

PAULINA TROJAN, MARCELINA JANIK, MAŁGORZATA PRZYBYŁO

*Zakład Biochemii Glikokoniugatów
Instytut Zoologii
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: malgorzata.przybylo@uj.edu.pl*

ŚRÓDBŁONEK – NIEDOCENIANY ORGAN. 1. BUDOWA I ROLA W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH

WSTĘP

Pierwsze obserwacje śródbłonka prowadzone były już w starożytności. Wtedy to Galen i Hipokrates definiowali układ naczyniowy jako system złożony z dwóch niepołączonych elementów, jakim były ich zdaniem żyły i tętnice. Teoria ta obalona została w 1628 r. przez Williama Harvey'a, który poprzez liczne badania prowadzone nad fizjologią psów wykazał, że system krwionośny to zamknięty układ połączonych ze sobą żył i tętnic. Pierwsze mikroskopowe obserwacje śródbłonka przeprowadził Marcello Malpighi (AIRD 2007). Z kolei słowo śródbłonek (ang. endothelium) po raz pierwszy pojawiło się w literaturze w 1865 r., kiedy to embriolog Wilhelm His opisał prowadzone przez siebie badania nad naczyniami krwionośnymi. Przedstawił on wówczas śródbłonek jako warstwę komórek wyściełającą światło naczyń, a także innych organów ciała, które w przeciwieństwie do nabłonków są pochodzenia mezodermalnego. Kolejne badania wykazały jednak, że śródbłonek występuje tylko jako wyściółka naczyń krwionośnych i limfatycznych (MAS 2009).

Śródbłonek jest aktywnym metabolicznie elementem układu naczyń, którego zadaniem jest utrzymanie prawidłowego przepływu płynów oraz udział w wielu procesach fizjologicznych. Ponadto zapewnia on integralność ścian naczyń, chroniąc

przed przypadkowym przedostawaniem się przez nie składników morfotycznych krwi (CHAPPEY i współaut. 1995). Śródbłonek naczyniowy jest zaangażowany w szereg biochemicznych i biomechanicznych sygnałów oraz odpowiedzi, które mają miejsce pomiędzy elementami morfotycznymi krwi oraz krwią a ścianą naczyń (MAS 2009).

Wielu badaczy traktuje śródbłonek jako integralny narząd w organizmie człowieka ze względu na jego udział w wielu procesach fizjologicznych, liczbę komórek, jego masę oraz zajmowaną powierzchnię. Ponadto, poprzez wydzielanie szeregu związków o wielostronnym działaniu biologicznym, uważa się go za największy gruczoł endokrynnny. Ważnym zagadnieniem jest także ekspresja cząsteczek adhezyjnych na ludzkim śródbłonku (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Cząsteczki te są niezbędne w procesie transmigracji leukocytów do miejsc, w których rozpoczął się stan zapalny. Dzięki tym molekułom adhezyjnym jest również możliwa swobodna migracja komórek nowotworowych, jaka ma miejsce w trakcie procesu tworzenia przerzutów (STRELL i ENTSCHLADEN 2008). Śródbłonek jest zatem obiektem zainteresowania badaczy przede wszystkim ze względu na jego, w dużej mierze niewykorzystany, potencjał diagnostyczny i terapeutyczny (AIRD 2007).

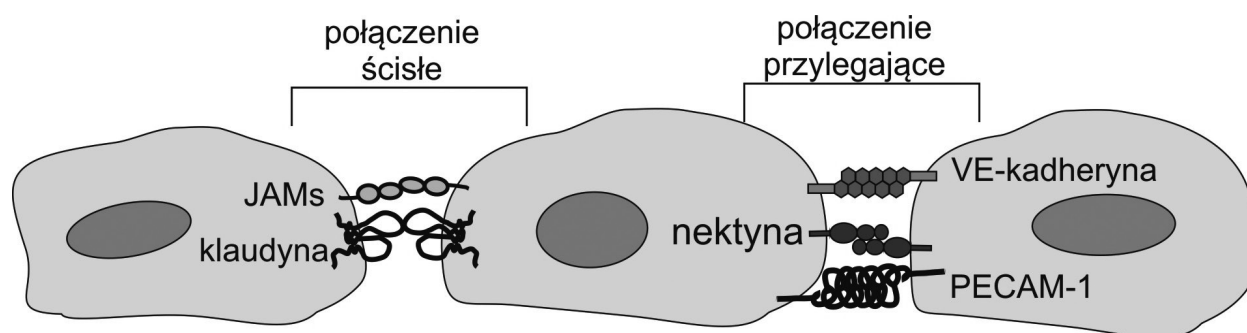
BUDOWA ŚRÓDBŁONKA

Śródbłonek wyściela wnętrze naczyń krwionośnych oraz limfatycznych. Stanowi półprzepuszczalną barierę pomiędzy krwią a mięśniami gładkimi naczyń poszczególnych narządów (AIRD 2007). Złożony jest z pojedynczej warstwy płaskich komórek, które zalicza się do nabłonków wyspecjalizowanych (WALSKI i FRONTCZAK-BANIEWICZ 2007). Śródbłonek powstaje w trakcie rozwoju embrionalnego, z mezodermy poprzez różnicowanie się hemangioblastów w kierunku angioblastów (AIRD 2007). Pojedyncza komórka śródbłonka (ang. endothelial cell, EC) o wymiarach około $10 \times 30 \mu\text{m}$ oraz grubości cytoplazmy $0,2 \mu\text{m}$ jest słabo widoczna w standardowych barwieniach histologicznych (LIPSKI i współaut. 2006). Wyraźnie obserwuje się jedynie jądro tej komórki, które wraz z cytoplazmą ma grubość $0,3 \mu\text{m}$ (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Wygląd ECs jest różny w zależności od miejsca lokalizacji w sieci naczyniowej. Zazwyczaj komórki te są płaskie (AIRD 2007). W tętnicach i tętniczkach komórki śródbłonka przybierają kształt wrzecionowaty i zorientowane są zgodnie z kierunkiem przepływu krwi. Kształt ten wywołany jest występującym w naczyniu napięciem ścinającym (ang. shear stress) i może się zmieniać w zależności od działania tych sił. Natomiast w naczyniach włosowatych i żyłkach ECs są bardziej zaokrąglonego kształtu (MAS 2009).

Zszacuje się, że w organizmie dorosłego człowieka występuje około 1×10^{12} komórek śródbłonka o łącznej masie 1–2 kg (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007), które zajmują obszar

700–2000 m^2 . Uważa się, że w ramach tej powierzchni funkcjonalny śródbłonek zajmuje jedynie około 300 m^2 (MAS 2009). Komórki śródbłonka położone są na błonie podstawnej, którą tworzy macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix, ECM) bogata w kolagen typu IV i typu V, fibronektynę oraz lamininę (WALSKI i FRONTCZAK-BANIEWICZ 2007). Silne przyleganie śródbłonka do błony podstawnej jest możliwe dzięki licznym receptorom integrynowym, które wiążą go do białek ECM, a zlokalizowane są w części podstawno-bocznej jego komórek (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Powierzchnia komórek śródbłonka skierowana do światła naczynia tworzy gładką warstwę, na której tworzone są z błony plazmatycznej nieliczne mikrokosmki. Mikrokosmki te ograniczają miejsca występowania połączeń międzykomórkowych (WALSKI i FRONTCZAK-BANIEWICZ 2007).

Poszczególne komórki śródbłonka połączone są ze sobą za pomocą połączeń międzykomórkowych (Ryc. 1). Częsteczki odpowiedzialne za oddziaływanie międzykomórkowe, zarówno homotypowe, jak i heterotypowe znajdują się w części bocznej komórek śródbłonka. Zalicza się do nich przede wszystkim konstitutywne, jak i indukowane cząsteczki adhezyjne: E-selektynę (CD62E), P-selektynę (CD62P), a także adresyny immunoglobulinopodobne: cząsteczkę międzykomórkowej adhezji-1 (ang. intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1, CD54), cząsteczkę międzykomórkowej adhezji-2 (ang. intercellular adhesion molecule-2, ICAM-2, CD102), cząsteczkę adhezji komórkowej płytek i śródbłonka-1



Ryc. 1. Rodzaje połączeń międzykomórkowych śródbłonka.

Komórki śródbłonka kontaktują się ze sobą poprzez dwa typy połączeń: ściste i przylegające. W utworzenie połączenia ścistego zaangażowane są białka JAM i klaudyny. Natomiast połączenia przylegające tworzą oddziałujące homotypowo VE-kadheryny, nektyny i PECAM-1.

