

KATARZYNA SUMIŃSKA - JASIŃSKA

**OCENA DZIAŁANIA SULODEKSYDU NA CZYNNOŚĆ
LUDZKICH KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA
W WARUNKACH HODOWLI IN VITRO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Katedra i Zakład Patofizjologii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik: Prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz

Promotor: Prof. dr hab. med. Andrzej Bręborowicz

Poznań 2012

SPIS TREŚCI

I.	STRESZCZENIE	3
II.	SUMMARY	5
III.	WSTĘP	7
	1. Czynność śródbłónka	8
	A. Regulacja krzepnięcia i fibrynolizy wewnątrznaczyniowe	8
	B. Udział śródbłónka w odczynie zapalnym	10
	C. Regulacja oporu naczyniowego przez komórki śródbłónka	10
	2. Zaburzenia czynności śródbłónka	11
	A. Starzenie śródbłónka	11
	B. Stres oksydacyjny w komórkach śródbłónka	13
	3. Protekcja komórek śródbłónka	13
	4. Sulodeksyd – nowy lek modulujący czynność komórek śródbłónka	15
IV.	CEL PRACY	17
V.	MATERIAŁ I METODYKA	18
	1. Wpływ sulodeksydu na odczyn zapalny w komórkach śródbłónka	19
	A. Oznaczanie stężenia IL-6	19
	B. Oznaczanie stężenia MCP-1	19
	C. Pomiar wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników	20
	2. Wpływ sulodeksydu na komórki śródbłónka w warunkach przewlekłej hiperglikemii	20
	A. Ocena szybkości gojenia uszkodzonej warstwy komórek śródbłónka	21

3.	Wpływ sulodeksydu na proces starzenia komórek nabłonka	22
4.	Analiza statystyczna wyników	23
VI.	WYNIKI	24
1.	Wpływ sulodeksydu na czynność ludzkich komórek śródbłonka w hodowli <i>in vitro</i>	24
2.	Efekt przewlekłej hiperglikemii na komórki śródbłonka – modyfikujące działanie sulodeksydu	27
3.	Wpływ sulodeksydu na procesy replikacyjnego starzenia komórek śródbłonka w hodowli <i>in vitro</i>	32
VII.	DYSKUSJA	39
VIII.	PODSUMOWANIE	46
IX.	WNIOSKI	47
X.	PIŚMIENNICTWO	48

I. STRESZCZENIE

Sulodeksyd jest mieszaniną glikozaminoglikanów zawierającą heparynę (około 80% całości) i siarczan dermatanu (około 20% całości). Lek ten ma silne działanie przeciwzakrzepowe, profibrynolityczne, obniżające poziom lipidów w osoczu oraz przeciwzapalne. Uważa się, że część sulodeksydu, po wprowadzeniu do organizmu łączy się z powierzchnią komórek śródbłonna. Wyniki prac innych badaczy sugerują, że sulodeksyd może działać protekcyjnie w stosunku do śródbłonna, zwłaszcza w warunkach hiperglikemii.

Celem przedstawionych w tej pracy badań była ocena wpływu sulodeksydu na czynność ludzkich komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*. Badany był odczyn zapalny w tych komórkach podczas ich ekspozycji na sulodeksyd, wpływ hiperglikemii na czynność komórek z jednoczesną oceną czy obecność sulodeksydu modyfikuje efekt hiperglikemii. W ostatniej części pracy badano wpływ sulodeksydu na proces replikacyjnego starzenia komórek śródbłonna.

Badania wykonano na ludzkich komórkach śródbłonna hodowanych w standardowym medium hodowlanym lub w medium z dodatkiem glukozy 30 mmol/l. Oceniano wpływ sulodeksydu (w stężeniach 0.125 LSU/ml; 0.25 LSU/ml i 0.5 LSU/ml) na czynność tych komórek. Badano wewnątrzkomórkową generację wolnych rodników, produkcję Czynnika Chemotaktycznego dla Monocytów typu 1 (MCP-1), oraz Interleukiny 6 (IL-6). Badano również szybkość gojenia mechanicznie uszkodzonej warstwy komórek śródbłonna. Proces replikacyjnego starzenia komórek śródbłonna polegał na wykonywaniu powtarzalnych, 15 pasażów hodowanych komórek, w odstępach 4-dniowych. Czynność komórek (stres oksydacyjny, odczyn zapalny, czas podwojenia populacji, szybkość gojenia mechanicznie uszkodzonej warstwy komórek, aktywność β -galaktozydazy) była oceniana na początku eksperymentu oraz po ostatnim pasażu komórek.

Sulodeksyd hamował, proporcjonalnie do zastosowanego stężenia, generację wolnych rodników w komórkach śródbłonna (-32%, $p < 0.01$), uwalnianie MCP-1 (-60%, $p < 0.001$), IL-6 (-69%, $p < 0.01$). W komórkach śródbłonna hodowanych w medium z dodatkiem glukozy 30 mmol/l obserwowano nasilenie stresu oksydacyjnego (+20%, $p < 0.05$), uwalniania MCP-1

(+113%, $p < 0.001$) i IL6 (+26%, $p < 0.05$). Ponadto komórki przewlekle ekspozowane na hiperglikemię wykazywały upośledzoną zdolność do gojenia (-28%, $p < 0.01$). W przypadku gdy komórki były jednocześnie ekspozowane na hiperglikemię (30 mmol/l) i sulodeksyd (0.5 LSU/ml) nie stwierdzano istotnych zmian w czynności komórek.

W komórkach poddanych replikacyjnemu starzeniu obserwowano nasilenie stresu oksydacyjnego (+852%, $p < 0.005$), wzmożoną produkcję IL-6 (+174%, $p < 0.005$), MCP-1 (+81%, $p < 0.01$) oraz wydłużenie czasu podwojenia populacji (+180%, $p < 0.005$). Aktywność β -galaktozydazy w komórkach była zwiększona (+68%, $p < 0.05$). Jednocześnie zdolność tych komórek do gojenia była upośledzona (-41%, $p < 0.005$). Wszystkie powyżej opisane zmiany były mniej nasilone w przypadku gdy komórki były poddawane replikacyjnemu starzeniu w obecności sulodeksydu (0.5 LSU/ml). Mniejsza, w porównaniu do komórek hodowanych w medium bez sulodeksydu, była generacja wolnych rodników (-41%, $p < 0.001$), aktywność β -galaktozydazy (-23%, $p < 0.01$), uwalnianie cytokin zapalnych: IL-6 (-44%, $p < 0.01$) i MCP-1 (-54%, $p < 0.001$). Jednocześnie krótszy był czas podwojenia populacji komórek (-55%, $p < 0.001$), natomiast szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek była większa (+64%, $p < 0.001$).

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy dowodzą, że sulodeksyd hamuje stres oksydacyjny i odczyn zapalny w ludzkich komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro*. Lek ten przeciwdziała prooksydacyjnemu i prozapalnemu działaniu hiperglikemii na śródbłonek. Ponadto, sulodeksyd spowalnia zmiany strukturalne i czynnościowe w komórkach śródbłonna podczas ich procesu starzenia. Uzyskane wyniki dowodzą, że sulodeksyd ma protekcyjne działanie w stosunku do komórek śródbłonna naczyniowego.

II. SUMMARY

Sulodexide is a mixture of glycosaminoglycans composed of heparin sulphate (80%) and dermatan sulphate (20%). It is known to have strong antithrombotic and profibrinolytic activity, ability to reduced plasma lipids levels as well as inhibition of the systemic inflammatory action. It is assumed that significant amount of sulodexide, after introduction into the body, binds to the surface of the vascular endothelial cells. Results presented by other authors suggest that sulodexide may have protective action in endothelial cells, especially in hyperglycemic environment.

The goal of the research presented in that manuscript is evaluation of the sulodexide effect on function of human vascular endothelial cells cultured in *in vitro* conditions. We studied inflammatory pattern of these cells also in conditions of hyperglycemia. At the same time effect of sulodexide on the function of the endothelial cells was evaluated in standard culture conditions and in hyperglycemic environment. In the last part of the study we tested if sulodexide can modify senescence of the endothelial cells undergoing *in vitro* replicative aging.

Study was performed on human endothelial vascular cells cultured *in vitro* in the standard conditions or in medium with increased glucose level (30 mmol/L). We tested effect of sulodexide used in concentrations: 0.125 LSU/mL, 0.25 LSU/mL and 0.5 LSU/mL on the intracellular generation of free radicals, release of monocyte chemoattractant protein type 1 (MCP-1), interleukin 6 (IL-6). Healing of the scratch injured endothelial layer was also studied. Endothelial cells were made senescent by 15 repeated passages performed every four days. The following parameters of the cells at the beginning of the study and after 15 passages were studied: intracellular generation rate of free radicals, inflammatory pattern, population doubling time, β -galactosidase activity and speed of healing of the injured endothelial layer.

Sulodexide decreased intracellular generation of free radicals in endothelial cells in a dose-dependent manner (maximal effect: by 32% $p < 0.01$), release of MCP-1 (maximal effect by 60%, $p < 0.001$), release of IL-6 (maximal effect by 69%, $p < 0.01$). In endothelial cells cultured in presence of high glucose concentration (30 mmol/L) oxidative stress was

enhanced (by 20%, $p < 0.05$), as well as release of MCP-1 (by 113%, $p < 0.001$) and IL-6 (by 26%, $p < 0.05$). Additionally, endothelial cell cultured in the hyperglycemic milieu demonstrated slow healing rate after scratching (by 28%, $p < 0.01$). However when cells were simultaneously exposed to hyperglycemia (30 mmol/L) and sulodexide (0.5 LSU/ml) no significant changes in their function were detected.

In the endothelial cells undergoing the replicative aging enhanced oxidative stress was observed (by 852%, $p < 0.005$), increased release of IL-6 (by 174%, $p < 0.005$) and MCP-1 (by 81%, $p < 0.01$). Population doubling time was also extended (by 180%, $p < 0.005$). Intracellular β -galactosidase activity was increased by 68%, $p < 0.05$. Senescent endothelial cells also showed reduced speed of healing after mechanical injury, by 41%, $p < 0.005$. All described functional changes of the senescent cells were weaker, when replicative senescence of these cells was performed in presence of sulodexide (0.5 LSU/mL). Intracellular generation of free radicals was smaller than in control cells (by 41%, $p < 0.001$), as well as β -galactosidase activity (by 23%, $p < 0.01$), release of the inflammatory cytokines : IL-6 (by 44%, $p < 0.01$) and MCP-1 (by 54%, $p < 0.001$). At the same time population doubling time was shorter than in control cells (by 55%, $p < 0.001$), but healing of the injured endothelial monolayer was accelerated (by 64%, $p < 0.001$).

Presented in that paper results show that sulodexide decreases oxidative stress and inflammatory reaction in human vascular endothelial cells maintained in *in vitro* culture. Additionally it reduces the prooxidative and proinflammatory effects in endothelium induced by hyperglycemia. Sulodexide also slows down morphological and functional changes in the endothelial cells caused by their senescence. Our results prove the protective effect of sulodexide towards the human vascular endothelial cells.

III. WSTĘP

Komórki śródbłonka tworzą zlewną warstwę wyściełającą wszystkie naczynia krwionośne organizmu i ich całkowita powierzchnia w organizmie człowieka jest szacowana na około 4000 do 7000 m². Odpowiada to ilości 10¹³ komórek, których sumaryczna waga jest oceniana na około 1-1.5 kg [1]. W obrazie mikroskopowym są to płaskie (grubość około 0.5 – 1,0 μm) komórki mogące mieć charakter wydłużony (do około 100 μm) lub bardziej zbliżony do okrągłego, co zależy między innymi od szybkości przepływającej krwi przez naczynie; szybki prąd krwi powoduje wydłużenie komórek śródbłonka zgodnie z kierunkiem tego przepływu [2]. Szybszy przepływ krwi w naczyniach tętnicznych powoduje, że komórki śródbłonka je wyściełające mają bardziej wydłużony kształt niż w naczyniach żylnych.

W warunkach prawidłowych warstwa komórek śródbłonka wyściełająca ścianę naczynia krwionośnego zapewnia utrzymanie płynności krwi, reguluje wielkość przepływu krwi w danym obszarze naczyniowym, wpływa na dynamikę wymiany płynu i cząsteczek pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową i zewnątrznaczyniową, a także ogranicza i reguluje stopień oddziaływania elementów morfotycznych ze ścianą naczynia krwionośnego.

Śródbłonek tworzy zlewną warstwę komórek, jednak jej ścisłość jest uzależniona od rodzaju połączeń występujących pomiędzy komórkami. W naczyniach tętnicznych i żylnych połączenia międzykomórkowe mają charakter ścisły; dodatkowo w tych drugich naczyniach występują na ich wewnętrznej powierzchni zastawki pokryte komórkami śródbłonka, które zapobiegają cofaniu się płynącej w kierunku serca fali krwi [3]. Natomiast dużą różnorodność połączeń międzykomórkowych można zaobserwować w naczyniach włosowatych, co jest uzasadnione funkcją narządu w którym te naczynia występują. W wątrobie gdzie istotna jest łatwość wymiany pomiędzy światłem naczynia a przestrzenią zewnątrznaczyniową występuje śródbłonek o strukturze nieciągłej z otwartymi szczelinami pomiędzy sąsiadującymi komórkami, w kłębuszkach nerkowych, gdzie w wyniku filtracji dochodzi do powstawania około 200 litrów moczu pierwotnego w ciągu doby połączenia pomiędzy komórkami śródbłonka nie są w pełni ścisłe (śródbłonek okienkowaty), co powoduje, że w małym stopniu ograniczają przechodzenie białek osocza. Natomiast w naczyniach włosowatych zlokalizowanych w mięśniach, czy ośrodkowym układzie nerwowym połączenia międzykomórkowe są

ściśle, a transport cząsteczek przez komórki śródbłónka odbywa się w mechanizmie endocytozy lub poprzez wyspecjalizowane kanały transportowe umiejscowione w błonie komórkowej [2,3]

Powierzchnia śródbłónka pokryta jest mieszaniną glikoprotein i glikozaminoglikanów określanych jako glikokaliks (z języka greckiego – *glycocalyx* – słodka osłonka) [4]. Występuje tam między innymi siarczan heparanu, będący kofaktorem dla trombiny III, co wspomaga jej działanie przeciwkrzepliwe [5], a także siarczan dermatanu oddziałujący z kofaktorem II heparyny [6]. Obecność grup siarczanowych w obrębie glikokaliks powoduje ujemność ładunku elektrycznego na powierzchni komórek śródbłónka, co ogranicza oddziaływanie z jego powierzchnią ujemnie naładowanych cząsteczek osocza (np. albumin) czy komórek krwi (np. płytki krwi). Te właściwości glikokaliks decydują o jego silnym działaniu przeciwkrzepliwym [6]. Ponadto glikokaliks modyfikuje oddziaływanie wielu innych cząsteczek z komórkami śródbłónka oraz ogranicza ich przenikanie przez ścianę naczynia [7]. Stąd enzymatyczne usunięcie glikokaliks doprowadza do zwiększenia przepuszczalności ściany naczyniowej.

1. CZYNNOŚĆ ŚRÓDBŁONKA

Komórki śródbłónka regulują wiele procesów wewnątrznaczyniowych, ponadto wpływają przez działanie wazokonstrykcyjne i wazodylatacyjne na przepływ obwodowy krwi, a także są barierą regulującą wymianę płynu i cząsteczek pomiędzy przestrzenią wewnątrznaczyniową i zewnątrznaczyniową.

A. Regulacja krzepnięcia i fibrynolizy wewnątrznaczyniowej

Śródbłonek może mieć różnego typu działanie na hemostazę. W warunkach fizjologicznych przeciwdziała wewnątrznaczyniowemu wykrzepianiu krwi poprzez hamowanie tego procesu, a jednocześnie pobudzanie fibrynolizy wewnątrznaczyniowej [8]. Natomiast w przypadku uszkodzenia naczynia komórki śródbłónka przyczyniają się do pobudzenia wykrzepiania krwi w miejscu urazu [9]. Przyleganie płytek krwi do powierzchni komórek śródbłónka jest hamowane nie tylko przez obecność glikokaliks, ale także wskutek działania uwalnianych z jego komórek takich mediatorów jak prostacyklina i NO [10]. Komórki śród-

blonka produkują również enzymy degradujące czynniki przyspieszające agregację płytek krwi, co także sprowadza się do ich działania antykoagulacyjnego. Ponadto komórki śródblonka produkują silny inhibitor osoczowych czynników krzepnięcia, glikoproteinę Antytrombinę III, której aktywność jest zwiększona wskutek oddziaływania z siarczanem heparanu obecnym w glikokaliks pokrywającym powierzchnię komórek [11]. Innym czynnikiem hamującym niektóre osoczowe czynniki krzepnięcia jest kofaktor II heparyny wspomagany przez siarczan dermatanu z glikokaliks komórek [12]. Na powierzchni komórek śródblonka znajduje się białko TFPI (ang. *Tissue factor pathway inhibitor*), które blokuje przez związanie aktywny czynnik Xa, a tym samym uniemożliwia jego udział w procesie krzepnięcia krwi [13]. Komórki śródblonka produkują także trombomodulinę, która występuje na ich powierzchni, ale również jest uwalniana do krwi. Trombomodulina wiążąc się z białkiem C nasila jego działanie antykoagulacyjne polegające między innymi na wiązaniu osoczowych czynników krzepnięcia V i VIII [14]. Dodatkowo śródbłonek aktywuje białko C przez wytwarzanie na swojej powierzchni swoistego receptora dla tej cząsteczki [15].

