy brzegi autofagosomu zostaną zamknięte przy udziale kompleksu białek ESCRT, to do ich błony przyłączają się białka SNARE, takie jak, np. syntaksyna 17 (STX17), które wchodzi w interakcję ze SNAP29 oraz VAMP7, umożliwiając tym samym fuzję z lizosomem¹⁹⁵.

Fuzja z lizosomem

Aby doszło do fuzji, autofagosomy muszą migrować do lizosomów wykorzystując mikrotubule oraz białka motoryczne, a białkiem oddziałującym z nimi jest Rab7¹⁹⁶. Białkiem umożliwiającym fuzję po stronie lizosomu jest LAMP-2¹⁹⁷.

Degradacja i recykling

Lizosomy są pęcherzykami otoczonymi pojedynczą błoną, zatem po fuzji z autofagosomem, wewnętrzna błona autofagosomu ulega degradacji i powstaje autolizosom. Obecne w lizosomach enzymy hydrolityczne (znanych jest około 60), takie jak katepsyny, lipazy, sulfatazy, fosfatazy, glikozydazy i nukleazy degradują materiał zawarty w autolizosomie¹⁹⁸.

Dysfunkcja lizosomów prowadzić może zatem do rozwoju wielu chorób, które są wynikiem akumulacji nieprawidłowych białek^{199,200}.

Błona lizosomu stanowi barierę, z jednej strony zapewniając enzymom hydrolitycznym odpowiednie pH 4,5-5, a z drugiej chroniąc cytozol przed zakwaszeniem. Jest to możliwe dzięki odpowiedniej grubości błony, która wynosi około 7-10 nm oraz poprzez silnie glikozylowanym białkom osadzonym w błonie lizosomu. Do najbardziej rozpowszechnionych białek związanych z błoną lizosomu należą LAMP-1, LAMP-2. Białka te biorą udział w fuzji lizosomów z innymi pęcherzykami^{201,202}. Utrzymanie odpowiedniego pH wewnątrz lizosomów umożliwia V-ATPaza, obecna w błonie, która jest pompą protonową. Ponadto lizosomy zawierają jony i kanały jonowe, które są niezbędne w regulacji pH²⁰³.

W fuzji autofagosomu z lizosomem/późnym endosomem biorą udział białka z rodziny Rab, LC3 oraz SNARE¹⁹⁵. Proces degradacji zużywa pulę dostępnych lizosomów w komórce, dlatego regeneracja lizosomów jest kluczowym mechanizmem pozwalającym na utrzymanie homeostazy²⁰⁴. Jest to możliwe dzięki odnowieniu lizosomów z autolizosomów (ALR, ang. *autophagic lysosome reformation*). W procesie tym błona autolizosomu ulega uwypukleniu w wyniku czego powstaje pączek. Jest on następnie przesuwany wzdłuż mikrotubul, tworząc przy tym kanalik błonowy, który ulega pęknięciu i powstaje „protolizosom”. Następnie protolizosom przechodzi dojrzewanie aby stać się funkcjonalnym lizosomem²⁰⁵.

1.6.2. Udział autofagii w starzeniu komórkowym

Ogólnie przyjęte jest, że starzeniu towarzyszy spadek wydajności autofagii w niektórych tkankach²⁰⁶. Ponieważ autofagia stanowi kluczowe ogniwo łączące homeostazę białek i organelli komórkowych, istnieje wiele dowodów wskazujących, że obniżenie jej wydajności prowadzi do dysfunkcji komórkowej, a w konsekwencji – do zaburzeń funkcjonowania tkanek, organizmu oraz skrócenia długości życia.

Z czasem dowiedziono, że autofagia towarzyszy starzeniu, promując rozwój fenotypu komórek starych. Ta prostarzeniowa aktywność autofagii została po raz pierwszy opisana przez Naritę²⁰⁷, który wykazał, że autofagia, poprzez dostarczanie substratów pochodzących ze zdegradowanego materiału, przyczynia się do rozwoju fenotypu sekrecyjnego.

Autofagia może też chronić komórkę starą przed śmiercią. Na taką, pozytywną rolę autofagii w starzeniu wskazują wyniki badań Huang i wsp. ²⁰⁸ prowadzone na komórkach nowotworowych, które były indukowane do starzenia promieniowaniem.

Kolejnym przykładem potwierdzającym zaangażowanie procesu autofagii w starzenie komórkowe jest jej udział w hamowaniu białka p53. Wykazano, że w trakcie starzenia replikacyjnego fibroblastów dochodzi do zależnej od autofagii degradacji izoformy $\Delta 133p53\alpha$, która hamuje pełnej długości, funkcjonalne p53 ²⁰⁹.

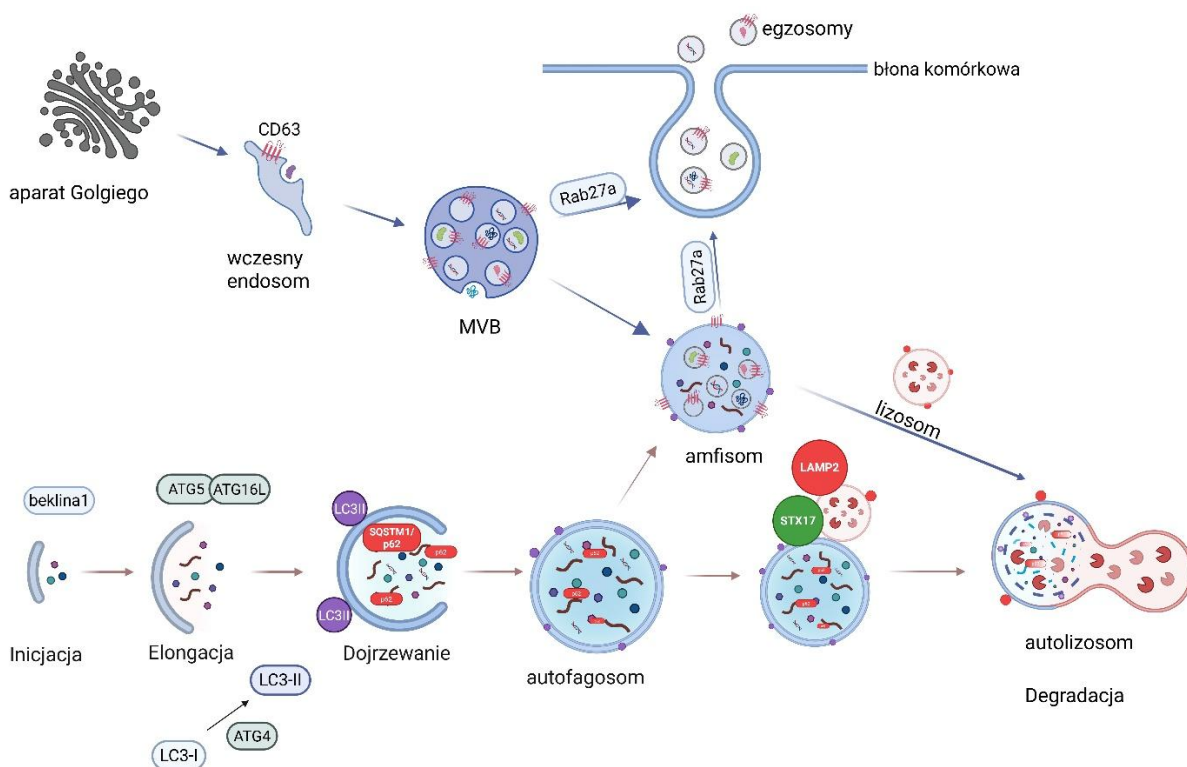
Autofagia w komórkach ulegających starzeniu jest również zaangażowana w degradację białka otoczki jądrowej - laminy B1. Razem z laminą degradacji ulegają fragmenty chromatyny powiązane z laminą tzw. LADs (*ang. lamin associated domains*). Uważa się, że degradacja między innymi tych białek oraz fragmentów DNA przyczynia się do osiągnięcia stanu nieodwracalnego starzenia komórki ^{210,211}.

Badania dostarczyły również szereg dowodów na przeciwstarzeniową rolę autofagii.

Wykazano, że poziom białek z rodziny ATG, zaangażowanych w indukcję autofagii, spada wraz z wiekiem, co obserwuje się szczególnie podczas starzenia się mózgu ²¹². Zaobserwowano, że długotrwałe hamowanie autofagii wynikające z obniżenia poziomu białek biorących udział w dojrzewaniu autofagosomów – ATG5 i ATG7, indukuje starzenie ludzkich fibroblastów. Było to związane z gromadzeniem się uszkodzonych mitochondriów prowadzącym do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu ²¹³.

Zahamowanie autofagii przyczynia się do indukcji SASP. Kang i wsp. zidentyfikowali czynnik transkrypcyjny GATA4 jako kluczowy regulator starzenia i wydzielania czynników SASP ²¹⁴. W warunkach fizjologicznych GATA4 jest degradowany na drodze selektywnej autofagii zależnej od SQSTM1/p62, jednak proces ten zostaje zahamowany podczas starzenia. Akumulacja GATA4 prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, co z kolei przyczynia się do indukcji SASP i progresji starzenia komórkowego ²¹⁴. Podsumowując, w zależności od warunków autofagia może działać antystarzeniowo, jak i przyczyniać się do starzenia komórkowego. To, jaką rolę pełni w starzeniu, może zależeć od rodzaju autofagii – selektywna lub nieselektywna, etapu starzenia oraz od tego w jakim subkomórkowym przedziale zachodzi ten proces.

1.6.3. Autofagia a sekrecja



Ryc. 1.4. Schemat ilustrujący przebieg procesu autofagii. Początkowo, prekursor autofagosomu, fagofor rozszerza swoje krawędzie, tworząc autofagosom. Zamknięte autofagosomy, zawierające pochłonięte białka cytoplazmatyczne lub organelle, migrują w kierunku lizosomów umożliwiając fuzję autofagosomu z lizosomami. Alternatywnie, autofagosomy mogą tworzyć amfisosomy poprzez fuzję z endosomami. Ostatecznie autofagosomy lub amfisosomy łączą się z lizosomami, gdzie ich zawartość ulega degradacji. Wykonano przy użyciu BioRender.com.

W większości eukariotycznych komórek wydzielanie białek odbywa się za pośrednictwem konwencjonalnego szlaku sekrecyjnego, obejmującego transport białek z retikulum endoplazmatycznego (ER) do aparatu Golgiego, a następnie ich eksport na zewnątrz komórki w procesie egzocytozy. Szlak ten wymaga obecności peptydów sygnałowych, które kierują syntetyzowane białko do przedziałów sekrecyjnych. W przypadku braku sekwencji sygnałowej, białka mogą być eksportowane alternatywnymi drogami, określanymi mianem niekanonicznych lub niekonwencjonalnych mechanizmów sekrecji, które omijają zarówno ER, jak i aparat Golgiego²¹⁵.

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych przykładów tego typu procesów jest autofagia sekrecyjna, odpowiedzialna za transport białek cytoplazmatycznych z udziałem pęcherzyków

wewnątrzkomórkowych. W odróżnieniu od klasycznej autofagii degradacyjnej, prowadzącej do rozkładu materiału cytoplazmatycznego w lizosomach, autofagia sekrecyjna umożliwia jego wydzielanie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Klasycznym przykładem takiego procesu jest sekrecja prozapalnej cytokiny IL-1 β , która może być sortowana do autofagosomów w formie prekursora i – po przekształceniu przez kompleks inflamasomu (cytozolowy, wielobiałkowy kompleks nieswoistej odpowiedzi odpornościowej) – uwalniana na zewnątrz w wyniku fuzji autofagosomu z błoną komórkową^{140,216}. Innym białkiem wydzielanym w sposób zależny od autofagii jest alarmina HMGB1²¹⁷. Co istotne, autofagia sekrecyjna uczestniczy również w wydzielaniu białek podatnych na agregację, co sugeruje jej potencjalną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych²¹⁸.

Coraz więcej dowodów wskazuje, że niekonwencjonalne mechanizmy sekrecji są ściśle powiązane z biogenezą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs), w tym egzosomów. Wykazano, że białko ATG5 uczestniczy w produkcji egzosomów, a razem z LC3 reguluje zakwaszenie ciałek wielopęcherzykowych (MVBs) poprzez kontrolę interakcji z podjednostką ATP6V1E1 kompleksu V1V0-ATPazy. Wydzielane pęcherzyki zawierają LC3, co sugeruje funkcjonalne powiązanie procesów autofagii i biogenezy EVs^{219,220}.

Połączenie MVBs z autofagosomami prowadzi do powstania amfisosomów, które mogą następnie fuzjować z błoną komórkową, uwalniając swój ładunek do środowiska zewnątrzkomórkowego. Zaobserwowano również, że LC3-II obecny na błonie MVBs pełni rolę w wychwytywaniu białek wiążących RNA i ich pakowaniu do pęcherzyków wewnętrznych (ILVs)²²¹ (Ryc. 1.4).

W literaturze opisano również proces określany jako zależne od LC3 ładowanie i wydzielanie EVs (LDELS, ang. *LC3-dependent EVs loading and secretion*), w którym lipidowane LC3-II zlokalizowane na błonie endosomów selektywnie wychwytuje ładunek – w tym białka wiążące RNA i małe niekodujące RNA (sncRNA) – i włącza go do ILVs oraz umożliwia wydzielanie EVs w wyniku fuzji MVBs z błoną komórkową²²¹.

W regulację autofagii sekrecyjnej zaangażowane są liczne białka biorące udział w kanoniczną autofagię, m.in. ULK1, beklina 1, ATG5, ATG12, ATG16L oraz LC3²²². Zaproponowano kilka mechanizmów niekanonicznego wydzielania zależnego od autofagii²²³. Pierwszy zakłada, że

kompleks ATG5–ATG12–ATG16L promuje tworzenie autofagosomu zawierającego LC3, którego zawartość nie trafia do lizosomu, lecz zostaje uwolniona na zewnątrz komórki. Drugi natomiast sugeruje, iż białka cytoplazmatyczne bez sekwencji sygnałowej zostają włączone do autofagosomu, który następnie łączy się z MVBs, tworząc amfisom. Amfisom ten fuzjuje z błoną komórkową, umożliwiając wydzielenie jego zawartości. W obu przypadkach proces wymaga obecności specyficznych białek SNARE, które zapobiegają fuzji z lizosomem i kierują pęcherzyk w stronę błony komórkowej^{224,225}.

Autofagia sekrecyjna uczestniczy w wydzielaniu szerokiego spektrum składników cytoplazmatycznych – od białek i organelli po cząstki RNA i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Wydzielane komponenty mogą działać jako sygnalizatory międzykomórkowe, wywołując zróżnicowane odpowiedzi, w tym reakcje zapalne, metaboliczne i strukturalne²²⁶. Aktywacja tego szlaku następuje w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, takie jak głodzenie, stres ER, odpowiedź na nieprawidłowo sfałdowane białka (UPR, ang. *unfolded protein response*) czy blokadę transportu wewnątrzkomórkowego²²⁷. Co istotne, niekonwencjonalne szlaki sekrecyjne mogą pełnić rolę mechanizmu adaptacyjnego, umożliwiającego komórkom wydzielanie białek, które w warunkach fizjologicznych korzystają z konwencjonalnego szlaku ER–Golgi, lecz w warunkach stresowych ulegają redystrybucji do alternatywnych dróg sekrecji²²⁸.

Mimo znacznego postępu w zrozumieniu autofagii sekrecyjnej, wiedza na temat dokładnych mechanizmów, za pośrednictwem których białka z rodziny ATG uczestniczą w tym procesie, pozostaje niepełna. Coraz więcej danych wskazuje jednak, że autofagia sekrecyjna stanowi kluczowy element sieci komunikacji międzykomórkowej, łącząc procesy degradacji, recyklingu i wydzielania w dynamiczny system regulujący homeostazę i odpowiedź komórkową na stres.

1.7. Rola statyn w starzeniu komórkowym

Inhibitory reduktazy HMG-CoA, statyny, są stosowanymi lekami w chorobie wieńcowej obniżającymi poziom lipidów. Wykorzystywane w leczeniu hipercholesterolemii poprzez obniżenie stężenia całkowitego cholesterolu (TC), lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) i trójglicerydów, przy jednoczesnym zwiększaniu stężenia lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Konwersja 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA) do mewalonianu przez

reduktazę HMG-CoA w hepatocytach jest pierwszym etapem biosyntezy cholesterolu. Statyny hamują reduktazę HMG-CoA, poprzez wiązanie się z miejscem aktywnym enzymu i zmianę konformacyjną w jego strukturze ²²⁹. Mechanizm ten pomaga zmniejszyć ryzyko miażdżycy poprzez zmniejszenie prawdopodobieństwa gromadzenia się cholesterolu ^{230,231}. Wykazano, że statyny poprawiają funkcje śródbłonna, funkcję komórek mięśni gładkich naczyń i funkcjonowanie makrofagów, poprawiając przy tym funkcjonowanie naczyń, regulację odpowiedzi zapalnej oraz stabilność blaszek miażdżycowych ²³². Statyny prowadzą do zwiększonej produkcji syntazy tlenu azotu pochodzącej ze śródbłonna, co zwiększa produkcję tlenu azotu i wspomaga rozszerzenie naczyń krwionośnych ²³³. Utrudnia to też adhezję leukocytów, zapobiega agregacji płytek krwi i zmniejsza proliferację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych ²³⁴. Statyny mają zdolność do hamowania aktywności NF-κB, mogą łagodzić stan zapalny poprzez zmniejszenie produkcji białka CRP, interleukin i cząsteczek adhezyjnych, takich jak ICAM-I ²³⁵.

Statyny mogą wpływać w zróżnicowany sposób na starzenie. Wykazano na przykład, że atorwastatyna zapobiega starzeniu się komórek progenitorowych śródbłonna ²³⁶. Natomiast simwastatyna, działa senomorficznie tj. wpływa na obniżenie poziomu prozapalnych czynników SASP w starzejących się fibroblastach ²³⁷. W oparciu o badania prowadzone na komórkach śródbłonna (HUVEC) dowiedziono, że simwastatyna, atorwastatyna i lowastatyna, ale nie prawastatyna, podane w wysokim, mikromolowym stężeniu, mają działanie senolityczne, wywołując śmierć komórek starzejących się ²³⁸.

Z drugiej strony statyny, hamując komórkowe mechanizmy naprawy DNA, uwrażliwiają komórki na starzenie po naświetlaniu promieniami γ ²³⁹.

Istnieją dowody, choć wciąż niezbyt liczne, że statyny mogą wpływać na sekrecję EVs. Kulshreshtha i wsp. ²⁴⁰ odnotowali znaczny spadek poziomu wydzielanych EVs w komórkach nabłonka i monocytach poddanych działaniu simwastatyny. Obniżenie poziomu wydzielanych EVs oraz zwiększenie wydzielania EVs wzbogaconych w cholesterol zaobserwowano również w komórkach raka jajnika, SKOV-3, traktowanych atorwastatyną, co przekładało się na zwiększoną tych komórek wrażliwość na chemioterapeutyki ²⁴¹

Skolei Tamboli i wsp. ²⁴² wykazali, że statyny promują wydzielanie enzymu degradującego insulinę (IDE) w mysich komórkach mikrogleju BV 2, co przyczyniało się do obniżenia poziomu amyloidu β przez proteazę IDE.

Wydaje się zatem, że działanie statyn na sekrecję EVs jest w dużym stopniu zależne od typu komórek i badanego kontekstu biologicznego.

2. Cele pracy

Starzenie komórkowe jest procesem wysoce dynamicznym i wieloetapowym, podczas którego komórki ulegają zmianom zarówno na poziomie morfologicznym jak i molekularnym. Te zmiany mogą się przekładać na rolę jaką stare komórki odgrywają w organizmie, gromadząc się wraz z wiekiem lub w wyniku procesów patologicznych w tkankach. Wykazano na przykład, że stare komórki VSMC są obecne w blaszkach miażdżycowych. Występując przede wszystkim w czapeczce włóknistej, znacząco przyczyniają się one do nieefektywnej naprawy blaszki, co prowadzi do jej pęknięcia a w konsekwencji udaru lub zawału. Ponadto czynniki wydzielane przez stare komórki VSMC sprzyjają destabilizacji blaszki poprzez nasilanie stanu zapalnego i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednym z procesów, który współtowarzyszy starzeniu komórkowemu jest autofagia. W zależności od kontekstu może ona działać zarówno pro-, jak i anty-starzeniowo, uczestnicząc w procesie indukcji starzenia jak i wpływając na pewne jego cechy, w tym fenotyp sekrecyjny.

Głównymi celami mojej pracy była:

1. Charakterystyka komórek VSMC ulegających starzeniu replikacyjnemu oraz starzeniu indukowanemu stresem na wczesnym i późnym jego etapie oraz wydzielanych przez nie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs).
2. Zbadanie udziału autofagii w regulacji wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez młode i stare komórki VSMC.

W związku z postawionymi celami, w ramach niniejszej pracy zrealizowałam następujące cele szczegółowe:

- Porównanie zmian zachodzących w trakcie procesu starzenia indukowanego i replikacyjnego komórek VSMC w oparciu o analizę podstawowych biomarkerów starzenia.
- Kompleksowa, jakościowa i ilościowa charakterystyka transkryptomu komórek VSMC ulegających starzeniu indukowanemu oraz replikacyjnemu z uwzględnieniem zmian zachodzących w czasie.

- Analiza porównawcza proteomu komórek VSMC ulegających starzeniu oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez nie wydzielanych z uwzględnieniem zmian zachodzących w czasie.
- Określenie zmian zachodzących w procesie autofagii towarzyszących procesowi starzenia komórek VSMC.
- Sprawdzenie współzależności pomiędzy autofagią a wydzielaniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez ulegające starzeniu komórki VSMC.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Hodowla komórek *in vitro*

W badaniach wykorzystano ludzkie komórki mięśni gładkich, izolowane z aorty (VSMC, ang. *Vascular Smooth Muscle Cells*) zakupione z banku komórkowego ATCC (American Type Culture Collection). Komórki były hodowane w specjalnie przeznaczony do tego typu komórek pożywce Vascular Cell Basal Medium (ATCC) uzupełnionej 5% cielęcą surowicą płodową (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*) oraz zestawem suplementów: 5 µg/ml insuliny, 5 ng/ml FGF-B, 5 ng/ml EGF, 10 mM L-glutaminą oraz 50 µg/ml kwasem askorbinowym (ATCC). Komórki hodowano w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% dwutlenku węgla i 95% wilgotności.

3.1.2. Przeciwciała

Poniżej w Tabeli 3.1 przedstawiono przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystane podczas analizy białek metodą Western blot oraz w barwieniach immunofluorescencyjnych.

Tabela 3.1. Wykaz stosowanych przeciwciał pierwszorzędowych.

Antygen	Masa [kDa]	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Bufor blokujący	Producent
ATG16L	64	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
ATG5	55	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
beklina 1	60	mysz	1:500	mleko	BD Biosciences
BrdU	-	mysz	1:100	BSA	BD Biosciences
CD63	26	mysz	1:500	BSA	Abcam
CD81	22	mysz	1:500	BSA	Abcam

EEA1	160	mysz	1:500	mleko	BD Biosciences
flotylna-1	48	mysz	1:1000	mleko	BD Biosciences
HMGB1	29	królik	1:1000	mleko	Abcam
γ H2AX (S139)	15	mysz	1:500	Mleko/BSA	Abcam
GAPDH	35	mysz	1:50000	mleko	BD Biosciences
lamina B1	72	mysz	1:500	mleko	Santa Cruz
TOMM20	20	królik	1:1000	mleko	GeneTex
LAMP-2	100-120	mysz	1:1000	mleko	Invitrogen
LC3B	16-18	królik	1:1000	mleko	Sigma Aldrich
LC3A	16-18	królik	1:250	BSA	NovusBio
PARP	113	mysz	1:500	mleko	BD Biosciences
p16 ^{INK4}	16	królik	1:500	mleko	Proteintech
p21	21	królik	1:500	mleko	Santa Cruz
p53	53	mysz	1:500	mleko	Santa Cruz
p-p53 (S15)	53	królik	1:500	BSA	Cell Signaling
p62/SQSTM1	62	mysz	1:500	mleko	BD Biosciences
p62/SQSTM1	62	kawia domowa	1:250	BSA	PROGEN
Rab7a	23	królik	1:500	mleko	GeneTex
Rab27a	27	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
STX17	33	królik	1:500	mleko	Sigma Aldrich
S6	32	mysz	1:500	mleko	Cell Signaling

p-S6 (S235/236)	32	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
S6K	70-80	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
p-S6K (T389)	70-85	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
53BP1	214	królik	1:500	BSA	NovusBio
GM130	130	królik	1:500	mleko	Cell Signaling
TSG101	50	królik	1:500	mleko	Abcam

Poniżej w Tabeli 3.2 przedstawiono przeciwciała drugorzędowe wykorzystane podczas analizy białek metodą Western blot oraz w barwieniach immunofluorescencyjnych.

Tabela 3.2. Wykaz stosowanych przeciwciał drugorzędowych.

NAZWA	POCHODZENIE	ROZCIĘCZENIE	KONIUGAT	PRODUCENT
CZĘŚĆ FC KRÓLICZYCH IGG	koza	1:2000	peroksydaza chrzanowa	DAKO
CZĘŚĆ FC KRÓLICZYCH IGG	koza	1:500	fluorochrom Alexa Fluor 488	Invitrogen
CZĘŚĆ FC KRÓLICZYCH IGG	koza	1:500	fluorochrom Alexa Fluor 555	Invitrogen
CZĘŚĆ FC MYSICH IGG	koza	1:2000	peroksydaza chrzanowa	DAKO
CZĘŚĆ FC MYSICH IGG	koza	1:500	fluorochrom Alexa Fluor 488	Invitrogen
CZĘŚĆ FC MYSICH IGG	koza	1:500	fluorochrom Alexa Fluor 555	Invitrogen

3.1.3. Odczynniki i roztwory

3.1.3.1. Związki wykorzystywane do traktowania komórek

Roztwory przygotowujemy i przechowywamy według poniższych danych (Tabela 3.3):

Tabela 3.3. Wykaz i właściwości roztworów stosowanych do traktowania komórek.

ZWIĄZEK	PRODUCENT	TEMP. PRZECHOWYWANIA ROZTWORU	ROZPUSZCZALNIK ROZTWORU WYJŚCIOWEGO	STĘŻENIE ROZTWORU WYJŚCIOWEGO	STĘŻENIE KOŃCOWE W POŻYWCIE
DOKSORUBICZYNA	Sigma Aldrich	-20°C	DMSO	25 mM	150 nM
BAFILOMYCZYNA A1 (BAF A1)	Bioshop	-20°C	DMSO	100 mM	100 nM
CHLOROCHINA (CQ)	Bioshop	-20°C	woda dejonizowana	60 mM	18-60 μM
SIMWASTATYNA (SMV)	Merck (Sigma- Aldrich)	-20°C	DMSO	10 mM	100-250 nM

3.1.3.2. Roztwory stosowane do oznaczania poziomu aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal)

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

Roztwór barwiący – roztwór zawierający x-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd, substrat SA- β -gal) o stężeniu 1 mg/ml, 5 mM heksacyjanożelazian (II) potasu ($C_6FeK_4N_6$), 5 mM heksacyjanożelazian (III) potasu ($C_6FeK_3N_6$), 150 mM chlorek sodu oraz 2 mM chlorek magnezu w buforze fosforanowym o pH 6,0.

Bufor fosforanowy o pH 6,0 – roztwór przygotowano poprzez zmieszanie 87,7 ml 0,1 M roztworu NaH_2PO_4 (13,79 g/l) z 12,3 ml 0,1 M roztworu Na_2HPO_4 (17,79 g/l), następnie za pomocą użytych roztworów skorygowano pH do wartości 6,0.

3.1.3.3. Roztwory wykorzystywane w barwieniach cytochemicznych

Roztwór 20% paraformaldehydu (PFA) – 20 g PFA (Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 90 ml PBS z dodatkiem wodorotlenku sodu (NaOH) w temperaturze około 60°C. Po rozpuszczeniu powstały roztwór doprowadzono do pH 7,4 przy użyciu kwasu chlorowodorowego (HCl), uzupełniono PBS do końcowej objętości 100 ml i przechowywano w temperaturze -20°C. Bezpośrednio przed użyciem roztwór ten rozmrażano i rozcieńczano do 4%.

3.1.3.4. Roztwory wykorzystywane w metodzie Western blot

Bufor 1 M Tris-HCl o pH 6,8 – 60,57 g Tris rozpuszczono w 400 ml wody dejonizowanej. Po dobie ustalono pH za pomocą kwasu chlorowodorowego (HCl) i uzupełniono do końcowej objętości 500 ml wodą dejonizowaną.

Bufor 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8 – 90,85 g Tris rozpuszczono w 400 ml wody dejonizowanej. Po dobie ustalono pH za pomocą kwasu chlorowodorowego (HCl) i uzupełniono do końcowej objętości 500 ml wodą dejonizowaną.

Bufor Laemmli'ego – przygotowano roztwór wyjściowy (dwukrotnie stężony) o stężeniu 125 mM Tris-HCl o pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol oraz 0,2% błękit bromofenolowy ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Br}_4\text{S}$) w wodzie dejonizowanej. Roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej, chroniąc przed dostępem światła. Przed zastosowaniem, do odpowiedniej porcji buforu dodawano DTT ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$), aby końcowo otrzymać stężenie DTT 100 mM.

Bufor do elektroforezy białek w żelu – przygotowano roztwór wyjściowy (10-krotnie stężony) o stężeniu 250 mM Tris-HCl, 2,5 M glicyna i 1% SDS w wodzie dejonizowanej. Przed zastosowaniem roztwór rozcieńczano dziesięciokrotnie w wodzie dejonizowanej i przechowywano w 4°C. Tak przygotowany roztwór wykorzystywano dwukrotnie.

Bufor do transferu białek z żelu na membranę – przygotowano roztwór wyjściowy (10-krotnie stężony) o stężeniu 250 mM Tris-HCl, 2 M glicyna i 0,5% SDS w wodzie dejonizowanej. Przed zastosowaniem roztwór rozcieńczano dziesięciokrotnie w roztworze alkoholu

metylowego, w taki sposób, aby końcowe stężenie alkoholu wynosiło 20%. Bufor po przygotowaniu przechowywano w lodówce i wykorzystywano dwukrotnie.

TBST – przygotowano roztwór wyjściowy TBS (10-krotnie stężony) o stężeniu 200 mM Tris-HCl oraz 1,37 M chlorek sodu w wodzie dejonizowanej. Ustalono pH 7,6 za pomocą 10 M HCl i przechowywano w 4°C. Przed użyciem roztwór ten dziesięciokrotnie rozcieńczano i dodawano Tween-20, aby jego końcowe stężenie wynosiło 0,1%.

Roztwór Ponceau S – rozpuszczono 1 g różu Ponceau S w 100 ml kwasu octowego o stężeniu 3%. Roztwór po przygotowaniu przechowywano w temperaturze pokojowej i wykorzystywano wielokrotnie.

Roztwór błękitu Coomassie – rozpuszczono 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma-Aldrich) i 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck) w roztworze składającym się z 40% alkoholu etylowego, 5% alkoholu metylowego i 8% kwasu octowego w wodzie dejonizowanej. Następnie roztwór przesączono przez sącze wykonane z bibuły, przechowywano w temperaturze pokojowej i wykorzystywano wielokrotnie.

3.1.3.5. Roztwory do przygotowywania żeli poliakrylamidowych.

W doświadczeniach wykorzystywano żele poliakrylamidowe rozdzielające o stężeniach 10%, 12% oraz 15% i żel poliakrylamidowy zagęszczający o stężeniu 5%. Skład roztworów do przygotowania podano w Tabeli 3.4.

Tabela 3.4. Skład roztworów do przygotowywania żeli poliakrylamidowych.

	Żel rozdzielający (objętość [ml] na 5 ml żelu)			Żel zagęszczający (objętość [ml] na 5 ml żelu)	
Stężenie żelu / Odczynnik	10%	12%	15%	Stężenie żelu / Odczynnik	5%
woda	2,35	2,1	1,72	woda	3,61

40% akrylamid/bis- akrylamid 29:1	1,25	1,5	1,88	40% akrylamid/bis- akrylamid 29:1	0,64
1,5 M Tris-HCl 8,8 pH	1,3	1,3	1,3	1,5 M Tris-HCl 6,8 pH	0,63
10% SDS	0,05	0,05	0,05	10% SDS	0,05
10% APS	0,05	0,05	0,05	10% APS	0,05
TEMED	0,002	0,002	0,002	TEMED	0,005

3.1.3.6. Bufory i roztwory stosowane w przygotowywaniu preparatów do mikroskopii elektronowej

Wszystkie roztwory przygotowywane były bezpośrednio przez użyciem.

0,4 M HEPES o pH 7,3 – rozpuszczono 9,5 g HEPES w 100 ml wody podwójnie destylowanej, a następnie ustalano pH roztworu na 7,3 za pomocą NaOH.

Bufor utrwalający – rozpuszczono 2 g PFA (Sigma-Aldrich) w 40 ml wody podwójnie destylowanej z dodatkiem kropli 5 M wodorotlenku sodu w temperaturze 60°C. Po całkowitym rozpuszczeniu dodano 50 ml 0,4 M HEPES o pH 7,3 i 0,2 ml otwartego bezpośrednio przed użyciem 25% glutaraldehydu (EMS). Ustalono pH roztworu na 7,3 za pomocą NaOH, a następnie uzupełniono podwójnie destylowaną wodą do 100 ml.

Bufor blokujący – rozpuszczono 0,5 g albuminy surowicy bydlęcej (BSA), 0,05 g saponiny oraz 0,27 g chlorku amonu w 100 ml PBS.

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

1% roztwór zredukowanego tetratlenku osmu – roztwór tetratlenku osmu o stężeniu 4% (Agar Scientific) zmieszano z roztworem żelazo (II) cyjanku potasu o stężeniu 3% oraz podwójnie destylowaną wodą w proporcjach 1:2:1.

2% roztwór tetratlenku osmu – roztwór tetratlenku osmu o stężeniu 4% (Agar Scientific) zmieszano z podwójnie destylowaną wodą w proporcjach 1:1.

Tiokarbohydrazd (TCH) – rozpuszczono 0,1 g TCH (Sigma-Aldrich) w 10 ml wody podwójnie destylowanej i podgrzewano w temperaturze 60°C przez godzinę, mieszając co kilkanaście minut.

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

Roztwór asparagianu ołowiu Waltona – rozpuszczono 0,066 g azotanu ołowiu (Sigma-Aldrich) w 10 ml 0,03 M kwasu asparaginowego o pH 3,8 w łaźni wodnej w temperaturze 60°C. Następnie ustalano pH na 5,5 za pomocą 1 M NaOH.

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

3.1.4. Sondy molekularne

LysoTracker™ Red DND-99 (Invitrogen)

Sonda stosowana w celu wizualizacji organelli o kwaśnym pH, w tym lizosomów. Wyjściowy 1 mM roztwór sondy przygotowano w DMSO i przechowywano w temperaturze -20°C, bez dostępu światła. Przed zastosowaniem roztwór wyjściowy sondy rozcieńczano w pożywce (10000 razy) do uzyskania 100 nM stężenia końcowego i dodawano do komórek.

MagicRed® CATHEPSIN assays (ImmunoChemistry Technologies)

Sonda stosowana do pomiaru aktywności katepsyny B w komórce. Wyjściowy roztwór sondy przygotowano poprzez rozpuszczenie w DMSO i przechowywano w temperaturze -20°C, bez dostępu do światła. Przed zastosowaniem roztwór wyjściowy rozcieńczano dziesięciokrotnie w wodzie dejonizowanej i dodawano odpowiednią objętość do świeżej pożywki hodowlanej (40 µl/ml w przypadku preparatów mikroskopowych lub 62,5 µl/ml w przypadku pomiaru ilościowego w czytniku płytek). Tak przygotowaną pożywkę dodawano do komórek.

3.1.5. Zestawy odczynników

LEGENDplex™ HU Proinflam. Chemokine Panel 1 Standard, BioLegend

LEGENDplex™ HU Proinflam. Chemokine Panel 2 Standard, BioLegend

RNeasy Plus Mini Kit (50 probes) 74134, Qiagen

3.2. Metody

3.2.1. Ocena potencjału proliferacyjnego komórek w oparciu o skumulowaną liczbę podwojeń populacji (cPD)

Komórki mięśni gładkich naczyń (VSMC) na wczesnych pasażach (4-7) wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² i pasażowano co 3 – 5 dni. Podczas każdego pasażu komórki liczone w ulepszonej komorze Neubauera w celu monitorowania podwojenia populacji (PD, ang. *population doubling*), ze wzoru:

$$PD = \frac{\log_{10}(N_h) - \log_{10}(N_i)}{\log_{10}2}$$

gdzie:

N_i – (ang. *inoculum number*), liczba wysianych komórek

N_h – (ang. *cell harvest number*), liczba zebranych podczas kolejnego, pasażu komórek

Następnie do oceny potencjału proliferacyjnego komórek wyznaczano skumulowaną liczbę podwojeń populacji (cPD, ang. *cumulative population doubling*). Komórki były uznawane za potencjalnie stare, kiedy przestawały się dzielić, a wartość cPD pozostawała stała.

3.2.2. Indukcja starzenia z wykorzystaniem doksorubicyny

W celu indukcji starzenia przyspieszonego komórki na wczesnych pasażach wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² naczynia hodowlanego, następnie po 24 godzinach od wysiania traktowano komórki doksorubicyną o końcowym stężeniu 150 nM przez 7 dni. Po tym czasie komórkom wymieniano pożywkę na świeżą i hodowano przez kolejne dni (wymieniając pożywkę według potrzeb). Traktowane w ten sposób komórki analizowano po 7 i 28 dniach od traktowania doksorubicyną.

W celu badania wpływu simwastatyny na komórki poddane starzeniu indukowanemu stresem, wykorzystano model starzenia, w którym komórkom podawano 1 μM doksorubicynę na 2 godziny, a następnie wymieniano pożywkę na świeżą.

3.2.3. Wyznaczanie indeksu autofagicznego

Do wyznaczenia indeksu autofagicznego dla każdego punktu czasowego (kontrola, SIPS I, SIPS IV, RS) przygotowano trzy warianty komórek: komórki nietraktowane (N), komórki traktowane 100 nM bafilomycyną A1 przez ostatnie 3 godziny hodowli (B) oraz komórki traktowane 60 μM chlorochiną również przez 3 ostatnie godziny hodowli (C). W komórkach tych oznaczano poziom białka LC3B I oraz LC3B II z użyciem techniki Western blot, jak opisano w rozdziale 3.2.4., następnie densytometrycznie określano względny poziom tych białek oraz wyznaczano stosunek LC3B II/LC3B I dla każdego wariantu. Do wyliczenia indeksu autofagicznego stosowano wzór:

$$\text{indeks autofagiczny} = \frac{\frac{LC3B II}{LC3B I}_{INHIBITOR (B LUB C)} - \frac{LC3B II}{LC3B I}_{NIETRAKTOWANE (N)}}{\frac{LC3B II}{LC3B I}_{NIETRAKTOWANE (N)}}$$

3.2.4. Hamowanie wydajności autofagii

W celu inhibicji autofagii dla każdego punktu czasowego starzenia indukowanego (kontrola, SIPS I, SIPS IV), przygotowano trzy warianty komórek: komórki nietraktowane (NT), komórki traktowane 100 nM bafilomycyną A1 przez ostatnie 48 godzin hodowli (BAF A1) oraz komórki traktowane 18 μM chlorochiną również przez ostatnie 48 godzin hodowli (CQ).

3.2.5. Badanie poziomu białek metodą Western blot

Badanie poziomu białek rozpoczynano od wysiania komórek w gęstości 3,5 tys./ cm^2 w butelkach hodowlanych. Komórki w danym punkcie eksperymentalnym przepłukiwano PBS, odczepiano od podłoża za pomocą 0,25% roztworem trypsyny, neutralizowano pożywką i otrzymaną zawiesinę komórkową wirowano przy prędkości 200 g przez 5 minut. Następnie komórki ponownie przepłukiwano PBS i wirowano przy prędkości 6700 g przez 5 minut. PBS zlewano znad osadu komórkowego, a pozostały pelet przechowywano w temperaturze -20°C .

3.2.5.1. Przygotowanie ekstraktów całokomórkowych

Białka izolowano po zebraniu wszystkich peletów komórkowych w danym doświadczeniu. Po rozmrożeniu osady komórkowe zawieszano w odpowiedniej objętości PBS i dodawano taką samą objętość stężonego dwukrotnie buforu Laemmliego. Próbkę następnie homogenizowano przy użyciu strzykawek insulinowych o średnicy igły 0,3 mm i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 95°C. Po tym czasie próbkę wirowano przy prędkości 10500 g przez 5 minut, a supernatanty przenoszono do nowych probówek. Tak przygotowane lizaty przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.5.2. Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym, transfer białek na membranę i wizualizacja białek

Równe ilości białka były наносzone na żel poliakrylamidowy. W zależności od wielkości białek poddawanych detekcji, do elektroforetycznego rozdzielania wykorzystywano żele poliakrylamidowe o stężeniach 10%, 12% i 15%. Rozdział białek prowadzono w temperaturze pokojowej pod stałym napięciem 50 V w buforze do elektroforezy przez około 20 minut, a następnie 120 V przez około 2 godziny. W tym celu korzystano z aparatu Mini-PROTEAN (Bio-Rad).

Po zakończeniu elektroforezy, rozdzielone na żelu białka przenoszono na membranę nitrocelulozową przeprowadzając mokry transfer w aparacie Mini Trans-Blot (Bio-Rad) przy stałym natężeniu prądu 400 mA. Transfer przeprowadzano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Do oceny wydajności transferu białek z żelu na membranę wykorzystywano roztwór czerwieni Ponceau S.

Membranę dzielono na fragmenty zawierające analizowane białka, w tym celu wykorzystywano wzorzec mas. Następnie fragmenty blokowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w buforze do blokowania, w zależności od stosowanego w dalszych etapach przeciwciała, zawierającego 5% odtłuszczone mleko lub 5% BSA w TBST. Po tym czasie membranę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (Tabela 3.1). Następnie membranę płukano trzykrotnie przez 5 minut w TBST i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową lub

fluorochromem (Tabela 3.2). Membrany płukano trzykrotnie TBST przez 5 minut. Do detekcji drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową wykorzystywano system do chemiluminescencji ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) zgodnie z zaleceniami producenta. Membranę eksponowano na kliszy rentgenowskiej i wywoływano za pomocą urządzenia Fuji FPM 800A lub BioRad ChemiDoc Imaging System. Natomiast do detekcji przeciwciała drugorzędowego sprzężonego z fluorochromem wykorzystywano urządzenie BioRad ChemiDoc Imaging System. Analizę densytometryczną przeprowadzono przy użyciu programu ImageJ, a intensywność sygnałów z poszczególnych próbek normalizowano do poziomu białka referencyjnego GAPDH.

3.2.6. Barwienia cytochemiczne

W celu wykonania barwień cytochemicznych wysiewano 12 tys. komórek na szkiełko nakrywkowe 15 mm x 15 mm. Komórki kontrolne barwiono 24-48 godzin od wysiania, natomiast pozostałe komórki traktowano jak opisano w rozdziale 3.2.2. i barwiono w określonych punktach czasowych.

3.2.6.1. Oznaczanie aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal)

Komórki hodowane na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm przepłukiwano trzykrotnie PBS i następnie inkubowano je przez 5 minut w temperaturze pokojowej w buforze utrwalającym. Następnie w celu oznaczenia aktywności β -galaktozydazy związanej ze starzeniem (SA- β -gal), komórki ponownie płukano trzykrotnie PBS i inkubowano w buforze barwiącym zawierającym x-gal. Po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, komórki płukano trzykrotnie PBS, barwiono jądra komórkowe za pomocą roztworu Hoechst 33342 o stężeniu 2 μ g/ml, ponownie płukano PBS i zatapiano przy użyciu Fluoromount-G (Invitrogen) na szkiełku podstawowym. Przygotowane w ten sposób preparaty fotografowano i analizowano za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research. Odsetek komórek z aktywną SA- β -gal określano jako stosunek niebiesko zabarwionych komórek (komórki SA- β -gal pozytywne) do liczby wszystkich jąder komórkowych. Do analizy ilościowej zostało użyte oprogramowanie ImageJ.

3.2.6.2. Barwienie F-aktyny w komórkach

Komórki rosnące na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm przepłukiwano trzykrotnie PBS i utrwalano 4% roztworem PFA w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS i przechowywano w temperaturze 4°C do momentu barwienia. Przed barwieniem komórki permeabilizowano przez 10 minut roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym płukaniu w PBS, komórki inkubowano przez 30 minut z falloidyną skoniugowaną z fluorochromem Alexa Fluor 488 (Invitrogen; w celu wizualizacji cytoszkieletu aktynowego) w rozcieńczeniu 1:40 w PBS. Po tym czasie komórki płukano dwukrotnie PBS, a jądra komórkowe barwiono roztworem DAPI o stężeniu 1 µg/ml przez 15 minut. Komórki płukano trzykrotnie w PBS i zatapiano przy użyciu Fluoromount-G (Invitrogen) na szkiełku podstawowym. Preparaty fotografowano i analizowano za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research.

3.2.6.3. Wizualizacja i pomiar lizosomów oraz aktywnej katepsyny B

Komórki rosnące na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm inkubowano przez ostatnie 30 minut hodowli w temperaturze 37°C z sondą LysoTracker™ Red DND-99 lub MagicRed® CATHEPSIN assays w celu wizualizacji lizosomów lub aktywnej katepsyny B. Natychmiast po inkubacji komórki płukano PBS, fotografowano i analizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research. W celu ilościowej analizy komórki analizowano w czytniku płytek Tecan The Infinite®M1000 przy długości fal wzbudzenia i emisji wskazanych przez producenta

3.2.7. Barwienia immunocytochemiczne

W celu wykonania barwień immunocytochemicznych wysiewano 12 tys. komórek na szkiełko nakrywkowe 15 mm x 15 mm. Komórki kontrolne barwiono 24-48 godzin od wysiania, natomiast pozostałe komórki traktowano jak opisano w rozdziale 3.2.2. i barwiono w określonych punktach czasowych.

3.2.7.1. Oznaczenie zdolności komórek do wbudowywania bromodeoksyurydyny do DNA

Na ostatnią dobę hodowli do komórek rosnących na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm, dodawano bromodeoksyurydynę (BrdU) o końcowym stężeniu 10 μ M. Po tym czasie komórki płukano PBS, utrwalano i przechowywano w 70% alkoholu etylowym w temperaturze -20°C przez minimum 24 godziny. Przed barwieniem komórki płukano dwukrotnie przez 5 minut 0,5% roztworem Triton X-100 (Sigma Aldrich) w PBS. Następnie komórki inkubowano przez 30 minut w roztworze 2 N kwasu chlorowodorowego (HCl) w PBS, dwukrotnie płukano PBS przez 5 minut i inkubowano przez 1 minutę w 0,1 M roztworze tetraboranu sodu (Sigma-Aldrich). Po powtórny dwukrotnym płukaniu PBS przez 5 minut, komórki inkubowano przez 1 godzinę z pierwszorzędowym przeciwciałem specyficznym dla BrdU w rozcieńczeniu 1:100. Przeciwciało to rozcieńczano w buforze zawierającym 1% BSA i 0,5% Tween-20 (Sigma-Aldrich) w PBS. Następnie komórki płukano dwukrotnie 0,5% roztworem Tween-20 w PBS i inkubowano przez 1 godzinę z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z fluorochromem Alexa Fluor 488. Przeciwciało to rozcieńczono 1:500 w takim samym buforze jak przeciwciało pierwszorzędowe. Po godzinie komórki płukano dwukrotnie roztworem 0,5% Tween-20 w PBS i barwiono roztworem DAPI o stężeniu 1 μ g/ml przez 15 minut. Następnie płukano komórki trzykrotnie przez 5 minut PBS i zatapiano na szkiełku podstawowym za pomocą Fluoromount-G (Invitrogen). Zdjęcia wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research. Następnie analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ. Wynik przedstawiano jako odsetek komórek wbudowujących BrdU w stosunku do totalnej liczby komórek, określonej jako całkowita liczba jąder komórkowych.

3.2.7.2. Analiza liczby uszkodzeń DNA w oparciu o wizualizację skupisk 53BP1 oraz γ H2AX

Komórki rosnące na szkiełkach nakrywkowych o wymiarach 15 mm x 15 mm przepłukiwano trzykrotnie PBS i utrwalano 4% roztworem PFA w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie komórki przepłukiwano trzykrotnie PBS i przechowywano w temperaturze 4°C do momentu barwienia. Przed barwieniem komórki permeabilizowano przez 10 minut roztworem 0,5% Triton X-100 w PBS w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym płukaniu

PBS, komórki blokowano przez 15 minut w roztworze składającym się z 2% BSA, 1,5% surowicy koziej oraz 0,1% Triton X-100 w PBS. Następnie inkubowano komórki z przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-53BP1 oraz anti- γ H2AX, rozcieńczonymi 1:500 w buforze stosowanym do blokowania w wilgotnej komorze przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie szkiełka z komórkami przepłukiwano trzykrotnie PBS, a następnie inkubowano w ciemności z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromami Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 555. Po zakończeniu inkubacji oraz trzykrotnym płukaniu PBS, jądra komórkowe barwiono przez 15 minut roztworem DAPI o stężeniu 1 μ g/ml, ponownie przepłukano PBS i zatapiano na szkiełku podstawowym za pomocą Fluoromount-G (Invitrogen). Zdjęcia wykonywano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse Ti i oprogramowania NIS Elements Basic Research. Następnie analizowano przy użyciu oprogramowania ImageJ. Komórki z określoną liczbą skupisk 53BP1/ γ H2AX w jądrze komórkowym podzielono na pięć grup: 1. komórki bez widocznych skupisk, 2. komórki z jednym widocznym skupiskiem, 3. komórki z widocznymi 2-5 skupiskami, 4. komórki z więcej niż 5 skupiskami oraz 5. komórki z niepoliczalną liczbą skupisk. Wyniki te przedstawiono jako procent całkowitej liczby analizowanych jąder komórkowych.

3.2.8. Mikroskopia elektronowa

Do analizy za pomocą mikroskopii elektronowej przygotowano próbki wykorzystując dwie metody, w zależności od celu analizy. Niezależnie od zastosowanej metody przygotowywania preparatów były one analizowane za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 (JEOL Co.) wyposażonego w kamerę MORADA G2 (EMSIS GmbH).

3.2.8.1. Obrazowanie struktur komórkowych

Do mikroskopii elektronowej komórki wysiewano w gęstości 3 tys./cm² na specjalne szalki ze szklanym dnem (MatTek, p35g-1-5-14-cgrd) i przeprowadzono schemat doświadczenia (indukcję starzenia) jak opisano w rozdziale 3.2.2. Komórki następnie utrwalano dwuetapowo roztworem 0,2 M HEPES o pH 7,3 zawierającym 2% PFA oraz 1% GA. Początkowo dodano 1 ml roztworu do pożywki na 5 minut w temperaturze 37°C, następnie zalano komórki 2 ml świeżego roztworu i utrwalano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie utrwalone komórki płukano pięciokrotnie przez 5 minut 0,2 M roztworem HEPES o pH 7,3, a następnie pięciokrotnie zimnym roztworem 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4.

Następnymi etapami były kolejno: inkubacja w 1% roztworze zredukowanego tetratlenku osmu przez 30 minut na lodzie, 20 minutowa inkubacja w temperaturze pokojowej w przefiltrowanym przez filtr strzykawkowy TCH oraz inkubacja w 2% roztworze tetratlenku osmu w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Poszczególne inkubacje były poprzedzone pięciokrotnymi płukaniem wodą podwójnie destylowaną. Następnie preparaty pozostawiano na całonocną inkubację w temperaturze 4°C w przefiltrowanym roztworze 1% octanu uranylu. Kolejnego dnia, komórki przepłukiwano pięciokrotnie wodą podwójnie destylowaną i następnie umieszczano w piecu w temperaturze 60°C na 30 minut. Po tym czasie preparaty inkubowano w roztworze asparagianu ołowiu Waltona przez 20 minut w temperaturze 60°C i płukano odgazowaną wodą podwójnie destylowaną. Kolejnym krokiem było odwadnianie komórek alkoholem etylowym przy użyciu roztworów o wzrastającym stężeniu: 20%, 50%, 70%, 80%, 90% oraz dwa razy 100%. Odwadnianie przeprowadzano po 5 minut na każde stężenie alkoholu etylowego. Po ostatnim odwadnianiu komórki inkubowano przez godzinę w 50% roztworze żywicy Durcupan w etanolu, a następnie przez całą noc w 100% żywicy Durcupan. Kolejnego dnia do szkiełek ze znajdującymi się na nich komórkami przyklejano kapsułkę z obciętym dnem i wypiekano w piecu w temperaturze 70°C przez co najmniej 24 godziny. Po tym czasie kapsułki wypełniano żywicą i wypiekano przez kolejne 3 dni w temperaturze 70°C. Następnie kapsułkę odrywano od szklanego dna szalki, rozcinano i wyjmowano bloczki żywicy. Bloczki te były cięte przy użyciu ultramikrotomu (Ultracut R, Leica) na 70 nm skrawki i zbierane na miedzianych siatkach pokrytych formvarem (Agar Scientific). Tak przygotowane preparaty były obrazowane za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 (JEOL Co.) wyposażonego w kamerę MORADA G2 (EMSYS GmbH).