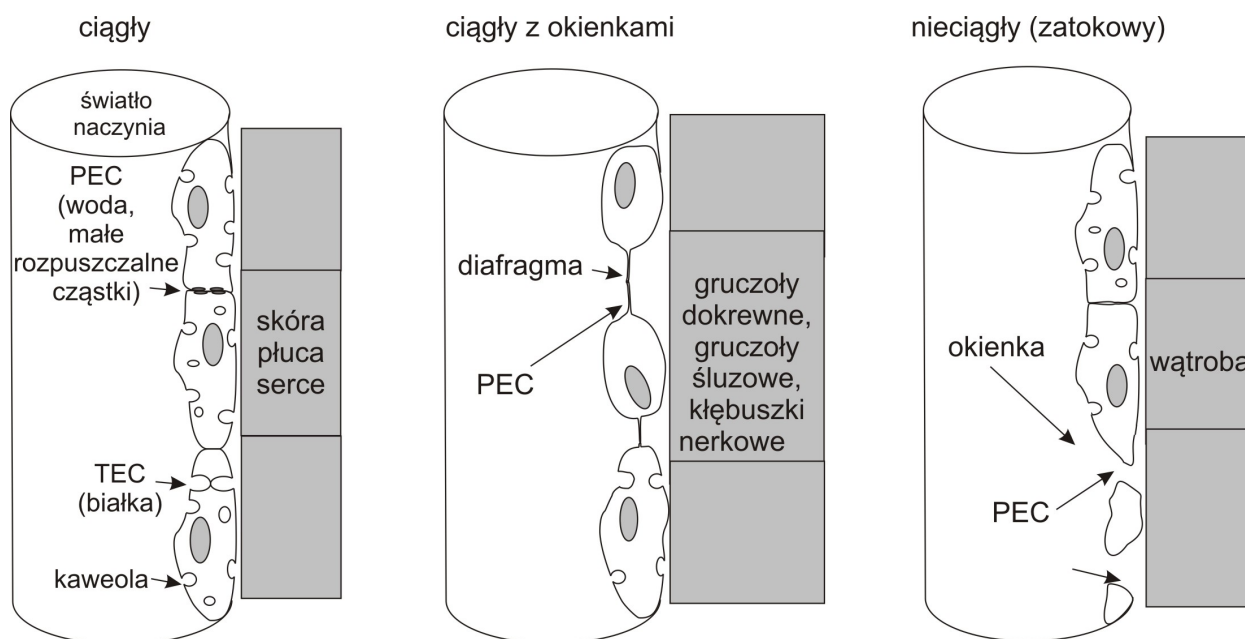
(ang. platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, CD31) oraz cząsteczkę adhezji komórkowej naczyń-1 (ang. vascular cell adhesion molecule, VCAM-1, CD106). Cząsteczki te biorą również udział w toczeniu się, aktywacji, adhezji, a także diapedezie neutrofili w trakcie trwania odczynu zapalnego (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Rolą połączeń międzykomórkowych w śródbłonku, a szczególnie połączeń białkowych, jest regulacja transportu substancji poprzez ścianę naczynia (WALSKI i FRONTCZAK-BANIEWICZ 2007).

Do połączeń międzykomórkowych w śródbłonku zalicza się: połączenia przylegające (ang. adherens junction), połączenia ścisłe-zamykające (ang. tight junction) oraz połączenia szczelinowe (ang. gap junction). Połączenia te występują naprzemiennie, tworząc charakterystyczny układ złożony kolejno z połączeń ścisłych, przylegających oraz szczelinowych, występujących od wierzchołka ku podstawie komórki śródbłonka (FUKUHRA i współaut. 2006). Połączenia przylegające są formowane przez transbłonowe białka zwane VE-kadherynami (MAS 2009), które łączą komórki bez zachowania ścisłego połączenia. Kadheryny te wykazują heterogenność gatunkową. Obok VE-kadheryny w skład połączeń przylegających wchodzi ponadto nektyna-2 i PECAM-1 (FUKUHRA i współaut. 2006). Z kolei połączenia ścisłe, szczególnie charakterystyczne dla naczyń krwionośnych mózgowia ssaków, gdzie tworzą barierę naczyniowo-mózgową, tworzone są przez białka zwane okludynami. Okludyny, łącząc się z aktynowymi włóknami cytoszkieletu błony podstawnej, na której leży śródbłonek, zamykają strefę międzykomórkową ograniczając tym samym transport substancji (WALSKI i FRONTCZAK-BANIEWICZ 2007). Oprócz okludyn w skład połączeń ścisłych wchodzi także białka z rodziny kładyn, łączące cząsteczki adhezyjne (ang. junctional adhesion molecule, JAMs), selektywne cząsteczki adhezyjne komórek śródbłonka (ang. endothelial cell-selective adhesion molecule, ESAM) i nektyny, które również kontrolują przepuszczalność naczyniową. ESAM ulegają ekspresji w różnych typach naczyń krwionośnych, w szczególności w naczyniach włosowatych mózgu oraz mięśni (VESTWEBER 2002, FUKUHRA i współaut. 2006). Połączenia ścisłe pomagają utrzymać stan polaryzacji komórek oraz tworzą barierę dla parakomórkowego transportu substancji (AIRD 2007). Natomiast połączenia szczelinowe tworzone są przez skupiska transbłonowych kanałów, które łączą

cytoplazmy sąsiednich komórek. Kanały te, zwane koneksonami, zbudowane są z sześciu transbłonowych białek z rodziny koneksyn (Cx). W ludzkim śródbłonku zidentyfikowano 3 białka: Cx37, Cx40, Cx43, które różnią się wzorem ekspresji w różnych naczyniach. Połączenia szczelinowe występują pomiędzy komórkami śródbłonka zlokalizowanymi w całym układzie naczyniowym, a także pomiędzy ECs a komórkami mięśni gładkich otaczających naczynia oporowe. Dzięki tym połączeniom możliwy jest międzykomórkowy transfer jonów oraz małych cząsteczek, co pozwala na szybką koordynację funkcji komórek (MAS 2009).

Wymienione powyżej połączenia odpowiadają nie tylko za utrzymanie integralności śródbłonka, ale także uczestniczą w regulacji przepływu sygnałów generowanych w przebiegu wielu ważnych procesach biologicznych, takich jak apoptoza czy proliferacja. Połączenia te są nierównomiernie rozmieszczone w sieci naczyniowej, w przypadku tętnic są upakowane ciaśniej niż w przypadku żył. Natomiast w mikrokrażeniu charakteryzują się różnorodnym wzorem i w zależności od organu, w jakim występują dzielimy je na ciągłe, ciągłe okienkowe (ang. fenestrated) i nieciągłe (zatokowe) (Ryc. 2) (MAS 2009).

Komórki śródbłonka pokryte są warstwą glikokaliksu o grubości 50-100 nm, która zlokalizowana jest od wewnętrznej strony światła naczynia (MAS 2009). Glikokaliks zbudowany jest głównie z glikozaminoglikanów, wśród których dominuje siarczan heparanu posiadający liczne grupy siarczanowe. Obecność grup siarczanowych nadaje ścianie naczynia ujemny ładunek elektrostatyczny, co ma za zadanie zapobiec przypadkowemu przechodzeniu cząsteczek występujących w płynach ustrojowych przez warstwę śródbłonka. Dzięki temu następuje odpychanie ujemnie naładowanych molekuł krążących we krwi. Ponadto, glikokaliks bierze udział w transporcie cząsteczek przez śródbłonek, a także chroni komórki śródbłonka przed działaniem rodników tlenowych. Oprócz tego zaangażowany jest w procesy immunologiczne (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). W skład glikokaliksu wchodzi poza glikozaminoglikanami również glikoproteiny, zawierające krótkie i rozgałęzione łańcuchy węglowodanowe oraz proteoglikany posiadające długie i nierozgałęzione łańcuchy cukrowe (MAS 2009). Elementy glikokaliksu występującego na śródbłonku łączą się z lipidami i białkami błony komórkowej EC za pomocą ich trans-



Ryc. 2. Rodzaje śródbłónka i jego przepuszczalność.

Śródbłonek ciągły to najbardziej zwarta forma organizacji komórek śródbłónka, a co za tym idzie o najmniej przepuszczalności dla wody i innych cząsteczek, jakkolwiek cząsteczki te mogą przemieszczać się zarówno drogą para-, jak i transkomórkową, tak jak w pozostałych typach śródbłónka. Znacznie większy stopień filtracji i transportu jest obserwowany w śródbłónku ciągłym o ścianie okienkowej, którego komórki są rozluźnione a pomiędzy nimi znajdują się miejsca oddzielające światło naczynia od otaczającej tkanki jedynie warstwą diafragmy. Największa przepuszczalność charakteryzuje śródbłonek nieciągły (zatokowy), w strukturze którego pomiędzy rozsuniętymi komórkami tworzą się luki, przez które swobodnie przedostaje się woda i mniejsze cząsteczki. PEC – droga parakomórkowa, TEC – droga transkomórkowa.

blonowej domeny białkowej. W wyniku tego struktura glikokaliksu jest bogata w białkowe receptory powierzchniowe, enzymy i związki o właściwościach aktywujących (WALSKI i FRONTZAK-BANIEWICZ 2007). Składniki glikokaliksu mogą łączyć się także z wieloma białkami występującymi w praktycznie unieruchomionym osoczu, tworząc warstwę zwaną powierzchnią warstwą śródbłónka (ang. endothelial surface layer, ESL) o grubości 1 μm . Zarówno ESL, jak i warstwa glikokaliksu tworzą obszar na śródbłónku odpowiedzialny za przekazywanie biochemicznych i biomechanicznych sygnałów inicjowanych przez krew płynącą do ECs (MAS 2009).

