PRACA POGLĄDOWA

Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 2015, Tom 21, Nr 2, 113–115
www.monz.pl

Krążące komórki śródbłonka jako marker uszkodzenia śródbłonka naczyń

Małgorzata Dec[1], Elżbieta Bartoszek[1], Jerzy Mosiewicz[1]

[1] *Klinika Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie*

Dec M, Bartoszek E, Mosiewicz J. Krążące komórki śródbłonka jako marker uszkodzenia śródbłonka naczyń. Med Og Nauk Zdr. 2015; 21(2): 113–115. doi: 10.5604/20834543.1152904

Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Krążące komórki śródbłonka (CECs) są to komórki, które pojawiają się we krwi obwodowej na skutek złuszczania się śródbłonka naczyń w przebiegu schorzeń układu sercowo-naczyniowego, nowotworów, zakażeń czy zapaleń. U osób zdrowych komórki te nie występują we krwi obwodowej lub ich liczba jest bardzo mała. Celem prezentowanej pracy jest podsumowanie doniesień dotyczących CECs – chorób, w przebiegu których dochodzi do wzrostu liczby tych komórek we krwi obwodowej oraz sposobów ich detekcji.

Skrócony opis stanu wiedzy. CECs możemy obecnie uznać za wiarygodny, nieinwazyjny marker uszkodzenia śródbłonka naczyń. Liczba tych komórek jest podwyższona w wielu schorzeniach przebiegających z dysfunkcją śródbłonka takich jak: ostry zespół wieńcowy, zapalne choroby naczyń, zakażenia, cukrzyca, obturacyjny bezdech senny czy nowotwory. W badaniach dowiedziono również, że liczba CECs koreluje z zaostrzeniem choroby i jej rokowaniem. Przy pomocy oceny liczby CECs obserwuje się odpowiedź na terapię, także przeciwnowotworową. Do izolacji CECs stosowane są obecnie dwie metody – immunomagnetyczna oraz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Podsumowanie. Określenie liczby CECs we krwi obwodowej staje się pomocne w ocenie klinicznej chorób, prognozowaniu ich przebiegu oraz w ocenie skuteczności stosowanego leczenia. Istotne wydaje się prowadzenie dalszych badań nad występowaniem CECs w różnych schorzeniach oraz ujednolicenie metod ich detekcji z krwi obwodowej.

Słowa kluczowe

śródbłonek naczyniowy, krążące komórki śródbłonka, marker dysfunkcji śródbłonka

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Krążące komórki śródbłonka (CECs – circulating endothelial cells) są to komórki pojawiające się we krwi obwodowej na skutek złuszczania się śródbłonka naczyń w przebiegu takich schorzeń jak zakażenia, zapalenie, nowotwory czy choroby układu sercowo-naczyniowego. U osób zdrowych nie występują lub można je wykryć w bardzo niskiej liczbie – od 0 do 10 CECs mL^{-1} (metodą immunomagnetyczną), co może świadczyć o naturalnym procesie złuszczania się śródbłonka naczyń [1]. Krążące komórki śródbłonka zostały po raz pierwszy opisane w latach 70. [2]. Od tego czasu publikowane były liczne badania uznające CECs za nowy, wiarygodny, nieinwazyjny marker uszkodzenia i dysfunkcji śródbłonka naczyń.

Prezentowana praca zawiera podsumowanie doniesień dotyczących krążących komórek śródbłonka, schorzeń, w przebiegu których dochodzi do wzrostu liczby tych komórek, a także doniesień na temat sposobów ich izolacji z krwi obwodowej. Istotne wydaje się przyszłościowe spojrzenie na kliniczne wykorzystanie oznaczania krążących komórek śródbłonka we krwi obwodowej.