3.2.8.2. Immunodetekcja białka CD63 za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej

Komórki wysiewano w gęstości 3 tys./cm² na szalki ze szklanym dnem (MatTek, p35g-1-5-14-cgrd) i postępowano zgodnie ze schematem doświadczenia jak opisano w rozdziale 3.2.2. Komórki inkubowano w buforze utrwalającym z 4% PFA i 0,05% GA w temperaturze 37°C przez 5 minut, a następnie w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie przepłukiwano je buforem utrwalającym zawierającym 4% PFA i pozostawiano w tym buforze na 30 minut

w temperaturze pokojowej. Po tym czasie trzykrotnie płukano komórki PBS i inkubowano w buforze blokującym przez następne 30 minut w temperaturze pokojowej. Komórki następnie pozostawiano na noc w wilgotnej komorze w temperaturze 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem anti-CD63, rozcieńczonym 1:200 w buforze blokującym. Następnego dnia płukano komórki sześciokrotnie PBS oraz inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny z przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z nanocząsteczkami złota rozcieńczonym, 1:50 w buforze blokującym. Po tym czasie komórki trzykrotnie przepłukano PBS, trzykrotnie podwójnie destylowaną wodą i następnie inkubowano z odczynnikiem Gold Enhance™ (NanoProbes) przez około 30 sekund w celu wzmocnienia sygnału cząstek złota. Preparaty natychmiast przepłukiwano wodą podwójnie destylowaną i PBS oraz ponownie utrwalano roztworem 1% GA w PBS w temperaturze pokojowej. Po 10 minutach preparaty przepłukiwano PBS dwukrotnie, a następnie pięciokrotnie zimnym 0,1 M buforem fosforanowym. Kolejno postępowano tak jak w rozdziale 3.2.7.1. rozpoczynając od 30 minutowej inkubacji w 1% roztworze zredukowanego tetratlenku osmu na lodzie.

3.2.9. Analiza wydzielania wybranych cytokin

3.2.9.1. Test ELISA

W celu ilościowej analizy wydzielanych cytokin, interleukiny 6 oraz 8, zastosowano test ELISA typu „sandwich”. Komórki wysiewano w gęstości 3,5 tys./cm² i na dobę przed analizą zmieniano pożywkę na świeżą. Po tym czasie pożywkę zbierano, a komórki liczone w celu normalizacji wyników. Zebraną pożywkę przechowywano w temperaturze -20°C do momentu zebrania wszystkich próbek z danego doświadczenia. Analizę ilości cytokin przeprowadzano zgodnie z instrukcją do oznaczania białek R&D System. 96-dołkową płytkę opłaszczano przeciwciałami wychwytyjącymi oznaczane białko, po czym niezwiązane przeciwciała odpłukiwano. Następnie przeprowadzano inkubację z próbkami i po odpłukaniu niezwiązanych białek nakładano przeciwciała skoniugowane z peroksydazą chrzanową przeciwko analizowanym białkom. Po wypłukaniu ich nadmiaru, dodawano substrat dla peroksydazy chrzanowej i prowadzono reakcję do momentu otrzymania niebieskiego zabarwienia, po czym reakcję zatrzymywano poprzez obniżenie pH i dokonywano pomiaru

kolorymetrycznego przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru Tecan Sunrise (Tecan). Uzyskane wyniki absorbancji porównywano do krzywej wzorcowej.

3.2.9.2. Analiza cytometryczna

Profil cytokin uwalnianych przez komórki VMSC oznaczano z wykorzystaniem zestawów LEGENDplex HU Proinflammatory Chemokine Panel 1 oraz 2 (BioLegend, USA), opartych na użyciu mikrokulek pokrytych specyficznymi przeciwciałami. Detekcję sygnału przeprowadzano metodą cytometrii przepływowej. Analizowany materiał stanowiła pożywka hodowlana pobrana z komórek, pierwotnie zgromadzona do badań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Badania obejmowały komórki proliferujące, analizowane po 96 godzinach od wysiania i utrzymywane w pożywce zawierającej DMSO, jak również komórki ulegające starzeniu indukowanemu, oceniane siedem dni po indukcji procesu starzenia doksorubicyną (podaną w stężeniu 1 μ M na 2 godziny), traktowane DMSO lub simwastatyną w stężeniach 100 oraz 250 nM. Wszystkie etapy analizy realizowano zgodnie z instrukcją producenta zestawu.

Do pobranej pożywki dodawano mikrokulki znakowane przeciwciałami, a następnie próbki inkubowano przez 2 godziny na wytrząsarce (800 rpm) w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji próbki dwukrotnie płukano, dodawano mieszaninę biotynylowanych przeciwciał rozpoznających oznaczane białka i inkubowano przez kolejną godzinę w analogicznych warunkach. Następnie do każdej próbki wprowadzano streptawidynę sprzężoną z fluorochromem fikoerytrynę i prowadzono inkubację przez 25 minut przy 800 rpm na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Po tym etapie płytkę ponownie płukano, dodawano bufor płuczający i przechowywano do czasu wykonania analizy cytometrycznej, którą przeprowadzano następnego dnia z wykorzystaniem cytometra Aurora (Cytek).

Uzyskane dane poddano obróbce i analizie przy użyciu oprogramowania Qognit, dostępnego online na stronie producenta BioLegend.

3.2.10. Izolacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)

Do izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych korzystano z protokołu opracowanego przez Clotilde Thery²⁴³ z kilkoma modyfikacjami. W celu izolacji EVs komórki wysiewano w gęstości

8 tys./cm² na butelki hodowlane typu T75 i postępowano dalej zgodnie ze schematem doświadczenia jak opisano w rozdziale 3.2.2. Na dobę przed izolacją pożywkę wymieniano na pożywkę pozbawioną surowicy. Po 24 godzinnej inkubacji pożywkę z nad komórek (dalej określaną jako medium kondycjonowane) zbierano do ułożonych na lodzie falkonów, a komórki po odcięciu od podłoża za pomocą trypsyny liczone w celu normalizacji wyników. Pożywkę wirowano przez 20 minut przy prędkości 1280 x g w wirówce MPW-350R. Następnie supernatant przenoszono do specjalnych poliwęglanowych próbek (Beckman Coulter) i najpierw ultrawirovano przez 30 minut przy prędkości 10000 x g, a następnie po przeniesieniu do świeżych próbek 1 godzinę 30 min przy prędkości 100000 x g. Wszystkie wirowania odbywały się w temperaturze 4°C. Do ultrawirowania korzystano z ultrawirówki Beckman Coulter Optima XPN-100 i rotora typu 45Ti. Po zakończonej izolacji, uzyskany pelet zawieszano w 50 µl sterylnego i świeżo otwartego PBS i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.10.1. Pomiar wielkości i ilości wyizolowanych pęcherzyków

Stężenie oraz rozkład wielkości wyizolowanych pęcherzyków analizowano za pomocą techniki NTA (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) z użyciem aparatu NanoSight NS300 (Malvern Instruments). NTA bazuje na właściwościach rozpraszania światła lasera oraz ruchach Browna w celu analizy rozkładu wielkości nanocząstek w cieczy. Zapisywany przez kamerę aparatu film, na którym cząstki są widoczne jako świetlne punkty, jest analizowany przez wbudowane oprogramowanie oraz wyliczany jest współczynnik dyfuzji każdej zarejestrowanej cząstki. Wielkość badanych cząstek jest wyznaczana przez zastosowanie równania Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji cząstek (m²/s),

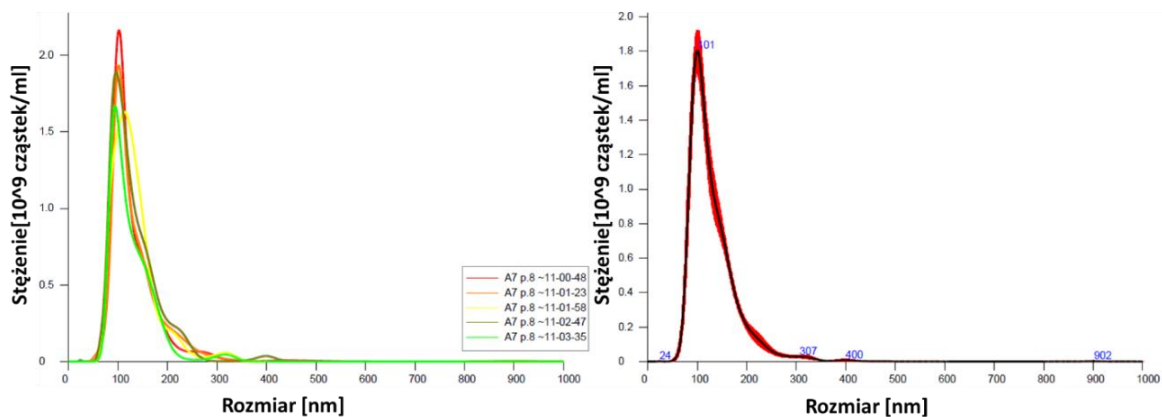
K_B - stała Boltzmanna (1.38×10⁻²³ J/K),

T - temperatura absolutna (K),

η - lepkość cieczy (Pa·s),

r - promień (lub promień zastępczy) cząstki (m).

Przed pomiarem każda próbka była rozcieńczana 1:1000 w czystym PBS, mierzona przez zarejestrowanie pięciu trzydziestosekundowych filmów i analizowana za pomocą wbudowanego oprogramowania NanoSight NTA 3.2. Build 3.2.16. Przykładowy rozkład wielkości mierzonych pęcherzyków przedstawiono na Rycinie 3.1.



Ryc. 3.1. Przykładowe wykresy z NanoSight NTA 3.2. przedstawiające rozkład wielkości mierzonych EVs. Lewy wykres przedstawia wyniki pięciu pojedynczych pomiarów, prawy przedstawia wyniki uśrednionych pięciu pomiarów.

3.2.11. Sekwencjonowanie RNA (RNAseq)

3.2.11.1. Izolacja RNA

RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji całkowitego RNA (RNAeasy Micro Kit, Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta i zawieszano w wodzie wolnej od RNaz. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono wykorzystując spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), gdzie stosunek absorpcji A_{260} do A_{280} mieszczący się w granicach od 1,8 do 2,0 wykazywał odpowiednią jakość RNA, odpowiednią do zastosowania kolejnych kroków.

3.2.11.2. Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania mRNA

Analiza została przeprowadzona w Pracowni Sekwencjonowania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Jakość RNA do RNAseq sprawdzano określając RIN (ang. *RNA integrity number*). Parametr ten wyznaczany był przy użyciu urządzenia 2100 Bioanalyzer (Agilent) i dedykowanych dla niego zestawów odczynników Agilent RNA 6000 Pico Kit.

Procedura przygotowania bibliotek do sekwencjonowania mRNA wykonana została przy użyciu zestawu KAPA Stranded mRNAseq Kit (KAPA Biosystems Ltd) zgodnie z instrukcjami producenta, ale metoda została zaadaptowana do własnych potrzeb. Metoda izolacji mRNA z puli całkowitego RNA opiera się w tym przypadku na wykorzystaniu kulek magnetycznych z przyłączonymi ogonkami poli-T, do których specyficznym przyłączają się tylko cząsteczki polyA+ mRNA. Jako materiał wyjściowy w procedurze stosowano 500 ng całkowitego RNA. Kolejnym krokiem po wyizolowaniu mRNA jest fragmentacja termiczna materiału (94°C, 5 minut dla próbek z wartością RIN większą niż 7 oraz 94°C, 3 minuty dla próbek z wartością RIN niższą niż 7). W następnym etapie mRNA przepisywane jest na cDNA, syntetyzowana jest kolejno pierwsza i druga nić cDNA. Pierwsza nić cDNA uzyskiwana jest z użyciem starterów przyłączających się losowo do wszystkich regionów RNA (ang. *random primers*). W ten sposób uzyskiwana jest przejściowa struktura hybrydowa cDNA-RNA, która następnie przekształcana jest w dwuniciowe cDNA z jednoczesnym włączeniem dUTP do drugiej nici cDNA. Specyficzność nici uzyskiwana jest w czasie syntezy komplementarnego łańcucha nici.

Uzyskane dwuniciowe cDNA oczyszczano z użyciem kulek magnetycznych AMPure XP. Kolejny etap to ligacja sekwencji adaptorowych, które przez wzgląd na swoją strukturę pętli muszą następnie zostać przecięte przez przeznaczony do tego enzym USER (NEB, Ipswich, MA, USA), aby umożliwić zajście procesu końcowej amplifikacji biblioteki. Co istotne, druga syntetyzowana nić DNA zawierająca dUTP nie jest amplifikowana, ponieważ polimeraza jest specyficzna tylko dla nukleotydów występujących w DNA. W konsekwencji sprawia to, że odczyty pochodzące bezpośrednio z transkryptów są zawsze niciowo-zgodne z odczytem R2 pochodzącym z sekwencjonowania typu *paired-end*.

Końcowe stężenie uzyskanej biblioteki oraz jej czystość wyrażoną w postaci wartości $A_{260/280}$ (zakres prawidłowych wartości parametru 1,8-2,2) mierzono za pomocą urządzenia Nanodrop (Thermo Scientific), a także z wykorzystaniem urządzenia Quantus Fluorometer i dedykowanego dla niego zestawu odczynników QuantiFluor dsDNA System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Oceny jakości biblioteki dokonywano przy użyciu urządzenia 2100

Bioanalyzer (Agilent) i dedykowanego dla niego zestawu odczynników Agilent High Sensitivity DNA Kit.

Sekwencjonowanie nowej generacji wykonano z wykorzystaniem sekwenatora Illumina NovaSeq 6000. Biblioteki sekwencjonowano w trybie sparowanych końców (ang. *paired-end sequencing*) 2x151. Celem było uzyskanie 25 mln odczytów dla każdej próbki.

3.2.11.3. Przetwarzanie wstępne danych i analiza

Kontrola jakości odczytów została przeprowadzona przy użyciu programu FastQC (v. 0.11.9). Usuwanie sekwencji adapterów oraz przycinanie odczytów pod względem jakości wykonano odpowiednio za pomocą cutadapt (v. 3.4) oraz TrimGalore (v. 0.6.7), przy czym parametr jakości w TrimGalore ustawiono na wartość 25. Odczyty zmapowano do referencyjnego genomu człowieka przy użyciu programu STAR (v. 2.7.9a) z domyślnymi ustawieniami. Jako plik adnotacji GTF wykorzystano adnotacje z wydania Ensembl 105. Duplikaty odczytów oznaczono przy użyciu narzędzia Picard MarkDuplicates (v. 2.27.4-SNAPSHOT). Końcowa kontrola jakości została zestawiona przy użyciu MultiQC (v. 1.13) na podstawie wyników z RSeQC (v. 3.0.1) oraz wyżej wymienionych narzędzi.

Zliczanie odczytów przypisanych do cech genomowych przeprowadzono za pomocą programu featureCounts (v. 2.0.0) dla danych sparowanych (*paired-end*), uwzględniając wyłącznie pierwotne dopasowania oraz odczyty zgodne z odwróconą orientacją nici (*reverse stranded*). Minimalna wartość jakości mapowania (MAPQ) wymagana do uwzględnienia odczytu w zliczeniach została ustawiona na 3.

Analizy różnicowej ekspresji oraz analizy funkcjonalne wykonano w środowisku R (v. 4.1.3). Analizę różnicowej ekspresji przeprowadzono z użyciem pakietu DESeq2 (v. 1.34) z domyślnymi parametrami. Cechy, dla których suma zliczeń była mniejsza niż 10 we wszystkich próbkach, zostały wykluczone z dalszej analizy. Analizę funkcjonalną przeprowadzono z wykorzystaniem funkcji `enrichPathway()`, natomiast analizę wzbogacenia zestawów genów (GSEA) z użyciem funkcji `gsePathway()`, obie z pakietu ReactomePA (v. 1.38). Za istotne statystycznie uznawano wyniki z wartością $p < 0,05$.

Wizualizacje wyników wygenerowano przy użyciu pakietów ggplot2 (v. 3.5.1), enrichplot (v. 1.14.1) oraz ComplexHeatmap (v. 2.10.0).

3.2.12. Analiza proteomiczna

Analizę przeprowadzono w Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

Analizę proteomiczną przeprowadzono z zastosowaniem ilościowej metody znakowania izobarycznego TMTpro 16-plex, umożliwiającej jednoczesną analizę i porównanie 16 próbek biologicznych w jednym eksperymencie LC–MS/MS. Zastosowanie znakowania TMT pozwala na analizę wszystkich próbek wchodzących w skład jednego zestawu w identycznych warunkach analitycznych, a także umożliwia efektywne frakcjonowanie połączonej puli peptydów. Takie podejście znacząco zwiększa głębokość analizy proteomicznej oraz liczbę zidentyfikowanych białek, co jest szczególnie istotne w przypadku próbek o szerokim zakresie stężeń białek i wysokiej złożoności, takich jak lizaty mięśniowe czy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane do pożywek zawierających dodatki białkowe.

Analizie poddano lizaty komórkowe mięśni gładkich naczyń oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) przez nie wydzielane.

3.2.12.1. Przygotowanie próbek

Próbki przygotowano metodą SP3 (ang. *Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation*), która umożliwia oczyszczanie i trawienie białek w jednym naczyniu przy minimalnych stratach materiału. Białka inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 60°C w obecności 10 mM tris(2-karboksyetylo)fosfiny w celu redukcji mostków disiarczkowych. Następnie grupy tiolowe cystein zablokowano przy użyciu metanotiosulfonianu metylu.

Do każdej próbki dodawano 40 µl mieszaniny kulek magnetycznych do SP3 (Sera-Mag Carboxyl hydrofilowych i hydrofobowych) oraz acetonitrylu z dodatkiem 1% kwasu mrówkowego, uzyskując końcowe stężenie acetonitrylu wynoszące 85%. Wiązanie białek do kulek prowadzono przez 30 minut na wytrząsarce, po czym cząstki magnetyczne przemywano trzykrotnie 85% etanolem oraz jednokrotnie czystym acetonitrylem w celu usunięcia zanieczyszczeń.

Trawienie enzymatyczne przeprowadzono poprzez dodanie 2 µg trypsyny zawieszanej w 100 µl 100 mM buforu TEAB i inkubację próbek przez noc w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu trawienia roztwór peptydów przenoszono do nowych probówek, a pozostałe na kulkach

peptydy eluowano dodatkowo przy użyciu 1% DMSO w wodzie oraz wody. Połączone eluaty suszono w SpeedVac i rozpuszczano w 100 mM buforze TEAB.

3.2.12.2. Znakowanie TMTpro

Stężenie peptydów oznaczano metodą kolorymetryczną. Dla lizatów komórkowych do znakowania przeznaczono po 30 µg peptydów. W przypadku pęcherzyków zewnątrzkomórkowych znakowano objętość próbki odpowiadającą pęcherzykom wydzielonym przez 1205000 komórek, co odpowiadało 10-37 µg peptydów. Ilości peptydów EVs nie wyrównywano przed znakowaniem, aby zachować biologiczne proporcje wydzielanych pęcherzyków oraz ich białkowego cargo, przyjmując, że pomiędzy badanymi grupami mogą występować istotne różnice w składzie EVs.

Znakowanie prowadzono zgodnie z instrukcją producenta odczynników TMTpro (Thermo Scientific) w 70 µl 100 mM buforu TEAB. Wydajność znakowania oceniono metodą LC-MS i wynosiła 99,6% dla lizatów komórkowych oraz 99,1% dla EVs. Reakcję znakowania zatrzymywano przy użyciu hydroksyloaminy, po czym znakowane peptydy w obrębie każdego zestawu TMT łączono.

3.2.12.3. Oczyszczanie i frakcjonowanie peptydów

Połączone peptydy oczyszczano metodą chromatografii odwróconych faz z użyciem czterech kolumn Oasis HLB o masie sorbentu 30 mg na każdy zestaw TMT. Kolumny kondycjonowano metanolem oraz 1,5% acetonitrylem w 0,1% kwasie mrówkowym, następnie nanoszono próbki, płukano i eluowano peptydy 90% acetonitrylem w 0,1% kwasie mrówkowym. Eluaty suszono i rozpuszczano w 10 mM wodorotlenku amonu.

Frakcjonowanie przeprowadzono metodą chromatografii odwróconych faz prowadzonej w warunkach wysokiego pH na kolumnie XBridge Peptide BEH C18 z wykorzystaniem systemu Waters Acquity UPLC H-class. Elucję monitorowano przy długości fali 214 nm. Frakcje zbierano do płytki 96-dołkowej, rozpoczynając zbieranie po 2 minutach i kolekcjonując jedną frakcję na minutę, uzyskując łącznie 48 frakcji. Po wysuszeniu frakcje poddano konkatencji poprzez łączenie co 24. frakcji, uzyskując 24 frakcje końcowe dla każdego zestawu TMT, które następnie rozpuszczano w fazie A do LC (0,1% kwas mrówkowy w wodzie).

3.2.12.4. Analiza LC–MS/MS

Analizę chromatografii cieczerwnej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS, ang. *liquid chromatography–mass spectrometry*) przeprowadzono z wykorzystaniem systemu Evosep One sprzężonego ze spektrometrem mas Orbitrap Exploris 480. Dla każdej frakcji mierzono około 2 µg peptydów. Próbki nanoszono na jednorazowe prekolumny Evotip Pure C18, a rozdział chromatograficzny prowadzono przy przepływie 0,5 µl/min z zastosowaniem 44-minutowego przeprogramowanego gradientu.

Dane zbierano w trybie dodatnim z zastosowaniem akwizycji zależnej od danych (DDA). Widma MS1 rejestrowano przy rozdzielczości 60000, w zakresie m/z 300–1700, z automatycznym czasem akumulacji jonów oraz docelową wartością AGC 300%. Wybór jonów prekursorowych do fragmentacji oparto na kryterium Precursor Fit, zapewniającym selekcję jonów o najlepszym dopasowaniu izotopowym i ograniczającym współizolację, co ma szczególne znaczenie przy analizie TMT. Widma MS2 rejestrowano przy rozdzielczości 30000, stosując okno izolacji 1,2 m/z oraz fragmentację metodą HCD z względną energią kolizyjną 30%. Do ilościowej analizy sygnałów reporterowych zastosowano tryb TurboTMT, zoptymalizowany pod kątem odczytników TMTpro.

3.2.12.5. Analiza danych

Analizę surowych danych wykonano za pomocą programu MaxQuant/Andromeda (wersja 2.5) z wykorzystaniem referencyjnej bazy danych białek ludzkich zdeponowanych w serwisie UniProt (20666 sekwencji, wersja 2024_04). Identyfikację i ilościową analizę białek przeprowadzono z użyciem standardowych parametrów dla danych znakowanych TMT.

Dalszą analizę danych przeprowadzono w programie Perseus (wersja 1.6.15). Dane normalizowano na medianę sygnału. Na podstawie analizy głównych składowych (PCA) z dalszych analiz wykluczono próbki lizatu komórkowego oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które wykazywały charakter odstający.

Różnice pomiędzy badanymi grupami oceniano z wykorzystaniem testu t Studenta, z korektą FDR na wielokrotność testowania.

3.2.13. Analiza porównawcza oraz wizualizacja danych transkryptomicznych i proteomicznych

Do wizualizacji danych wielkoskalowych wykorzystano narzędzia dostępne online: VolcaNoseR, InteractiVenn, STRING, MORPHEUS.

3.2.14. Analiza statystyczna

Prezentowane wyniki stanowią średnie z co najmniej 3 powtórzeń biologicznych. Dokładna liczba powtórzeń została zamieszczona w opisach figur. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ze standardowym błędem pomiaru (SEM) lub wartość minimum (min), kwartył 1 (Q1), mediana, kwartył 3 (Q3), wartość maksimum (max), dokładna informacja zamieszczona w opisach figur. Do określenia normalności rozkładu zmiennej użyto testu Shapiro-Wilka. Do porównania grup użyto test t-studenta lub jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test post-hoc Dunnett'a (w przypadku porównania badanych grup z kontrolą) lub test post-hoc Tukey'a (w przypadku porównania wszystkich badanych grup między sobą). Wyniki zostawały uznawane za istotne statystycznie jeśli $p \leq 0,05$. Istotność statystyczną oznaczano względem odpowiedniego wariantu kontrolnego lub wariantu wskazanego na wykresie, gdzie * ($p \leq 0,05$); ** ($p \leq 0,01$); *** ($p \leq 0,001$); **** ($p \leq 0,0001$). Do analizy statystycznej wykorzystywano program GraphPad Prism 9.

4. Wyniki



Ryc. 4.1. Schemat doświadczenia. Komórki będące na wczesnych pasażach wysiewano, a następnie w celu indukcji starzenia, komórki kontrolne traktowano po 24 godzinach doksorubicyną o stężeniu 150 nM na 7 dni, a następnie zbierano po 1 (SIPS I) i 4 (SIPS IV) tygodniach od traktowania. W celu uzyskania komórek starych replikacyjnie (RS) komórki hodowano do momentu wyczerpania potencjału replikacyjnego (ok. 3 miesiące).

Badania były prowadzone na ludzkich komórkach mięśni gładkich aorty (VSMC, *ang. vascular smooth muscle cells*). W doświadczeniach wykorzystano modele eksperymentalne reprezentujące dwa różne typy starzenia komórkowego – starzenie indukowane stresem (SIPS, *ang. stress-induced premature senescence*) oraz starzenie replikacyjne (RS, *ang. replicative senescence*). Jako induktor starzenia (model I, SIPS) zastosowano doksorubicynę – inhibitor topoizomerazy IIb (TOP2B) (Ryc. 4.1). Zahamowanie topoizomerazy II prowadzi do powstania pęknięć dwuniciowych DNA²⁴⁴. Wcześniejsze prace prowadzone w naszym zespole^{245,246} pozwoliły na ustalenie stężenia doksorubicyny, które efektywnie hamuje proliferację badanych komórek przy jednoczesnym braku wpływu na ich żywotność. Wyniki tych prac były punktem wyjścia dla prowadzonych badań opisanych w niniejszej rozprawie.

Starzenie komórkowe jest procesem dynamicznym, który zmienia się w czasie. Uwzględniając ten fakt, wyznaczono dwa punkty czasowe, w których były analizowane komórki indukowane do starzenia z wykorzystaniem doksorubicyny. Etap wczesny - po 7 dniach od indukcji starzenia (tzw. SIPS I) oraz późny – po kolejnych 3 tygodniach hodowli w pożywce pozbawionej doksorubicyny (4 tygodnie od indukcji starzenia) w pożywce pozbawionej doksorubicyny (tzw. SIPS IV).

Drugi model eksperymentalny – starzenie replikacyjne (RS), opierał się na uzyskaniu populacji komórek, które uległy starzeniu replikacyjnemu, co wiązało się z długotrwałą (około

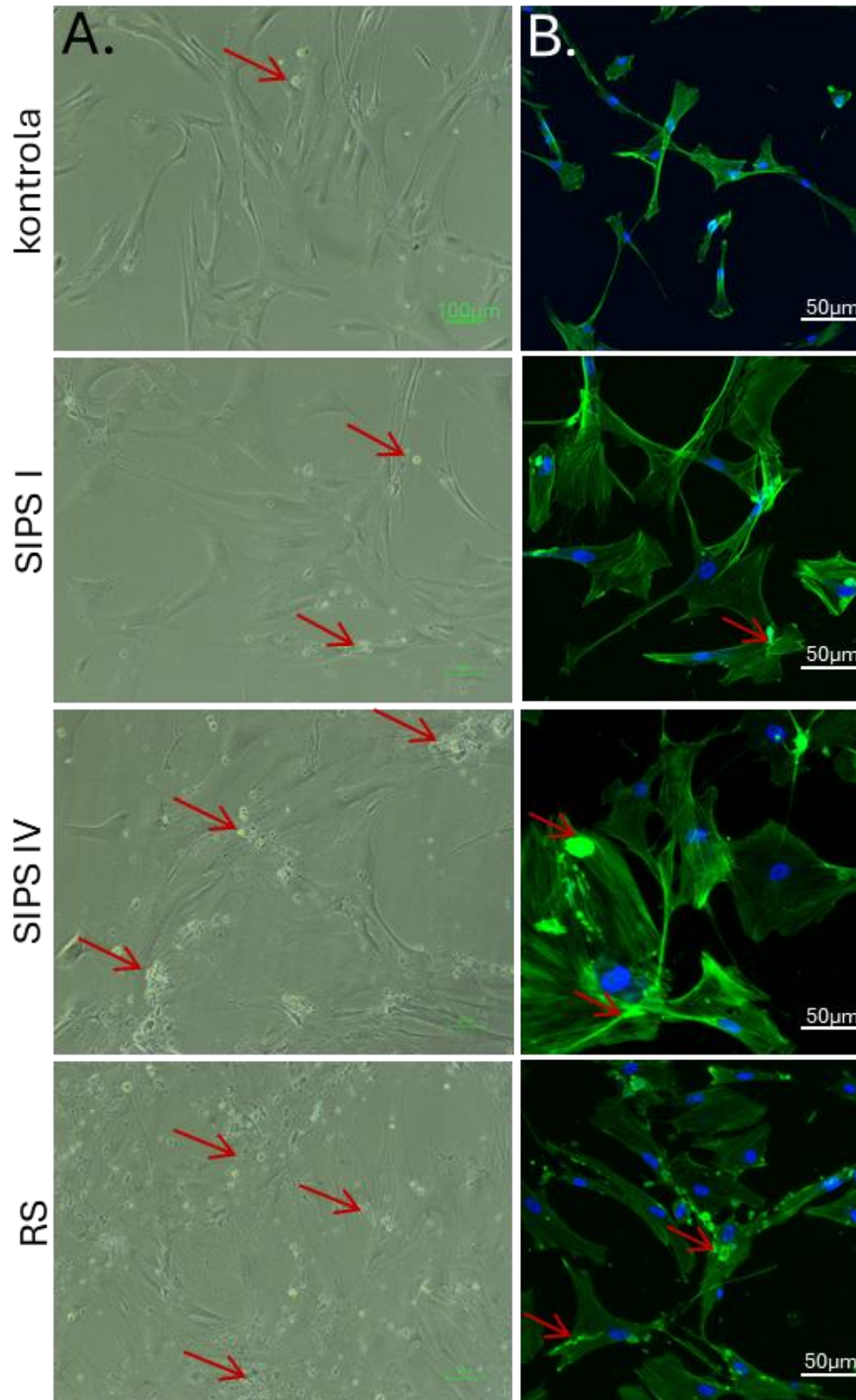
3-miesięczną) hodowlą komórek, która prowadziła do utraty potencjału replikacyjnego i trwałego zahamowania proliferacji, potwierdzanego stałą liczbą komórek.

We wszystkich przeprowadzonych analizach, komórki stare (SIPS i RS) porównywano z komórkami młodymi (kontrola, wczesne pasaże, $p < 9$), o zachowanym potencjale proliferacyjnym.

4.1. Charakterystyka starzenia komórek VSMC przeprowadzona na podstawie wybranych markerów

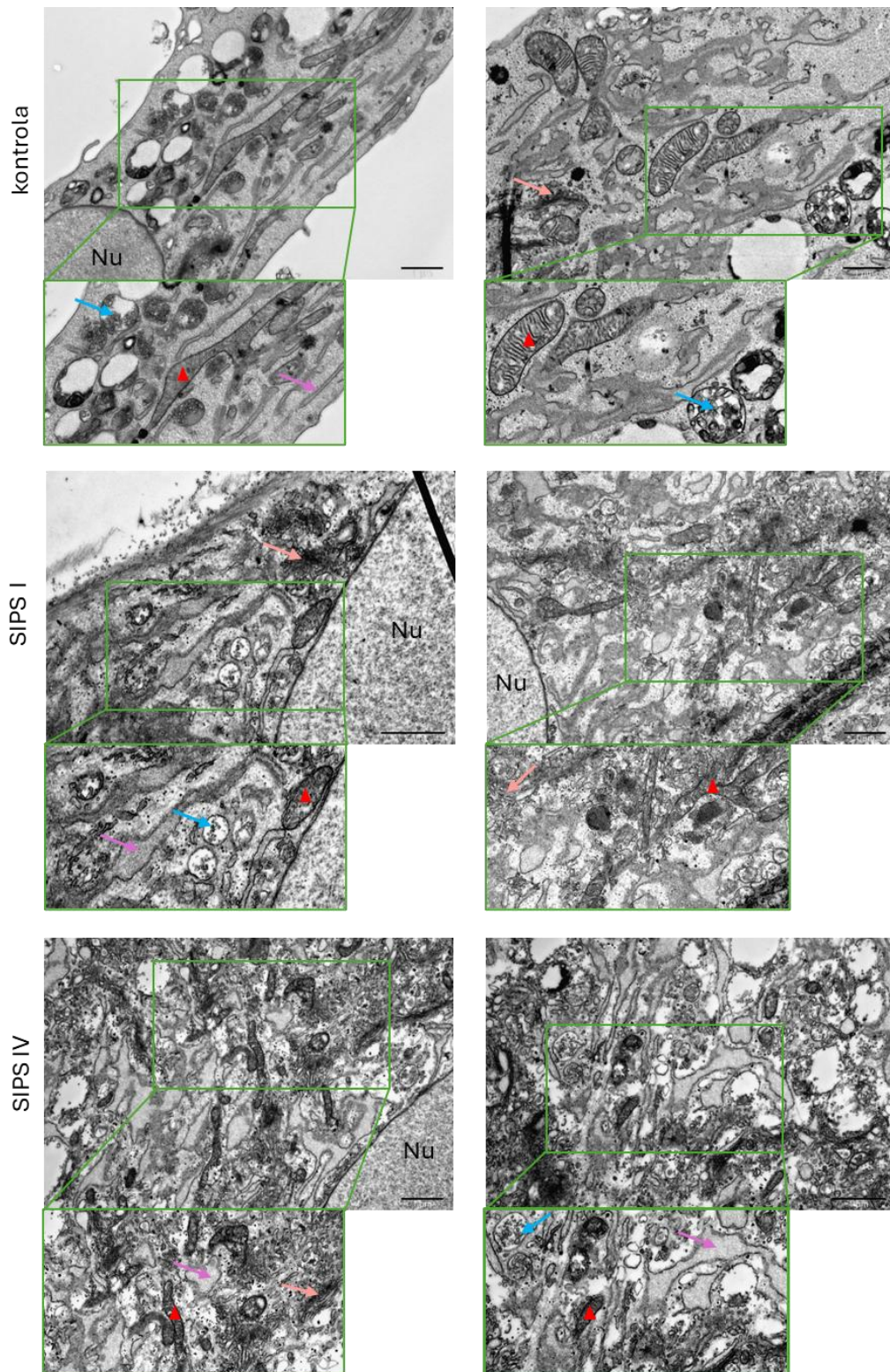
4.1.1. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach VSMC na różnych etapach procesu starzenia indukowanego stresem oraz replikacyjnego

Komórki poddane działaniu doksorubicyny oraz komórki, które wyczerpały potencjał proliferacyjny charakteryzowały się zmienioną morfologią. Młode komórki miały wrzecionowaty kształt oraz jądro komórkowe zlokalizowane w ich centralnej części. Ciało komórek opalizowało w świetle przechodzącym, co wskazuje na ich wypukłość. W trakcie starzenia, ciało komórek rozplaszczało się, zwiększając swoją powierzchnię (Ryc. 4.2A). Komórki na późnym etapie starzenia (SIPS IV) były zauważalnie większe niż komórki na wczesnym etapie tego procesu (SIPS I), zaś komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu miały rozmiary zbliżone do komórek na wczesnym etapie starzenia indukowanego stresem. Podobnie jak ciało komórki, powiększeniu ulegało również jądro. Na powierzchni komórek starych obserwowano liczne, kuliste, opalizujące i wypełnione aktyną struktury, będące, prawdopodobnie drobnymi fragmentami ciała innych komórek (czerwone strzałki). Struktury te były najliczniejsze w hodowlach komórek będących na późnym etapie starzenia (SIPS IV), jak i komórek starych replikacyjnie. Ponadto, w komórkach starych przebudowie ulegał cytoszkielet. Włókna aktynowe ulegały pogrubieniu i stawały się bardziej widoczne. Powyższe obserwacje wskazują, że zmiany morfologiczne towarzyszące starzeniu komórkowemu ewoluują i pogłębiają się w czasie (Ryc. 4.2B)



Ryc. 4.2. Reprezentatywne zdjęcia prezentujące morfologię komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) -młodych (kontrola) oraz starych będących na wczesnym (SIPS I) i późnym etapie tego procesu (SIPS IV) oraz komórek starych replikacyjnie (RS). Zdjęcia wykonano z zastosowaniem mikroskopii świetlnej (A.) oraz fluorescencyjnej (B.); jądra komórkowe wybarwione DAPI (kolor niebieski), włókna aktyny (kolor zielony), czerwone strzałki – fragmenty innych komórek (opis w tekście).

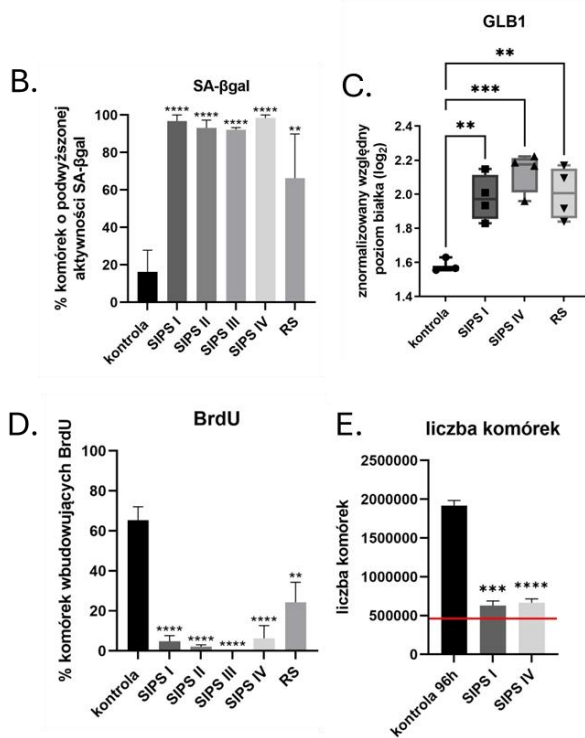
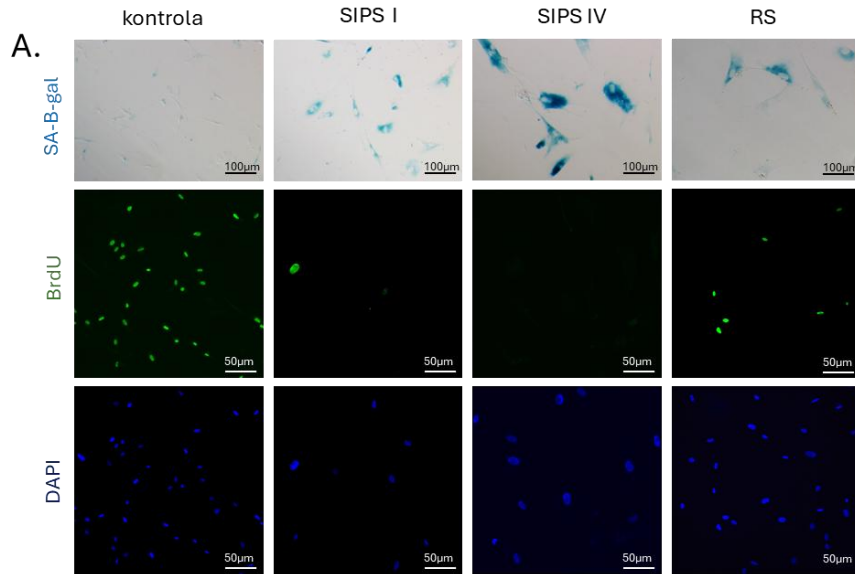
W procesie starzenia obserwowane były również zmiany na poziomie ultrastrukturalnym (Ryc. 4.3). W komórkach kontrolnych – młodych, mitochondria były owalne lub tworzyły wydłużoną sieć. Wewnątrz mitochondriów wyraźnie widoczne był regularne grzebienie. W procesie starzenia mitochondria ulegały pęcznieniu i przybierały nieregularne kształty, co wpływało na układ ich grzebieni. Siateczka śródplazmatyczna (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) komórek starych również pęczniała oraz tworzyła duże cysterny w porównaniu do ER w komórkach kontrolnych. W komórkach starych regularna forma spłaszczonych cystern aparatu Golgiego ulegała rozproszeniu, a w jego pobliżu obserwowano zwiększoną liczbę pęcherzyków. W takich komórkach starych widoczny był wzrost liczby ciałek wielopęcherzykowych (MVBs), których większość znajdowała się w pobliżu aparatu Golgiego. Cytoplazma komórek starych, przez wzrost liczby pęcherzyków, jak również pęcznienie organelli, przypominała obraz chaosu w porównaniu do zorganizowanego układu organelli w komórkach młodych.



Ryc. 4.3. Ultrastruktura komórek mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu wizualizowana przy użyciu mikroskopii elektronowej. Skala na zdjęciach wynosi 1 μm. W zielonych ramkach przedstawiono powiększone fragmenty. Nu – jądro komórkowe, czerwonymi trójkątami zaznaczono mitochondria, niebieskimi strzałkami ciała wielopęcherzykowe (MVBs), pomarańczowymi strzałkami aparat Golgiego, a fioletowymi siateczkę śródplazmatyczną (ER).

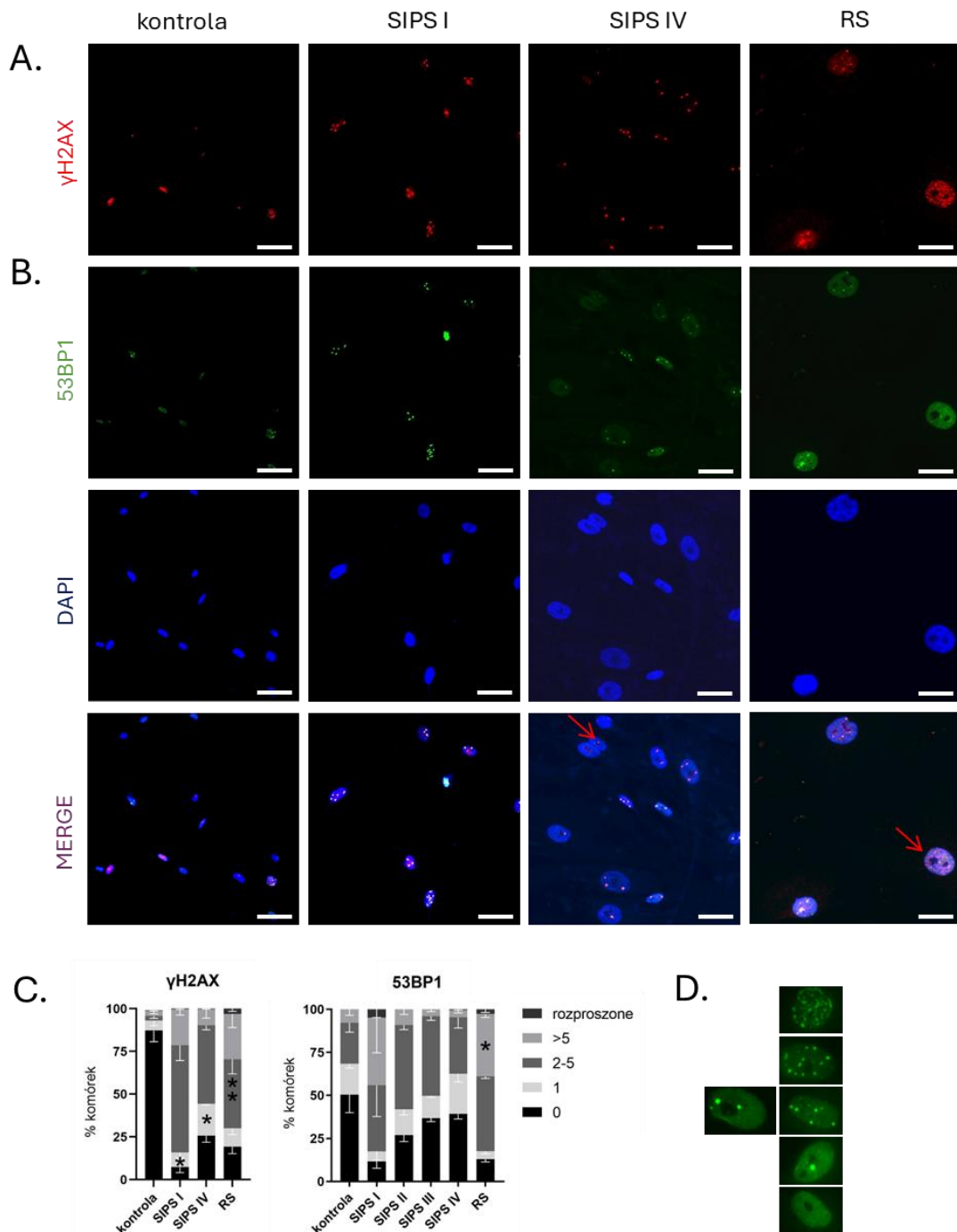
4.1.2. Zmiany w poziomie wybranych markerów starzenia w komórkach VSMC ulegających starzeniu indukowanemu stresem oraz replikacyjnemu

Komórki stare charakteryzują się podwyższoną aktywnością enzymu lizosomalnego β -galaktozydazy, aktywnej w pH 6.0 (SA- β -gal, *ang. senescence-associated β -galactosidase*), która jest markerem powszechnie stosowanym zwłaszcza w modelach *in vitro*. Ocena aktywności SA- β -gal przeprowadza się stosując test kolorymetryczny, w trakcie którego, dochodzi do przemiany bezbarwnego substratu (x-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolylo-beta-D-galaktozyd) w produkt nadający komórkom niebieskie zabarwienie. Już w pierwszym tygodniu po podaniu doksorubicyny, ponad 90% komórek wykazywało podwyższoną aktywność tego enzymu (komórki zabarwione na niebiesko). W komórkach na późnym etapie starzenia odsetek komórek z aktywną SA- β -galaktozydazą nie zmieniał się, natomiast pogłębiała się intensywność ich zabarwienia (Ryc. 4.4A, B). Komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu, również charakteryzowały się podwyższoną aktywnością tego enzymu - średnio 60% komórek była wybarwiona na niebiesko, a intensywność zabarwienia utrzymywała się na poziomie komórek na wczesnym etapie starzenia (Ryc. 4.4A, B). Ponadto, w komórkach starych, niezależnie od typu starzenia (SISP czy RS) oraz jego etapu (SIPS I czy SIPS IV) obserwowano podwyższony poziom enzymu SA- β -gal w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 4.4C). Wzrost liczby komórek z podwyższoną aktywnością SA- β -gal korelował z utratą przez nie zdolności do wbudowywania BrdU – syntetycznego analogu tymidyny, co dowodzi o zahamowaniu replikacji DNA w komórkach poddanych działaniu doksorubicyny oraz komórkach, które wyczerpały potencjał proliferacyjny (RS). Wyniki testu inkorporacji BrdU wykazały, iż 60% komórek kontrolnych w ciągu 24 godzin przeszła choć raz przez fazę syntezy DNA, co świadczy o tym, że większość z nich proliferowała. Natomiast, nie więcej niż 5% komórek po traktowaniu doksorubicyną było zdolnych do proliferacji (ryc. 4.4D). O długotrwałym zahamowaniu proliferacji świadczył brak przyrostu liczby komórek w ciągu 4 tygodni od indukcji starzenia, w warunkach hodowli 3 tygodnie, bez doksorubicyny. Co istotne, liczba komórek nie spadała poniżej wyjściowej liczby komórek poddanych działaniu doksorubicyny, co świadczy o braku toksycznego wpływu zastosowanej do indukcji starzenia dawki (Ryc. 4.4E). Wśród komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu odsetek komórek proliferujących utrzymywał się na poziomie około 25% (Ryc. 4.4D).



Ryc. 4.4. Analiza markerów starzenia i proliferacji w komórkach VSMC poddanych działaniu doksorubicyny oraz komórkach VSMC, które wyczerpały potencjał proliferacyjny po długotrwałej hodowli. A. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające wynik testu kolorymetrycznego na aktywność SA-β-gal oraz reprezentatywne zdjęcia ilustrujące zdolność komórek do wbudowywania BrdU do DNA w ciągu 24-godzinnej hodowli w obecności nukleozydu. Wykresy przedstawiają: B. Analizę ilościową komórek o podwyższonej aktywności SA-β-gal, n=3-5. C. Poziom białka GLB1 (dane zostały uzyskane w oparciu o analizę proteomu metodą spektrometrii mas, n=3-4. D. Procent komórek wbudowujących BrdU, n=3-5. E. Analizę liczby komórek kontrolnych oraz poddanych działaniu doksorubicyny - 7 dni (SIPS i) i 4 tygodnie (SIPS IV) po traktowaniu doksorubicyną; czerwona linia oznacza liczbę komórek wysianych 24h przed podaniem doksorubicyny (500 000), n=5. C - wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max); B, D, E – średnia ±SEM.

Jednym z podstawowych markerów starzenia jest obecność w jądrze komórkowym nienaprawionych uszkodzeń DNA – dwuniciowych pęknięć. W celu określenia liczby dwuniciowych uszkodzeń DNA wykonano immunocytochemiczną detekcję białek związanych z aktywacją odpowiedzi na uszkodzenia DNA - histonu H2AX ufosforylowanego na serynie 139 (γ H2AX), oraz białka 53BP1. Obydwa białka lokalizują się w bezpośrednim sąsiedztwie pęknięcia DNA i dzięki temu są wykrywane w formie charakterystycznych skupisk. W pierwszym tygodniu po podaniu doksorubicyny znacząco wzrosła liczba komórek z uszkodzeniami DNA. W kolejnych tygodniach procesu starzenia uszkodzenia ulegały tylko częściowej naprawie, o czym świadczy fakt, że pomiędzy I a IV tygodniem starzenia liczba komórek, w których nie stwierdzono żadnych uszkodzeń – braku skupisk γ H2AX i 53BP1, zwiększyła się około 2,5-krotnie. Tym nie mniej, w dalszym ciągu najliczniejszą grupę wśród komórek starych stanowiły komórki z dwoma lub więcej uszkodzeniami (skupiska γ H2AX), zaś wśród komórek proliferujących takie komórki stanowiły około 15% (Ryc. 4.5). Komórki stare replikacyjnie wykazywały poziom uszkodzeń DNA (liczbę skupisk γ H2AX) pośredni pomiędzy poziomem uszkodzeń obserwowanym w komórkach SIPS I a SIPS IV. Zaobserwowano różnice pomiędzy liczbą skupisk γ H2AX a 53BP1. Około połowa komórek kontrolnych charakteryzowała się obecnością przynajmniej jednego skupiska 53BP1. Po indukcji starzenia odsetek komórek z co najmniej jednym uszkodzeniem nici DNA wzrósł do około 90%. W kolejnych tygodniach po traktowaniu rozkład liczby skupisk 53BP1 coraz bardziej przypominał ten zaobserwowany w komórkach kontrolnych. Co ciekawe, komórki, które uległy starzeniu replikacyjnemu charakteryzowały się rozkładem skupisk białka 53BP1 podobnym do tego obserwowanego w komórkach na wczesnym etapie starzenia indukowanego stresem (SIPS I). Obydwa białka, choć należące do tej samej ścieżki sygnałowej, pełnią odmienne funkcje. γ H2AX „zaznacza” miejsca uszkodzenia nici DNA inicjując kaskadę zdarzeń, która prowadzi do uruchomienia naprawy DNA. W naprawie istotną rolę odgrywa białko 53BP1. W związku z tym obserwowane różnice w odsetkach poszczególnych grup komórek z określoną liczbą skupisk badanych białek, które mogą wynikać z dynamiki procesu identyfikacji i naprawy uszkodzonego DNA.