Komórki śródblonka wykazują także silne działanie fibrynolityczne, które zależy przede wszystkim od produkcji tkankowego aktywatora plazminogenu (ang. *tissue Plasminogen Activator* - t-PA) przekształcającego plazminogen do plazminy. Ten czynnik jest produkowany jedynie w komórkach śródblonka wyściełających naczynia włosowate, ale nie we wszystkich narządach [16]. Mniejsze znaczenie w tym procesie odgrywa urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. *urokinase plasminogen activator* u-PA), który jest zlokalizowany wyłącznie w naczyniach nerki [17]. W komórkach śródblonka produkowane są także inhibitory aktywatorów plazminogenu (ang. *Plasminogen Activator Inhibitors 1, 2, 3* - PAI) [18]. W warunkach fizjologicznych dominuje aktywność tkankowego aktywatora plazminogenu, co warunkuje stałą gotowość do wewnątrznaczyniowej fibrylizy.

W stanach patologicznych takich jak uraz czy zapalenie dochodzi w komórkach śródblonka do wzmożonej ekspresji i wytwarzania tzw. Czynnika Tkankowego (ang. *Tissue Factor* -TF), który wiąże się z osoczowym czynnikiem krzepnięcia VII, aktywując go i tak powstały kompleks białkowy inicjuje w ten sposób proces krzepnięcia krwi [19]. Trombina i inne czynniki krzepnięcia wiążą się z powierzchnią komórek śródblonka za pośrednictwem syntetyzowanych przez nie receptorów dla tych białek [20].

B. Udział śródbłonka w odczynie zapalnym

W przypadku uszkodzenia tkanek lub pojawienia się obcych dla gospodarza antygenów, komórki śródbłonka wytwarzają na swojej powierzchni białka adhezyjne, które umożliwiają adhezję leukocytów do ich powierzchni a następnie przenikanie leukocytów ze światła naczynia do okolicznych tkanek [21,22]. Jednocześnie wytwarzają chemokiny (np. MCP-1 and. *Monocyte chemoattractant protein-1*, Czynn timer chemotaktyczny dla monocytów -1), które ukierunkowują ruch białych krwinek [23]. Ponadto komórki śródbłonka produkują cytokiny zapalne (np. IL-6 ang. *Interleukin 6*, TNF α ang. *Tumor Necrosis Factor*), wspomagające działanie leukocytów w odczynie zapalnym [24].

W przebiegu odczynu zapalnego dochodzi do dwustopniowego pobudzenia śródbłonka. Pierwsza faza, trwająca kilka godzin jest niezależna od aktywacji genów i ma cechy stymulacji komórek w wyniku ich ekspozycji na czynnik zapalny. W drugiej fazie odczynu zapalnego istotną rolę odgrywa aktywacja genów regulujących produkcję cytokin zapalnych, białek adhezyjnych i innych mediatorów zapalenia [25]. Czynn timer produkowane przez komórki śródbłonka przyczyniają się do wystąpienia pięciu kardynalnych cech odczynu zapalnego: *dolor* – ból, *calor* – ocieplenie, *rubor* – zaczerwienienie, *tumor* – obrzmienie, *functio laesa* – upośledzenie funkcji. Przewlekły odczyn zapalny dotyczący komórek śródbłonka jest jednym z bardziej istotnych czynników przyspieszających powstawanie zmian miażdżycowych w naczyniach tętniczych [26].

C. Regulacja oporu naczyniowego przez komórki śródbłonka

Śródbłonek produkuje czynn timer rozszerzające ścianę naczyń krwionośnych (tlenek azotu, prostacyklina, śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący) oraz czynn timer ją kurczące (tromboksan A2, prostaglandyna F, prostaglandyna H, endotelina) . [27, 28]. Ponadto komórki śródbłonka naczyń płucnych i nerkowych produkują enzym konwertujący angiotensynę I do silnie kurczącej naczynia angiotensyny II [29]. Z tego krótkiego wywodu wynika, że wypadkowy opór łożyska naczyniowego zależy między innymi od równowagi pomiędzy śródbłonkowymi czynn timerami rozszerzającymi i kurczącymi naczynia.

Produkcję tlenu azotu, przez komórki śródbłonka opisali w 1980 roku Furchgott i Zawadzki, którzy wstępnie określili go mianem śródbłonkowego czynn timer rozluźniającego (ang. *endothelial derived relaxing factor*- EDRF) a dopiero później stwierdzono strukturę chemiczną tego czynn timer, która odpowiada tlenkowi azotu (NO) [30]. Substratem do jego produkcji jest aminokwas L-arginina, a jego synteza jest katalizowana przez dwa enzymy:

konstytutywną endotelialną syntazę NO (ang. *endothelial NO synthase* - eNOS) oraz indukowaną syntazę NO (ang. *inducible NO synthase* - iNOS) [31]. Aktywność tego pierwszego enzymu jest stale obecna w komórkach śródbłonna i warunkuje produkcję tlenku azotu. Jest ona aktywowana pod wpływem zmiany napięcia stycznego (ang. *shear stress*) powierzchni komórek śródbłonna przez przepływającą falę strumienia krwi a także przez czynniki powodujące relaksację ściany naczynia krwionośnego takie jak adenozyzna, acetylocholina czy bradykinina [31]. Natomiast iNOS ulega aktywacji pod wpływem mediatorów procesu zapalnego (TNF α , Interleukina1); w warunkach spoczynkowych ilość NO produkowana w procesie katalizowanym przez ten enzym jest znikoma, natomiast podczas zapalenia jest nawet 1000 razy większa niż ilość powstającego NO w wyniku aktywności eNOS [32].

Prostacyklina jest produkowana w komórkach śródbłonna pod wpływem podobnych czynników, które pobudzają eNOS. Jej działanie nie ogranicza się tylko do relaksacji ściany naczyń krwionośnych, ale również ważne jest jej, podobnie do NO, antyagregacyjne działanie w stosunku do płytek krwi [33]. Endotelina jest produkowana w komórkach śródbłonna pod wpływem takich czynników jak hipoksja czy zmiany napięcia stycznego błony komórkowej [34].

2. ZABURZENIA CZYNNOŚCI ŚRÓDBŁONKA

Nieprawidłowa czynność śródbłonna wyściełającego wewnątrz naczyń krwionośnych może zaburzać ich strukturę i czynność. Jednym z dominujących wykładników zaburzenia czynności śródbłonna jest upośledzenie jego aktywności wazodylatacyjnej. Może to następować na drodze różnych mechanizmów powodujących niedostateczną produkcję tlenku azotu lub jego przedwczesną degradację do związków wolnorodnikowych [35]. Niektóre mechanizmy doprowadzające do zaburzenia czynności śródbłonna mogą wynikać z procesu starzenia komórek [36], inne są wynikiem działania czynników toksycznych np. nadmiernego stresu oksydacyjnego [37].

A. Starzenie śródbłonna

Starzenie śródbłonna, podobnie jak i innych komórek występujących w organizmie jest wynikiem działania wielu czynników, których skutkiem jest między innymi wzmożony wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny i skracanie telomerów. Wolne rodniki generowane wewnątrz komórek śródbłonna mogą przyspieszać proces ich starzenia na drodze różnych

mechanizmów. Strukturami szczególnie wrażliwymi na ich działanie są między innymi telomery, ale cytotoksyczne działanie wolnych rodników dotyczy również innych struktur komórkowych [38]. Mogą one powodować bezpośrednie uszkodzenie DNA w jądrze komórkowym, zaburzenie czynności mitochondriów lub aktywować różnego rodzaju kinazy w cytoplazmie. Nadmierna ekspresja, wywołana działaniem wolnych rodników, niektórych onkogenów w komórkach śródbłonna przyspiesza ich starzenie [39]. Mitochondria mogą ulegać uszkodzeniu pod wpływem działania wolnych rodników, ale jednocześnie same mogą być źródłem nadmiernej generacji wolnych rodników, co przyspiesza starzenie komórek [40]. Spośród innych czynników, które mogą powodować przyspieszenie procesu starzenia komórek śródbłonna należy także wymienić angiotensynę II [41], hiperglikemię [42] oraz produkty glikacji białek [43]

W komórkach śródbłonna aktywność telomerazy jest niższa niż w komórkach nowotworowych czy w komórkach prawidłowych, co może wskazywać na ich szybszy proces starzenia [36]. Wiele czynników może wpływać na zwiększanie lub hamowanie aktywności tego enzymu. Niektóre czynniki wzrostowe, takie jak czynnik wzrostowy dla fibroblastów typu 2 (ang. *fibroblast growth factor 2* – FGF-2) zwiększają aktywność tego enzymu w śródbłonna, a tym samym przedłużają zdolność tych komórek do replikacji [44]. W innych badaniach wykazano, że estrogeny także zwiększają aktywność telomerazy śródbłonkowej, co wydłuża żywotność tych komórek [45]. Wyniki niektórych badań wskazują, że podobne działanie w stosunku do telomerazy śródbłonkowej wykazuje tlenek azotu [46]. Jednak w innych badaniach, w których zwiększano lub zmniejszano dostępność tlenu azotu, nie stwierdzono wpływu tych działań na aktywność śródbłonkowej telomerazy [47,48]. Również stres oksydacyjny wywołany przez cytokiny zapalne, utlenowane LDL, także powoduje zmniejszenie aktywności telomerazy w komórkach śródbłonna [48].

Konsekwencją starzenia śródbłonna jest zmiana fenotypu tych komórek. Konsekwencją tych zmian jest upośledzenie zdolności tych komórek do tworzenia nowych naczyń krwionośnych [49,50], a jednocześnie dochodzi do zmian w tych komórkach, których następstwem jest ich działanie prozapalne i stymulujące wykrzepianie krwi, charakterystyczne do zmian właściwości śródbłonna w miażdżycy. Zwiększeniu ulega ekspresja interleukiny-1 α [51], białek adhezyjnych [52] oraz inhibitora aktywatora plazminogenu [53]. Cechą charakterystyczną starzejących się komórek śródbłonna jest także wzrost aktywności β -galaktozydazy co jest wykładnikiem akumulacji w lizosomach tych komórek niestrawionych materiałów [54,55]. Te komórki posiadają również zmniejszona zdolność do inicjowania przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej [56] oraz degradacji miażdżycorodnych lipoprotein [57].

W wyniku procesu starzenia dochodzi do zmian czynnościowych w komórkach śródbłonka, które powodują zmniejszenie ich wazodylatacyjnego działania na naczynia krwionośne. Z jednej strony obserwuje się zmniejszoną produkcję tlenku azotu [58], a jednocześnie jego przyspieszoną degradację w wyniku nasilonego stresu oksydacyjnego co powoduje jego przekształcenie do nadtlenoazotynu, który sam jest cytotoksycznym wolnym rodnikiem [59]. Zmniejszona produkcja tlenku azotu może być wynikiem obniżonej aktywności endotelialnej syntazy tlenku azotu co jest charakterystyczną cechą starzejących się komórek śródbłonka [60]. Również produkcja innego wazodylatacyjnego czynnika – prostacykliny była istotnie obniżona podczas starzenia komórek śródbłonka [61].

B. Stres oksydacyjny w komórkach śródbłonka

Zwiększona generacja wolnych rodników w komórkach śródbłonka ma miejsce nie tylko podczas procesu jego starzenia, ale także w przebiegu różnych stanów patologicznych. Występuje u chorych z hipercholesterolemią [62], przewlekłych palaczy [63], w różnych typach niewydolności krążenia [64], miażdżycy dotyczącej różnych części układu tętniczego [65,66], nadciśnieniu tętniczym [67].

Stres oksydacyjny jest także jednym z czynników, które powodują uszkodzenie komórek śródbłonka w przebiegu cukrzycy [68]. Hiperglikemia powoduje glikację białek [69], a także może doprowadzać do wzrostu ekspresji genów [70].

Konsekwencją stresu oksydacyjnego jest uszkodzenie komórek śródbłonka, nasilenie produkcji mediatorów zapalnych a także zmniejszenie ich działania wazodylatacyjnego. Ten ostatni efekt jest wynikiem zmniejszenia produkcji tlenku azotu i jego dostępności w ścianie naczynia tętniczego. Te zmiany są następstwem zmniejszonej ekspresji endotelialnej syntazy NO w warunkach hiperglikemii [71,72]. Jednocześnie tworzenie w warunkach stresu oksydacyjnego, podobnie jak w przypadku procesu starzenia śródbłonka, nadtlenoazotynu, który sam jest wolnym rodnikiem, powoduje nie tylko zmniejszenie dostępności tlenku azotu, a jednocześnie tworzenie substancji cytotoksycznej w stosunku do ściany naczyniowej [73]

3. PROTEKCJA KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA

Stres oksydacyjny jest jednym z głównych czynników bezpośrednio uszkadzających śródbłonek a jednocześnie inicjującym pośrednio inne procesy patologiczne. Dlatego uważa się, że ograniczenie nasilenia tego patologicznego czynnika może sprzyjać spowolnieniu

uszkodzenia śródbłonka w warunkach *in vivo*. [37]. Jednocześnie uważa się, że zachowanie prawidłowej syntezy tlenu azotu może gwarantować nie tylko prawidłowe rozszerzanie naczyń krwionośnych, ale także przeciwdziałać postępowi zmian miażdżycowych w tętnicach [74,75].

Strategia ograniczania stresu oksydacyjnego na poziomie komórek śródbłonka może polegać na zmniejszaniu produkcji wolnych rodników w samych komórkach, a jednocześnie stosowaniu zmiataaczy wolnych rodników. Statyny pierwotnie stosowane jedynie jako leki obniżające lipidemiją mają również silne działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne, co również może powodować ograniczenie narastania zmian miażdżycowych w ścianie tętnic [76]. Istotnym czynnikiem w działaniu protekcyjnym może być zmiana stylu życia oraz odpowiednia dieta. Takie postępowanie prowadzi do zmniejszenia odczynu zapalnego i stresu oksydacyjnego wynikających z nadmiaru tkanki tłuszczowej [77].

Aktualnie prowadzone są badania nad nowymi metodami protekcji komórek śródbłonka, które mogłyby, między innymi, opóźnić powstawanie zmian miażdżycowych w naczyniach. Część z tych badań jest na etapie doświadczeń *in vitro*, inne wchodzą już w etap badań klinicznych. Ponownie postuluje się podawanie związków azotynowych, nie tylko jako czynników działających wazodylatacyjnie, ale również stabilizujących komórki śródbłonka [78]. W badaniach doświadczalnych na zwierzętach zwiększenie ekspresji trombomoduliny w komórkach śródbłonka szczurów spowodowało zmniejszenie wykrzepiania krwi przy ścianie naczyń krwionośnych [79], a także ograniczenie proliferacji mięśni gładkich ściany naczynia [80]. Pochodne ziół o nazwie *Ligusticum* wykazują silne działanie antyoksydacyjne i protekcyjne w stosunku do komórek śródbłonka [81]. Analogi prostacykliny poza działaniem ochronnym na ścianę naczyniową, stymulują uwalnianie progenitorowych komórek śródbłonka u chorych z niedokrwieniem kończyn [82]. Nowym ciekawym aspektem terapii przyszłości jest modulowanie aktywności białek z grupy Sirtuin, które powodują przedłużenie życia organizmów o różnym stopniu złożoności. Są one stymulowane przez restrykcję kaloryczną [83] jak i niektóre polifenole – resweratrol występujący w czerwonym winie [84]. Resweratrol zwiększa ekspresję eNOS w komórkach śródbłonka [85].

4. SULODEKSYD – NOWY LEK MODULUJĄCY CZYNNOŚĆ ŚRÓDBŁONKA?

Sulodeksyd jest mieszaniną glikozaminoglikanów ekstrahowanych ze świńskich jelit składającą się z heparyny (około 80% całości) i siarczanu dermatanu (około 20% całości) [86]. Należy podkreślić fakt, że w odróżnieniu od heparyn, sulodeksyd wykazuje skuteczność przeciwzakrzepową zarówno podczas jego podawania drogą parenteralną jak i enteralną. Po doustnym podaniu znakowanego izotopem ^{14}C sulodeksydu u ludzi około 55% wydalanej radioaktywności stwierdzono w żółci, natomiast 23% w moczu [87]. W innych badaniach ilość wydalanego przez nerki sulodeksydu sięgała nawet 50% podanej dawki leku [88]. Nie można wykluczyć, że także komórki śródbłonna naczyniowego są miejscem degradacji mieszaniny glikozaminoglikanów wchodzących w skład preparatu sulodeksyd [89]. Z pewnością może to dotyczyć heparyny obecnej w sulodeksydzie, ponieważ poprzednio wykazano silne jej powinowactwo do komórek śródbłonna [90]. Potencjalne oddziaływanie sulodeksydu z komórkami śródbłonna sugeruje, że może on modyfikować nie tylko jego aktywność antykoagulogenną czy fibrynolityczną, ale także inne właściwości tych komórek. Wiązanie sulodeksydu z komórkami śródbłonna może powodować stymulację produkcji proteoglikanów, a jednocześnie hamować proliferację komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej [91,92]. Sulodeksyd wykazuje również zdolność do hamowania proliferacji fibroblastów [93].