OPIS STANU WIEDZY

Śródbłonek nie tylko wyściela ścianę naczyń, stanowiąc naturalną barierę między tkankami organizmu a krwią, odgrywa także kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego, w angiogenezie oraz w hemostazie, wydzielając szereg substancji aktywnych biologicznie. Na powierzchni śródbłonka znajdują się liczne receptory dla molekuł białkowych, takich jak czynniki wzrostu czy czynniki krzepnięcia, dla metabolitów (np. tlenek azotu), hormonów (np. endotelina) czy genów. Śródbłonek naczyń możemy podzielić na 3 oddzielne kompartmenty pod względem czynnościowym: komórki śródbłonka ściany naczyniowej, krążące komórki śródbłonka, które uległy złuszczeniu w wyniku uszkodzenia ściany naczyniowej i krążące progenitorowe komórki śródbłonka (EPCs – *endothelial progenitors cells*) [3]. EPCs to komórki, które migrują ze szpiku kostnego do miejsc regeneracji śródbłonka lub nowotworzenia naczyń [4]. Wykazują one ekspresję glikoproteiny CD133. Uważa się, że istnieje odwrotna korelacja między liczbą CECs a EPCs.

Kiedy dochodzi do wzrostu liczby krążących komórek śródbłonka we krwi obwodowej?

Krążące komórki śródbłonka możemy obecnie uznać za marker uszkodzenia śródbłonka naczyń. Liczba CECs koreluje z osoczowymi markerami uszkodzenia śródbłonka naczyń, takimi jak czynnik von Willebranda (aWf), rozpuszczalne E-selektyny czy rozpuszczalna trombomodulina [5]. Istotne wydaje się ustalenie, w jakich schorzeniach dochodzi do wzrostu krążących komórek śródbłonka oraz czy ich liczba koreluje z zaostrzeniem choroby, rokowaniem i odpowiedzią na terapię.

Do wzrostu liczby krążących komórek śródbłonka we krwi dochodzi w schorzeniach układu sercowo-naczyniowego, takich jak ostry zespół wieńcowy, nadciśnienie płucne, anemia sierpowatokrwinkowa, jak też w chorobach naczyń obwodowych. Obserwowano większą liczbę CECs w ostrym zespole wieńcowym niż w dławicy piersiowej stabilnej. Poza tym zauważono, że w ostrym zespole wieńcowym dochodzi do znacznego wzrostu liczby krążących komórek śródbłonka,

Adres do korespondencji: Małgorzata Dec, Klinika Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Staszica 16, Lublin
E-mail: malgosdec@gmail.com

Nadesłano: 16 marca 2012; zaakceptowano do druku: 3 grudnia 2014

który korelował ze wzrostem stężenia czynnika von Willebranda [6]. Podwyższoną liczbę CECs zaobserwowano także w zakażeniu riketsją, cytomegalowirusem oraz we wstrząsie septycznym. Zaburzenia immunologiczne, takie jak toczeń rumieniowaty układowy, choroba Kawasaki, choroba Behceta, również wpływają na wzrost liczby krążących komórek śródbłonka we krwi. W przypadku tocznia rumieniowatego układowego wzrost liczby CECs koreluje ze stopniem uszkodzenia śródbłonka naczyń, z nasileniem objawów chorobowych, a także może stanowić czynnik przewidywania przedwczesnego rozwoju zmian miażdżycowych [3]. W okresie zaostrzenia choroby liczba CECs jest wyższa, a w okresie remisji znacznie niższa, więc zjawisko to może być wykorzystane w monitorowaniu skuteczności stosowanego leczenia [7]. W przypadku ANCA-dodatnich zapaleń naczyń również dochodzi do wzrostu liczby krążących komórek śródbłonka w ostrej fazie choroby, a ich spadek obserwuje się w przypadku skutecznego leczenia immunosupresyjnego [8]. Podobną sytuację opisywano w twardzinie układowej, w przebiegu której dochodziło do wzrostu liczby CECs, co korelowało z aktywnością choroby oraz obecnością powikłań narządowych takich jak nadciśnienie płucne [9]. W przypadku obturacyjnego bezdechu sennego dowiedziono, że wzrost liczby krążących komórek śródbłonka koreluje ze wzrostem stężenia czynnika von Willebranda i czynnika tkankowego (TF – *tissue factor*). Po ośmiotygodniowej terapii stałym dodatnim ciśnieniem w drogach oddechowych (nCPAP – *nasal continuous positive airway pressure*) zaobserwowano znaczny spadek liczby CECs i poziomu czynnika tkankowego [10]. W cukrzycy typu 1 i 2 dochodzi do wzrostu liczby krążących komórek śródbłonka, co świadczy o toksycznym działaniu przewlekłej hiperglikemii na śródbłonek naczyniowy. W badaniach zauważono korelację między liczbą CECs a poziomem hemoglobiny glikowanej (Hb_{A1C}) w przebiegu cukrzycy typu 1 [11], a brak takiego związku w cukrzycy typu 2 [12]. Opisywano wzrost liczby krążących komórek śródbłonka u chorych po transplantacji szpiku kostnego lub nerki, a także w przebiegu raka piersi i w chłoniakach [13]. W onkologii obserwuje się proces angiogenezy we wzroście guzów i w przerzutach nowotworowych. Zauważono, że liczba CECs może stać się istotnym markerem w monitorowaniu terapii przeciwnowotworowej przy użyciu leków hamujących angiogenezę [14]. Badania Del Papa i wsp. dowiodły, iż terapia statynami powoduje zmniejszenie liczby krążących CECs [15], co pośrednio może świadczyć o poprawie funkcji śródbłonka naczyniowego. Udowodniono wzrost liczby CECs w przebiegu nadciśnienia wrotnego i marskości wątroby [16]. Zmiana liczby CECs obserwowana jest także w różnych postaciach chorób nerek, może być użytecznym markerem uszkodzenia śródbłonka i odrzucenia przeszczepu u chorych po transplantacji nerki [17].