Komórki śródbłónka charakteryzują się dużą aktywnością metaboliczną (AIRD 2007). Mimo że posiadają mitochondria, to energię potrzebną do prawidłowego funkcjonowania czerpią z beztlenowego procesu glikolizy (MAS 2009). ECs zawierają liczne pęcherzyki pinocytarne, a także białka transportowe (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Wydzielają wiele czynników aktywujących, które stymu-

lują nieaktywne czynniki natury ogólnoustrojowej. Charakterystyczne dla ECs struktury, to ciała Weible-Palade'a (ang. Weible-Palade bodies, WPBs), zlokalizowane w cytoplazmie, które dobrze widoczne są w mikroskopii elektronowej. Ich liczba zwiększa się na skutek uszkodzenia śródbłónka. WPBs zawierają glikoproteinę prokoagulacyjną, która jest nośnikiem czynnika VIII von Willebranda (WALSKI i FRONTZAK-BANIEWICZ 2007). Czynnikiem ten, znajdujący się również w osoczu, megakariocytach oraz płytkach krwi, umożliwia przyleganie płytek do śródbłónka naczyniowego oraz ich agregację w miejscu uszkodzenia (SWOBODA i KAJDANIUK 2009). W ciałkach WPBs zawarta jest także selektyna P, która jest uwalniana w odpowiedzi na pobudzenie śródbłónka (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Egzocytozę ciałek WPBs uważa się za pierwszą naczyniową odpowiedź na uszkodzenie (MAS 2009).

Komórki śródbłónka zawierają w swej błonie komórkowej liczne enzymy uczestniczące m.in. w procesie krzepnięcia krwi. Po-

nadto, tak jak i w innych typach komórek, także na ich powierzchni obecne są liczne kaweole – pęcherzykowate wpuklenia błony komórkowej, posiadające dodatkowe wzmocnienia błony ze względu na dużą zawartość cholesterolu. Co charakterystyczne, komórki śródbłónka cechują się widocznym aparatem Golgiego, świadczącym o ich dużej aktywności wydzielniczej (MAS 2009). W swej strukturze zawierają liczne lizosomy, dzięki czemu mogą uczestniczyć w endocytozie cząsteczek. W ich obrazie morfologicznym obecna jest także rozległa siateczka śródplazmatyczna (AIRD 2007).

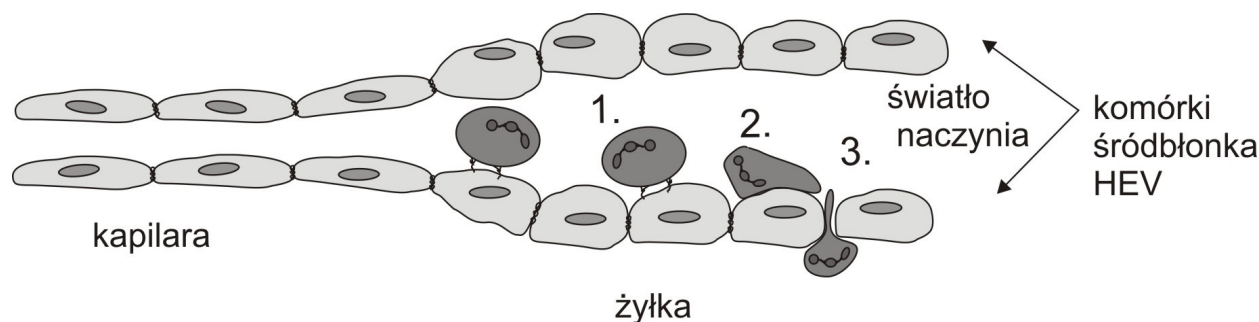
Komórki śródbłónka wykazują niezwykle niejednorodność struktury i funkcji (AIRD 2007). Różnorodność ta wynika głównie z roli, jaką pełnią w organizmie, ich lokalizacji, a także z odrębności antygenowej (STRELL i ENTSCHLADEN 2008). Z badań na poziomie ultrastrukturalnym wiadomo, że komórki śródbłónka charakteryzują się specyfiką gatunkową, osobniczą, a także narządową. Ponadto, na ich powierzchni znajdują się różnorakie antygeny oraz cząsteczki adhezyjne. Oprócz tego mogą one odmiennie reagować na po-

budzenie przez czynniki wzrostowe (WALSKI i FRONTZAK-BANIEWICZ 2007). W zależności od miejsca występowania w organizmie wyróżnia się trzy typy śródbłónka (Ryc. 2) począwszy od ciągłej monowarstwy (w naczyniach skóry, płuc, serca, mózgu), poprzez ciągłą monowarstwę z okienkami (w naczyniach gruczołów endokrynnych, błony śluzowej jelit i żołądka), aż do typu nieciągłego zwanego także zatokowym (w naczyniach wątroby) (STRELL i ENTSCHLADEN 2008). Wstępowanie typu śródbłónka ciągłego z okienkami charakteryzuje ponadto miejsca, w których następuje zwiększona filtracja lub transport przez barierę śródbłónka (AIRD 2007). Przykładem jest krążenie płucne, które różni się zasadniczo od krążenia ogólnoustrojowego. Wynaczynienie leukocytów w płucach ma miejsce w mikrokrażeniu, natomiast w przypadku krążenia ogólnego odbywa się ono w żyłkach kapilarnych. Co warto zaznaczyć, liczba leukocytów w naczyniach krwionośnych płuc jest od 35–100 razy większa niż w pozostałych naczyniach organizmu (STRELL i ENTSCHLADEN 2008).

ŚRÓDBŁONEK WYSOKI

Jak już wcześniej wspomniano, śródbłonek wyściela zarówno naczynia krwionośne, jak i limfatyczne. Dla komórek krwi, przejście poza przedział naczyniowy jest utrudnione ze względu na wielowarstwową budowę naczyń, jednakże migracja leukocytów jest

możliwa i odbywa się w specjalnych naczyniach wyścielanych tzw. wysokim śródbłonkiem (ang. high endothelial venules, HEV) (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Komórki śródbłónka HEV są bardziej kuboidalnego kształtu niż pozostałe, które są zazwyczaj płą-



Ryc. 3. Migracja leukocytów przez śródbłonek HEV.

Śródbłonek HEV wyściela naczynia limfatyczne w organach limfatycznych i węzłach chłonnych, i umożliwia nieprzerwaną migrację limfocytów, w celu infiltracji przez nie węzłów chłonnych. Ponieważ w naczyniach limfatycznych limfocyty przemieszczają się tocząc się po powierzchni HEV ich migracja przebiega w trzech etapach: toczenia, aktywacji i adhezji zakończonej transmigracją. Komórki HEV prezentują na swej powierzchni białka adhezyjne wyróżniające je pośród innych śródbłonek np. PNA_d – adresynę regionalnych węzłów chłonnych (z ang. peripheral node addressin), które zapewniają właściwy przebieg tych procesów.

skie (AIRD 2007). Śródbłonek HEV występuje przede wszystkim w żyłkach pozawłosowatych narządów Nielimfatycznych oraz naczyń obwodowych narządów limfatycznych, do których zaliczmy m.in. węzły chłonne, kępki Peyera czy migdałki (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). W przeciwieństwie do normalnych żyłek, gdzie migracja leukocytów odbywa się tylko pod wpływem stanów zapalnych, transmigracja przez HEV umożliwia stałą cyrkulację leukocytów pomiędzy krwią

a narządami limfatycznymi (STRELL i ENT-SCHLADEN 2008).