Stały poziom sulodeksydu w osoczu uzyskuje się po około 4-5 dniach podawania tego leku drogą doustną [88]. Stopień eliminacji sulodeksydu z organizmu zależy od dawki leku oraz drogi jego podania i jego okres półtrwania trwa kilkanaście godzin. Warto podkreślić, że biodostępność leku była porównywalna niezależnie od tego czy był podawany dożylnie czy doustnie [88,94]

Skład sulodeksydu determinuje jego właściwości terapeutyczne, ponieważ zarówno heparyna jak i siarczan dermatanu wpływają na działanie biologiczne antytrombiny III i ko-faktora heparyny typu II, co powoduje, że lek ten wywołuje silne działanie przeciwzakrzepowe u ludzi [95,96]. Efekt działania leku był proporcjonalny do zastosowanej dawki [96]. Jego działanie polegało nie tylko na hamowaniu krzepnięcia krwi, ale także nasilało fibrynolityczną aktywność osocza. W badaniach na małpach wykazano, że doustne podanie sulodeksydu powoduje uwolnienie tkankowego oraz urokinazowego aktywatora plazminogenu [97]. Natomiast przewlekłe, przez okres 30 dni, doustne stosowanie sulodeksydu u pacjentów z zakrzepowym zapaleniem żył doprowadziło nie tylko do obniżenia poziomu fibrynogenu we krwi ale także inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 [98,99]. Wykazano skuteczne prze-

ciwzакrzepowe działanie tego leku w obrębie naczyń wieńcowych serca u chorych po przeby-
tym zawale serca [100]. Stwierdzono w tym badaniu zmniejszenie w ciągu 12 miesięcy
obserwacji o około 30 % śmiertelności w grupie chorych, którym podawano ten lek. Klinicz-
nie istotne wydłużenie czasu trombinowego uzyskuje się przy stężeniu sulodeksydu w osoczu
powyżej 2 μ g/ml [101].

Istnieją doniesienia, które wskazują na jeszcze szerszą gamę potencjalnych działań
sulodeksydu. U zwierząt doświadczalnych żywionych dietą bogatą w lipidy stwierdza się
hipercholesterolemię i nasilenie zmian miażdżycowych podczas gdy jednoczesne stosowanie
sulodeksydu częściowo je ogranicza [102]. Jednak w badaniach przeprowadzonych na pacjen-
tach uremicznych, poddawanych przewlekłej dializie otrzewnowej sulodeksyd zmniejszał
potencjał osocza do wykrzepiania, ale zmiany w poziomie osoczowych lipidów nie były sta-
tystycznie istotne [103]. Jednocześnie, w innych badaniach klinicznych wykazano, że stoso-
wanie sulodeksydu powodowało obniżenie osoczowego poziomu trójglicerydów, przy równo-
czesnym wzroście HDL-cholesterolu [104]. Sulodeksyd wpływa także korygująco na zmiany
w kłębuszkach nerkowych w przebiegu cukrzycy. Stosowanie tego leku u szczurów z do-
świadczalnie wywołaną cukrzycą ograniczało zmiany morfologiczne w kłębuszkach nerko-
wych, czego konsekwencją było zmniejszenie albuminurii [105]. Te obserwacje z badań do-
świadczalnych, wskazujące na protekcyjne działanie sulodeksydu w odniesieniu do błony
filtracyjnej kłębuszków nerkowych, znajdują potwierdzenie w niektórych badaniach klinicz-
nych [106,107,108], chociaż nie we wszystkich [109]. U pacjentów leczonych dializą otrzew-
nową obserwowano ograniczenie przezotrzewnowej utraty białek po przewlekłym dodawaniu
sulodeksydu do płynu dializacyjnego [110]. W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy,
że dootrzewnowe stosowanie sulodeksydu ogranicza wewnątrzotrzewnowy i systemowy od-
czyn zapalny u szczurów z ostrym zapaleniem otrzewnej [111]. Wyniki innych badań do-
świadczalnych sugerują, że podawanie sulodeksydu ogranicza nasilenie nadciśnienia tętnicze-
go u genetycznie predysponowanych do tego zaburzenia szczurów [112].

Obecność siarczanów heparyny i dermatanu w glikokaliks śródbłónka, a także fakt
oddziaływania sulodeksydu z powierzchnią tych komórek sugeruje, że może on zmieniać ich
czynność. Sugerowano, że sulodeksyd może działać protekcyjnie w stosunku do komórek
śródbłónka w przypadku ich ekspozycji na czynniki potencjalnie uszkodzające jak np. leuko-
cyty, czy hiperglikemię [113,114,]. W badaniach klinicznych stwierdzono, że doustne stoso-
wanie sulodeksydu u pacjentów z cukrzycą typu 2 powoduje odbudowę zniszczonej warstwy

glikokaliks komórek śródbłonka z widoczną tendencją do zmniejszenia przepuszczalności ściany naczyniowej dla albuminy [115]. Sulodeksyd także ogranicza zakres reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego u zwierząt z doświadczalnie wywołanym niedokrwieniem mięśnia sercowego [116]. Wyniki badań zarówno doświadczalnych jak i klinicznych sugerują, że właściwości czynnościowe komórek śródbłonka mogą ulegać zmianie pod wpływem działania sulodeksydu, co może poprawiać ich funkcję w różnych stanach patologicznych.

IV. CEL PRACY

Celem moich badań jest wyjaśnienie w jakim stopniu ostra lub przewlekła ekspozycja ludzkich komórek śródbłonka na sulodeksyd w warunkach hodowli *in vitro* powoduje zmianę ich czynności. Szczegółowymi problemami, które planuję zbadać są:

1. Ocena stresu oksydacyjnego i produkcji mediatorów zapalnych w komórkach śródbłonka eksponowanych na zróżnicowane stężenia sulodeksydu.
2. W jakim stopniu sulodeksyd wpływa na zmiany patologiczne w komórkach śródbłonka wywołane ich przewlekłą hodowlą *in vitro* w warunkach hiperglikemii.
3. Czy sulodeksyd wpływa na proces starzenia komórek śródbłonka w warunkach hodowli *in vitro*.

V. MATERIAŁ I METODYKA

Badania zostały wykonane na ludzkich komórkach śródbłonka pochodzących z żylnych naczyń tętninowych, utrzymywanych w hodowli *in vitro*. Pierwotne linie komórek śródbłonka z ludzkiej żyły tętninowej zostały zakupione w firmie Cascade Biologics (Paisley, Wielka Brytania). Komórki były hodowane w medium 200 PRF z dodatkiem 2% cielęcej surowicy płodowej (Cascade Biologics, Paisley, Wielka Brytania), zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów 1.5 µg/ml (Cascade Biologics, Paisley, Wielka Brytania), ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 5µg/ml (Cascade Biologics, Paisley, Wielka Brytania) oraz hydrokortyzonu 1µg/ml (Sigma, St. Louis, USA).

Komórki były hodowane w mieszaninie powietrza z dodatkiem 5% CO₂, w temperaturze 37°C, w butelkach hodowlanych o powierzchni 75 cm²(Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy). Po uzyskaniu zlewnej warstwy komórek były one złączane z butelek hodowlanych przy pomocy roztworu trypsyny-0.05%- EDTA-0.02%, dwukrotnie przepłukiwane w medium hodowlanym oraz ponownie posiewane ,w zależności od planowanego eksperymentu, w 24-studzienkowych lub 6 studzienkowych płytkach hodowlanych (Corning BV Life Sciences, Schiphol-Rijk, Holandia) lub na szkiełkach hodowlanych Lab-Tek (Nunc, Roskilde, Dania). Medium hodowlane było zmieniane w butelkach lub płytkach hodowlanych co 3 dni. Do wszystkich doświadczeń używano komórek pochodzących z 3-5 pasażu. W doświadczeniach, w których badano proces starzenia komórek doświadczenie było rozpoczynane na komórkach pochodzących z trzeciego pasażu.

W doświadczeniach oceniałam wpływ sulodeksydu (Alfa Wassermann, Bolonia, Włochy) w stężeniach 0.125 LSU/ml, 0.25 LSU/ml i 0.5LSU/ml. LSU – (ang. *Lipoprotein lipase stimulating unit* – jednostka aktywująca lipazę lipoproteinową) na czynność komórek śródbłonka w warunkach hodowli *in vitro*. W pracy przedstawiam wyniki trzech serii eksperymentów, w których oceniałam różnych warunkach działanie sulodeksydu na komórki śródbłonka:

- A. wpływ sulodeksydu na odczyn zapalny w komórkach śródbłonka
- B. działanie sulodeksydu na komórki śródbłonka jednocześnie ekspozowane na hiperglikemię
- C. wpływ sulodeksydu na proces starzenia komórek śródbłonka

Wszystkie eksperymenty były powtarzane sześciokrotnie.

1. Wpływ sulodeksydu na odczyn zapalny w komórkach śródbłonka

Badania były wykonywane na zlewnych warstwach komórek śródbłonka w 24-studzienkowych płytkach hodowlanych. Komórki były eksponowane przez okres 7 dni na następujące roztwory:

- A. Medium hodowlane - kontrola
- B. Medium hodowlane + sulodeksyd 0.125 LSU/ml
- C. Medium hodowlane + sulodeksyd 0.25 LSU/ml
- D. Medium hodowlane + sulodeksyd 0.5 LSU/ml

Medium było zmieniane co 3 dni, a po 6 dniu rozpoczynano 24 godziną inkubację, po zakończeniu której pobierano próbki medium do badań. Po usunięciu medium ze studzienek komórki złuszczano roztworem trypsyny-0.05%- EDTA-0.02%, a następnie liczone w hemocytometrze.

W próbkach medium oznaczano stężenie interleukiny-6 [IL-6] oraz białka chemotaktycznego dla monocytów typu 1 (*ang. Monocyte Chemoattractant Protein -1 :MCP-1*).

A. Oznaczanie stężenia IL-6

Stężenie ludzkiej IL-6 w próbkach medium z hodowli komórek mezotelium oznaczano za pomocą techniki immunoenzymatycznej ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) typu „sandwich”, przy użyciu kompletnego zestawu do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Czulość metody wynosiła 0.7 pg/mL. Pomiar wykonywano przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie IL-6 w badanych próbkach odczytywano na podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy IL-6 przeliczano na ilość komórek w hodowli.

B. Oznaczanie stężenia MCP-1

Stężenie MCP-1 w próbkach medium oznaczano również metodą ELISA przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu do oznaczeń firmy R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Czulość metody wynosiła 2 pg/mL. Pomiar wykonywano przy długości fali 450 nm, stosując jako referencyjną falę o długości 540 nm, na spektrofotometrze EL x 808 (Bio-Tek Instruments, USA). Stężenie MCP-1 w badanych próbkach odczytywano na

podstawie krzywej wzorcowej. Wielkość syntezy MCP-1 przeliczano na ilość komórek w hodowli.

C. Pomiar wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników

Ocenę wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników dokonywano w warstwie komórek śródbłonna hodowanych w 6-studzienkowych płytkach. Po 7 dniach ekspozycji na medium kontrolne lub medium z dodatkiem różnych stężeń sulodeksydu oceniano ilość wolnych rodników generowanych wewnątrz komórek..

Oznaczenie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników przeprowadzono przy pomocy dwuocianu 2',7' - dichlorodihydrofluoresceiny (DDF), która w obecności wolnych rodników przechodzi w 2',7' - dichlorodihydrofluoresceinę (DF), źródło fluorescencji. Po zakończeniu 7-dniowej ekspozycji na badane media, przez okres następnych 45 minut komórki były inkubowane w medium hodowlanym z dodatkiem DDF, a następnie poddawane lizie 0.1N NaOH. Fluorescencja emitowana przez uzyskane lizaty komórkowe była mierzona w spektrofлуorymetrze (Wallac-Victor; Perkin-Elmer, Turku, Finland) przy fali wzbudzenia 485 nm i fali emisji 535 nm. Uzyskane wyniki są przedstawione w arbitralnych jednostkach przeliczonych na ilość komórek. Ponieważ komórki poddawano lizie dla określenia nasilenia fluorescencji, uzyskane wyniki przeliczano na liczbę komórek w sąsiedniej studzience płytki hodowlanej, która była eksponowana przez poprzedni okres 7 dni na identyczne medium.

2. Wpływ sulodeksydu na komórki śródbłonna w warunkach przewlekłej hiperglikemii.

W tej grupie doświadczeń oceniano w jakim stopniu 7-dniowa ekspozycja komórek śródbłonna na medium z podwyższonym poziomem glukozy (30 mmol/l) wpływa na czynność tych komórek, a jednocześnie badałam, czy sulodeksyd może przeciwdziałać zmianom w komórkach spowodowanych przewlekłą hiperglikemią. Komórki eksponowane były przez okres 7 dni na następujące roztwory:

Grupa 1 - Medium hodowlane - kontrola

Grupa 2 - Medium hodowlane z glukozą 30 mmol/l

Grupa 3 - Medium hodowlane z glukozą 30 mmol/l i sulodeksydem 0.5 LSU/ml

Media w studzienkach były zmieniane co trzy dni, a podczas ostatnich 24 godzin eksperymentu oceniano czynność komórek. Po zakończeniu eksperymentu pobierano próbki

medium do oznaczeń stężenia IL-6 i MCP-1, które wykonywano w identyczny sposób jak opisano powyżej. Ilość produkowanych cytokin była przeliczana ilość komórek w studzience, które były zliczane w hemocytometrze po ich złuszczeniu roztworem trypsyny-0.05%-EDTA-0.02%.

Wewnątrzkomórkową generację wolnych rodników oceniano w komórkach hodowanych w 6-studzienkowych płytkach, po zakończeniu 7-dniowej ekspozycji na medium kontrolne lub medium z dodatkiem glukozy (30 mmol/l) lub glukozy (30 mmol/l) i sulodeksydu (0.5LSU/ml). Technikę oznaczania wolnych rodników opisałam powyżej.

A. Ocena szybkości gojenia uszkodzonej warstwy komórek śródbłonna

W tej serii doświadczeń badałam w jakim stopniu przewlekła ekspozycja komórek śródbłonna na podwyższone stężenie glukozy w medium wpływa na zdolność tych komórek do gojenia po urazie mechanicznym. Oceniałam także, czy sulodeksyd może modyfikować wpływ hiperglikemii na ten proces.

Badanie przeprowadzono na zlewnej warstwie komórek śródbłonna hodowanych w 6-studzienkowych płytkach. Po 7 dniach hodowli w badanych mediach, dokonywano uszkodzenia warstwy komórek śródbłonna w kształcie rysy, używając do tego celu narzędzia *cell-scraper* (Nunc,USA). Powierzchnia uszkodzenia była równa około 450 000 do 600 000 μm^2 . Następnie usuwano medium hodowlane, komórki przemywano roztworem Hanksa dla usunięcia złuszczonych komórek i do studzienek dodawano medium hodowlane adekwatne dla każdej grupy doświadczalnej. Następnie płytkę przenoszono do stacji Cell-Observer (Carl Zeiss Inc., Niemcy), na którą składa się mikroskop odwrócony sprzężony z kamerą cyfrową oraz mały inkubator hodowlany, ze stałą temperaturą 37°C oraz mieszaniną gazów (5% CO₂ i powietrze), w którym na czas trwania eksperymentu umieszczano hodowle. Zdjęcia komórek śródbłonna wykonywano w odstępach 15-minutowych przez okres 4 godzin. Analizę obrazu przeprowadzono przy użyciu programu Axio Vision Release 4.6 (Zeiss Microimaging GmbH, Niemcy) pod kątem przyrostu komórek śródbłonna wypełniających uszkodzoną strefę ich zlewnej warstwy, wyliczanego w μm^2 /jednostkę czasu.

3. Wpływ sulodeksydu na proces starzenia komórek śródbłonka

Badania zostały wykonane przy użyciu replikacyjnego modelu starzenia komórek w warunkach hodowli *in vitro*, który już poprzednio był stosowany w naszym laboratorium [117]. Komórki śródbłonka zostały posiane do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² z gęstością 1.25 x 10⁵ komórek/25 cm². Wyodrębniono dwie grupy badawcze:

Grupa 1- Komórki hodowane w medium hodowlanym – kontrola

Grupa 2 - Komórki hodowane w medium hodowlanym z dodatkiem sulodeksydu 0.5LSU/ml.

Posiane w butelkach komórki były po 96 godzinach hodowli zluszczone roztworem trypsyny-0.05%- EDTA-0.02%, ich ilość liczona w hemocytometrze. Następnie ponownie posiewano te komórki na butelki hodowlane o powierzchni 25 cm² z gęstością 1.25 x 10⁵ komórek/25 cm². Wykonano 15 pasażów komórkowych w każdej grupie.

