



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2023 r.



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Wioletta Zielińska

**Rola kanału wapniowego TRPM2 w odpowiedzi komórek
śródbłónka naczyniowego na warunki stresu oksydacyjnego**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

dr hab. n. med. Maciej Gagat, prof. UMK

Bydgoszcz 2023 r.

Spis treści

Wykaz skrótów	5
1. WSTĘP	9
1.1 Wprowadzenie.....	9
1.2 Śródbłonek.....	12
1.2.1 Struktura i funkcja śródbłonka	12
1.2.2 Dysfunkcja śródbłonka	22
1.2.3 Sygnalizacja wapniowa w komórkach śródbłonka	23
1.3 Błonowy kanał wapniowy TRPM2	25
1.3.1 Struktura TRPM2	26
1.3.2 Mechanizmy aktywacji kanału TRPM2	28
1.3.3 Rola TRPM2 w funkcjonowaniu bariery śródbłonkowej	29
1.3.4 Metody inhibicji TRPM2	33
2. CEL PRACY	38
3. MATERIAŁY I METODY	40
3.1 Materiał badawczy i hodowla komórkowa	40
3.2 Traktowanie komórek.....	40
3.3 Transfekcja.....	44
3.4 Test cytotoksyczności MTT	44
3.5 Cytometryczna ocena indukowanej śmierci komórek	46

3.6 Cytometryczna ocena rozkładu faz cyklu komórkowego	46
3.7 Pomiar poziomu jonów wapnia	47
3.8 Test migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego	48
3.9 Test gojenia się ran	49
3.10 Przeciwciała użyte w badaniach	49
3.11 Fluorescencyjne znakowanie białek	51
3.12 Western Blot.....	52
3.13 Analiza statystyczna wyników	53
4. WYNIKI	55
4.1 Obniżenie poziomu TRPM2 z wykorzystaniem siRNA	55
4.1.1 Ocena efektywności transfekcji komórek z wykorzystaniem elektroporacji metodą nukleofekcji.....	55
4.1.2 Ocena żywotności komórek	57
4.1.3 Ocena rodzaju indukowanej śmierci	59
4.1.4 Ocena poziomu jonów wapnia	61
4.1.5 Ocena migracji komórek wobec środowiska chemoatrakcyjnego	63
4.1.6 Ocena migracji komórek z wykorzystaniem testu gojenia się ran	65
4.1.7 Ocena fluorescencji VE-kadheryny i F-aktyny	67
4.1.8 Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny i β -kateniny	69
4.2 Inhibicja kanału TRPM2 oraz enzymu PARP	71
4.2.1 Ocena żywotności komórek	71

4.2.2 Ocena morfologii komórek.....	75
4.2.3 Ocena rodzaju indukowanej śmierci komórek	77
4.2.4 Ocena rozkładu faz cyklu komórkowego w komórkach żywych	80
4.2.5 Ocena fluorescencji	82
4.2.6 Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny	94
4.2.7 Ocena migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego	96
4.2.8 Ocena migracji komórek z wykorzystaniem testu gojenia się ran	100
5. Dyskusja.....	106
6. Wnioski	122
7. Streszczenie	123
8. Summary.....	128
9. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	132
10. Literatura	134

Wykaz skrótów

AP-1 – białko aktywatorowe-1 (*ang. activator protein-1*)

2-APB – boran 2-aminoetoksydifenylu (*ang. 2-aminoethoxydiphenyl borate*)

3-AB – 3-aminobenzamid (*ang. 3-aminobenzamide*)

3-MFA – kwas mefenamowy (*ang. mefenamic acid*)

ABPs – białka wiążące aktynę (*ang. actin-binding proteins*)

ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy (*ang. N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic acid*)

ACE – konwertaza angiotensyny (*ang. angiotensin-converting enzyme*)

ADP – adenozy-no-5'-difosforan (*ang. adenosine-5'-diphosphate*)

ADPR – polimer ADP-rybozy [*ang. poly(ADP-ribose)*]

AMP – adenozy-no-5'-monofosforan (*ang. adenosine-5'-monophosphate*)

ATCC – amerykański bank komórek (*ang. American Type Culture Collection*)

ATP – adenozy-no-5'-trifosforan (*ang. adenosine-5'-triphosphate*)

AV – Aneksyna V (*ang. Annexin V*)

bET1 – dłuższa forma endoteliny 1 (*ang. big endothelin 1*)

CaM – kalmodulina (*ang. calmodulin*)

cAMP – cykliczny adenozy-no-3',5'-monofosforan (*ang. adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*)

CAR – receptor wirusa coxsackie i adenowirusów (*ang. coxsackie and adenovirus receptor*)

COX – cyklooksygeneza (*ang. cyclooxygenase*)

CPP – białko penetrujące komórkę (*ang. cell-penetrating peptide*)

cGMP – cykliczny guanozy-no-3',5'-monofosforan (*ang. guanosine 3',5'-cyclic monophosphate*)

DAG – diacyloglicerol (*ang. diacylglycerol*)

DMEM – medium Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon

EA.hy926 – linia komórkowa będąca hybrydą komórek śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC, *ang. human umbilical vein endothelial cells*) oraz niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix*)

ED – dysfunkcja śródbłonka (*ang. endothelial dysfunction*)

EDHF – czynniki hiperpolaryzacyjne zależne od śródbłonka (*ang. endothelium-dependent hyperpolarizing factor*)

eNOS – śródbłonkowa syntaza NO (*ang. endothelial nitric oxide synthase*)

ER – siateczka śródplazmatyczna (*ang. endoplasmic reticulum*)

FBS – bydlęca surowica płodowa (*ang. foetal bovine serum*)

FFA – kwas flufenamowy (*ang. flufenamic acid*)

GAPDH – dehydrogenaza 3-fosforanu gliceroaldehydu (*ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GFP – białko zielonej fluorescencji (*ang. green fluorescence protein*)

HIF1- α – czynnik indukowany hipoksją-1 α (*ang. hypoxia-inducible factor-1 α*)

HRP – peroksydaza chrzanowa (*ang. horseradish peroxidase*)

HUVEC – komórki śródbłonka żyły pępowinowej (*ang. human umbilical vein endothelial cells*)

ICAM-1 – międzykomórkowa molekula adhezyjna-1 (*ang. intercellular adhesion molecule-1*)

IP₃ – 1,4,5-trisfosforan inozytolu (*ang. inositol 1,4,5 triphosphate*)

JAM – połączeniowe cząsteczki adhezyjne (*ang. junctional adhesion molecules*)

LPS – lipopolisacharyd (*ang. lipopolisaccharide*)

MLC – łańcuchy lekkie miozyny (*ang. myosin light chains*)

MLCK – kinaza łańcuchów lekkich miozyny (*ang. myosin light chains kinase*)

NADPH – oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (*ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF- κ B – jądrowy czynnik kappa B (*ang. nuclear factor kappa B*)

NMN – mononukleotyd nikotynamidu (*ang. nicotinamide mononucleotide*)

NMNAT – adenylotransfereza mononukleotydów nikotynamidu 2 (*ang. nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2*)

NO – tlenek azotu (*ang. nitric oxide*)

NUDT9-H – domena nudix-box odpowiedzialna za wiązanie agonistów przez kanał TRPM2 (*ang. nudix-box sequence motif*)

Orai1 – modulator uwalniania wapnia 1 (CRAMC1, *ang. calcium release-activated calcium modulator 1*)

PARG – glikohydrolaza poli(ADP-rybozy) (*ang. poly(ADP-ribose) glycohydrolase*)

PARP – polimeraza poli(ADP-rybozy) (*ang. poly (ADP-ribose) polymerase*)

PBS – bufor fosforanowy (*ang. phosphate buffered saline*)

PC-PLD – fosfolipaza specyficzna dla fosfatydylocholiny (*ang. phosphatidyl choline-specific phospholipase*)

PECAM-1 – płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezyjna-1 (*ang. platelet endothelial cell adhesion molecule-1*)

PFA – paraformaldehyd (*ang. paraformaldehyde*)

PI – jodek propidyny (*ang. propidium iodide*)

PI-PLC – fosfolipaza C specyficzna dla fosfatydyloinozytolu (*ang. phosphatidyl inositol specific phospholipase C*)

PKG – białka z rodziny kinaz G (*ang. protein kinase G*)

PMCA_s – błonowe ATPazy Ca^{2+} (*ang. plasma membrane Ca^{2+} ATPases*)

PSC – fosfolipaza C (*ang. phospholipase C*)

ROS – reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species*)

SERCA_s – sarkoendoplazmatyczne ATPazy Ca^{2+} (*ang. sarcoendoplasmic Ca^{2+} ATPases*)

SOC – rodzaj kanałów jonowych (*ang. store-operated channels*)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (*ang. superoxide dismutase*)

STAT3 – przekaźnik sygnałów i aktywator transkrypcji 3 (*ang. signal transducer and activator of transcription 3*)

STIM1 – cząsteczka interakcji zrębu 1 (*ang. stromal interaction molecule 1*)

TEM – przezśródbłonkowa transmigracja leukocytów (*ang. leukocyte tranendothelial migration*)

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (*ang. transforming growth factor β*)

TNF α – czynnik martwicy nowotworów α (*ang. tumor necrosis factor α*)

TRP – kanały potencjału receptora przejściowego (*ang. transcient receptor potential*)

TRPC1 – kanoniczny TRP 1 (*ang. TRP canonical 1*)

TRPC6 – kanoniczny TRP 6 (*ang. TRP canonical 6*)

TRPM2 – TRP dla melastatyny (*ang. TRP melastatin 2*)

VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń-1 (*ang. vascular cell adhesion molecule-1*)

VE-kadheryna – kadheryna naczyńniowo-śródbłonkowa (*ang. vascular endothelial-cadherin*)

VEGF – śródbłonkowy czynnik wzrostu (*ang. vascular endothelial growth factor*)

ZO – obwódka zamykająca (*ang. zonula occludens*)

1. WSTĘP

1.1 Wprowadzenie

Śródbłonek naczyniowy stanowi wewnętrzną warstwę nabłonkową wyściełającą naczynia krwionośne oraz jamy serca. Dzięki temu, że ma on bezpośredni kontakt z krwią, selektywnie przepuszcza jej składniki do sąsiadujących tkanek. Warunkiem utrzymania barierowej funkcji śródbłonka naczyń jest ścisłe przyleganie do siebie komórek, które zapewnia sieć połączeń międzykomórkowych, zarówno typu zwierającego, jak i zamykającego [1]. Stąd wszelkie zmiany w strukturze śródbłonka mogą skutkować zaburzeniem jego barierowej funkcji, a w następstwie, niekontrolowanym przedostawaniem się składników krwi do tkanek podśródnabłonkowych. Naturalnym procesem, w którym obserwuje się zmiany w zakresie przepuszczalności śródbłonka jest stan zapalny [2]. W jego przebiegu następuje rekrutacja komórek układu odpornościowego do miejsca zapalenia. Przebywające w krwioobiegu leukocyty są wabione przez chemoatraktanty, co umożliwia powstawanie oddziaływań adhezyjnych oraz przezśródbłonkową transmigrację leukocytów (TEM, *ang. leukocyte tranendothelial migration*) do tkanek otaczających. Przedłużający się stan zapalny może doprowadzić do trwałych uszkodzeń śródbłonka [3]. Taki stan nazywany jest dysfunkcją śródbłonka (ED, *ang. endothelial dysfunction*) i leży u podstaw wielu chorób układu sercowo-naczyniowego, m.in. nadciśnienia i miażdżycy. Występowanie ED potwierdzono również u pacjentów z hipercholesterolemią, cukrzycą oraz u osób palących [4].