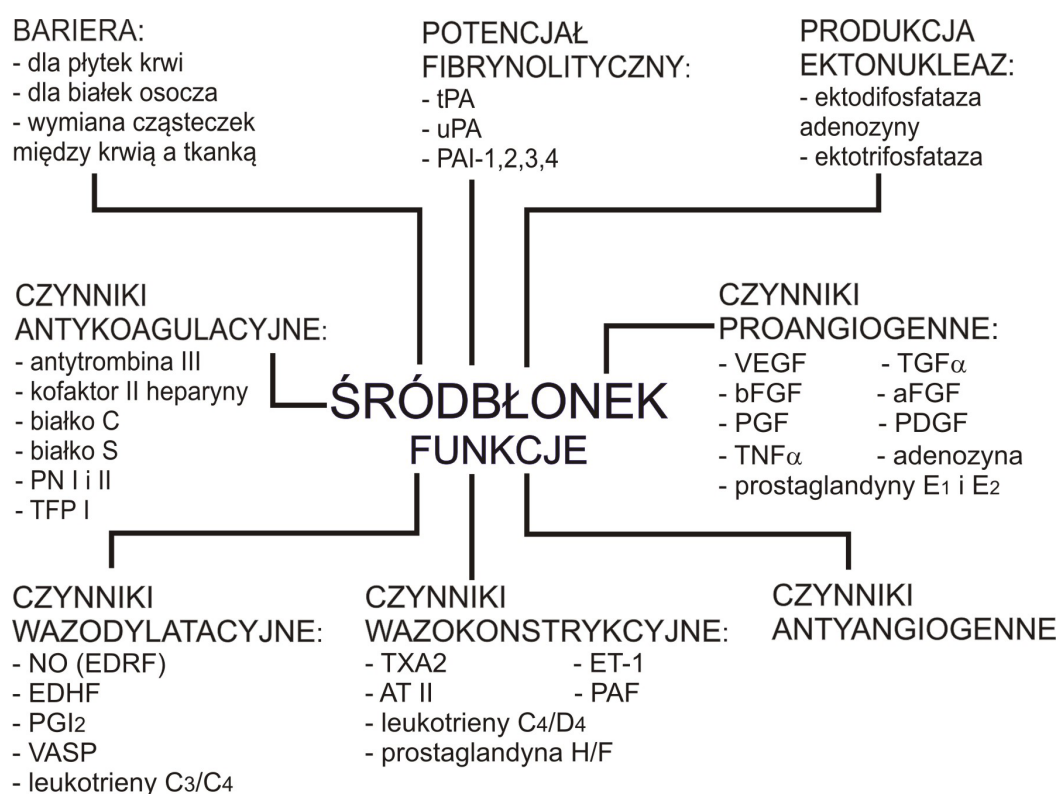
W migracji leukocytów przez śródbłonek HEV można wyróżnić 3 etapy: toczenia, aktywacji i ścisłej adhezji (Ryc. 3). Szczególną rolę w tym procesie pełni adresyna błon śluzowych (ang. mucosal adressin cell adhesion molecule, MAdCAM), zlokalizowana na śródbłonku HEV (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007) i wchodząca w interakcje z integryną $\alpha_4\beta_7$.

ROLA ŚRÓDBŁONKA W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH

Śródbłonek naczyń krwionośnych odgrywa istotną rolę w utrzymaniu hemostazy naczynia krwionośnego, warunkując tym samym prawidłowy przepływ krwi w układzie krwionośnym. Jest to efektem syntetyzowania i wydzielania przez jego komórki całego spektrum czynników utrzymujących ten pożądaný stan równowagi (Ryc. 4). Poprzez syntezę i uwalnianie czynników antykoagulacyjnych, które w warunkach fizjologicznych przeważają nad czynnikami prokoagulacyjnymi, śródbłonek zapobiega nadmiernej krzepliwości krwi, natomiast w momencie jego uszkodzenia uczestniczy za-

równo w tworzeniu skrzepu, jak i fibrynolizie (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

W warunkach fizjologicznych śródbłonek pozostaje nieaktywowany, a znajdujące się na jego powierzchni receptory są niedostępne dla cząsteczek znajdujących się we krwi, w szczególności dla leukocytów i płytek krwi (ULBRICH i współaut. 2003). Ponadto, aby zapobiec aktywacji neutrofili, makrofagów i płytek krwi, śródbłonek produkuje tlenek azotu (NO) oraz prostacyklinę (PGI_2), które dodatkowo rozszerzają światło naczynia krwionośnego.



Ryc. 4. Funkcje pełnione przez śródbłonek.

CZYNNIKI ANTYKOAGULACYJNE

Śródbłonek wydziela liczne czynniki antykoagulacyjne, z których najistotniejszym jest antytrombina III (ATIII). Jest to glikoproteina, której zadanie polega na hamowaniu aktywnych czynników krzepnięcia krwi, w szczególności czynnika II (trombiny), IXa, Xa, XIa, XIIa, plazminy oraz kalikreniny. Jej działanie, prowadzące do inaktywacji enzymów, jest wspomagane poprzez znajdujące się na powierzchni śródbłonka glikozamoglikany, posiadające w swej strukturze grupy heparynowe, gdyż zawarta w nich heparyna jest kofaktorem dla antytrombiny (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Wśród czynników antykoagulacyjnych wydzielanych przez śródbłonek znajdują się także: kofaktor II heparyny, białka S i C oraz proteazowe neksyny I i II (PN-I, PN-II). Czynniki te uczestniczą w kaskadzie krzepnięcia krwi. Kofaktor II heparyny jest przede wszystkim zaangażowany w inaktywację trombiny, ale także czynnika Xa. Obecności trombiny wywołuje aktywację białka C, a kofaktorem tego procesu jest trombomodulina. Aktywna forma białka C jest natomiast zdolna do proteolizy, a tym samym do inaktywacji czynników Va i VIIIa, ale tylko w obecności kofaktora, jakim jest białko S. Z kolei białko S bierze również udział w niezależnej od komórek prezentujących antygen (ang.

antigen presenting cells, APC) aktywacji protrombiny przez czynniki Va i Xa (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Innym czynnikiem wydzielanym przez komórki śródbłonka, zaangażowanym w kaskadę krzepnięcia krwi, jest inhibitor zewnątrzopochodnego toru aktywacji krzepnięcia (ang. tissue factor pathway inhibitor, TFPI). TFPI to białko ulegające ekspresji głównie na komórkach śródbłonka, natomiast w mniejszym stopniu na aktywnych płytkach krwi. Ma on zdolność łączenia się z lipoproteinami osocza krwi, a odpowiedzialny jest przede wszystkim za inhibicję czynnika Xa (SWOBODA i KAJDANIUK 2009). TFPI znajdujący się na trombocytach bierze udział w regulacji aktywności czynnika tkankowego (ang. tissue factor, TF), wydzielanego do krwi z pobudzonych komórek śródbłonka i leukocytów. Dodatkowo TFPI uczestniczy w hamowaniu tworzenia kompleksu czynnika tkankowego z czynnikiem VII (TF-fVIIa). Transport TF do skrzepu odbywa się w mikropęcherzykach i jest on niezbędnym warunkiem przebiegu prawidłowego procesu naprawy uszkodzonego śródbłonka. Jeśli proces ten nie jest odpowiednio regulowany, to może doprowadzić do powstania zakrzepicy naczyń (KOTSCHY i współaut. 2010).

POTENCJAŁ FIBRYNOLITYCZNY

Kolejna grupa czynników wydzielanych przez śródbłonek to czynniki odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowego potencjału fibrynolitycznego (SWOBODA i KAJDANIUK 2009). Są to przede wszystkim aktywatory plazminogenu, które w obecności fibryny przekształcają plazminogen w aktywną plazminę (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Jednym z takich czynników jest tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator, tPA), który uznawany jest za marker pobudzenia oraz uszkodzenia śródbłonka (SWOBODA i KAJDANIUK 2009). tPA wydzielany nieprzerwanie przez śródbłonek ma zdolność łączenia się z aneksyną II, również występującą na śródbłonku, dzięki czemu aktywacja plazminogenu może zachodzić nawet przy braku fibryny (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). tPA występuje w dużych ilościach w tarczycy, która jest najbardziej ukrwionym

narządem (SWOBODA i KAJDANIUK 2009). Śródbłonek wydziela także urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. urokinase plasminogen activator, uPA), ale w mniejszej ilości niż tPA. Innym czynnikiem uczestniczącym w powstawaniu plazminy są proteazy serynowe. Aby zapewnić odpowiednią równowagę w procesie fibrynolizy, oprócz aktywatorów plazminogenu wydzielane są także inhibitory fibrynolizy. W stanach fizjologicznych ilość aktywatorów plazminogenu dominuje nad inhibitorami fibrynolizy. Znanymi inhibitorami tPA i uPA są inhibitory aktywatora plazminogenu (ang. plasminogen activator inhibitor, PAI), wśród których wyróżnia się PAI-1, PAI-2, PAI-3 i PAI-4 zwany także proteazową neksyną I. Największe znaczenie w inhibicji tPA, uPA oraz trombiny ma PAI-1 (KOŁODZIEJCZYK i WACHOWICZ 2009).