Z różnicy pomiędzy ilością komórek uzyskiwanych z butelki po 96 godzinach hodowli a ilością posianych komórek na butelkę, wyliczano Czas Podwojenia Populacji (CPP) dla każdej grupy komórek, według następującego wzoru:

$$CPP = \ln 2 / [\ln (N/N_0) / T]$$

gdzie:

N – ilość komórek uzyskanych z butelki po 96 godzinach hodowli

N₀ – ilość komórek posianych na butelkę na początku pasażu

T – czas hodowli (w godzinach)

Czynność komórek śródbłonka oceniano na początku doświadczenia oraz po wykonaniu 15 pasażów. W tym celu komórki pozyskiwano z butelek przy pomocy roztworu trypsyny-0.05%- EDTA-0.02% oraz posiewano na 6-studzienkowe lub 24-studzienkowe płytki hodowlane. Komórki hodowano do momentu uzyskania ich zlewnej warstwy, w obecności medium

na które były ekspozowane podczas doświadczenia. Wtedy przystępowano do oceny ich parametrów czynnościowych:

1. Wewnątrzkomórkowa generacja wolnych rodników oceniana przy pomocy metody opisanej powyżej
2. Produkcja cytokin IL-6 i MCP-1, których stężenie w medium mierzono metodą ELISA, jak opisano powyżej, i przeliczano na ilość komórek w studziencie.
3. Hipertrofia komórek oceniana na podstawie stosunku ilości białka komórkowego do ilości komórek w studziencie. W tym celu w jednej studziencie liczono, po ich uprzednim złuszczeniu roztworem trypsyny-0.05%- EDTA-0.02%, ilość komórek przy pomocy hemocytometru. Natomiast w sąsiedniej studziencie, po odessaniu medium, dodawano roztwór 0.1 N NaOH w celu dokonania lizy białka komórkowego, którego stężenie mierzono metodą Lowry'ego [118]. Ze stosunku ilości białka do liczby komórek wyliczano współczynnik hipertrofii.
4. Szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek śródbłonna oceniana przy pomocy mikroskopu odwróconego z kamerą, usytuowanych w komorze hodowlanej, według metody opisanej powyżej.
5. Altywność β -galaktozydazy oceniano w komórkach hodowanych w komorach, w których dnem było szkiełko podstawowe Lab-Tek (Nunc, Roskilde, Dania). Po uzyskaniu zlewnej warstwy komórek w komorach hodowlanych usuwano medium, a komórki barwiono na obecność β -galaktozydazy przy pomocy komercyjnie dostępnego zestawu firmy Mirus Bio LCC (Madison, USA).

4. Analiza statystyczna wyników

Przeprowadzona analiza wykazała zgodność z rozkładem normalnym. Wyniki badań są przedstawione jako wartości średnie \pm SEM. Analizę statystyczną wykonywano przy zastosowaniu analizy wariancji z *post hoc* testem Tukeya. Wartość $p < 0.05$ przyjmowano jako statystycznie istotną.

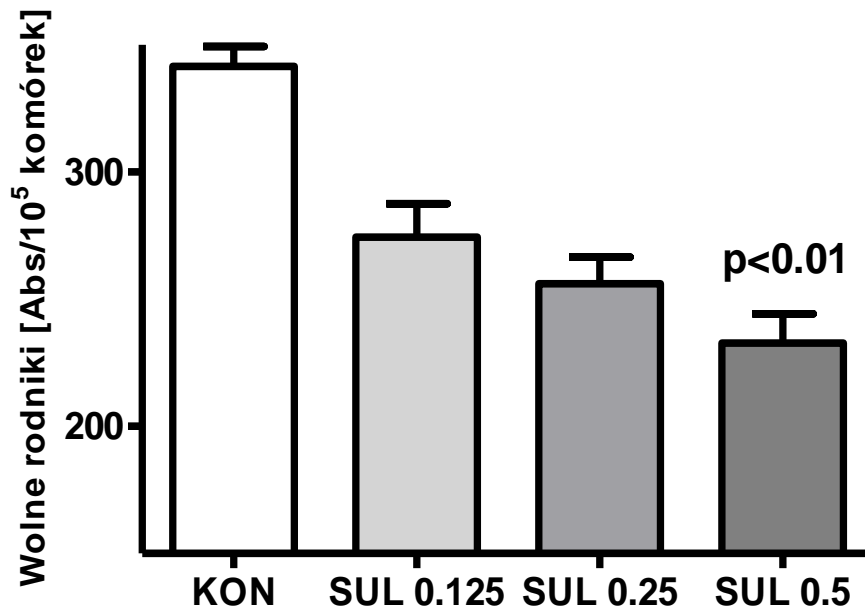
VI. WYNIKI

Sulodeksyd stosowany jako dodatek do medium, w stężeniach porównywalnych do tych, które występują w surowicy pacjentów leczonych tym lekiem, wpływał na parametry czynnościowe ludzkich komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*. Działanie sulodeksydu obserwowałam w różnych warunkach, zarówno wtedy gdy oceniałam jego efekt w kontrolnym medium hodowlanym, w medium z podwyższonym stężeniem glukozy, a także na komórkach które poddawano starzeniu w wyniku ich powtarzalnych pasaży.

1. Wpływ sulodeksydu na czynność ludzkich komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*.

Przewlekła ekspozycja, przez okres 7 dni komórek śródbłonna na medium hodowlane z dodatkiem Sulodeksydu stosowanego w stężeniach w zakresie od 0.125 LSU/ml do 0.5 LSU/ml powodowała zmniejszenie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników oraz supresję komórkowego odczynu zapalnego. Nasilenie efektu sulodeksydu było proporcjonalne do dawki leku, w przypadku generacji wolnych rodników w komórkach czy produkcji MCP-1, ale w odniesieniu do syntezy interleukiny 6 istotne zahamowanie produkcji tej cytokiny było statystycznie istotne już przy najniższym stężeniu leku.

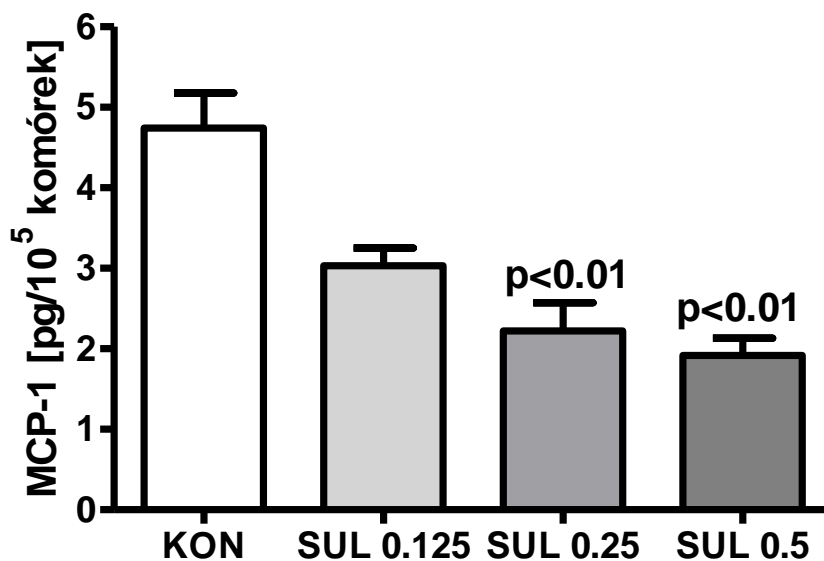
Już najniższe stężenie sulodeksydu w medium (0.125 LSU/ml) wykazywało tendencję do zmniejszania wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników w hodowanych komórkach śródbłonna. Jednak statystycznie istotne zahamowanie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników stwierdziłam przy stężeniu sulodeksydu 0.5 LSU/ml : -32% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.01$. (Rycina 1).



Rycina 1

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłonka w hodowli *in vitro* na sulodeksyd (SUL), stosowany w zakresie stężeń od 0.125 LSU/ml do 0.5 LSU/ml na wewnątrzkomórkową generację wolnych rodników. Porównanie do grupy kontrolnej (KON), w której komórki były hodowane w medium bez dodatku sulodeksydu.

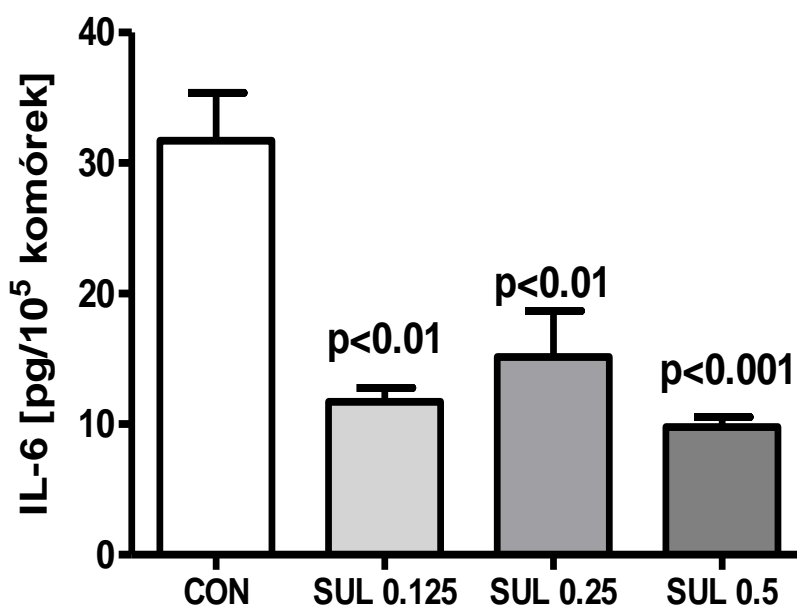
Produkcja MCP-1 w komórkach śródbłonka była hamowana pod wpływem sulodeksydu, a obserwowany efekt był proporcjonalny do stosowanego stężenia leku. Już przy najniższym jego stężeniu obserwowano silną tendencję do zmniejszenia produkcji MCP-1, ale ta zmiana nie była statystycznie istotna. Natomiast statystycznie istotny efekt obserwowano przy stężeniu sulodeksydu 0.25 LSU/ml (zahamowanie o 51% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.01$), a maksymalny efekt (zahamowanie o 60% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.01$) przy stężeniu 0.5 LSU/ml (Rycina 2).



Rycina 2

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłonka w hodowli *in vitro* na sulodeksyd (SUL), stosowany w zakresie stężeń od 0.125 LSU/ml do 0.5 LSU/ml, na produkcję MCP-1 w tych komórkach.. Porównanie do grupy kontrolnej (KON), w której komórki były hodowane w medium bez dodatku sulodeksydu.

Najsilniejszy efekt przeciwzapalny sulodeksydu obserwowano w przypadku działania tego leku na produkcję interleukiny-6 w komórkach śródbłonka w hodowli *in vitro*. Statystycznie istotne zahamowanie produkcji interleukiny-6 stwierdziłam już przy najniższym stosowanym stężeniu sulodeksydu 0.125 LSU/ml (-65% w porównaniu do kontroli, $p < 0.01$). Produkcja interleukiny-6 po ekspozycji komórek na wyższe stężenia sulodeksydu np. 0.25 LSU/ml czy 0.5 LSU/ml nie powodowała nasilenia zahamowania interleukiny 6 w komórkach śródbłonka (Rycina 3).



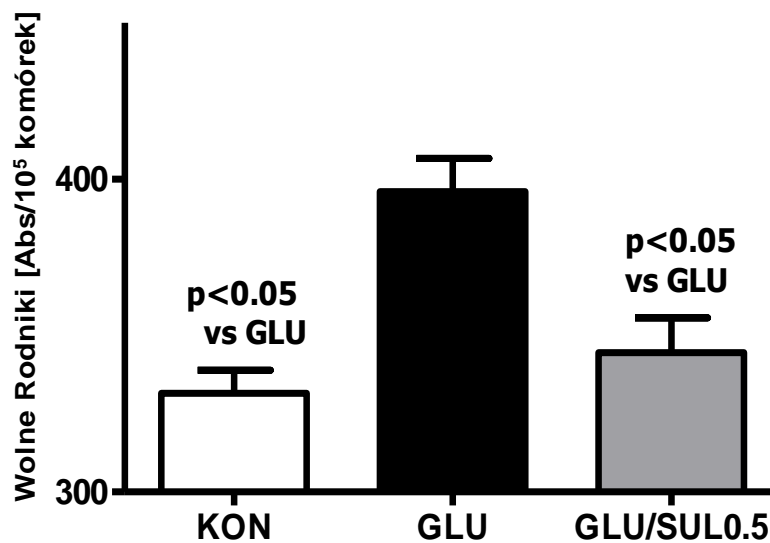
Rycina 3

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłonna w hodowli *in vitro* na sulodeksyd (SUL), stosowany w zakresie stężeń od 0.125 LSU/ml do 0.5 LSU/ml na produkcję interleukiny 6 (IL-6) w tych komórkach. Porównanie do grupy kontrolnej (KON), w której komórki były hodowane w medium bez dodatku sulodeksydu.

2. Efekt przewlekłej hiperglikemii na komórki śródbłonna – modyfikujące działanie sulodeksydu

Przewlekła, trwająca 7 dni, ekspozycja komórek śródbłonna na medium hodowlane z dodatkiem glukozy 30 mmol/l powodowała zwiększony odczyn zapalny w komórkach, czego wykładnikiem jest nasilony wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny czy zwiększona produkcja interleukiny- 6 i MCP-1. Efekt hiperglikemii na komórki śródbłonna był hamowany w przypadku gdy komórki były ekspozycjonowane jednocześnie na podwyższone stężenie glukozy w medium (30 mmol/l) i sulodeksyd (0.5 LSU/ml).

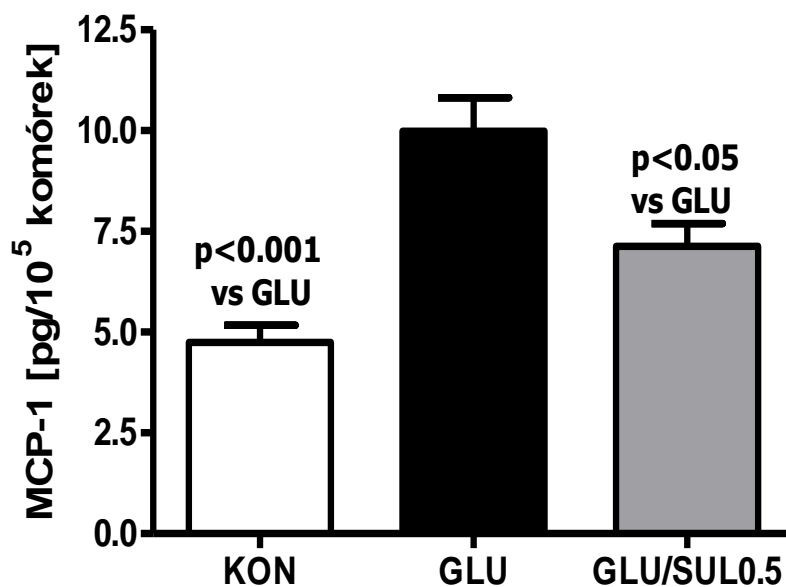
Przewlekła hiperglikemia (30 mmol/l) powodowała zwiększenie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników (+ 20% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.05$) i ten efekt był hamowany w przypadku gdy komórki były jednocześnie ekspozycje na hiperglikemię i sulodeksyd 0.5 LSU/ml (Rycina 4). Nie stwierdziłam statystycznie istotnej różnicy pomiędzy ilością wolnych rodników tworzonych w komórkach z grupy kontrolnej i komórkach jednocześnie ekspozycje na hiperglikemię i sulodeksyd.



Rycina 4

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłónka w hodowli *in vitro* na medium hodowlane z dodatkiem glukozy 30 mmol/l (GLU) lub glukozy 30 mmol/l i sulodeksydu 0.5 LSU/ml (GLU/SUL0.5) na wewnątrzkomórkową generację wolnych

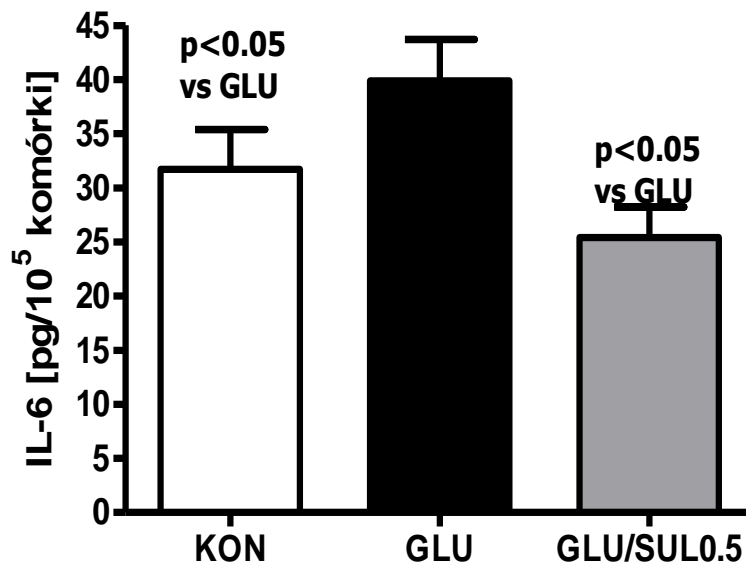
Podwyższone stężenie glukozy w medium (30 mmol/l) powodowało zwiększenie produkcji MCP-1 w komórkach śródbłónka (+ 112% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.001$) i ten efekt był częściowo hamowany gdy jednocześnie komórki były ekspozycje na sulodeksyd w stężeniu 0.5 LSU/ml (Rycina 5). Natomiast brak jest statystycznie istotnej różnicy pomiędzy ilością produkowanego MCP-1 w komórkach kontrolnych i w komórkach śródbłónka ekspozycje na hiperglikemię i sulodeksyd.



Rycina 5

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłónka w hodowli *in vitro* na medium hodowlane z dodatkiem glukozy 30 mmol/l (GLU) lub glukozy 30 mmol/l i sulodeksydu 0.5 LSU/ml (GLU/SUL0.5) na produkcję MCP-1.