Poszczególne schorzenia charakteryzują się różnym wzrostem liczby krążących komórek śródbłonka we krwi. Znaczny wzrost CECs był obserwowany w układowych zapaleniach naczyń, w zakażeniu riketsją czy cytomegalowirusem. W schorzeniach z ograniczonym uszkodzeniem śródbłonka naczyń, jak w przypadku przeprowadzonego zabiegu angioplastyki wieńcowej, liczba CECs była nieznacznie podwyższona [13]. Obserwowana jest także różna kinetyka wzrostu tych komórek. Przy rozpoznaniu zakrzepicy żył głębokich liczba CECs znacząco wzrosła, natomiast po 9–15 miesiącach od ostrego incydentu liczba ta istotnie zmalała [18]. Rola CECs, wpływ tych komórek na ścianę naczyniową i inne elementy morfotyczne krwi nie są do końca poznane. Ich działanie prozapalne nie jest udowodnione. Ekspresja czynnika tkankowego na powierzchni CECs może powodować aktywację kaskady krzepnięcia. Wydaje się więc, że niektóre subpopulacje CEC mogą się przyczyniać do rozwoju uszkodzenia naczyń krwionośnych przez inicjowanie procesów prozakrzepowych [7]. Dodatkowo zwiększona liczba CECs u pacjentów z nowotworami świadczy o dużym obrocie komórek endotelium i zaburzonej angiogenezie w obrębie guza oraz jest związana ze zwiększoną objętością naczyń krwionośnych [19].

Izolacja krążących komórek śródbłonka z krwi obwodowej

Wyróżniamy dwie metody pozwalające na wyizolowanie krążących komórek śródbłonka z krwi obwodowej – metoda immunomagnetyczna i cytometria przepływowa. Obie mają swoje ograniczenia, głównie z uwagi na występowanie CECs we krwi w bardzo małej liczbie oraz brak swoistego markera na ich powierzchni. Metoda immunomagnetyczna jest stosowana od dawna, jednak uważana jest za czasochłonną i wymagającą intensywnej pracy laboratoryjnej. Polega ona na izolacji komórek z krwi obwodowej przy pomocy cząstek paramagnetycznych powlekanych odpowiednimi przeciwciałami przeciwśródbłonkowymi, najczęściej anty-CD146 [3]. Cytometria przepływowa natomiast jest dostępną i szybką techniką, która pozwala na jednoczesne oznaczanie wielu markerów oraz rozróżnienie populacji komórek. Metoda ta charakteryzuje się większą czułością, jednak przy jej stosowaniu może dochodzić do przeszacowania liczby komórek, z uwagi na występowanie fałszywie pozytywnych wyników. W grupie kontrolnej osób zdrowych liczba CECs wykrywana techniką cytometrii przepływowej była wielokrotnie wyższa niż przy użyciu metody immunomagnetycznej [3, 13].