Stres oksydacyjny jest jedną ze znanych przyczyn prowadzących do ED [4]. Powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*) w organizmach żywych jest skutkiem metabolizmu komórkowego. Głównym źródłem ROS w organizmach tlenowych jest ich uwalnianie z mitochondriów w trakcie oddychania tlenowego. Dodatkowo ROS produkowane są w wyniku działania niektórych enzymów, tj. oksydazy ksantynowej, oksydazy fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH, *ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oraz oksydazy cytochromu p450. ROS są niezbędne w procesie komunikacji międzykomórkowej nazywanej sygnalizacją redoks [5]. Jednakże kluczem do utrzymania homeostazy jest balans pomiędzy produkcją i rozkładem ROS. Organizmy posiadają szereg systemów obronnych w celu eliminacji ROS, bądź naprawy wywołanych przez nie uszkodzeń. W przebieg mechanizmów antyoksydacyjnych zaangażowane są takie enzymy jak katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, *ang. superoxide*

dismutase), czy peroksydaza glutationowa. Pewne znaczenie mogą mieć również antyoksydanty przyjmowane wraz z pożywieniem lub w formie suplementów. Jednakże jest to zagadnienie kontrowersyjne, gdyż literatura wskazuje na zróżnicowaną odpowiedź badanych organizmów na zastosowanie suplementacji antyoksydantami [6]. Stres oksydacyjny jest zjawiskiem, podczas którego dochodzi do nadmiernej produkcji ROS w stosunku do antyoksydacyjnych możliwości organizmu. Wynikiem zaburzeń w homeostazie redoks są uszkodzenia różnych cząsteczek, a w szczególności białek, lipidów oraz w obrębie DNA. W komórkach śródbłonna w efekcie nasilenia stresu oksydacyjnego obserwuje się rozluźnienie połączeń międzykomórkowych oraz śmierć komórek na drodze apoptozy. Powoduje to powstawanie przestrzeni międzykomórkowych, a tym samym zmiany w strukturze bariery śródbłonkowej, która staje się nadmiernie przepuszczalna [7].

Jony Ca^{2+} są drugorzędowym przekaźnikiem informacji w komórce, a ich stężenie wewnątrzkomórkowe jest ściśle kontrolowane. W warunkach spoczynkowych w cytoplazmie utrzymywane jest stosunkowo niskie stężenie Ca^{2+} wynoszące około 100 nM, jednak w procesie pobudzenia komórek obserwuje się znaczny wzrost koncentracji, nawet do poziomu 1000 nM [8]. Jest to spowodowane w pierwszej kolejności uwolnieniem Ca^{2+} z magazynu wewnątrzkomórkowego, którego funkcję pełni siateczka śródplazmatyczna (ER, *ang. endoplasmic reticulum*). Następnie dochodzi do otwarcia błonowych kanałów wapniowych, poprzez które do komórki napływają jony Ca^{2+} zgromadzone w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wzrost stężenia Ca^{2+} wewnątrz komórki wpływa na liczne szlaki sygnalizacyjne oraz procesy życiowe komórek, w tym migrację, proliferację, a nawet śmierć [8]. Sygnalizacja wapniowa jest również interesująca w kontekście ED i funkcjonowania śródbłonna. Jony Ca^{2+} wpływają na stabilność białek z grupy kadheryn. Są to białka połączeniowe zaangażowane w tworzenie połączeń zwierających nazywanych również adherentnymi. Wariantem kadheryny, która ulega ekspresji w komórkach śródbłonna jest kadheryna naczyniowo-śródbłonkowa (VE-kadheryna, *ang. vascular endothelial-cadherin*) [9]. Trwałość połączeń zwierających pomiędzy komórkami śródbłonna jest kluczowa, gdyż dopiero w warunkach ich stabilności możliwe jest utworzenie połączeń zamykających. Innym zjawiskiem prowadzącym do ED są zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego. Jest to możliwe dzięki białkom wiążącym aktynę (ABPs, *ang. actin-binding proteins*). Jednym z ABPs jest gelsolina, której funkcjonowanie ściśle zależy od stężenia jonów Ca^{2+} . Białko to wpływa na regulację ruchu komórek oraz utrzymanie ich kształtu poprzez cięcie oraz czapeczkowanie

filamentów aktynowych. Aktywacja gelsoliny w odpowiedzi na wzrost stężenia jonów Ca^{2+} jest procesem wieloetapowym i wieloaspektowym. Jednakże wiadomo, że to właśnie od stężenia jonów Ca^{2+} zależy zdolność białka do cięcia filamentów aktynowych [10]. Powiązanie pomiędzy jonami Ca^{2+} , gelsoliną oraz cytoszkieletem aktynowym może wyjaśniać dlaczego wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} wpływa na zdolności migracyjne komórek. Ostatnim z etapów sygnalizacji wapniowej powinno być wypompowanie jonów Ca^{2+} z cytozolu, w celu przywrócenia ich bazowego poziomu. W procesie tym biorą udział białka z grupy ATPaz, tj. (i) błonowe ATPazy Ca^{2+} (PMCA, *ang. plasma membrane Ca^{2+} ATPases*), które usuwają jony Ca^{2+} z komórki poprzez ich transport do przestrzeni międzykomórkowej, oraz (ii) sarkoendoplazmatyczne ATPazy Ca^{2+} (SERCAs, *ang. sarcoendoplasmic Ca^{2+} ATPases*), które są odpowiedzialne za ponowne zmagazynowanie Ca^{2+} w ER. Obie rodziny pomp wapniowych mogą działać dzięki energii pochodzącej z rozkładu adenosyno-5'-trifosforanu (ATP, *ang. adenosine-5'-triphosphate*). Wynikiem nadmiernego nagromadzenia Ca^{2+} może być śmierć komórki na drodze apoptozy [11]. Znaczące podwyższenie poziomu Ca^{2+} prowadzi do aktywacji enzymów hydrolitycznych, upośledza metabolizm energetyczny komórki oraz inicjuje degradację cytoszkieletu, co ostatecznie skutkuje śmiercią komórki.

Do błonowych kanałów wapniowych, których ekspresję potwierdzono w komórkach śródbłonna należą kanały typu SOC (*ang. store-operated channels*), które są aktywowane przez uwolnienie jonów Ca^{2+} z ER, co jest związane ze stymulacją licznych receptorów błonowych. Przykładami takich kanałów są cząsteczka interakcji zrębu 1 (STIM1, *ang. stromal interaction molecule 1*) oraz modulator uwalniania wapnia 1 (Orai1, *ang. calcium release-activated calcium modulator 1*), lecz również kanały potencjału receptora przejściowego (TRP, *ang. transient receptor potential*) np. kanoniczny TRP 1 (TRPC1, *ang. TRP canonical 1*) [12]. Innym typem kanałów wapniowych charakterystycznych dla komórek śródbłonna są kanały kationowe uruchamiane przez receptory (*ang. receptor-operated cation channels*), których aktywacja nie jest warunkowana wcześniejszym uwolnieniem jonów Ca^{2+} z ER. Przykładem może być kanoniczny TRP 6 (TRPC6, *ang. TRP canonical 6*), którego aktywację w komórkach śródbłonna obserwuje się np. w przebiegu TEM [13]. Kolejnym błonowym kanałem wapniowym, którego ekspresję potwierdzono w komórkach śródbłonna jest TRP dla melastatyny 2 (TRPM2, *ang. TRP melastatin 2*) [14]. Jednym z najlepiej poznanych szlaków aktywacji tego kanału jest ten związany z ADP-rybozą (ADPR, *ang. ADP-ribose*). ADPR powstaje poprzez rybozylację ADP oraz bierze udział w reakcjach katalizowanych przez polimerazy ADPR

(PARP, *ang. poly(ADP-ribose) polymerase*). Poli(ADPR) może być ponownie rozłożony do monomerów przez glikohydrolazę ADPR (PARG, *ang. poly(ADP-ribose) glycohydrolase*). Aktywacja PARP i PARG jest efektem uszkodzeń komórki powstałych w wyniku działalności ROS. Udowodniono również, że jednym z efektów traktowania komórek nadtlaniem wodoru jest dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} spowodowany aktywacją TRPM2 [14]. Stąd kanał ten stanowi punkt łączący ED, jony Ca^{2+} oraz mechanizmy działania stresu oksydacyjnego.

1.2 Śródbłonek

1.2.1 Struktura i funkcja śródbłonka

Śródbłonek naczyniowy jest wyspecjalizowanym nabłonkiem jednowarstwowym płaskim. Ta pojedyncza warstwa komórek wyściela cały układ krążenia, od jam serca aż do najmniejszych naczyń włosowatych. Jednym z podstawowych zadań śródbłonka jest selekcja składników, które mają przeniknąć z krwioobiegu do otaczających tkanek [15]. Komórki śródbłonka, hodowane *in vitro*, wykazują fenotyp nabłonkowo-podobny. Oznacza to, że błony komórkowe sąsiadnych komórek ściśle do siebie przylegają, nadając strukturze wygląd przypominający kostkę brukową. Zwarty układ komórek śródbłonka regulowany jest siecią połączeń międzykomórkowych obejmującą: (i) połączenia zwierające, (ii) połączenia zamykające oraz (iii) połączenia komunikacyjne. Barrierową funkcję śródbłonka umożliwia szereg białek adehezyjnych, tj. VCAM-1 (*ang. vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*ang. intercellular adhesion molecule-1*), PECAM-1 (*ang. platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), talina oraz nektyna [16]. Białka adhezji komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (ECM, *ang. extracellular matrix*) są połączone ze strukturą cytoszkieletu poprzez szereg białek adaptorowych. Ma to na celu przeniesienie naprężeń ze stosunkowo słabej struktury połączeń punktowych na całą strukturę cytoszkieletu, co czyni połączenia mniej podatnymi na zerwanie oraz umożliwia kooperację mechaniczną zwartej grupy komórek.

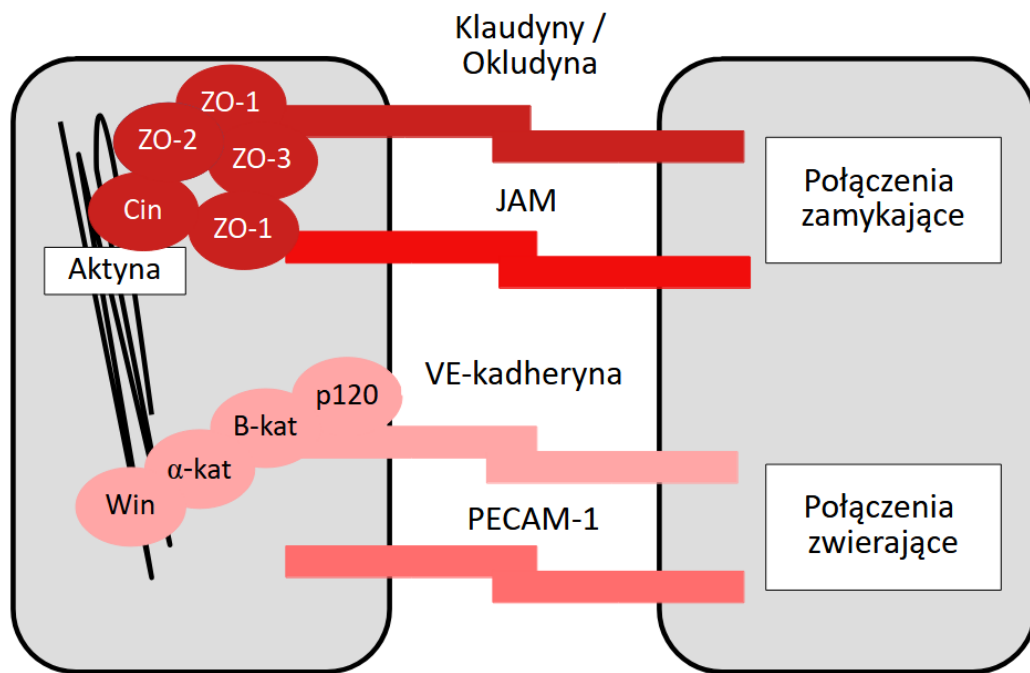
Połączenia zamykające są tworzone przez białka np. okludyna, kładyny oraz białka JAM (*ang. junctional adhesion molecules*) [17]. Ich funkcją jest regulacja dyfuzji jonów oraz polarnych rozpuszczalników. Ograniczają one również przenikanie przez barierę śródbłonkową cząstek o średnicy większej niż 4 Å [18]. Jednym z kluczowych dla funkcjonowania śródbłonka białek tworzących połączenia zamykające jest kładyna-5, która pełni istotną rolę w regulacji jego przepuszczalności. Zarówno kładyny, jak i okludyna są ściśle

powiązane z białkami rodziny ZO (*ang. zonula occludens*) w tym ZO-1, ZO-2 oraz ZO-3, które pośredniczą w interakcjach pomiędzy białkami połączeniowymi, a cytoszkieletem aktynowym. Z punktu widzenia przepuszczalności śródbłónka istotnymi są również oddziaływania za pośrednictwem białek JAM i receptora wirusa coxsackie i adenowirusów (CAR, *ang. coxsackie and adenovirus receptor*), które wpływają na proces składania i stabilizacji połączeń typu zamykającego [17].