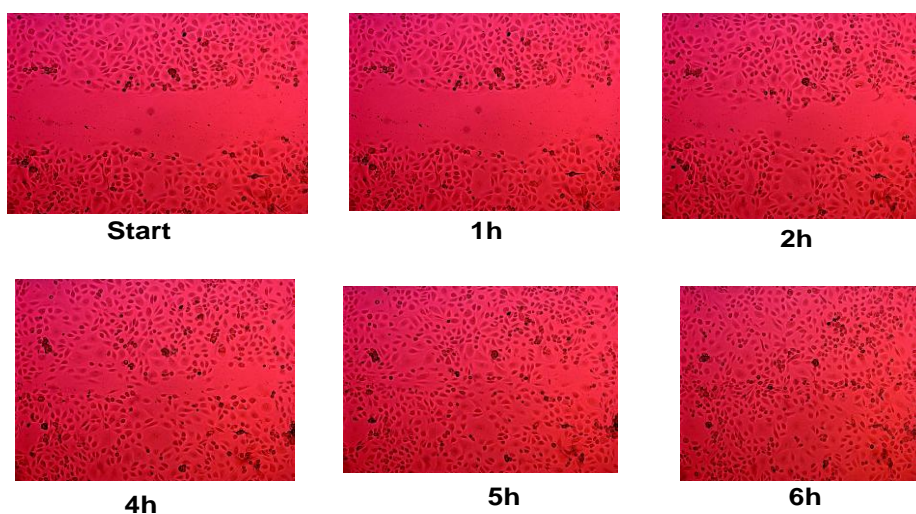
Również produkcja interleukiny-6 była zwiększona w komórkach śródbłónka ekspozycjonowanych na podwyższone stężenie glukozy (30 mmol/l) w medium hodowlanym (+25% w porównaniu do grupy kontrolnej, $p < 0.05$) i ten efekt był hamowany przez jednoczesną ekspozycję na sulodeksyd 0.5 LSU/ml w medium. (Rycina 6). Komórki śródbłónka hodowane w medium z podwyższonym stężeniem glukozy oraz sulodeksydem produkowały porównywalną z grupą kontrolną ilość interleukiny 6. Wręcz była widoczna tendencja zmniejszonej produkcji tej cytokiny podczas ekspozycji komórek na hiperglikemię i sulodeksyd (Rycina 6).



Rycina 6

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłónka w hodowli *in vitro* na medium hodowlane z dodatkiem glukozy 30 mmol/l (GLU) lub glukozy 30 mmol/l i sulodeksydu 0.5 LSU/ml (GLU/SUL0.5) na produkcję interleukiny 6 (IL-6).

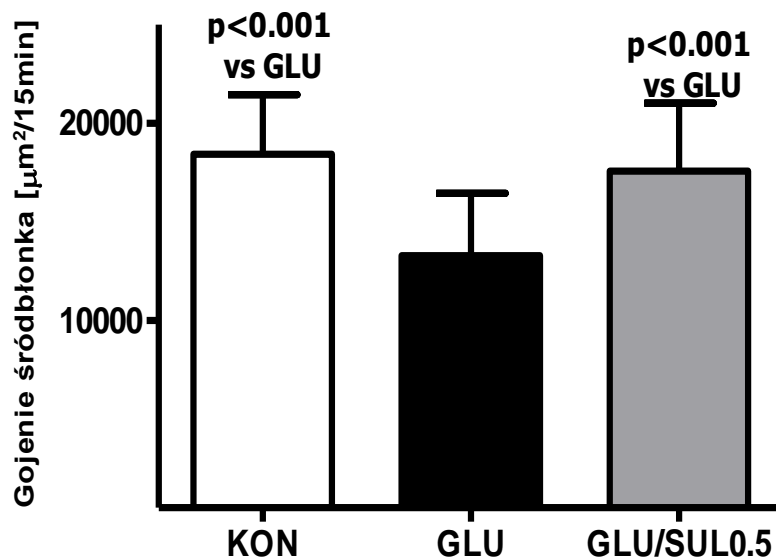
Zlewna warstwa komórek śródbłónka w hodowli *in vitro* po mechanicznym urazie powodującym zniszczenie pasma komórek ulega szybkiemu gojeniu. Podczas tego procesu pasmo z usuniętymi komórkami ulega szybkiemu gojeniu w wyniku proliferacji/migracji komórek, które wypełniają puste pole pozostałe po zniszczonych/usuniętych komórkach. Dynamika tego procesu w warunkach hodowli *in vitro* jest duża i po kilku godzinach dochodzi do całkowitego zagojenia uszkodzonego miejsca. Przykładowa dynamika tego procesu jest przedstawiona na Rycinie 7.



Rycina 7

Gojenie mechanicznie uszkodzonej warstwy śródbłonka w warunkach hodowli *in vitro*. Na początku obserwacji (Start) widoczne jest pasmo uszkodzenia, którego szerokość ulega zężeniu z upływem czasu. W 6 godzinie doświadczenia pierwotne pasmo uszkodzenia jest niezauważalne.

Komórki śródbłonka przewlekle eksponowane przez okres 7 dni na podwyższone stężenie glukozy w medium (30 mmol/l) wykazywały upośledzoną zdolność do gojenia po ich mechanicznym uszkodzeniu. Szybkość gojenia tych komórek była wolniejsza średnio o 28% niż w grupie kontrolnej ($p < 0.01$). Jednak w przypadku gdy komórki były przewlekle eksponowane na hiperglikemię i sulodeksyd (0.5LSU/ml) szybkość gojenia uszkodzonej zlewnej warstwy komórek była podobna jak w grupie kontrolnej (Rycina 8).



Rycina 8

Wpływ przewlekłej ekspozycji komórek śródbłonka w hodowli *in vitro* na medium hodowlane z dodatkiem glukozy 30 mmol/l (GLU) lub glukozy 30 mmol/l i sulodeksydu 0.5 LSU/ml (GLU/SUL0.5) na szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek śródbłonka.

3. Wpływ sulodeksydu na proces replikacyjnego starzenia komórek śródbłonka w hodowli *in vitro*

Komórki śródbłonka poddane starzeniu w wyniku powtarzalnych pasażów komórkowych wymuszających ich stałą replikację wykazywały zmiany czynnościowe charakterystyczne dla starzejących komórek. Z widocznych zmian morfologicznych należy wymienić hipertrofię tych komórek oraz zwiększoną wewnątrzkomórkową aktywność β -galaktozydazy. Jednocześnie można było zaobserwować zwiększony wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny, czego wykładnikiem była zwiększona generacja wolnych rodników. Ponadto istotnemu zwiększeniu uległa produkcja cytokin zapalnych. Szybkość proliferacji tych komórek była zmniejszona, co ma odbicie w wydłużonym czasie podwojenia populacji, a także wykazywały one mniejszą zdolność do gojenia uszkodzonej warstwy komórek. Średnie wartości dla komórek kontrolnych, hodowanych w standardowym medium hodowlanym na początku eksperymentu oraz po 15 pasażach są przedstawione w Tabeli 1.

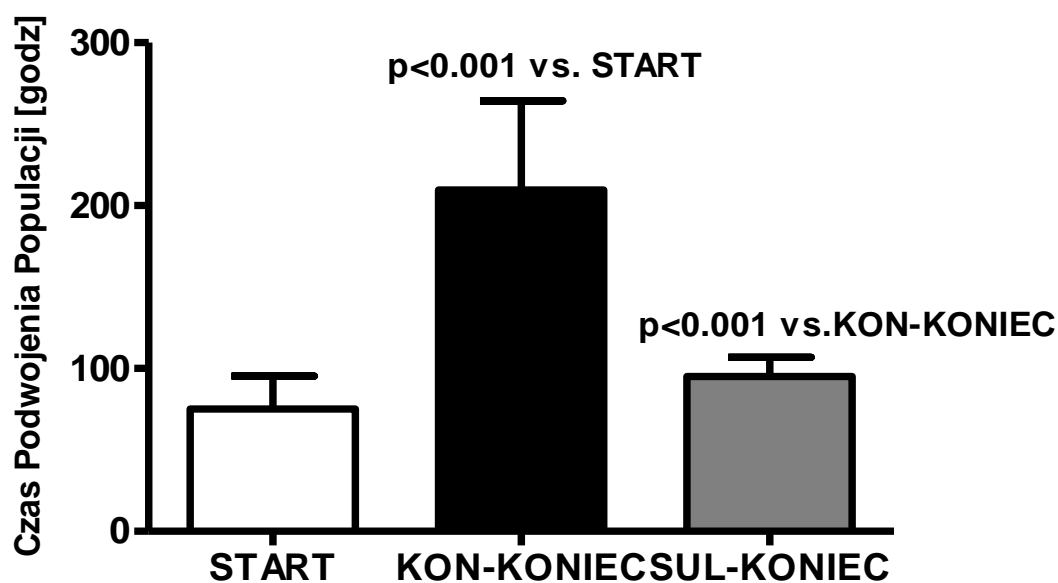
PARAMETR	START	KONIEC
Generacja Wolnych Rodników [Absorbancja/10⁵ komórek/]	71187 ± 22356	677811 ± 188418 p<0.005
B-Galaktozydaza [jednostki]	77 ± 8	129 ± 14 p<0.05
Czas Podwojenia Populacji [godziny]	75 ± 20	210 ± 55 p<0.005
IL-6 [pg/10⁵ komórek]	3724 ± 1108	10219 ± 2525 p<0.005
MCP-1 [pg/10⁵ komórek]	380 ± 61	687 ± 184 p<0.01
Gojenie śródbłonka [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]	9759 ± 818	5720 ± 2366 p<0.05
Hipertrofia komórek [μg białka/10⁵komórek]	237 ± 61	487 ± 127 p<0.005

Tabela 1

Parametry czynnościowe komórek śródbłonka na początku eksperymentu (START) i po 15 pasażach (KONIEC)

Komórki eksponowane, w podobnym układzie eksperymentalnym, powodującym ich starzenie, na medium wzbogacone sulodekсыdem (0.5 LSU ml) wykazywały mniejsze nasilenie parametrów odzwierciedlających nasilenie procesu starzenia. Obserwowałam również tendencję do hipertrofii tych komórek: 351 ± 86 μg białka/10⁵ komórek w stosunku do wartości wyjściowych na początku eksperymentu: 237 ± 61 $\mu\text{g}/10^5$ komórek ale ta różnica nie była statystycznie istotna, w przeciwieństwie do komórek z grupy kontrolnej (487 ± 127 μg białka/10⁵ komórek), w których nasilenie hipertrofii było statystycznie większe w porównaniu do początku badania.

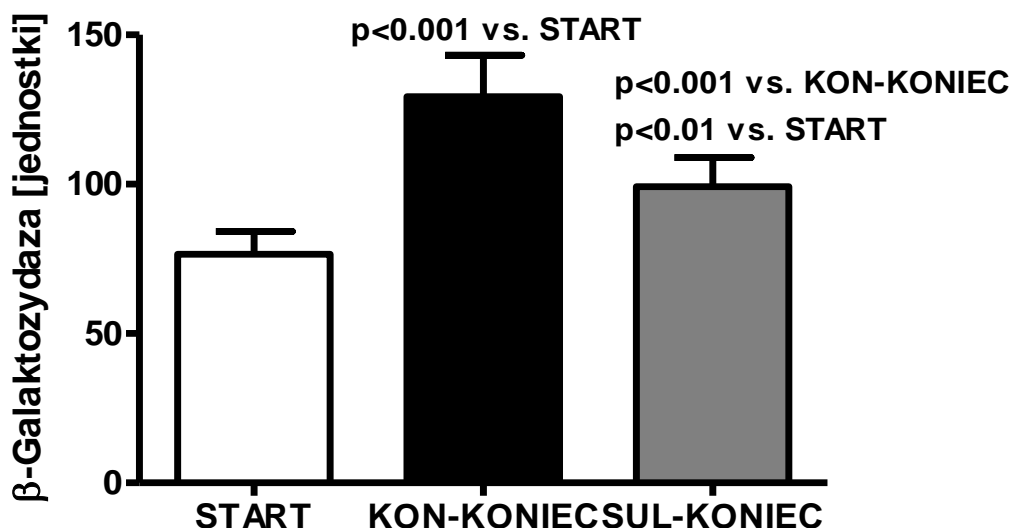
Obecność sulodeksydu w medium hodowlanym ograniczała wydłużenie czasu podwojenia populacji komórek podczas procesu starzenia. Średnia wartość czasu podwojenia populacji była o 55 % krótsza ($p < 0.001$) niż w kontrolnej grupie komórek poddawanych procesowi starzenia. Natomiast jej długość nie ulegała istotnemu wydłużeniu w porównaniu z początkiem eksperymentu (Rycina 9).



Rycina 9

Czas podwojenia populacji komórek śródbłónka na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).

W komórkach poddawanych replikacyjnemu starzeniu zwiększała się aktywność β -galaktozydazy w grupie kontrolnej jak i w grupie komórek eksponowanych na sulodeksyd. Jednak na końcu eksperymentu aktywność tego enzymu w komórkach hodowanych w obecności sulodeksydu była o 23% niższa ($p < 0.01$) niż w grupie kontrolnych komórek (Rycina 10).

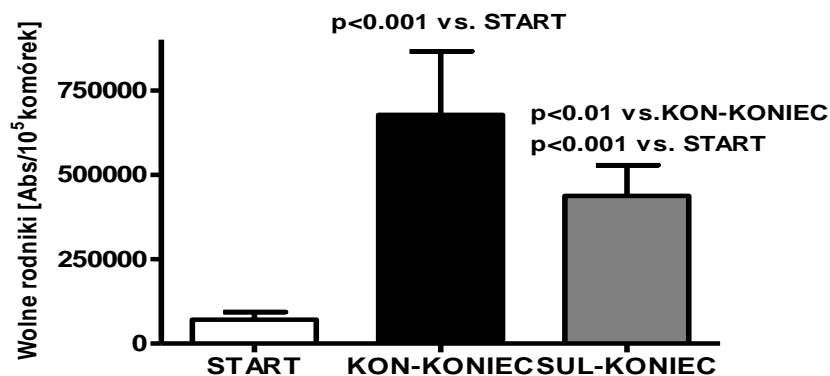


Rycina 10

Aktywność β -galaktozydazy w komórkach śródbłonka na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).

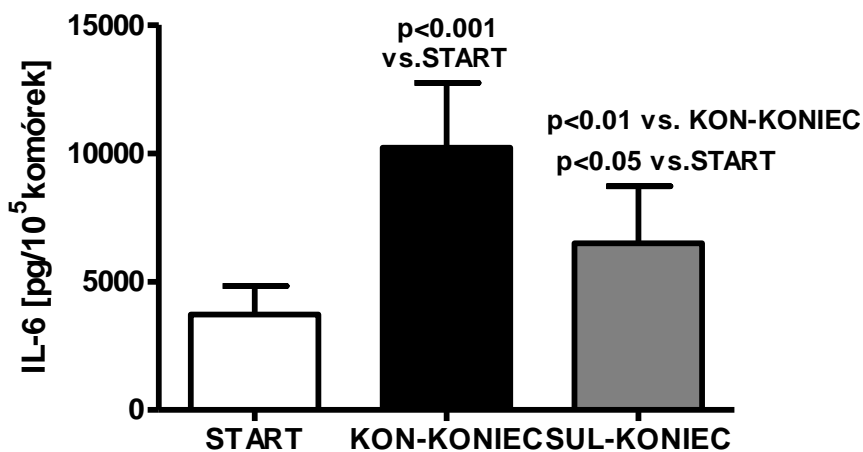
Podczas procesu replikacyjnego starzenia komórek zwiększała się ilość wewnątrzkomórkowo generowanych wolnych rodników w obu badanych grupach. Jednak proces ten był bardziej nasilony w komórkach hodowanych w standardowym medium. Hodowla komórek w medium z dodatkiem sulodeksydu (0.5 LSU/ml) zmniejszała nasilenie tego efektu. Generacja wolnych rodników w tej grupie komórek była o 41% niższa ($p < 0.001$) niż w grupie kontrolnej (Rycina 11).

Konsekwencją starzenia komórek śródbłonka poddawanych powtarzalnym pasażom było nasilenie produkcji przez nie cytokin zapalnych. Zwiększeniu ulegała produkcja interleukiny-6, ale ten proces był mniej nasilony w przypadku gdy komórki były hodowane w medium wzbogaconym w sulodeksyd. W tej grupie komórek produkcja interleukiny-6 była zmniejszona o 44% ($p < 0.01$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 12).



Rycina 11

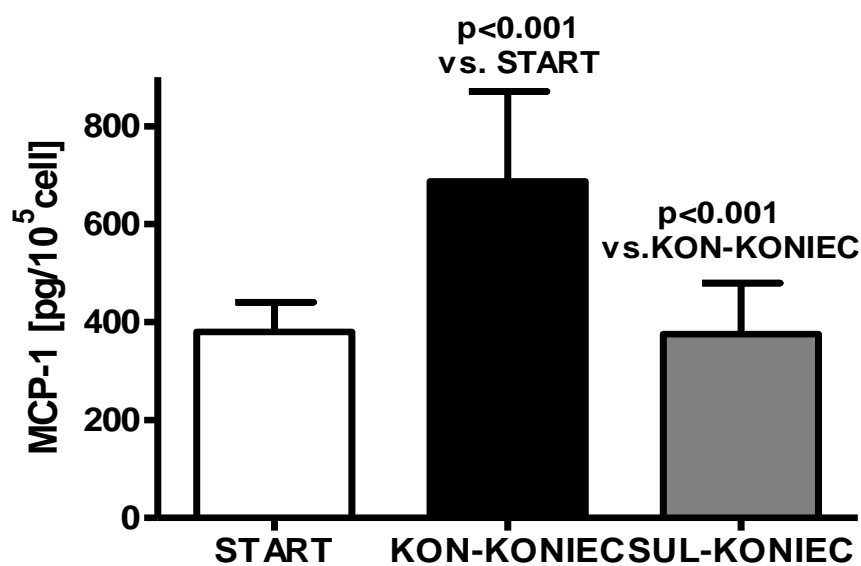
Wewnątrzkomórkowa generacja wolnych rodników w komórkach śródbłonna na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).