EKTONUKLEAZY

Komórki śródbłónka wydzielają także ektonukleazy, które odpowiadają za degradację adenozynodifosforanu (ADP) i adenozynotrifosforanu (ATP), w wyniku czego powstają inozyny i adenozyne, działające inaktywująco

na czynniki pobudzające płytki krwi. Do ektonukleaz zalicza się przede wszystkim ektodifosfatazę adenozyne oraz ektotrifosfatazę (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

CZYNNIKI WAZODYLATACYJNE I WAZOKONSTRYKCYJNE

Śródbłonek, jak to już zostało wspomniane, odgrywa ważną rolę w procesie regulacji przepływu krwi oraz utrzymaniu prawidłowego napięcia ściany naczynia. Jest to możliwe dzięki wydzielanym przez niego czynnikom wazodylatacyjnym i wazokonstrykcyjnym, które uwalniane są w odpowiedzi na bodźce chemiczne i biomechaniczne (CELIŃSKI 2010). Substancje te są wytwarzane przez prawidłowy śródbłonek w bardzo małych ilościach. Czynniki wazodylatacyjne powodują rozkurcz mięśni gładkich naczyń, co prowadzi do rozszerzenia światła naczynia krwionośnego, a co za tym idzie spowolnienia przepływu krwi. Czynniki wazokonstrykcyjne odpowiedzialne są za skurcz mięśni gładkich naczyń (ang. vascular smooth muscle cells, VSMCs), co powoduje zwężenie światła naczynia (MAS 2009). Do bodźców chemicznych stymulujących śródbłonek do uwalniania czynników wazodylatacyjnych zaliczamy acetylocholinę, bradykininę, ADP, cytokiny (endotoksynę, interleukinę 1b, czynnik martwicy nowotworów α (ang. tumor necrosis factor- α , TNF- α)), insulinę, substancję P, hormony np. estrogeny, natomiast bodźcem biomechanicznym są przede wszystkim siły ściskania wywołane przepływem komórek krwi (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Badania przeprowadzone w 1980 r. przez badaczy Furchgotta i Zawadzkiego pozwoliły na zidentyfikowanie głównego związku biorącego udział w relaksacji mięśniówki naczyniowej. Czynnikiem ten nazwano wówczas śródbłonkowym czynnikiem rozluźniającym (ang. endothelial derived relaxing factor, EDRF) (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Kolejne badania dowiodły, że EDRF to tlenek azotu (NO) (JANUSZEWICZ i SZNAJDERMAN 2000). NO syntetyzowany jest w komórkach śródbłónka przy udziale enzymu, syntazy tlenku azotu (ang. nitric oxide synthase, NOS). W zależności od miejsca jej lokalizacji wyróżnia się trzy izoformy syntazy tlenku azotu: eNOS (śródbłonkowa), nNOS (neuronalna) i iNOS (indukowaną

badź zapalną). Enzym ten katalizuje oksydację N-końcowej guaniny aminokwasu L-argininy (HAEFLIGER i współaut. 2001), co prowadzi do syntezy NO i L-cytruliny. Do aktywności katalitycznej wymaga obecności tlenu molekularnego i L-argininy, jako substratów oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego i kalmoduliny, jako kofaktorów. Konstytutywna forma eNOS stale występuje w komórkach śródbłónka, a jej poziom może być regulowany przez różne czynniki. Natomiast forma indukowana pojawia się pod wpływem różnych czynników działających na naczynia. U ludzi eNOS występuje również w kardiomiocytach, leukocytach, tkance nabłonkowej oraz w niektórych komórkach nerwowych i endokrynnych (MAS 2009). Tlenek azotu odgrywa główną rolę w regulacji napięcia ściany naczyń krwionośnych i jest najsilniej działającym czynnikiem wazodylatacyjnym. Dzięki swoim lipofilnym właściwościom ma zdolność przenikania do komórek mięśniówki naczyń, gdzie poprzez aktywację cyklazy guanylowej przyczynia się do relaksacji naczynia krwionośnego. NO jest związkiem nietrwałym, stosunkowo szybko wychwytywanym i wiązany przez hemoglobinę, dlatego do utrzymania stanu wazodylatacji konieczne jest ciągle wydzielanie tego czynnika przez komórki śródbłónka (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Dominujący wpływ NO na regulację miejscowego przepływu krwi obserwuje się w dużych tętnicach (MAS 2009). NO wpływa też na obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych oraz jest zaangażowany w procesy prowadzące do zahamowania ekspresji białek adhezyjnych. Posiada również właściwości antyoksydacyjne, gdyż przyczynia się do zmniejszenia ilości utlenianych lipoprotein o małej gęstości (ang. low density lipoprotein, LDL). Co więcej, poprzez swoje działanie parakrynnie wpływa hamująco na agregację i adhezję płytek krwi do śródbłónka naczyniowego. Ma także zdolność hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Poza tlenkiem azotu śródbłonek wydzielają działającą synergistycznie z NO prostacyklinę PGI_2 . PGI_2 , tak jak inne prostaglandyny syntetyzowana jest z kwasu arachidonowego na drodze wieloetapowego procesu. W pierwszych etapach, dzięki aktywności cyklooksygenazy, syntetyzowana jest prostaglandyna H_2 (PGH_2), która następnie zostaje przekształcona do PGI_2 przy udziale syntazy prostacykliny (MAS 2009). PGI_2 zaliczana do eikozanoidów, wydzielana jest w odpowiedzi na czynniki, takie jak: hipoksja, siły ścierania, obecność acetylocholiny czy serotoniny. PGI_2 bierze udział w relaksacji mięśniówki naczyniowej, prowadząc do jej skurczu poprzez aktywację kanałów potasowych oraz wzrost koncentracji cyklicznego AMP (ang. cyclic adenosine monophosphate, cAMP) w komórkach mięśni gładkich. Innym zadaniem prostacykliny jest hamowanie agregacji płytek krwi (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Wśród innych czynników o działaniu wazodylatacyjnym uwalnianych przez EC znajduje się śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (ang. endothelium derived hyperpolarizing factor, EDHF). Czynnik ten bezpośrednio aktywuje ATP-zależny kanał potasowy, przyczyniając się tym samym do hiperpolaryzacji błony komórkowej komórek śródbłonka (HAEFLIGER i współaut. 2001). Hiperpolaryzacja oraz zmniejszony napływ jonów potasowych do wnętrza komórki powodują osłabienie czynności białek kurczliwych (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). Uważa się ponadto, że efekt wywołany przez EDHF może wynikać również z hiperpolaryzującego prądu elektrycznego przepływającego przez połączenia szczelinowe między EC a VSMC.

Wazodylatacyjne działanie EDHF obserwuje się szczególnie w małych tętnicach nieprzekraczających 200 μm średnicy oraz w tętniczkach (tj. naczyniach oporowych) (MAS 2009).

Oprócz NO, PGI_2 i EDHF śródbłonek wydziela także fosfoproteiny stymulujące rozszerzenie naczyń (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP) oraz leukotrieny C_3 i C_4 , które również należą do substancji rozszerzających ścianę naczynia krwionośnego. Wydzielanie czynników wazodylatacyjnych odbywa się z reguły pod wpływem działania

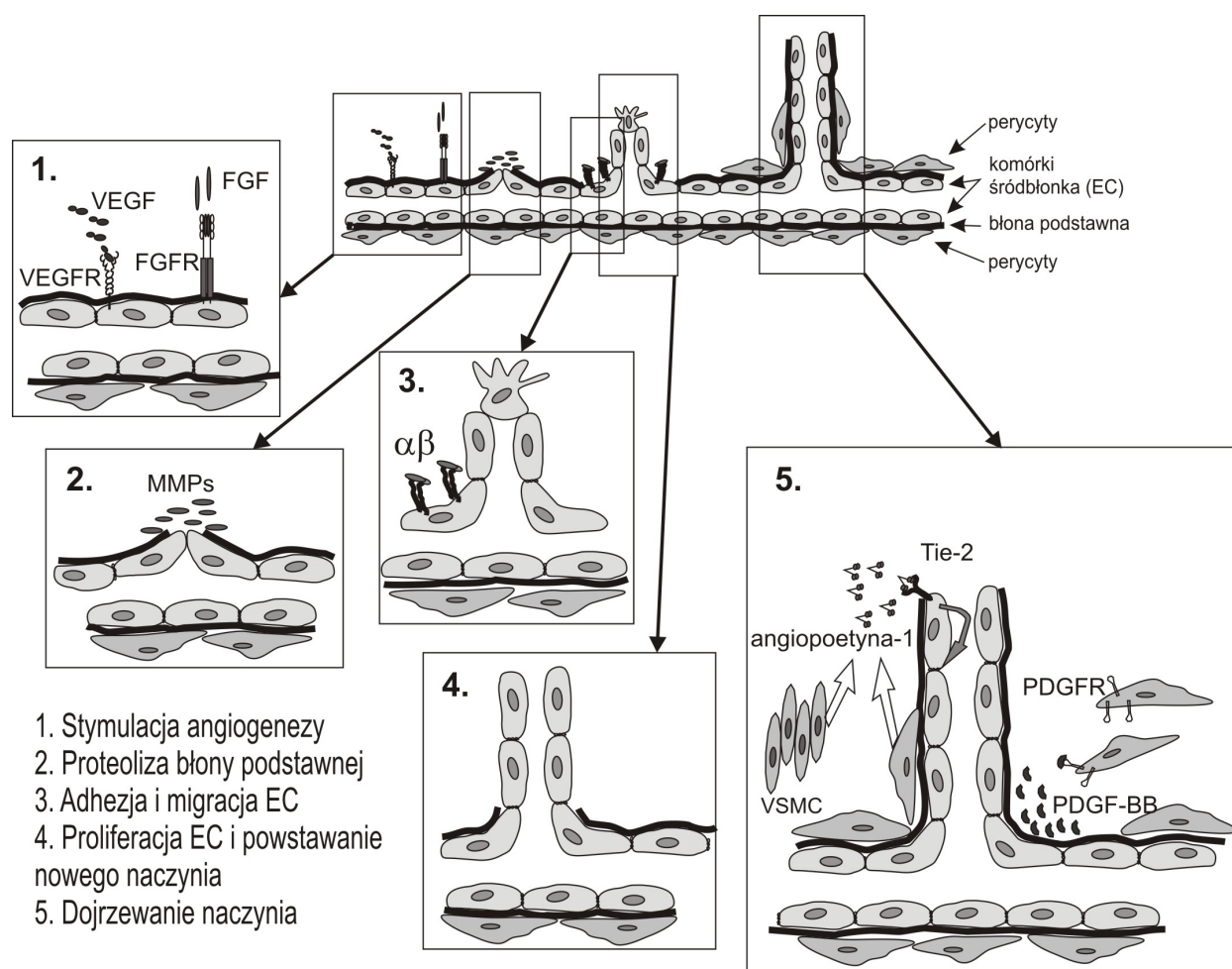
bradykininy po jej związaniu z receptorem B_2 zlokalizowanym na komórkach śródbłonka. Prowadzi to do wielu przemian powodujących rozszerzenie światła naczyń krwionośnych, wskutek rozkurczu ich mięśni gładkich, a także do zahamowania agregacji i adhezji płytek (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