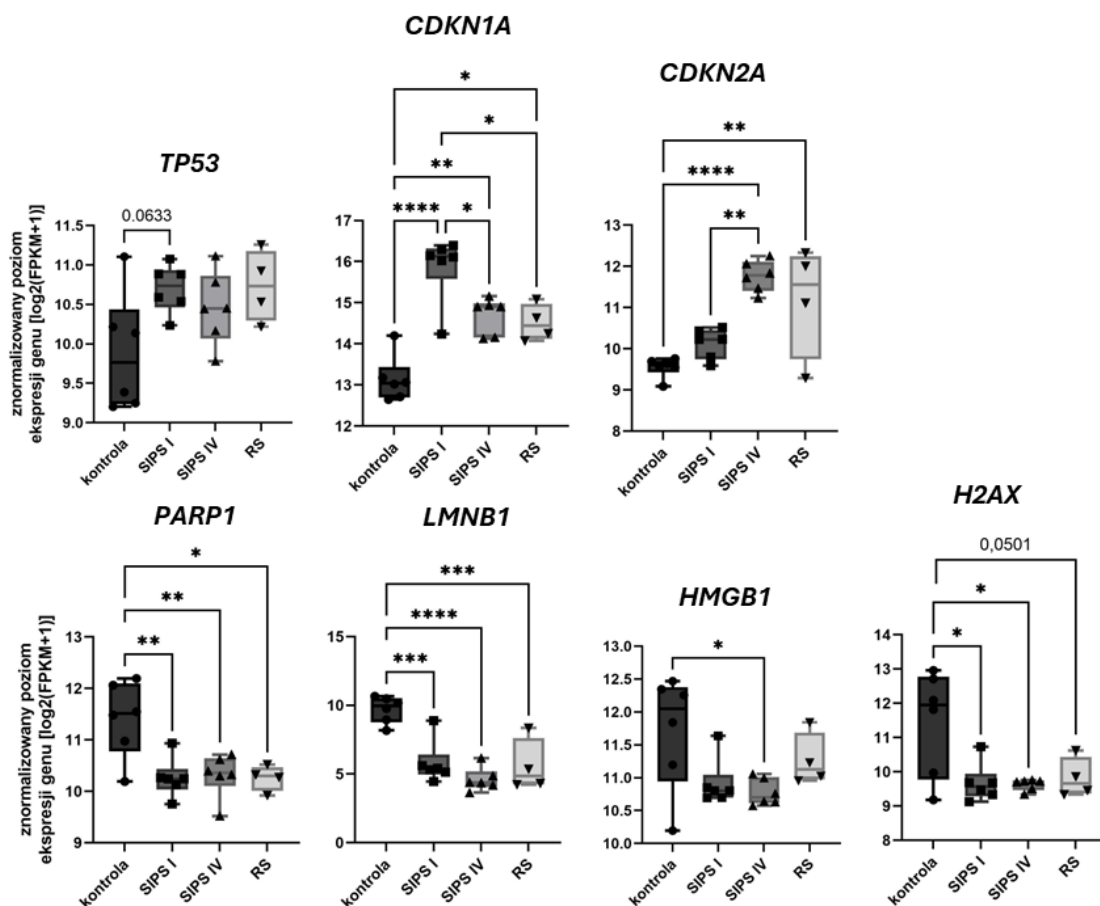
Ryc. 4.5. Analiza liczby uszkodzeń DNA w komórkach VSMC ulegających starzeniu (SIPS, RS) na podstawie immunocytochemicznej detekcji białek γ H2AX oraz 53BP1. A, B. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające immunocytochemiczną detekcję białek γ H2AX i 53BP1 w komórkach VSMC. Skala 50 μ m, C. Wykresy przedstawiające odsetek komórek VSMC o określonej liczbie skupisk białka γ H2AX oraz 53BP1 w jądrze komórkowym, średnia \pm SEM, n=3-5, D. Przykładowe zdjęcia jąder komórkowych z liczbą skupisk dla każdej z wyodrębnionych w analizie grup komórek. Czerwone strzałki – kolokalizacja białek.

4.1.3. Analiza ekspresji genów oraz poziomu białek, uznawanych za markery starzenia

W kolejnym etapie porównano zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących białka, będące markerami procesu starzenia, takie jak: p53, p21 i p16 - zaangażowane w indukcję starzenia, lamina B1 (LMNB1) – białko otoczki jądrowej, HMGB1 – białko chromatyny, histon H2AX i PARP1 – białka uczestniczące w naprawie DNA.

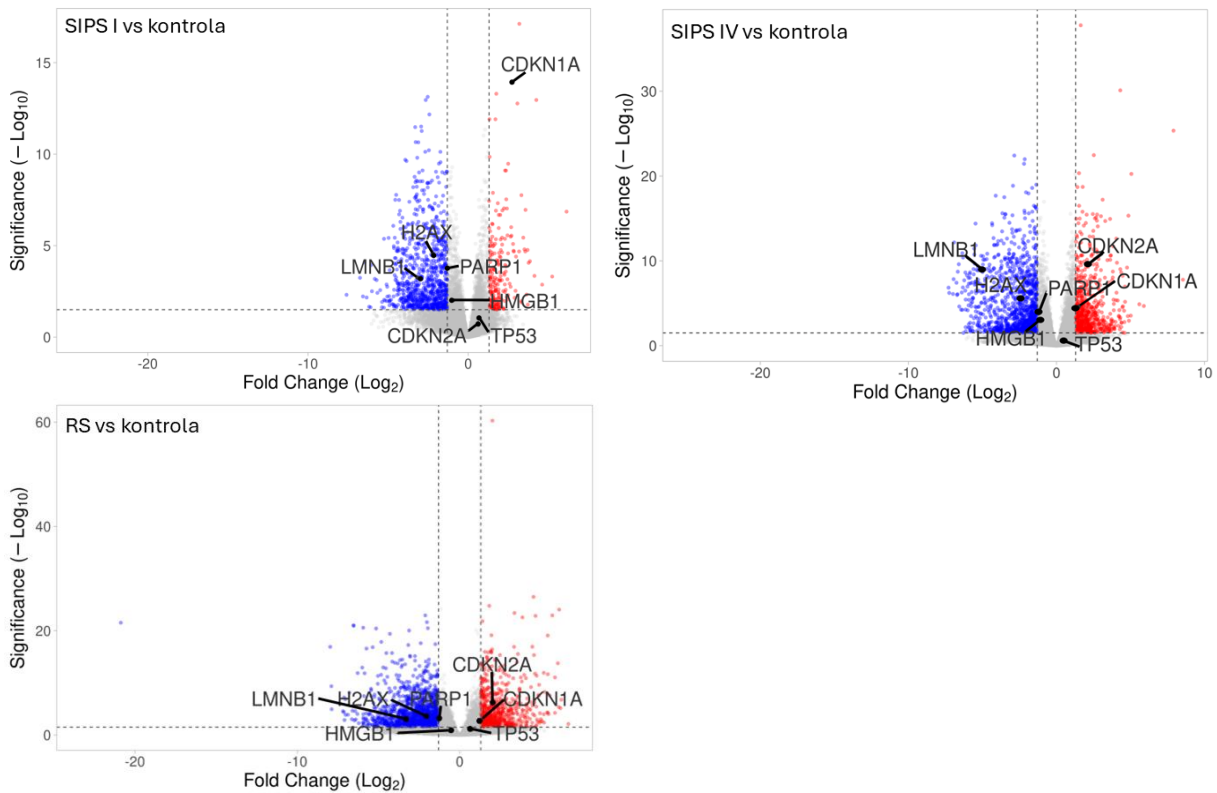
Ekspresja genu *TP53*, kodującego białko p53, wzrosła na początkowym etapie (SIPS I) i utrzymywała się na podobnym poziomie, zarówno na późnym etapie (SIPS IV), jak i w starzeniu replikacyjnym (RS). Stwierdzono również istotnie statystyczny wzrost ekspresji genu kodującego białko p21 (*CDKN1A*), która osiągnęła najwyższą wartość w pierwszym tygodniu starzenia (SIPS I), po czym obniżyła się i utrzymywała na podobnym poziomie w komórkach SIPS IV i RS, będąc w dalszym ciągu istotnie wyższa niż w komórkach kontrolnych. Z kolei ekspresja genu *CDKN2A*, kodującego białko p16, sukcesywnie rosła w czasie, jednak istotny wzrost odnotowano dopiero w czwartym tygodniu starzenia indukowanego oraz w starzeniu replikacyjnym. Poziom ekspresji genów kodujących PARP1, LMNB1 oraz HMGB1 spadał już na wczesnym etapie starzenia i utrzymywał się na porównywalnym, niskim poziomie zarówno w SIPS IV, jak i RS.

Wyniki te wskazują, iż ekspresja genów kodujących białka uczestniczące w indukcji starzenia, takie jak p16 i p21, zmienia się w czasie, korelując z wczesnym (SIPS I) lub późnym (SIPS IV) etapem starzenia indukowanego stresem. Natomiast ekspresja genów kodujących białka związane ze strukturą jądra komórkowego utrzymuje się na podobnym, niskim poziomie wkrótce po indukcji starzenia, jak i po dłuższym czasie (Ryc. 4.6).



Ryc. 4.6. Poziomu ekspresji wybranych genów kodujących białka związane ze starzeniem. Przedstawione dane zostały uzyskane w oparciu o analizę RNAseq. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4-6.

Opierając się na analizie różnicowej genów, których ekspresję zbadano na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego stresem oraz w starzeniu replikacyjnym komórek VSMC stwierdzono, że spośród wybranych markerów starzenia, w porównaniu ze wszystkimi zidentyfikowanymi genami o różnicowej ekspresji, najbardziej istotnie statystycznie i zarazem najbardziej znacząco ($\log_2FC > 1.5$, *FC-fold change*) zmieniał się poziom ekspresji genu *CDKN1A*, na wczesnym etapie starzenia. Z kolei geny *LMNB1* i *H2AX* były jedynymi genami, których poziom obniżał się znacząco ($\log_2FC < -1.5$) w starzeniu replikacyjnym i indukowanym, niezależnie od jego etapu. Ekspresja genu *CDKN2A* rosła znacząco ($\log_2FC > 1.5$) i istotnie tylko na późnym etapie starzenia indukowanego oraz w komórkach, które ulegały starzeniu replikacyjnemu.



Ryc. 4.7. Wykresy typu volcano plot przedstawiający geny kodujące wybrane markery starzenia na tle wszystkich zidentyfikowanych genów o różnicowej ekspresji (DEG, *ang. differentially expressed genes*). Oś x: log₂(FC), oś y: -log₁₀(p-value). Na niebiesko zaznaczono geny o istotnie statystycznie obniżonej a na czerwono geny o istotnie statystycznie podwyższonej ekspresji w komórkach starych względem komórek kontrolnych. Kryteria: FDR < 0,05, |log₂FC| > 1,5).

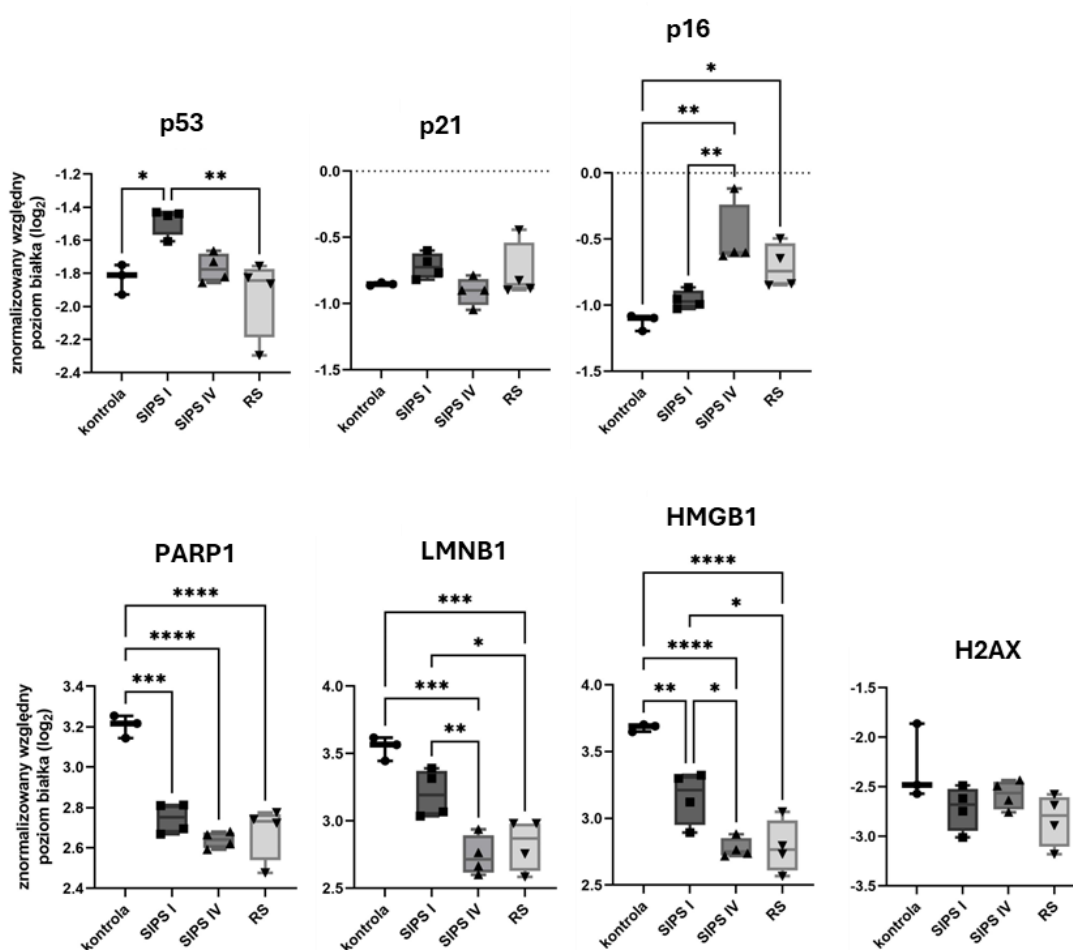
Analogiczną analizę markerów starzenia przeprowadzono na poziomie białek. W tym celu wykorzystano specyficzne przeciwciała rozpoznające określone białka (Western blot) oraz dane uzyskane z analizy proteomicznej (spektrometria mas).

Wyniki uzyskane z wykorzystaniem spektrometrii mas oraz Western blot były zbieżne, potwierdzając tym samym tendencję zmian badanych białek w określonym typie starzenia oraz na różnych jego etapach (Ryc. 4.8 i 4.9).

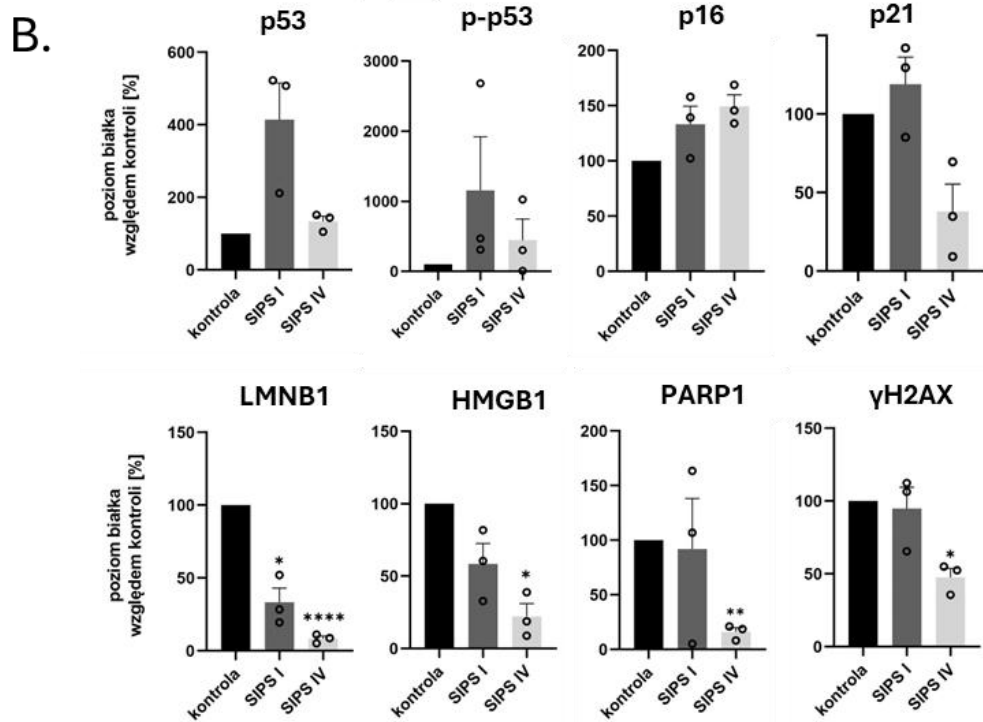
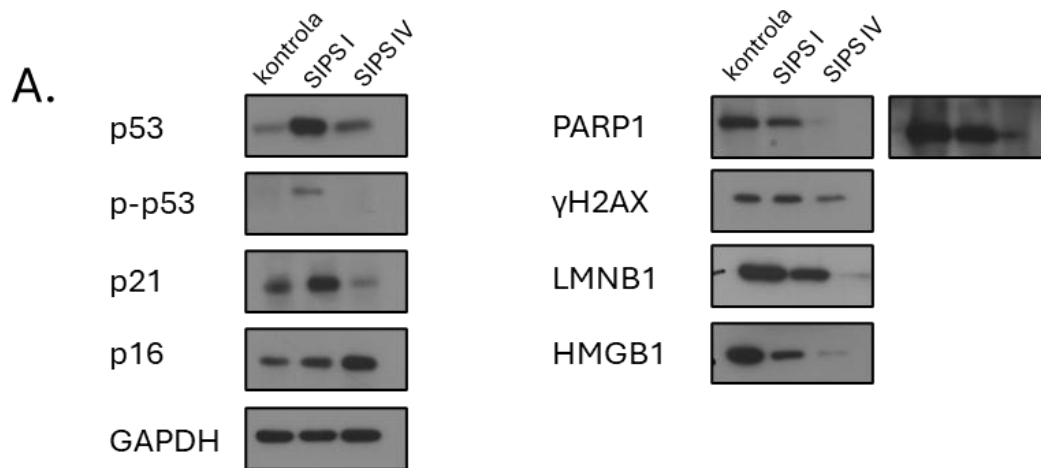
Poziom białka p53 wzrastał w SIPS I, co jest wynikiem aktywacji ścieżki związanej z uszkodzeniami DNA w wyniku działania doksorubicyny, a następnie spadał w SIPS IV i oraz utrzymywał się na porównywalnym do kontroli poziomie w komórkach RS. Aktywacja p53 indukuje ekspresję białka p21. Podobnie jak w przypadku p53, poziom p21 był nieznacznie podniesiony w komórkach będących na wczesnym etapie starzenia (SIPS I) a następnie spada na późnym etapie starzenia (SIPS IV) do poziomu niższego niż w komórkach kontrolnych. W odpowiedzi na stres wzrastał poziom białka p16, jednak jego ekspresja nie jest zależna od

p53. W przeciwieństwie do p21 jego poziom sukcesywnie wzrastał, osiągając najwyższą wartość w komórkach SIPS IV i RS.

Co istotne, najbardziej powtarzalny wzór zmian w poziomie białek w badanych grupach eksperymentalnych wykazano dla HMGB1, laminy B1 oraz PARP1, których poziom był istotnie statystycznie obniżony w komórkach ulegających starzeniu. W przypadku HMGB1, laminy B1 i, do pewnego stopnia H2AX, spadek był stopniowy, co wskazuje na postępujące w czasie zmiany w fenotypie komórki starej. Podobny wzór postępujących w czasie zmian wykazano dla białka p16, którego poziom rósł, osiągając maksimum w SIPS IV i porównywalny z poziomem w RS.



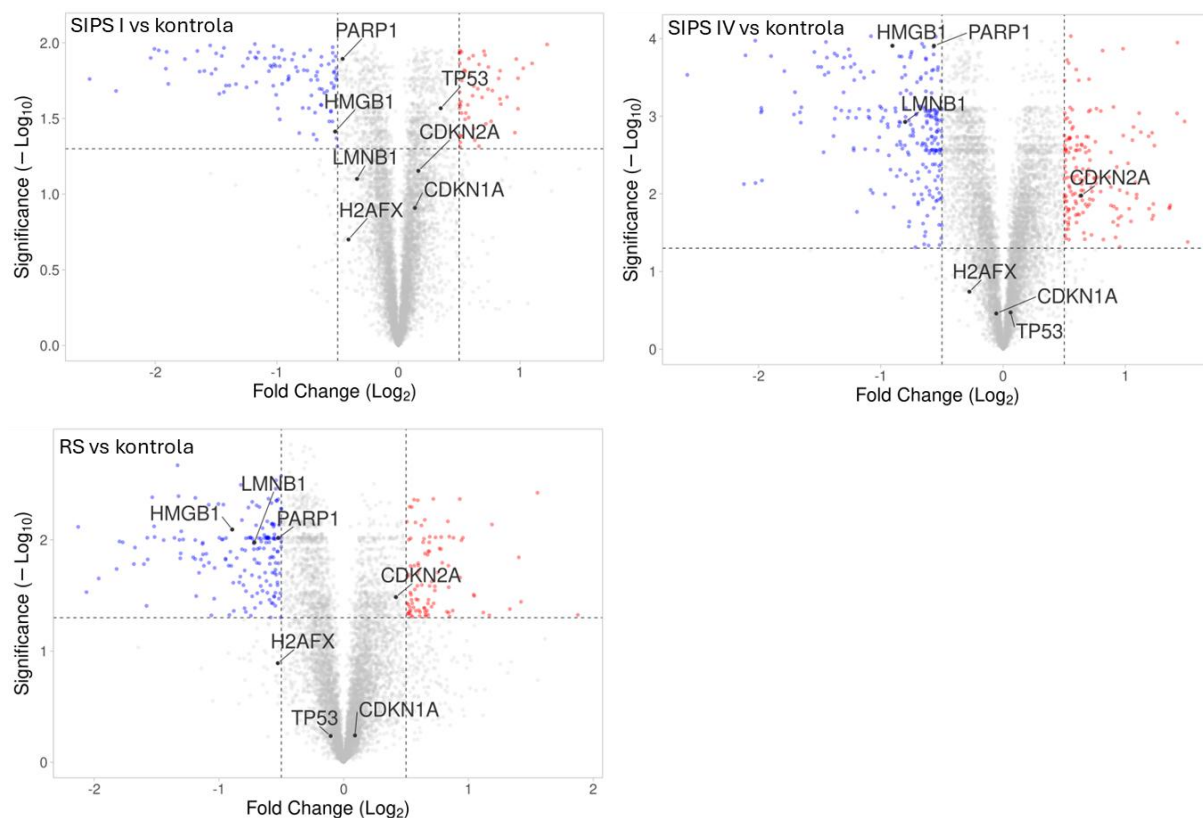
Ryc. 4.8. Wybrane białka, których poziom zmienia się podczas starzenia. Przedstawione dane zostały uzyskane w oparciu o analizę proteomu metodą spektrometrii mas. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=3-4.



Ryc. 4.9. Analiza poziomu białek, których poziom zmienia się podczas starzenia, z wykorzystaniem metody Western blot. A. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych. B. Analiza densytometryczna wyników Western blot. Wykresy przedstawiają poziom białek po normalizacji do białka referencyjnego – GAPDH, średnia \pm SEM, n=3.

Jak wykazała różnicowa analiza białek, spośród badanych markerów starzenia jedynie białka HMGB1, PARP1 i lamina B1 można zaliczyć do grupy białek zmieniających się znacząco ($p < 0.05$ i $\log_2FC < -0,5$) w grupie eksperymentalnej SIPS IV i RS podobnie jak białko p16 w komórkach starych będących na późnym etapie tego procesu. W komórkach będących na wczesnym

etapie starzenia (SIPS I) poziom większości białek markerowych zmieniała się nieistotnie statystycznie i w stosunkowo niewielkim stopniu, poza białkami HMGB1, PARP 1 i p53 (Ryc. 4.10).



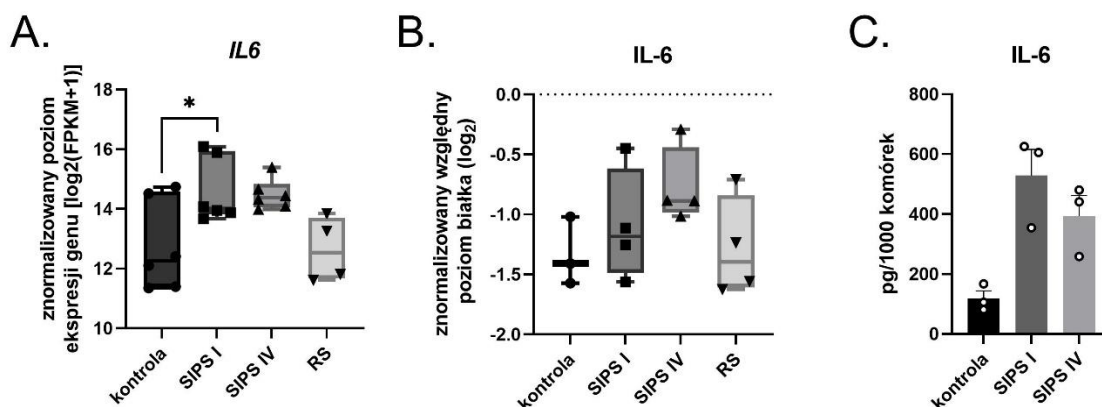
Ryc. 4.10. Wykresy typu volcano plot przedstawiające wybrane markery starzenia na tle wszystkich zidentyfikowanych białek o różnicowej ekspresji (DEP, *differentially expressed proteins*). Oś x: $\log_2(\text{FC})$, oś y: $-\log_{10}(p\text{-value})$. Na niebiesko zaznaczono białka o istotnie statystycznie obniżonym a na czerwono o istotnie statystycznie podwyższonym poziomie w komórkach starych względem komórek kontrolnych (młodych). Przedstawione dane zostały uzyskane w oparciu o analizę proteomu metodą spektrometrii mas. Kryteria: $\text{FDR} < 0,05$, $|\log_2\text{FC}| > 1,5$.

Porównując zmiany zachodzące na poziomie transkryptomu i proteomu, spójne pod względem istotności i krotności wyniki uzyskano dla markerów lamina B1, PARP1 i p16. W przypadku p21 i H2AX obserwowane zmiany były silnie wyrażone tylko na poziomie ekspresji genu, podczas gdy w przypadku HMGB1 wyraźne różnice obserwowano głównie w poziomie białka.

4.1.4. Zmiany markerów starzenia towarzyszących SASP

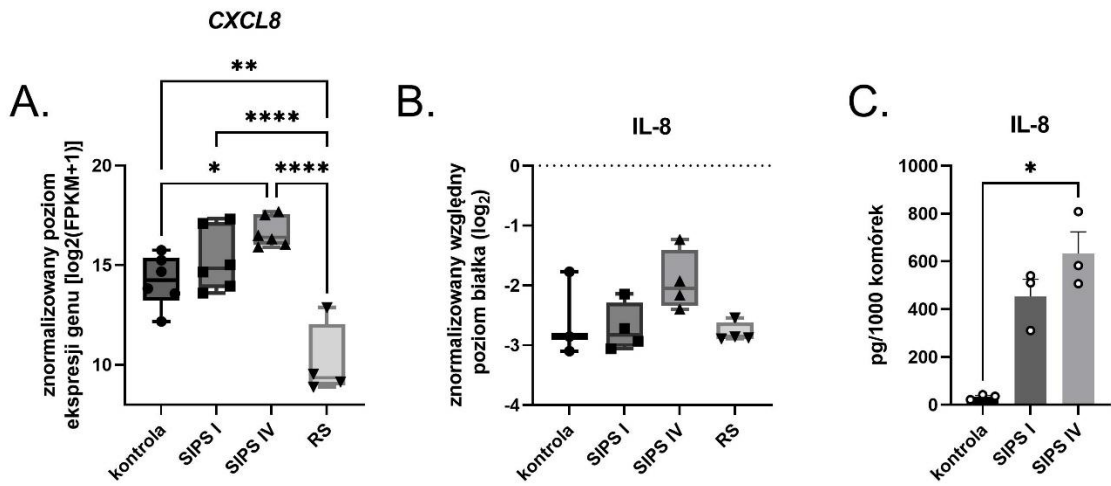
Istotną cechą komórek starych jest SASP. W skład tzw. fenotypu sekrecyjnego wchodzi białka wydzielane przez komórki stare bezpośrednio do mikrośrodowiska, tzw. czynniki

rozpuszczalne, (cytokiny prozapalne, chemokiny, metaloproteiny czy czynniki wzrostu) oraz czynniki nierozpuszczalne (pęcherzyki zewnątrzkomórkowe). W celu określenia zmian w poziomie czynników SASP w badanych modelach eksperymentalnych, analizowano poziom ekspresji genu - interleukiny 6, która wzmacnia stan zapalny oraz interleukiny 8, która jest czynnikiem chemotaktycznym i bierze udział w regulacji migracji komórek układu odpornościowego.



Ryc. 4.11. Analiza zmian w poziomie IL-6 w komórkach VSMC ulegających starzeniu. A. Poziom ekspresji genu *IL6* (RNAseq), n=4-6. B. Poziom białka IL-6 w komórkach (spektrometria mas), n=3-4. C. Stężenie IL-6 wydzielonej do medium hodowlanego (ELISA), n=3. A,B wykres ramka-wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), C. - średnia ±SEM.

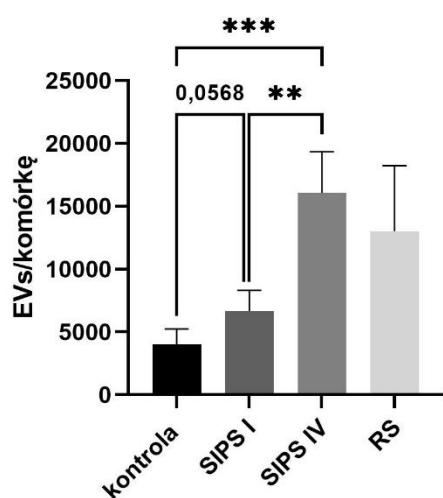
Ekspresja genu kodującego *IL6* istotnie wzrastał na wczesnym etapie starzenia i utrzymywał się na porównywalny poziomie w późnym etapie tego procesu. Nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji *IL6* w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 4.11A). Poziom badanej cytokiny w komórkach (Ryc. 4.11B), odzwierciedlał zmiany w ekspresji genu *IL6*. Co ciekawe, ilość wydzielonej cytokiny w przeliczeniu na 1000 komórek była 5-cio krotnie wyższa niż w przypadku ilości wydzielanej przez komórki proliferujące, przewyższając zmiany względnego poziom tego białka w komórkach starych (Ryc. 4.11C).



Ryc. 4.12. Analiza zmian w poziomie IL-8 w komórkach VSMC ulegających starzeniu. A. Poziom ekspresji genu *CXCL8* (RNAseq), n=4-6. B. Poziom białka IL8 w komórkach (spektrometria mas), n=3-4. C. Stężenie IL-8 wydzielonej do medium hodowlanego (ELISA), n=3. A i B - wykres ramka-wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), C- średnia ±SEM.

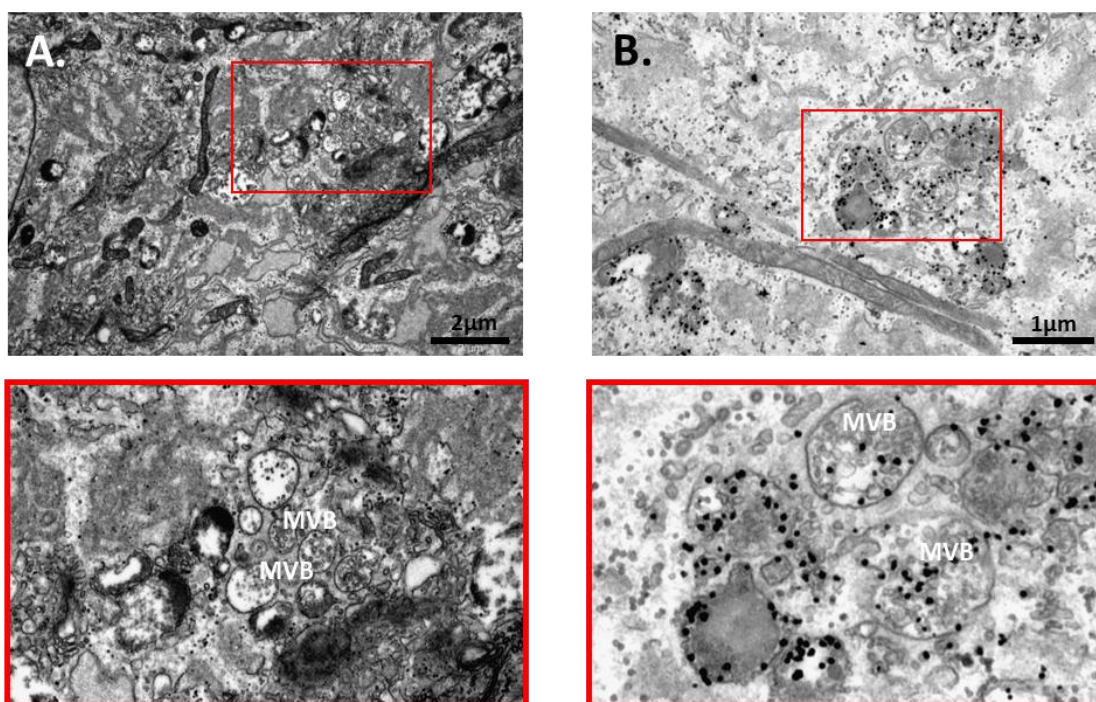
Ekspresja genu kodującego interleukinę 8 – *CXCL8* – rosła systematycznie oraz istotnie statystycznie rosła w trakcie procesu starzenia indukowanego. Co ciekawe, komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu charakteryzowały się obniżonym poziomem ekspresji w porównaniu do komórek SIPS oraz komórek kontrolnych (Ryc. 4.12A). Poziom badanego białka w komórkach odzwierciedlał zmiany w ekspresji kodującego je genu, osiągając najwyższy poziom w SIPS IV (Ryc. 4.12B). Analogicznie, ilość wydzielonej interleukiny w przeliczeniu na 1000 komórek była najwyższa na późnym etapie starzenia, chociaż znaczący wzrost zaobserwowano już w pierwszym tygodniu (SIPS I), kiedy to zmiany w poziomie ekspresji genu i białka były nieznaczne w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 4.12C).

Oprócz wymienionych cytokin analizowano liczbę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) wydzielonych przez komórki VSMC ulegające starzeniu przyspieszonemu i replikacyjnemu. Pęcherzyki były izolowane z medium kondycjonowanego tzn. medium, które zebrane z komórek po 24-godzinnej hodowli. Pożywkę poddawano różnicowemu ultrawiroowaniu w celu uzyskania frakcji małych pęcherzyków wydzielonych przez badane komórki. Stężenie pęcherzyków określano metodą NTA (ang. *nanoparticle tracking analysis*) z wykorzystaniem analizatora NanoSight300. Wykazano znaczący wzrost liczby EVs już na wczesnych etapach starzenia indukowanego stresem (SIPS I). Wraz z czasem liczba wydzielanych EVs wzrosła przeszło dwukrotnie, osiągając najwyższy poziom w SIPS IV. Komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu charakteryzowały się poziomem wydzielania EVs zbliżonym do komórek będących na późnym etapie starzenia indukowanego stresem (SIPS IV) (Ryc. 4.13). Na podstawie przeprowadzonego pomiaru można wnioskować, że wzmożona sekrecja EVs jest cechą, która narasta wraz z rozwojem fenotypu starzenia.



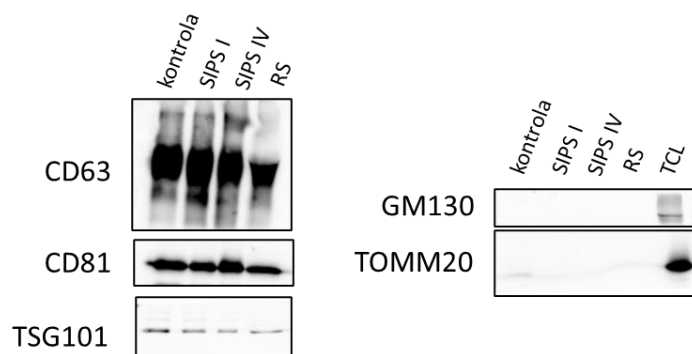
Ryc. 4.13. Liczba pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielonych przez komórki VSMC w ciągu 24h, średnia \pm SEM, n=5-9.

Poza zmianami w liczbie pęcherzyków wydzielonych przez komórki VSMC na różnych etapach starzenia, dokonano dokładniejszej analizy. Rozpoczęto od wizualizacji prekursorów egzosomów - ILVs powstałych w wyniku wpuklenia błony endosomu i powstania ciałek wielopęcherzykowych – MVBs. Wykorzystano do tego transmisyjną mikroskopię elektronową w połączeniu z immunodetekcją białka CD63, które jest jednym z markerów egzosomów (Ryc. 4.14)



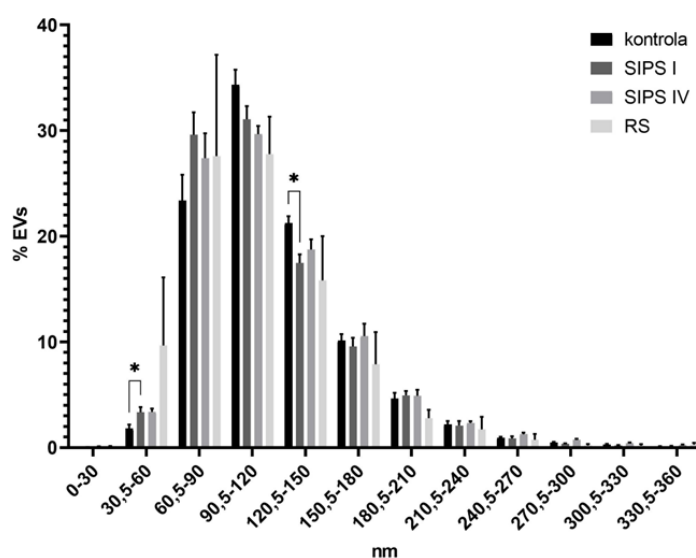
Ryc. 4.14. Wizualizacja prekursorów egzosomów (ILVs) oraz ciałek wielopęcherzykowych (MVBs) w komórkach VSMC przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W czerwonych ramkach przedstawiono powiększone fragmenty. A. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające ciała wielopęcherzykowe (MVB). B. Reprezentatywne zdjęcia z immunodetekcją białka CD63 w MVB z zastosowaniem nanocząstek złota (czarne punkty).

Mając na uwadze heterogenność EVs określono występowanie wybranych markerów egzosomów, takich jak CD63, CD81 oraz TSG101, we frakcji EVs izolowanej z medium kondycjonowanego. Białka CD63 i CD81 są tetraspaninami obecnymi w błonach egzosomów, zaś białko TSG101 uczestniczy w szlaku ESCRT związanym z sortowaniem ładunku do egzosomów. Obecność tych białek w badanych frakcjach pęcherzyków, wydzielanych zarówno przez komórki młode, jak i stare, pozwoliła na stwierdzenie wzbogacenia egzosomami uzyskiwanych izolatów EVs. W celu potwierdzenia czystości wyizolowanej frakcji pęcherzyków sprawdzono obecność białka GM130, które jest białkiem macierzy cis-Golgi oraz TOMM20 będącym translokazą zewnętrzną błony mitochondrialnej. Uzyskany wynik potwierdził brak zanieczyszczeń frakcji pęcherzykowej fragmentami wymienionych organelli komórkowych (Ryc. 4.15).



Ryc. 4.15. Analiza markerów egzosomów oraz białek pochodzących z siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów w frakcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uzyskanych metodą różnicowego ultrawiwiania. Analizę przeprowadzono na tej samej liczbie pęcherzyków - 6×10^9 , TCL (ang. *total cell lysate*) lizat całokomórkowy.

Opierając się na pomiarach z wykorzystaniem techniki NTA (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) sprawdzono rozkład wielkości pęcherzyków wydzielonych przez komórki młode (kontrola) oraz ulegające starzeniu. Pęcherzyki podzielono na grupy różniące się wielkością o 30 nm i określano procentowy udział każdej z grup. Stwierdzono zwiększony odsetek pęcherzyków małych (30 nm – 90 nm) wydzielonych przez komórki ulegające starzeniu (SIPS I, SIPS IV, RS) oraz obniżony poziom sekrecji pęcherzyków większych w zakresie od 90 nm do 150 nm, przy czym istotne statystycznie różnice wykazano tylko w przypadku frakcji 30-60 nm oraz 120-150 nm wydzielanych przez komórki SIPS I (Ryc. 4.16).

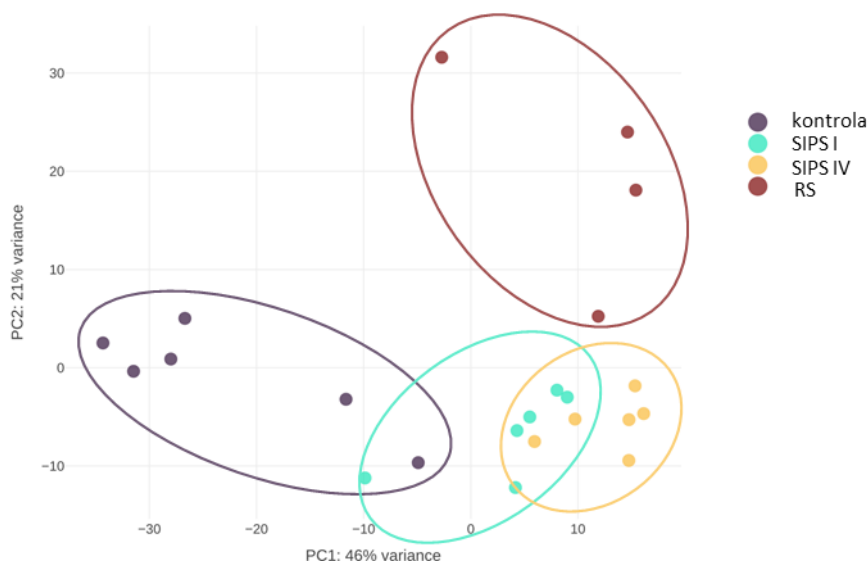


Ryc. 4.16. Wykres przedstawiający odsetek pęcherzyków w danym przedziale wielkości. Pomiarów dokonano za pomocą metody NTA z wykorzystaniem aparatu NanoSight300. Wykres przedstawia średnią \pm SEM z n=3-7.

4.2. Analiza porównawcza transkryptomu komórek VSMC na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu

W oparciu o wyniki sekwencjonowania RNA przeprowadzono jakościową i ilościową analizę poziomu ekspresji genów na różnych etapach procesu starzenia oraz porównanie pomiędzy starzeniem indukowanym (SIPS) a replikacyjnym (RS).

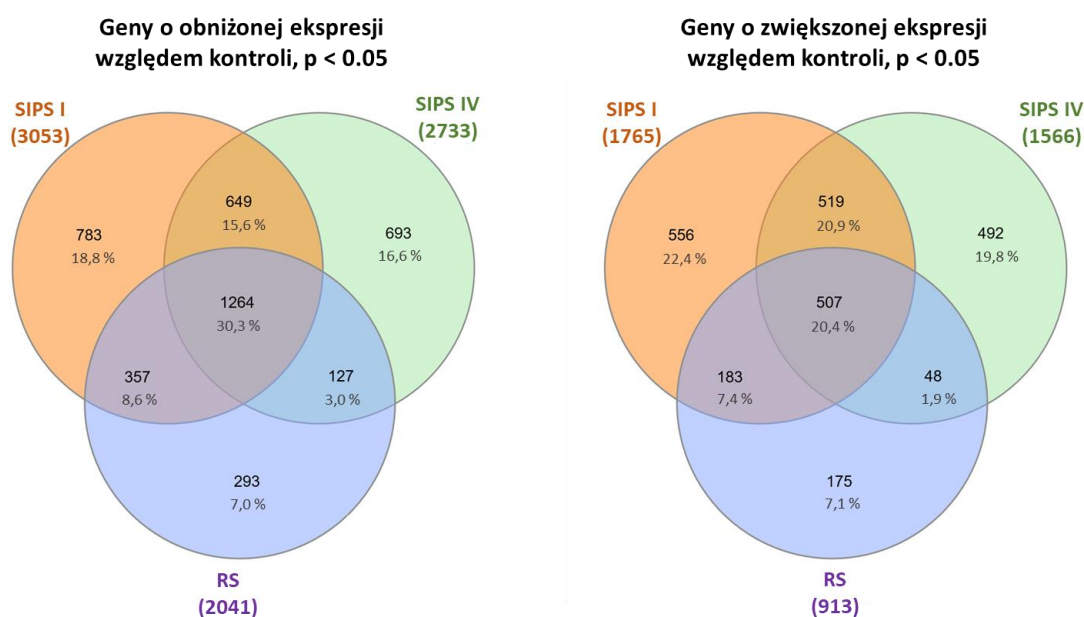
Zidentyfikowano 39525 transkryptów (baza ENSEMBL), z czego 19031 były to transkrypty genów kodujących białka. Analiza głównych składowych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) pozwoliła na wykazanie istnienia najbardziej znaczących różnic pomiędzy transkryptomem komórek kontrolnych - proliferujących, a tych, które uległy starzeniu replikacyjnemu. Transkryptom komórek ulegających starzeniu indukowanemu stresem różnił się zarówno od transkryptomu komórek kontrolnych, jak i starzejących się replikacyjnie, przy czym różnice pomiędzy SIPS I i SIPS IV były relatywnie najmniejsze (Ryc. 4.17).



Ryc. 4.17. Analiza głównych składowych (PCA), ilustrująca podobieństwa i różnice transkryptomu komórek kontrolnych, komórek na wczesnym i późnym etapie starzenia (SIPS I i SIPS IV) oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS).

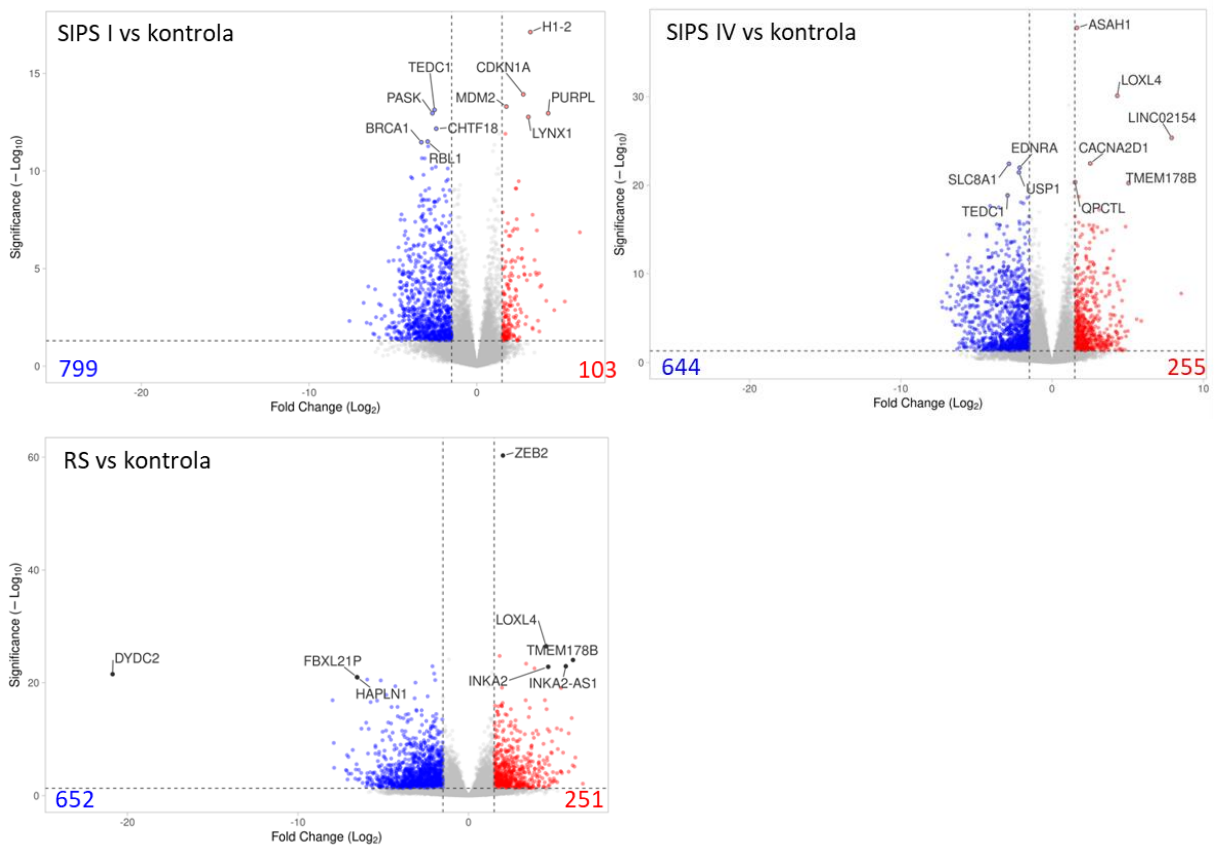
Kolejnym krokiem była ilościowa analiza transkryptomu komórek kontrolnych i ulegających procesowi starzenia. Zidentyfikowano 6646 genów o różnicowej ekspresji (DEG, ang. *differentialy expressed genes*), których poziom ekspresji zmieniał się istotnie ($p < 0,05$) w komórkach starych w porównaniu do komórek kontrolnych, co stanowiło prawie 22%

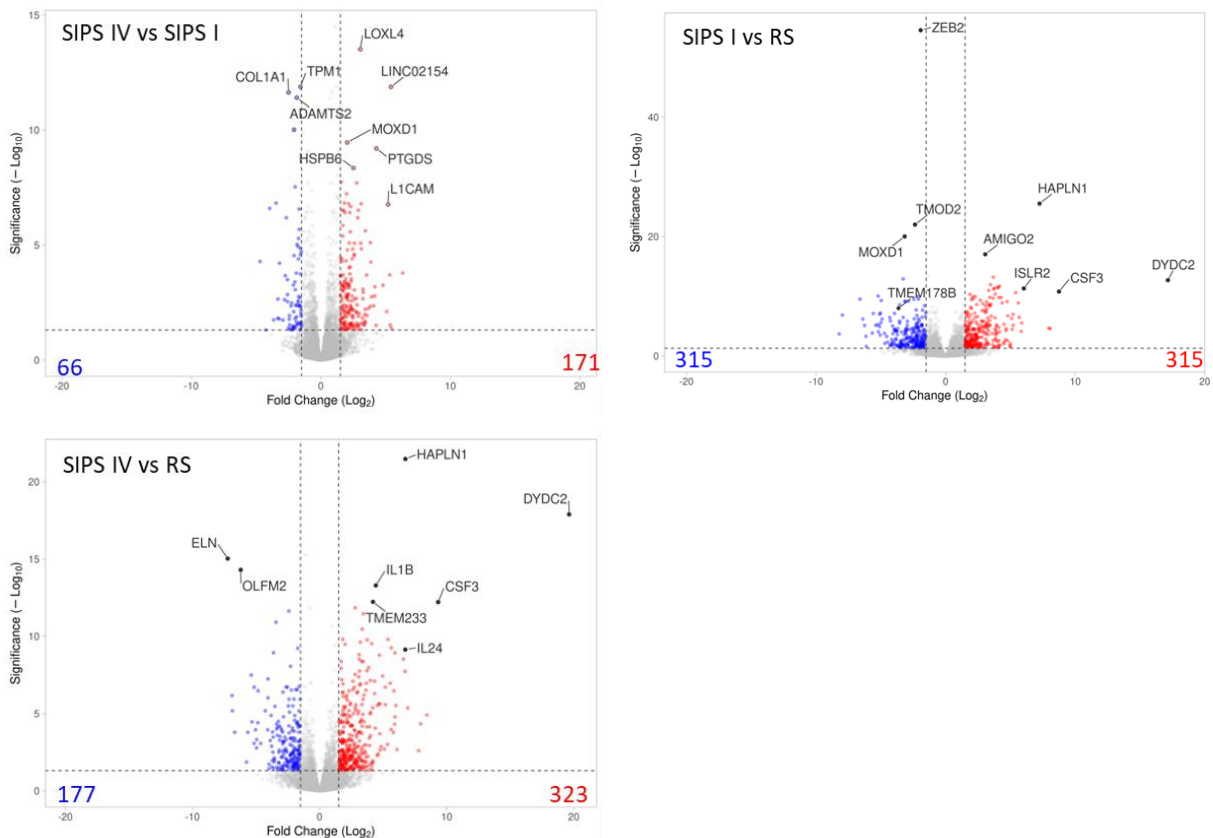
wszystkich genów ulegających ekspresji w badanych komórkach. Wyodrębniono 4166 genów o obniżonej ekspresji, co z kolei stanowiło ponad 10% wszystkich zidentyfikowanych, wśród nich 1264 czyli 3% było wspólnych dla wszystkich badanych grup eksperymentalnych reprezentujących komórki stare (SIPS I, SIPS IV, RS). Spośród genów zidentyfikowanych w komórkach ulegających starzeniu, których ekspresja istotnie statystycznie spadała względem ekspresji w komórkach kontrolnych, około 20% (783) genów było unikalnych dla komórek na wczesnym etapie starzenia, ponad 15% (693) dla komórek na późnym etapie starzenia i tylko 7% (293) dla komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu. Liczba genów o istotnie podwyższonej ekspresji była niższa od liczby genów o obniżonej ekspresji i wynosiła 2480 (6% wszystkich zidentyfikowanych genów), 507 (około 20% genów o istotnie podwyższonej ekspresji) z nich była wspólna dla wszystkich trzech grup. Natomiast udział unikalnych genów o różnicowej ekspresji wynosił dla SIPS I 556 (22,4% spośród genów o istotnie podwyższonej ekspresji w komórkach starych), SIPS IV - 492 (19,8%) a dla RS 175 (7,1%). Co ciekawe, w obu porównaniach komórki RS charakteryzowały się większą pulą wspólnych genów z komórkami na wczesnym niż na późnym etapie starzenia (Ryc. 4.18).