Rycina 12

Produkcja interleukiny 6 (IL-6) komórkach śródbłonna na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).

Starzenie komórek w modelu doświadczalnym zastosowanym w tej pracy powodowało także zwiększoną produkcję MCP-1. Ponownie dodanie sulodeksydu do medium hodowlanego zmniejszało nasilenie tego procesu. Produkcja MCP-1 w grupie komórek ekspozowanej na sulodeksyd była o 54% ($p < 0.001$) niższa niż w komórkach grupy kontrolnej (Rycina 13).

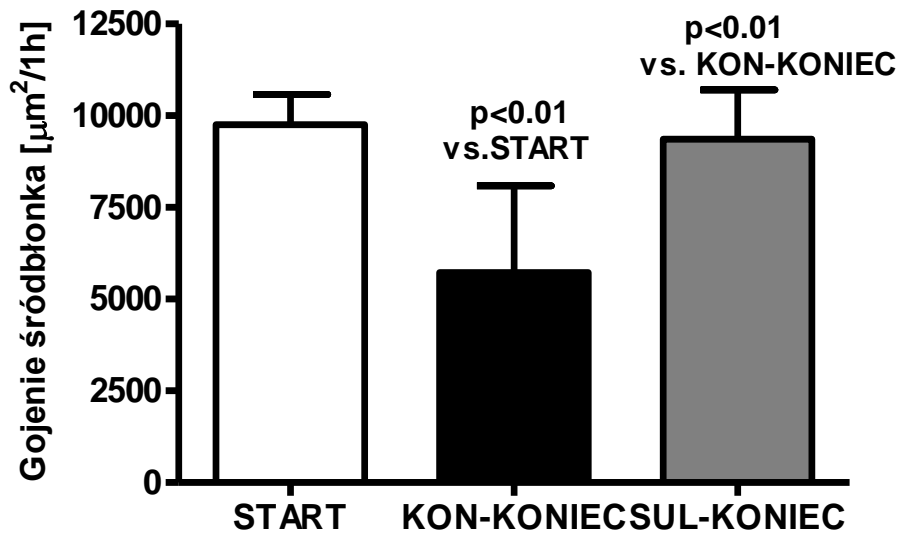


Rycina 13

Produkcja MCP-1 komórkach śródbłonna na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).

Zlewna warstwa komórek śródbłonna wykazuje, po mechanicznym uszkodzeniu jej ciągłości, dużą zdolność do gojenia (Rycina 7). Komórki, które uległy starzeniu w wyniku powtarzalnych w krótkim okresie czasu replikacji mają osłabioną zdolność do gojenia. Jednak gdy proces replikacyjnego starzenia komórek jest wywoływany w obecności sulodeksydu (0.5 LSU/ml) zdolność do gojenia uszkodzonej warstwy komórek jest w mniejszym stopniu upośledzona. Szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek była większa w grupie komó-

rek ekspozowanych na sulodeksyd (+ 64%, $p < 0.01$), w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej (Rycina 14).



Rycina 14

Szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek śródbłónka na początku eksperymentu (START) oraz po 15 pasażach w medium kontrolnym (KON-KONIEC) lub w medium z dodatkiem sulodeksydu (SUL-KONIEC) (0.5 LSU/ml).

VII. Dyskusja

Przedstawione w obecnej pracy wyniki badań doświadczalnych dowodzą, że lek sulodeksyd będący mieszaniną siarczanu heparyny i siarczanu dermatanu wpływa na czynność ludzkich komórek śródbłonna. To działanie ma charakter protekcyjny, antyoksydacyjny, przeciwzapalny. Można przypuszczać, że wszystkie te efekty mogą powodować przedłużenie żywotności śródbłonna w warunkach *in vivo*. Należy jednak z ostrożnością ekstrapolować uzyskane w tych badaniach wyniki do warunków klinicznych. Jednym z czynników za tym przemawiających może być fakt, że obecne badania wykonano na komórkach śródbłonna pochodzących z ludzkich żył pępowinowych. Wiadomo tymczasem, że pomimo wielu cech wspólnych, istnieje silne zróżnicowanie strukturalne i czynnościowe komórek śródbłonna [119]. Różnice dotyczą nie tylko komórek śródbłonna pochodzących z naczyń tętniczych czy żylnych, ale zależą także od wielkości naczynia czy narządu w którym się znajduje. Stąd nasilenie obserwowanych w moich badaniach efektów działania sulodeksydu na poziomie śródbłonna może być niejednakowe w różnych naczyniach krwionośnych.

Siarczan heparyny i siarczan dermatanu fizjologicznie występują w organizmie, w glikokaliks pokrywającym powierzchnię śródbłonna wpływając pośrednio i bezpośrednio z powodu wytwarzanego ujemnego ładunku elektrycznego na właściwości przeciwkrzepliwe tych komórek [5,6]. Wiele czynników może zmieniać ilość glikozaminoglikanów na powierzchni komórek śródbłonna. Wykazano, że silny przepływ krwi powodujący znaczny efekt ugięcia powierzchni komórek (ang. *shear stress*) nasila produkcję tych związków w komórkach śródbłonna [120]. Natomiast niedotlenienie i następowa reperfuzja powodują degradację glikokaliks na powierzchni komórek śródbłonna [121]. Podobne działanie ma odczyn zapalny [122] Również hiperglikemia powoduje zmniejszenie grubości glikokaliks pokrywającej powierzchnię komórek śródbłonna. W warunkach hodowli *in vitro* efekt ten jest widoczny już po kilku dniach ekspozycji na stężenie glukozy równe 25 mmol/l i obserwowane zmiany nie były skutkiem efektu osmotycznego glukozy [123]. Wykazano, że zmniejszenie grubości glikokaliks pokrywającego śródbłonek u ludzi z doświadczalnie wywołaną hiperglikemią doprowadza do aktywacji wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [124].

Zmniejszenie grubości glikokaliks w śródbłonku powoduje jego upośledzona reakcję na efekt ugięcia jego powierzchni pod wpływem przepływającej krwi, co może mieć negatywne skutki, takie jak na przykład zmniejszona produkcja tlenu azotu [125]. Ponadto może

dochodzić do zwiększenia przepuszczalności warstwy śródbłonka, a tym samym ściany mikrona czyń czego następstwem jest nieprawidłowa wymiana płynów i cząsteczek pomiędzy przestrzenią wewnątrznacyniową a zewnątrznacyniową [126]. Stąd podejmowane są różnego rodzaju działania takie jak modyfikacja stresu oksydacyjnego, stosowanie substancji hamujących odczyn zapalny czy utrzymywanie właściwego poziomu albuminy w osoczu, które mają stabilizować glikokaliks na powierzchni komórek śródbłonka, a tym samym zapobiegać dysfunkcji komórek śródbłonka [127]. W badaniach klinicznych wykazano, że jednym z czynników potencjalnie stabilizujących glikokaliks śródbłonka w warunkach hiperglikemii, a nawet zwiększających jego grubość a tym samym zmniejszającą przepuszczalność ściany naczyniowej jest sulodeksyd [115]. Wyniki moich badań potwierdzają protekcyjne działanie sulodeksydu w odniesieniu do komórek śródbłonka hodowanych *in vitro* w warunkach hiperglikemii w medium.

Myśląc o ekstrapolowaniu uzyskanych wyników z doświadczeń *in vitro* do warunków klinicznych należy zwrócić uwagę na stężenia tego leku stosowane w obecnych badaniach. W warunkach klinicznych sulodeksyd może być bezpiecznie stosowany w dawce do 1200 LSU na dobę. Jeżeli przyjmiemy średnią objętość osocza około 2.5 litra, możemy oczekiwać maksymalnego stężenia tego leku w osoczu rzędu około 0.5 LSU/ml [128]. W moich badaniach ten sam rząd wielkości stężenia sulodeksydu był stosowany (0.125 – 0.5 LSU/ml), a należy zwrócić uwagę na fakt, że niektóre efekty działania tego leku były widoczne już przy najniższym ze stosowanych stężeń. Pozwala to uważać, że przedstawione w tej pracy wyniki z badań doświadczalnych mogą mieć odniesienie do warunków *in vivo*, gdy lek jest podawany pacjentom w dawkach terapeutycznych.

Glikozaminoglikany i proteoglikany wywołują silne działanie przeciwzapalne na poziomie komórkowych np. makrofagi [129], fibroblasty [130] jak i w strukturach bardziej złożonych jak kłębuszki nerkowe [131]. Wyniki moich badań dowodzą, że podobne działanie sulodeksydu będącego mieszaniną glikozaminoglikanów ma miejsce w odniesieniu do ludzkich komórek śródbłonka naczyniowego. Niektóre efekty były widoczne już przy stosowaniu najniższego stężenia sulodeksydu (0.125 LSU/ml). Produkcja interleukiny-6 była w porównywalny, dla wszystkich stosowanych stężeń sulodeksydu, hamowana w hodowanych komórkach śródbłonka (Rycina 3). Statystycznie istotne zahamowanie produkcji MCP-1 było widoczne przy stężeniu sulodeksydu 0.25 LSU/ml (Rycina 2), natomiast obniżenie wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników przy stężeniu 0.5 LSU/ml (Rycina1). Hamowanie

stresu oksydacyjnego w warunkach hiperglikemii było już obserwowane w badaniach *in vivo* u pacjentów z nefropatią cukrzycową leczonych przewlekle sulodeksydem z powodu albuminurii [132]. Przeciwwzpalne działanie sulodeksydu opisywano także w innych układach eksperymentalnych. W naszych poprzednich doświadczeniach na szczurach wykazaliśmy, że sulodeksyd ogranicza systemowy i lokalny, wewnątrzotrzewnowy odczyn zapalny podczas ostrego zapalenia otrzewnej [111]. Wyrazem działania przeciwzapalnego oraz antyoksydacyjnego sulodeksydu może być obserwowane zmniejszenie obszaru uszkodzenia mięśnia sercowego u królików z niedokrwieniem i następową reperfuzją mięśnia sercowego [116]. Należy zwrócić uwagę, że w tych ostatnich badaniach nie obserwowano zaburzeń krzepliwości krwi u badanych zwierząt, co wskazuje na to, że sulodeksyd jest bezpiecznym lekiem, nawet w stanach ostrych jak np. niedokrwienie-reperfuzja mięśnia sercowego. Wyniki prezentowanych w tej pracy badań po raz pierwszy pokazują, że sulodeksyd może bezpośrednio hamować odczyn zapalny na poziomie komórek śródbłonka naczyniowego.

Komórki śródbłonka regulują odczyn zapalny ale także mogą w nim uczestniczyć. W warunkach spoczynkowych komórki śródbłonka produkują różne substancje biologicznie aktywne regulujące wielkość przepływu krwi, a także zapewniają płynność krwi wskutek utrzymywania równowagi pomiędzy czynnikami przyspieszającymi jej krzepnięcie, hamującymi ten proces a także białkami regulującymi proces fibrynolizy. Istnieje przewaga uwalnianych czynników o działaniu przeciwzapalnym w porównaniu do prozapalnych cytokin i chemokin. Po stymulacji bodźcem zapalnym w komórkach śródbłonka inicjowane są dwa procesy: szybki polegający na uwalnianiu dostępnych mediatorów zapalenia oraz wolniejszy, zależny od zwiększenia ekspresji genów i w dalszej konsekwencji powodujący masową produkcję czynników regulujących proces zapalnych [25]. Istotnym aspektem czynności komórek śródbłonka jest w tych stanach produkcja chemokin (np. MCP-1), które powodują napływ leukocytów do środowiska z odczynem zapalnym i dalsze nasilenie odczynu zapalnego [133]. Niekontrolowany proces zapalny może powodować znaczne uszkodzenie tkanek i w konsekwencji trwale zaburzenie funkcji narządów, również śródbłonka który w tym procesie aktywnie uczestniczy. Stąd tak ważna jest możliwość kontrolowania intensywności zapalenia. Wydaje się, że sulodeksyd może być stosowany w tym celu. Jego działanie przeciwzapalne może wynikać z obecności drobnocząsteczkowej heparyny w jego składzie. Jej działanie antyoksydacyjne obserwowano w różnych typach leukocytów [134,135]. Ponadto heparyna hamuje w leukocytach ekspresję genów regulujących wytwarzanie cytokin w leukocytach [136]. Systemowe przeciwzapalne i antyoksydacyjne działanie heparyny obserwowano także

w warunkach *in vivo*, u pacjentów poddawanych powtarzalnym hemodializom [137]. W innych badaniach sulodeksyd zmniejszał nasilenie stresu oksydacyjnego u pacjentów z niedokrwinną chorobą serca, ale nie wpływał na systemowy odczyn zapalny mierzony poziomem fibrynogenu, białka C-reaktywnego czy leukocytów we krwi [138]. W moich badaniach miarą odczynu zapalnego śródbłonna było uwalnianie interleukiny-6 i MCP-1 i w obu przypadkach stwierdziłam znaczne obniżenie produkcji tych cytokin.

Sulodeksyd może wywierać działanie przeciwzapalne pośrednio, w wyniku stymulacji uwalnianych innych substancji o działaniu przeciwzapalnym. Borawski i wsp. zaobserwowali, że po dożylnym podaniu sulodeksydu u ludzi we krwi wzrasta kilkukrotnie stężenie wątrobowego czynnika wzrostu (ang. *Hepatocyte Growth Factor* – HGF) [139]. Uważa się, że HGF może być jednym z czynników stabilizujących śródbłonek w warunkach mocznicy, między innymi w wyniku swojego działania przeciwzapalnego [140]. W badaniach wykonanych w Zakładzie Patofizjologii UMP potwierdzono obserwacje Borawskiego o silnym wzroście poziomu HGF w osoczu po podaniu sulodeksydu. Jednocześnie stwierdzono, że obecność podwyższonego stężenia HGF w medium hodowlanym powoduje nasiloną adhezję naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF) do komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*, co tłumaczy równoczesne ze wzrostem HGF w osoczu obniżenie poziomu VEGF. Morishita i wsp. wykazali, że komórki śródbłonna pochodzące z ludzkiej aorty mają zdolność produkowania HGF [141], ale nie stwierdzono tego w komórkach śródbłonna pochodzących z żył pępowinowych (Bręborowicz – publikacja w przygotowaniu). Prezentowane w tej pracy badania były wykonywane w warunkach hodowli *in vitro*, stąd można przypuszczać, że obserwowane przeciwzapalne działanie sulodeksydu nie było zależne od obecności HGF.

Hiperglikemia w przebiegu cukrzycy jest jednym z najczęstszych czynników powodujących zaburzenie funkcji komórek śródbłonna, a tym samym przyspieszenie powstawania zmian miażdżycowych [142]. Cytotoksyczność glukozy może wynikać z aktywacji różnych patologicznych procesów jak np. glikacja białek lub nadmiernej aktywacji procesów fizjologicznych jak np. szlak poliowy czy aktywacja kinazy białkowej typu C (ang. *C protein kinase*) [143]. Konsekwencją części z tych procesów jest zwiększony stres oksydacyjny w komórkach, który może wynikać z nasilonej wewnątrzkomórkowej generacji wolnych rodników lub upośledzenia komórkowych mechanizmów antyoksydacyjnych [144]. W moich doświadczeniach stwierdziłam nasilony stres oksydacyjny w komórkach śródbłonna podczas ich ekspo-

zycji na medium z podwyższonym stężeniem glukozy (Rycina 4). W innych badaniach wykonywanych również na komórkach śródbłonna pochodzących z ludzkiej żyły pępowinowej, wykazano zwiększony poziom dialdehydu malonowego w lizacie komórkowym po ich 48 godzinnej ekspozycji na podwyższony poziom glukozy w medium, co również świadczy o zwiększonym stresie oksydacyjnym w tych komórkach [145]. Nasilony stres oksydacyjny może być jednym z czynników inicjujących odczyn zapalny w komórkach śródbłonna [146]. Rzeczywiście w moich doświadczeniach obserwowałam nasilone uwalnianie interleukiny-6 i MCP-1 z komórek śródbłonna eksponowanych na hiperglikemię (Rycina 5 i 6). Wzrost wydzielania MCP-1 jest jednym z głównych efektów obserwowanych w warunkach hiperglikemii [147]. Również w moich doświadczeniach wzrost wydzielania MCP-1 pod wpływem hiperglikemii był znacznie większy niż podobny efekt obserwowany dla interleukiny-6 (Rycina 5 i 6). Leki, takie jak statyny czy inhibitory konwertazy angiotensyny, które zmniejszają wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny obniżają również produkcję cytokin zapalnych w komórkach śródbłonna [148]. Wyniki przedstawione w tej pracy dowodzą, że również sulodeksyd może mieć takie działanie. Można przypuszczać, że antyoksydacyjne działanie sulodeksydu może wynikać z obecności w jego składzie heparyny. Niskocząsteczkowa heparyna zmniejsza stres oksydacyjny u chorych poddawanych hemodializie [149]. Inną prawdopodobną przyczyną protekcyjnego działania sulodeksydu w stosunku do komórek śródbłonna w warunkach hiperglikemii może być uzupełnianie niedoboru glikozaminoglikanów w glikokaliks komórek. Hiperglikemia aktywuje heparanazę w komórkach śródbłonna, co może powodować degradację ich glikokaliks, a efekt ten jest hamowany przez heparynę [150]. Stąd można przypuszczać, że sulodeksyd zawierający siarczan dermatanu i heparyny może powodować zahamowanie aktywności heparanazy w komórkach śródbłonna, a jednocześnie być substratem do uzupełniania zniszczonego glikokaliks komórkowego. Działanie antyoksydacyjne (Rycina 4), przeciwzapalne (Rycina 5 i 6) oraz stabilizujące glikokaliks komórek śródbłonna w warunkach hiperglikemii wywierane przez sulodeksyd może tłumaczyć łatwiejsze gojenie uszkodzonej warstwy tych komórek w przeprowadzonych w tej pracy doświadczeniach (Rycina 8). Uważa się, że końcowym efektem i następstwem zmian patologicznych w śródbłonku wywołanych przez jego przewlekłą ekspozycję na hiperglikemię jest upośledzenie właściwości naprawczych tego nabłonka [151]. Może to wynikać zarówno z uszkodzenia komórek śródbłonna przez hiperglikemię jak i niedoboru komórek progenitorowych. W warunkach *in vivo* uszkodzona warstwa komórek śródbłonna ulega gojeniu w wyniku proliferacji/migracji komórek z najbliższego otoczenia lub w wyniku wbudowywania i rozplemu komórek progenitorowych śródbłonna pochodzących ze szpiku kostnego i obecnych