Białkiem kluczowym w formowaniu połączeń zwierających pomiędzy komórkami śródbłónka jest VE-kadheryna. Główną funkcją połączeń za pośrednictwem systemu kadherynowego jest mechaniczne utrzymanie zespołu komórek jako ściśle kooperującej ze sobą całości. Białko to jest również w sposób pośredni połączone ze strukturą cytoszkieletu. W skład kompleksu połączeniowego wchodzi α -katenina, β -katenina, plakoglobina (nazywana też γ -kateniną), katenina p120 oraz α -aktylina [19]. Dodatkowo białka te wpływają na proces formowania się i rozkładu połączeń zwierających. Choć połączenia zwierające i zamykające zbudowane są z różnych cząsteczek i pełnią odmienne funkcje, ich wzajemne powiązanie zostało wykazane przez szereg badań naukowych [20]. VE-kadheryna jest w stanie regulować ekspresję białek wchodzących w skład połączeń zamykających. Dodatkowo połączenia zamykające mogą wykształcić się dopiero w warunkach stabilności połączeń zwierających. Stąd, uważa się, że połączenia zwierające stanowią architekturę istotną w procesie formowania się połączeń zamykających. Jednym z elementów, który integruje i umożliwia komunikację pomiędzy oboma rodzajami połączeń są białka ZO [20].

Połączenia komunikacyjne (nazywane również jonowo-metabolicznymi lub szczelinowymi) bezpośrednio nie wpływają na wzajemne przyleganie komórek. Są one tworzone przez białka z rodziny koneksyn. Sześć koneksyn buduje strukturę pojedynczego koneksonu, który łączy ze sobą cytoplazmę komórek umożliwiając bezpośredni transport niewielkich cząstek, tj. jonów czy wody. Połączenia te stanowią relatywnie szybki sposób wymiany informacji pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Jednakże ich zaangażowanie w funkcjonowanie bariery śródbłónkowej wzbudza rosnące zainteresowanie w środowisku naukowym. Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe izolowane z osocza krwi pacjentów z niedokrwistością sierpowatą oraz ostrym zespołem klatki piersiowej indukują rozkład połączeń zamykających i zwierających, ale również komunikacyjnych [21]. Co więcej, to właśnie degradacja tych ostatnich była obserwowana jako pierwsza. Dodatkowo spadek

intensywności fluorescencji białek tworzących poszczególne rodzaje połączeń również wskazywał na najbardziej istotne zmiany w obrębie połączeń komunikacyjnych [21]. Struktura wybranych połączeń międzykomórkowych została przedstawiona na **Rycinie 1**.



Rycina 1. Schemat budowy wybranych połączeń międzykomórkowych w komórkach śródbłónka. α -kat – α -katenina, β -kat – β -katenina, Cln – cinkulina, JAM – połączeniowe cząsteczki adhezyjne, p120 – katenina p120, PECAM-1 – płytkowo-śródbłónkowa cząsteczka adhezyjna 1, Win – winkulina, ZO – obwódka zamykająca. Zmodyfikowano na podstawie [22].

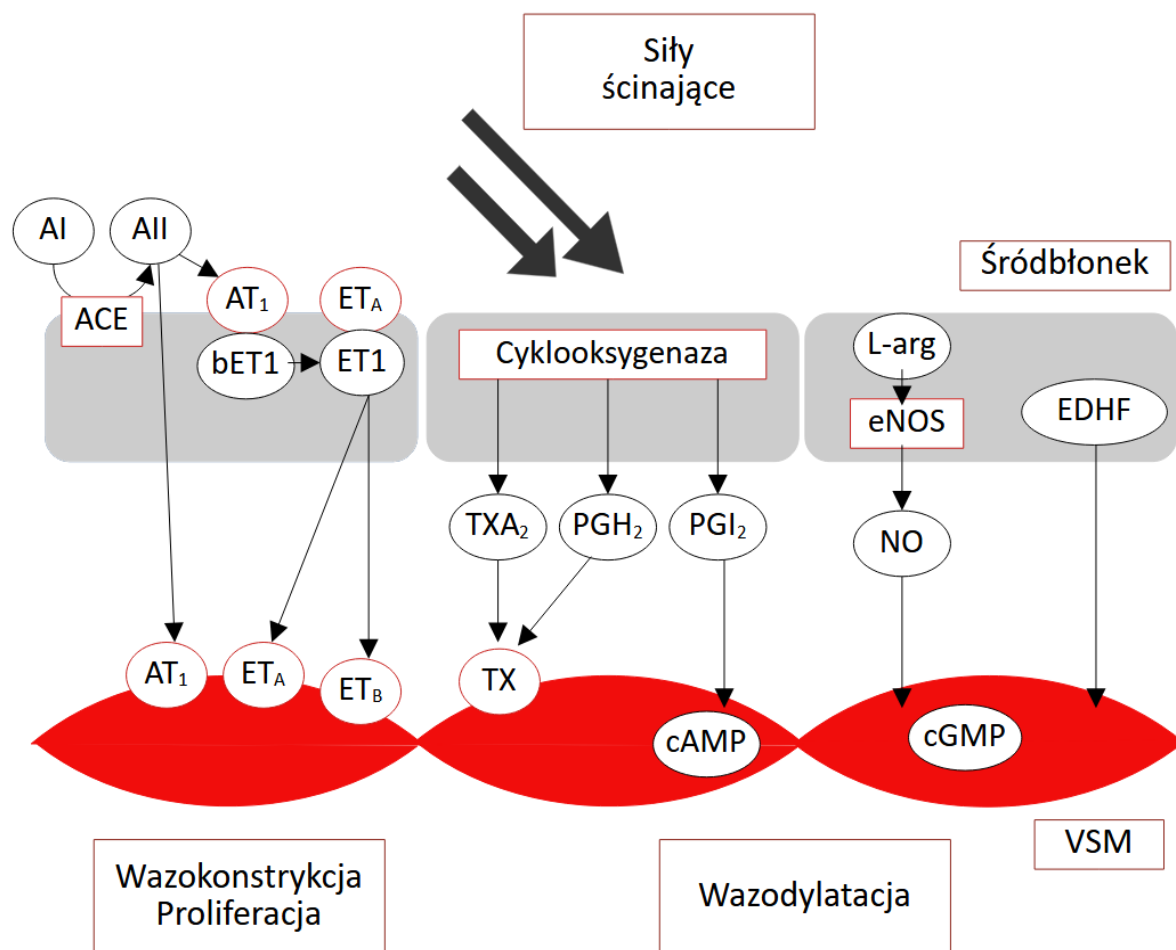
Znaczenie śródbłonna nie ogranicza się do funkcji barierowej. Odgrywa on również ważną rolę w modulowaniu napięcia ściany naczyń poprzez syntezę i uwalnianie: (i) czynników wazodylatacyjnych, w tym prostaglandyn, tlenku azotu (NO, *ang. nitric oxide*) i czynników hiperpolaryzacyjnych zależnych od śródbłonna (EDHF, *ang. endothelium-dependent hyperpolarizing factor*), oraz (ii) czynników wazokonstrykcyjnych, w tym endoteliny, tromboksanu A₂, czy anionorodnika ponadtlenkowego [23]. Dzięki tym substancjom komórki śródbłonna w sposób parakrynnny mogą wpływać na stopień napięcia miocytów gładkich leżących w błonie środkowej naczyń krwionośnych.

NO jest podstawowym czynnikiem wazodylatacyjnym w prawidłowo funkcjonujących komórkach śródbłonna naczyń wieńcowych. Jest on wytwarzany przez śródbłonkową konstytutywną syntazę NO (eNOS, *ang. endothelial NO synthase*) z L-argininy [24]. Po dotarciu do warstwy mięśniówki gładkiej naczyń, NO aktywuje cyklazę guanylową, która katalizuje reakcje formowania cyklicznego guanozyny-3',5'-monofosforanu (cGMP, *ang. guanosine 3',5'-cyclic monophosphate*). To z kolei powoduje aktywację białek z rodziny kinaz G (PKG, *ang. protein kinase G*) oraz kanałów potasowych [25]. Aktywacja eNOS może być spowodowana przez niektóre receptory, w tym dla bradykininy i muskaryny, a także działanie sił ścinających oraz odkształcenie komórek w następstwie pulsacyjnego przepływu krwi. Prostacyklina oraz inne prostanoidy, indukujące rozszerzenie naczyń krwionośnych, produkowane są z kwasu arachidonowego z udziałem cyklooksygenazy (COX, *ang. cyclooxygenase*) [26]. Prostanoidy wiążą się z odpowiednimi receptorami, co pobudza produkcję cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (cAMP, *ang. adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*). Rezultatem tego jest otwarcie kanałów potasowych zależnych od ATP i zwiększenie przepływu krwi przez naczynie. Mechanizmy rozkurczu mięśni gładkich ściany naczyń krwionośnych w wyniku działania NO i prostanoidów wydają się być ze sobą powiązane. Prawdopodobnym jest, że niedobór lub upośledzone działanie eNOS może być częściowo kompensowane przez działanie prostanoidów [27]. Śródbłonek wytwarza również inne czynniki powodujące rozszerzenie naczyń krwionośnych w odpowiedzi na acetylocholinę oraz bradykininę. Substancje te nazwane są zbiorczo jako EDHF, gdyż indukują one hiperpolaryzację miocytów gładkich budujących błonę środkową ściany naczyń krwionośnych. Czynniki te to m.in. zależne od cytochromu p450 metabolity kwasu arachidonowego czy nadutlenek wodoru produkowany przez mitochondria. Doniesienia literaturowe sugerują, że udział EDHF w relaksacji naczyń krwionośnych jest bardziej znaczący w łóżyskach naczyniowych i stanach fizjopatologicznych,

w których mniejszą rolę odgrywa NO [28]. Wydzielanie EDHF, podobnie jak w przypadku NO, może być indukowane poprzez wiązanie agonisty z określonymi receptorami oraz siły ścinające oddziałujące na ścianę naczyń. Na stan układu krążenia za pośrednictwem EDHF mogą oddziaływać również estrogeny. U szczurów rasy Wistar po usunięciu jajników obserwowano ograniczenie hiperpolaryzacji indukowanej przez EDHF w tętniczkach łożyskowych krezki. Efekt ten nie był widoczny w przypadku samic, którym dodatkowo podano 17 β -estradiol [29]. Może to wyjaśniać niższą zapadalność kobiet w okresie przedmenopauzalnym na choroby układu krążenia w porównaniu do mężczyzn lub kobiet po menopauzie. Zagadnienie to jednak wciąż budzi kontrowersje, gdyż w krążeniu mózgowym udział EDHF w relaksacji naczyń jest mniejszy u kobiet niż u mężczyzn [30]. Ponadto nie wiadomo jakie jest znaczenie połączeń szczelinowych w hiperpolaryzacji miocytów gładkich. Mioendotelialne połączenia szczelinowe prawdopodobnie wywodzą się z komórek śródbłoka i poprzecznie przerywają ciągłość błony podstawnej, w taki sposób by umożliwić kontakt z błoną komórkową mięśni gładkich [31]. Sugeruje to różnice w budowie tego rodzaju połączeń względem połączeń szczelinowych łączących komórki tego samego typu.