Ryc. 4.18. Diagramy Venna prezentujące rozkład genów o różnicowej ekspresji (DEG, ang. *differentially expressed genes*) wspólnych i unikalnych dla badanych grup, których poziom ekspresji spadał lub wzrastał istotnie statystycznie w komórkach ulegających starzeniu względem poziomu ekspresji genów komórek kontrolnych.

Z grupy genów o istotnie zmienionej ekspresji w procesie starzenia, wyodrębniono dodatkowo geny, których poziom ekspresji zmieniał się przynajmniej o 50%, czyli krotność zmian (FC, ang. *fold change*) wynosiła $|FC| > 1.5$, zakładając, że jest to grupa genów o potencjalnie największym znaczeniu. Na rycinie 4.19 przedstawiono porównanie par wszystkich grup eksperymentalnych. Przeprowadzona analiza wykazała, że komórki będące na wczesnym etapie starzenia charakteryzują się zdecydowaną przewagą genów, których ekspresja znacząco spada (prawie 8 razy więcej niż genów o podwyższonej ekspresji) w porównaniu do komórek kontrolnych. W komórkach będących na późniejszym etapie starzenia (SIPS IV) lub starzejących się replikacyjne (RS) rośnie udział genów o znacząco podwyższonej ekspresji.





Ryc. 4.19. Wykresy typu volcano plot przedstawiające wyniki analizy różnicowej ekspresji genów pomiędzy wszystkimi grupami badanymi. Oś x: $\log_2(FC)$, oś y: $-\log_{10}(p\text{-value})$. Na niebiesko zaznaczono geny o istotnie obniżonej ekspresji, na czerwono geny o istotnie podwyższonej ekspresji. Podpisane na wykresie transkrypty to 10 najbardziej zmieniających się transkryptów dla każdego porównania. Kryteria: $FDR < 0,05$, $|\log_2FC| > 1,5$.

Porównanie wczesnego i późnego etapu starzenia wykazało więcej genów o zwiększonej ekspresji na późnym etapie starzenia. Porównanie wczesnego etapu starzenia indukowanego ze starzeniem replikacyjnym pokazało podobieństwo w liczbie genów o obniżonej i podwyższonej ekspresji, podczas gdy w komórkach będących na późnym etapie starzenia dominowały geny o podwyższonej ekspresji w porównaniu do komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (Ryc. 4.19).

Dalszym krokiem analizy było wyznaczenie grupy genów zmieniających się w największym stopniu. Wyróżniono je na podstawie odległości Manhattan na przygotowanych wykresach typu volcano. Dla każdego genu obliczono odległość od punktu 0,0 na wykresie i wyodrębniono 20 genów (Tabela 4.1) o najwyższych wartościach tej odległości, co odpowiada największemu jednoczesnemu odchyleniu w wartości $-\log_{10}(p\text{-value})$ oraz FC. W tabeli geny o obniżonej ekspresji przedstawiono kolorem niebieskim, a o podwyższonej kolorem

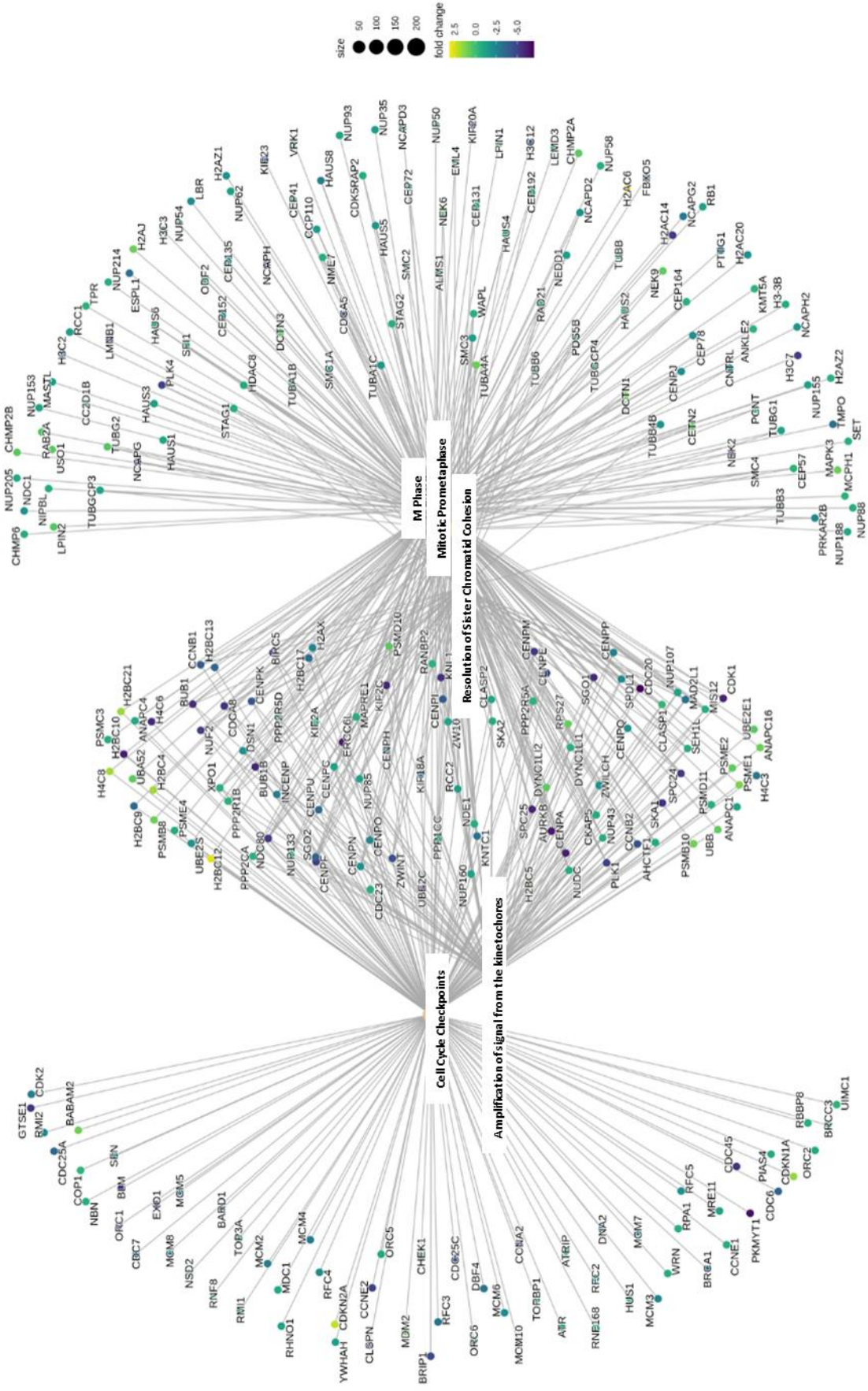
czerwonym. Geny o najbardziej zmieniającej się ekspresji zidentyfikowane w komórkach SIPS I w porównaniu do kontroli kodują białka zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego oraz naprawę DNA, podczas gdy w SIPS IV dodatkowo zidentyfikowano grupę genów kodujących białka regulujące transkrypcję oraz wpływające na modyfikacje innych białek. Geny o różnicowej ekspresji zidentyfikowane na późnym etapie starzenia w porównaniu do wczesnego etapu tego procesu (SIPS IV *versus* SIPS I) związane były z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulacją odpowiedzi na stan zapalny. Geny, których ekspresja zmieniała się najbardziej w komórkach RS w porównaniu do komórek kontrolnych kodują białka uczestniczące w regulacji transkrypcji, angiogenezie oraz organizacji struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Geny odróżniające komórki stare replikacyjnie od komórek będących na wczesnym etapie starzenia (SIPS I) związane są z adhezją komórek i macierzą zewnątrzkomórkową oraz odpowiedzią zapalną. Zmiany w ekspresji genów związanych z macierzą zewnątrzkomórkową i odpowiedzią zapalną - szczególnie mocno wyrażoną w SIPS IV vs RS, oraz sygnalizacją międzykomórkową, odróżniają starzenie replikacyjne od indukowanego (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Lista 20 genów o najbardziej zmieniającej się ekspresji dla każdego porównania dwóch grup. Wybrano je na podstawie odległości Manhattan odpowiadającej największemu jednoczesnemu odchyleniu wartości $-\log_{10}(p\text{-value})$ oraz FC. Na niebiesko zaznaczono geny o obniżonej, a na czerwono podwyższonej ekspresji.

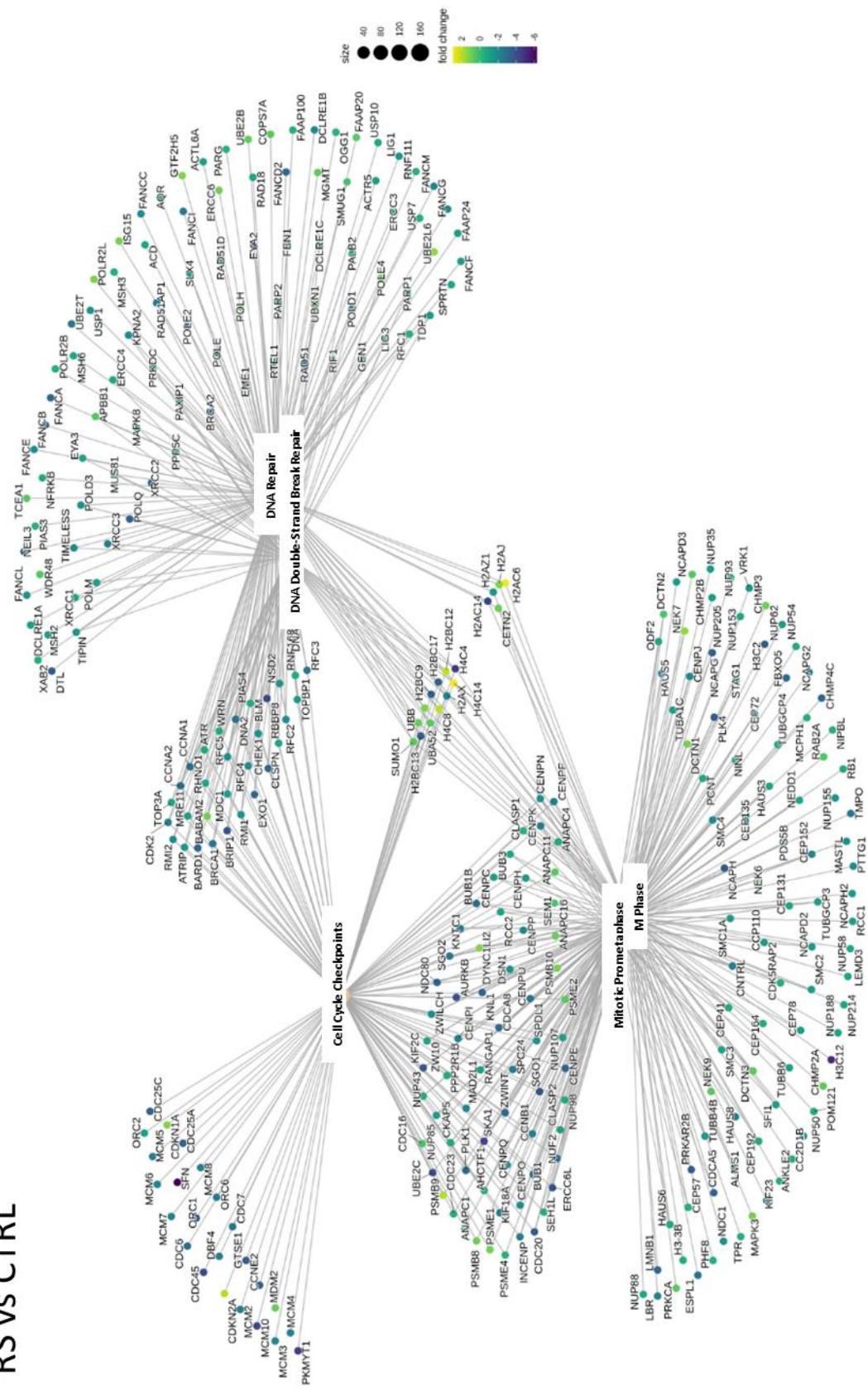
SIPS I vs kontrola	SIPS IV vs kontrola	RS vs kontrola	SIPS IV vs SIPS I	SIPS I vs RS	SIPS IV vs RS
H1-2	ASAH1	ZEB2	LINC02154	ZEB2	DYDC2
PURPL	LOXL4	DYDC2	LOXL4	HAPLN1	HAPLN1
CDKN1A	LINC02154	LOXL4	COL1A1	DYDC2	ELN
LYNX1	TMEM178B	TMEM178B	PTGDS	TMOD2	CSF3
TEDC1	SLC8A1	INKA2-AS1	TPM1	MOXD1	OLFM2
PASK	CACNA2D1	FBXL21P	ADAMTS2	AMIGO2	IL1B
MDM2	EDNRA	INKA2	L1CAM	CSF3	TMEM233
BRCA1	USP1	HAPLN1	MOXD1	ISLR2	IL24
CHTF18	QPCTL	MOXD1	HSPB6	PDE4B	CXCL6
RBL1	TEDC1	TP53INP2	ISLR2	LOXL4	PI3
RECQL4	HELLS	LRFN5	LACC1	L1CAM	PDE4B
TEDC2	RBL1	LINC00607	CRLF1	IGF2	CXCL8
FANCA	NPC2	GABBR2	CCL3	LINC01085	MMP3
CENPI	H2AC6	ADCY7	LINC00520	IL1B	PREX1
RRM2B	HAUS5	WNT7B	COL5A1	PTGS2	CXCL5
ARHGEF39	LINC00520	LINC01085	CACNA2D1	PTPRN	LIMS2
PINCR	CENPJ	PDE4B	SERPING1	NPR3	NREP
STIL	WNT7B	HAUS5	NDP	OLFM2	FUT8-AS1
TONSL	ZFP69B	MFSD2A	HDAC9	NRG1	HHEX
DDX11	FANCA	PGF	VNN1	SMOC1	PTGS2

Dla genów, których ekspresja zmieniała się istotnie statystycznie ($p > 0.05$) określono najważniejsze szlaki biologiczne, w których uczestniczą oraz ich powiązania. Geny te, w komórkach ulegających zarówno starzeniu indukowanemu jak i replikacyjnemu (SIPS I i IV, RS *versus* kontrola), zaangażowane były w regulację cyklu komórkowego, a w szczególności regulację mitozy. Dodatkowo komórki na wczesnym etapie starzenia (SIPS I), jak i komórki stare replikacyjnie, wykazały zmiany w szlakach związanych z naprawą DNA. Porównanie pomiędzy badanymi grupami komórek starych (SIPS I, SIPS IV, RS) wykazało zmiany w ekspresji genów związanych z organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, syntezą kolagenu (SIPS I *versus* SIPS IV, SIPS IV *versus* RS), szlakami sygnałowymi związanymi z interleukinami oraz glikozylacją (SIPS I *versus* RS, SIPS IV *versus* RS) (Ryc. 4.20).

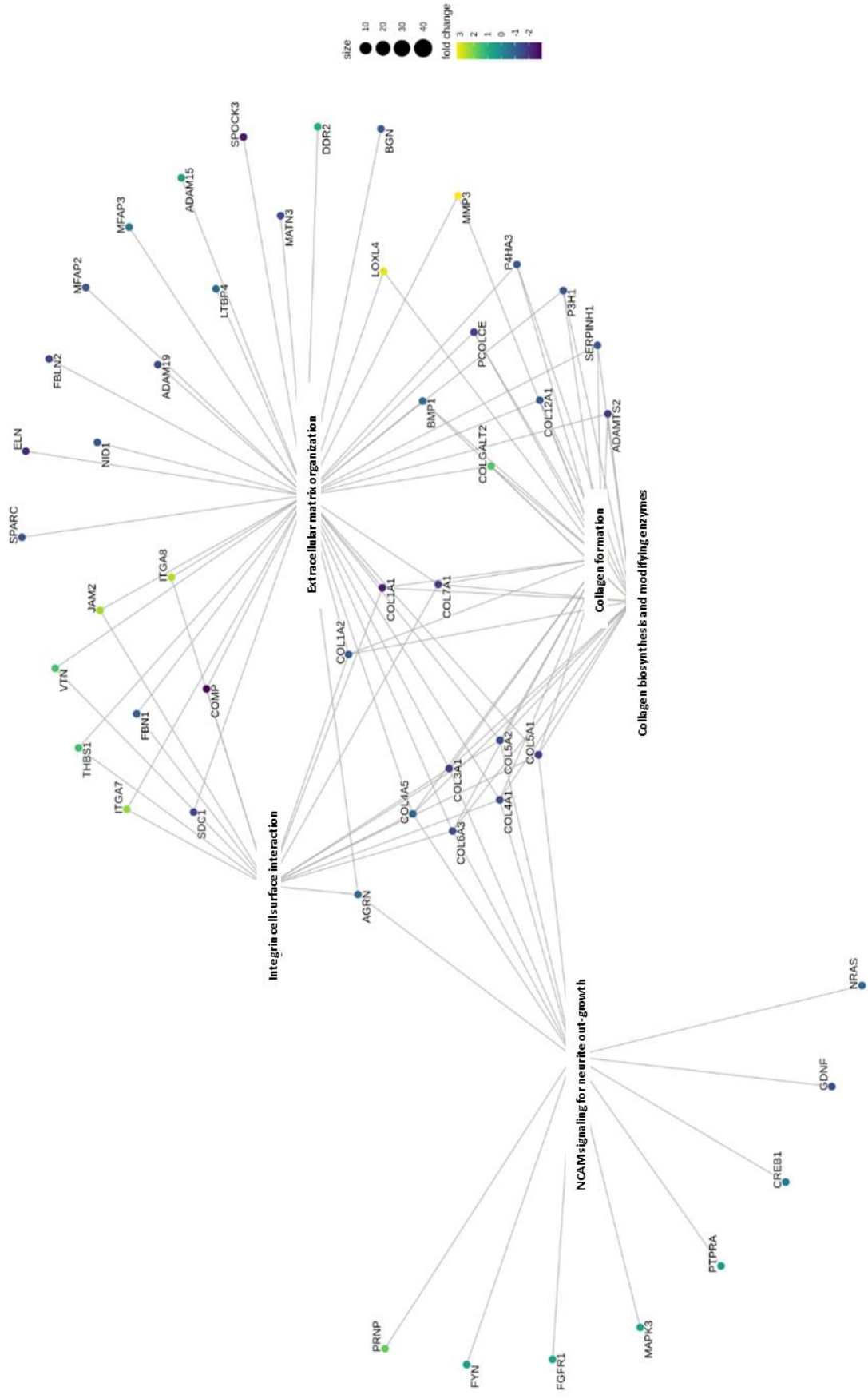
SIPS IV vs kontrola



RS vs CTRL

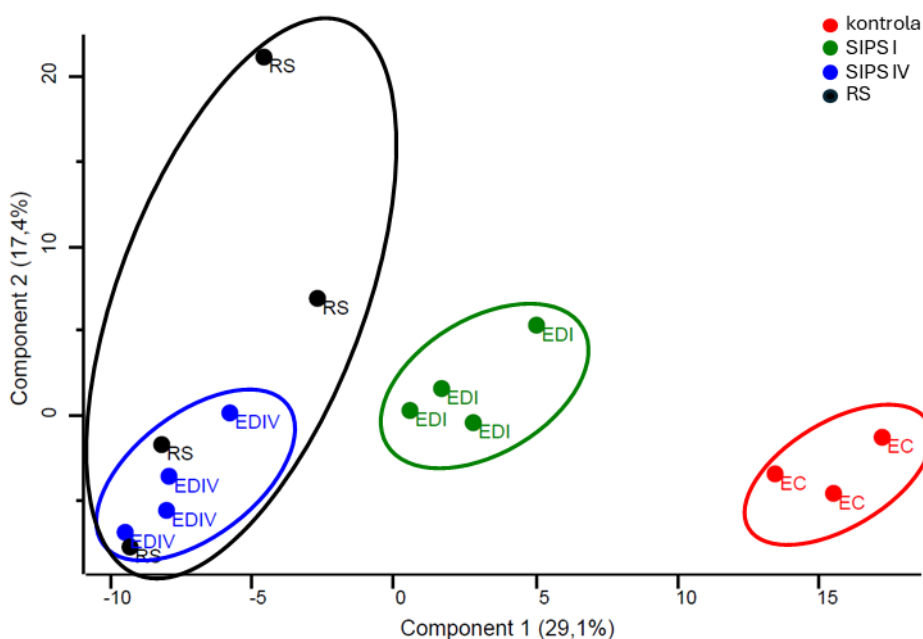


SIPS IV vs SIPS I



4.3. Analiza porównawcza proteomu komórek VSMC na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu

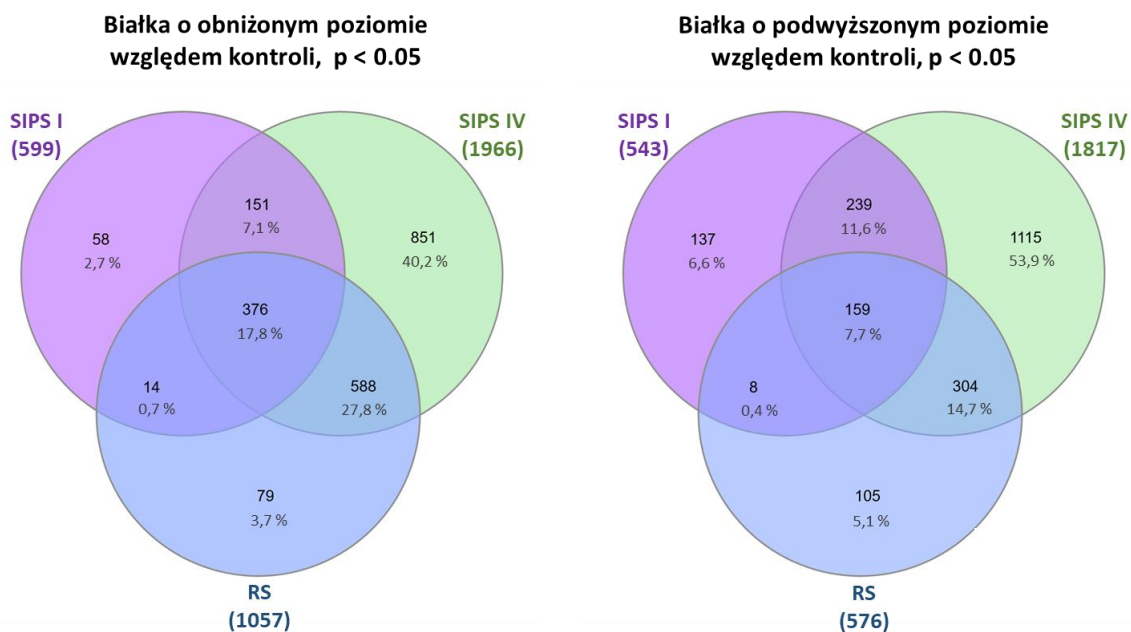
Chcąc zweryfikować zaobserwowane różnice w transkryptomie komórek VSMC ulegających starzeniu indukowanemu stresem i replikacyjnemu oraz dokonać oceny zmian w procesach biologicznych zachodzących w czasie starzenia na poziomie translacji, zbadano proteom tych komórek. Za pomocą spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*) i z wykorzystaniem izobarycznych znaczników fragmentacyjnych TMT (ang. *tandem mass tag*) zidentyfikowano 7692 białek w proteomie komórek VSMC. Analiza PCA wykazała podobieństwo proteomu komórek na późnym etapie starzenia (SIPS IV) i komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS). Proteom komórek na wczesnym etapie starzenia (SIPS I) był odmienny od proteomów pozostałych komórek starych, a wszystkie one różniły się znacząco od proteomu komórek kontrolnych (Ryc. 4.21).



Ryc. 4.21. Analiza głównych składowych (PCA), ilustrująca podobieństwa i różnice proteomu komórek kontrolnych, komórek na wczesnym i późnym etapie starzenia (SIPS I i SIPS IV) oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu (RS).

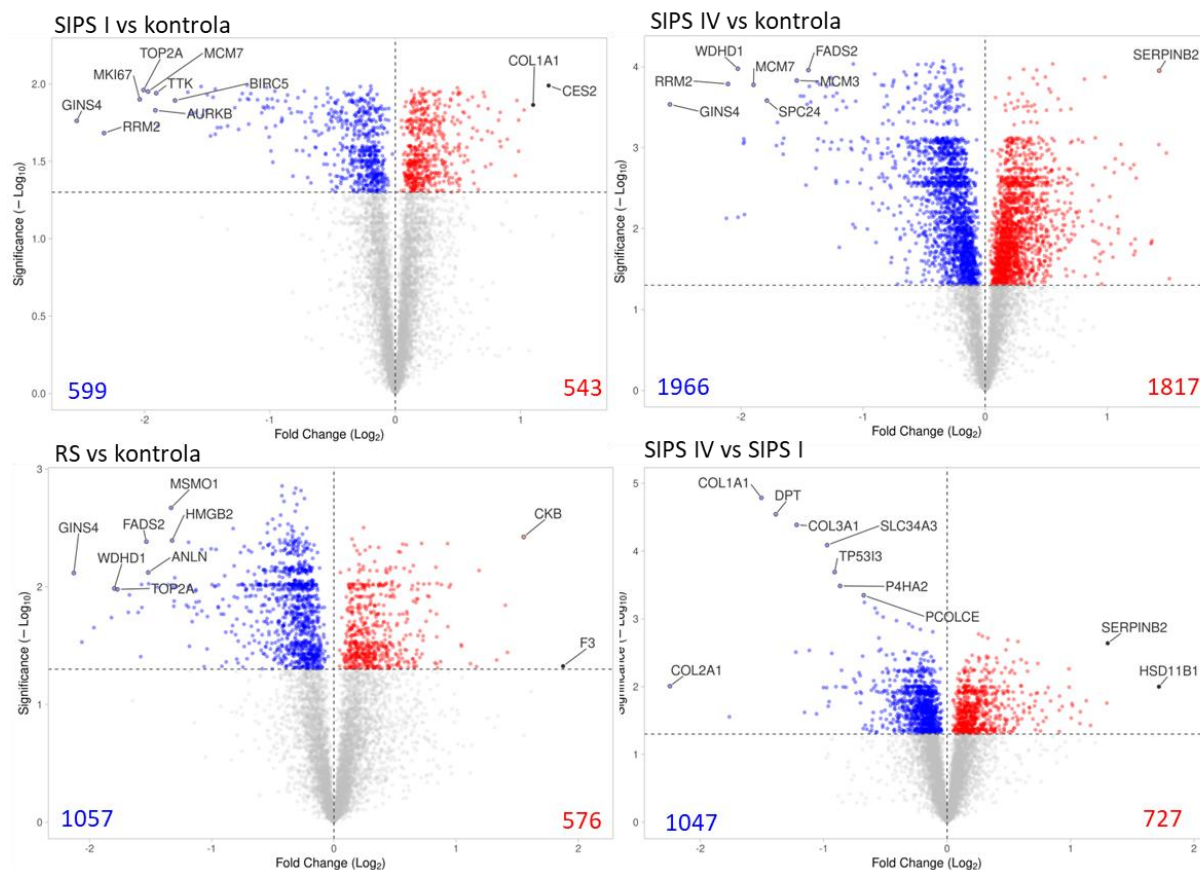
Spośród wszystkich białek zidentyfikowanych w komórkach starych, większość z nich (63%, 4184 białek) zmieniała się istotnie w porównaniu do komórek kontrolnych ($p < 0.05$).

W przeciwieństwie do genów, liczba białek o obniżonym jak i podwyższonym poziomie była zbliżona. Zidentyfikowano 2067 białka o istotnie podwyższonym poziomie i 2117 białka, których poziom spadał w komórkach starych w porównaniu do komórek kontrolnych. Zaledwie 18% białek o obniżonym poziomie i tylko 8% białek o podwyższonym poziomie zostało zidentyfikowanych we wszystkich grupach komórek starych (SIPS I i IV oraz RS), co świadczy o dużym zróżnicowaniu ich proteomu. Najwięcej unikalnych białek zidentyfikowano w komórkach będących na późnym etapie starzenia (SIPS IV) - stanowiły one aż 40% wszystkich zidentyfikowanych białek o obniżonym poziomie i ponad 50% białek o podwyższonym poziomie w całym proteomie białek różnicowych w komórkach VSMC (Ryc. 4.22).



Ryc. 4.22. Diagramy Venna prezentujące rozkład białek wspólnych i unikalnych dla badanych grup, których poziom spadał lub wzrastał istotnie statystycznie w komórkach ulegających starzeniu względem poziomu białek komórek kontrolnych.

Analiza, którą przedstawiono na volcano plotach (Ryc. 4.23) pokazała krotność zmian w poziomie białek zidentyfikowanych w proteomach badanych komórek. W przeciwieństwie do transkryptomu, krotność zmian (FC, *ang. fold change*) zdecydowanej większości białek nie przekraczała $|\log_2 FC| = 2$.



Ryc. 4.23. Wykresy typu volcano plot przedstawiające wyniki analizy różnicowej zmian poziomu białek pomiędzy wszystkimi grupami badanymi. Oś x: $\log_2(FC)$, oś y: $-\log_{10}(p\text{-value})$. Na niebiesko zaznaczono białka o istotnie obniżonym, a na czerwono białka o istotnie podwyższonym poziomie. Podpisane na wykresie białka to 10 najbardziej zmieniających się białek dla każdego porównania. Kryterium: $FDR < 0,05$.

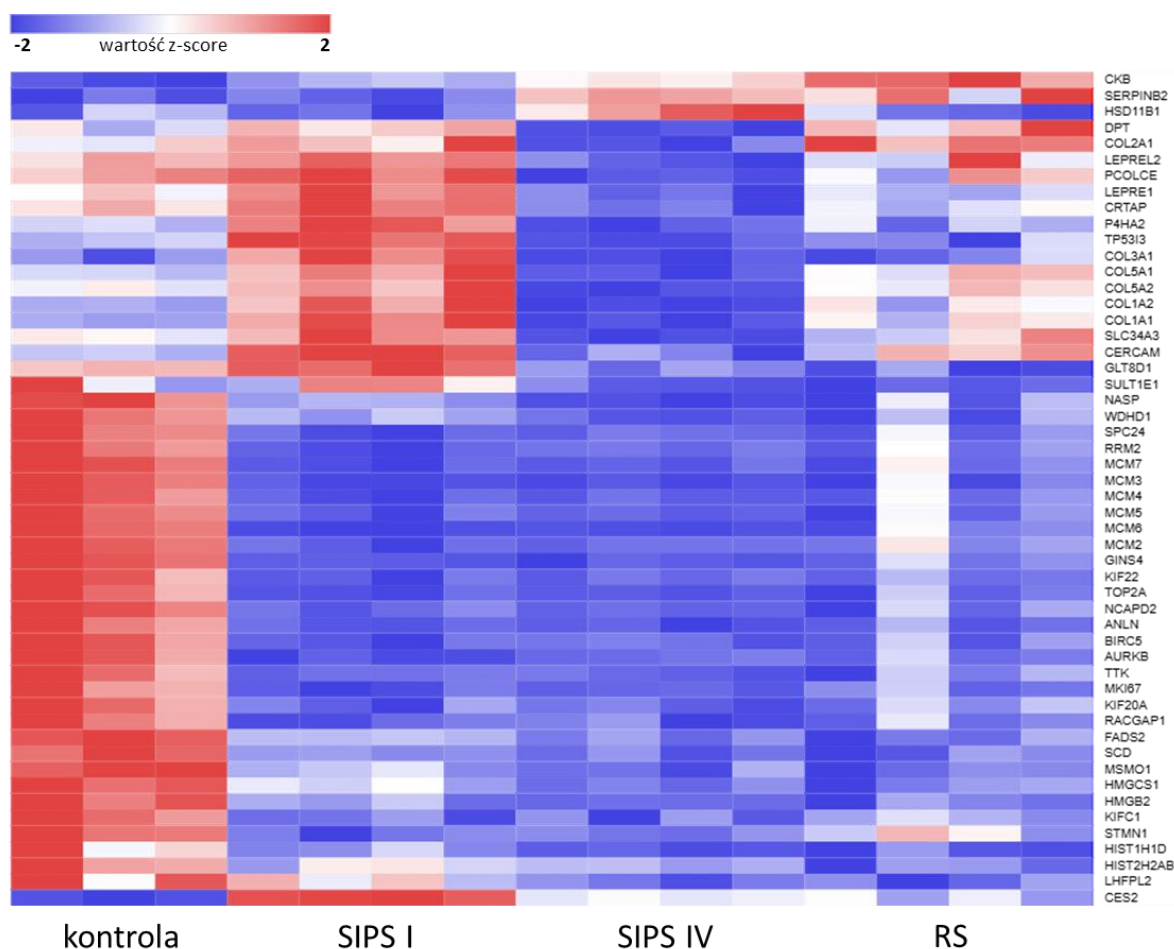
Na podstawie odległości Manhattan wyodrębniono 20 białek o najbardziej znacząco zmieniającym się poziomie (Tabela 4.2). Białka o obniżony poziomie oznaczono kolorem niebieskim, zaś czerwonym białka o podwyższonym poziomie. Niemal wszystkie najbardziej zmieniające się w starzeniu białka to te, których poziom spadał.

Tabela 4.2. Lista białek o najbardziej zmieniającym się poziomie. Wybrano je na podstawie odległości Manhattan odpowiadającej największemu jednoczesnemu odchyleniu wartości p oraz FC od środka wykresu. Na niebiesko zaznaczono białka o obniżonym poziomie a na czerwono białka, których poziom wzrastał.

SIPS I vs CTRL	SIPS IV vs CTRL	RS vs CTRL	SIPS IV vs SIPS I
GIN54	GIN54	GIN54	COL1A1
RRM2	WDHD1	M5MO1	DPT
TOP2A	RRM2	CKB	COL3A1
MKI67	MCM7	FADS2	SLC34A3
MCM7	FADS2	WDHD1	TP53I3
TTK	SERPINB2	TOP2A	P4HA2
AURKB	MCM3	HMGB2	COL2A1
BIRC5	SPC24	ANLN	PCOLCE
SPC24	MCM2	LHFPL2	SERPINB2
KIFC1	HMGB2	MKI67	CES2
MCM6	MCM6	AURKB	CRTAP
ANLN	MCM4	HIST1H1D	COL1A2
WDHD1	STMN1	HMGCS1	HSD11B1
KIF20A	NCAPD2	RRM2	CERCAM
RACGAP1	SCD	BIRC5	COL5A2
KIF22	MKI67	TTK	GLT8D1
MCM3	NASP	HIST2H2AB	COL5A1
MCM2	TTK	SCD	LEPREL2
CES2	MCM5	SPC24	SULT1E1
FADS2	TOP2A	MCM7	LEPRE1

Zmiany w poziomie tych białek, po normalizacji za pomocą standaryzacji Z, przedstawiono za pomocą mapy ciepła (Ryc. 4.24). Pozwoliło to na wyróżnienie dwóch głównych grup białek, spośród których pierwsza obejmuje białka, których poziom rósł w pierwszym tygodniu starzenia a następnie spadał poniżej poziomu kontroli w czwartym tygodniu starzenia. Poziom białek należących do tej grupy w komórkach RS był zbliżony do poziomu komórek proliferujących. Grupę tę tworzyły przede wszystkim kolagen oraz enzymy biorące udział w jego modyfikacji i dojrzewaniu. Drugą grupę stanowiły białka, które mają obniżony poziom w komórkach starych w porównaniu do komórek kontrolnych. Poziom tych białek w komórkach starych (SIPS I, SIPS IV i RS) był porównywalny. Do grupy tej należą białka związane z replikacją, kondensacją chromosomów i mitozą oraz naprawą DNA, takie jak białka

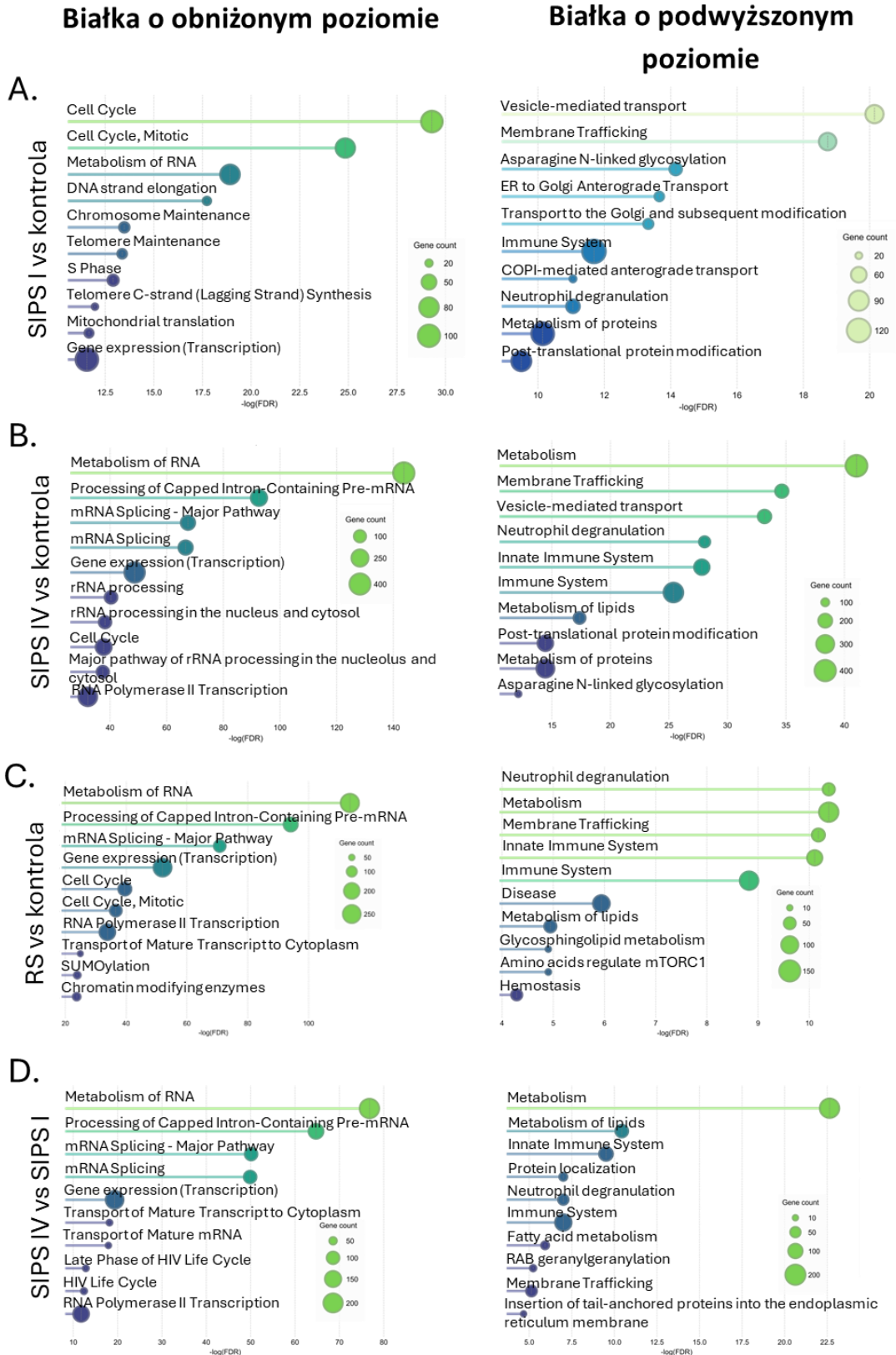
MCM, HMGB2 czy Ki67. W przedstawionym zestawieniu najbardziej znacząco zmieniających się białek wyróżnia się serpina B2, która rośnie na późnych etapach starzenia oraz w komórkach, które uległy starzeniu replikacyjnemu.



Ryc. 4.24. Mapa ciepła przedstawiająca względny poziom najbardziej zmieniających się 20 białek w każdej grupie badanej. Dla każdego porównania dwóch grup badanych. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z.

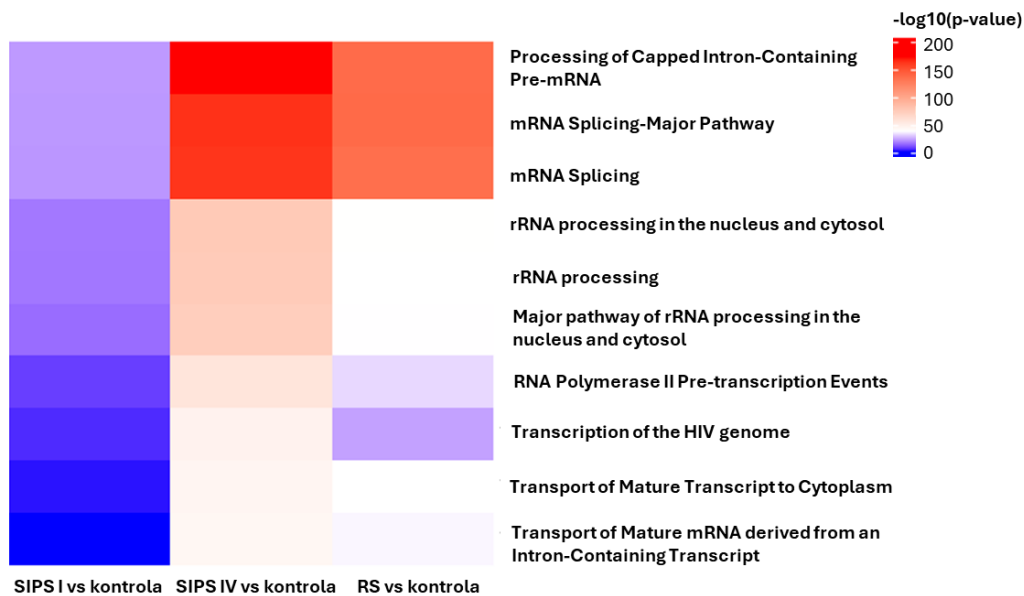
Analiza w bazie STRING (ang. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) oraz wykorzystanie danych z Reactome Pathways umożliwiło dokonanie pogłębionej analizy funkcjonalnej białek, których ekspresja istotnie spadała lub wzrastała w komórkach starych. W analizie uwzględniono białka, których poziom zmieniał się istotnie. Szlaki, w które zaangażowane były białka, których poziom spadał, pokrywały się w dużym stopniu ze szlakami zidentyfikowanymi w analizie transkryptomu tylko w przypadku komórek, które były na wczesnym etapie starzenia (SIPS I) i reprezentowały one ścieżki związane z regulacją cyklu

komórkowego oraz utrzymaniem integralności i prawidłowej struktury chromosomów (Ryc. 4.25A). W komórkach będących na późnym etapie starzenia (SIPS IV) oraz starych replikacyjnie (RS) najbardziej istotnie wzbogacone były szlaki związane z metabolizmem i obróbką RNA, jak również cyklem komórkowym i sumoilacją (Ryc. 4.25B i C). Szlaki, w których zaangażowane były białka o podwyższonym poziomie, różniły się w zależności od etapu i typu starzenia komórkowego. W komórkach SIPS I szlaki o największym wzbogaceniu były m.in. powiązane z transportem pęcherzykowym oraz błonowym, glikozylacją, jak również z regulacją komórek układu odpornościowego. W komórkach SIPS IV oraz RS wykazano wzbogacenie tych samych reaktywów, przy czym największym wzbogaceniem charakteryzowały się procesy związane z metabolizmem. Porównanie szlaków istotnie wzbogaconych pomiędzy późnym (SIPS IV) a wczesnym etapem (SIPS I) starzenia wykazało, iż komórki po czterech tygodniach wykazały obniżenie poziomu białek uczestniczących w modyfikacjach RNA. Z kolei białka, których wzbogacenie rośnie należały do ścieżek związanych przede wszystkim z metabolizmem i wpływem na komórki układu odpornościowego (Ryc. 4.25D).



Ryc. 4.25. Analiza za pomocą bazy REACTOME szlaków białek, których poziom znacząco spadał (lewa strona panelu) lub wzrastał (prawa strona panelu) w komórkach na wczesnym (SIPS I), późnym (SIPS IV) etapie starzenia oraz w komórkach replikacyjnych (RS) w porównaniu do komórek kontrolnych, oraz porównanie późnego etapu z starzenia z wczesnym.

Na rycinie 4.25. przedstawiono w formie mapy ciepła 10 najbardziej wzbogaconych szlaków wspólnych dla wszystkich badanych grup. W przypadku analizy szlaków sygnałowych białek, kluczowe zmiany związane są z obróbką RNA. Komórki RS wykazują zmiany na poziomie pośrednim pomiędzy wczesnym a późnym etapem starzenia (Ryc. 4.26).

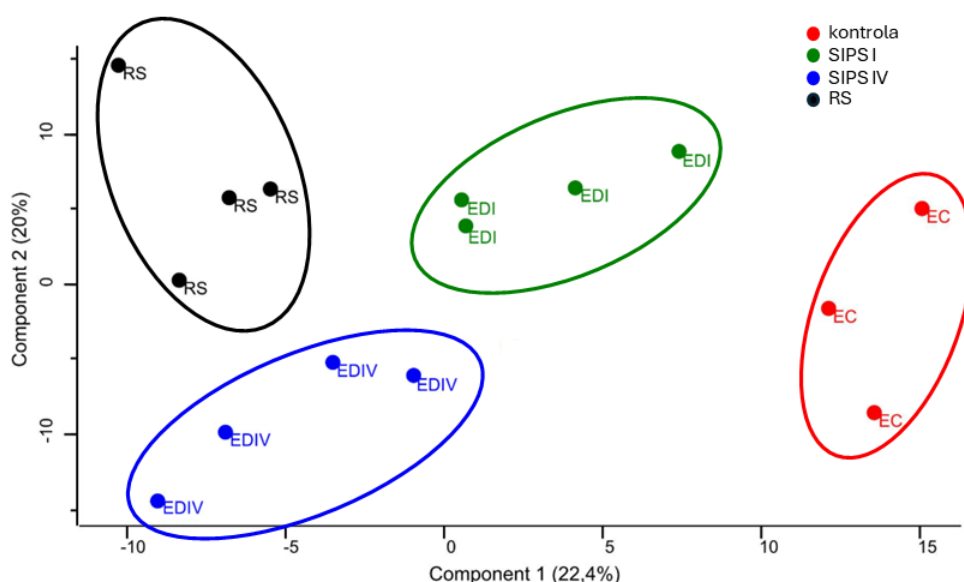


Ryc. 4.26. Analiza za pomocą bazy REACTOME najbardziej zmieniających się szlaków na podstawie zmian ekspresji w nie zaangażowanych, w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu oraz replikacyjnemu. $-\log_{10}(p\text{-value}) > 1,3$.

4.4. Analiza porównawcza proteomu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki VSMC będących na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu

Ostatnim etapem analizy porównawczej komórek VSMC ulegających starzeniu było zbadanie składu białkowego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) wydzielanych przez te komórki. Wyniki wcześniejszych badań opisanych w rozdziale 4.1.4. pokazały, że ulegające starzeniu komórki VSMC wydzielają więcej pęcherzyków niż komórki proliferujące, kontrolne. Liczba wydzielanych EVs wzrastała wraz z 'dojrzywaniem' fenotypu starzenia i była zbliżona w przypadku komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu i tych, które były na późnym etapie starzenia indukowanego stresem. Zadano zatem pytanie na ile zmiany w liczbie pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare korelują z różnicami w ich składzie białkowym.

Podobnie jak w przypadku analizy proteomu komórek w celu analizy składu białkowego EVs wydzielonych przez komórki, posłużono się spektrometrią mas z wykorzystaniem izobarycznych znaczników fragmentacyjnych TMT. Zidentyfikowano 4641 białek pęcherzykowych, co stanowi około 60% białek zidentyfikowanych w proteomie komórek. Analiza głównych składowych wykazała różnice pomiędzy proteomem EVs wydzielanych przez komórki indukowane do starzenia, komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu oraz komórki proliferujące. Co ciekawe, w przeciwieństwie do proteomu komórek, proteom EVs wydzielanych przez komórki będące na późnym etapie starzenia (EV_{SIPS_IV}) odróżniał się od proteomu EVs wydzielanych przez komórki stare replikacyjnie (EV_{RS}) (Ryc. 4.27).

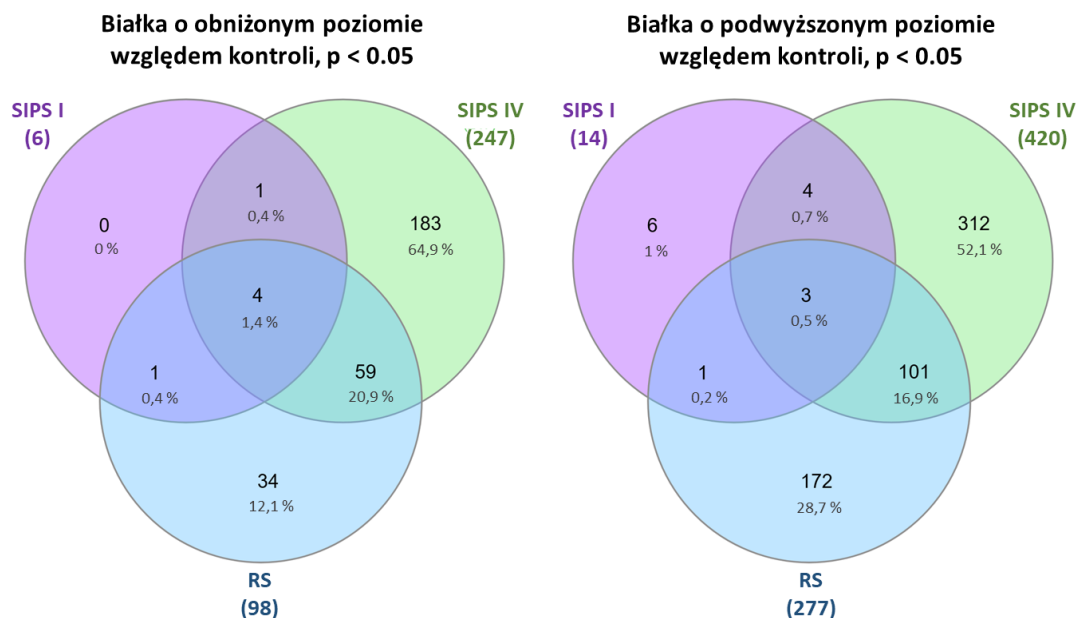


Ryc. 4.27. Analiza głównych składowych (PCA), ilustrująca podobieństwo i różnice proteomu pęcherzyków wydzielonych przez komórki kontrolne, komórki na wczesnym i późnym etapie starzenia (SIPS I i SIPS IV) oraz przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu (RS).