we krwi [152,153]. Zaburzenie równowagi pomiędzy szybkością uszkodzania komórek śródbłonka a ich zdolnością do naprawy może być istotnym czynnikiem przyspieszającym powstawanie zmian miażdżycowych [154]. Obserwowane w moich badaniach osłabienie zdolności komórek śródbłonka do naprawy ich uszkodzonej warstwy mogło wynikać jedynie z ich dysfunkcji spowodowanej hodowlą w medium z podwyższonym stężeniem glukozy. Wynika to z układu doświadczenia, w którym hodowane komórki nie były eksponowane na krew, a tym samym można wykluczyć udział komórek progenitorowych w naprawie uszkodzonej warstwy śródbłonka. Obecnie pracuje się na różnymi nowymi procedurami terapeutycznymi, których celem jest protekcja komórek śródbłonka u pacjentów z cukrzycą. Szeroko zakrojone są badania czynników ograniczających stres oksydacyjny [155] lub zwiększających wrażliwość komórek na działanie insuliny [156]. Protekcyjne działanie sulodeksydu w stosunku do komórek śródbłonka było także obserwowane w badaniach doświadczalnych na zwierzętach [114]. Moje wyniki potwierdzają te obserwacje i wskazują, że protekcyjne działanie sulodeksydu w stosunku do komórek śródbłonka może wynikać z jego efektu antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego.

Dysfunkcja komórek śródbłonka może być następstwem nie tylko procesu patologicznego jakimi są np. cukrzyca czy hiperlipidemia, ale może być także konsekwencją procesu starzenia komórek [36]. Jednym z głównych czynników determinujących ten proces jest nasilenie stresu oksydacyjnego. Następstwem starzenia w komórkach śródbłonka jest zmiana ich fenotypu. Komórki charakteryzują się upośledzoną zdolnością do zachowania integralności, zmniejszeniem produkcji czynników wazodylatacyjnych, aktywnością prokoagulogenną oraz nasilonym odczynem zapalnym. W obecnej pracy zastosowano standardowy model doświadczalny powodujący przyspieszone starzenie komórek wskutek ich nasilonej aktywności replikacyjnej [157]. W następstwie takiego postępowania obserwowałam zmiany w komórkach śródbłonka, które odpowiadały fenotypowi starzejących się komórek [36,38]. Nasilony był między innymi wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny, zwiększona produkcja interleukiny 6 i MCP-1 a komórki wykazywały cechy hipertrofii (Tabela 1). Zwiększona była również aktywność β -galaktozydazy w komórkach, co jest charakterystyczną cechą starzejących się komórek [158].

Model starzenia komórek stosowany w obecnej pracy i powszechnie akceptowany w badaniach *in vitro* starzenia komórek nie odzwierciedla w pełni zmian komórek śródbłonka w warunkach *in vivo*. Zmiany fenotypowe komórek są podobne, zarówno podczas starzenia in

vivo jak i *in vitro*. Jednak w warunkach *in vivo* komórki śródbłonna nie podlegają tak nasilonej replikacji, ale proces ten nasila się znacznie pod wpływem uszkodzenia warstwy komórek śródbłonna wyściełających wnętrze naczynia. W tych miejscach widoczne jest przyspieszenie procesu starzenia komórek, czego wykładnikiem jest między innymi zwiększona wewnątrzkomórkowa aktywność β -galaktozydazy [159]. Nasilony proces starzenia komórek śródbłonna widoczny jest w tych częściach układu tętniczego, w których śródbłonek wyściełający wnętrze naczynia tętniczego ekspozycyjnie jest na turbulencyjny przepływ krwi, zwiększone ciśnienie wewnątrznacyniowe [160]. W tych miejscach najszybciej dochodzi do powstawania zmian miażdżycowych, co pośrednio dowodzi, że starzenie komórek śródbłonna przyspiesza miażdżycę naczyń tętniczych [154]. Przyczyną tego stanu może być również upośledzona replikacja/migracja komórek śródbłonna. W moich doświadczeniach wykazałam, że replikacyjne starzenie komórek śródbłonna wydłuża czas ich podwojenia populacji oraz upośledza zdolność komórek do gojenia (Tabela 1). Stąd jest oczywiste, że spowolnienie procesu starzenia komórek śródbłonna może spowodować mniejsze nasilenie zmian miażdżycowych. Proponowanych jest wiele rozwiązań terapeutycznych tego problemu. Uważa się, że starzenie śródbłonna może być spowolnione w wyniku zmian humoralnych wywołanych wysiłkiem fizycznym [161], suplementacją estrogenów [162] lub magnezu [163]. Bardzo ważne w tym działaniu prewencyjnym jest hamowanie odczynu zapalnego oraz zmniejszanie stresu oksydacyjnego [164,165]. Sulodeksyd jako czynnik zmniejszający nasilenie odczynu zapalnego i stresu oksydacyjnego spełnia warunki leku, który może być stosowany w prewencji procesu starzenia śródbłonna. Potwierdzają to także wyniki moich badań, w których wykazałam, że wiele zmian wynikających z procesu starzenia komórek śródbłonna, takich jak wydłużenie czasu podwojenia populacji (Rycina 9), wzrost wydzielania MCP-1 (Rycina 13), czy szybkość gojenia uszkodzonej warstwy komórek (Rycina 14), ulegają normalizacji podczas ekspozycji komórek na sulodeksyd. Natomiast nasilenie innych zmian charakterystycznych dla procesu starzenia, takich jak zwiększona aktywność β -galaktozydazy (Rycina 10) nasilony stres oksydacyjny (Rycina 11), czy zwiększona produkcja interleukiny 6 (Rycina 12) ulegała osłabieniu podczas ekspozycji komórek śródbłonna na sulodeksyd. Ponadto przeciwkrzepliwe działanie sulodeksydu [101,166] może zmniejszać prokoagulogenne działanie starzejących się komórek śródbłonna.

Podsumowanie

Przedstawione w tej pracy wyniki dowodzą, że sulodeksyd będący mieszaniną naturalnych glikozaminoglikanów: siarczanu heparyny i siarczanu dermatanu, wpływa na czynność komórek śródbłonna w hodowli *in vitro*. Lek ten działa antyoksydacyjnie i przeciwzapalnie, czego wyrazem jest zmniejszona generacja wolnych rodników oraz zahamowanie uwalniania cytokin zapalnych. To działanie sulodeksydu utrzymuje się w warunkach hiperglikemii, zmniejszając nasilenie wielu zmian indukowanych w tych warunkach, takich jak stres oksydacyjny czy nadmierne uwalnianie cytokin zapalnych. Konsekwencją takiego działania sulodeksydu jest prawdopodobnie zwiększona żywotność tych komórek, co znajduje odbicie w prawidłowej szybkości gojenia warstwy śródbłonna po mechanicznym uszkodzeniu. Wreszcie działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne sulodeksydu może tłumaczyć jego hamujący wpływ na zmianę fenotypu komórek śródbłonna wynikającą z procesu ich starzenia. Odległymi skutkami tych efektów sulodeksydu na poziomie śródbłonna może być spowolnienie powstawania zmian miażdżycowych w naczyniach tętniczych, a tym samym zmniejszenie zaburzeń w układzie sercowo-naczyniowym wynikających z tej patologii. Uważam, że przedstawione w tej pracy wyniki mogą być podstawą do dalszych badań na doświadczalnych modelach zwierzęcych a następnie badań klinicznych, które zweryfikują przydatność sulodeksydu jako leku stabilizującego śródbłonek.

VIII. WNIOSKI

1. Sulodeksyd wywołuje proporcjonalnie do zastosowanej dawki zmniejszenie stresu oksydacyjnego i wydzielania cytokin zapalnych w ludzkich komórkach śródbłonna w hodowli *in vitro*.
2. Hiperglikemia w warunkach hodowli *in vitro* stymuluje odczyn zapalny w ludzkich komórkach śródbłonna naczyniowego oraz powoduje zaburzenie ich czynności. Równoczesne stosowanie sulodeksydu zapobiega niekorzystnemu działaniu hiperglikemii na śródbłonek.
3. Sulodeksyd zmniejsza nasilenie zmian strukturalnych i czynnościowych w starzejących się w hodowli *in vitro* ludzkich komórkach śródbłonna naczyniowego.

IX. PIŚMIENICTWO

1. Augustin HG, Kozina DH, Johnson RC, *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated cell phenotypes*. Bioassays 1994; 16: 901-906
2. Aird WC, *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I Structure, function and mechanisms*. Circ. Res. 2007; 100: 158-173
3. Aird WC, *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. Circ. Res. 2007; 100: 174-190
4. Luft JH, *Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red*. Fed. Proc. 1966; 25: 1773 - 1783
5. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflugers Arch 2007; 454:345-359
6. Sugahara K, Mikami T, Uyama T i wsp. *Recent advances in structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate*. Curr Opin. Struct. Biol. 2003; 13: 612-620
7. Henry CB, Duling BR, *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. Am. J. Physiol. 1999; 277: H508-H514
8. De Agostini AI, Watkins SC, Slayter HS i wsp. *Localization of anticoagulant active heparin sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta*. J. Cell Biol. 1990; 111: 1293- 1304
9. Steffel J, Luscher TF, Tanner FC, *Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications*. Circulation 2006; 113: 722-731
10. Gao Y, *The multiple actions of NO*. Pflugers Arch – Eur. J. Physiol. 2010; 459: 829-839
11. Rosenberg RD, *Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism*. Am. J. Med. 1989; 87: 2S-9S
12. Tollefsen DM, Pestka CA, *Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure*. Blood 1985; 66: 769-774

13. Broze GJ, *Tissue factor pathway inhibitor*. Thromb. Haemost 1995; 66: 769-777
14. Esmon CT, *Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation*. Crit. Care Med. 2001; 29: S48-S51
15. Fukudome K, Kurosawa S, Stearn-Kurosawa DJ i wsp. *The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor*. J. Biol. Chem. 1996; 271: 17491-17498
16. Todd AS, *The histological localisation of fibrinolysis activator*. J. Pathol Bacteriol 1959;78:281–283.
17. Barnathan ES, Kuo A, Kariko K, i wsp. *Characterisation of human endothelial cell urokinase-type plasminogen activator receptor protein and messenger RNA*. Blood 1990; 76: 1795-1806
18. Shih GC, Hajjar KA, *Plasminogen and plasminogen activator assembly on the human endothelial cell*. Proc Soc Exp Biol Med. 1993; 202:258-264.
19. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL i wsp. *Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro*. J. Clin. Invest 1987; 79: 124-130
20. Woolkalis MJ, DeMelti TM, Blanchard N i wsp. *Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells*. J. Biol. Chem. 1995; 270: 9868-9875
21. McEver RP, Moore KL, Cummings RD, *Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interaction*. J. Biol. Chem. 1995; 270: 11025-11028
22. Languino LR, Plescia J, Duperray A i wsp. *Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway*. Cell 1993;73:1423-1434
23. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE, *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res. 2009;29:313-326.

24. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L i wsp. *Human endothelium as a source of multi-functional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease.* J Interferon Cytokine Res. 1999;19:91-104.
25. Pober JS, Sessa WC, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation.* Nature Reviews. Immunology. 2007; 7: 803-815
26. Ross R, *Atherosclerosis – an inflammatory disease.* N. Engl. J. Med. 1999; 340: 115-126
27. Triggle CR, Ding H, *The endothelium in compliance and resistance vessels.* Front Biosci . 2011; 3:730-744
28. Barton M, *The discovery of endothelium-dependent contraction: the legacy of Paul M. Vanhoutte.* Pharmacol Res. 2011; 63:455-462
29. Rush JW, Aultman CD. *Vascular biology of angiotensin and the impact of physical activity.* Appl Physiol Nutr Metab. 2008; 33:162-172
30. Furchgott RF, Zawadzki JV, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature 1980;288:373-376
31. Fleming I, *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS.* Pflugers Arch – Eur. J. Physiol. 2010; 459: 793-806
32. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD, *Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation.* Vascul Pharmacol. 2008; 49:134-140
33. van Hinsbergh VW, *Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation.* Semin Immunopathol. 2012; 34:93-106.
34. Levin ER, *Endothelins.* N. Engl. J. Med. 1995; 333: 356-363
35. Flammer AJ, Luscher TF, *Human endothelial dysfunction: EDRFs.* Pflugers Arch – Eur. J. Physiol. 2010; 459: 1005-1013

36. Erusalimsky JD, Vascular *endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology*. J. Appl. Physiol. 2009; 106: 326-332
37. Munzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S, *Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?* European Heart Journal 2010; 31: 2741-2749
38. Erusalimsky JD, Kurz DJ, *Endothelial cell senescence*. Handb. Exp. Pharmacol. 2006; 173: 213-248
39. Desphande SS, Qi B, Park YC, Irani K, *Constitutive activation of rac1 results in mitochondrial oxidative stress and induces premature endothelial cell senescence*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003; 23: e1-e6
40. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T, *Mitochondria, oxidants, aging*. Cell 2005; 120: 483-495
41. Imanishi T, Hano T, Nishio I, *Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress*. J. Hypertens. 2005; 23: 97-104
42. Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O i wsp. *Apoptosis Signac-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells*. Diabetes 2006; 55: 1660-1665
43. Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM i wsp. *Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells*. Circ. Res. 2002; 90: 1290-1298
44. Kurz DJ, Hong Y, Trivier E i wsp. *Fibroblast growth factor-2 but not vascular endothelial growth factor, upregulates telomerase activity in human endothelial cell*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003; 23: 748-754
45. Imanishi T, Hano T, Nishio I, *Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity*. J. Hypertens. 2005; 23: 1699-1706

46. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, i wsp *Endothelial senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes*. Proc. Natl. Acad.Sci USA 2006; 103: 17018-17023
47. Hong Y, Quintero M, Frakich NM i wsp. *Evidence against the involvement of nitric oxide in the modulation of telomerase activity or replicative capacity of endothelial cells*. Exp. Gerontol. 2007; 42: 904-910
48. Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmler S, *Pro-atherogenic factors induce telomerase activation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism*. FEBS Kett 2001; 493: 21-25
49. Hill JM, Zalos G, Halcox JP i wsp. *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. N Engl J Med 2003; 348: 593-600
50. Falchetti ML, Mongiardi MP, Fiorenzo P i wsp. *Inhibition of telomerase in the endothelial cells disrupts tumor angiogenesis in glioblastoma xwnografts*. Int. J. Cancer 2008; 122: 1236-1242
51. Maier JA, Voulalas P, Roeder D, Maciag T, *Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 alpha antisense oligomer*. Science 1990; 249: 1570-1574
52. Maier JA, Statuto M, Ragnotti G, *Senescence stimulates U937-endothelial cell interactions*. Exp. Cell. Res. 1993; 280: 270-274
53. Comi P, Chiamonte R, Maier JA, *Senescence-dependent regulation of type I plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells* Exp. Cell Res. 1005; 219: 304-308
54. Van der Loo B, Fenton MJ, Erusalimsky JD, *Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial cells and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels*. Exp. Cell Res. 1998; 241: 309-315

55. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD, *Senescence-associated beta-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative aging of human endothelial cells*. J Cell Sci 2004; 117: 2417-2426
56. Shelton DN, Chang E, Whittier PS i wsp. *Microarray analysis of replicative senescence*. Curr Biol. 1999; 9: 939-945
57. Vasile E, Tomita Y, Bown LF i wsp. *Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis*. FASEB J 2001; 15: 458-466
58. Tschudi MR, Barton M, Bersinger MA, i wsp. *Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery*. J. Clin. Invest. 1996; 98: 899-905
59. Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN i wsp. *Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging*. J. Exp. Med. 2000; 192: 1731-1744
60. Matsuhita H, Chang E, Glassford AJ i wsp. *eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization*. Circ. Res. 2001; 89: 793-798
61. Nakajima M, Hashimoto M, Wang F i wsp. *Aging decreases the production of PGI₂ in rat aortic endothelial cells*. Exp. Gerontol. 1997; 32: 685-693
62. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. J. Clin. Invest. 1993; 91: 2546-2551
63. Heitzer T, Just H, Munzel T, *Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers*. Circulation 1996; 94: 6-9
64. Cai H, Harrison DG, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ. Res. 2000; 87: 840-844