Endotelina jest jednym z najsilniejszych endogennych czynników wazokonstrykcyjnych. Wyróżnia się trzy izoformy białka – endotelinę-1, 2 oraz 3. Prawdopodobnie tylko endotelina-1 jest wydzielana przez komórki śródbłoka. Z kolei produkcję endoteliny-2 obserwuje się w jelitach i nerkach, a endoteliny-3 głównie w obrębie tkanki nerwowej [32]. Wykazano, że endotelina-1 oddziałuje na miocyty gładkie ściany naczyń w sposób parakrynnny, natomiast autokrynnie na komórki śródbłoka. Ponadto wydzielanie tego białka przez komórki śródbłoka zachodzi w kierunku bazolateralnym, tak by szybko oddziaływać na leżące poniżej komórki mięśni gładkich, co tłumaczy wyższy poziom tego białka w obrębie tkanki niż w osoczu [33]. Dodatkowo cechą charakterystyczną endoteliny-1 jest krótki czas rozpadu, co eliminuje możliwość endokrynnego działania tego białka [32]. Synteza i wydzielanie endoteliny-1 jest regulowane głównie przez siły ścinające i odkształcenie ściany naczyń. Aktywacja receptorów odbierających informacje o naprężeniach działających na komórki śródbłoka skutkuje zwiększeniem produkcji NO oraz hamowaniem syntezy endoteliny-1 [34]. Natomiast nasilenie produkcji powyższego czynnika wazokonstrykcyjnego może zachodzić w wyniku działania niektórych cytokin, np. transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , *ang. transforming growth factor β*), czynnika martwicy nowotworów α (TNF α , *ang. tumor necrosis factor α*), insuliny, norepinefryny,

trombiny, interleukin, czy angiotensyny II [35–38]. Endoteliny oddziałują na komórki w następstwie ich związania z receptorami. Dwoma głównymi rodzajami są receptory dla endoteliny typu A oraz B (ET_A i ET_B). W błonie komórkowej miocytów gładkich ściany naczyń krwionośnych obserwuje się ekspresję obu z nich [39]. Sposób działania białka jest złożony. W jednym z opisanych mechanizmów w wyniku pobudzenia receptora ET_A dochodzi do aktywacji fosfolipazy C (PSC, *ang. phospholipase C*), co skutkuje powstawaniem 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP₃, *ang. inositol 1,4,5 triphosphate*) i diacyloglicerolu (DAG, *ang. diacylglycerol*) z fosfatydyloinozytolu. IP₃ aktywuje receptory zlokalizowane w ER, co prowadzi do uwolnienia jonów Ca²⁺ i skutkuje skurczem mięśni gładkich oraz zwężeniem światła naczynia [40]. Opisane zostały również szlaki związane z aktywacją fosfolipazy specyficznej dla fosfatydylocholine (PC-PLD, *ang. phosphatidyl choline-specific phospholipase*) czy fosfolipazy C specyficznej dla fosfatydyloinozytolu (PI-PLC, *ang. phosphatidyl inositol specific phospholipase C*) [41–43]. Informacje na temat czynników wazoaktywnych produkowanych przez śródbłonek oraz ich oddziaływanie z miocytami gładkimi błony środkowej naczyń krwionośnych zostały podsumowane na **Rycinie 2**.



Rycina 2. Czynniki wazoaktywne produkowane przez śródbłonek oraz ich oddziaływanie na komórki mięśniówki gładkiej błony środkowej naczyń krwionośnych. AI – angiotensyna I, AII – angiotensyna II, ACE – konwertaza angiotensyny (*ang. angiotensin-converting enzyme*), AT₁ – receptor dla angiotensyny typu 1, bET1 – dłuższa forma endoteliny-1 (*ang. big endothelin 1*), cAMP – cykliczny adenozyνο-3',5'-monofosforan, cGMP – cykliczny guanozyνο-3',5'-monofosforan, EDHF – czynniki hiperpolaryzujące zależne od śródbłonka, eNOS – syntaza tlenu azotu, ET1 – endotelina-1, ET_A – receptor dla endoteliny typu A, ET_B – receptor dla endoteliny typu B, L-arg – L-arginina, NO – tlenek azotu, PGH₂ – prostaglandyna H₂, PGI₂ – prostaglandyna I₂, TX – receptor dla tromboksanu, TXA₂ – tromboksan A₂, VSM – miocyty gładkie ściany naczyń. Zmodyfikowano na podstawie [44].

Kolejną z istotnych funkcji śródbłónka jest jego udział w TEM. Jest to proces ściśle związany ze stanem zapalnym. Dzięki niemu znajdujące się we krwi leukocyty są rekrutowane do miejsca zapalenia. Zgodnie z przyjmowanym obecnie modelem w trakcie TEM można wyróżnić następujące kroki: wybicie leukocytów z głównego strumienia krwi, toczenie komórek układu odpornościowego po powierzchni komórek śródbłónka, ich rozpłaszczanie będące wynikiem coraz mocniejszej adhezji do komórek śródbłónka oraz diapedezę [45]. Ostatni etap może odbywać się na dwa sposoby: (i) pomiędzy komórkami śródbłónka (szlak parakomórkowy) lub (ii) przez cytoplazmę komórek śródbłónka (szlak transkomórkowy). Wprawdzie diapedeza może zachodzić na całej powierzchni śródbłónka, to w pewnych miejscach proces ten obserwuje się znacznie częściej niż w innych. Takie miejsca nazywane są gorącymi punktami transmigracji [46]. Jednakże ich funkcjonowanie wciąż pozostaje zagadką. Istnieje wiele czynników, które są w stanie oddziaływać na komórki układu odpornościowego. Wśród nich wyróżnia się: (i) chemokiny (prowadzące do chemotaksji), (ii) cząsteczki adhezyjne (prowadzące do haptotaksji), (iii) sztywność komórek (prowadząca do durotaksji), oraz (iv) opór (prowadzący do tenertaksji). Znaczenie w TEM mają również siły ścinające, rodzaj naczynia krwionośnego, czy nawet skład glikokaliksu [46]. Leukocyty płynące wraz ze strumieniem krwi są wabione w kierunku ściany naczynia za pośrednictwem chemoatraktantów, np. leukotrien B₄, CXCL1 do CXCL3 oraz CXCL5 do CXCL8 [47]. Z kolei przyleganie i toczenie komórek po powierzchni śródbłónka umożliwiają cząsteczki adhezyjne, tj. L- i E-selektyna. Tworzą one nietrwałe połączenia pomiędzy komórkami, a ich powstawanie i zrywanie skutkuje wprowadzeniem leukocyty w ruch obrotowy po komórkach śródbłónka. W kolejnym kroku wytwarzane są bardziej stabilne połączenia z udziałem integryn oraz cząsteczek adhezyjnych typu VCAM-1 oraz ICAM-1, co skutkuje silniejszym przyleganiem i zatrzymaniem leukocyty oraz umożliwia jego migrację przez barierę śródbłónkową [48]. W opisie TEM wciąż brakuje jednak odpowiedzi na wiele pytań, wśród nich: (i) Dlaczego istnieją dwa szlaki – parakomórkowy oraz transkomórkowy? oraz (ii) Jak TEM oddziałuje na przepuszczalność śródbłónka? Logicznym wydaje się, że TEM powinna skutkować rozluźnieniem struktury połączeń między komórkami śródbłónka, czego efektem byłoby zwiększenie przepuszczalności bariery śródbłónkowej. Rzeczywiście w przebiegu stanu zapalnego obserwuje się lokalne przesączenie składników osocza do otaczających tkanek, co skutkuje ich obrzękiem. Jednak, w przypadku jednoczesnego badania przepuszczalności naczyń oraz interakcji śródbłonek-leukocyty stwierdzono znaczne różnice w lokalizacji

miejsowych przecieków oraz miejsc transmigracji i adhezji komórek układu odpornościowego [22]. Co więcej, wykazano, że adhezja i TEM słabo korelują ze zmianą przepuszczalności bariery śródbłonkowej pod względem czasu występowania w przypadkach ostrego stanu zapalnego [49]. Jednakże to w jaki sposób śródbłonek w trakcie TEM może utrzymywać ścisłą strukturę połączeń międzykomórkowych wciąż nie zostało wyjaśnione.

Inną istotną funkcją śródbłonka jest zdolność formowania nowych naczyń krwionośnych określana mianem angiogenezy. Proces ten jest podstawą tworzenia układu naczyń w trakcie rozwoju embrionalnego. U ludzi dorosłych angiogeneza jest zjawiskiem rzadkim. W warunkach fizjologicznych proces ten obserwuje się w mięśniach szkieletowych jako skutek wysiłku fizycznego oraz w błonie śluzowej macicy w trakcie odbudowy warstwy czynnościowej przed owulacją [50,51]. Zdolność do wytwarzania nowych naczyń krwionośnych przez komórki śródbłonka wzrasta po wystąpieniu urazu tkankowego. Przykładem może być tutaj mechanizm gojenia się tkanki ścięgnowej [52]. Jednym z najlepiej opisanych aktywatorów neowaskularyzacji jest śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*) oraz oś VEGF/Notch [53]. Wykazano, że związanie czynnika z receptorami w obrębie komórek śródbłonka nasila ich migrację oraz proliferację, a więc procesy niezbędne do wytworzenia nowego naczynia. Poziom VEGF podnosi się nie tylko w przebiegu procesu regeneracji tkanki, ale również w warunkach obniżonej dostępności tlenu. Z tego względu proces angiogenezy ściśle związany jest także z nowotworzeniem. Zapotrzebowanie na tlen szybko dzielących się komórek nowotworowych przestaje być zaspokajane przez otaczającą je sieć naczyń krwionośnych. Dodatkowo nagromadzone produkty metabolizmu prowadzą do martwicy. Panujące w centrum guzów litych warunki prozapalne przy jednoczesnej hipoksji sprzyjają angiogenezie [54]. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych może prowadzić do ekspansji nowotworu. Stąd tak silny nacisk w terapii onkologicznej kładzie się na próby powstrzymania angiogenezy np. poprzez obniżenie poziomu VEGF. Co ciekawe, na proces formowania się naczyń krwionośnych wpływać mogą również czynniki związane ze stylem życia, np. palenie wyrobów tytoniowych. Badania przeprowadzone na materiale biopsyjnym oskrzeli potwierdziły obecność większej ilości naczyń, ich większą powierzchnię oraz wyższą ekspresję VEGF u palaczy w stosunku do osób niepalących [55]. Zjawisko adaptacyjnej angiogenezy stwierdzono również w łożyskach matek palących w trakcie ciąży [56]. Jednakże w przypadku złamań kości, w materiale pochodzącym od palaczy oraz ze szpiku kostnego traktowanym osoczem krwi osób palących zmieszanym z

ekstraktem dymu papierosowego, stwierdzono zaburzenia w formowaniu się skrzepu, częstości angiogenezy oraz spowolnienie regeneracji [57]. Wykazano również, że palenie tytoniu upośledza unaczynienie ścięgna bicepsa w przewlekłej tendinopatii, co skutkowało powstawaniem niekolagenowych wysp tkanki ścięgnistej składających się ze zbitych kwaśnych polisacharydów [52]. Podobnie komórki tętnicy płucnej traktowane ekstraktem dymu papierosowego charakteryzowały się niższymi zdolnościami do migracji i formowania struktur tubularnych [58]. Tak zróżnicowana odpowiedź komórek śródbłónka pochodzących z różnych lokalizacji dodatkowo podkreśla silną heterogeniczność tej grupy komórek.

