

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, określaną terminem *Senescence Associated Secretary 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.