Zjawisko przeciwne, a więc skurcz mięśni gładkich w ścianie naczynia krwionośnego, zachodzi dzięki aktywności czynników wazokonstrykcyjnych syntetyzowanych i uwalnianych przez śródbłonek. Wśród nich wyróżnić możemy tromboksan A_2 (TXA_2), endotelinę-1 (ET-1), angiotensynę II (AII), czynnik aktywujący płytki (PAF), prostaglandynę H , prostaglandynę F oraz leukotrieny (poza C_4 i D_4). Wszystkie te czynniki wykazują działanie przeciwstawne do wazodylatorów. Tromboksan A_2 syntetyzowany jest z endonadtlenków z udziałem syntazy tromboksanu. TXA_2 produkowany głównie w płytkach krwi, działa antagonistycznie w stosunku do PGI_2 . Przyczynia się on do skurczu mięśni gładkich naczyń oraz agregacji płytek krwi, co prowadzi do zwężenia światła naczynia. Ponadto nasila proces transmigracji komórek krwi poprzez śródbłonek do otaczających go tkanek (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007). W przeciwieństwie do tromboksanu A_2 , endotelina-1 syntetyzowana jest jedynie w komórkach śródbłonka, przy udziale enzymu konwertującego endotelinę. Wazokonstrykcyjne działanie ET-1 na naczynie krwionośne możliwe jest dzięki istnieniu receptorów endoteliny typu B (ang. endothelin receptor type B, ET(B)R), zlokalizowanych na komórkach śródbłonka oraz receptorów endoteliny typu A [ang. endothelin receptor type A, ET(A)R] obecnych na komórkach mięśni gładkich. Synteza i wydzielanie ET-1 są hamowane przez NO (HAEFLIGER i współaut. 2001). Kolejny czynnik wazokonstrykcyjny to angiotensyna II, która powstaje z nieaktywnej formy angiotensyny I krążącej we krwi w wyniku jej obróbki przez konwertazę angiotensyny zlokalizowaną na śródbłonku. Wiązanie związków o działaniu wazokonstrykcyjnym do ich receptorów zlokalizowanych na VSMC powoduje zmniejszenie poziomu cAMP oraz zwiększenie stężenia cytozolowego wapnia (MAS 2009).

CZYNNIKI PROANGIOGENNE I ANTYANGIOGENNE

Poprzez uwalnianie czynników o działaniu proangiogennym oraz antyangiogennym, a także ekspresję białek powierzchniowych,

śródbłonek zaangażowany jest w proces powstawania naczyń krwionośnych i to zarówno na drodze waskulogenezy, jak i angioge-



Ryc. 5. Przebieg procesu angiogenezy.

Tworzenie nowych naczyń krwionośnych przebiega w 5 etapach: 1. Pobudzenie ECs przez docierające z otaczających tkanek sygnały proangiogenne – VEGF i FGF; 2. Przerwanie ciągłości błony podstawnej otaczającej naczynie krwionośne w efekcie degradacji jej składników przez obecne w środowisku metaloproteiny; 3. Stymulowana czynnikami proangiogennymi i obecnością integrzyn (m.in. $\alpha_v\beta_3$) adhezja i migracja ECs; 4. Podziały ECs prowadzące do formowania się właściwego kształtu nowego naczynia; 5. Stabilizacja ściany nowopowstałego naczynia obejmująca wytworzenie błony podstawnej oraz rekrutację perycytów. Czynnikiem stymulującym migrację perycytów w kierunku nowopowstałego naczynia jest PDGF wydzielany przez ECs. Natomiast angiopoetyna-1 produkowana przez perycyty i VSMC, wiążąc się z obecnym na ECs receptorem Tie-2 powoduje dojrzewanie naczynia poprzez wzmocnienie jego integralności, czyli zmniejszenie jego przepuszczalności i wzmocnienie oddziaływań pomiędzy ECs i perycytami.

nezy. Waskulogeneza jest procesem, w którym dochodzi do proliferacji i różnicowania się komórek macierzystych śródbłónka tzw. hemiangioblastów w kierunku angioblastów (ZIELONKA 2003). Różnicowanie się angioblastów prowadzi do powstania pierwotnej sieci mikronaczyń, co jest szczególnie zauważalne podczas embriogenezy (GROSICKI i współaut. 2007). Z kolei angiogeneza jest wieloetapowym procesem formowania się nowych naczyń krwionośnych na bazie już istnie-

jących. Zachodzi ona w życiu płodowym i pozapłodowym organizmu. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych czy to na drodze waskulogenezy, czy angiogenezy ma istotne znaczenie w wielu fizjologicznych procesach zachodzących w ludzkim organizmie, m.in. w rozwoju zarodkowym, powstawaniu łożyska, gojeniu ran czy w cyklu menstruacyjnym w kobiecym układzie rozrodczym (ZIELONKA 2003). Ważnym czynnikiem regulującym proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych

jest tempo proliferacji komórek śródbłonka. Nieaktywowane ECs są w stanie przeżyć około 1000 dni, podczas gdy w trakcie angiogenezy tempo ich proliferacji wzrasta znacząco i podziały mogą zachodzić już co 5 dni. Znaczącą rolę dla przebiegu procesu angiogenezy mają także prezentowane na powierzchni komórek śródbłonka różnorodne cząsteczki adhezyjne zaangażowane w migrację komórek w trakcie tworzenia nowych naczyń oraz białka enzymatyczne odpowiedzialne za proteolizę otaczającej naczynia macierzy zewnątrzkomórkowej (SWIDZIŃSKA i współaut. 2006). Proces angiogenezy regulowany jest ponadto przez szereg czynników, tzw. proangiogennych, z których wiele jest wydzielanych przez sam śródbłonek. Wśród nich wyróżnia się m.in. naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF), podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor, bFGF), kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (ang. acidic

fibroblast growth factor, aFGF), łożyskowy czynnik wzrostu (ang. placenta growth factor, PGF), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), transformujący czynnik wzrostu α (ang. transforming growth factor- α , TGF- α), czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (ang. platelet-derived growth factor, PDGF), adenozyne, a także prostaglandyny E₁ i E₂ (WNUCZKO i SZCZEPAŃSKI 2007).

W trakcie pięcioetapowego przebiegu procesu angiogenezy komórki śródbłonka wykazują zdolności migracyjne, proliferacyjne oraz podziałowe, dzięki czemu mogą tworzyć „odgałęzienia” od istniejącego już naczynia (Ryc. 5). Ruch tych komórek w miejsce formowania się nowego naczynia uzależniony jest od czynników proangiogennych, a także od oddziaływań komórek śródbłonka z białkami ECM. Istotną rolę odgrywają tu integryny, które pośredniczą w interakcji śródbłonka z białkami ECM, takimi jak: witronektyna, laminina czy fibronektyna (WALSKI i FRONT-CHAK-BANIEWICZ 2007).