Spośród wszystkich zidentyfikowanych białek wyodrębniono 881 białek, których poziom zmieniał się w EVs w sposób istotny ($p < 0.05$).

Wykazano, że w EVs wydzielonych przez komórki stare 282 białek występuje na obniżonym względem kontroli (EV_{ctrl.}) poziomie, a przeszło 2 razy więcej białek (599) występowało na poziomie podwyższonym. W pęcherzykach wydzielonych przez komórki na wczesnym etapie starzenia (EV_{SIPS_I}) nie zaobserwowano żadnych unikalnych białek, których poziom spadał,

podczas gdy w EVs wydzielonych przez komórki będące na późnym etapie starzenia (EV_{SIPS_IV}) takich białek było aż 183 i stanowiły one 65% wszystkich zidentyfikowanych białek, których poziom spadał względem EVs z komórek kontrolnych. W pęcherzykach wydzielonych przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu (EV_{RS}) zidentyfikowano 34 białka, których poziom spadał tylko w tych pęcherzykach. Znaczną część proteomu EV_{RS} (20,9%) stanowiły białka wspólne z białkami zidentyfikowanymi w pęcherzykach wydzielonych przez komórki na późnym etapie starzenia (EV_{SIPS_IV}). Podobnie jak w przypadku białek, których poziom spadał w pęcherzykach wydzielonych przez komórki stare, najwięcej białek, których poziom rósł, zidentyfikowano w EV_{SIPS_IV} (70% wszystkich białek o rosnącym poziomie) i EV_{RS} (47% wszystkich białek o rosnącym poziomie). Część z nich, tj. 101 białek (17%), była identyfikowana w obydwu grupach EVs (Ryc. 4.28).

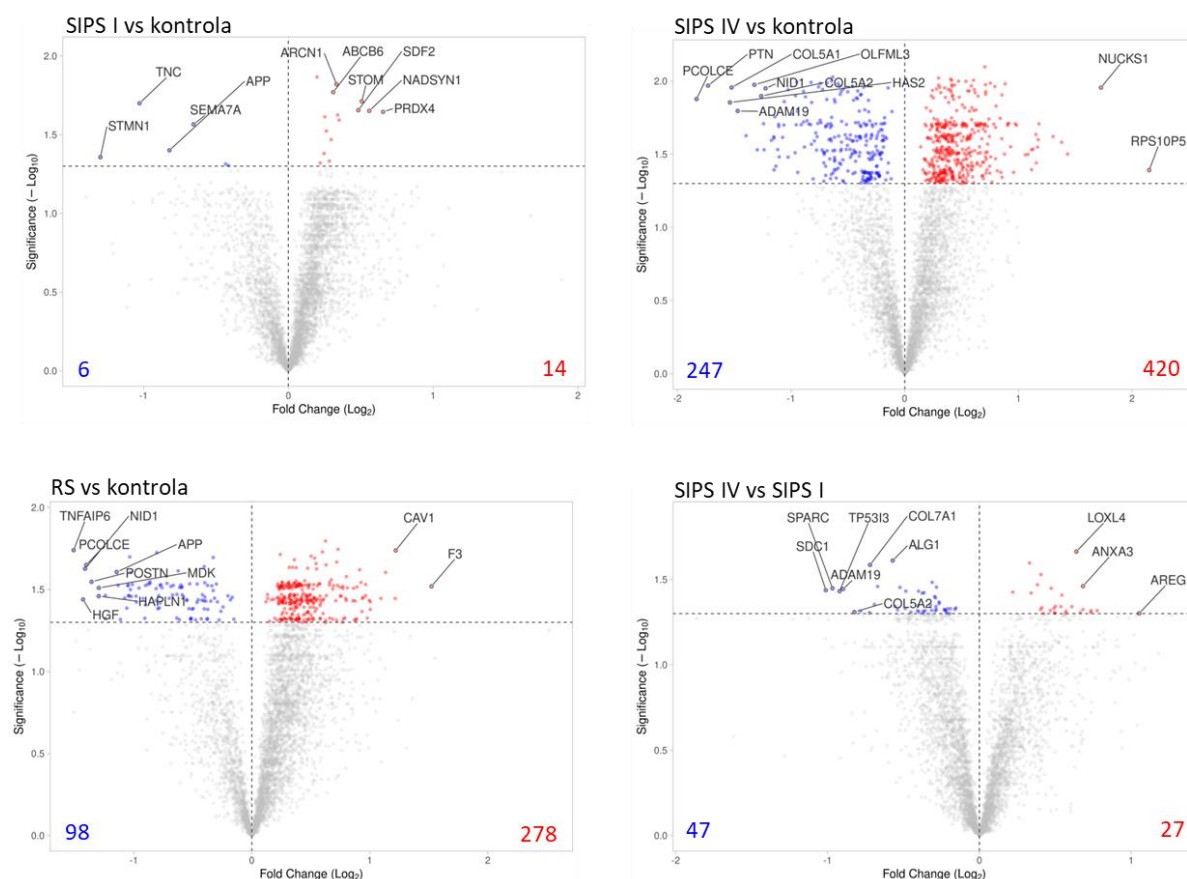


Ryc. 4.28. Diagramy Venna prezentujące rozkład białek wspólnych i unikalnych, których poziom spadał lub wzrastał istotnie statystycznie w pęcherzykach wydzielonych przez komórki ulegające starzeniu względem poziomu białek z pęcherzyków wydzielonych przez komórki kontrolne.

Zaobserwowano znaczące różnice w liczbie białek, których poziom zmieniał się istotnie statystycznie w zależności od typu starzenia i jego etapu. Liczba białek zmieniających się (rosnących lub malejących względem EV_{ctrl}) w pęcherzykach wydzielonych przez komórki SIPS IV (EV_{SIPS_IV}) była ponad 30-krotnie większa i prawie 20-krotnie większa w EVs

wydzielanych przez komórki RS (EV_{SR5}), niż w pęcherzykach wydzielonych przez komórki na wczesnym etapie starzenia (EV_{SIPS_I}) (Ryc. 4.29).

Biorąc pod uwagę krotność zmian (FC) w poziomie białek pęcherzykowych, była ona zbliżona do krotności zmian białek komórkowych i tylko w pojedynczych przypadkach przekraczała wartość $|\log_2 FC|=2$.



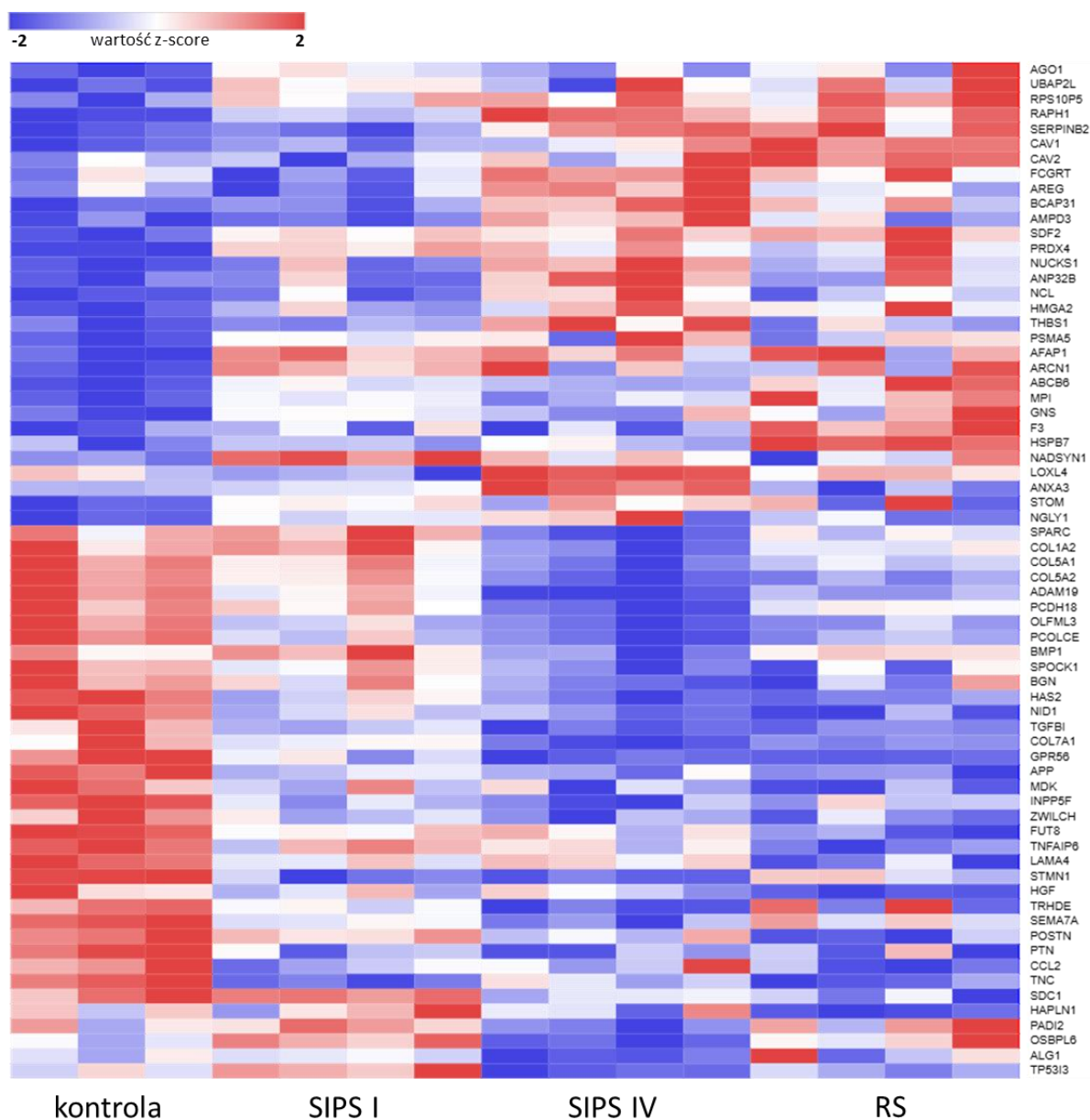
Ryc. 4.29. Wykresy typu volcano ploty przedstawiające wyniki analizy różnicowej zmian poziomu białek w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych pomiędzy wszystkimi grupami badanymi. Oś x: $\log_2(FC)$, oś y: $-\log_{10}(p\text{-value})$. Na niebiesko zaznaczono białka o obniżonym istotnie poziomie, na czerwono białka o podwyższonym istotnie poziomie (kryteria: $FDR < 0,05$). Białka podpisane, oznaczone na wykresie to 10 najbardziej znacząco i istotnie zmieniających się białek.

Spośród wszystkich istotnie zmieniających się białek pęcherzykowych wyodrębniono 20 białek (TOP 20), które zmieniały się najbardziej istotnie (najmniejsza wartość p) oraz najbardziej znacząco (najwyższa wartość FC) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Lista białek o najbardziej znacząco zmieniającym się poziomie. Wybrano je na podstawie odległości Manhattan wyznaczającej największe jednoczesne odchylenie w wartości $-\log_{10}(p\text{-value})$ oraz FC. Na niebiesko zaznaczono białka o obniżonym poziomie, a na czerwono białka, których poziom wzrastał.

SIPS I vs CTRL	SIPS IV vs CTRL	RS vs CTRL	SIPS IV vs SIPS I
TNC	PCOLCE	TNFAIP6	SDC1
STMN1	PTN	PCOLCE	SPARC
PRDX4	NUCKS1	F3	AREG
APP	RPS10P5	NID1	TP53I3
SEMA7A	COL5A1	CAV1	ADAM19
STOM	HAS2	POSTN	COL7A1
NADSYN1	OLFML3	HGF	LOXL4
ARCN1	ADAM19	MDK	ALG1
SDF2	NID1	HAPLN1	ANXA3
ABCB6	COL5A2	APP	COL5A2
PSMA5	SPOCK1	HSPB7	PCDH18
UBAP2L	SEMA7A	TNC	COL1A2
GNS	NCL	CCL2	BCAP31
NGLY1	TGFBI	CAV2	OSBPL6
RAPH1	PCDH18	LAMA4	SERPINB2
MPI	HMGA2	ADAM19	PADI2
INPP5F	THBS1	OLFML3	AMPD3
FUT8	GPR56	COL5A2	BMP1
AGO1	BGN	ZWILCH	FCGRT
AFAP1	ANP32B	COL5A1	TRHDE

Różnice w poziomach tych białek zwizualizowano, po standaryzacji Z, jako mapę ciepłą (Ryc. 4.30). W odróżnieniu od białek TOP 20 zidentyfikowanych w komórkach, analogicznie wyodrębniona grupa białek pęcherzykowych charakteryzowała się większą zmiennością pomiędzy poszczególnymi próbkami należącymi do jednej grupy eksperymentalnej. Pomimo tej zmienności udało się wyróżnić dwie główne grupy białek, dla których wzór zmian w poziomie był zbliżony: grupa I - białka, których poziom był najniższy w pęcherzykach wydzielanych przez komórki kontrolne, a następnie wzrastał w czasie procesu starzenia oraz grupa II - białka, których poziom w pęcherzykach malał wraz z pogłębianiem się starzenia komórek. W obu grupach, EVs wydzielane przez komórki stare replikacyjnie, charakteryzowały się poziomem białek zbliżonym do poziomu zaobserwowanego w pęcherzykach wydzielanych przez komórki będące na późnym etapie starzenia.



Ryc. 4.30. Mapa ciepła przedstawiająca względny poziom najbardziej zmieniających się w EVs 20 białek w każdej grupie badanej. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z.

Dalsza analiza funkcjonalna ujawniła, że w grupie białek, których poziom wzrastał w pęcherzykach wydzielonych przez komórki stare (grupa I), zidentyfikowano głównie białka związane z regulacją ekspresji, organizacji chromatyny, biogenezą oraz transportem pęcherzyków oraz białka związane z adhezją i migracją komórek. Do grupy tej również należały białka związane z metabolizmem i odpowiedzią na stres oraz czynniki sygnałowe (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Białka TOP20, których poziom wzrastał w EVs wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu. Białka zostały pogrupowane według procesów biologicznych, w których uczestniczą.

Białka rosnące z TOP20 białek w EVs	
Regulacja ekspresji genów	AGO1 (Argonaute-1) HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2) NCL (Nucleolin) NUCKS1 (Nuclear Casein and Cyclin-dependent Kinase Substrate 1) ANP32B (Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B) RPS10P5 (Ribosomal Protein S10 Pseudogene 5)
Transport pęcherzykowy	CAV1 (Caveolin-1) CAV2 (Caveolin-2) FCGRT (Fc Gamma Receptor And Transporter) BCAP31 (B-Cell-Associated Protein 31) ARCN1 (Archain 1 Coat Protein Complex I Subunit Delta) STOM (Stomatin) ABCB6 (ATP-binding cassette super-family B member 6)
Metabolizm i enzymy	AMPD3 (Adenosine Monophosphate Deaminase 3) MPI (Mannose Phosphate Isomerase) GNS (Glucosamine (N-Acetyl)-6-Sulfatase) NADSYN1 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Synthetase 1)
Stres komórkowy	PRDX4 (Peroxiredoxin-4) HSPB7 (Heat Shock Protein Beta-7) SDF2 (Stromal Cell-Derived Factor 2)
ECM, adhezja i migracja	THBS1 (Thrombospondin-1) LOXL4 (Lysyl Oxidase-Like 4) RAPH1 (Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1) AFAP1 (Actin Filament Associated Protein 1) ANXA3 (Annexin A3)
Krzepnięcie i odpowiedź zapalna	SERPINB2 (Plasminogen Activator Inhibitor-2) F3 (Cagulation factor III) AREG (Amphiregulin)

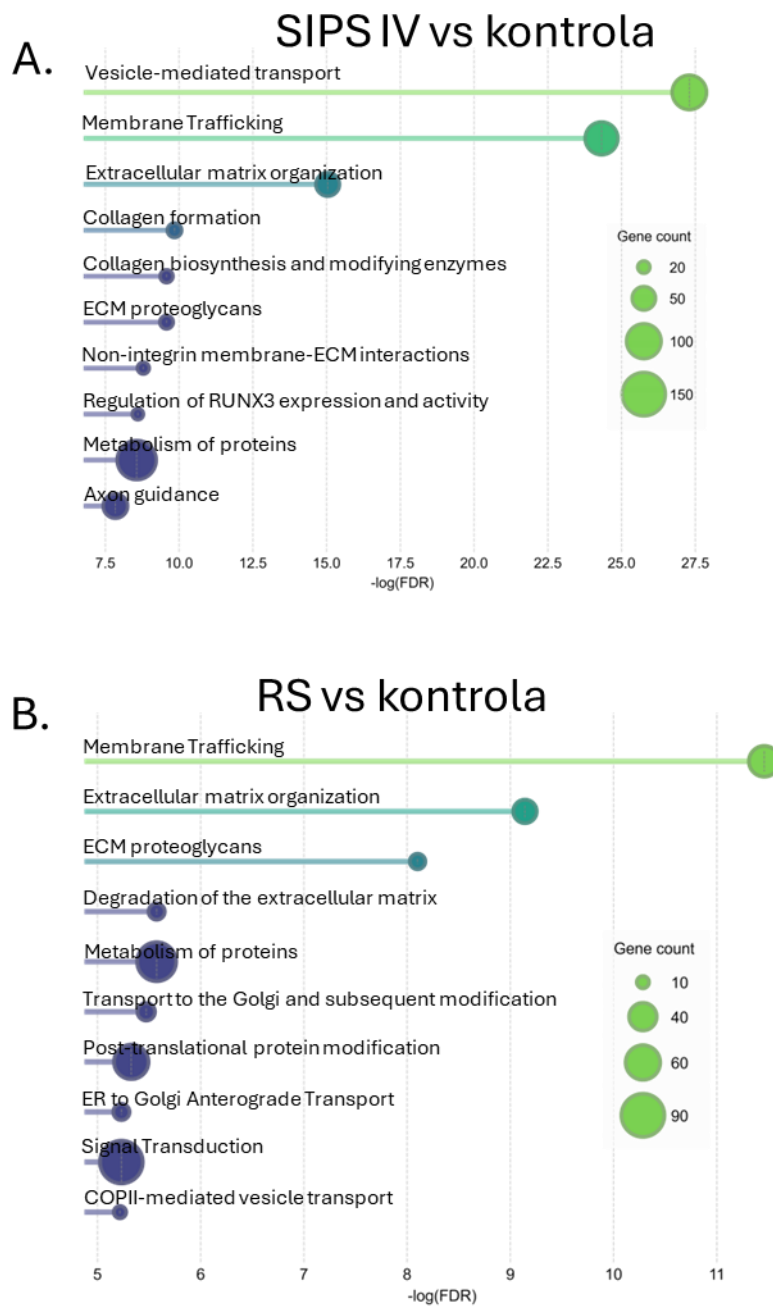
W grupie białek, których poziom spadał (grupa II), najbardziej liczną grupą były te związane z tworzeniem oraz modyfikacją macierzy zewnątrzkomórkowej oraz przekazywaniem sygnału i komunikacją komórkową (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Białka TOP20, których poziom ulegał obniżeniu w EVs wydzielanych przez komórki VSMC ulegające starzeniu. Białka zostały pogrupowane według procesów biologicznych, w których uczestniczą.

Białka spadające z TOP20 białek w EVs	
ECM i struktura tkanek	<p>Kolageny:</p> <p>COL1A2 (Collagen alpha-2(I) chain), COL5A1 (Collagen alpha-1(V) chain), COL5A2 (Collagen alpha-2(V) chain), COL7A1 (Collagen alpha-1(VII) chain)</p> <p>Białka ECM i adhezji:</p> <p>SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), BGN (Biglycan), NID1 (Nidogen-1), TGFBI (Transforming growth factor, beta-induced), POSTN (Periostin), TNC (Tenascin C), SPOCK1 (Testican-1), HAPLN1 (Hyaluronan and proteoglycan link protein 1), LAMA4 (Laminin subunit alpha-4)</p>
Przebudowa ECM	<p>ADAM19 (ADAM Metallopeptidase Domain 19), BMP1 (Bone morphogenetic protein 1), PCOLCE (Procollagen C-endopeptidase enhancer 1)</p>
Polisacharydy i glikokaliks	<p>HAS2 (Hyaluronan Synthase 2), TNFAIP6 (Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 6), SDC1 (Syndecan-1), FUT8 (Alpha-(1,6)-fucosyltransferase), ALG1 (Chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase)</p>
Transdukcja sygnału i komunikacja komórkowa	<p>GPR56 (ADGRG1) (G protein-coupled receptor 56), PCDH18 (Protocadherin-18), APP (Amyloid-beta precursor protein), MDK (Midkine), PTN (Pleiotrophin), HGF (Hepatocyte Growth Factor), CCL2 (MCP-1) (monocyte chemoattractant protein 1), SEMA7A (Semaphorin-7A),</p>

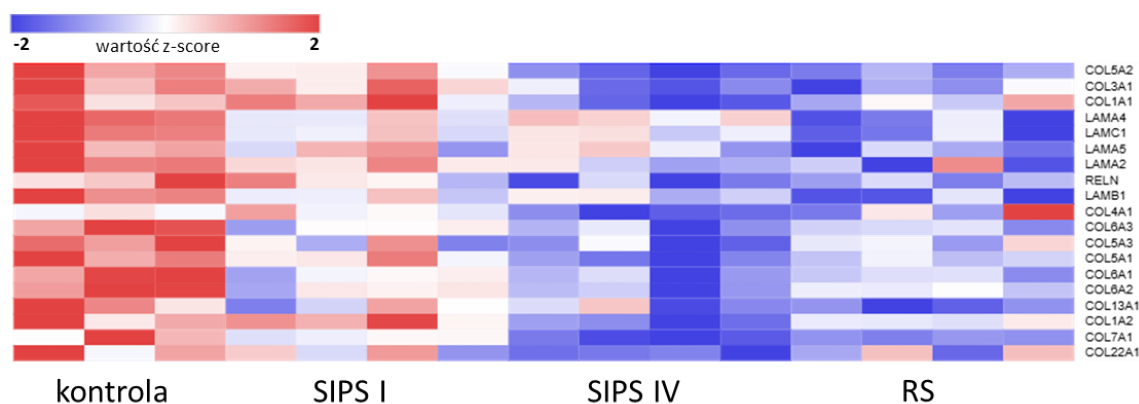
Ze względu na zbyt małą liczbę zidentyfikowanych białek, których poziom zmieniał się istotnie w pęcherzykach wydzielonych przez komórki na wczesnym etapie starzenia, analizę szlaków przy wykorzystaniu bazy Reactome została przeprowadzona tylko dla pęcherzyków wydzielanych przez komórki na późnym etapie starzenia oraz komórki starzejące się replikacyjne (Ryc. 4.31). W EVs wydzielonych przez komórki SIPS IV znajdowały się głównie białka związane z transportem pęcherzykowym oraz organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym syntezą kolagenu. Białka w pęcherzykach wydzielonych przez komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu, podobnie jak EV_{SIPS IV}, zaangażowane były

w organizację macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazano również obecność białek zaangażowanych w transport z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego.



Ryc. 4.31. Analiza za pomocą bazy REACTOME szlaków wszystkich białek, których poziom zmienił się istotnie, w komórkach na późnym (SIPS IV) etapie starzenia oraz w komórkach replikacyjnych (RS) w porównaniu do komórek kontrolnych,

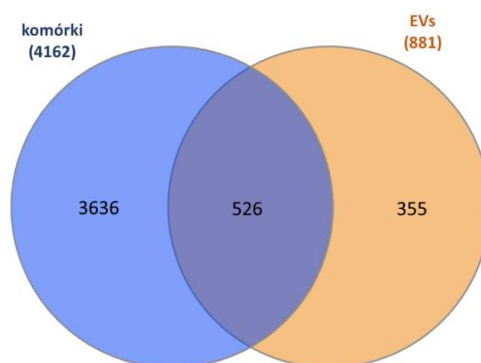
Analiza białek budujących macierz zewnątrzkomórkową, które zostały zidentyfikowane w EVs, pozwoliła na wykazanie, postępującego w czasie i towarzyszącego starzeniu spadku ich poziomu (Ryc. 4.32).



Ryc. 4.32. Mapa ciepła przedstawiająca względny poziom białek macierzy zewnątrzkomórkowej, których poziom zmieniał się istotnie w EVs w trakcie starzenia komórek VSMC. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z.

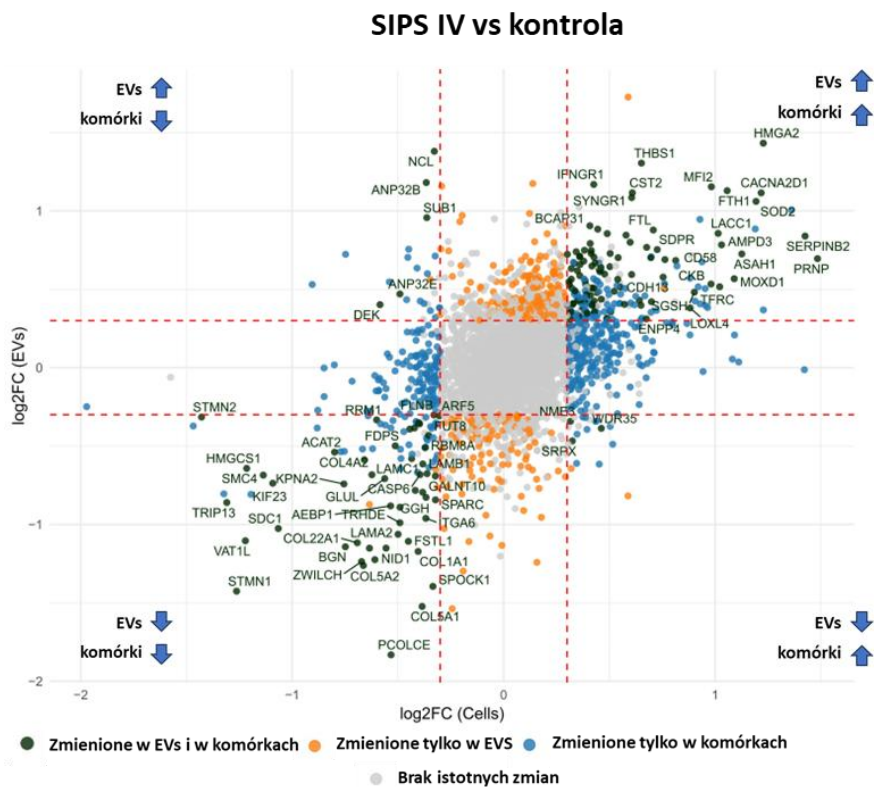
4.5. Proteom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako reprezentacja proteomu komórkowego

Porównano również proteom komórek z proteomem wydzielonych przez nie pęcherzyków. Wyróżniono 526 białek, których poziom zmieniał się istotnie zarówno w komórkach starych jak i w pęcherzykach przez nie wydzielanych. Białka te stanowiły 12 % wszystkich istotnie zmieniających w starzeniu białek komórkowych oraz 60% białek zidentyfikowanych w EVs wydzielonych przez komórki stare (Ryc. 4.33).



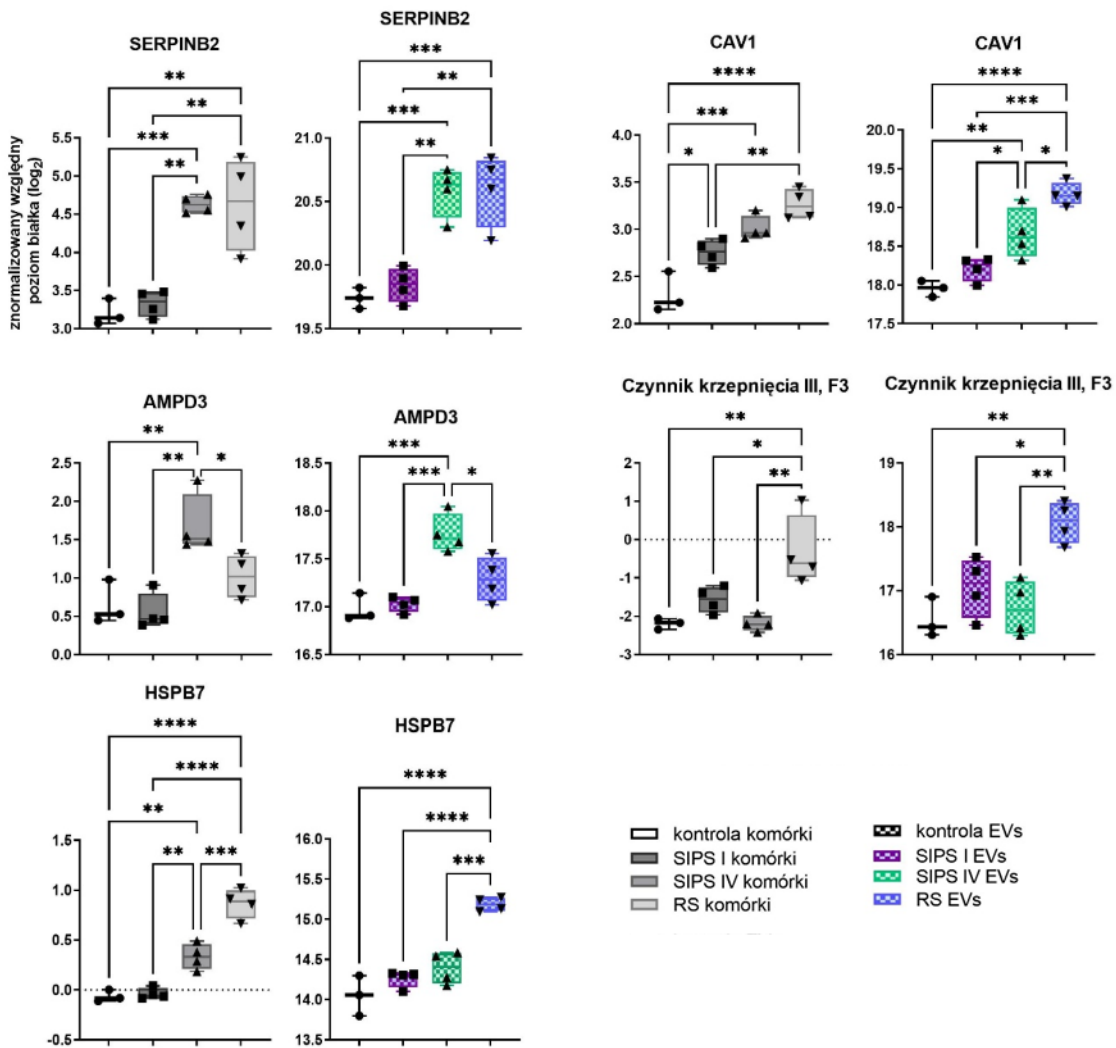
Ryc. 4.33. Diagram Venna przedstawiający rozkład białek wspólnych i unikalnych, których poziom ekspresji spadał lub wzrastał istotnie statystycznie w komórkach ulegających starzeniu oraz pęcherzykach wydzielonych przez te komórki.

Dokonano również analizy porównującej zmiany w poziomie poszczególnych białek w komórkach oraz EVs przez nie wydzielonych (Ryc. 4.34). Przedstawiona analiza pozwoliła na wyodrębnienie czterech podgrup w zależności od kierunku zmian (wzrost lub spadek). Wyodrębniono białka zmieniające się istotnie statystycznie ($p < 0.05$), które rosły lub spadały przynajmniej o 30% ($FC > 0.3$). Stwierdzono, że większość zidentyfikowanych białek zmienia się w wydzielanych pęcherzykach w ten sam sposób jak w komórkach, które je wydzielają. W grupie białek których poziom wzrastał w EVs i spadał w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu (SIPS IV), były białka ANP32E i B, SUB1, DEK oraz NCL, które odpowiadają między innymi za strukturę DNA, pełniąc na przykład rolę białek opiekuńczych histonów lub wpływając na geometrię DNA.



- F3 (trombokinaza tkankowa 3, czynnik krzepnięcia III) – białko kaskady krzepnięcia krwi,
- HSPB7 -białko szoku cieplnego,
- AMPD3 (deaminaza AMP 3) - katalizuje przemianę adenylozomonofosforanu (AMP) do inozynomonofosforanu (IMP) i amoniaku.

Na rycinie 4.34 przedstawiono wykresy ilustrujące zmiany w poziomie tych białek.



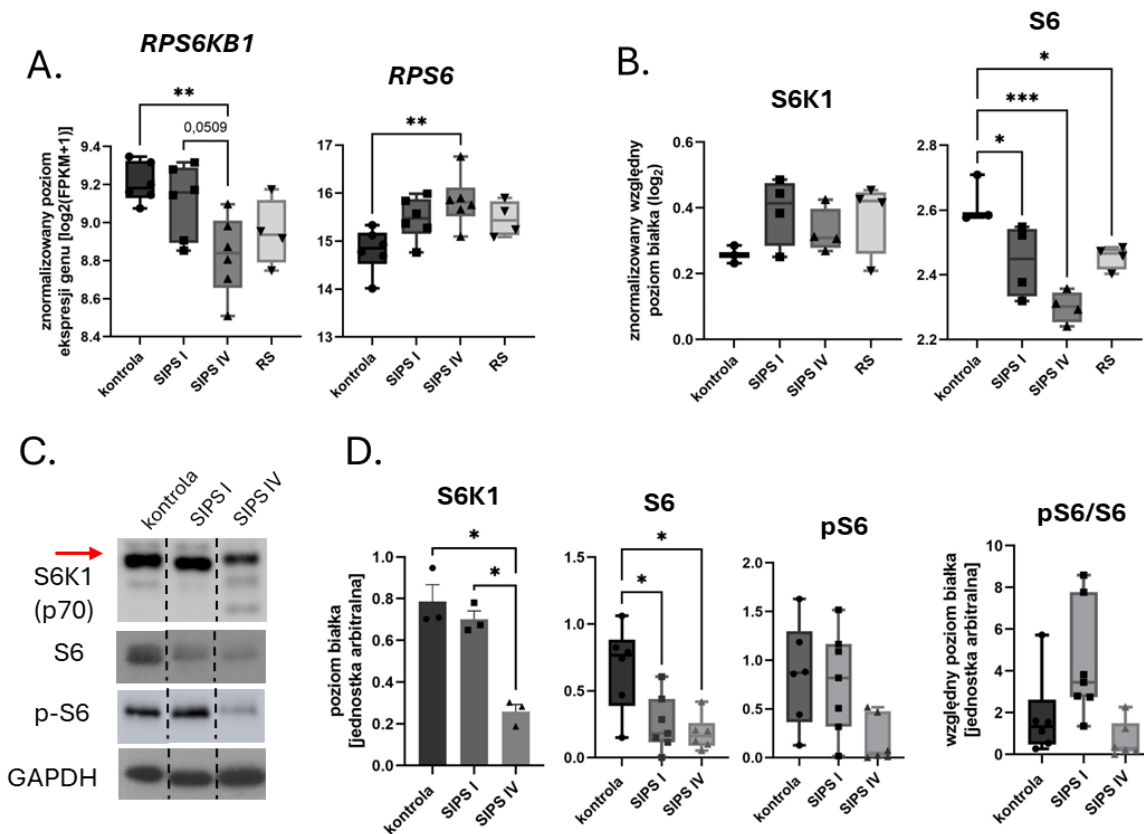
Ryc. 4.35. Porównanie poziomu białek, które zmieniają się istotnie statystycznie i znacząco zarówno w EVs jak i w komórkach je wydzielających. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=3-6.

4.6. Analiza procesu autofagii w komórkach VSMC na różnych etapach procesu starzenia

Autofagia jest procesem wieloetapowym, w którego regulację jest zaangażowany szereg białek. Ocenę przebiegu tego procesu w ulegających starzeniu komórkach VSMC przeprowadzono w oparciu o analizę ekspresji genów i poziomu wybranych białek autofagicznych, analizę lizosomów uczestniczących w końcowym etapie degradacji materii komórkowej zgromadzonej w pęcherzykach autofagicznych oraz poprzez określenie poziomu aktywności autofagii tzw. *autophagic flux* na wczesnym i późnym etapie procesu starzenia indukowanego stresem oraz w starzeniu replikacyjnym.

4.6.1. Ocena ekspresji genów oraz poziomu białek związanych z autofagią

Proces autofagii regulowany jest przez ścieżkę zależną od mTOR i może zostać aktywowany w wyniku stresu oraz niedoboru czynników wzrostu. Za przekazanie sygnału odpowiada mTORC1 - kompleks kinazy mTOR, który w warunkach optymalnych jest aktywny i hamuje autofagię. Podczas stresu, aktywność kompleksu 1 mTOR (mTORC1) spada, indukując proces autofagii. Aktywność tego kompleksu analizowano poprzez badanie poziomu ufosforylowanej formy białka S6. Analizowano również poziom kinazy S6 (S6K), która jest bezpośrednim substratem mTORC1 i która fosforyluje białko S6. W komórkach ulegających starzeniu zaobserwowano spadek ekspresji genu kodującego kinazę S6, przy jednoczesnym wzroście ekspresji genu *RPS6* (koduje białko S6). Analiza proteomu wykazała brak istotnych zmian w poziomie kinazy S6 oraz znaczny, postępujący w czasie, spadek białka S6 w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu (SIPS I i SIPS IV) oraz w komórkach RS. Poziom kinazy S6 badany za pomocą Western blot pokrywał się ze wzorem zmian ekspresji genu kodującego to białko. Analizowano również poziom ufosforylowanej formy białka S6 (p-S6) i stwierdzono 25% wzrost p-S6 w komórkach na wczesnym etapie starzenia, a następnie wyraźny spadek poniżej poziomu obserwowanego w komórkach kontrolnych (Ryc. 4.36).

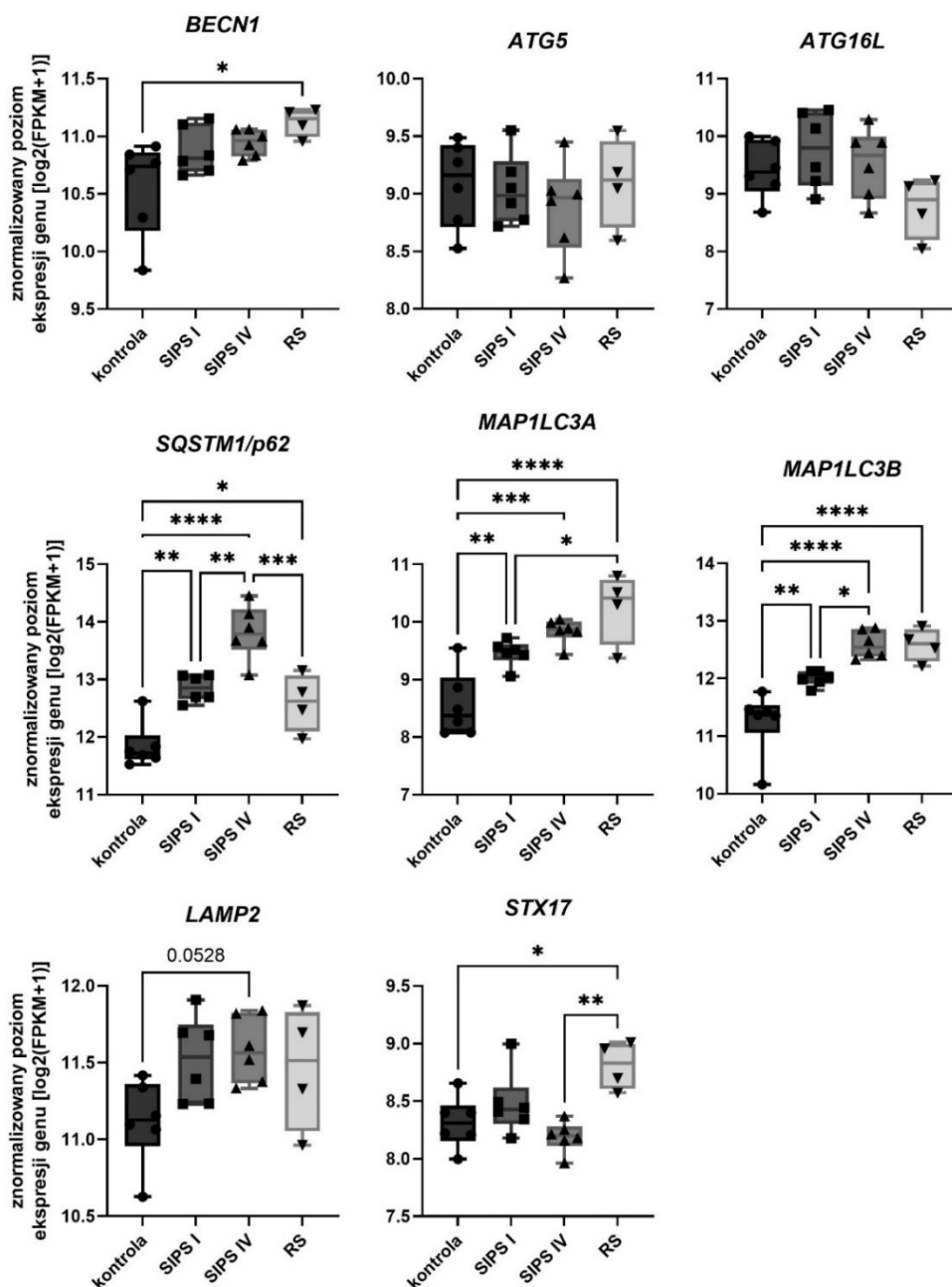


Ryc. 4.36. Analiza poziomu ekspresji genów i białka efektorów ścieżki mTOR podczas starzenia komórek VSMC. A. Ekspresja genów kodujących kinazę S6 (*S6K1*) oraz białko S6, n=4-6. B. Poziomy białka S6K1 oraz S6 określone metodą spektrometrii mas, n=3-4. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max). C. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące poziom kinazy S6, oraz ufosforylowanej formy białka S6 w poszczególnych wariantach doświadczalnych. D. Analiza densytometryczna wyników Western blot, n=3-7. Wykresy przedstawiają poziom białek po normalizacji do białka referencyjnego – GAPDH. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max) dla S6K1, średnia wartość ±SEM dla S6, pS6 oraz pS6/S6.

Do dalszej analizy wytypowano 8 genów kodujących białka związane z regulacją i/lub przebiegiem różnych etapów autofagii: *BECN1* (beklina 1), biorąca udział w inicjacji powstawania autofagosomu, *ATG5* oraz *ATG16L*, występujące w kompleksie uczestniczącym w wydłużaniu błony tworzącego się autofagosomu i *SQSTM1*, który jest białkiem adaptorowym (*SQSTM1/p62*) znakującym białka przeznaczone do degradacji. Geny *STX17* (syntaksyna 17) oraz *LAMP2* kodują białka biorące udział w fuzji lizosomu z autofagosomem. W analizie uwzględniono geny kodujące dwie izoformy białka LC3 – A oraz B, które są białkami, do których przyłączają się białka adaptorowe.

Poziom ekspresji genów kodujących białka biorące udział w początkowych etapach autofagii, takie jak *BECN1*, *ATG5* oraz *ATG16L*, pozostawał na zbliżonym poziomie w komórkach

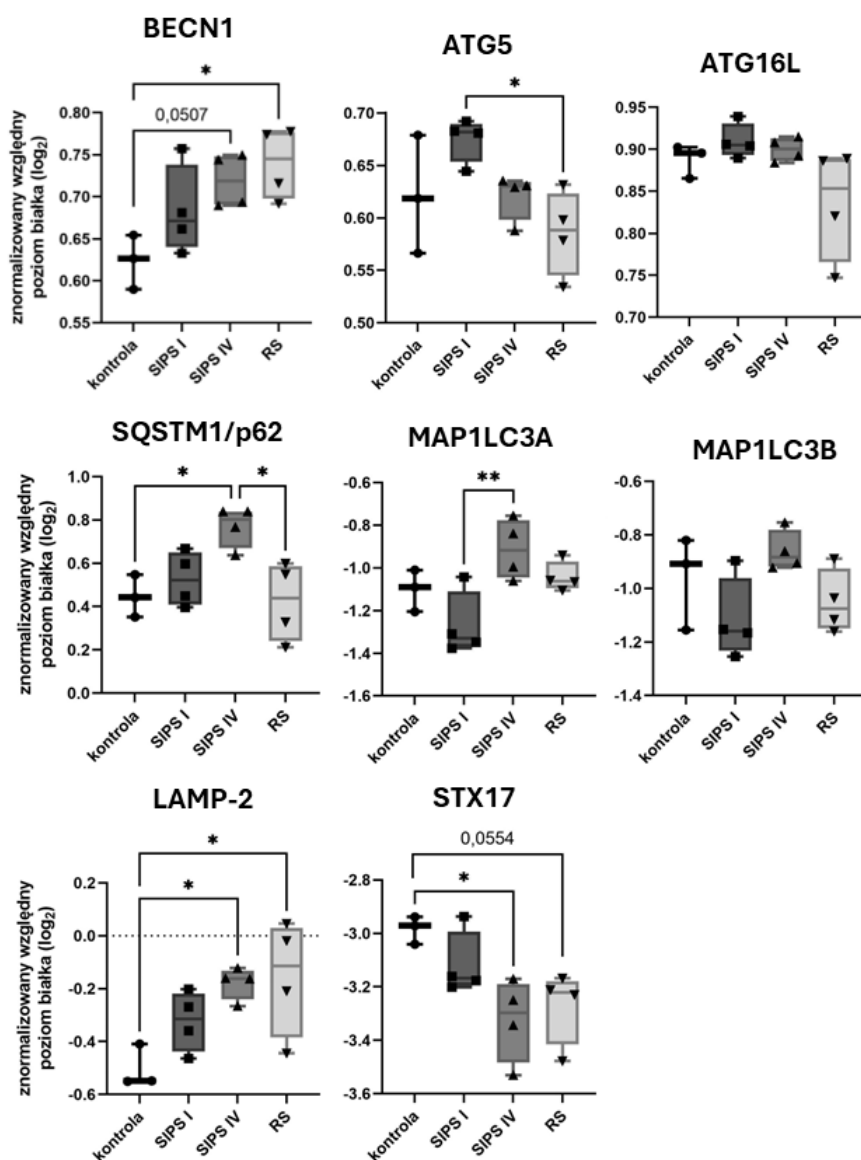
będących na wczesnym i późnym etapie starzenia. Zaobserwowano nieznaczny, istotny statystycznie wzrost ekspresji *BECN1* oraz spadek *ATG16L* w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Znaczne zmiany w ekspresji zaobserwowano natomiast w genach kodujących białka biorące udział w znakowaniu struktur lub białek przeznaczonych do degradacji - *SQSTM1*, fuzji - *STX17* oraz występujących na dojrzałych autofagosomach - *MAP1LC3*. Wykazano stopniowy, narastający w trakcie starzenia indukowanego stresem wzrost ekspresji genów *SQSTM1* i *MAP1LC3A/B* oraz istotnie statystycznie podwyższony poziom ekspresji *STX17*, *MAP1LC3A/B* i *SQSTM1* w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Poziom ekspresji *LAMP2* był podwyższony w obydwu typach starzenia (Ryc. 4.37).



Ryc. 4.37. Analiza ekspresji wybranych genów kodujących białka związane z autofagią przeprowadzona w oparciu o dane uzyskane z RNAseq. Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4-6.

Analiza poziomu wybranych białek związanych z autofagią przeprowadzona w oparciu o dane uzyskane przy użyciu spektrometrii mas, tylko częściowo odzwierciedlała zmiany w poziomie ekspresji genów je kodujących. Dotyczyło to następujących białek: beklina1, której poziom rósł w ulegających starzeniu komórkach; ATG16L, którego poziom ulegał nieznacznemu obniżeniu w komórkach starych replikacyjne; SQSTM1/p62, którego poziom rósł i był podwyższony istotnie statystycznie jedynie na późnych etapach starzenia indukowanego stresem (SIPS IV)

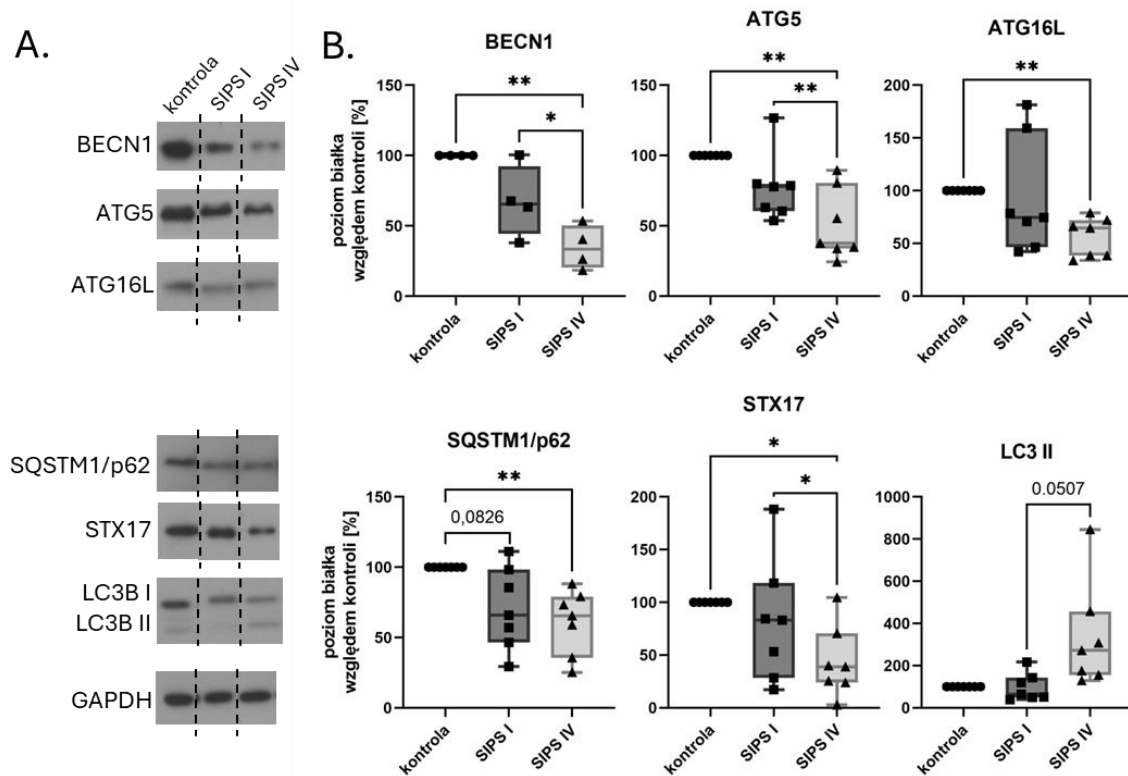
oraz LAMP-2, którego poziom narastał stopniowo w trakcie starzenia indukowanego stresem oraz był podwyższony w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu. Odnotowano również spadek poziomu białka STX17 w komórkach SIPS IV i RS, oraz zmienny, zależny od typu starzenia i jego etapu poziom białka MAP1LC3A/B (Ryc. 4.38).



Ryc. 4.38. Analiza zmian poziomu wybranych białek związanych z autofagią (dane uzyskane z analizy proteomicznej w wykorzystaniu spektrometrii mas). Wykres ramka – wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=3-4.