Ze względu na liczne funkcje śródbłónka, prawidłowe funkcjonowanie tej struktury jest kluczowe dla utrzymania homeostazy układu krążenia. Przewlekłe nieprawidłowości w zakresie funkcjonowania śródbłónka prowadzą do jego dysfunkcji, co z kolei jest podłożem wielu chorób układu sercowo-naczyniowego.

1.2.2 Dysfunkcja śródbłónka

ED jest najczęściej rozumiana jako dysproporcja pomiędzy produkcją czynników wazodylatacyjnych oraz wazokonstrykcyjnych przez komórki śródbłónka [15]. W warunkach spoczynkowych przeważać powinna synteza czynników powodujących rozkurcz ściany naczyń z lokalnymi zmianami w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, tj. wybrane cząsteczki sygnałowe czy siły ścinające wywierane przez krew na powierzchnię ściany naczyń. Jednakże w przebiegu ED obserwuje się nasilenie produkcji czynników wazokonstrykcyjnych. Możliwym jest, że zaburzenie równowagi w syntezie substancji odpowiedzialnych za rozszerzenie i zwężenie światła naczyń jest jedynie objawem problemów, które na poziomie komórkowym manifestują się znacznie wcześniej [59]. W przebiegu ED obserwuje się reorganizację cytoszkieletu aktynowego, nasiloną ekspresję cząsteczek adhezyjnych, zmiany w obrębie regionu połączeń komórka-komórka oraz zaburzenia zdolności migracyjnych komórek. Są to zmiany, które wiążą się często z aktywacją śródbłónka, rozumianą jako przejście ze stanu spoczynkowego do formy umożliwiającej odpowiedź obronną organizmu. Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego, np. dym papierosowy lub L-homocysteina, stymulują produkcję chemokin, cytokin i cząsteczek adhezyjnych odpowiedzialnych za interakcje z leukocytami i trombocytami oraz ukierunkowanie odpowiedzi zapalnej na określone tkanki w celu efektywnej eliminacji patogenów [60,61]. Aktywowany śródbłonek zmienia sposób sygnalizacji z opartego o NO na sygnalizację typu redoks. ROS w obecności SOD prowadzą do

wytworzenia nadtlenu wodoru, który szybko dyfunduje w obrębie komórki zmieniając funkcję białek poprzez reakcje z ich grupami cysteinowymi. Kluczowym enzymem jest tutaj eNOS. W warunkach spoczynkowych enzym ten katalizuje produkcję NO, jednakże jest on w stanie również generować ROS, co z kolei sprzyja aktywacji śródbłonna [62]. Zmiany obserwowane na poziomie komórkowym oraz zaburzenia równowagi w produkcji czynników wazodylatacyjnych i wazokonstrykcyjnych pozostają więc nierozzerwalnie ze sobą powiązane. Jednakże aktywacja śródbłonna jest obserwowana w przebiegu procesu zapalnego i wcale nie musi prowadzić do jego dysfunkcji. Na rozwój patologii mogą mieć wpływ takie czynniki, jak zakres, natura, czy czas trwania stymulacji, a nawet specyfika oddziaływania danych czynników prozapalnych. Badania wskazują, że przewlekły stan zapalny jest jedną z podstawowych przyczyn ED [63]. Stąd schorzenia, w których obserwuje się nasilenie stanu zapalnego oraz stres oksydacyjny, tj. hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, a nawet choroby przyzębia wiąże się z rozwojem ED [64–66]. To, które z tych chorób są skutkiem ED, a które jego przyczyną, pozostaje wciąż otwarte. Wiadomo jednak, że niezależnie od przyczyny, nasilony stres oksydacyjny prowadzi do zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją NO i ROS, czego rezultatem jest dalsza aktywacja śródbłonna oraz stan zapalny.

Ze względu na zaangażowanie jonów Ca^{2+} w przebieg zmian obserwowanych w trakcie ED sygnalizacja wapniowa komórek śródbłonna również leży w kręgu zainteresowań badaczy zajmujących się tym zagadnieniem.

1.2.3 Sygnalizacja wapniowa w komórkach śródbłonna

Jony Ca^{2+} są niezbędnym drugorzędowym przekaźnikiem informacji w komórkach, w tym również w komórkach śródbłonna. Regulują one procesy zachodzące na terenie komórek jak migracja, angiogeneza, funkcja barierowa, czy odpowiedź zapalna [67]. Wzrost poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie aktywuje liczne szlaki sygnalizacyjne zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. W warunkach spoczynkowych poziom wolnego wapnia w komórkach śródbłonna utrzymywany jest na stosunkowo niskim poziomie (w zakresie 30-100 nM). Jednocześnie, pomiędzy wnętrzem komórki a przestrzenią zewnątrzkomórkową panuje około 20 000-krotna różnica stężeń Ca^{2+} . Stan ten jest utrzymywany w sposób aktywny poprzez błonowe pompy jonowe, takie jak np. ATPaza wapniowa oraz kanały znajdujące się w błonach ER [68]. W wyniku aktywacji śródbłonna dochodzi do 5-10-krotnego wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} . Efekt ten zaobserwowano w przypadku

stymulacji komórek śródbłónka naczyń przez mediatory stanu zapalnego, tj. histaminę, trombinę, czy bradykininę [69,70]. Związanie tych mediatorów zapalnych z receptorami białka G oraz receptorami kinazy tyrozynowej aktywuje PSC do produkcji DAG i IP₃. Prowadzi to do uwolnienia jonów Ca²⁺ z ER. Opróżnienie wewnątrzkomórkowego magazynu Ca²⁺ skutkuje dalszym napływem jonów z przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez kanały kationowe typu SOC, w tym TRPC1 [71]. W odpowiedzi na uwolnienie Ca²⁺ z ER zaangażowane są m.in. STIM1 i Orai1. STIM1 reaguje na niski poziom Ca²⁺ w ER poprzez aktywację Orai1, tak by pozwolić na uzupełnienie magazynowej puli Ca²⁺ [72]. W błonie komórkowej komórek śródbłónka znajduje się również szereg kanałów jonowych, których aktywacja nie wymaga wcześniejszego uwolnienia Ca²⁺ z ER. Przykładem mogą być tutaj takie kanały, jak TRPC6 i TRPM2. Jony Ca²⁺ znajdujące się w cytozolu oddziałują na białka zawierające miejsca wiązania Ca²⁺. Wpływa to na liczne procesy zachodzące na terenie komórek, w tym również na przepuszczalność bariery śródbłónkowej. Kluczową rolę w regulacji barierowej funkcji śródbłónka przypisuje się kanałowi TRPC6 [73]. Jest to nieselektywny kanał kationowy, który może być aktywowany przez DAG, mechaniczne rozciąganie ściany naczynia lub ROS. Wykazano również, że TRPC6 odpowiada za zwiększenie przepuszczalności śródbłónka w odpowiedzi na trombinę oraz bradykininę. Jest to spowodowane rozkładem połączeń zwierających opartych o VE-kadherynę oraz przebudową struktury cytoskieletu [74]. Ponadto wzajemna stabilność interakcji pomiędzy kadherynami jest ściśle związana z jonami Ca²⁺. Dodatkowo wzrost poziomu Ca²⁺ stymuluje kinazę łańcuchów lekkich miozyny (MLCK, *ang. myosin light chains kinase*) do fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny (MLC, *ang. myosin light chains*), co promuje jej oddziaływanie z aktyną. Skutkiem tego jest nasilenie naprężeń wewnątrzkomórkowych, a tym samym wymuszona zmiana w adhezji.

Jony Ca²⁺ są także zaangażowane w proces wynaczyniania się leukocytów. Już pierwszy kontakt leukocyta z powierzchnią śródbłónka, w który zaangażowana jest E-selektyna, prowadzi do dokomórkowego napływu jonów Ca²⁺ [75]. Z kolei adhezja leukocyta do powierzchni śródbłónka zachodzi z udziałem VCAM-1 i ICAM-1. W badaniach *in vitro* potwierdzono, że aktywacja powyższych białek skutkuje nasilonym dokomórkowym napływem Ca²⁺ [76]. Tu również wykazano, że kanałem odpowiedzialnym za te zmiany jest TRPC6, gdyż nokaut endogennej ekspresji tego kanału w komórkach śródbłónka blokował TEM [77]. Jednak wciąż nie wiadomo jaka jest dalsza rola sygnalizacji wapniowej w tym procesie. Możliwym jest tutaj zaangażowanie kalmoduliny (CaM, *ang. calmodulin*), gdyż inkubacja

komórek śródbłónka z inhibitorem CaM – triflouperazyną hamowała transmigrację monocytów [78]. Z kolei ograniczenie transmigracji neutrofili zaobserwowano po zastosowaniu inhibitora MLCK – ML-9 [79].

W kontekście analizy sygnalizacji wapniowej w komórkach śródbłónka należy zwrócić szczególną uwagę na jej heterogenność. W zależności od lokalizacji w drzewie naczyniowym, komórki śródbłónka mogą cechować się odmiennymi właściwościami oraz różnicami w ekspresji błonowych kanałów jonowych. Dla przykładu: w komórkach śródbłónka mikrounaczynienia płuc potwierdzono ekspresję TRP dla wanilloidu 4 (TRPV4, *ang. TRP vanilloid 4*), czego nie zaobserwowano w innych lokalizacjach [80]. Kolejnym istotnym aspektem jest mnogość typów kanałów wapniowych. Wśród samych kanałów TRP w komórkach śródbłónka potwierdzono obecność około 20 z nich [81]. Istotne mogą również okazać się interakcje pomiędzy poszczególnymi kanałami, gdyż ograniczenie funkcji jednego z nich może być kompensowane przez inne.

1.3 Błonowy kanał wapniowy TRPM2

TRPM2 (wcześniej oznaczony jako TRPC7 lub LTRPC2) jest nieselektywnym, przepuszczalnym dla wapnia kanałem kationowym [82]. Jego ekspresja została potwierdzona w wielu tkankach, w tym w szpiku kostnym, śledzionie, płucach, sercu, wątrobie i neutrofilach, a także komórkach śródbłónka [14]. Badania wskazują na istnienie kilku izoform TRPM2, w tym wariantu TRPM2-S, który jest krótszą formą białka pozbawioną 4 z 6 domen transbłonowych na końcu karboksylowym. Interakcja pomiędzy TRPM2 o pełnej długości łańcucha a TRPM2-S może odgrywać ważną rolę w regulacji napływu Ca^{2+} w odpowiedzi na nadtlenek wodoru, co potwierdzono w komórkach 293T pochodzących z nerki ludzkiego embrionu [83]. Ze względu na różnice w budowie domeny C-końcowej, TRPM2-S może działać jak inhibitor TRPM2. Ponadto w komórkach hematopoetycznych znaleziono kilka innych wariantów, np. (i) TRPM2-ΔN pozbawiony aminokwasów 538-557 na N-końcu oraz (ii) TRPM2-ΔC, który nie posiada aminokwasów 1292-1325 na C-końcu [84].