ŚRÓDBŁONEK JAKO BARIERA

Inną istotną funkcją śródbłonka jest udział w wymianie umożliwiającej przemieszczanie się cząsteczek pomiędzy krwią a tkankami otaczającymi naczynia. Śródbłonek stanowi barierę dla krążących płytek krwi i białek osocza biorących udział w procesie krzepnięcia krwi (MAS 2009). Poprzez śródbłonek swobodnie przenika woda i małe substancje w niej rozpuszczone. Większe makrocząsteczki wędrują drogą transkomórkową, w którą zaangażowany jest śródbłonek będący dla nich specyficzną barierą. W transcytozie makrocząsteczki potrzebują nośników, jakimi

są np. wyspecjalizowane struktury błonowe zwane kaweolami. Są to wpuklenia błony komórkowej, zbudowane głównie z białka kaweoliny oraz białka błonowego (ang. plasma-membrane vesicle protein-1, PV-1). Najwięcej kaweoli znajduje się w ciągłym śródbłonku bez okienek. Makrocząsteczki mogą wędrować również poprzez kanały błonowe. Ponadto w przebiegu stanów zapalnych następuje zwiększenie przepuszczalności śródbłonka dla substancji uczestniczących w tym procesie (AIRD 2007).

HODOWLE KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

W latach 70. i 80. XX w. po raz pierwszy udało się wyizolować i scharakteryzować komórki śródbłonka w hodowlach komórkowych. W latach 1973/1974 udało się pozyskać komórki śródbłonka z żyły pępowinowej i wyprowadzić popularną do dziś linię HUVEC (ang. human umbilical vein endothelial cells). Prowadzono wtedy również hodowle komórek śródbłonka z mediatorami stanu zapalnego, a zjawisko to nazywano „aktywacją komórek śródbłonka” (AIRD 2007).

Komórki śródbłonka rosną w hodowlach najczęściej w postaci konfluentnej monowarstwy. Morfologia hodowanych komórek wynika z jakości użytych naczyń oraz ich pokrycia białkami, dodatku bądź nie czynników wzrostu, w szczególności czynnika wzrostu komórek śródbłonka (ang. endothelial cell growth factor, ECGF); warunków prowadzonej hodowli i ilości dodanej do medium surowicy. Niemniej jednak morfologia komórek śródbłonka zmienia się wraz z liczbą przeprowadzonych pasażów oraz wraz ze starze-

niem się hodowli. Różnorodność fenotypowa komórek śródbłonkowych wynika z wpływu otaczających ich tkanek (CHAPPEY i współaut. 1995). Obecność czynnika von Willebranda w WPBs, uważanego za podstawowy marker komórek śródbłonkowych, pozwala na ich łatwą identyfikację przy użyciu technik immunobiologicznych oraz mikroskopii elektronowej. Równie charakterystyczna dla nich jest obecność enzymu konwertującego angiotensynę (CHAPPEY i współaut. 1995). Obecnie znanych jest wiele linii komórkowych prawidłowego ludzkiego śródbłonka. Niemniej jednak najpowszechniej stosowaną jest linia HUVEC. Obok niej do badań *in vitro* wykorzystywane są jeszcze linie: HPMEC (ang. human pulmonary microvascular endothelial cells), z mikrokrążenia płucnego, czy HDMEC (ang. human dermal microvascular endothelial cells), z mikrokrążenia skóry. Pozyskiwanie komórek śródbłonka odbywa się według znanych protokołów, w efekcie wieloetapowej procedury (JAFKE i współaut. 1973). Komórki śródbłonka izolowane z żyły pępowinowej są powszechnie stosowane, gdyż są łatwo dostępne i występują w dużych ilościach, a co ważne, sposób w jaki są pozyskiwane nie wywołuje kontrowersji etycznych. Komórki te uzyskuje się przy użyciu kolagenazy, a hodowle prowadzi się w plastikowych naczyniach hodowlanych pokrytych fibronektyną, kolagenem lub żelatyną. Komórki linii HUVEC najczęściej hoduje się w medium F12-K (ATTC LGC Standards, UK) zawierającym dodatkowo glutaminę, ludzką bądź bydlęcą surowicę oraz zestaw czynników wzrostowych (EGF, FGF, IGF, VEGF). Pozyskiwanie komórek śródbłonka z tętnicy płucnej odbywa się na podobnej zasadzie, jak z żyły pępowinowej. W porównaniu do tętnic i żył, izolacja ECs z mikrokrążenia jest mniej dostępna i sprowadza się jedynie do próbek uzyskanych z biopsji przeprowadzanych dla celów terapeutycznych (SCOTT i BICKNELL 1993). Inną metodą izolacji komórek śródbłonka jest zastosowanie kulek magnetycznych opłaszczonych aglutyninami, białkami specyficznymi wiążącymi grupy cukrowe, które rozpoznają i wiążą się specyficznie do L-fukozylowych reszt glikoprotein prezentowanych przez śródbłonek (CHAPPEY i współaut. 1995).

Ludzkie komórki śródbłonka w hodowli posiadają określoną długość życia (z ang. lifespan). Po kilku podziałach, z reguły od 2-6 pasażów, wraz ze starzeniem się, komórki tracą zdolność produkcji prostacykliny. Uzyskanie

dużej ilości pierwotnych hodowli komórek śródbłonka, które zachowują swoje strukturalne i biologiczne właściwości, nastęrcza wielu trudności, dlatego często podejmowane są próby transformacji takich hodowli. Najczęściej w tym celu ECs są izolowane z naczyń pochodzących z guzów nowotworowych i do tak otrzymanych hodowli poddaje się onkogeny wirusowe, transfekuje się komórki zrekombinowanymi genami lub dokonuje fuzji komórek. Otrzymane komórki zachowują wówczas cechy właściwe prawidłowym komórkom śródbłonka (CHAPPEY i współaut. 1995). Hodowle śródbłonka można wykorzystać do badań nad ich funkcją oraz zaangażowaniem w przebiegu fizjologicznych i patologicznych procesów związanych z tą tkanką. Stanowią one również dobry model do badań nad toksycznością ksenobiotyków czy nowych leków. Prowadzone w tym modelu badania pozwalają na bardziej precyzyjne określenie wpływu wybranego związku na docelowe komórki, gdyż uwzględniają fizjologię ECs, które w tym wypadku są miejscem transportu leków do docelowej tkanki (CHAPPEY i współaut. 1995). Choć wydaje się, że model hodowanych *in vitro* komórek śródbłonka jest dobrym odzwierciedleniem zachowania tych komórek w tkance, to świadomość istniejących ograniczeń tego modelu powinna towarzyszyć analizie otrzymywanych w ten sposób wyników, a istniejące, choć nieliczne różnice pomiędzy układem *in vitro* i *in vivo* powinny być zawsze brane pod uwagę. Szczególnie dotyczy to przenoszenia wyników otrzymanych dla hodowli komórek linii HUVEC na inne typy śródbłonek pochodzące z konkretnych tkanek. Głównym problemem jest tu odmienna ekspresja białek adhezyjnych (ICAM, E-selektyna) na powierzchni komórek śródbłonka różnego pochodzenia. W tym wypadku wyniki badań pokazują, że HUVEC nie do końca jest dobrym, uniwersalnym modelem do analizy zachowania komórek śródbłonka z innych tkanek. Kolejnym problemem jest utrata przez izolowane komórki HUVEC ekspresji tetrahydrobiopteryny, który jest kofaktorem NOS, a w związku z tym pojawiają się problemy z pokazaniem na modelu *in vitro* udziału NO w oddziaływaniach z komórkami układu immunologicznego (neutrofilami). Istnieją także obserwacje wskazujące na produkcję przez niestymulowane komórki śródbłonka, w warunkach *in vitro*, ponadtlenu i nadtlenu wodoru, co sugeruje, że ECs w hodowlach podlegają stale stresowi oksyda-

cyjnemu. Istotnym elementem w odpowiedzi śródbłonna na różnego rodzaju fizjologiczne i patologiczne sytuacje jest jego oddziaływanie z mikrośrodowiskiem w tym ze składnikami osocza, elementami morfotycznymi krwi (np. płytki krwi), z komórkami tuczny-

mi oraz elementami macierzy zewnątrzkomórkowej. Brak tych oddziaływań w układzie *in vitro* ogranicza interpretację otrzymywanych w ten sposób wyników w warunkach *in vivo* (KVIETYS i GRANGER 1997).

PODSUMOWANIE

Komórki śródbłonna pełnią szereg ważnych funkcji w procesach zachodzących w organizmie człowieka. Wiele z tych procesów jest niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania tak złożonego systemu, jakim jest organizm ludzki. Śródbłonek stanowi przede wszystkim barierę pomiędzy krwią a tkankami otaczającymi naczynie krwiono-

śne. Zapewnia on ciągłość naczynia krwionośnego, utrzymuje homeostazę krwi, reguluje jej krzepliwość, zapewnia odpowiednie napięcie ściany naczynia oraz bierze udział w reakcjach immunologicznych. Z tego względu śródbłonek jest swego rodzaju narządem wielofunkcyjnym.