Liczba krążących komórek śródbłonka oznaczana metodą immunomagnetyczną u ludzi zdrowych nie przekracza 10/ml [1], ważny jest więc początkowo wychwyt tych komórek przy użyciu czułej metody, a następnie ich identyfikacja za pomocą odpowiednich markerów śródbłonkowych. Niewystarczająca jest identyfikacja CECs za pomocą jednego markera, niezbędne jest oznaczenie kilku antygenów błonowych. Krążące komórki śródbłonka wykazują ekspresję glikoproteiny błonowej CD146, zwanej także S-Endo-1, która jest najbardziej rozpowszechnionym markerem występującym na komórkach śródbłonka. Antygen ten nie jest jednak specyficzny, gdyż występuje także na perycytach, fibroblastach szpiku kostnego, włóknach nerwowych, aktywowanych limfocytach T, na komórkach nowotworowych (czerniaka złośliwego, raka gruczołu krokowego) [20, 21]. Ekspresja antygenu CD133 wskazuje na pochodzenie komórek ze szpiku, jest charakterystyczna dla progenitorowych komórek śródbłonka (EPCs), nie występuje natomiast na krążących komórkach śródbłonka. Podobnie brak ekspresji glikoproteiny CD45 na krążących komórkach śródbłonka pozwala na odróżnienie ich od leukocytów, dojrzałych erytrocytów i płytek krwi [1, 12]. CECs wykazują ponadto ekspresję antygenu CD31 i CD34 [22]. Do oddzielenia martwych komórek z zawiesiny można użyć 7-aminoactinomycyny D (7-AAD) [23].

Krążące komórki śródbłonka możemy podzielić na grupy w zależności od ich fenotypu powierzchniowego. Dojrzałe krążące komórki śródbłonka (*mature* CECs) są definiowane jako CD34+, CD146+, a CD45- i CD133-, aktywowane (*activated* CECs) wykazują dodatkowo ekspresję glikoproteiny

CD106, a spoczynkowe (*resting* CECs) charakteryzują się brakiem tej ekspresji. Poza tym możemy wyróżnić apoptotyczne krążące komórki śródbłonka (*apoptotic* CECs), które wykazują ekspresję aneksyny V [23].

PODSUMOWANIE

Krążące komórki śródbłonka stają się wiarygodnym markerem uszkodzenia śródbłonka naczyń. Określenie liczby CECs we krwi może pomóc w ocenie klinicznej chorób, prognozowaniu ich przebiegu oraz w ocenie skuteczności stosowanego leczenia. Należy podkreślić istotność prowadzenia dalszych badań nad krążącymi komórkami śródbłonka, celem udoskonalenia i ujednolicenia metod ich detekcji we krwi. Cytometria przepływowa wydaje się przyszłościową metodą identyfikacji CECs, pomimo braku jednego, swoistego dla tych komórek antygenu.