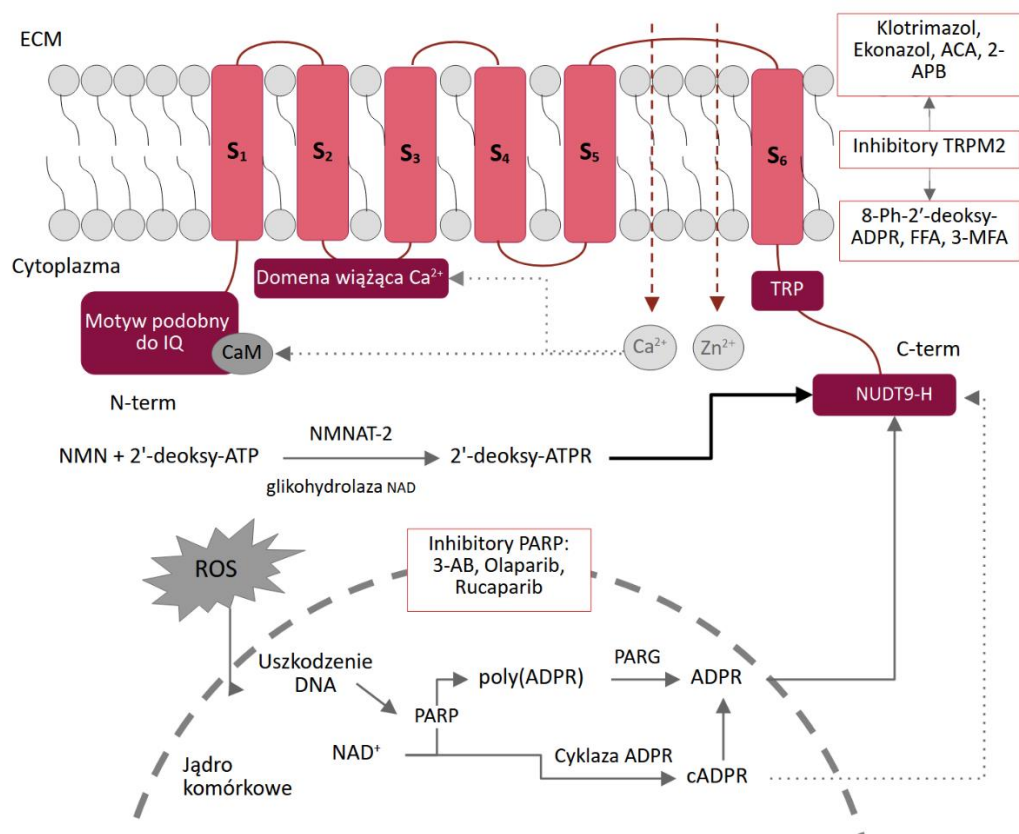
Funkcjonalny kanał TRPM2 występuje w formie tetramerycznej. Jego struktura obejmuje fałd wiążący difosforan nukleozydu zlokalizowany w cytoplazmatycznej domenie karboksylowej. Odpowiada on za wiązanie agonistów nukleotydów oraz niektórych czynników, tj. ADPR, cykliczny ADPR (cADPR, *ang. cyclic ADPR*), CaM, adenozy-5'-monofosforan (AMP, *ang. adenosine-5'-monophosphate*), czy dinukleotyd

nikotynoamidoadeninowy (NAD⁺, *ang. nicotinamide adenine dinucleotide*) [85]. Wykazano również, że jest on stymulowany stresem oksydacyjnym. Z kolei domena N-końcowa zawiera miejsce wiązania CaM, które jest odpowiedzialne za regulację TRPM2 przez jony Ca²⁺ [86].

Aktywność kanału TRPM2 została dotychczas powiązana z takimi zjawiskami, jak odpowiedź komórkowa na uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne, regulacja przepuszczalności śródbłonna, stan zapalny, rozwój nowotworów i chorób zwyrodnieniowych, czy indukcja śmierci komórki, w tym apoptozy i autofagii [87–91].

1.3.1 Struktura TRPM2

Na strukturę kanału TRPM2 składają się cztery monomery. W każdym z nich wyróżnia się region N-końcowy o długości około 800 aminokwasów, sześć domen transbłonowych nazywanych odpowiednio S₁ - S₆ oraz domenę C-końcową. Obie domeny końcowe znajdują się wewnątrz komórki. W składzie N-końca wyróżnia się cztery homologiczne domeny charakterystyczne dla podrodziny TRPM oraz motyw podobny do IQ (skrót pochodzi od pierwszych dwóch aminokwasów motywu – izoleucyny i glutaminy), który odpowiada za wiązanie CaM. Z kolei C-koniec zawiera sekwencję motywu nudix-box (NUDT9-H, *ang. nudix-box sequence motif*) o kluczowym znaczeniu w kontekście odpowiedzi kanału na stymulanty [92]. Pętla, która tworzy przepuszczalny dla jonów por zlokalizowana jest pomiędzy domenami S₅ i S₆. Budowę kanału TRPM2 wraz z opisanymi szlakami aktywacji i potencjalnymi inhibitorami przedstawiono na **Rycinie 3**.



Rycina 3. Budowa kanału TRPM2 wraz ze szlakami aktywacji zależnej od ligandów oraz potencjalnymi inhibitorami. Liniami ciągłymi zaznaczono najszerszej opisane i udowodnione ścieżki aktywacji. Linie przerywane obrazują prawdopodobne szlaki aktywacji. 2-APB – boran 2-aminoetoksydifenylu; 3-AB – 3-aminobenzamid; ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy; ATP – adenozylo-5'-trifosforan; ADPR – ADP-ryboza; cADPR – cykliczna ADP-ryboza; C-term – domena C-końcowa; CaM – kalmodulina; FFA – kwas flufenamowy; MFA – kwas mefenamowy; N-term – domena N-końcowa; NAD – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy; NMN – mononukleotyd nikotynamidowy; NMNAT-2 – adenylotransferaza mononukleotydu nikotynoamidu 2; PARG – glikohydrolaza poli(ADPR); PARP – polimeraza poli(ADPR); ROS – reaktywne formy tlenu; TRP – kanał przejściowego potencjału receptora; TRPM2 – TRP dla melastatyny 2. Zmodyfikowano na podstawie [93].

1.3.2 Mechanizmy aktywacji kanału TRPM2

Najlepiej poznany mechanizm regulacji kanału TRPM2 zachodzi poprzez związanie ADPR z NUDT9-H w obrębie domeny C-końcowej kanału [92]. Wprawdzie domena ta charakteryzuje się aktywnością hydrolazy ADPR, to jest ona stosunkowo słaba. Ponadto wydaje się, że to dłuższe oddziaływanie ADPR z TRPM2 jest odpowiedzialne za stymulację kanału. Nasilenie aktywności enzymatycznej, a tym samym przyspieszenie rozkładu ADPR, zapobiega otwarciu kanału [94]. Wykazano, że produkcja ADPR w komórkach jest ściśle skorelowana ze stresem oksydacyjnym. Wolne rodniki stymulują rybozylację ADP, która jest rodzajem potranslacyjnej modyfikacji białek. PARP wykorzystując NAD^+ jako donor ADPR powoduje przeniesienie tej cząsteczki na boczne łańcuchy reszt argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, cysteiny, lizyny, seryny i tyrozyny docelowych białek. Kolejne cząsteczki ADPR mogą ulegać przyłączeniu poprzez wiązania 1'-2' glikozydowe pomiędzy resztami rybozy prowadząc do powstania poli(ADPR) [95]. Uwolnienie monomerów ADPR zachodzi w reakcji katalizowanej przez PARG [96]. Mechanizmem alternatywnym może być bezpośrednia hydroliza NAD do nikotynamidu i ADPR. Jednakże większość badań wskazuje na większe znaczenie pierwszego z opisanych powyżej procesów [14]. W interakcji pomiędzy NUDT9-H a ADPR kluczowa wydaje się być końcowa cząsteczka rybozy, jako że samo ADP nie powoduje aktywacji kanału [97]. Opisano również możliwość koaktywacji TRPM2 przez ADPR wspólnie z jonami Ca^{2+} . Region odpowiedzialny za wiązanie jonów Ca^{2+} znajduje się blisko granicy wewnątrzkomórkowej części TRPM2. Badania wskazują, że jedynie jednoczesne związanie ADPR oraz jonów Ca^{2+} prowadzi do aktywacji tego kanału [98]. Co więcej, funkcjonowanie TRPM2 jest również ściśle powiązane z tymi jonami, a do jego aktywacji może prowadzić samo związanie jonów Ca^{2+} [99]. Jeszcze bardziej efektywnym agonistą kanału jest 2'-deoksy-ADPR [85]. W warunkach *in vitro* cząsteczka ta powstaje z mononukleotydu nikotynamidu (NMN, *ang. nicotinamide mononucleotide*) i 2'-deoksy-ATP w reakcji katalizowanej przez cytoplazmatyczną adenylotransferazę mononukleotydów nikotynamidu 2 (NMNAT-2, *ang. nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 2*) i glikohydrolazę dinukleotydu adeninowego (CD38). 2'-deoksy-ADPR określa się jako superagonistę TRPM2, gdyż związek ten indukuje 10,4-rza wyższy dokońrkowy napływ jonów w porównaniu do ADPR [85]. O ile zależność pomiędzy 2'-deoksy-ADPR oraz ADPR a TRPM2 wydaje się jasna, możliwość aktywacji kanału przez cADPR budzi więcej kontrowersji [100]. Otwarcie kanału potwierdzono jedynie po zastosowaniu ekstremalnie wysokich dawek cADPR [101]. Jednakże

cząsteczka ta może wspomagać działanie samego ADPR, gdyż jednocześnie zastosowanie obu substancji powodowało silniejszą aktywację TRPM2 niż w przypadku podania każdej z nich osobno [101]. Możliwym jest również, że cADPR w ogóle nie jest w stanie aktywować TRPM2, a efekty obserwowane w niektórych badaniach są związane z łatwym rozpadem cADPR do ADPR. Badania świeżo przygotowanych próbek cADPR z użyciem HPLC potwierdziły, że nawet 25% jej objętości stanowi ADPR. W eksperymencie przeprowadzonym na granulocytach obojętnochłonnych zaobserwowano aktywację TRPM2 jedynie dla cADPR przed oczyszczeniem z ADPR [102]. Z kolei inna grupa badaczy potwierdziła aktywację tego kanału przez oczyszczony cADPR poprzez jego związanie z domeną NUDT9-H [103]. Ze względu na brak spójności w opublikowanych wynikach niezbędnych jest więcej eksperymentów badających możliwość zależnej od cADPR aktywacji TRPM2. Kluczowe jest wykorzystywanie tylko oczyszczonego cADPR oraz potwierdzenie stopnia czystości związku. Podobne kontrowersje wzbudza rola NAD jako agonisty TRPM2. Niektóre z doniesień wskazują, że NAD może aktywować kanał w sposób bezpośredni. Natomiast inne źródła sugerują, że efekt ten jest indukowany przez produkty rozpadu cząsteczki lub dzięki kontaminacji związku przez ADPR [104–106].

Badania wykazały także, że otwarcie kanału TRPM2 jest zależne od ROS. Dwa alternatywne modele aktywacji TRPM2 przedstawili Hara i wsp. oraz Wehage i wsp. [82,84]. Pierwszy obejmuje stymulację TRPM2 w odpowiedzi na nadtlenek wodoru przez działanie metabolitów β -NAD⁺, podczas gdy drugi model zakłada aktywację niezależną od ADPR. Możliwe, że oba mechanizmy zachodzą równolegle lub osobno w zależności od izoformy kanału.

Opisano również alternatywny szlak aktywacji TRPM2 związany z odczuwaniem niepowodującego uszkodzeń tkanek ciepła. Zależne od ciepła otwarcie TRPM2 jest ważnym mechanizmem w neuronach wrażliwych na wysoką temperaturę, ponieważ kanał przekazuje informacje dotyczące tego parametru i stymuluje zachowania związane z poszukiwaniem chłodu [107].