ŚRÓDBŁONEK – NIEDOCENIANY ORGAN. 1. BUDOWA ORAZ ROLA W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH

Streszczenie

Śródbłonek to warstwa komórek stanowiąca wyściółkę naczyń krwionośnych i limfatycznych. W związku z liczbą budujących go komórek, ich masą, powierzchnią oraz rolą jaką odgrywa w wielu fizjologicznych procesach śródbłonek został uznany za integralny narząd w organizmie człowieka. Jego komórki są zakotwiczone w błonie podstawnej, a równocześnie kontaktują się ze sobą za pomocą różnego typu połączeń międzykomórkowych. Jest to możliwe dzięki obecności na ich powierzchni zestawu białek adhezyjnych, które ponadto uczestniczą w szeregu innych biomechanicznych (transmigracja komórek nowotworowych w procesie tworzenia przerzutów) oraz biochemicznych (przekaz wewnątrzkomórkowego sygnału) procesach. W ich przebiegu istotną rolę odgrywają także obecne na powierzchni komórek śródbłonna cukrowce tworzące charakterystyczną strukturę glikokaliksu. Typową dla komórek śródbłonna jest obecność ciałek Weible-Palade'a, licznych kaweoli oraz zakotwiczonych w błonie komórkowej enzymów uczestniczących m.in. w procesie krzepnięcia krwi. Specyficzny typ śródbłonna stanowią komórki śródbłonna wysokiego występującego przede wszystkim w narządach limfatycznych. Dzięki swej budowie śródbłonek wysoki umożliwia leukocytom fizjologiczną transmigrację z naczyń do tkanki limfatycznej, podczas gdy śródbłonek naczyń krwionośnych jest przepuszczalny dla leukocytów

jedynie w przypadku toczącego się stanu zapalnego. Głównym zadaniem śródbłonna jest utrzymanie w warunkach fizjologicznych stałego przepływu krwi poprzez regulację jej krzepliwości. Jego komórki w tej sytuacji pozostają w stanie spoczynku (nie prezentują receptorów adhezyjnych), a jednocześnie uwalniają do środowiska czynniki antykoagulacyjne, które w warunkach fizjologicznych przeważają nad czynnikami prokoagulacyjnymi. Kolejną grupę substancji wydzielanych przez śródbłonek stanowią czynniki wazodylatacyjne – powodujące relaksację naczyń krwionośnego i wazokonstrykcyjne – wywołujące jego skurcz, produkowane w odpowiedzi na obecność bodźców chemicznych i biomechanicznych. Ważną grupą czynników produkowanych przez komórki śródbłonna są czynniki pro- i antyangiogenne, które odpowiednio stymulują lub hamują powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Ze względu na ogromne znaczenie dla utrzymania homeostazy i uniwersalność produkowanych przez jego komórki czynników poznanie fizjologii śródbłonna jest przedmiotem intensywnych badań, coraz częściej prowadzonych *in vitro* na modelach wyprowadzonych linii komórkowych śródbłonna izolowanego z różnych narządów. Hodowle te choć posiadają swe ograniczenia wydają się być dobrym modelem do analizy udziału śródbłonna w procesach fizjologicznych czy patologicznych zachodzących w organizmie.

THE ENDOTHELIUM – UNDERESTIMATED ORGAN. 1. STRUCTURE AND PHYSIOLOGICAL FUNCTION

Summary

The endothelium is made of a layer of cells located on the inner surface of blood and lymphatic vessels. It is considered as the integral organ of hu-

man body. It is formed of endothelial cells anchoring in extracellular matrix and at the same time tightly connected one with another through vari-

ous types of cellular junctions. There is a number of adhesion molecules: proteins and glycans, taking part in this cell-to-cell and cell-to-ECM adhesion, and many of them are involved in variety of biomechanical and biochemical processes occurring in the endothelial cells. One of the most characteristic feature of the endothelial cells is the presence of the Weible-Palade bodies as well as numerous caveolae and cellular membrane-anchored enzymes regulating blood clotting. It has been shown that there is a specific type of endothelial cells called high endothelial cells, which are characteristic for the lymphatic vessels. This high endothelium facilitates physiological transmigration of leukocytes from vessels to surrounding lymphatic tissue. The endothelium is

known to have the uppermost role in maintaining the constant flow of blood in vessels through its regulatory influence on blood clotting processes. The endothelial cells produce a wide variety of factors including: anticoagulants, vasodilators – causing relaxation of vessels, vasoconstrictors – leading to constriction of blood vessels, as well as pro- and antiangiogenic factors that regulates formation of new blood vessels. Therefore, it seems to be very important to fully analyze the physiology of endothelium. *In vitro* cultures of endothelial cells, despite their limitations, seems to be a reliable model for biochemical and molecular analysis of this tissue under physiological and pathological conditions.

LITERATURA

- AIRD W. C., 2007. *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ. Res. 100, 158–173.
- CELIŃSKI R., 2010. *Przydatność oznaczeń endoteliny-1 w diagnostyce chorób układu krążenia*. Pol. Merk. Lek. XXVIII, 220–222.
- CHAPPEY O., WAUTIER M. P., WAUTIER J. L., 1995. *Endothelial cells in culture: a model to study in vitro vascular toxicity*. Toxicol. In Vitro 9, 411–419.
- FUKUHRA S., SAKURAI A., YAMAGISHI A., SAKO K., MOCHIZUKI N., 2006. *Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by small GTPase, Rap1*. J. Biochem. Mol. Biol. 39, 132–139.
- GROSICKI S., GROSICKA A., HOŁOWIECKI J., 2007. *Kliniczne znaczenie angiogenezy i czynników ją modyfikujących w onkohematologii*. Wiad. Lek. 60, 39–46.
- HAEFELIGER I. O., FLAMMER J., BENY J. L., LUSCHER T. F., 2001. *Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation*. Prog. Retin. Eye Res. 20, 209–225.
- JANUSZEWICZ W., SZNAJDERMAN M., 2000. *Modyfikacja czynności śródbłonna – nowa metoda leczenia nadciśnienia tętniczego*. Nadciśn. Tętn. 4, 195–199.
- JAFFE, E. A., NACHMANN R. L., BECKER G., MINICK R., 1973. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J. Clin. Invest. 52, 2745–2756.
- KOŁODZIEJCZYK J., WACHOWICZ B., 2009. *Zaburzenia fibrynolizy jako czynnik ryzyka zakrzepicy*. Pol. Merk. Lek. XXVII, 341–345.
- KOTSCHY M., KOTSCHY D., WITKIEWICZ W., 2010. *Rola czynnika tkankowego i jego inhibitora w procesie krzepnięcia krwi oraz w powikłaniach zakrzepowych*. Kardiolog. Pol. 68, 1158–1162.
- KVIETYS P. R., GRANGER D. N., 1997. *Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology*. Am. J. Physiol. 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36), G1189–G1199.
- LIPSKI K. M., OSTROWSKI K., KOMENDER J., ŚLADOWSKI D., 2006. *Udział śródbłonna w formowaniu się naczyń*. Post. Biol. Kom. 33, 59–70.
- MAS M., 2009. *A close look at the endothelium: Its role in the regulation of vasomotor tone*. Eur. Urol. Suppl. 8, 48–57.
- SCOTT P. A. E., BICKNELL R., 1993. *The isolation and culture of microvascular endothelium*. J. Cell Sci. 105, 269–273.
- STRELL C., ENTSCHLADEN F., 2008. *Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells*. Cell Commun. Signal. 6, 10.
- SWIDZIŃSKA E., NAUMNIK W., CHYCEWSKA E., 2006. *Angiogeneza i neoangiogeneza- znaczenie w raku płuc i innych nowotworach*. Pneumonol. Alergol. Pol. 74, 414–420.
- SWOBODA R., KAJDANIUK D., 2009. *Rola śródbłonna naczyniowego w nadciśnieniu tarczycy*. Endokrynol. Otył. Zab. Przem. Mat. 5, 81–86.
- ULBRICH H., ERIKSSON E. E., LINDBOM L., 2003. *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as target for therapeutic interventions in inflammatory disease*. Trends Pharmacol. Sci. 24, 640–647.
- VESTWEBER D., 2002. *Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation*. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 587–593.
- WALSKI M., FRONTCZAK-BANIEWICZ M., 2007. *Cechy ultrastrukturalne prawidłowego i dysfunkcyjnego śródbłonna naczyń krwionośnych*. Pol. Arch. Med. Wewn. 117, 46–49.
- WNUCZKO K., SZCZEPAŃSKI M., 2007. *Śródbłonek – charakterystyka i funkcje*. Pol. Merk. Lek. XXIII, 60–65.
- ZIELONKA T. M., 2003. *Angiogeneza. Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych*. Alergia Astma Immunol. 8, 169–174.