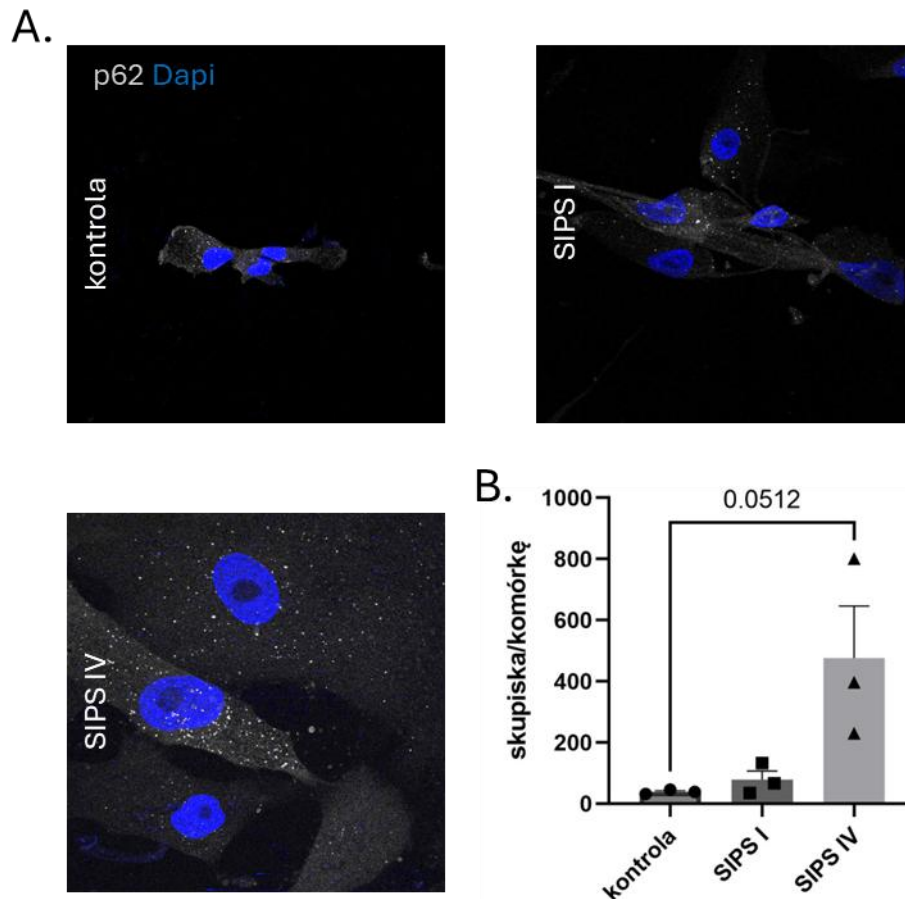
Co ciekawe, analiza poziomu białek autofagicznych przeprowadzona z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał (Western blot) dowiodła, że poziom wszystkich badanych białek ulega stopniowemu obniżeniu w trakcie starzenia indukowanego stresem, osiągając

najniższy poziom w późnym etapie tego procesu (SIPS IV). Zaobserwowano również nieistotny statystycznie, choć wyraźny, wzrost lipidowanej formy białka LC3B (LC3B II) w komórkach SIPS IV, która to forma lokalizuje się na powierzchni autofagosomów, sugerując ich podwyższoną liczbę w badanych komórkach (Ryc. 4.39).



Ryc. 4.39. Analiza zmian poziomu białek związanych z autofagią. A. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych. B. Analiza densytometryczna wyników Western blot. Wykres ramka – wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4-7. Wykresy przedstawiają poziom białek po normalizacji do białka referencyjnego – GAPDH.

Ze względu na rozbieżne wyniki uzyskane z analiz proteomicznych i analizy Western blot białka SQSTM1/p62, wykonano immunocytochemię SQSTM1/p62 w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu stresem. Wykazała ona znaczący wzrost liczby skupisk w komórkach indukowanych do starzenia, będących na późnym jego etapie (SIPS IV). Uzyskane dane były zbliżone z wynikami uzyskanymi w oparciu o analizę proteomiczną (Ryc. 4.40).



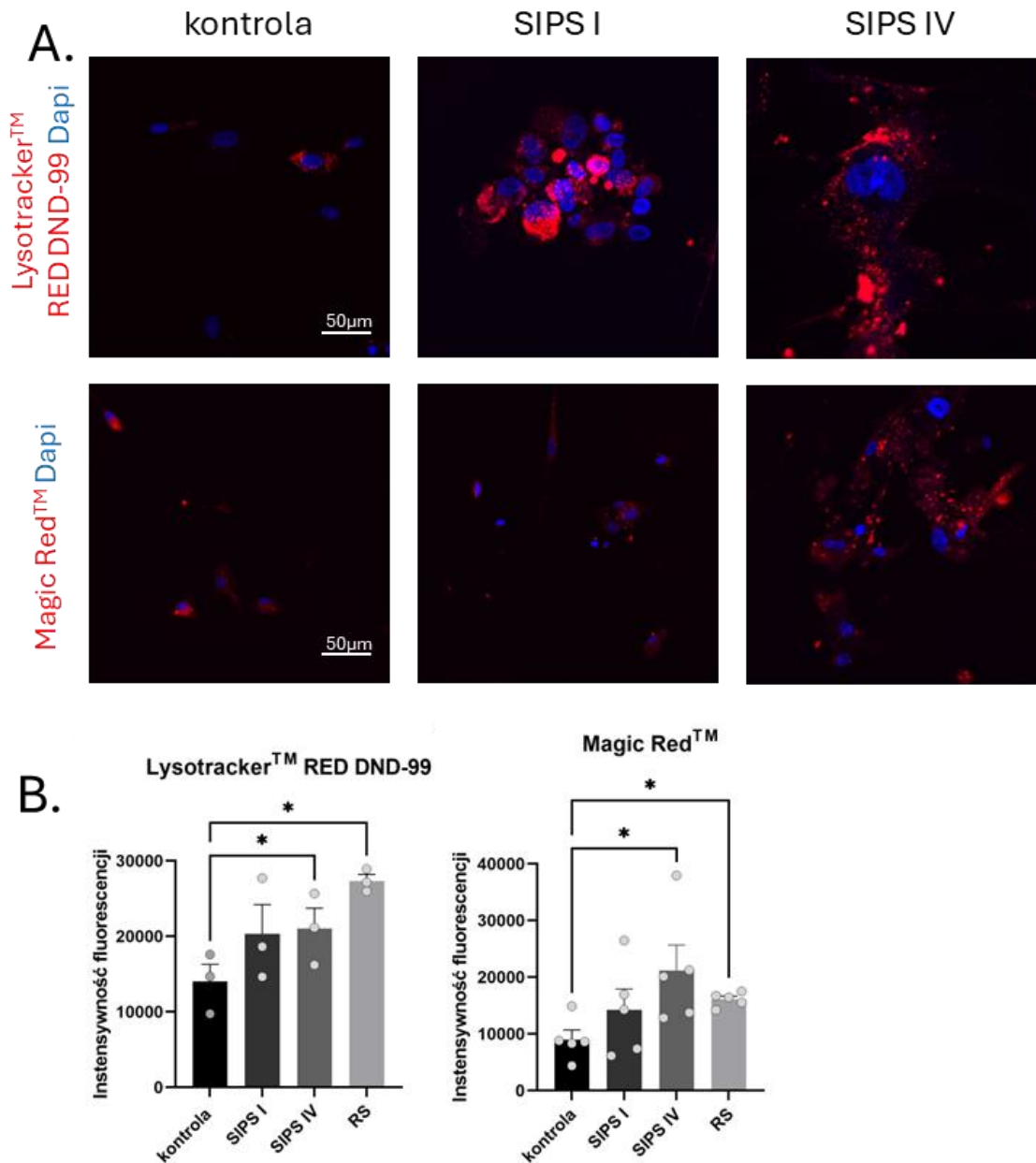
Ryc. 4.40. Analiza zmiany liczby skupisk białka SQSTM1/p62. A. Wizualizacja liczby agregatów białka SQSTM1/p62, B. Ilościowa analiza liczby skupisk białka SQSTM1/p62, średnia, \pm SEM, n=3.

Powyższe analizy wskazują, że starzenie komórek VSMC koreluje ze zmianami w ekspresji genów i w poziomie białek zaangażowanych w regulację autofagii. Zaobserwowane zmiany postępują wraz z czasem i zależą od etapu starzenia.

4.6.2. Analiza ilości i aktywności lizosomów

Końcowym etapem autofagii jest fuzja autofagosomów z lizosomami, co umożliwia degradację materiału komórkowego. W związku z powyższym zbadano ilość i aktywność lizosomów w komórkach VSMC ulegających starzeniu. Za miarę ilości lizosomów (tzw. masa lizosomów) przyjęto intensywność fluorescencji barwnika LysoTracker RED DND-99, którym barwiono komórki. Po dyfuzji do lizosomu, LysoTracker RED DND-99, będący słabą zasadą połączoną z hydrofobowym fluoroforem, dzięki niskiemu pH charakterystycznemu dla funkcjonalnych lizosomów, ulega protonacji i gromadzi się w tych organellach. Obserwacje przeprowadzone w mikroskopie fluorescencyjnym pozwoliły na stwierdzenie wzrostu fluorescencji LysoTracker

RED DND-99 w komórkach ulegających starzeniu (Ryc. 4.41A). Pomiar intensywności fluorescencji z zastosowaniem fluorymetru wykazał wzrost masy lizosomów w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu stresem oraz starzeniu replikacyjnemu, a zmierzona intensywność fluorescencji odpowiadająca masie lizosomów była przynajmniej dwukrotnie wyższa niż w komórkach kontrolnych (Ryc. 4.41B).



Ryc. 4.41. Analiza masy lizosomów i ich funkcjonalności w komórkach VSMC ulegających starzeniu. A. Wizualizacja lizosomów za pomocą LysoTracker™ RED DND-99 oraz detekcja funkcjonalnych lizosomów w oparciu o pomiar aktywności enzymu lizosomalnego - katepsyny B za pomocą Magic Red™, B. Ilościowa analiza intensywności fluorescencji LysoTracker™ RED DND-99 i Magic Red, średnia ±SEM, n=3-5.

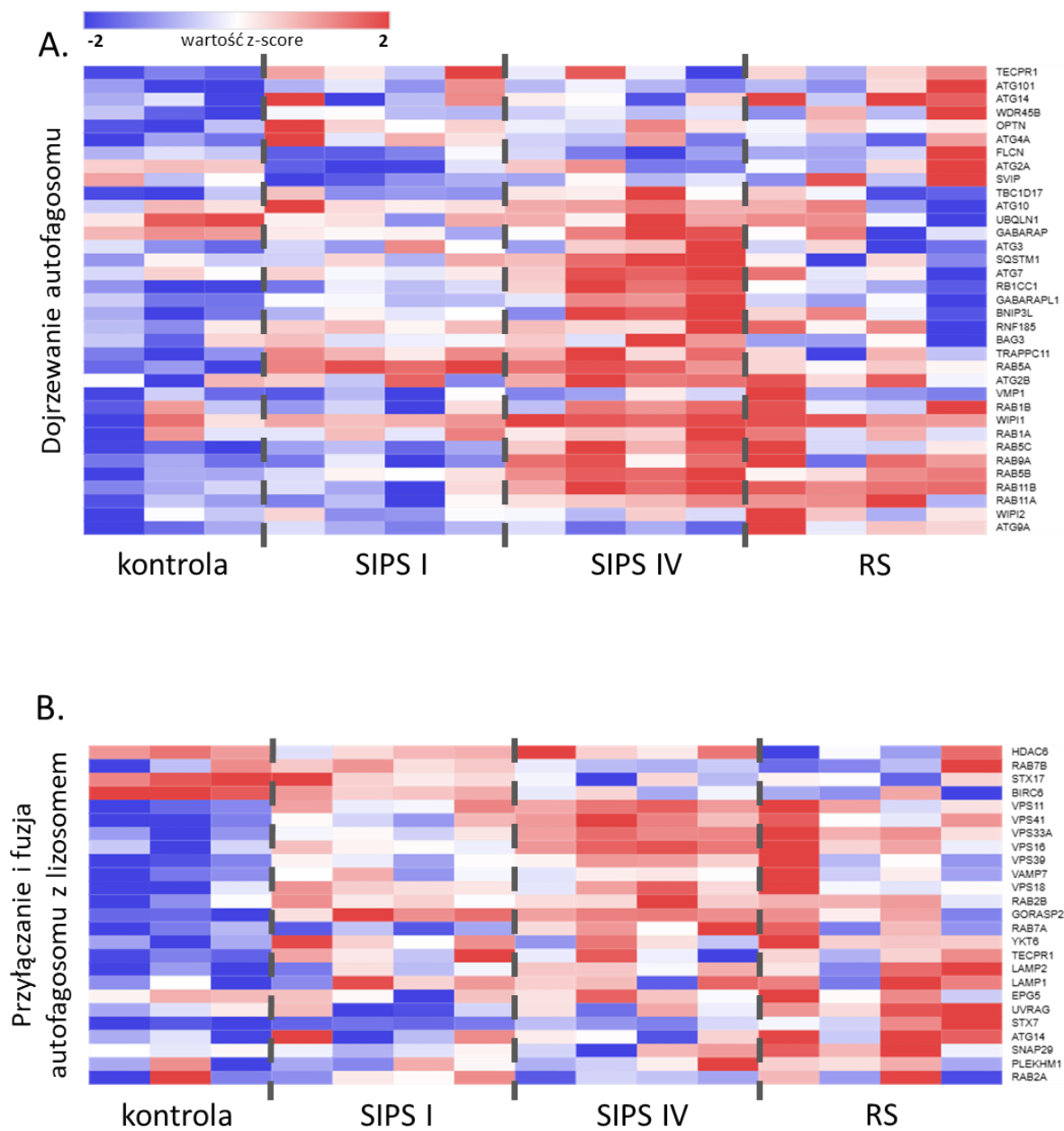
Stosując sondę Magic Red dokonano oceny aktywności lizosomów. Magic Red jest substratem dla katepsyny B - proteazy cysteinowej zaangażowanej w degradację białek, który po hydrolizie w lizosomach i wzbudzeniu światłem o określonej długości emituje czerwoną fluorescencję. Obserwacje mikroskopowe wykazały podwyższony poziom fluorescencji w komórkach starych inkubowanych w obecności sondy. Analiza ilościowa pozwoliła na wykazanie stopniowego i znacznego wzrostu intensywności fluorescencji w komórkach ulegających starzeniu indukowanemu stresem. Nieco niższy, choć istotnie statystycznie wyższy niż w kontroli, poziom fluorescencji odnotowano w komórkach starych replikacyjne.

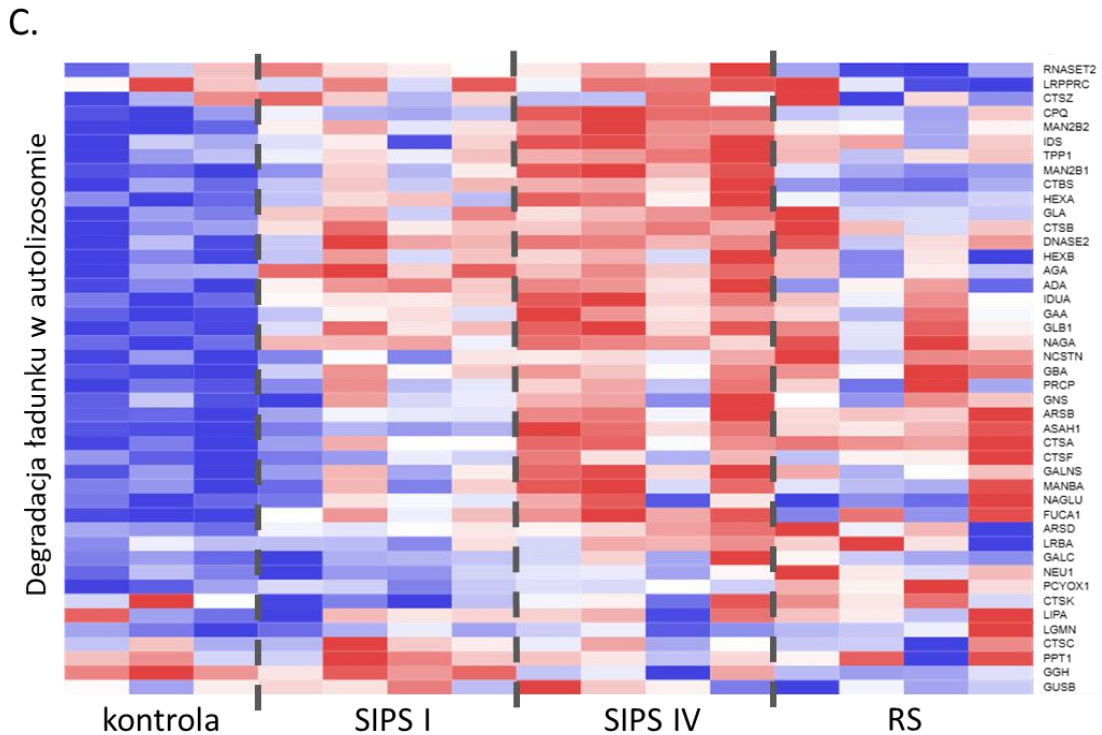
Uzyskane wyniki wskazują, że starzeniu komórek VSMC towarzyszy stopniowe gromadzenie się lizosomów, których aktywność ulega tylko częściowemu obniżeniu w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu.

4.6.3. Ocena poziomu białek związanych z dojrzewaniem autofagosomów i degradacją

W oparciu o analizę proteomiczną dokonano porównania względnego poziomu białek związanych z autofagią, dzieląc je na 3 grupy reprezentujące poszczególne etapy związane z powstawaniem pęcherzyków autofagicznych oraz degradacją w lizosomach. Wykazano, że w trakcie starzenia dochodzi do stopniowego wzrostu poziomu analizowanych białek. Najwięcej białek, których poziom był wyraźnie podwyższony zaobserwowano w komórkach będących na późnym etapie starzenia. Komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu charakteryzowały się większą niż pozostałe grupy badane zmiennością pomiędzy poszczególnymi replikatami biologicznymi. Tym niemniej w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu poziom wielu białek był podwyższony i zbliżony do poziomu w komórkach będących na późnym etapie starzenia (Ryc. 4.42).

Obserwowany wzrost poziomu analizowanych białek może wynikać ze wzrostu ekspresji genów je kodujących, jak również ze wzrostu liczby reprezentowanych przez nie struktur autofagicznych.



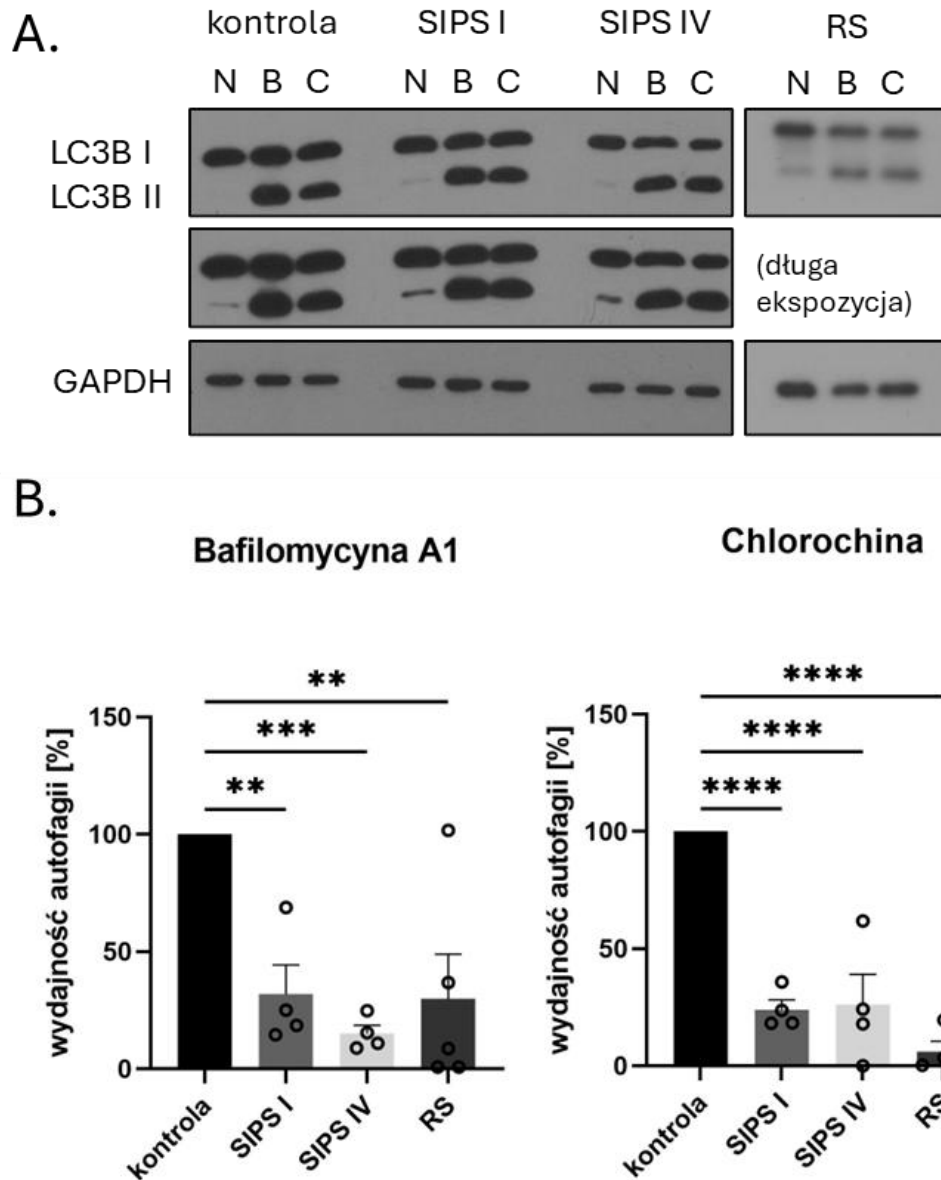


Ryc. 4.42. Mapy ciepła przedstawiające względny poziom wybranych białek biorących udział w wybranych etapach autofagii. A. Białka związane z dojrzewaniem autofagosomu, B. Białka związane z fuzją autofagosomu z lizosomem, C. Białka związane z degradacją w autolizosomie. Dane uzyskane z analizy proteomicznej w wykorzystaniem spektrometrii mas. Analizę przeprowadzono w oparciu o standaryzację Z.

4.6.4. Analiza wydajności przebiegu autofagii.

Różnice w poziomie białek mogą wskazywać na zaburzony przebieg autofagii w komórkach ulegających starzeniu. W celu pomiaru bazalnej aktywności autofagii na różnych etapach starzenia wyznaczono tzw. indeks autofagii. Służy on do oceny tempa syntezy i degradacji pęcherzyków autofagicznych. Miarą tego tempa jest zmiana w poziomie lipidowanej formy białka LC3B (LC3B II) w komórkach nietraktowanych oraz poddanych działaniu inhibitora autofagii. Ta ostatnia forma białka LC3 wiąże się z błoną autofagosomów i w kolejnych etapach autofagii po fuzji autofagosomu z lizosomem ulega degradacji. Różnica w poziomie LC3 II między komórkami traktowanymi inhibitorami autofagii, a tymi, których nie poddano działaniu inhibitorów, powinna odzwierciedlać stopień degradacji LC3 II w lizosomach. Do doświadczeń użyto dwóch inhibitorów - bafilomycyny A1 oraz chlorochiny, które zmieniając pH wnętrza lizosomów uniemożliwiają degradację autofagosomów. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na wyraźne obniżenie wydajności autofagii w komórkach starych. Co ciekawe, zastosowanie bafilomycyny A1 pozwoliło na wykazanie narastających zaburzeń

autofagii wraz z postępowaniem starzenia. Traktowanie VSMC chlorochiną wywierało podobny efekt w komórkach na wczesnym i późnym etapie starzenia (Ryc. 4.43).



Ryc. 4.43. Wydajność autofagii w komórkach mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu.

A. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych.

B. Ilościowa analiza indeksu autofagicznego wyliczona w oparciu o poziom białek LC3B I i II

w komórkach nietraktowanych oraz traktowanych bafilomycyną A1 lub chlorochiną, średnia \pm SEM,

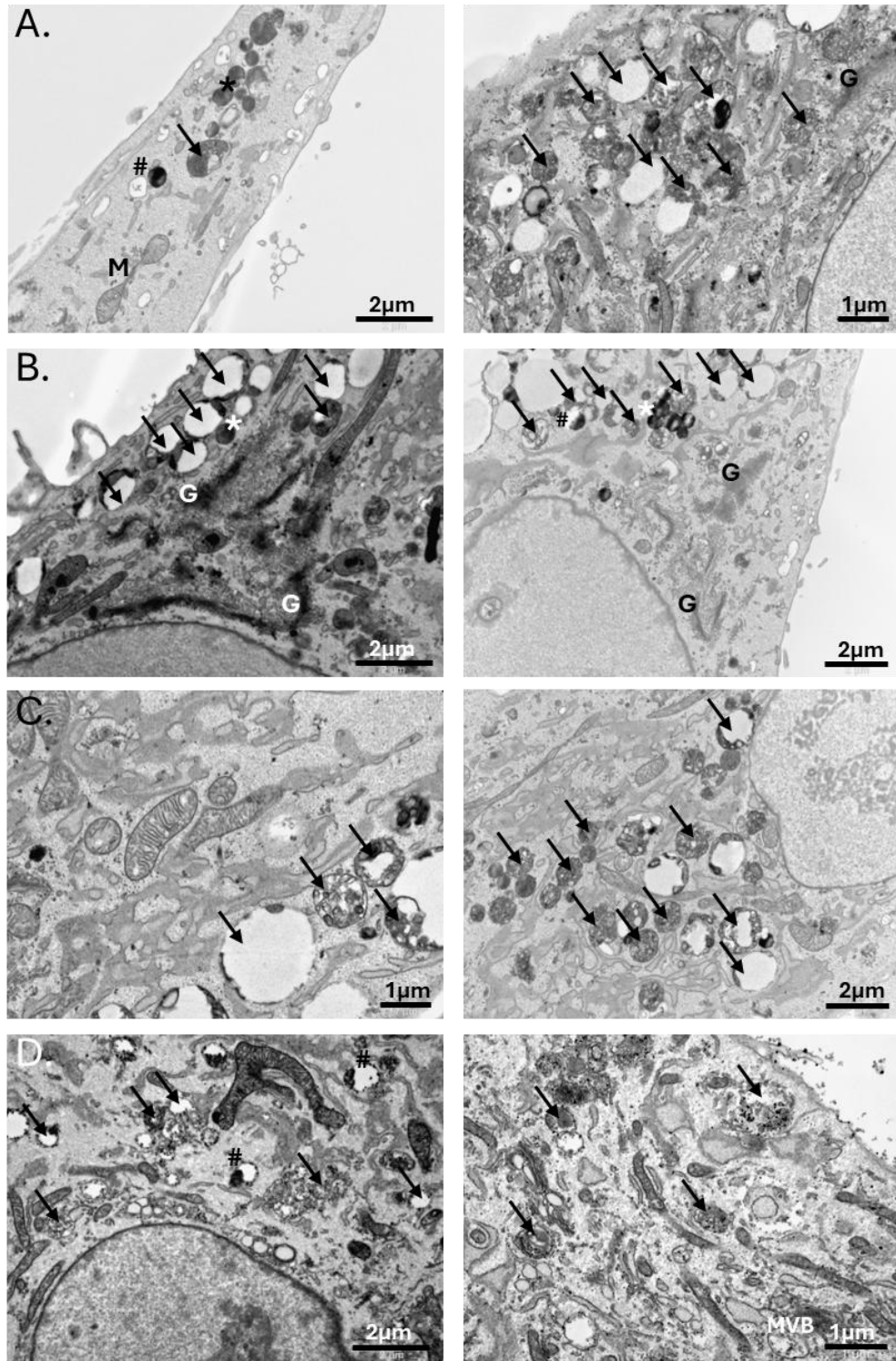
4.6.5. Modulacja wydzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych poprzez inhibicję procesu autofagii

Wyniki zaprezentowane w rozdziale 4.6. wskazują na zaburzenia w procesie autofagii w komórkach VSMC ulegających starzeniu indukowanemu, jak i replikacyjnemu. Narastające zmiany w poziomie białek istotnych dla regulacji przebiegu procesu autofagii korelują z obniżeniem wydajności tego procesu. Opublikowane prace dowodzą, że proces autofagii jest nie tylko odpowiedzialny za degradację uszkodzonych struktur komórkowych i białek, ale również może uczestniczyć w degradacji ILVs poprzez fuzję ciałek wielopęcherzykowych (MVBs) z autofagosomami, co prowadzi do utworzenia tzw. amfisomów. Amfisomy mogą następnie ulec degradacji zależnej od lizosomów lub, po fuzji z błoną komórkową, uwolnić zawarte w nich pęcherzyki oraz makrocząsteczki na zewnątrz komórki (Ryc. 1.4).

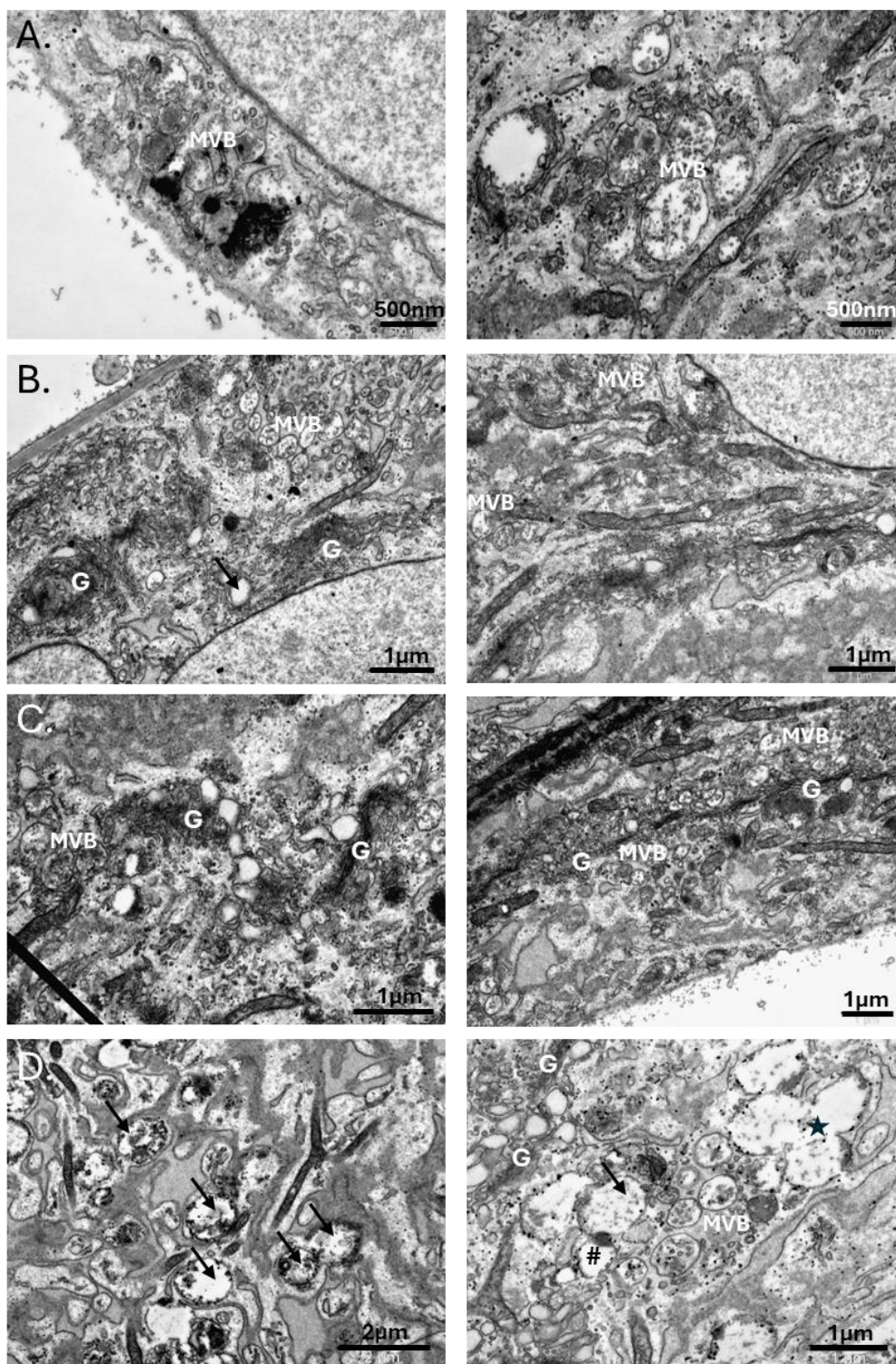
Część przedstawionych na schemacie struktur udało się zwizualizować z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (Ryc. 4.44, 4.45, 4.46). W komórkach proliferujących (Ryc. 4.44) znajdowały się liczne jednobłonowe pęcherzyki autofagiczne, o wielkości mniejszej niż 1 μm , z zawartością o różnej gęstości elektronowej (czarne strzałki). Morfologia obserwowanych struktur sugeruje, iż mogą to być autolizosomy z zawartością przeznaczoną do degradacji, bądź częściowo zdegradowaną, a ich liczna obecność świadczy o aktywnym procesie autofagii w komórkach. Aparat Golgiego w tych komórkach tworzy charakterystyczne stosy, składające się w większości ze ściśle upakowanych cystern o jednakowej grubości, co wskazuje na jego spoczynkową aktywność (G) (Ryc. 4.44B). Zaobserwowano również struktury o wysokiej gęstości elektronowej, które fuzują z jednobłonnymi pęcherzykami o dużo mniejszej gęstości elektronowej (#). Struktury te stanowiły lizosomy, które ze względu na dużą zawartość enzymów trawiennych wykazują wysoką gęstość elektronową, uzyskaną w wyniku użytej w tym przypadku metody przygotowania próbki do obrazowania. Lizosomy te łączą się z innymi pęcherzykami pochodzenia endosomalnego (endosomami, autolizosomami) (Ryc. 4.44A i D). Dodatkowo na rycinie 4.44D. immunodetekcja białka CD63 za pomocą przeciwciała sprzężonego z nanocząstkami złota (czarne punkty) wykazała obecność tego białka na błonie opisywanych powyżej struktur, co sugeruje endosomalne pochodzenie tych pęcherzyków. Ogólny obraz komórki wydaje się być uporządkowany co powoduje łatwą obserwację poszczególnych organelli komórkowych.

Komórki na wczesnym etapie starzenia charakteryzują się bardzo licznymi ciałkami wielopęcherzykowymi (MVBs), obserwowanymi na różnych etapach tworzenia. Są one zlokalizowane najczęściej w pobliżu błony komórkowej (Ryc. 4.45 A i C) lub aparatu Golgiego. Aparat Golgiego w procesie starzenia zmienia swoją strukturę - cysterny skracają się, a na ich końcach można zaobserwować tworzące się pęcherzyki, co może świadczyć o jego wzmożonej aktywności i formowaniu licznych pęcherzyków, jak na przykład MVBs. Zawartość pęcherzyków autofagicznych w komórkach starych charakteryzuje się niższą gęstością elektronową w porównaniu do komórek proliferujących. Te, które występują, mają zawartość o niższej gęstości elektronowej niż pęcherzyki autofagiczne w komórkach proliferujących. Na rycinie 4.45D. zamieszczono zdjęcia, które przedstawiają pęcherzyki autofagiczne z widoczną immunodetekcją CD63, co potwierdza ich endolizosomalne pochodzenie.

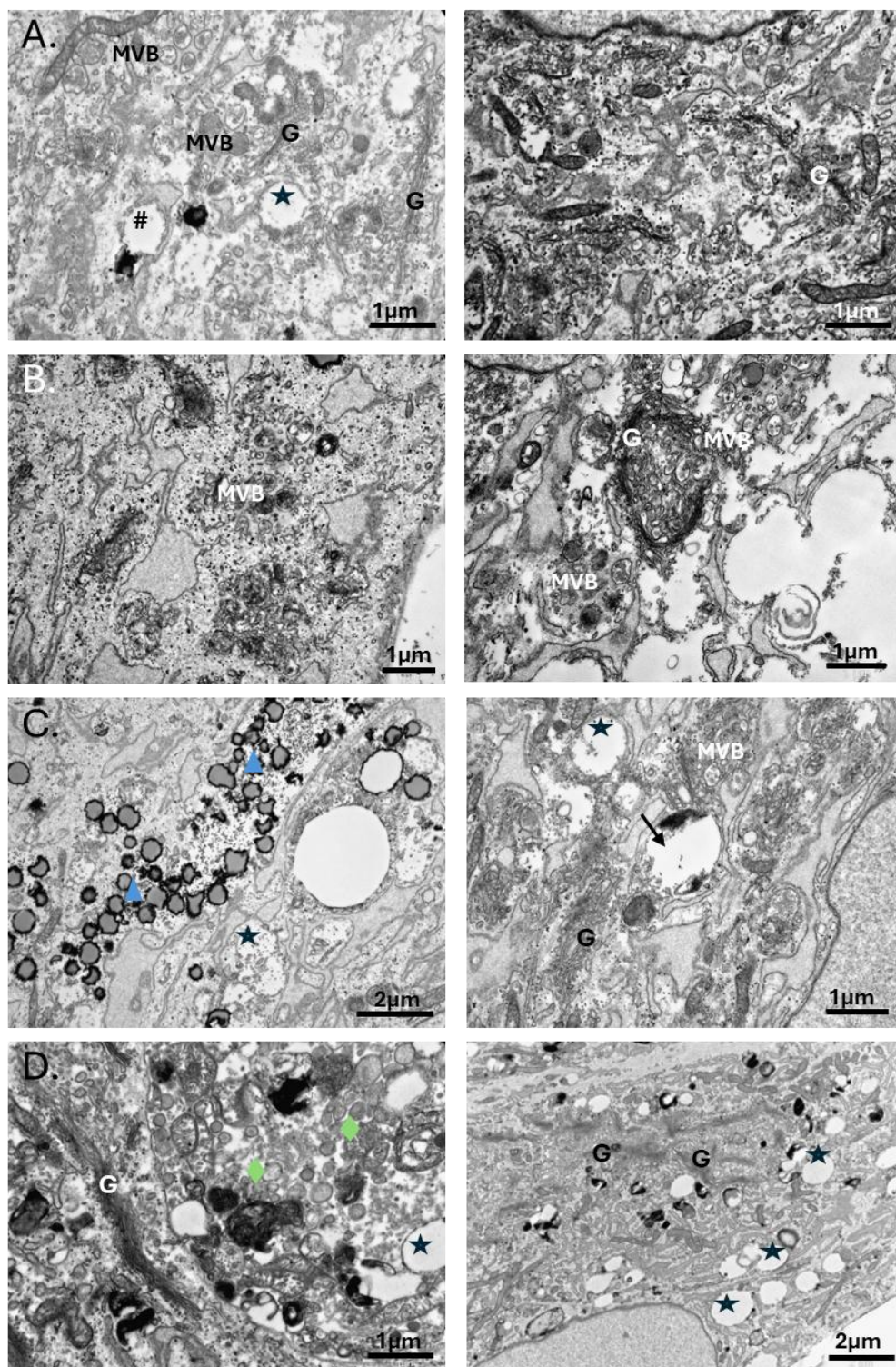
Komórki na późnym etapie starzenia charakteryzują się podobną ultrastrukturą co komórki na wczesnym etapie starzenia (Ryc. 4.46). W obu typach komórek obserwowano napęczniałą siateczkę śródplazmatyczną, struktury pęcherzykowate Golgiego, przewagę MVBs nad pęcherzykami autofagicznymi oraz mitochondria o zmienionej budowie. Co odróżnia komórki podczas pogłębiającego się starzenia od tych na wczesnym etapie starzenia to obecność kropeł tłuszczu o białkowych otoczkach (niebieskie trójkąty) oraz większa liczba pęcherzyków o bardzo wysokiej gęstości elektronowej, których wielkość nie przekracza 500 nm, co sugeruje, iż mogą być lizosomami lub późnymi endosomami (zielone romby). W komórkach SIPS IV obserwowane były też liczne pęcherzyki o wielkości przekraczającej 1,5 μm o bardzo niskiej gęstości elektronowej pochodzenia endolizosomalnego.



Ryc. 4.44. Reprezentatywne zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopii elektronowej, przedstawiające proliferujące komórki VSMC. Zdjęcia przedstawiają: A. Pęcherzyki autofagiczne z zawartością przeznaczoną do degradacji oraz fuzję lizosomu (*) z pęcherzykiem pochodzenia endosomalnego (#), mitochondrium (M). B. Cysternową strukturę aparatu Golgiego (G). C. Pęcherzyki autofagiczne z zawartością na różnych etapach degradacji (czarne strzałki). D. Immunodetekcję białka CD63 za pomocą przeciwciała znakowanego cząstkami złota (czarne punkty), ciała wielopęcherzykowe (MVB).

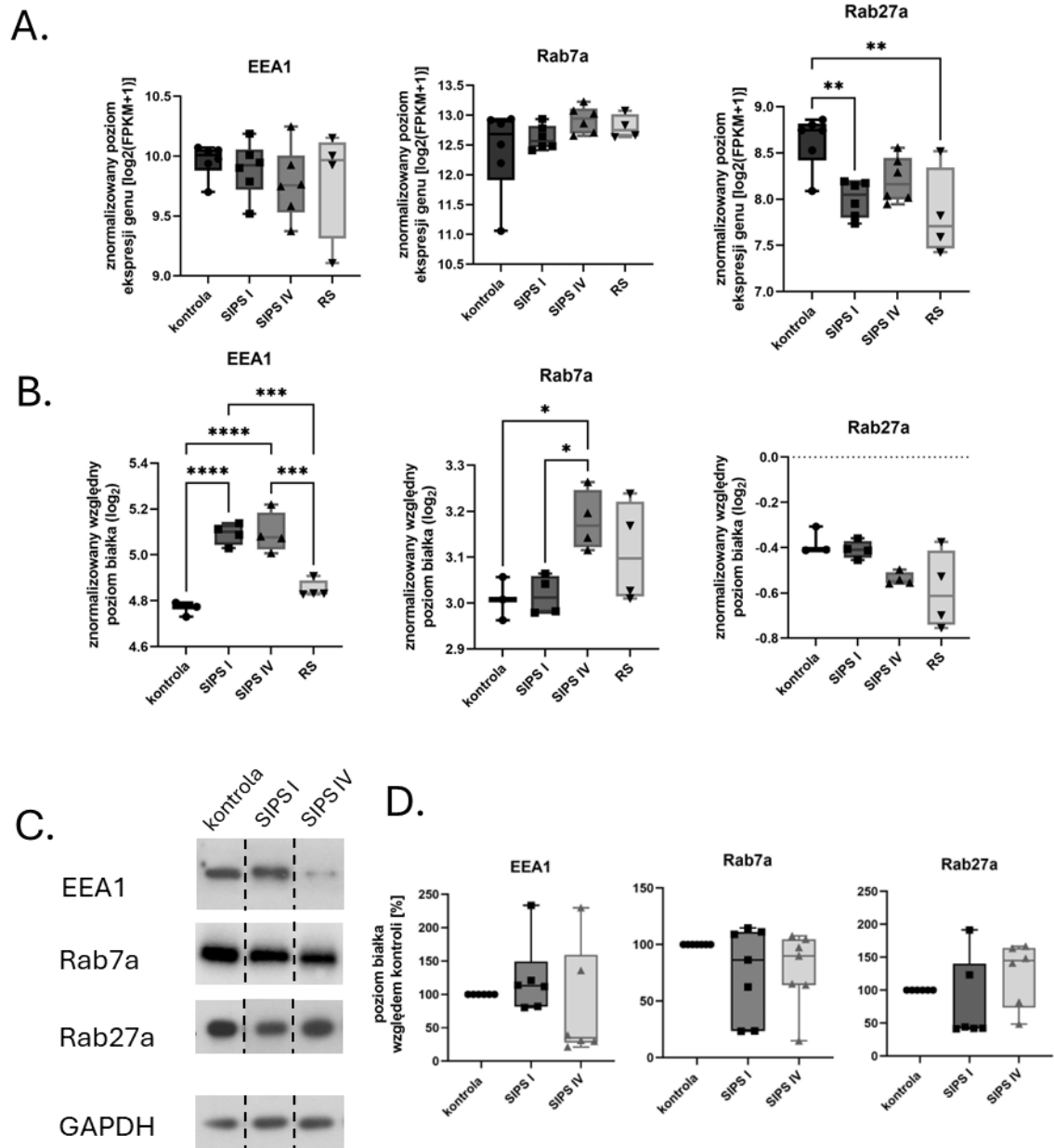


Ryc. 4.45. Reprezentatywne zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopii elektronowej, przedstawiające komórki VSMC na wczesnym etapie starzenia. Zdjęcia przedstawiają: A. Ciała wielopęcherzykowe (MVB). B. Pęcherzykową strukturę Aparatu Golgiego. C. Liczne ciała wielopęcherzykowe w bliskiej odległości Aparatu Golgiego. D. Immunodetekcję białka CD63 za pomocą przeciwciała znakowanego nanocząstkami złota (czarne punkty), pęcherzyki autofagiczne z zawartością przeznaczoną do degradacji oraz fuzję lizosomu z pęcherzykiem pochodzenia endosomalnego (#).



Ryc. 4.46. Reprezentatywne zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopii elektronowej, przedstawiające komórki VSMC na późnym etapie starzenia. Zdjęcia przedstawiają: A., B. Liczne ciała wielopęcherzykowe (MVB) w bliskiej odległości aparatu Golgiego, pęcherzyki autofagiczne z zawartością przeznaczoną do degradacji oraz fuzję lizosomu z pęcherzykiem pochodzenia endosomalnego (#). C. Krople tłuszczu w białkowych otoczkach (niebieskie trójkąty). D. Pęcherzyki o wysokiej gęstości elektronicznej (zielone romby), pęcherzyki pochodzenia endolizosomalnego (czarne gwiazdki).

Powstawanie i sekrecja egzosomów są ściśle powiązane ze szlakiem endosomalnym. W związku z powyższym przeanalizowano poziom ekspresji wybranych genów oraz białek przez nie kodowanych, biorących w nim udział. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji genów *EEA1* oraz *Rab7a*, które kodują białka zaangażowane w transport oraz dojrzewanie endosomów. Natomiast *Rab27a*, który koduje białko odpowiedzialne za uwalnianie egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, charakteryzowało się istotnym spadkiem ekspresji w pierwszym tygodniu po indukcji starzenia, a następnie niewielkim wzrostem w czwartym tygodniu trwania eksperymentu. Istotny spadek ekspresji wykazano również w komórkach ulegającym starzeniu replikacyjnemu (Ryc. 4.47A). Poziom białek związane z transportem endosomów, w przeciwieństwie do genów, charakteryzowały się istotnymi zmianami poziomów w czasie progresji starzenia. Poziom białka *EEA1* drastycznie wzrósł w SIPS I i utrzymywał się w kolejnych tygodniach starzenia. Komórki RS w porównaniu do kontroli wykazały niewielki wzrost, natomiast różnica w poziomie tego białka, pomiędzy starzeniem indukowanym a replikacyjnym była istotna statystycznie. Poziom białka *Rab7a* w pierwszym tygodniu procesu starzenia był podobny do obserwowanego w komórkach kontrolnych, a jego istotny wzrost zaobserwowano w komórkach na późnym etapie starzenia, zaś komórki RS charakteryzowały się niejednorodnymi zmianami. Poziom białka *Rab27a* wykazywał tendencje spadkowe, obserwowane dopiero w SIPS IV oraz RS (Ryc. 4.47B). Analiza poziomu tych samych białek metodą Western blot wykazała brak istotnych oraz jednoznacznych różnic pomiędzy komórkami proliferującymi a komórkami starymi (Ryc. 4.47D).

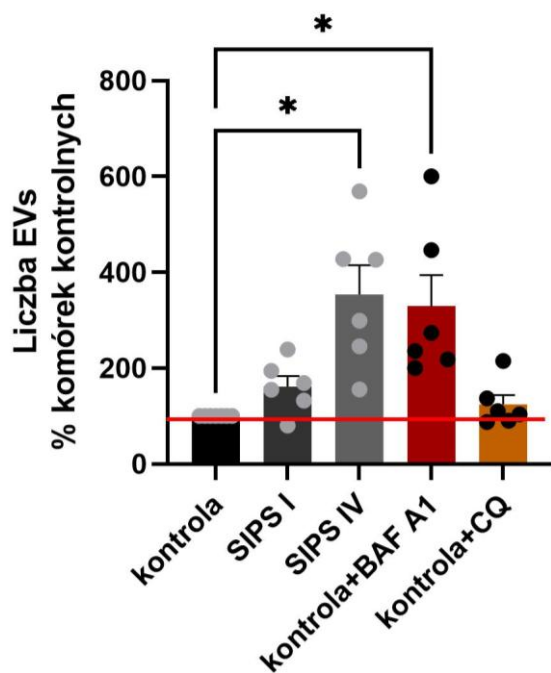


Ryc. 4.47. Analiza zmian w ekspresji genów i poziomie białek zaangażowanych w szlak endosomalny w komórkach mięśni gładkich naczyń ulegających starzeniu. A. Ekspresja genów *EEA1*, *Rab7a* oraz *Rab27a*. B. Poziom białek *EEA1*, *Rab7a* oraz *Rab27a* określone metodą spektrometrii mas. C. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych. D. Analiza densytometryczna wyników Western blot. Wykres ramka-wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4-7. Wykresy przedstawiają poziom białek po normalizacji do białka referencyjnego – GAPDH.

Biorąc pod uwagę istnienie zależności pomiędzy autofagią a sekrecją, postanowiono sprawdzić czy hamowanie autofagii może być odpowiedzialne za wzrost liczby pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki stare.

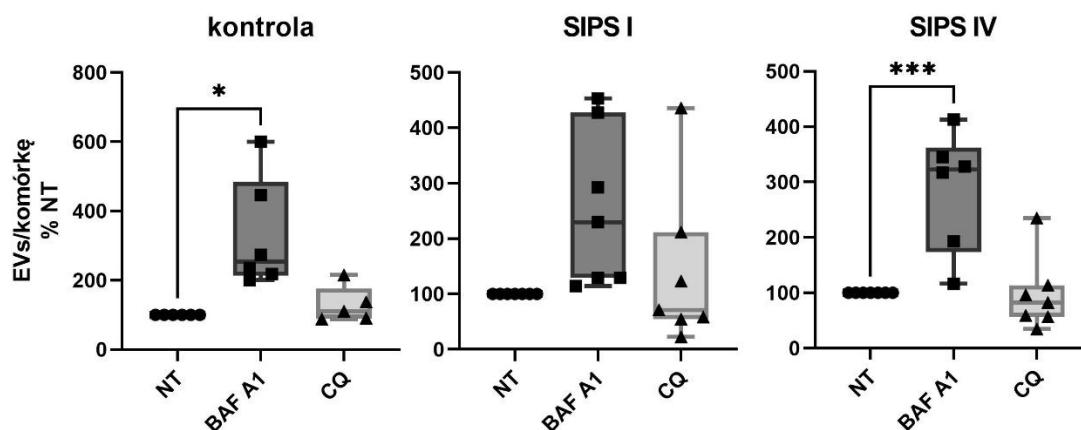
W tym celu zastosowano dwa inhibitory autofagii: bafilomycynę A1 i chlorochinę. Zastosowane inhibitory działają na tym samym etapie autofagii i oba prowadzą do podwyższenia pH w lizosomach, co zaburza prawidłowe działanie enzymów i w konsekwencji uniemożliwia degradację. Różni je jednak mechanizm działania. Bafilomycyna A1 hamuje zdolność v-ATPazy do przenoszenia protonów do wnętrza lizosomu i blokuje jego fuzję z autofagosomem, a chlorochina wnika do lizosomów, gdzie ulega protonacji i blokuje degradację materiału w autolizosomie.

Podanie bafilomycyny A1, powodowało zwiększoną sekrecję pęcherzyków przez komórki proliferujące. Liczba uwalnianych przez nie pęcherzyków była porównywalna do liczby pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare (SIPS IV), w których jak wcześniej wykazano, zahamowanie autofagii nastąpiło w wyniku rozwoju procesu starzenia. Co ciekawe, chlorochina nie wpływała na wzrost sekrecji EVs (Ryc.4.48.).



Ryc. 4.48. Wpływ inhibitorów autofagii na sekrecję EVs przez komórki proliferujące (kontrola), średnia \pm SEM, n=6.