1.3.3 Rola TRPM2 w funkcjonowaniu bariery śródbłonkowej

Dotychczasowe doniesienia naukowe wskazują na ścisły związek pomiędzy aktywnością błonowego kanału wapniowego TRPM2 a stanem komórki. Potwierdzono zaangażowanie tego kanału w regulację barierowej funkcji śródbłonka, TEM, migrację, proces

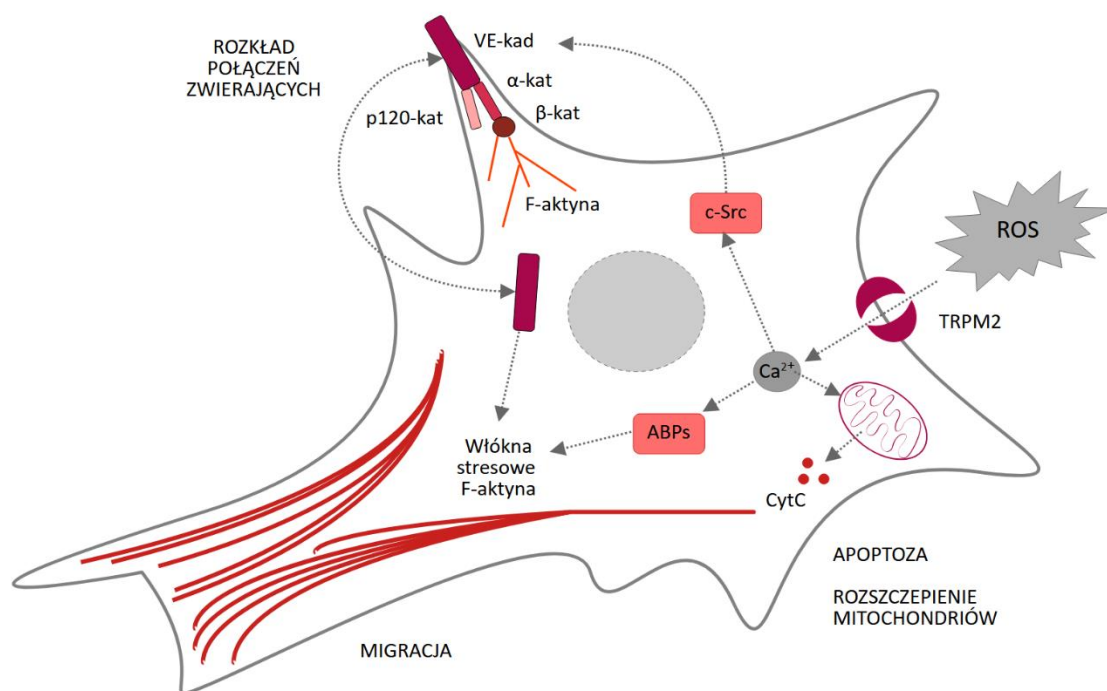
angiogenezy oraz śmierci komórek. Hodowla ludzkich komórek śródbłónka tętnicy płucnej w obecności nadtlenu wodoru prowadziła do dokomórkowego napływu jonów Ca^{2+} oraz rozluźnienia sieci połączeń międzykomórkowych, czego objawem był spadek przezśródbłonkowej rezystancji elektrycznej. Efekt ten ograniczono wykorzystując przeciwciała blokujące TRPM2, inhibitory PARP oraz poprzez indukcję nadekspresji TRPM2-S [14]. Porównano również odpowiedź myszy typu dzikiego i myszy z delecją TRPM2 w komórkach śródbłónka na lipopolisacharyd (LPS, ang. *lipopolisaccharide*). Badania potwierdziły obniżoną częstość TEM oraz wyższą śmiertelność myszy pozbawionych ekspresji TRPM2 w komórkach śródbłónka [108]. Obserwacje te potwierdzono w warunkach *in vitro*, wykorzystując komórki śródbłónka mikrounaczynienia płuc.

Badania potwierdziły również, że zaangażowany w angiogenezę VEGF indukuje napływ jonów Ca^{2+} przez kanał TRPM2 po traktowaniu komórek śródbłónka tętnicy płucnej nadtlaniem wodoru [109]. Ponadto aktywacja kanału powodowała jego przyłączanie do cząsteczek VE-kadheryny i c-Src, co prowadziło do rozkładu połączeń zwierających oraz internalizacji VE-kadheryny i promowało migrację komórek. Dodatkowo u myszy z delecją TRPM2 wykazano zaburzenia w odbudowie sieci mikrounaczynienia po uszkodzeniu niedokrwiennym [109].

Liczne doniesienia naukowe wykazały, że TRPM2 bierze udział w wywoływanej przez ROS śmierci komórek krwiotwórczych, neuronów i śródbłónka naczyniowego [90,110–112]. Dokomórkowy napływ Ca^{2+} , m.in. poprzez kanał TRPM2, może prowadzić do zaburzeń wewnątrzkomórkowej homeostazy wapniowej i indukować śmierć komórek. W przypadku linii komórek śródbłónka mikrounaczynienia serca H5V jednym z obserwowanych efektów traktowania ich nadtlaniem wodoru był spadek aktywności metabolicznej komórek. Dodatkowo możliwe jest, że TRPM2 bierze udział w indukcji śmierci komórki przez jedną z prozapalnych cytokin, tj. $\text{TNF}\alpha$. Wykazano, że traktowanie komórek H5V 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ przez 36 h skutkowało spadkiem ich żywotności. Jednakże, efekt ten został ograniczony po zastosowaniu przeciwciała blokującego TRPM2 (TM2E3) lub shRNA skierowanego przeciwko TRPM2 [90]. Funkcje TRPM2 w komórkach śródbłónka zostały przedstawione na **Rycinie 4**.

Podsumowując obecny stan wiedzy, istnieje ścisły związek między stanem śródbłónka, stresem oksydacyjnym a funkcją kanału TRPM2. Jednak wpływ manipulacji poziomem tego

kanału oraz zastosowanie jego inhibitorów w komórkach śródbłonna linii EA.hy926 nie zostały jeszcze zbadane.



Rycina 4. Rola TRPM2 w komórkach śródbłonna. α -kat – α -katenina, β -kat – β -katenina, ABPs – białka wiążące aktynę, CytC – cytochrom C, p120-kat – katenina p120, TRPM2 – kanał przejściowego potencjału receptora dla melastatyny 2, VE-kad – VE-kadheryna, ROS – reaktywne formy tlenu. Zmodyfikowano na podstawie [93].

1.3.4 Metody inhibicji TRPM2

Poznanie trójwymiarowej struktury kanału TRPM2 oraz poszerzenie wiadomości na temat jego aktywacji przyczyniły się do szybszego rozwoju sposobów jego inhibicji. Inhibitory TRPM2 można podzielić na pięć kategorii zgodnie z metodami prowadzącymi do ich odkrycia: (i) ponownie wykorzystane znane modulatory innych kanałów jonowych, (ii) analogi endogennych ligandów, (iii) inhibitory peptydowe, (iv) cząsteczki zidentyfikowane na podstawie wysokowydajnych badań przesiewowych oraz (v) cząsteczki zidentyfikowane poprzez screening wirtualny [113]. Do pierwszej grupy należą takie związki jak kwas flufenamowy (FFA, *ang. flufenamic acid*), kwas mefenamowy (3-MFA, *ang. mefenamic acid*), klotrimazol, ekonazol, kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy (ACA, *ang. N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic acid*), czy boran 2-aminoetoksydifenylu (2-APB, *ang. 2-aminoethoxydiphenyl borate*). Część wymienionych związków jest już dopuszczona do użytku jako substancje lecznicze. 3-MFA, ACA oraz FFA są inhibitorami COX wykorzystywanymi jako niesteroidowe leki przeciwzapalne. Z kolei klotrimazol i ekonazol to leki przeciwgrzybiczne. Obecnie są one przeznaczone jedynie do użytku zewnętrznego, przy czym dla klotrimazolu dopuszcza się aplikację na błony śluzowe. Największym problemem tej grupy inhibitorów pozostaje ich brak specyficzności wobec TRPM2 [114–118]. Przyczyniło się to do rozwoju drugiej z grup związków o działaniu hamującym aktywność TRPM2, czyli analogów endogennych ligandów tego kanału. Przedstawicielami powyższej grupy są głównie zmodyfikowane cząsteczki ADPR oraz cADPR, wśród których wyróżnia się 8-bromo-ADPR, AMP oraz 8-bromo-cADPR [119–121]. Cząsteczki te wiązane są przez domenę NUDT9-H, która jest elementem unikalnym dla kanału TRPM2. Do wad analogów endogennych ligandów TRPM2 zalicza się jednakże słabą penetrację błon komórkowych oraz brak stabilności [113]. Do peptydowych inhibitorów kanału należy tat-M2NX, który powstał z połączenia części domeny C-końcowej z białkiem penetrującym komórkę (CPP, *ang. cell-penetrating peptide*) pochodzącym z wirusa HIV – białkiem tat [122]. Peptyd ten charakteryzował się wysoką skutecznością nawet w nanomolowym zakresie stężeń [120]. Dodatkowo tat-M2NX jest zdolny do przekraczania bariery krew-mózg. Ta grupa inhibitorów, w porównaniu z poprzednimi, obarczona jest takimi wadami jak wysoki koszt produkcji, potencjalne reakcje ze strony układu immunologicznego oraz brak możliwości podania doustnego [113]. Dodatkowo zdolności CPP do przekraczania bariery błony komórkowej zależą od wielu czynników. Możliwym jest, że ich wykorzystywanie w ściśle połączonych ze sobą komórkach śródbłonna jest ograniczone [123].

Z kolei przeszukiwanie dostępnych bibliotek zawierających dane na temat struktury i aktywności różnych grup związków pozwala na znalezienie cząsteczek potencjalnie wpływających na poszczególne składniki komórek. W ten sposób odkryto możliwość wykorzystania skalaradialu oraz związku o nazwie JNJ-28583113 do blokowania aktywności TRPM2 [121,124]. Oba związki znacząco ograniczają dkomórkowy napływ jonów Ca^{2+} w odpowiedzi na stymulacje ADPR czy warunki stresu oksydacyjnego. Co więcej, JNJ-28583113 jest uznawany za najbardziej efektywny znany inhibitor TRPM2 z IC_{50} wynoszącym zaledwie 13 nM. Jednakże, związek ten jest mało stabilny i ulega gwałtownemu rozkładowi w warunkach biologicznych, co czyni go obecnie bezużytecznym w aplikacji klinicznej [113]. Z kolei dla skalaradialu zaobserwowano, że jego zdolności blokowania TRPM2 rosną wraz z czasem od momentu ekspozycji, osiągając swoje maksimum po około 20 min. Stąd przypuszczenie, że związek ten nie oddziałuje na kanał w sposób bezpośredni [124]. W trakcie poszukiwań skutecznych inhibitorów kanału TRPM2 z sukcesem zastosowano również metody screeningu wirtualnego, odkrywając m.in. pochodne 2,3-dihydroquinazolin-4 (1H)-onu, dla których IC_{50} określono w zakresie 3-5 μM [125].

Oprócz wykorzystania inhibitorów TRPM2 możliwa jest regulacja aktywności kanału z wykorzystaniem innych metod. Przykładem mogą być przeciwciała skierowane przeciwko TRPM2 takie jak wspomniane TM2E3, którego celem jest region E3 zlokalizowany niedaleko części przepuszczalnej dla jonów. Wykazano, że jego aplikacja ograniczała odpowiedź komórek H5V na nadtlenek wodoru w stopniu podobnym do obniżenia poziomu z wykorzystaniem shRNA wobec TRPM2. Ponadto oba podejścia ograniczenia aktywności TRPM2 hamowały apoptozę komórek i promowały ich przeżycie wobec nadtlenu wodoru, jak i $\text{TNF}\alpha$ [90].

Ciekawym aspektem regulującym funkcjonowanie TRPM2 jest obecność jego różnych izoform. Nazwa kanału jest stosowana domyślnie dla jego pełnowymiarowej formy TRPM2-L. Badania wykazały również istnienie formy skróconej TRPM2-S, która zwiera jedynie domenę N-końcową oraz pierwsze dwie domeny transbłonowe. Wiadomo, że TRPM2-S zapobiega aktywacji TRPM2-L, jednak dokładny mechanizm tej interakcji nie jest jeszcze poznany. Wykazano, że TRPM2-S może wpływać na obniżenie poziomu TRPM2-L poprzez przyspieszenie jego degradacji przez proteasomy, gdyż wzrost poziomu formy krótszej skutkował poliubikwitynacją oraz rozkładem wariantu pełnowymiarowego [126]. Dodatkowo w przypadku próbek pobranych od pacjentów z tłuszczakomięsakiem zaotrzewnowym

wykazano wartość prognostyczną TRPM2-S bez istotnego znaczenia dla poziomu TRPM2-L. Na modelu komórkowym potwierdzono, że nadekspresja TRPM2-S prowadziła do podniesienia wewnątrzkomórkowego poziomu ROS, hamowała apoptozę w warunkach normoksji, ale promowała śmierć komórek w warunkach ograniczonej dostępności tlenu [127]. Dane te wskazują, że nie tylko całkowity poziom TRPM2, ale również stosunek poziomów różnych wariantów tego białka mogą posiadać istotne znaczenie kliniczne.