PIŚMIENNICTWO

1. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol. 2006; 48(8): 1538–1547.
2. Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. Thrombosis Res. 1973, 3(6): 665–674.
3. Kluz J, Adamiec R. Krążące komórki śródbłonka w zapalnych chorobach naczyń. Adv Clin Exp Med. 2007; 16(1): 95–104.
4. Du F, Zhou J, Gong R, Huang X, Pansuria M, Virtue A, Li X, Wang H, Yang XF: Endothelial progenitor cells in atherosclerosis. Front Biosci. 2012 June 1; 17: 2327–2349.
5. Goon PKY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GYH. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads A methodological comparison. Thromb Haemost. 2006; 96: 45–52.
6. Lampka M, Grąbczewska Z, Jendryczka–Maćkiewicz E, Hołyńska–Iwan I, Sukiennik A, Kubica J i wsp. Circulating endothelial cells in coronary artery disease. Kardiol Pol. 2010; 68(10): 1100–1105.
7. Robak E, Kierstan MK, Kulczycka L, Sysa-Jędrzejowska A. Rola komórek śródbłonka w patogenezie układowego tocznia rumieniowatego. Postepy Hig Med Dosw. 2007; 61: 413–419.
8. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA–associated small–vessel vasculitis. Lancet. 2003; 361: 206–210.
9. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2004; 50(4): 1296–1304.
10. El Solh AA, Akinnusi ME, Berim IG, Peter AM, Paasch LL, Szarpa KR. Hemostatic implications of endothelial cell apoptosis in obstructive sleep apnea. Sleep Breath. 2008; 12(4): 331–337.
11. Asicioglu E, Gogas Yavuz D, Koc M, Ozben B, Yazici D, Deyneli O i wsp. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2010; 162(4): 711–717.
12. McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG i wsp. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. Diabetologia. 2005; 48(2): 345–350.
13. Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD. Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003/2004; 33(5–6): 495–499.
14. Mancuso P, Bertolini F. Circulating endothelial cells as biomarkers in clinical oncology. Microvascular Res. 2010; 79: 224–228.
15. Del Papa N, Cortiana M, Vitali C, Silvestris I, Maglione W, Comina DP, et al. Simvastatin reduces endothelial activation and damage but is partially ineffective in inducing endothelial repair in systemic sclerosis. J Rheumatol. 2008; 35: 1323–1328.
16. Abdelmoneim SS, Talwalkar J, Sethi S, Kamath P, Fathalla MM, Kipp BR i wsp. A prospective pilot study of circulating endothelial cells as a potential new biomarker in portal hypertension. Liver Int. 2010; 30(2): 191–197.
17. Zhang K, Yin F, Lin L. Circulating Endothelial Cells and Chronic Kidney Disease. BioMed Research International 2014, Article ID 364738, doi:10.1155/2014/364738.
18. Alessio A, Beltrame MP, Flores Nascimento MC, Vicente CP, de Godoy JAP, Santos Silva JCR, Bittar LF, Lorand-Metze I, de Paula E, Annichino-Bizzacchi JM. Circulating Progenitor and Mature Endothelial Cells in Deep Vein Thrombosis. Int J Med Sci. 2013; 10(12): 1746–1754.
19. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. Neoplasia. 2006; 8: 79–88.
20. Shantsila E, Lip GYH. Circulating endothelial cells in health and disease: how do we best quantify them? J Thromb Haemost. 2008; 6(6): 1021–1024.
21. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. Thromb Haemost. 2005; 93(2): 228–235.
22. Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain RK. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. Nat Protoc. 2007; 2(4): 805–810.
23. Mariucci S, Rovati B, Chatzileontiadou S, Bencardino K, Manzoni M, Delfanti S i wsp. A six-colour flow cytometric method for simultaneous detection of cell phenotype and apoptosis of circulating endothelial cells. Scand J Clin Lab Invest. 2009; 69(3): 433–438.

Circulating endothelial cells as biomarker of vascular damage

Summary

Blood circulating endothelial cells (CECs) are cells which shed from the intima of the blood vessels into blood circulation in the course of cardiovascular diseases, cancers, infections, and inflammation. In healthy individuals, CECs are not present in peripheral blood or they occur at very low frequency. The presented report summarizes data about CECs, various clinical events with elevated CECs level and the methods of their quantification in the peripheral blood.

CECs are thought to be a novel, reliable, non-invasive marker of vascular damage. CECs count is significantly increased in many pathological states connected with endothelial dysfunction, such as acute coronary syndrome, inflammatory vascular disorders, infections, diabetes, obstructive sleep apnea, and cancer. Clinical studies confirmed a positive correlation between the level of CECs and aggravation of the disease and its prognosis. In addition, CECs enumeration might be crucial for defining an appropriate treatment option for patients, also in anticancer therapy. There are the two main methods of quantification of CECs – immunomagnetic separation and flow cytometry.

CECs count in the peripheral blood becomes helpful in clinical assessment of the activity of diseases, prognosticating their course and evaluation of the effectiveness of treatment. It is crucial to continue studies concerning the occurrence of elevated CECs count in various diseases and reach a consensus in the identification and enumeration of CECs.

Key words

endothelium, circulating endothelial cells, marker of endothelial dysfunction