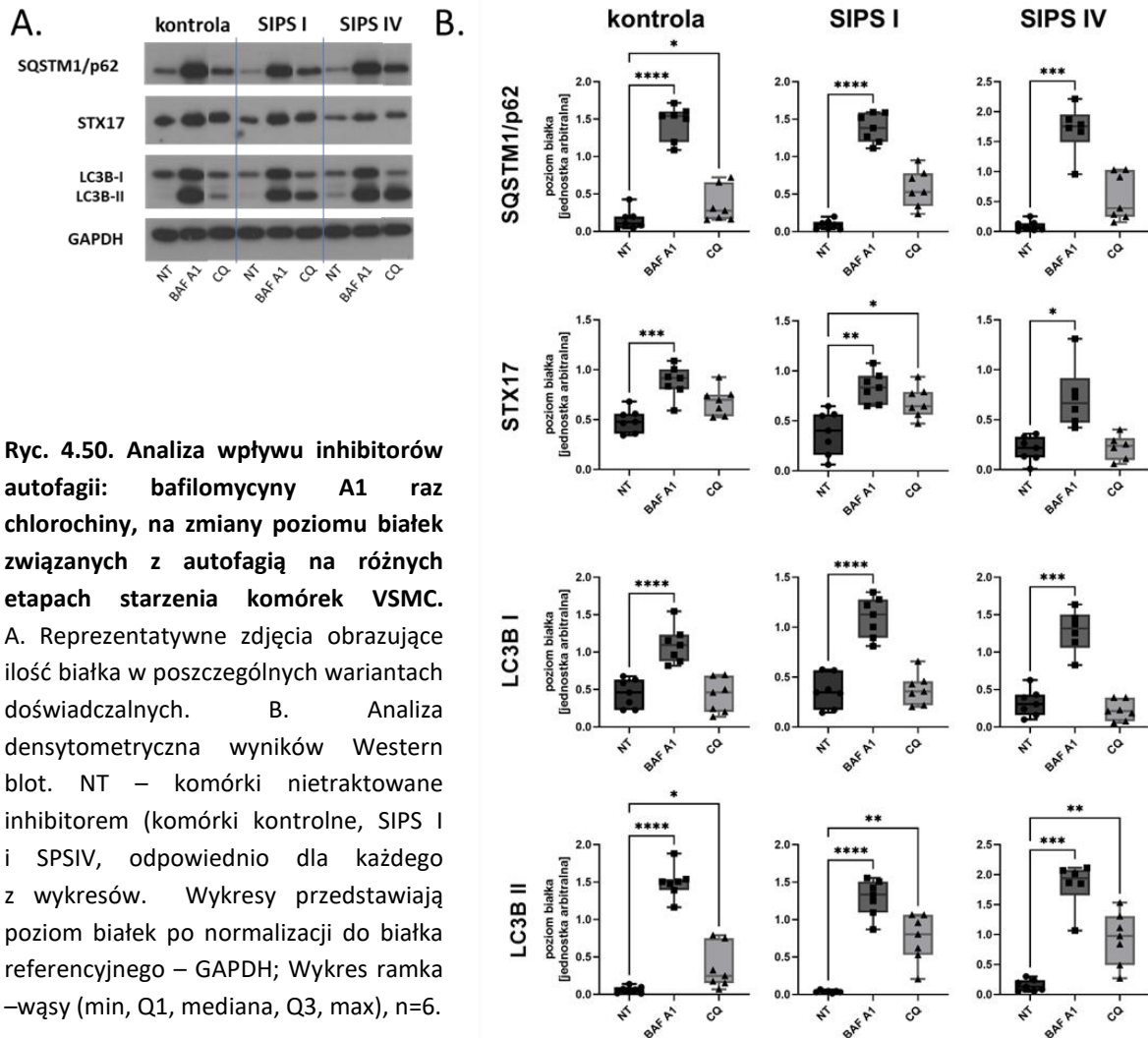
Kolejnym krokiem było sprawdzenie jak hamowanie autofagii w komórkach starych, w których wydajność autofagii już jest obniżona, wpłynie na poziom sekrecji EVs. W tym celu analizowano krotkość zmian liczby wydzielanych EVs w komórkach proliferujących oraz indukowanych do starzenia, poddanych działaniu inhibitorów.



Ryc. 4.49. Wpływ inhibitorów autofagii - bafilomycyny A1 raz chlorochiny na poziom sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki będące na różnych etapach starzenia indukowanego. NT – komórki nietraktowane inhibitorem (komórki kontrolne, SIPS I i SPSIV, odpowiednio dla każdego z wykresów. Wykres ramka – wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=5-7

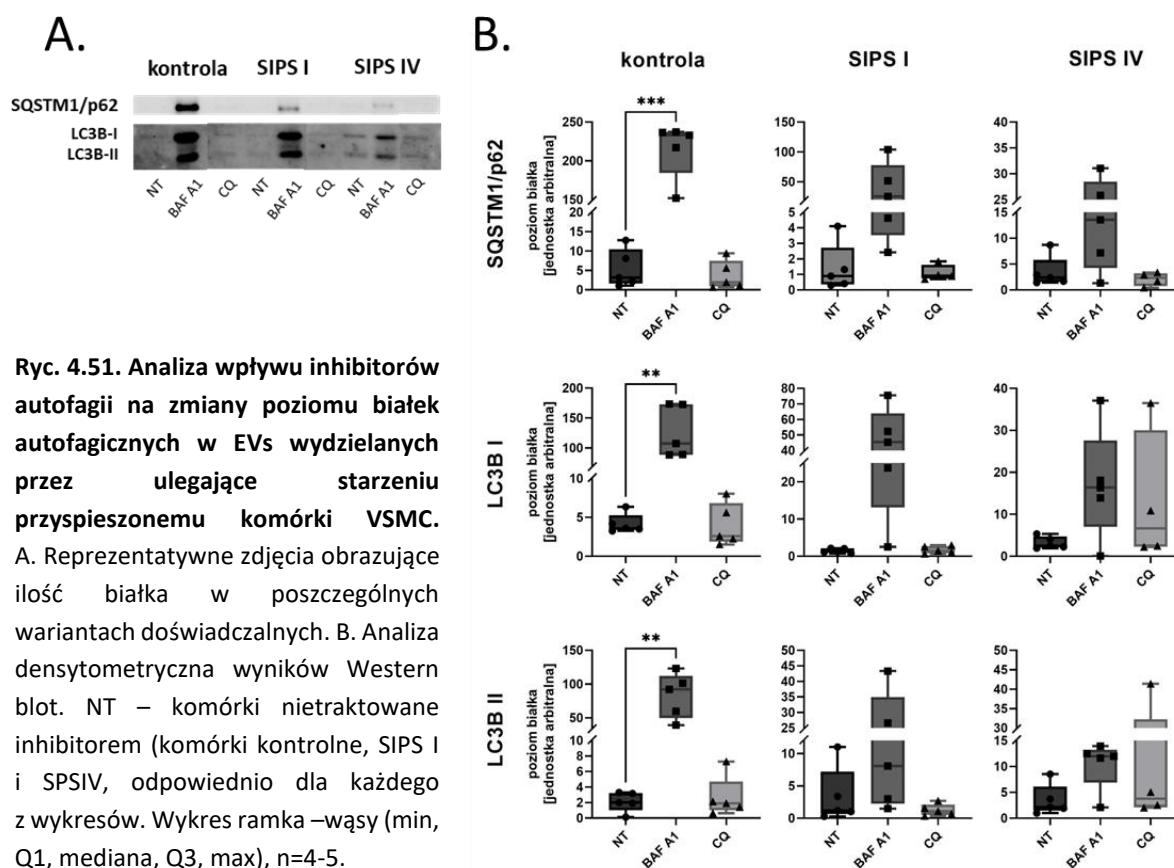
Wykazano, że podanie bafilomycyny A1 powoduje podobny wzrost liczby wydzielonych pęcherzyków w komórkach proliferujących oraz będących na wczesnym etapie starzenia (SIPS I). Komórki na późnym etapie starzenia (SIPS IV) odpowiadały silniej na traktowanie bafilomycyną A1. Stwierdzono ponad 3-krotny, istotnie statystyczny, wzrost liczby pęcherzyków. We wszystkich grupach badanych nie stwierdzono wpływu stosowania chlorochiny na zmiany w sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (Ryc. 4.49).

W związku z uzyskanymi wynikami, w celu sprawdzenia wpływu inhibitorów na hamowanie procesu autofagii, przeanalizowano poziom białek autofagicznych w komórkach proliferujących (kontrolnych) oraz ulegających starzeniu.



W oparciu o analizę zmian w poziomie białek związanych z autofagią stwierdzono, że we wszystkich grupach poddanych działaniu zarówno bafilomycyny A1, jak i chlorochiny, doszło do hamowania procesu autofagii, o czym świadczył wzrost poziomu białka SQSTM1/p62, STX17 oraz LC3B II. Biorąc pod uwagę poziom zmian wymienionych białek, bafilomycyna A1 wykazywała znacząco silniejszy efekt hamujący na autofagię niż chlorochina. Z kolei chlorochina wykazywała silniejsze działanie na komórki stare niż proliferujące, o czym świadczył wyższy poziom STQSTM1/p62 oraz LC3B II w komórkach starych hodowanych w obecności chlorochiny w porównaniu do komórek proliferujących, kontrolnych z chlorochiną. Co więcej efekt ten narastał w późniejszych etapach starzenia (SIPS IV) (Ryc. 4.50).

Analizowano również obecność białek pochodzących z autofagosomów we frakcji EVs wydzielanych przez komórki poddane działaniu inhibitorów autofagii oraz komórki nietraktowane. Wykazano znaczący wzrost poziomu SQSTM1/p62 oraz LC3B w EVs wydzielonych przez komórki poddane działaniu bafilomycyny A1. Zwiększony udział białek autofagosomalnych był widoczny we frakcji EVs wydzielonych zarówno przez komórki kontrolne (młode), jak i komórki ulegające starzeniu poddane działaniu bafilomycyny A1. Jednakże, biorąc pod uwagę tylko warianty komórek traktowane bafilomycyną A1, zaobserwowano stopniowy, postępujący w czasie spadek poziomu białek SQSTM1/p62 i LC3B w EVs wydzielonych przez komórki stare. Poziom badanych białek w EVs wydzielonych przez komórki poddane działaniu chlorochiny był porównywalny z poziomem w EVs wydzielonych przez komórki nietraktowane, zarówno młode, jak i stare (Ryc. 4.51).



Ryc. 4.51. Analiza wpływu inhibitorów autofagii na zmiany poziomu białek autofagicznych w EVs wydzielanych przez ulegające starzeniu przyspieszonemu komórki VSMC. A. Reprezentatywne zdjęcia obrazujące ilość białka w poszczególnych wariantach doświadczalnych. B. Analiza densytometryczna wyników Western blot. NT – komórki nietraktowane inhibitorem (komórki kontrolne, SIPS I i SIPSIV, odpowiednio dla każdego z wykresów. Wykres ramka – wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4-5.

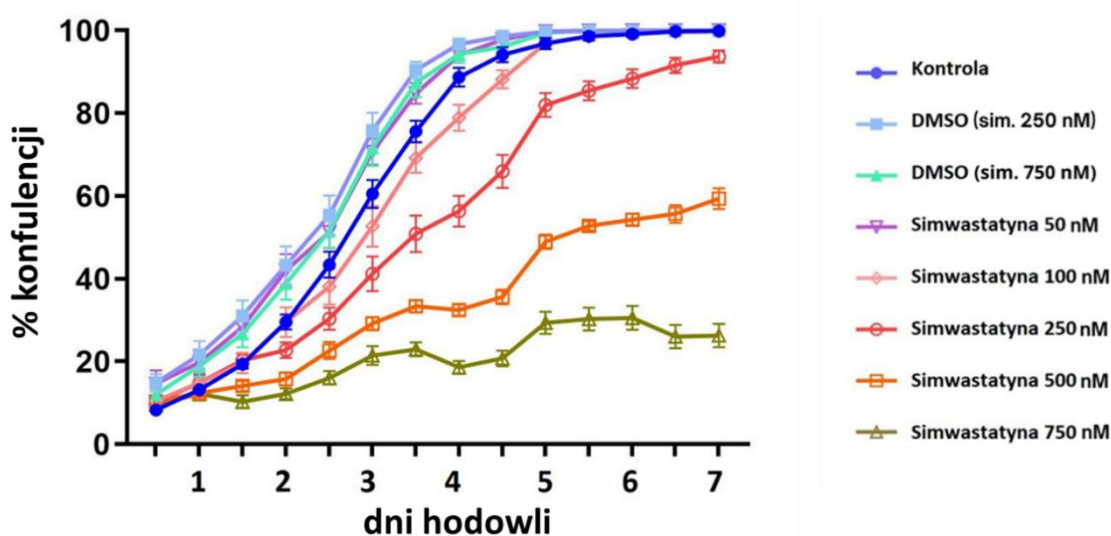
4.7. Wpływ simwastatyny na wydzielanie czynników SASP

Simwastatyna jest lekiem o działaniu przeciwmiażdżycowym. Wykazuje ona szerokie spektrum działania, w tym również przeciwzapalne. W związku z powyższym postanowiono

sprawdzić, czy simwastatyna wpływa na sekretom komórek starych. W tym wypadku analizowano zarówno poziom wybranych białek rozpuszczalnych, jak i pęcherzyków.

Do zbadania wpływu simwastatyny na wydzielanie składników SASP wykorzystano model krótkotrwałego (pulsacyjnego) traktowania komórek VSMC doksorubicyną o stężeniu 1 μM przez 2 godziny w celu indukcji starzenia. Taki model został już wcześniej opisany przez nas ²⁴⁷.

W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ simwastatyny na proliferację komórek VSMC wykorzystując do tego celu przyżyciową analizę postępujących w czasie zmian w gęstości hodowli. Wyniki analizy przedstawiono na rycinie 4.52.



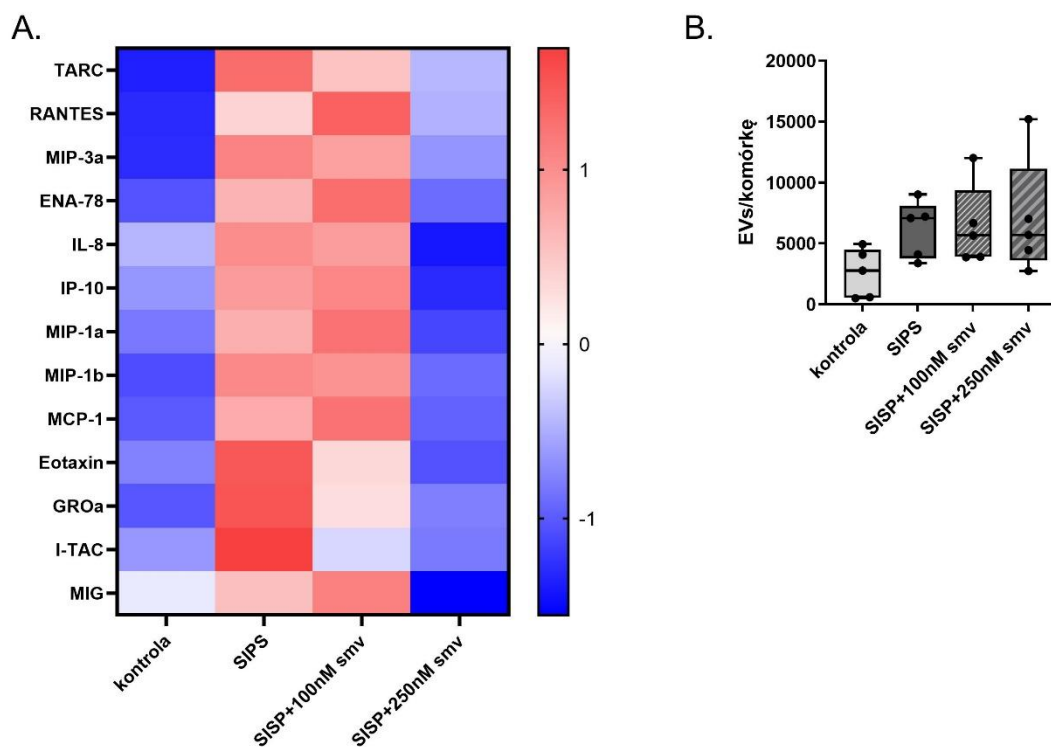
Ryc. 4.52. Analiza wpływu różnych stężeń simwastatyny na proliferację komórek młodych. Wykres ramka – wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max). (Część analiz wykonana w ramach pracy magisterskiej Klary Siejdy, wykonanej pod opieką autorki).

W oparciu o przeprowadzony pomiar, do dalszych badań wytypowano dwa stężenia simwastatyny – 100 nM i 250 nM, które nie wpływały na proliferację komórek VSMC.

Komórki indukowane do starzenia pulsem doksorubicyny były hodowane przez 7 dni w obecności simwastatyny w wybranych stężeniach (100 nM oraz 250 nM). Co drugi dzień wymieniano pożywkę na świeżą z dodatkiem nowej porcji simwastatyny. Po 7 dniach analizowano w pożywce wybrane czynniki SASP korzystając z zestawu odczynników LEGENDplex™ do cytometrycznej analizy białek wydzielonych do pożywki. Wykazano znaczny spadek wydzielania cytokin przez komórki hodowane w obecności simwastatyny w stężeniu 250 nM. Niższe stężenie leku nie powodowało spadku wydzielania cytokin. Spadkowi poziomowi

wydzielanych rozpuszczalnych składników SASP nie towarzyszył spadek liczby pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki ulegające starzeniu (Ryc. 4.53).

Wykazano, że simwastatyna nie wpływa na liczbę wydzielanych pęcherzyków przez komórki stare.



Ryc. 4.53. Analiza wpływu simwastatyny na poziom wydzielania wybranych czynników SASP. A. Mapa ciepła przedstawiająca analizę porównawczą poziomu wydzielanych cytokin. B. Wpływ simwastatyny na liczbę wydzielonych pęcherzyków przez komórki VSMC ulegające starzeniu; Wykres ramka –wąsy (min, Q1, mediana, Q3, max), n=4 (Część analiz wykonana w ramach pracy magisterskiej Klary Siejdy, wykonanej pod opieką autorki).

5. Dyskusja

Starzenie komórkowe jest procesem zachodzącym w każdym żywym organizmie i jest zaangażowane zarówno w procesy fizjologiczne związane ze starzeniem organizmu^{78,248}, jak i w szerokie spektrum chorób związanych z wiekiem²⁴⁹. Należy jednak pamiętać, że starzenie komórkowe (*sensescence*) i starzenie się organizmu (*aging*) nie są synonimami, ponieważ komórki mogą ulegać starzeniu niezależnie od wieku organizmu w odpowiedzi na czynniki stresowe.

Pomimo iż minęło ponad 60 lat od odkrycia starzenia komórkowego⁴, nie udało się znaleźć uniwersalnego markera tego procesu, a do identyfikacji komórek starych wymagane są liczne znaczniki²⁵⁰. Większość badań nad starzeniem komórkowym prowadzona była na fibroblastach, zatem wyznaczenie markerów starzenia zostało dokonane głównie w oparciu o ten typ komórek^{251–253}. Obecnie wiadomo już, że w zależności od pochodzenia tkankowego, komórki mogą charakteryzować się swoistymi markerami starzenia, a ich określenie może mieć krytyczne znaczenie przy ocenie wieku biologicznego tkanek i organizmów, rozwoju chorób związanych z wiekiem, jak też przy określaniu efektywności działania senolityków – związków selektywnie eliminujących komórki stare.

W przeprowadzonych, w ramach niniejszej pracy, badaniach zwrócono szczególną uwagę na dynamiczny charakter zmian zachodzących w trakcie starzenia. Wiadomo bowiem, że fenotyp starzenia zmienia się z czasem, a komórki stare mogą nabierać nowych cech, które nie występowały na wczesnym etapie tego procesu²⁵⁴. Co więcej, można przypuszczać, że to komórki, które gromadzą się w tkankach, przebywając w nich przez dłuższy czas (komórki ulegające starzeniu replikacyjnemu lub będące na późnych etapach starzenia przyspieszonego), mogą oddziaływać w odmienny sposób na mikrośrodowisko niż te na wczesnym etapie procesu starzenia.

Jednymi z najbardziej rozpowszechnionych chorób wieku podeszłego są choroby układu sercowo-naczyniowego, takie jak na przykład miażdżyca. W niniejszej pracy postanowiono dokonać charakterystyki porównawczej komórek mięśni gładkich aorty, które uległy starzeniu replikacyjnemu (RS) oraz starzeniu indukowanemu stresem (SIPS), z uwzględnieniem wczesnego i późnego etapu tego procesu.

5.1. Zachodzące w czasie zmiany w fenotypie komórek starych analizowane w oparciu o zdefiniowane markery starzenia.

W pierwszej kolejności analizowano markery starzenia powszechnie uznane za uniwersalne. Do markerów uniwersalnych zaliczono zmiany zachodzące na poziomie struktury i ultrastruktury komórek, jak też te zachodzące na poziomie molekularnym, dotyczącym konkretnych genów i białek.

Obserwacje komórek VSMC ulegających starzeniu dowiodły, że ich morfologia ulega zmianom typowym dla tego procesu – ciało komórki ulegającej starzeniu oraz jej jądro stawały się bardziej płaskie i zwiększały swoją powierzchnię^{255,256}. Zmiany te narastały z czasem. Wraz z pogłębianiem fenotypu starzenia zwiększała się ilość tzw. SCAFs (*ang. senescent-cell adhesion fragments*) czyli oderwanych dużych fragmentów komórkowych przylegających do błony zewnętrznej komórek starych, które zostały niedawno opisane przez Durik i wsp.²⁵⁷. Jak twierdzą autorzy tej publikacji, SCAFs mogą przetrwać nawet kilka dni w środowisku zewnątrzkomórkowym, a po tym czasie pękają i uwalniają swoją zawartość. Wykazano, że proteom tych struktur jest zróżnicowany i obejmuje czynniki sprzyjające rekrutacji komórek układu odpornościowego oraz tzw. wzorce molekularne związane z uszkodzeniami (DAMP *ang. Damage Associated Molecular Patterns*), co łącznie przyczynia się do promocji stanu zapalnego. Co istotne SCAFs zostały również zidentyfikowane *in vivo*, u myszy, w których za pomocą onkogenu, indukowano starzenie hepatocytów. Te niedawno opisane struktury stanowią zatem kolejny element fenotypu sekrecyjnego, który w istotny sposób może wpływać na mikrośrodowisko, co wydaje się mieć szczególne znaczenie w kontekście starych komórek VSMC gromadzących się w blaszkach miażdżycowych.

Analiza ultrastruktury starych VSMC pozwoliła na zaobserwowanie zmian w mitochondriach, jak również w siateczce śródplazmatycznej i aparacie Golgiego. Zaburzenia struktury organelli w ulegających starzeniu komórkach VSMC przypominały te opisywane już wcześniej w literaturze^{258–260}. Wyraźnie powiększona siateczka śródplazmatyczna oraz aparat Golgiego może świadczyć o wzmożonym transporcie wewnątrzkomórkowym, jak i sekrecji.

Podstawową cechą komórek starych, która definiuje proces starzenia, jest stałe i nieodwracalne zatrzymanie cyklu komórkowego. Do oceny potencjału proliferacyjnego

komórek po traktowaniu doksorubicyną wykorzystano test wbudowywania BrdU i potwierdzono, że w badanym modelu eksperymentalnym komórki poddane działaniu doksorubicyny (7 dni traktowania) nie wznawiały podziałów komórkowych nawet po 4-tygodniowej hodowli. Populacja komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu charakteryzowała się obecnością niewielkiej liczby komórek syntetyzujących DNA, świadcząc o heterogennym, pod względem zachowania potencjału proliferacyjnego, charakterze tej grupy. Na istnienie takiej heterogenności w populacji komórek ulegającej starzeniu replikacyjnemu zwrócił uwagę Ogrodnik ²⁶¹, który wyróżnił stan określony przez niego jako *'replicative aging'* i następujący po nim stan *'cellular senescence'*. Stan *'replicative aging'* charakteryzuje się stopniowym nabywaniem cech świadczących o upośledzeniu prawidłowego funkcjonowania komórki, takich jak wydłużanie cyklu komórkowego, postępująca hipertrofia komórki, zmiany w metabolizmie, skracanie telomerów czy też stopniowe gromadzenie uszkodzeń w makrocząsteczkach. Stan *'cellular senescence'* odróżnia od *'replicative aging'* poprzedniego nieodwracalne zatrzymanie cyklu komórkowego oraz nasilenie prozapalnego fenotypu komórek starych.

Z nieodwracalnym zatrzymaniem proliferacji komórek starych silnie koreluje wzrost aktywności SA- β -gal. Jest ona enzymem lizosomalnym, które jest aktywny przy pH 6.0, a więc wyższym niż fizjologiczne pH lizosomów (pH 4.0). Pomimo iż podwyższona aktywność SA- β -gal uznawana jest za podstawowy marker starzenia, to prawdopodobnie nie odgrywa ona żadnej roli w starzeniu ²⁶², a jedynie towarzyszy zmianom zachodzącym w starzejących się komórkach. Zwiększony poziom aktywnej SA- β -gal wynika między innymi ze zwiększonej liczby dysfunkcyjnych lizosomów ²⁶³. W badanych komórkach VSMC ulegających starzeniu zaobserwowaliśmy wyraźny wzrost SA- β -gal na poziomie białka, jak i zwiększoną masę lizosomów. Jednak obserwowany wzrost był porównywalny we wszystkich grupach komórek starych. Wydają się zatem, że obserwowana zwiększona aktywność SA- β -gal na późnym etapie starzenia jest niezależna od ilości białka oraz liczby lizosomów i może wynikać chociażby ze zmian związanych z dysfunkcją lizosomów, choć żeby to potwierdzić potrzebne są dodatkowe analizy.

Zarówno w starzeniu indukowanym, jak i replikacyjnym, dochodzi do akumulacji uszkodzeń dwuniciowych DNA, o czym świadczy obecność skupisk białek γ H2AX oraz 53BP1, będących

elementami szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA ²⁶⁴. Wraz z pogłębianiem się fenotypu starzenia zaobserwowaliśmy częściowy spadek liczby uszkodzeń DNA, co skutkowało wzrostem liczby komórek bez uszkodzeń. W efekcie komórki będące na późnych etapach starzenia (SIPS IV), pod względem liczby identyfikowanych w nich skupisk białka 53BP1, przypominały komórki kontrolne. W przypadku γ H2AX, liczba komórek bez skupisk tego białka była znacząco niższa we wszystkich analizowanych grupach komórek starych (SIPS I i IV, RS). Białko 53BP1 uczestniczy w naprawie DNA, podczas gdy γ H2AX znakuje miejsca rozpoznawane przez komórkowe systemy naprawcze ²⁶⁵. Uzyskany wynik sugeruje, że w komórkach starych część uszkodzeń pozostaje nierozpoznanych – nie wyznakowanych białkiem 53BP1. Zgodnie z wynikami badań przedstawionych przez Hewitt i wsp. ²⁶⁶, przeszło połowa uszkodzeń DNA indukowanych czynnikami genotoksycznymi prowadzącymi do starzenia komórkowego jest zlokalizowana w telomerach. Właśnie one zostały zaliczone do puli długo utrzymujących się, w komórce starej nienaprawionych uszkodzeń DNA. Jest to związane z ograniczonymi możliwościami działania systemów naprawy DNA w tych miejscach chromosomu ²⁶⁷. Co ciekawe, komórki VSMC ulegające starzeniu replikacyjnemu charakteryzowały się największą liczbą uszkodzeń. Wydaje się to skorelowane z uszkodzeniami zlokalizowanym preferencyjnie w telomerach, gdyż to właśnie skracanie telomerów jest odpowiedzialne za ten rodzaj starzenia.

Poczynione przez nas obserwacje dotyczące spadku liczby uszkodzeń w komórkach VSMC będących na późnym etapie starzenia, potwierdzają badania prowadzone na fibroblastach przez Chen i Ozanne ²⁶⁸.

Analizę fenotypu na poziomie molekularnym przeprowadzono w oparciu o markery powszechnie wykorzystywane do identyfikacji komórek starych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Należą do nich białka związane ze strukturą jądra komórkowego – lamina B1 (LMNB1), HMGB1, naprawą DNA - PARP1 oraz białka sygnałowe, takie jak: p53 (TP53), p21 (CDKN1A) i p16 (CDKN2A).

W naszych badaniach białka jądrowe wykazywały stopniowy spadek w trakcie starzenia indukowanego, a komórki stare replikacyjnie charakteryzowały się poziomem tych białek zbliżonym do komórek na późnym etapie starzenia. Lamina B1 jest głównym białkiem budującym otoczkę jądrową, której zanik obserwowany w komórkach ulegających starzeniu

proceeds to chromatin decondensation^{45,269}. The protein HMGB1, according to studies published by Sofiadis in 2021²⁷⁰, is a key factor for maintaining the defined structure of chromatin in cells undergoing aging. HMGB1 in the cell nucleus cooperates with chromatin components in such a way as to support the expression of SASP genes, and also supports the stability of these transcripts²⁷⁰. It is also worth remembering that during nuclear aging HMGB1 is released into the extracellular environment, which induces the senescent state⁵⁵.

Proteins p21 and p16 - classic markers of aging, are inhibitors of cyclin-dependent kinases (CKDs), and participate in cell cycle arrest. As the levels of p16 protein and the expression of *CDKN2A* increase during induced aging and in replicative aging, the expression of *CDKN1A* and p21 levels increase after induction of aging (SIPS I), but decrease in the late stage of aging (SIPS IV). Cells undergoing replicative aging show expression of genes and proteins at a level similar to SIPS IV cells. These findings are confirmed in the work of Gretchen Stein et al.²⁷², in which the authors showed that cell cycle arrest occurs before the increase in p16 levels, suggesting that p21 can be sufficient to inhibit proliferation, but its levels decrease during the progression of aging. In contrast, the increase in p16 levels in the late stage of aging suggests its role in maintaining aging, especially when p21 levels decrease²⁷².

Our results demonstrate the existence of age- and type-dependent differences in the expression of defined aging markers, which at this preliminary stage of analysis proved to be a differentiating factor for old cells. It also indicates that the identification of these cells, especially *in vivo*, may depend on the choice of markers.

5.2. Differences in the transcriptome of cells in early and late stages of induced aging and cells undergoing replicative aging

Comparing VSMC cells in early and late stages of induced aging and cells undergoing replicative aging with proliferating cells, we observed a clear increase in the number of genes whose expression increased in the late stages of induced aging and in replicative aging at a similar number of genes with decreased expression in all groups of old cells. This indicates an active restructuring of the transcriptome in

z rozwojem fenotypu starzenia. Niemniej jednak we wszystkich grupach komórek starych, niezależnie od etapu starzenia i typu starzenia, wykazaliśmy duże podobieństwo najbardziej wzbogaconych ścieżek sygnałowych (*reactome pathways*). Geny, których ekspresja zmieniała się istotnie statystycznie (dominowały geny o obniżonej ekspresji), były zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, a więc regulację mitozy, syntezy DNA oraz punktów kontroli. Nieco odmienne wyniki uzyskali Hernandez-Segura i wsp.²⁷³, którzy zachodzące w czasie zmiany w ekspresji genów badali w starzejących się fibroblastach, melanocytach oraz keranocytach. Analizę transkryptomu prowadzili w 4, 10 i 20 dni po indukcji starzenia. Podobnie jak wykazały nasze badania, wraz z upływem czasu transkryptom komórek starych ulegał modyfikacjom – rosła liczba genów, których ekspresja zmienia się istotnie statystycznie. Biorąc pod uwagę procesy, w które zaangażowane są białka kodowane przez geny o różnicowej ekspresji zidentyfikowane na wczesnym etapie starzenia (4-10 dni po indukcji), badacze odnotowali zmiany w ścieżkach związanych z odpowiedzią na uszkodzenia DNA oraz ścieżkach zależnych od białka p53 i kinazy p38 oraz szlakach metabolicznych. Dopiero w komórkach na późniejszym etapie starzenia (dzień 20) najsilniej reprezentowane były szlaki związane z hamowaniem cyklu komórkowego i reorganizacją chromatyny. Ta różnica w uzyskanych przez nas i Hernandez-Segura i wsp.²⁷³ wynikach może wiązać się z wykorzystaniem w naszych badaniach jako kontroli proliferujących komórek VSMC, podczas gdy analiza przeprowadzona przez Hernandez-Segura i wsp.²⁷³ opierała się na porównaniu komórek starych z komórkami będącymi w stanie spoczynku, a więc chwilowo (odwracalnie) zatrzymanych w cyklu.

Hernandez-Segura i wsp.²⁷³ wyróżnili 55 genów wspólnych dla wszystkich badanych typów komórek po 10 dniach od indukcji starzenia promieniowaniem jonizującym, co w odniesieniu do naszych badań można porównać do grupy SIPS I. W grupie genów wspólnych dla różnych typów starzenia indukowanego stresem, Hernandez-Segura i wsp. nie zaobserwowali obecności klasycznych markerów starzenia, takich jak *CDKN2A* (koduje białko p16), *CDKN1A* (koduje białko p21), *LMNB1* czy też genów związanych z SASP. Podobnie, metaanaliza przeprowadzona przez Scanlan i wsp.²⁷⁴ nie potwierdziła udziału genów kodujących klasyczne markery starzenia - *CDKN2A*, *CDKN1A*, w grupie istotnie zmieniających się genów. Nasze badania wykazały, że gen *CDKN1A* należał do grupy najbardziej znacząco zmieniających się transkryptów (TOP20), jednakże tylko na wczesnych etapach starzenia indukowanego

stresem. Fakt, że ekspresja *CDKN1A* jest w starzeniu przejściowa i prawdopodobnie związana bezpośrednio z indukcją uszkodzeń DNA może tłumaczyć zaobserwowane różnice pomiędzy naszymi badaniami a wynikami uzyskanymi przez Hernandez-Segura i wsp.²⁷³ Co ważne, w starzejących się komórkach VSMC, istotny statystycznie i znaczący wzrost ekspresji genu *CDKN1A* nie przekładał się na wzrost poziomu białka p21, co dodatkowo podważa wykorzystanie go jako powszechnego markera starzenia w analizach opartych o pomiar ilości białka. Ekspresja genu *CDKN2A* nie ulegała zmianie w SIPS I, ale rosła dopiero w późniejszych etapach starzenia (SIPS IV) oraz w starzeniu replikacyjnym. Poziom ekspresji *LMNB1*, choć zmieniał się istotnie statystycznie we wszystkich badanych przez nas grupach komórek starych, to jednak, podobnie jak w przypadku genu *CDKN2A*, nie należał do genów, których ekspresja zmieniała się w największym stopniu (TOP20).

Badania przeprowadzone przez Casella i wsp.²⁷⁵ na ludzkich fibroblastach oraz komórkach śródbłonna starych replikacyjne oraz indukowanych do starzenia za pomocą promieniowania jonizującego, doksorubicyny oraz onkogenów, wykazały różnice w ekspresji RNA w zależności od typu komórek, a zdecydowanie w mniejszym stopniu od induktora starzenia. Badacze zidentyfikowali 68 genów wspólnych dla wszystkich grup doświadczalnych, z czego 50 genów o podwyższonej oraz 18 o obniżonej ekspresji. Z grupy transkryptów wspólnych dla wszystkich badanych grup wyznaczono metodami bioinformatycznymi minimalną liczbę genów (5 genów) - *SLCO2B1*, *CLSTN2*, *PTCHD4*, *PURPL*, *LINC02154*, pozwalających na rozróżnienie komórek starych i proliferujących. Transkrypty *PURPL* i *LINC02154*, będące długimi niekodującymi RNA (lncRNA), znalazły się na naszej liście TOP20 transkryptów o podwyższonej ekspresji w ulegających starzeniu komórkach VSMC. Wysoką ekspresją *PURPL* wykazaliśmy na wczesnym etapie starzenia, natomiast *LINC02154* znalazł się wśród genów najbardziej zmieniających się na późnym etapie starzenia. Casella i wsp.²⁷⁵ sugerują, że transkrypt genu *PURPL* jest stabilniejszy od transkryptów *CDKN1A* i *CDKN2A*, co skutkuje tym, że jego wzrost jest bardziej powszechny przy zachowaniu istotności statystycznej.

Pomimo licznych publikacji, w których przedstawiono wyniki wielkoskalowych analiz transkryptomocnych, wciąż powstające listy genów określanych jako te, które najlepiej definiują komórki stare są bardzo zróżnicowane i w znacznym stopniu nie pokrywają się. Scanlan i wsp.²⁷⁴ przeprowadzili analizę danych transkryptomocnych opisanych w 119

opublikowanych badaniach przeprowadzonych na ludzkich fibroblastach indukowanych do starzenia uszkodzeniami DNA, onkogenem lub starzejących się replikacyjne. Wyróżnił 916 DEG (ang. *differentially expressed genes*) wspólnych dla wszystkich modeli starzenia fibroblastów. Spośród tych 916 genów wyróżnionych przez Scanlan i wsp.²⁷⁴ tylko 5 było wspólnych z grupą 55 genów określonych w badaniach Hernandez-Segura i wsp.²⁷³ jako reprezentatywne dla różnych typów starzenia i różnych typów komórek. Podobnie, zaledwie 16 genów z 68 opisanych w pracy Casella i wsp. jako te, które stanowią sygnaturę starzenia, było wspólnych z 916 genami opisanymi przez Scanlan i wsp. Wyniki te dobrze ilustrują niezwykłą zmienność fenotypu starzenia na poziomie transkryptomu, którego skład zależy od wielu czynników.

Biorąc pod uwagę coraz częściej podkreślane różnice w fenotypie zależne od etapu starzenia, autorzy prac zwracają uwagę, że nawet najlepsze biomarkery mogą identyfikować komórki starzejące się tylko na określonym etapie tego procesu. Co więcej, zmienność pomiędzy różnymi typami komórek jest większa niż pomiędzy różnymi typami starzenia, na co zwrócił uwagę Casella i wsp.²⁷⁵ Można zatem przypuszczać, że przynajmniej część z genów o różnicowej ekspresji zidentyfikowanych przez nas w starzejących się komórkach VSMC może być komórkowo specyficznymi markerami. Hipoteza ta wymaga oczywiście potwierdzenia w dalszych badaniach.

5.3. Różnice w proteomie komórek na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu

Opublikowane prace prezentujące badania proteomiczne komórek starych w przeważającej większości skoncentrowane są na analizie zmian zachodzących w wybranych organellach komórkowych, takich jak mitochondria²⁷⁶, lizosomy²⁷⁷ lub frakcji białek np. białka powierzchniowe²⁷⁸. Takie podejście umożliwia identyfikację białek występujących „lokalnie”, które często znacząco się zmieniają. Przedstawione przez nas badania miały na celu analizę globalnego proteomu komórek VSMC ulegających starzeniu, która umożliwiłaby zidentyfikowanie najbardziej znaczących i najsilniej reprezentowanych na poziomie białek zmian zachodzących w trakcie starzenia i/lub uzależnionych od sposobu indukcji tego procesu.

Porównując liczbę białek, których poziom istotnie spadał lub wzrastał w komórkach na wczesnym oraz późnym etapie starzenia indukowanego, zaobserwowaliśmy przeszło

trzykrotny wzrost ich liczby w komórkach SIPS IV. Świadczy to o postępujących wraz z rozwojem fenotypu starzenia zmianach zachodzących w komórkach starych po zatrzymaniu proliferacji i związanych z postępującą adaptacją metabolizmu. Komórki poddane starzeniu replikacyjnemu, natomiast, charakteryzowały się zbliżoną do komórek SIPS IV liczbą białek o istotnie obniżonym poziomie oraz porównywalną z komórkami SIPS I liczbą białek, których poziom wzrastał. Zatem sama analiza ilościowa zmian zachodzących w proteomie dowodzi dynamicznego charakteru tego procesu, zależnego również od czynnika indukującego starzenie.

Pośród 10 szlaków nadreprezentowanych przez białka, których poziom spadał w starych komórkach VSMC, zidentyfikowano ścieżki powiązane z cyklem komórkowym, stabilizacją chromosomów i telomerów - głównie występujące na wczesnych etapach starzenia, oraz związane z metabolizmem i obróbką RNA, które najsilniej wyrażone były w komórkach SIPS IV oraz RS. Obniżenie poziomu białek związanych z obróbką RNA może mieć związek z globalną redukcją translacji przy jednoczesnym dostosowywaniu komórek do produkcji białek w zależności od stanu w jakim się znajdują ²⁷⁹. Spadek poziomu białek związanych z metabolizmem RNA opisywali również Delfarah i wsp. ²⁸⁰, którzy prowadzili badania na ludzkich komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego (HMEC, ang. *human mammary epithelial cells*) ulegających starzeniu replikacyjnemu. Przytoczone badania dowodzą, że zmiany zachodzące w komórkach starych na poziomie obróbki i metabolizmu RNA mogą mieć charakter uniwersalny. Niemniej jednak białka zaangażowane w ten proces mogą być różne lub wyrażone na różnym poziomie w zależności od typu komórki i modelu starzenia, czego dowiodło porównanie wyników analiz proteomicznych otrzymanych przez nas i Delfarah'a i wsp. ²⁸⁰.

Zidentyfikowane przez nas białka występujące na podwyższonym poziomie w starych komórkach VSMC zaangażowane były głównie w transport do aparatu Golgiego oraz dokonywane tam modyfikacje białek, jak również transport pęcherzykowy. Wspomniane wcześniej analizy proteomiczne prowadzone przez Delfarah i wsp. ²⁸⁰ wskazały z kolei na wzrost poziomu białek związanych z lizosomami, wakuolami, pęcherzykami komórkowymi oraz peroksysomami, co jest zbieżne z uzyskanymi przez nas wynikami. W komórkach będących na późnym etapie starzenia oraz starzejących się replikacyjnie większość białek

o podwyższonym poziomie uczestniczyła w procesach regulacji metabolizmu oraz oddziaływania na komórki układu odpornościowego. Wyniki te podkreślają istotną rolę jaką mogą odgrywać w tworzeniu środowiska zapalnego w obrębie blaszek miażdżycowych stare komórki mięśni gładkich gromadzące się w patologicznie zmienionych naczyniach, czego dowodzą nasze wcześniejsze badania jak również prace innych naukowców^{281–283}.

Odmienne od uzyskanych przez nas wyniki zostały zaprezentowane w pracy Li i wsp.²⁸⁴. Autorzy przeprowadzili analizę proteomiczną ludzkich fibroblastów IMR-90, indukowanych do starzenia onkogenem Ras. Komórki były analizowane 6 dni po indukcji starzenia, co w naszym modelu odpowiada komórkom będących na wczesnym etapie starzenia. Trzydzieści jeden białek zidentyfikowanych przez Li i wsp.²⁸⁴, których poziom ulegał istotnemu statystycznie obniżeniu, związanych było głównie z glikozylacją, podczas gdy w naszych analizach zaobserwowaliśmy wzrost poziomu białek odpowiedzialnych za ten proces zarówno na wczesnym jak i na późnym etapie starzenia. Znacznie większą grupę w badaniach Li i wsp.²⁸⁴ stanowiły białka, których poziom wzrastał po indukcji starzenia – 179 białek. Były one głównie zaangażowane w obróbkę RNA oraz translację, co z kolei stoi w sprzeczności z uzyskanymi przez nas wynikami, które wykazały spadek poziomu białek zaangażowanych w metabolizm i obróbkę RNA w komórkach będących na późnym etapie starzenia oraz starzejących się replikacyjnie. Badacze zaobserwowali również wzrost poziomu białek zaangażowanych w syntezę ATP, co naukowcy argumentowali zwiększoną gęstością mitochondriów w komórkach starych²⁸⁴.

Co istotne, wśród białek, których poziom zmieniał się najbardziej znacząco w komórkach VSMC ulegających starzeniu (TOP20), były białka związane z budową macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej modyfikacją. Fakt ten może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia roli starych komórek VSMC obecnych w blaszkach miażdżycowych na rozwój miażdżycy. Dowodzą tego badania Wierer'a i wsp.²⁸⁵, którzy analizowali zmiany zachodzące w proteomie komórek aorty myszy (głównie komórki VSMC) po 8, 16 i 24 miesiącach stosowania diety wysokotłuszczowej. Zidentyfikowali oni prawie 5200 białek, z czego 182 zmieniało się istotnie, 65 z nich związanych było z macierzą zewnątrzkomórkową. Wśród nich znalazły się między innymi kolageny COL1A1, COL1A2 oraz COL3A1, których poziom wzrastał. Te same białka zostały przez nas zakwalifikowane do grupy TOP20, a ich poziom rósł w komórkach na wczesnym etapie

starzenia by spaść, poniżej poziomu wykrywanego w komórkach kontrolnych, na późnym etapie starzenia. Natomiast w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu poziom tych białek nieznacznie wzrastał względem komórek kontrolnych.

Również badania prowadzone na materiale uzyskanym od osób chorych na miażdżycę, którym wykonano endarterektomię (operacja polegająca na usunięciu blaszki miażdżycowej), wskazały na znaczące zmiany w obrębie białek macierzy zewnątrzkomórkowej, które różnicowały blaszki stabilne i niestabilne, a więc te podatne na pęknięcie²⁸⁶. Przeprowadzone analizy proteomiczne dowiodły, że niestabilne/miękkie blaszki miażdżycowe są bogate w białka związane ze stanem zapalnym, jak również przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i degradacją białek (np. metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, katepsyny). Z kolei stabilne/twarde blaszki miażdżycowe zawierają wyższy poziom białek strukturalnych ECM (np. kolagenów, wersykanów, nidogenów, biglikanów, lumikanów, proteoglikanu 4, białek mineralizacyjnych).

Uzyskane przez nas wyniki dowodzą, że stare komórki mięśni gładkich mogą aktywnie uczestniczyć w zmianach zachodzących w obrębie blaszek miażdżycowych, między innymi poprzez modyfikację struktury macierzy zewnątrzkomórkowej. Co więcej, ich rola może ulegać zmianie w zależności od etapu starzenia

5.4. Różnice w proteomie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielonych przez komórki na wczesnym i późnym etapie starzenia indukowanego oraz komórek ulegających starzeniu replikacyjnemu.

Funkcje i skład pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez starzejące się komórki wciąż pozostają stosunkowo słabo poznane, a publikacje prezentujące wyniki badań prowadzonych na różnych modelach starzenia są nieliczne. Przeprowadzona przez nas analiza proteomu pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare wykazała, że wśród białek, których poziom wzrastał znalazły się między innymi białka zaangażowane w odpowiedź zapalną i krzepnięcie, metabolizm czy regulację ekspresji genów. Analiza funkcjonalna dowiodła, że białka występujące w EVs wydzielanych przez komórki będące na późnym etapie starzenia oraz starzejące się replikacyjnie są związane głównie z budową i organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej oraz transportem pęcherzykowym, co jest spójne z analizą proteomu komórkowego. Ponadto porównanie poziomu białek strukturalnych macierzy

zewnątrzkomórkowej obecnych w EVs dowiodło o pogłębiającym się w czasie starzenia spadku ich poziomu. Wyniki te sugerują, że pęcherzyki wydzielane przez komórki stare mogą mieć istotny wpływ na procesy, w których rolę odgrywa macierz zewnątrzkomórkowa. Ciekawych dowodów potwierdzających tę hipotezę dostarczyła praca Whitehead i wsp.²⁸⁷. Autorzy badali rolę EVs wydzielonych przez stare komórki VSMC w patogenezie amyloidozy naczyń krwionośnych związanej z powstawaniem w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej złogów utworzonych przez medynę – peptyd o długości 50 aminokwasów powstający z białka MFGE8. Wykazali, że starzenie komórek VSMC wiąże się z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej, co prowadzi do nasilonego wiązania wydzielanych przez nie EVs. EVs pochodzące ze starych VSMC zawierały też więcej medyny, która ulegała agregacji przyczyniając się do powstawania złogów.

Uzyskane przez nas wyniki pokazujące zmiany w proteomie EVs wydzielanych przez stare VSMC, wskazują na istnienie podobnej charakterystyki tych struktur opisywanej przez innych badaczy. Patel i wsp.²⁸⁸ analizowali skład pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez fibroblasty indukowane do starzenia trzema różnymi czynnikami - promieniowanie γ , doksorubicyna lub antymycyna A. Wykazali, że sposób indukcji starzenia ma wpływ na liczbę zidentyfikowanych białek. W pęcherzykach wydzielanych przez starzejące się fibroblastach poziom białek zmienia się istotnie i waha się w granicach od 48% do 80% wszystkich zidentyfikowanych białek. Z grupy 1426 zidentyfikowanych białek wyodrębnili oni 318 wspólnych dla wszystkich zastosowanych induktorów starzenia. Białka te były związane głównie ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym oraz przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Porównanie białek zidentyfikowanych przez Patel i wsp.²⁸⁸, których poziom zmieniał się istotnie przynajmniej o 50% (146 białek), z białkami obecnymi w EVs wydzielane przez starzejące się komórki VSMC (EV_{Ssen_VSMC}) i zmieniającymi się w podobnym stopniu (276 białek) dowiodła, że blisko 8% (21 białek) z białek obecnych w EV_{Ssen_VSMC} jest taka sama jak w EVs pochodzących ze starych fibroblastów. Zdecydowana większość z nich była zaangażowana w organizację macierzy zewnątrzkomórkowej.

Z kolei Basisty i wsp.²⁸⁹, którzy podobnie jak Patel i wsp.²⁸⁸ przeprowadzili analizę proteomiczną EVs wydzielanych przez fibroblasty indukowane do starzenia promieniowaniem γ lub nadekspresją onkogenu RAS zwrócili uwagę, że najbardziej zmieniające się białka zawarte

w EVs wydzielonych przez komórki stare uczestniczą w ścieżkach związanych ze stanem zapalnym (system dopełniacza oraz synteza i regulacja prostaglandyn), adhezją komórkową oraz tworzeniem połączeń komórkowych, jak również przesyłaniem sygnału zależnego od Ras i białek G.

W przeprowadzonych przez nas analizach starzejących się VSMC, wśród białek których poziom wzrastał najbardziej znacząco (białka TOP20) w znalazły się również białka pełniące funkcje prozapalne oraz zaangażowane w hemostazę. Białka należące do tych grup były również identyfikowane w pęcherzykach wydzielanych przez starzejące się fibroblasty^{288,289}.

Doświadczenia przeprowadzone przez Kaplelach i wsp.²⁹⁰ na myszach, potwierdzają znaczny udział białek związanych z macierzą zewnątrzkomórkową w pęcherzykach wyizolowanych ze starzejącego się mózgu w porównaniu do tych pochodzących z mózgu młodych myszy. Zaobserwowane zmiany wskazały na wzrost poziomu białek ECM w EVs z mózgu starych myszy. Wśród nich wyróżnili białka HAPLN1 i HAPLN2 (*Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 i 2*), których poziom rósł najbardziej. Co ciekawe, w naszych badaniach białko HAPLN1 jest jednym z białek, którego poziom najbardziej znacząco obniża się w EVs wydzielanych przez ulegające starzeniu replikacyjnemu komórki VSMC. Badania te sugerują, że wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na organizację macierzy zewnątrzkomórkowej może być zależny od kontekstu tkankowego i typu starzejących się komórek, które je wydzielają.

We wspomnianych wcześniej badaniach prowadzonych przez Patel i wsp.²⁸⁸ przeanalizowano również proteom EVs wyizolowanych z osocza osób młodych (20-26 lat) oraz starszych (65-74 lata). Zidentyfikowano 1356 białek, z czego 171 odróżniało badane grupy. Białka różnicowe uczestniczyły w szlakach związanych z krzepnięciem krwi, odpowiedzią na uszkodzenia oraz osłabieniem odpowiedzi immunologicznej. Porównanie składu EVs wydzielanych przez stare fibroblasty oraz obecnych w osoczu osób starszych wykazało istnienie znaczących podobieństw. Spośród 1288 białek zidentyfikowanych w egzosomach pochodzących ze starych fibroblastów oraz 119 zidentyfikowanych w EVs pochodzących z osocza ludzi 'w podeszłym wieku' - 52 białka były wspólne dla obu grup. W obydwu porównywanych proteomach pęcherzykowych badacze stwierdzili spadek stężenia białek antyoksydacyjnych

i białek macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również zmiany w białkach prozapalnych i związanych z modyfikacją ECM, które odgrywają kluczową rolę w starzeniu komórkowym.

Biorąc pod uwagę uzyskane przez nas wyniki oraz zbieżne z nimi wyniki innych badaczy można przypuszczać, że pęcherzyki wydzielane przez komórki stare akumulujące się wraz z wiekiem w tkankach mogą stanowić istotny komponent sekretomu identyfikowanego w surowicy osób starszych. Oprócz znaczenia funkcjonalnego zmieniającego się wraz z wiekiem ładunku pęcherzyków, bardzo interesujące jest znalezienie białek pęcherzykowych, które stanowiłyby biomarkery starzenia komórkowego identyfikowane w krwi. W oparciu o przeprowadzone przez nas analizy porównawcze proteomu komórkowego i pęcherzykowego wyodrębniliśmy 5 białek (kaweolina 1, serpina B2, trombokinaza tkankowa/czynnik krzepnięcia III, białko szoku cieplnego HSPB7 oraz deaminaza AMP), które potencjalnie mogłyby pełnić taką rolę. Co ciekawe, niektóre z wytypowanych białek odgrywają istotną rolę w rozwoju miażdżycy. Liczne prace dowiodły, że kaweolina promuje miażdżycę poprzez modulację transportu błonowego - głównie LDL, metabolizmu cholesterolu i sygnalizacji komórkowej ²⁹¹. Ponadto reguluje stan zapalny naczyń, a jej brak ogranicza ten proces ²⁹². Zarówno wzmożony transport LDL jak i stan zapalny są powiązane z hamowaniem przez kaweolinę procesu autofagii ²⁹³. Z kolei czynnik krzepnięcia III (F3) występuje w dużych ilościach w blaszkach miażdżycowych, a jego ekspresja zachodzi w obecnych w blaszkach komórkach VSMC, makrofagach i komórkach piankowatych. Coraz więcej badań przedklinicznych potwierdza udział czynników krzepnięcia w nieprawidłowej aktywacji tego procesu w trakcie rozwoju miażdżycy. Aktywacja czynników krzepnięcia nie tylko wspomaga krzepnięcie, ale może również wywołać stan zapalny na przykład poprzez ścieżki sygnałowe, takie jak receptor aktywowany proteazą 2 (PAR-2) ²⁹⁴.