65. Huraux C, Makita T, Kurz S i wsp. *Superoxide production, risk factors and endothelium dependent relaxations in human internal mammary arteries*. *Circulation* 1999; 99: 53-59
66. Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD i wsp. *Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis*. *Circ. Res.* 1998; 82: 1298-1305
67. Higashi Y, Sasaki S, Nagakawa K, i wsp. *Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension*. *N. Eng. J. Med.* 2002; 346: 1954-1962
68. Ding H, Triggle CR, *Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment*. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 2010; 459: 977-994
69. Vlassara H, Palace MR, *Diabetes and advanced glycation endproducts*. *J Intern. Med.* 2002; 251: 87-101
70. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C i wsp. *Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail*. *Diabetes* 2009; 58: 1229-1236
71. Ding Y, VAziri ND, Coulson R i wsp. *Effects of simulated hyperglycemia, insulin and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 2000; 279: E11-E17
72. Okon EB, Chung AW, RAuniyar P i wsp. *Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients*. *Diabetes* 2005; 54: 2415-2423
73. Forstermann U, *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 2010; 459: 923-939
74. Luiking YC, Engelen MPKJ, Deuts N, *Regulation of nitric oxide production in health and disease*. *Curr Opin Clin Nutr Metab. Care* 2010; 13: 97-104

75. Wu G, Bazer FW, Davis TA i wsp. *Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease*. Amino Acids 2009; 37: 153-168
76. Ludman A, Venugopal V, Yellon DM, Hausenloy DJ. *Statins and cardioprotection-more than just lipid lowering?* Pharmacol Ther. 2009 ;122:30-43
77. McCall DO, McGarland CP, McKinley MC i wsp. *Dietary intake of fruits and vegetables improves microvascular function in hypertensive subjects in a dose-dependent manner*. Circulation 2009; 119: 2153-2160
78. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, i wsp. *Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction*. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2009; 296: H1281-H1288
79. Tabuchi N, Shickiri M, Shibamya A i wsp. *Non-viral in vivo thrombomodulin gene transfer prevents early loss of thromboresistance of grafted veins*. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 2004; 26: 995-1001
80. Li J, Garnette CS, Cahn M, i wsp. *Recombinant thrombomodulin inhibits arterial smooth muscles cell proliferation induced by thrombin*. J. Vasc. Surg 2000; 32: 804-813
81. Liu X, Zhang R, Xu W i wsp. *Synthesis of the novel ligustrazine derivatives and their proreective effect on the injured vascular endothelial cell damaged by hydrogen peroxide*. Bioorg Med. Chem Lett 2003;13: 2123-2126
82. Di Stefano R, Barsotti MC, Melillo E i wsp. *The prostacyclin analogue iloprost increases circulating endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia*. Thromb. Haemost. 2008; 100: 871-877
83. Howitz KZ, Bitterman KJ, Cohen HY i wsp. *Small molecules activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan*. Nature 2003; 425: 191-196

84. Kaberlein M, McDonagh T, Heltweg B i wsp. *Substrate specific activation of sirtuins by resveratrol*. J. Biol. Chem. 2005; 280: 17038-17045
85. Potente M, Dimmeler S, *Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis*. Cell Cycle 2008; 7: 2117-2122
86. Radhakrishnamurthy B, Sharma C, Bhandaru RR i wsp. *Studies of chemical and biologic properties of a fraction of Sulodexide, a heparin-like glycosaminoglycan*. Atherosclerosis 1986; 60: 141-149
87. Busutti L, Breccia A, *Pharmacokinetics of sulodexide after single oral administration in man*. Eur. J. Clin. Res. 1991; 1:25-36
88. Milani MR, Busutti L, Breccia A. *Pharmacokinetics of sulodexide evaluated from ^{131I}-labelled fast-moving heparin after single intravenous and oral administration on man at different doses*. Br J Clin Res. 1992; 3:161-178
89. Boneu B, Dol. F, Caranobe C i wsp. *Pharmacokinetics of heparin and related polysaccharides*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989; 556: 282-291
90. Heibert LM, Jacques LB, *Heparin uptake on the endothelium*. Artery 1976; 2: 26-37
91. Tiozzo R, Cinqi MR, Pietrangelo A, i wsp. *Effect of the heparin-like compounds on the in vitro proliferation and protein synthesis by various cell types*. Arzheim-Forsch Drug Res. 1989; 39: 15-20
92. Vijayagopal P, Ciolino HP, Radhakrishna-Murthy B, Berenson GJ, *Heparin stimulates proteoglycans synthesis by vascular smooth muscles while suppressing cellular proliferation*. Atherosclerosis 1992; 94: 135-146
93. Castelluccio A, Bologna E, *Effect of sulodexide on blood viscosity in patients with peripheral vascular disease*. Curr Med Res Opinion 1991;12: 325-331

94. Silvestro L, Lanzarotti E, Marchi E i wsp. *Human pharmacokinetics of glycosaminoglycans using deuterium-labeled and unlabeled substances: evidence for oral absorption*. *Semin Thromb Hemost*. 1994;20:281-292
95. Boneu B, Buchanan MR, Cade JF i wsp. *Effects of heparin, its low molecular weight fractions and other glycosaminoglycans on thrombus growth in vivo*. *Thromb. Res*. 1995; 40: 8-90
96. Agnelli G, Cosmi B, Paola F i wsp. *A randomized double-blind placebo-controlled trial of dermatan sulphate for prevention of deep vein thrombosis in hip fracture*. *Thromb. Haemostas*. 1992; 67: 203-208
97. Mauro M, Ferraro G, Palmieri G, *Profibrynolytic and antithrombotic effects of Sulodexide oral administration: a double-blind, cross-over placebo- controlled study*. *Curr Therap. Res* 1992; 51: 342-350
98. Callas DD, Hoppensteadt DA, Jeske W i wsp. *Comparative pharmacological profile of glycosaminoglycans mixture (Sulodexide) and a chemically modified heparin derivative, Suleparotide*. *Semin. Thromb. Hemostas*. 1993; 19: suppl 1: 49-57
99. Veriello A, Quatraro A, Ettorre E, i wsp. *Glycosaminoglycan administration decreases high plasma fibrinogen levels in diabetic patients*. *Diab. Nutr, Metab*. 1993; 6: 1-4
100. Condorelli M, Cjairiello M, DAgianti A i wsp. *IPO-V2: A prospective, multi-center, randomized comparative clinical investigation of the effects of Sulodexide in preventing cardiovascular accidents in the first year after acute myocardial infarction*. *Am. J. Coll. Cardiol*. 1994; 23: 27-34
101. Harenberg J, *Review of pharmacodynamics, pharmacokinetics, and therapeutic properties of sulodexide*. *Med. Res. Rev* 1998; 1: 1-20
102. Tarugi P, Tiozzo-Costa R, Barbanti M, i wsp. *Effect of sulodexide, a heparin-like compound, on experimental atherosclerosis in the rabbit*. *Med. Sci. Res*. 1987; 15: 1071-1072
103. Kim SB, Kim SH, Lee MS i wsp. *Effects of sulodexide on hemostatic factors, lipid profile, and inflammation in chronic peritoneal dialysis patients*. *Perit. Dial. Int*. 2007; 27: 456-459

104. Corsi C, Bocci L, Cipriani C i wsp. *The effectiveness of glycosaminoglycans in peripheral vascular disease therapy: a clinical and experimental trial.* J Int Med Res. 1985;13:40-47
105. Gambaro G, Cavazzana AO, Lui P. i wsp. *Glycosaminoglycans prevent morphological renal alterations and albuminuria in diabetic rats.* Kidney Int. 1992; 42: 285-291
106. Sulikowska B, Olejniczak H, Muszyńska M, i wsp. *Effect of sulodexide on albuminuria, NAG excretion and glomerular filtration response to dopamine in diabetic patients.* Am J Nephrol. 2006;26:621-628
107. Blouza S, Dakhli S, Abid H, i wsp. *Efficacy of low-dose oral sulodexide in the management of diabetic nephropathy.* J Nephrol. 2010;23:415-424
108. Gambaro G, Kinalska I, Oksa A, i wsp. *Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and typ 2 diabetic patients: The Di.N.A.S. randomized trial.* J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 13: 1615-1625
109. Packham DK, Wolfe R, Reutens AT, i wsp. *Sulodexide fails to demonstrate renoprotection in overt type 2 diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol. 2012; 23: 123-130.
110. Bazzato G, Fracasso A, Gambaro G, Baggio B, *Use of glycosaminoglycans to increase efficiency of long-term continuous peritoneal dialysis.* Lancet 1995; 346: 740-741
111. Karoń J, Połubinska A, Antoniewicz A, i wsp. *Anti-inflammatory effect of sulodexide during acute peritonitis in rats.* Blood Purif. 2007;25:510-514
112. Andriuoli G, *Antihypertensive effect of long term treatment with glycosaminoglycan sulphate in spontaneously hypertensive rats.* W: Atherosclerosis: ethiopathogenesis, clinical evaluation and therapy. Bologna: Editrice Compositori: 1982: 465-470
113. Kristová V, Kriska M, Babál P, i wsp. *Evaluation of endothelium-protective effects of drugs in experimental models of endothelial damage.* Physiol Res. 2000;49:123-128
114. Kristová V, Lísková S, Sotníková R, i wsp. *Sulodexide improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats.* Physiol Res. 2008;57:491-494.
115. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, i wsp. *Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus.* Diabetologia. 2010;53:2646-2655

116. Lauver DA, Booth EA, White AJ, i wsp. *Sulodexide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury and the deposition of C-reactive protein in areas of infarction without affecting hemostasis*. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 312:794-800.
117. Książek K, Piwocka K, Brzezinska A, i wsp. *Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16(INK4a)-mediated premature senescence*. J. Appl. Physiol. 2006; 100: 988-995
118. Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 1951;193:265-275.
119. Aird WC, *Endothelial cell heterogeneity*. Cold Spring Harb. Persp Med. 2012; 2: a006429
120. Arisaka T, Mitsumata M, Kawasumi M i wsp. *Effects of shear stress on glycosaminoglycan synthesis in vascular endothelial cells*. Ann N Y Acad Sci. 1995; 748 : 543 -554.
121. Becker BF, Fischer J, Hartmann H, i wsp. *Inosine, not adenosine, initiates endothelial glycocalyx degradation in cardiac ischemia and hypoxia*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2011;30::1161-1167.
122. Henrich M, Gruss M, Weigand MA, *Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx*. ScientificWorldJournal. 2010;10:917-923
123. Singh A, Fridén V, Dasgupta I i wsp. *High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx*. Am J Physiol Renal Physiol. 2011 ;300:F40-F48.
124. Niueworp M, van Haefen TW, Gouverneur MCLG i wsp. *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes 2006; 55: 480-486
125. Brower JB, Targovnik JH, Caplan MR, Massia SP. *High glucose-mediated loss of cell surface heparan sulfate proteoglycan impairs the endothelial shear stress response*. Cytoskeleton 2010; 67:135-141

126. Becker BF, Chappell D, Jacob M. *Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit*. Basic Res Cardiol. 2010;105:687-701.
127. Becker BF, Chappell D, Bruegger D i wsp. *Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential*. Cardiovasc Res. 2010 ;87:300-310.
128. Borawski J, Dubowski M, Pawlak K, Myśliwiec M, *Sulodexide induces hepatocyte growth factor release in humans*. Eur. J. Pharmacol. 2007: 558: 167-171
129. Neumann A, Schnizel R, Palm R, i wsp. *High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation rndproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression*. FEBS Lett 1999: 453: 283-287
130. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, i wsp. *High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokine and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis*. Osteoarth. Cartil. 2006: 4: 1237-1247
131. Rops ALW, van der Vlag J, Lensen JFM i wsp. *Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation*. Kidney Int. 2004: 65: 768-785
132. Skrha J, Perusovicova J, Kvasnicka J, Hilgertova J, *The effect of glycosaminoglycan sulodexide on oxidative stress and fibrinolysis in diabetes mellitus*. Sb. Lek. 1998: 99: 103-109
133. Speyer CL, Ward PA, *Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation*. Journal of Investigative Surgery 2011: 24: 18-27
134. Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H, *Heparin effects on superoxide production by neutrophils*. Eur. J. Surg. 1995: 27: 184-188
135. Dandona P, Qutob T, HAmouda W i wsp. *Heparin inhibits reactive oxygen species generation by polymorphonuclear and mononuclear leukocytes*. Thromb. Res. 1999: 96: 437-443

136. Attanasio M, Gori AM, Giusti B, i wsp. *Cytokine gene expression in human LPS- and INF γ -stimulated mononuclear cells is inhibited by heparin*. *Thromb. Haemost.* 1998; 79: 959-962
137. Poyrazoglu OK, Dogukan A, Yalniz M, i wsp. *Acute effect of standard heparin versus low molecular weight heparin on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients*. *Ren. Fail.* 2006; 28: 723-727
138. Bilinska M, Wolszakiewicz J, Duda M i wsp. *Antioxidative activity of sulodexide, a glycosaminoglycan, in patients with stable coronary artery disease: a pilot study*. *Med Sci Monit.* 2009;15:CR618-23.
139. Borawski J, Dubowski M, Pawlak K, Myśliwiec M, *Sulodexide induces hepatocyte growth factor release in humans*. *Eur. J. Pharmacol.* 2007;558:167-171
140. Gong R, Rifai A, Dworkin LD, *Anti-inflammatory effect of Hepatocyte Growth Factor in chronic kidney disease: targeting the inflamed vascular endothelium*. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 2464-2473
141. Morishita R, Higaki J, Hayashi SI, i wsp. *Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor*. *Diabetologia.* 1997;40:1053-1061
142. Ding H, Triggle CR, *Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium*. *Vascular Health and Risk Management* 2005; 1: 55-71
143. Madonna R, De Caterina R, *Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes – Part I. Pathways of vascular disease in diabetes*. *Vasc. Pharmacol.* 2001; 54: 68-74
144. Eper RJ, Vilarino JO, Machado RA, Paragano A, *Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism*. *Adv. Cardiol.* 2008; 45: 17-43
145. Szczepanski M, Kamianowska M, Skrzydlewska M, *Wpływ hiperglikemii na procesy oksydacyjno-redukcyjne w komórkach śródbłonna ludzkiej żyły pępowinowej*. *Pol. Merk. Lek.* 2007; XXIII: 246-250

146. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM, *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. Endocrine Rev. 2002;23:599-622
147. Dragomir E, Simionescu M, *Monocyte chemoattractant protein-1 a major contributor to the inflammatory process associated with diabetes*. Arch. Physiol. Biochem. 2006; 112: 239-244
148. Schleicher E, Friess U, *Oxidative stress, AGE and atherosclerosis*. Kidney Int. 2007; 72: s17-s26
149. Poyrazoglu OK, Dogukan A, Yalniz M, i wsp. *Acute effect of standard heparin versus low molecular weight heparin on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients*. Ren Fail. 2006;28:723-727.
150. Han J, Woytowich AE, Mandal AK, Hiebert LM, *Heparanase upregulation in high-glucose treated endothelial cells is prevented by insulin and heparin*. Exp. Biol. Med. 2007;232: 927-934
151. Madonna R, De Caterina R, *Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes. Part II: Cellular mechanisms and therapeutic targets*. Vasc. Pharmacol. 2011; 54: 75-79
152. Leone AM, Valgimigli M, Giannico MB, i wsp. *From Bone marrow to the arterial wall the ongoing tale of endothelial progenitor cells*. Eur. Heart. J. 2009; 30: 890-899
153. De Caterina R, *Endothelial dysfunction: common denominators in vascular disease*. Curr. Opin. Lipidol. 2000; 11: 9-23
154. Dimmeler S, Zeiher AM, *Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis*. J. Mol. Med. 2004; 82: 671-677
155. Nassar T, Kadery B, Lotan C, i wsp. *Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats*. Eur. J. Pharmacol. 2002;435:111-118

156. Stumvoll M, Haring HU, *Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms*. Ann. Med. 2002; 78: 265-273
157. Foreman KE, Tang J, *Molecular mechanism of replicative senescence in endothelial cells*. Exp. Geront. 2003; 38: 1251-1257
158. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. *Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay*. Methods Mol Biol. 2007; 371:21-31
159. Fenron M, Barker S, Kurz DI i wsp. *Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid artery*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21: 220-226
160. Csiszar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z, *Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B*. J. Appl. Physiol. 2008; 105: 1333-1341
161. Di Francescomarino S, Sciartilli A, DiValerio V i wsp. *The effects of physical exercise on endothelial function*. Sports Med. 2009; 39: 797-812
162. Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. *Endothelial progenitor cell senescence--is there a role for estrogen?* Ther Adv Cardiovasc Dis. 2010;4:55-69
163. Killilea DW, Maier JAM, *A connection between magnesium deficiency and aging: a new insights from cellular studies*. Magnes. Res. 2008; 21: 77-82
164. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R i wsp. *Mechanisms of vascular aging: new perspectives*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2010 ;65:1028-1041
165. Camici GG, Shi Y, Cosentino F i wsp. *Anti-aging medicine: molecular basis for endothelial cell-targeted strategies - a mini-review*. Gerontology. 2011;57:101-108.
166. Ofosu FA. *Pharmacological actions of sulodexide*. Semin Thromb Hemost. 1998;24:127-38