5.5. Modulacja autofagii i jej wpływ na sekrecje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Przeprowadzone przez nas analizy dowiodły, że starzeniu komórek VSMC towarzyszy zwiększona sekrecja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) oraz, że proces ten znacząco nasila się w późnej fazie starzenia. Badania ultrastruktury komórek VSMC z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej pozwoliły na stwierdzenie zwiększonej liczby ciałek wielopęcherzykowych MVBs w starych komórkach VSMC. Struktury te po fuzji z błoną komórkową uwalniają zawarte w nich małe pęcherzyki ILVs do przestrzeni

zewnątrzkomórkowej jako egzosomy. Na tej podstawie możemy przypuszczać, że wśród EVs wydzielanych przez komórki stare rośnie udział egzosomów.

Zaobserwowane zmiany w rosnącej liczbie wydzielanych pęcherzyków przez komórki VSMC będące na późnych etapach starzenia oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu korelują z postępującą w czasie akumulacją pęcherzyków autofagicznych oraz lizosomów identyfikowanych zarówno na podstawie zwiększonego udziału białek budujących te struktury, jak i obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej. Wyniki te były zgodne z postawioną w pracy hipotezą łączącą zaburzenia autofagii ze wzmożoną sekrecją EVs.

W literaturze odnajdujemy szereg prac wskazujących na związek pomiędzy autofagią a szeroko pojętą sekrecją, stąd też coraz częściej mówi się o autofagii sekrecyjnej w odróżnieniu od powszechnie badanej autofagii degradacyjnej. Jeden z typów autofagii sekrecyjnej został opisany przez Leidal i wsp.²⁹⁵ jako proces sekrecji zależny od białka LC3 (LDELS). Inne prace pokazują, że upośledzenie funkcji endolizosomów będących elementami zależnej od autofagii degradacji ma wpływ na zwiększoną sekrecję EVs^{296,297}. Nasze badania dowiodły, że traktowanie komórek VSMC bafilomycyną A1 prowadzi do znaczącego wzrostu wydzielania EVs. Co istotne, liczba wydzielanych EVs przez młode komórki VSMC poddane działaniu bafilomycyny A1 była porównywalna z liczbą pęcherzyków wydzielanych przez komórki będące na późnym etapie starzenia. Bafilomycyna A1 jest powszechnie stosowanym w badaniach inhibitorem autofagii, a jej działanie wiąże się z zaburzeniem fuzji autofagosomów z lizosomami jak też samą degradacją lizosomalną.

Zgodnie z wynikami badań opublikowanymi przez Solvik i wsp.,²⁹⁸ podanie bafilomycyny A1 prowadzi do indukcji specyficznego typu autofagii sekrecyjnej - SALI (*ang. secretory autophagy during lysosome inhibition*). Solvik i wsp. wykazali, że komórki z zaburzoną funkcją lizosomów uruchamiają mechanizm, który pozwala na wydalenie przeznaczonych do degradacji ładunków w celu utrzymania homeostazy.

Wyniki naszych badań jako pierwsze wskazują, że ten typ autofagii sekrecyjnej może być mechanizmem regulującym zwiększoną sekrecję EVs przez komórki będące na późnych etapach starzenia. Potwierdza to również wynik przeprowadzonego przez nas eksperymentu, w którym bafilomycyną A1 traktowane były komórki młode i komórki będące na wczesnym

i późnym etapie starzenia. Podanie bafilomycyny A1 prowadziło do hamowania autofagii, o czym świadczył porównywalny wzrost poziomu LC3B II w komórkach młodych i starych. Obserwowaliśmy również wzrost wydzielania EVs po podaniu bafilomycyny A1 we wszystkich grupach badanych komórek, przy czym najwięcej EVs wydzielaly komórki będące na późnym etapie starzenia. Frakcja pęcherzyków wydzielonych przez komórki VSMC poddane działaniu bafilomycyny A1 była wzbogacona w białka autofagosomalne – lipidowaną formę LC3 i SQSTM1/p62, co dowodzi, że EVs wydzielone pod wpływem bafilomycyny A1 powstały w wyniku połączenia ścieżki endosomalnej i autofagicznej, prowadzącej do utworzenia amfiosomów. Zgodnie z wynikami badań Solvik i wsp.²⁹⁸ białka te nie są pakowane do egzosomów, ale pozostają przyłączone do ich powierzchni. Co ciekawe, przeprowadzona przez nas analiza poziomu białek LC3 i SQSTM1/p62 w pęcherzykach wydzielonych przez młode i stare komórki VSMC wykazała zdecydowanie niższy poziom białek autofagosomalnych był we frakcji EVs wydzielonych przez stare komórki. Ponieważ analizę Western blot przeprowadzono na tej samej liczbie pęcherzyków z każdej badanej grupy komórek, niższy poziom badanych białek może być efektem ich „rozcieńczenia” w większej liczbie EVs wydzielanych przez komórki stare.

W wyniku hamowania autofagii, wzmożona sekrecja EVs była obserwowana przez nas tylko po zastosowaniu bafilomycyny A1. Zastosowanie chlorochiny (CQ) – nie zwiększało sekrecji EVs. Obydwa inhibitory mają zbliżony mechanizm działania - bafilomycyna A1 jest inhibitorem wakuolarniej ATPazy protonowej (V-ATPase), co powoduje wzrost pH w lizosomach, zaś chlorochina jako słaba zasada przenika do kwaśnych przedziałów komórkowych zmieniając ich pH. W literaturze istnieją rozbieżne informacje dotyczące ewentualnych różnic w działaniu obydwu inhibitorów. Na przykład Mauthe i wsp.²⁹⁹ dowodzi, że chlorochina zaburza fuzję autofagosomów z lizosomami a nie wpływa na funkcjonowanie lizosomów, zaś działanie bafilomycyny A1 ogranicza się do zmiany pH w lizosomach i zaburzenia ich zdolności proteolitycznych. Z kolei Mauvezin i wsp.³⁰⁰ wykazali, że bafilomycyna A1 nie tylko zmienia pH w lizosomach, ale również zaburza fuzję autofagosomów z lizosomami, podobnie jak to opisywał Mauthe i wsp.²⁹⁹ w przypadku chlorochiny. Podobne rozbieżności odnajdujemy w pracach, w których wykorzystywano bafilomycynę A1 i/lub chlorochinę do badania ich wpływu na sekrecję EVs. Wyniki niektórych doświadczeń są zgodne z naszymi obserwacjami i pokazują, że tylko bafilomycyna A1 prowadzi do zwiększonej sekrecji

EVs³⁰¹, podczas gdy inne dowodzą, że taki sam efekt obserwowany jest pod wpływem chlorochiny³⁰². Trudno zatem na tym etapie spekulować o znaczeniu uzyskanego wyniku w kontekście prowadzonych przez nas badań. Być może jest to związane z różnicami w zastosowanych stężeniach badanych związków, czasie traktowania i typie komórki.

5.6. Wpływ simwastatyny na wydzielanie czynników SASP przez komórki VSMC po indukcji starzenia dokсорubicyną

Statyny są grupą leków powszechnie stosowanych w chorobach układu krążenia, w tym w miażdżycy. Ich działanie prowadzi do obniżenia cholesterolu (LDL) oraz redukują stan zapalny i przyczyniają się do stabilizacji blaszki miażdżycowej. Przeprowadzone przez nas eksperymenty miały odpowiedzieć na pytanie czy statyny mogą wpływać na sekrecję EVs przez stare komórki VSMC, jak również cytokin należących do tzw. czynników rozpuszczalnych SASP.

Uzyskane przez nas wyniki pokazały, że simwastatyna, w sposób zależny od stężenia, obniża poziom wydzielanych przez stare komórki VSMC wybranych cytokin. Wcześniejsze prace pokazały, że statyny prowadzą do obniżenia poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (IL-6, IL-8, MCP-1) w komórkach śródbłonna (HUVEC) oraz w komórkach jednojądrzastych krwi hodowanych *in vitro* oraz w monocytach pochodzących od pacjentów z hipercholesterolemią, którym podawano statyny³⁰³. Wykazano również obniżenie poziomu wydzielanej IL-6 i IL-8 pod wpływem siwastatyny przez komórki nabłonkowe stymulowane IL-1 α . Podobny efekt działania statyn pokazały badania Montecuccio i wsp.³⁰⁴, prowadzone na monocytach stymulowanych białkiem CRP, w których obniżeniu ulegał poziom chemokin CCL2, CCL3 oraz CCL4. Z kolei Liu i wsp.³⁰⁵ jako pierwsi pokazali, że statyny mogą również obniżać poziom czynników SASP, co wykazano prowadząc badania na fibroblastach indukowanych do starzenia promieniowaniem jonizującym. Rossi i wsp.³⁰⁶ w niedawno opublikowanej pracy³⁰⁶ przedstawili wyniki badań przeprowadzonych na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych po indukcji starzenia dokсорubicyną i wykazali spadek ekspresji genów kodujących IL1 β , IL6, IL8 i NF-kB1 w komórkach starych.

Podsumowując, wpływ statyn na obniżenie sekrecji cytokin jest obserwowany w różnych modelach eksperymentalnych, również tych, w których badane były komórki stare. Tak więc uzyskany przez nas wynik jest zgodny z ugruntowaną już wiedzą, a przeprowadzone przez nas

eksperymenty stanowią dowód na zgodne z literaturą działanie badanych związków na ulegające starzeniu VSMC.

Pomimo odnotowanego wpływu siwastatyny na wydzielanie cytokin przez stare komórki VSMC, liczba wydzielanych przez te same komórki pęcherzyków nie uległa zmianie, dowodząc, że w badanym modelu eksperymentalnym działanie statyn ogranicza się do wpływu na sekrecję białek. Ten wynik nie znajduje jednoznacznego potwierdzenia w dotychczas opublikowanych pracach. Niektóre z nich wykazują, że statyny obniżają liczbę wydzielanych EVs, tak jak to opisał Kulshreshtha i wsp.³⁰⁷ prowadząc badania na linii komórek nabłonka oskrzeli oraz monocytach (THP-1). Warto zwrócić uwagę, że ilość wydzielanych pęcherzyków była mierzona w sposób pośredni, na podstawie oceny poziomu białka CD63, co może prowadzić do fałszywie pozytywnego wyniku. Spadek wydzielania EVs pod wpływem atorwastatyny zaobserwowano również w badaniach prowadzonych na komórkach linii raka płuc MDA-MB-231 oraz EMT6³⁰⁸. Niezależnie od wpływu statyn na sekrecję EVs w literaturze pojawiają się doniesienia o wpływie tych związków na skład EVs, co może mieć istotne znaczenie funkcjonalne. Choe i wsp.³⁰⁸ zwrócili uwagę na obniżoną pod wpływem atorwastatyny ekspresję PDL-1 w komórkach nowotworowych raka płuc, co prowadziło do spadku poziomu tego białka w EVs. To wskazanie na możliwość wykorzystania statyn w immunoterapii nowotworu. Statyny powodowały też zmiany składu lipidowego EVs wydzielanych przez komórki raka jajnika (SKOV3). Wykazano, że spadkowi wydzielania EVs towarzyszył wzrost liczby EVs bogatych w cholesterol³⁰⁹. Z kolei analiza EVs występujących we frakcji LDL surowicy chorych z subklinicznymi objawami miażdżycy wykazała wzrost poziomu niektórych czynników krzepnięcia w EVs izolowanych z krwi pacjentów, którym była podawana rozuwastatyna³¹⁰.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, obserwowany brak efektu simwastatyny na liczbę wydzielanych przez komórki stare EVs nie wyklucza jej wpływu na proteom pęcherzyków co może przekładać się na rolę jaką pełnią EVs wydzielone przez komórki stare w rozwoju blaszki miażdżycowej. Konieczne są jednak dalsze badania, które pozwolą na pogłębienie wiedzy w tym zakresie.

6. Podsumowanie i wnioski

- Białka jądrowe takie jak lamina B1, HMGB1 oraz PARP1, zaliczane do klasycznych markerów starzenia są najbardziej wiarygodnymi znacznikami tego procesu, a zmiany w poziomie tych białek obserwowane są na wczesnym i późnym etapie starzenia przyspieszonego jak i w komórkach ulegających starzeniu replikacyjnemu.
- Podwyższony poziom białka p16, powszechnie stosowanego markera komórek ulegających starzeniu *in vivo*, występuje wyłącznie w komórkach VSMC będących na późnym etapie starzenia oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu.
- Wzrost poziomu białek związanych z odpowiedzią komórki na uszkodzenia DNA (p53, p21) jest przejściowy i obserwowany wyłącznie na wczesnych etapach starzenia indukowanego komórek VSMC i nie może stanowić znacznika tego procesu na późniejszych jego etapach.
- Podczas starzenia komórek VSMC dochodzi do istotnego obniżenia ekspresji większości genów, podczas gdy w proteomie komórek starych – liczba białek o obniżonym poziomie jest zbliżona do tych których poziom rośnie.
- Wraz z rozwojem fenotypu starzenia dochodzi do istotnych zmian w ekspresji genów kodujących składniki macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białek ją modyfikujących.
- Analiza PCA wykazała, że komórki VSMC będące na późnym etapie starzenia indukowanego stresem oraz komórki starzejące się replikacyjnie charakteryzują się podobnymi zmianami w proteomie komórkowym, odróżniającymi je od komórek proliferujących i będących na wczesnym etapie starzenia indukowanego stresem.
- Biorąc pod uwagę białka, które są najbardziej istotnie nadreprezentowane w komórkach będących na późnym etapie starzenia indukowanego oraz ulegających starzeniu replikacyjnemu można stwierdzić, że w trakcie starzenia komórek VSMC dochodzi do znaczących zmian w metabolizmie komórkowym, w tym metabolizmie lipidów oraz procesach wpływających na funkcje komórek układu odpornościowego.
- Liczba wydzielanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz ich proteom ulega znaczącym zmianom wraz z upływem czasu od indukcji starzenia.
- Zmiany obserwowane w proteomie pęcherzyków wydzielanych przez komórki stare w dużym stopniu odzwierciedlają zmiany w proteomie tych komórek a EVs, które są

istotnie wzbogacone o białka występujące w starych komórkach VSMC, mogą mieć wartość predykcyjną przy ocenie zmian zachodzących w naczyniach w trakcie rozwoju chorób układu krążenia, w tym miażdżycy.

- Spadek wydajności autofagii w starych komórkach VSMC wiąże się z postępującą w czasie akumulacją pęcherzyków autofagicznych i lizosomów oraz koreluje ze zwiększoną liczbą wydzielonych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki będące na późnym etapie starzenia.
 - Hamowanie autofagii bafilomycyną A1 przyczynia się do zwiększonej sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki VSMC, przy czym najwyższy poziom sekrecji wykazują komórki VSMC będące na późnych etapach starzenia.
 - Hamowanie autofagii bafilomycyną A1 w komórkach VSMC prowadzi do wydzielania pęcherzyków znacząco i istotnie wzbogaconych o białka obecne w autofagosomach. Poziom tych białek spada w EVs wydzielanych przez komórki stare i jest odwrotnie proporcjonalny do liczby wydzielanych EVs.
 - Simwastatyna obniża poziom wydzielonych rozpuszczalnych składników SASP i nie ma wpływu na sekrecję pęcherzyków.
1. W komórkach VSMC indukowanych do starzenia dochodzi do postępujących w czasie zmian w transkryptomie, proteomie i sekretomie. W skutek tych zmian komórki VSMC, będące na późnym etapie starzenia, które akumulują się w patologicznie zmienionej ścianie aorty, nabierają określonych cech, które mogą mieć istotne znaczenie w rozwoju miażdżycy miażdżycowej i mogą przyczyniać się do niestabilności blaszki miażdżycowej.
 2. Autofagia sekrecyjna wynikająca z zaburzonego przebiegu końcowych etapów degradacji uczestniczy w kształtowaniu fenotypu sekrecyjnego komórek starych, w szczególności na późnych etapach starzenia.
 3. Białka, które są nadreprezentowane w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EVs) wydzielanych przez stare komórki VSMC i mogą być potencjalnymi biomarkerami rozwoju miażdżycy.

Bibliografia

1. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300 (1956).
2. Blackburn, E. H. & Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120, 33–53 (1978).
3. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405–413 (1985).
4. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585–621 (1961).
5. Tuttle, C. S. L., Luesken, S. W. M., Waaijer, M. E. C. & Maier, A. B. Senescence in tissue samples of humans with age-related diseases: A systematic review. *Ageing Res Rev* 68, 101334 (2021).
6. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439–446 (2014).
7. Kumari, R. & Jat, P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* 9, 645593 (2021).
8. Dasgupta, N., Arnold, R., Equey, A., Gandhi, A. & Adams, P. D. The role of the dynamic epigenetic landscape in senescence: orchestrating SASP expression. *NPJ Aging* 10, 48 (2024).
9. Carrel, A. & Ebeling, A. H. The multiplication of fibroblasts in vitro. *J Exp Med* 34, 317–337 (1921).
10. Allsopp, R. C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10114–10118 (1992).
11. Bodnar, A. G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352 (1998).
12. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460 (1990).
13. Harley, C. & Villeponteau, B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Current opinion in genetics & development* 5, (1995).
14. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225, 951–960 (1992).

15. Moyzis, R. K. et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622–6626 (1988).
16. Fumagalli, M. et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14, 355–365 (2012).
17. Jeyapalan, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M. & Herbig, U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128, 36–44 (2007).
18. d’Adda di Fagagna, F. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198 (2003).
19. Toussaint, O., Medrano, E. E. & von Zglinicki, T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35, 927–945 (2000).
20. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602 (1997).
21. Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol* 22, 816–827 (2010).
22. Chainiaux, F. et al. Stress-Induced (Premature) Senescence. in *Cellular Ageing and Replicative Senescence* 243–262 (2016). doi:10.1007/978-3-319-26239-0_13.
23. Nardella, C., Clohessy, J. G., Alimonti, A. & Pandolfi, P. P. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 11, 503–511 (2011).
24. Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A. & Mosieniak, G. A common signature of cellular senescence; does it exist? *Ageing Res Rev* 71, 101458 (2021).
25. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* 28, 436–453 (2018).
26. Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K. & Albiez, M. Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* 180, 84–93 (1989).
27. Neurohr, G. E. et al. Excessive Cell Growth Causes Cytoplasm Dilution And Contributes to Senescence. *Cell* 176, 1083-1097.e18 (2019).
28. Levy, D. L. & Heald, R. Mechanisms of intracellular scaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 113–135 (2012).

29. Marshall, W. F. Scaling of Subcellular Structures. *Annu Rev Cell Dev Biol* 36, 219–236 (2020).
30. Lanz, M. C. et al. Increasing cell size remodels the proteome and promotes senescence. *Mol Cell* 82, 3255–3269.e8 (2022).
31. Lengefeld, J. et al. Cell size is a determinant of stem cell potential during aging. *Sci Adv* 7, eabk0271 (2021).
32. Wi, J. H., Heo, C. H., Gwak, H., Jung, C. & Kim, S. Y. Probing Physical Properties of the Cellular Membrane in Senescent Cells by Fluorescence Imaging. *J Phys Chem B* 125, 10182–10194 (2021).
33. Moujabber, O. et al. Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci* 76, 1169–1183 (2019).
34. Nishio, K. & Inoue, A. Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 123, 263–273 (2005).
35. Shen, Y., Maxson, R., McKenney, R. J. & Ori-McKenney, K. M. Microtubule acetylation is a biomarker of cytoplasmic health during cellular senescence. *bioRxiv* 2025.03.31.646469 (2025) doi:10.1101/2025.03.31.646469.
36. Fanning, E., Klimovich, V. & Nager, A. R. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 34, 4126–4137 (2006).
37. Lee, J.-H. & Paull, T. T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93–96 (2004).
38. Abraham, R. T. PI 3-kinase related kinases: ‘big’ players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3, 883–887 (2004).
39. d’Adda di Fagagna, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8, 512–522 (2008).
40. Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. R. & Elledge, S. J. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961–966 (2003).
41. Dimri, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363–9367 (1995).
42. Miwa, S., Kashyap, S., Chini, E. & von Zglinicki, T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest* 132, e158447 (2022).
43. Neikirk, K. et al. MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. *Eur J Cell Biol* 102, 151371 (2023).

44. Passos, J. F. et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* 5, e110 (2007).
45. Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 23, 2066–2075 (2012).
46. Ivanov, A. et al. Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol* 202, 129–143 (2013).
47. Chandra, T. et al. Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Mol Cell* 47, 203–214 (2012).
48. Wenger, B. et al. PML-nuclear bodies decrease with age and their stress response is impaired in aged individuals. *BMC Geriatrics* 14, 42 (2014).
49. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 15, 1139–1153 (2014).
50. Qian, S. et al. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol* 12, 985363 (2022).
51. Yosef, R. et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7, 11190 (2016).
52. Birch, J. & Gil, J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* 34, 1565–1576 (2020).
53. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118 (2010).
54. Basisty, N. et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* 18, e3000599 (2020).
55. Davalos, A. R. et al. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 201, 613–629 (2013).
56. Coppé, J.-P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6, 2853–2868 (2008).
57. Wang, B., Han, J., Elisseeff, J. H. & Demaria, M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 25, 958–978 (2024).

58. Nakamura, Y., Aihara, R., Iwata, H., Kuwayama, T. & Shirasuna, K. IL1B triggers inflammatory cytokine production in bovine oviduct epithelial cells and induces neutrophil accumulation via CCL2. *Am J Reprod Immunol* 85, e13365 (2021).
59. Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K. & Campisi, J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17031–17036 (2009).
60. Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A. & Vernet, J.-P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal* 15, 17 (2017).
61. Wei, J. et al. Leukotriene D4 induces cellular senescence in osteoblasts. *Int Immunopharmacol* 58, 154–159 (2018).
62. Wiley, C. D. et al. Secretion of leukotrienes by senescent lung fibroblasts promotes pulmonary fibrosis. *JCI Insight* 4, e130056, 130056 (2019).
63. Cheng, H., Huang, H., Guo, Z., Chang, Y. & Li, Z. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. *Theranostics* 11, 8836–8854 (2021).
64. Dackor, R. T. et al. Prostaglandin E₂ protects murine lungs from bleomycin-induced pulmonary fibrosis and lung dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301, L645-655 (2011).
65. Chong, M. et al. CD36 initiates the secretory phenotype during the establishment of cellular senescence. *EMBO Rep* 19, e45274 (2018).
66. Xu, W. et al. Membrane-Bound CD40L Promotes Senescence and Initiates Senescence-Associated Secretory Phenotype via NF-κB Activation in Lung Adenocarcinoma. *Cell Physiol Biochem* 48, 1793–1803 (2018).
67. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30, 1536–1548 (2011).
68. Wiley, C. D. et al. Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Rep* 8, 2410 (2018).
69. Coppé, J.-P. et al. Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 286, 36396–36403 (2011).
70. Wang, B. et al. Pharmacological CDK4/6 inhibition reveals a p53-dependent senescent state with restricted toxicity. *EMBO J* 41, e108946 (2022).

71. Sturmlechner, I. et al. p21 produces a bioactive secretome that places stressed cells under immunosurveillance. *Science* 374, eabb3420 (2021).
72. Buj, R., Leon, K. E., Anguelov, M. A. & Aird, K. M. Suppression of p16 alleviates the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY)* 13, 3290–3312 (2021).
73. Laberge, R.-M. et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* 17, 1049–1061 (2015).
74. Takahashi, A. et al. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9, 1249 (2018).
75. Zhao, B. et al. Topoisomerase 1 cleavage complex enables pattern recognition and inflammation during senescence. *Nat Commun* 11, 908 (2020).
76. McArthur, K. et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science* 359, eaao6047 (2018).
77. Victorelli, S. et al. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. *Nature* 622, 627–636 (2023).
78. Demaria, M. et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31, 722–733 (2014).
79. Mosteiro, L. et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 354, aaf4445 (2016).
80. Franceschi, C. & Campisi, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1, S4–9 (2014).
81. Baker, D. J. et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189 (2016).
82. Xu, M. et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24, 1246–1256 (2018).
83. Zha, Y. et al. Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells and Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* 9, 910580 (2022).
84. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241 (2000).
85. Moore, K. J., Sheedy, F. J. & Fisher, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 13, 709–721 (2013).

86. Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W. & Medford, R. M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9114–9119 (1996).
87. Lamiell, J. M., Wilcosky, B. R. & Crouch, G. L. Physiologic monitoring of combat casualties. *Mil Med* 154, 186–191 (1989).
88. Gui, Y., Zheng, H. & Cao, R. Y. Foam Cells in Atherosclerosis: Novel Insights Into Its Origins, Consequences, and Molecular Mechanisms. *Front Cardiovasc Med* 9, 845942 (2022).
89. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166–6173 (2000).
90. Wang, J. C. & Bennett, M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res* 111, 245–259 (2012).
91. Kawai, K., Kawakami, R., Finn, A. V. & Virmani, R. Differences in Stable and Unstable Atherosclerotic Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 44, 1474–1484 (2024).
92. Kolodgie, F. D. et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 16, 285–292 (2001).
93. Libby, P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247, 349–358 (2000).
94. Kockx, M. M. et al. Apoptosis and Related Proteins in Different Stages of Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 97, 2307–2315 (1998).
95. Kapustin, A. N. et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res* 109, e1-12 (2011).
96. Kapustin, A. N. et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* 116, 1312–1323 (2015).
97. Kapustin, A. N. & Shanahan, C. M. Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation. *J Physiol* 594, 2905–2914 (2016).
98. Aikawa, M. et al. Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression. *Circulation* 96, 82–90 (1997).
99. Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 74, 13–40 (2012).

100. Bennett, M. R., Evan, G. I. & Schwartz, S. M. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 95, 2266–2274 (1995).
101. Hariri, R. J. et al. Aging and arteriosclerosis. Cell cycle kinetics of young and old arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol* 131, 132–136 (1988).
102. Matthews, C. et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 99, 156–164 (2006).
103. Araldi, R. P. et al. Pharma Intelligence Applied to the Research and Development of Cell and Cell-Free Therapy: A New Era of the Medicine. in *Recent Update on Mesenchymal Stem Cells* (IntechOpen, 2024). doi:10.5772/intechopen.1003827.
104. Chargaff, E. & West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166, 189–197 (1946).
105. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13, 269–288 (1967).
106. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23, 177–189 (2009).
107. Heijnen, H. & van der Sluijs, P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* 13, 2141–2151 (2015).
108. Webber, A. J. & Johnson, S. A. Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis. *Am J Pathol* 60, 19–42 (1970).
109. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967–978 (1983).
110. Johnstone, R. M. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 34, 214–219 (2005).
111. Morishita, M., Takahashi, Y., Nishikawa, M. & Takakura, Y. Pharmacokinetics of Exosomes-An Important Factor for Elucidating the Biological Roles of Exosomes and for the Development of Exosome-Based Therapeutics. *J Pharm Sci* 106, 2265–2269 (2017).
112. Qin, J. & Xu, Q. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm* 71, 537–543 (2014).

113. Welsh, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 13, e12404 (2024).
114. Sheta, M., Taha, E. A., Lu, Y. & Eguchi, T. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. *Biology (Basel)* 12, 110 (2023).
115. Barteneva, N. S., Maltsev, N. & Vorobjev, I. A. Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 49 (2013).
116. Fitzner, D. et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* 124, 447–458 (2011).
117. Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* 164, 1226–1232 (2016).
118. Raposo, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161–1172 (1996).
119. Zitvogel, L. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594–600 (1998).
120. Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659 (2007).
121. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 597–608 (2009).
122. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* 5, 442 (2014).
123. Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K. & Antalíková, J. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Int J Mol Sci* 21, 7568 (2020).
124. Colombo, M. et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126, 5553–5565 (2013).
125. Wollert, T. & Hurley, J. H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869 (2010).
126. Pfitzner, A.-K. et al. An ESCRT-III Polymerization Sequence Drives Membrane Deformation and Fission. *Cell* 182, 1140–1155.e18 (2020).
127. Trajkovic, K. et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244–1247 (2008).

128. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228 (2018).
129. Han, Q.-F. et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer* 21, 207 (2022).
130. Haraszti, R. A. et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles* 5, 32570 (2016).
131. Fabbiano, F. et al. RNA packaging into extracellular vesicles: An orchestra of RNA-binding proteins? *J Extracell Vesicles* 10, e12043 (2020).
132. Ostrowski, M. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 12, 19–30; sup pp 1-13 (2010).
133. Xu, M. et al. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes Dis* 10, 1894–1907 (2023).
134. Gordon, P. B., Høyvik, H. & Seglen, P. O. Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *Biochem J* 283 (Pt 2), 361–369 (1992).
135. Ganesan, D. & Cai, Q. Understanding amphisomes. *Biochem J* 478, 1959–1976 (2021).
136. Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L. & Seglen, P. O. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* 7, 935–956 (2011).
137. Tooze, S. A., Abada, A. & Elazar, Z. Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a018358 (2014).
138. Patel, K. K. et al. Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. *EMBO J* 32, 3130–3144 (2013).
139. Chen, Y.-D. et al. Exophagy of annexin A2 via RAB11, RAB8A and RAB27A in IFN- γ -stimulated lung epithelial cells. *Sci Rep* 7, 5676 (2017).
140. Zhang, M., Kenny, S. J., Ge, L., Xu, K. & Schekman, R. Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife* 4, e11205 (2015).
141. Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3, (2014).
142. Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. & Baruteau, J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 19, 47 (2021).

143. Jeppesen, D. K. et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177, 428-445.e18 (2019).
144. McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M. & McCracken, S. A. Exosomes: Mechanisms of Uptake. *J Circ Biomark* 4, 7 (2015).
145. Bonsergent, E. et al. Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun* 12, 1864 (2021).
146. Petroni, D. et al. Extracellular Vesicles and Intercellular Communication: Challenges for In Vivo Molecular Imaging and Tracking. *Pharmaceutics* 15, 1639 (2023).
147. Lehmann, B. D. et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* 68, 7864–7871 (2008).
148. Borghesan, M. et al. Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Rep* 27, 3956-3971.e6 (2019).
149. Kavanagh, E. L. et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. *Oncogenesis* 6, e388 (2017).
150. Mensà, E. et al. Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesicles* 9, 1725285 (2020).
151. Takasugi, M. et al. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun* 8, 15729 (2017).
152. Terlecki-Zaniewicz, L. et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY)* 10, 1103–1132 (2018).
153. Terlecki-Zaniewicz, L. et al. Extracellular Vesicles in Human Skin: Cross-Talk from Senescent Fibroblasts to Keratinocytes by miRNAs. *J Invest Dermatol* 139, 2425-2436.e5 (2019).
154. Takahashi, A. et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8, 15287 (2017).
155. Wallis, R., Mizen, H. & Bishop, C. L. The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mech Ageing Dev* 189, 111263 (2020).
156. Chironi, G. et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2775–2780 (2006).

157. Fang, F. et al. Extracellular Vesicles in Atherosclerosis: From Pathogenesis to Theranostic Applications. *Small* 21, e2504761 (2025).
158. Peng, Z., Shu, B., Zhang, Y. & Wang, M. Endothelial Response to Pathophysiological Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39, e233–e243 (2019).
159. Libby, P. et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5, 56 (2019).
160. Chatterjee, V. et al. Endothelial microvesicles carrying Src-rich cargo impair adherens junction integrity and cytoskeleton homeostasis. *Cardiovasc Res* 116, 1525–1538 (2020).
161. Jansen, F. et al. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 98, 94–106 (2013).
162. Barry, O. P., Praticò, D., Savani, R. C. & FitzGerald, G. A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 102, 136–144 (1998).
163. Mesri, M. & Altieri, D. C. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* 161, 4382–4387 (1998).
164. Zhang, P. et al. Serum-Derived Exosomes from Patients with Coronary Artery Disease Induce Endothelial Injury and Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Int Heart J* 62, 396–406 (2021).
165. Nguyen, M.-A. et al. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38, 49–63 (2018).
166. Zakharova, L., Svetlova, M. & Fomina, A. F. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol* 212, 174–181 (2007).
167. Chen, X. et al. Hepatic steatosis aggravates atherosclerosis via small extracellular vesicle-mediated inhibition of cellular cholesterol efflux. *J Hepatol* 79, 1491–1501 (2023).
168. Niu, C. et al. Macrophage Foam Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Adhesion. *J Am Heart Assoc* 5, e004099 (2016).
169. Ehara, S. et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 110, 3424–3429 (2004).

170. Wong, K. K., Thavornpattanapong, P., Cheung, S. C., Sun, Z. & Tu, J. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC Cardiovasc Disord* 12, 7 (2012).
171. Otsuka, F., Sakakura, K., Yahagi, K., Joner, M. & Virmani, R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 724–736 (2014).
172. Lozito, T. P. & Tuan, R. S. Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. *J Cell Physiol* 227, 534–549 (2012).
173. Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S. & Bhutia, S. K. Autophagy in health and disease: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 104, 485–495 (2018).
174. Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24, 24–41 (2014).
175. Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 931–937 (2007).
176. Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J. & Yoshimori, T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 167–185 (2023).
177. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–141 (2011).
178. Hara, T. et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181, 497–510 (2008).
179. Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. & Eskelinen, E. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, (2009).
180. Hailey, D. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, (2010).
181. Tooze, S. & Yoshimori, T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology* 12, (2010).
182. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 14, (2018).
183. Holzer, E., Martens, S. & Tulli, S. The Role of ATG9 Vesicles in Autophagosome Biogenesis. *Journal of molecular biology* 436, (2024).

184. Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, (2010).
185. Mizushima, N. et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* 116, (2003).
186. Romanov, J. et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO journal* 31, (2012).
187. Ye, Y. et al. Multifaceted membrane interactions of human Atg3 promote LC3-phosphatidylethanolamine conjugation during autophagy. *Nature communications* 14, (2023).
188. Klionsky, D. & Schulman, B. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature structural & molecular biology* 21, (2014).
189. Jakobi, A. et al. Structural basis of p62/SQSTM1 helical filaments and their role in cellular cargo uptake. *Nature communications* 11, (2020).
190. Pankiv, S. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282, (2007).
191. Yoshii, S. & Mizushima, N. Monitoring and Measuring Autophagy. *International journal of molecular sciences* 18, (2017).
192. He, H. et al. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *The Journal of biological chemistry* 278, (2003).
193. Mizushima, N. Autophagic flux measurement: Cargo degradation versus generation of degradation products. *Current opinion in cell biology* 93, (2025).
194. Kauffman, K. et al. Delipidation of mammalian Atg8-family proteins by each of the four ATG4 proteases. *Autophagy* 14, (2018).
195. Zhao, Y. & Zhang, H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *The Journal of cell biology* 218, (2019).
196. Hikita, H., Sakane, S. & Takehara, T. Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research* 2, 120–124 (2018).
197. Eskelinen, E. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1, (2005).

198. Trivedi, P., Bartlett, J. & Pulinilkunnil, T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* 9, (2020).
199. Navarro-Romero, A., Montpeyó, M. & Martinez-Vicente, M. The Emerging Role of the Lysosome in Parkinson's Disease. *Cells* 9, (2020).
200. Sun, A. Lysosomal storage disease overview. *Annals of translational medicine* 6, (2018).
201. Schwake, M., Schröder, B. & Saftig, P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 14, (2013).
202. Wilke, S., Krausze, J. & Büsow, K. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC biology* 10, (2012).
203. Xiong, J. & Zhu, M. Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Science China. Life sciences* 59, (2016).
204. Nanayakkara, R. et al. Autophagic lysosome reformation in health and disease. *Autophagy* 19, (2023).
205. Yu, L. et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, (2010).
206. Cuervo, A. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends in genetics : TIG* 24, (2008).
207. Young, A. et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & development* 23, (2009).
208. Huang, Y. et al. Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. *Autophagy* 10, (2014).
209. Horikawa, I. et al. Autophagic degradation of the inhibitory p53 isoform $\Delta 133p53\alpha$ as a regulatory mechanism for p53-mediated senescence. *Nature communications* 5, (2014).
210. Dou, Z. et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527, (2015).
211. Hansen, M., Rubinsztein, D. & Walker, D. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, (2018).
212. Lipinski, M. et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, (2010).

213. Kang, H., Lee, K., Kim, S., Choi, H. & Park, S. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS one* 6, (2011).
214. Kang, C. et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science (New York, N.Y.)* 349, (2015).
215. Nickel, W. & Rabouille, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, (2009).
216. Dupont, N. et al. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO journal* 30, (2011).
217. Chen, R., Kang, R. & Tang, D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Experimental & molecular medicine* 54, (2022).
218. Lee, J., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S. & Ye, Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nature cell biology* 18, (2016).
219. Berg, T., Fengsrud, M., Strømhaug, P., Berg, T. & Seglen, P. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *The Journal of biological chemistry* 273, (1998).
220. Guo, H. et al. Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Developmental cell* 43, (2017).
221. Leidal, A. et al. The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nature cell biology* 22, (2020).
222. Ponpuak, M. et al. Secretory autophagy. *Current opinion in cell biology* 35, (2015).
223. Levine, B. & Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176, (2019).
224. Cadwell, K. & Debnath, J. Beyond self-eating: The control of nonautophagic functions and signaling pathways by autophagy-related proteins. *The Journal of cell biology* 217, (2018).
225. Kimura, T. et al. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *The EMBO journal* 36, (2017).
226. Piletic, K., Alsaleh, G. & Simon, A. Autophagy orchestrates the crosstalk between cells and organs. *EMBO reports* 24, (2023).

227. Jahangiri, B. et al. Exosomes, autophagy and ER stress pathways in human diseases: Cross-regulation and therapeutic approaches. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1868, (2022).
228. Gee, H., Noh, S., Tang, B., Kim, K. & Lee, M. Rescue of $\Delta F508$ -CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146, (2011).
229. Stancu, C. & Sima, A. Statins: mechanism of action and effects. *Journal of cellular and molecular medicine* 5, (2001).
230. Goldstein, J. & Brown, M. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, (1973).
231. Goldstein, J. & Brown, M. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* 161, (2015).
232. Koh, K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovascular research* 47, (2000).
233. Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. & Liao, J. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, (1998).
234. Kuwahara, N. et al. HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *International journal of cardiology* 123, (2008).
235. Dichtl, W. et al. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, (2003).
236. Assmus, B. et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circulation research* 92, (2003).
237. Liu, S. et al. Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Scientific reports* 5, (2015).
238. Belakova, B. et al. Lipophilic Statins Eliminate Senescent Endothelial Cells by inducing Anoikis-Related Cell Death. *Cells* 12, (2023).
239. Efimova, E. et al. HMG-CoA Reductase Inhibition Delays DNA Repair and Promotes Senescence After Tumor Irradiation. *Molecular cancer therapeutics* 17, (2018).

240. Kulshreshtha, A. et al. Simvastatin mediates inhibition of exosome synthesis, localization and secretion via multicomponent interventions. *Scientific reports* 9, (2019).
241. Tamboli, I. et al. Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *The Journal of biological chemistry* 285, (2010).
242. Tamboli, I. Y. et al. Statins Promote the Degradation of Extracellular Amyloid β -Peptide by Microglia via Stimulation of Exosome-associated Insulin-degrading Enzyme (IDE) Secretion. *J Biol Chem* 285, 37405–37414 (2010).
243. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology* Chapter 3, (2006).
244. Linders, A. N. et al. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *NPJ Aging* 10, 9 (2024).
245. Bielak-Zmijewska, A. et al. A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology* 15, 47–64 (2014).
246. Grabowska, W. et al. IQGAP1-dysfunction leads to induction of senescence in human vascular smooth muscle cells. *Mech Ageing Dev* 190, 111295 (2020).
247. Przybylska, D. et al. NOX4 downregulation leads to senescence of human vascular smooth muscle cells. *Oncotarget* 7, 66429–66443 (2016).
248. Storer, M. et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119–1130 (2013).
249. Guo, J. et al. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Signal Transduct Target Ther* 7, 391 (2022).
250. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J* 288, 56–80 (2021).
251. Bulbaniakova, D. et al. Hallmarks and Biomarkers of Skin Senescence: An Updated Review of Skin Senotherapeutics. *Antioxidants (Basel)* 12, 444 (2023).
252. Kim, Y.-M. et al. Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell* 12, 622–634 (2013).
253. Absher, P. M., Absher, R. G. & Barnes, W. D. Genealogies of clones of diploid fibroblasts. Cinemicrophotographic observations of cell division patterns in relation to population age. *Exp Cell Res* 88, 95–104 (1974).

254. Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 128, 1238–1246 (2018).
255. Belhadj, J., Surina, S., Hengstschläger, M. & Lomakin, A. J. Form follows function: Nuclear morphology as a quantifiable predictor of cellular senescence. *Aging Cell* 22, e14012 (2023).
256. Joung, J. et al. Cell enlargement modulated by GATA4 and YAP instructs the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Commun* 16, 1696 (2025).
257. Durik, M., Gonçalves, D. S., Spiegelhalter, C., Messaddeq, N. & Keyes, W. M. Senescent cells deposit intracellular contents through adhesion-dependent fragmentation. 2023.01.11.523642 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.01.11.523642> (2023).
258. Passos, J. F. et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6, 347 (2010).
259. Despres, J. et al. Replicative senescence of human dermal fibroblasts affects structural and functional aspects of the Golgi apparatus. *Exp Dermatol* 28, 922–932 (2019).
260. Matos, L., Gouveia, A. M. & Almeida, H. ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70, 924–935 (2015).
261. Ogrodnik, M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. *Aging Cell* 20, e13338 (2021).
262. Lee, B. Y. et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195 (2006).
263. Tan, J. X. & Finkel, T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep* 24, e57265 (2023).
264. Löbrich, M. et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9, 662–669 (2010).
265. Kleiner, R. E., Verma, P., Molloy, K. R., Chait, B. T. & Kapoor, T. M. Chemical proteomics reveals a γ H2AX-53BP1 interaction in the DNA damage response. *Nat Chem Biol* 11, 807–814 (2015).
266. Hewitt, G. et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* 3, 708 (2012).
267. Fumagalli, M. et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14, 355–365 (2012).

268. Chen, J.-H. & Ozanne, S. E. Deep senescent human fibroblasts show diminished DNA damage foci but retain checkpoint capacity to oxidative stress. *FEBS Lett* 580, 6669–6673 (2006).
269. Shimi, T. et al. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* 25, 2579–2593 (2011).
270. Sofiadis, K. et al. HMGB1 coordinates SASP-related chromatin folding and RNA homeostasis on the path to senescence. *Mol Syst Biol* 17, e9760 (2021).
271. Davalos, A. R. et al. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 201, 613–629 (2013).
272. Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A. & Dulić, V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 2109–2117 (1999).
273. Hernandez-Segura, A. et al. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* 27, 2652-2660.e4 (2017).
274. Scanlan, R.-L. et al. Systematic transcriptomic analysis and temporal modelling of human fibroblast senescence. *Front Aging* 5, 1448543 (2024).
275. Casella, G. et al. Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res* 47, 7294–7305 (2019).
276. Kim, J. Y., Atanassov, I., Dethloff, F., Kroczeck, L. & Langer, T. Time-resolved proteomic analyses of senescence highlight metabolic rewiring of mitochondria. *Life Sci Alliance* 6, e202302127 (2023).
277. Rovira, M. et al. The lysosomal proteome of senescent cells contributes to the senescence secretome. *Aging Cell* 21, e13707 (2022).
278. Deng, Y. et al. Analysis of the senescence-associated cell surfaceome reveals potential senotherapeutic targets. *Aging Cell* 23, e14312 (2024).
279. Payea, M. J. et al. Senescence suppresses the integrated stress response and activates a stress-enhanced secretory phenotype. *bioRxiv* 2023.04.12.536613 (2023) doi:10.1101/2023.04.12.536613.
280. Delfarah, A., Hartel, N. G., Zheng, D., Yang, J. & Graham, N. A. Identification of a Proteomic Signature of Senescence in Primary Human Mammary Epithelial Cells. *J Proteome Res* 20, 5169–5179 (2021).
281. Gardner, S. E., Humphry, M., Bennett, M. R. & Clarke, M. C. H. Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent

- Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1963–1974 (2015).
282. Głuchowska, A. et al. Unbiased proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by senescent human vascular smooth muscle cells reveals their ability to modulate immune cell functions. *Geroscience* 44, 2863–2884 (2022).
283. Uryga, A. K. et al. Telomere damage promotes vascular smooth muscle cell senescence and immune cell recruitment after vessel injury. *Commun Biol* 4, 611 (2021).
284. Li, M. et al. Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect. *Proteomics* 13, 2585–2596 (2013).
285. Wierer, M. et al. Compartment-resolved Proteomic Analysis of Mouse Aorta during Atherosclerotic Plaque Formation Reveals Osteoclast-specific Protein Expression. *Mol Cell Proteomics* 17, 321–334 (2018).
286. Lorentzen, L. G. et al. Proteomic analysis of the extracellular matrix of human atherosclerotic plaques shows marked changes between plaque types. *Matrix Biol Plus* 21, 100141 (2024).
287. Whitehead, M. et al. Vascular smooth muscle cell senescence accelerates medin aggregation via small extracellular vesicle secretion and extracellular matrix reorganization. *Aging Cell* 22, e13746 (2023).
288. Patel, S. K. et al. Exosomes released from senescent cells and circulatory exosomes isolated from human plasma reveal aging-associated proteomic and lipid signatures. *Aging (Albany NY)* 17, 1929–1965 (2025).
289. Basisty, N. et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol* 18, e3000599 (2020).
290. Kaplelach, A. K., Murchison, C. F., Kojima, K., Mobley, J. A. & Arrant, A. E. Increased levels of extracellular matrix proteins associated with extracellular vesicles from brains of aged mice. *Aging Cell* 24, e14359 (2025).
291. Zhang, Y., Jia, X., Wang, Y. & Zheng, Q. Caveolin-1-mediated LDL transcytosis across endothelial cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 402, 119113 (2025).
292. Ramírez, C. M. et al. Caveolin-1 Regulates Atherogenesis by Attenuating Low-Density Lipoprotein Transcytosis and Vascular Inflammation Independently of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation. *Circulation* 140, 225–239 (2019).

293. Zhang, X. et al. Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40, 1510–1522 (2020).
294. Grover, S. P. & Mackman, N. Tissue factor in atherosclerosis and atherothrombosis. *Atherosclerosis* 307, 80–86 (2020).
295. Leidal, A. M. et al. The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles. *Nat Cell Biol* 22, 187–199 (2020).
296. Miranda, A. M. et al. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat Commun* 9, 291 (2018).
297. Hessvik, N. P. et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci* 73, 4717–4737 (2016).
298. Solvik, T. A. et al. Secretory autophagy maintains proteostasis upon lysosome inhibition. *J Cell Biol* 221, e202110151 (2022).
299. Mauthe, M. et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455 (2018).
300. Mauvezin, C., Nagy, P., Juhász, G. & Neufeld, T. P. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun* 6, 7007 (2015).
301. Cashikar, A. G. & Hanson, P. I. A cell-based assay for CD63-containing extracellular vesicles. *PLoS One* 14, e0220007 (2019).
302. Ortega, F. G. et al. Interfering with endolysosomal trafficking enhances release of bioactive exosomes. *Nanomedicine* 20, 102014 (2019).
303. Rezaie-Majd, A. et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1194–1199 (2002).
304. Montecucco, F. et al. Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 48, 233–242 (2009).
305. Liu, S. et al. Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Sci Rep* 5, 17895 (2015).
306. Rossi, C. et al. Simvastatin ameliorates senescence-induced mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 403, 119176 (2025).

307. Kulshreshtha, A. et al. Simvastatin mediates inhibition of exosome synthesis, localization and secretion via multicomponent interventions. *Sci Rep* 9, 16373 (2019).
308. Choe, E.-J. et al. Atorvastatin Enhances the Efficacy of Immune Checkpoint Therapy and Suppresses the Cellular and Extracellular Vesicle PD-L1. *Pharmaceutics* 14, 1660 (2022).
309. Chen, Y. et al. Statins Lower Lipid Synthesis But Promote Secretion of Cholesterol-Enriched Extracellular Vesicles and Particles. *Front Oncol* 12, 853063 (2022).
310. Verbree-Willemsen, L. et al. LDL extracellular vesicle coagulation protein levels change after initiation of statin therapy. Findings from the METEOR trial. *Int J Cardiol* 271, 247–253 (2018).
311. Vartak T, Kumaresan S, Brennan E. Decoding microRNA drivers in atherosclerosis. *Biosci Rep*. 2022 Jul 29;42(7)
312. Aafreen S, Feng J, Wang W, Liu G. Theranostic extracellular vesicles: a concise review of current imaging technologies and labeling strategies. *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids*. 2023 Mar;4(1)

Spis publikacji autorki rozprawy

Czarnecka-Herok J., Sliwinska M. A., Herok M., **Targonska A.**, Strzeszewska-Potyrala A., Bojko A., Wolny A., Mosieniak G., Sikora E. Therapy-Induced Senescent/Polyploid Cancer Cells Undergo Atypical Divisions Associated with Altered Expression of Meiosis, Spermatogenesis and EMT Genes, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022 23(15), 8288. doi.org/10.3390/ijms23158288

Ruzycka-Ayoush M., Nowicka A. M., Kowalczyk A., Gluchowska A., **Targonska A.**, Mosieniak G., Sobczak K., Donten M., Grudzinski I. P., Exosomes derived from lung cancer cells: Isolation, characterization, and stability studies, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023 1:181:106369. doi: 10.1016/j.ejps.2022.106369

Kowalczyk A., Gajda-Walczak A., Ruzycka-Ayoush M., **Targonska A.**, Mosieniak G., Glogowski M., Szumera-Cieckiewicz A., Prochorec-Sobieszek M., Bamburowicz-Klimkowska M., Nowicka A. M., Grudzinski I. P., Parallel SPR and QCM-D Quantitative Analysis of CD9, CD63, and CD81 Tetraspanins: A Simple and Sensitive Way to Determine the Concentration of Extracellular Vesicles Isolated from Human Lung Cancer Cells, *Analytical Chemistry*, 2023, 95, 25, 9520–9530. doi.org/10.1021/acs.analchem.3c00772

Swatler J., **Targonska A.**, Tuross-Korgul L., Mosieniak G., Piwocka K. Protocol for isolation of tumor-derived extracellular vesicles and functional studies on human T cell subsets, *STAR Protocols*, 2024, 5, (2). doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103011

Ruzycka-Ayoush M., Prochorec-Sobieszek M., Cieszanowski A., Glogowski M., Szumera-Cieckiewicz A., Podgorska J., **Targonska A.**, Sobczak K., Mosieniak G., Grudzinski I. P. Extracellular Vesicles as Next-Generation Biomarkers in Lung Cancer Patients: A Case Report on Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma, *Life*, 2024, 14(3), 408; doi.org/10.3390/life14030408

Mosieniak G., Gluchowska A., **Targońska A.**, Starzenie komórkowe - 60 lat od odkrycia Hayflick'a, *Kosmos*. 2024, 72 (4), 409-424; doi.org/10.36921/kos.2023_2982

Krzystyniak A., Gluchowska A., Pytyś A., Dudkowska M., Wojtowicz T., **Targonska A.**, Janiszewska D., Sikora E., Mosieniak G. 2-Bromopalmitate treatment attenuates senescence phenotype in human adult cells - possible role of palmitoylation, *Aging*, 2024, 23;16(16):11796-11808. doi: 10.18632/aging.206080

Bamburowicz-Klimkowska M., Ruzycka-Ayoush M., **Targonska A.**, Stawarska A., Grudzinski I. P. Loading of Enzymatic Cargos into Extracellular Vesicles Derived from Lung Cancer Cells, *The International Journal of Nanomedicine*, 2025 Aug 15;20:9931-9944. doi: 10.2147/IJN.S528193

Kasarla S., Staniak K., Surman M., Zajęzkowski K., **Targońska A.**, Mosieniak G., Bobecka-Wesołowska K., Uskoba J., Przybyło M., Kobiela T., Multimodal Nanobiophysical Profiling of Melanoma-Derived Small Extracellular Vesicles Reveals Glycan Signatures Associated with Tumor Progression, *Nanotechnology, Science and Applications*, 2025, 18:499-514. doi: 10.2147/NSA.S547649