Alternatywnym podejściem do regulacji aktywności TRPM2 jest inhibicja PARP. Enzym ten aktywowany jest w warunkach uszkodzenia DNA i bierze udział w jego naprawie. PARP jest również niezbędny w procesie aktywacji TRPM2. Po rozpoznaniu uszkodzenia DNA enzym ten napędza produkcję poli(ADPR). Następnie, polimer ten zostaje rozłożony przez PARG do ADPR, która jest głównym aktywatorem TRPM2. Wykazano, że limfocyty pozbawione ekspresji PARP nie odpowiadają na stres oksydacyjny poprzez aktywację TRPM2 [128]. Również w neuronach myszy zaobserwowano ścisłe powiązanie między aktywnością PARP i TRPM2 [129]. Zastosowanie inhibitorów PARP i PARG w celach terapeutycznych nie jest zagadnieniem nowym. Jak dotąd największy potencjał tej grupy substancji wiązano z terapiami przeciwnowotworowymi. Wykorzystanie inhibitorów PARP dopuszczono w leczeniu nowotworów piersi i jajnika z potwierdzoną mutacją BRCA (*ang. breast cancer gene*). Z kolei inhibitory PARG dodatkowo hamują zdolności replikacji DNA komórek nowotworowych, przez co mogą wspomagać działanie inhibitorów PARP. Jak dotąd brak jest badań nad możliwością wykorzystania inhibitorów PARG w hamowaniu aktywności TRPM2.

Kolejnym logicznym sposobem modulacji TRPM2 może być również wykorzystanie substancji o potencjale antyoksydacyjnym. Skoro aktywacja kanału TRPM2 jest ściśle powiązana ze stresem oksydacyjnym, to antyoksydanty powinny móc wpływać na ten proces. W badaniach na komórkach jajnika chomika chińskiego linii CHO oceniono aktywację TRPM2 za pomocą nadtlenu wodoru z wcześniejszą ekspozycją komórek na witaminy C i E oraz glutation. Pomimo zastosowania tak silnych antyoksydantów, nie stwierdzono żadnego wpływu wstępnego traktowania na dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} w wyniku otwarcia kanałów TRPM2 [130]. W przypadku tej samej linii komórkowej bardziej obiecujące rezultaty przyniosło zastosowanie melatoniny. Substancja ta jest neurohormonem, jednakże należy również do grupy antyoksydantów. Melatonina w znacznym stopniu blokowała dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} w odpowiedzi na nadtlenek wodoru, hamując również śmierć komórek na

drodze apoptozy [131]. Podobny efekt przyniosło wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe podanie selenu, które ograniczyło dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} w odpowiedzi na traktowanie komórek CHO nadtlenkiem wodoru [132]. Dodatkowo równoczesne podanie selenu oraz inhibitora TRPM2 – 2-APB hamowało aktywność TRPM2 w większym stopniu, niż każda z tych substancji podawana pojedynczo [132]. Atutem wykorzystania selenu może więc być działanie synergistyczne z inhibitorami TRPM2. Metody regulacji aktywności kanału TRPM2 wraz z przykładowymi substancjami przedstawiono w **Tabeli I**.

Choć pierwsze próby wykorzystania inhibitora TRPM2 w modelu komórkowym zostały opisane w 2004 roku, po prawie 20 latach dalszych badań żadna ze zidentyfikowanych substancji nie została włączona do badań klinicznych. Główne problemy związane z użyciem substancji blokujących dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} przez kanał jonowy TRPM2 to niska stabilność, brak selektywności działania oraz możliwe efekty uboczne związane z działaniem substancji na różne typy komórek. Jednakże zaangażowanie kanału w liczne procesy patologiczne, tj. choroby neurodegeneracyjne, zaburzenia niedokrwienno-reperfuzyjne różnych narządów oraz ED, napędza poszukiwania coraz bezpieczniejszych i bardziej skutecznych związków. Również badania nad wpływem znanych już inhibitorów na inne rodzaje komórek dostarczają cennych danych. Stąd w eksperymentach opisanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano dwa inhibitory kanału TRPM2 (ACA i FFA) oraz enzymu PARP (3-AB i DPQ). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy są to pierwsze badania mające na celu ocenę działania tych substancji w kontekście odpowiedzi modelowych komórek śródbłonna naczyniowego na warunki indukowanego stresu oksydacyjnego.

Tabela I. Podział metod inhibicji kanału TRPM2 wraz z przykładowymi przedstawicielami poszczególnych grup.

Grupa	Przykład
Modulatory innych kanałów jonowych	2-APB, 3-MFA, ACA, FFA, ekonazol,
Analogi endogennych ligandów kanału	8-bromo-ADPR, 8-bromo-cADPR, AMP
Inhibitory peptydowe	tat-M2NX
Cząsteczki zidentyfikowane na podstawie wysokowydajnych badań przesiewowych	Skalaradial, JNJ-28583113
Cząsteczki zidentyfikowane na podstawie screeningu wirtualnego	Pochodne 2,3-dihydroquinazolin-4 (1H)-onu
Przeciwciała anty-TRPM2	TM2E3
Alternatywne formy TRPM2	TRPM2-S
Inhibitory PARP	3-AB, DPQ
Antyoksydanty	Melatonina, selen

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania i odpowiedzi komórek śródbłonka na warunki stresu oksydacyjnego, jak również ocena możliwości potencjalnego wykorzystania inhibitorów TRPM2 i PARP w prewencji i terapii chorób układu krążenia związanych z dysfunkcją śródbłonka.

W pierwszym etapie badań obniżono poziom TRPM2 w komórkach EA.hy926 z wykorzystaniem siRNA przeciwko TRPM2, które zostało wprowadzone do komórek na drodze elektroporacji metodą nukleofekcji. Stres oksydacyjny indukowano nadtlenkiem wodoru. Porównano odpowiedź komórek transfekowanych i nietransfekowanych na działanie nadtlenku wodoru przez 24 h w stężeniach wybranych na podstawie doniesień literaturowych oraz wyników testu MTT. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie nadtlenku wodoru wobec ekspresji TRPM2 badano w zakresie: żywotności komórek, rodzaju indukowanej śmierci komórek, wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , zdolności migracyjnych, poziomu i lokalizacji białek połączeniowych oraz organizacji cytoszkieletu aktynowego.

W drugim etapie badań oceniono odpowiedź komórek linii EA.hy926 na stres oksydacyjny wobec inhibitorów TRPM2 (ACA oraz FFA) albo PARP (3-AB oraz DPQ). W tym celu komórki były poddane działaniu inhibitorów przez 30 min, a następnie hodowane w obecności nadtlenku wodoru przez 24 h. Odpowiedź komórek na wybrane inhibitory TRPM2 albo PARP, nadtlenek wodoru oraz kombinację danego inhibitora i nadtlenku wodoru oceniono w zakresie żywotności komórek, zmian w rozkładzie cyklu komórkowego, rodzaju indukowanej śmierci komórek, potencjału migracyjnego oraz lokalizacji i ekspresji wybranych białek.

Przeprowadzone eksperymenty miały na celu odpowiedzieć na następujące pytania badawcze:

1. Jak indukcja stresu oksydacyjnego imitowana nadtlenkiem wodoru wpływa na komórki śródbłonka linii EA.hy926?
2. Jakie znaczenie ma obniżenie poziomu błonowego kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania komórek linii EA.hy926?
3. Czy obniżenie poziomu TRPM2 wpływa na odpowiedź komórek śródbłonka na działanie nadtlenku wodoru?

4. Czy możliwe jest zahamowanie aktywności TRPM2 poprzez zastosowanie wybranych inhibitorów kanału lub inhibitorów enzymu PARP?
5. Czy kanał TRPM2 może być rozważany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i leczeniu chorób, których podłożem jest dysfunkcja śródbłonna?

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiał badawczy i hodowla komórkowa

Materiałem wykorzystanym w badaniach były modelowe komórki śródbłónka naczyń krwionośnych linii EA.hy926 (ATCC, *ang. American Type Culture Collection*). Linia stanowi hybrydę komórek śródbłónka żyły pępowinowej (HUVEC, *ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) oraz komórek niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549. Linie komórkową zakupiono dwukrotnie, bezpośrednio przed każdą z serii przeprowadzonych badań. Komórki były hodowane zgodnie z wymaganiami określonymi przez producenta, tj. w medium hodowlanym Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, *ang. fetal bovine serum*; Lonza) oraz 50 µg/ml gentamycyny (Merck) z wykorzystaniem standardowych warunków hodowli (5% nasycenie CO₂, 37°C, 95% wilgotność). Komórki pasażowano w momencie osiągnięcia 80% konfluencji poprzez odklejenie od podłoża za pomocą 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (Merck; 5 min, 37°C). Następnie wysiewano je do odpowiednich naczyń hodowlanych, tj. płytek 6-dołkowych (w celu oceny cyklu komórkowego, rodzaju indukowanej śmierci oraz migracji komórek), płytek 12-dołkowych (w celu oceny rozkładu i ekspresji białek metodami mikroskopowymi), szalek Petriego (w celu oceny poziomu jonów wapnia), butelek hodowlanych typu T o powierzchni 25 cm² (w celu oceny potranslacyjnej ekspresji białek metodą Western Blot) lub 75 cm² (w celu prowadzenia dalszej hodowli) w gęstościach zoptymalizowanych eksperymentalnie. W celu zapewnienia powtarzalności wyników, komórki linii EA.hy926 utrzymywane były w fazie logarytmicznego wzrostu poprzez regularne pasażowanie (z zachowaniem limitu możliwości wykorzystania komórek do 6 pasażu). Komórki regularnie testowano na obecność bakterii z rodzaju *Mycoplasma* poprzez fluorescencyjne znakowanie DNA i ocenę mikroskopową. Na każdym etapie eksperymentów potwierdzano ekspresję VE-kadheryny jako markera charakterystycznego dla komórek śródbłónka z wykorzystaniem immunofluorescencyjnego znakowania białka oraz mikroskopii fluorescencyjnej.

3.2 Traktowanie komórek

W celu imitacji warunków stresu oksydacyjnego wykorzystano traktowanie komórek nadtlaniem wodoru przez 24 h. Komercyjnie przygotowany 30% (9,8 M) roztwór nadtlenu

wodoru w wodzie z dodatkiem stabilizatora (Merck) był przechowywany w lodówce oraz chroniony przed światłem, zgodnie z zaleceniami producenta. Bezpośrednio przed traktowaniem komórek przygotowywano szereg rozcieńczeń poprzez zmieszanie 10 μ l perhydrolu oraz 990 μ l wody destylowanej otrzymując roztwór I. Następnie 100 μ l roztworu I mieszano z 900 μ l wody destylowanej otrzymując roztwór II. Komórki były traktowane w momencie osiągnięcia około 90% konfluencji poprzez dodanie odpowiednich ilości roztworu II do medium hodowlanego. Następnym krokiem była inkubacja w standardowych warunkach hodowlanych przez 24 h. W przypadku testu MTT wykorzystane stężenia nadtlenu wodoru wynosiły: 50, 100, 200, 400 oraz 800 μ M. Do dalszych eksperymentów wybrano najniższe stężenie, które powodowało istotne statystycznie zmiany w przeżywalności komórek względem nietraktowanej kontroli, tj. 100 μ M.

W pierwszym etapie badań komórki zostały podzielone na następujące grupy:

1. K – komórki nietransfekowane, które nie zostały poddane działaniu nadtlenu wodoru,
2. 100 – komórki nietransfekowane, które zostały poddane działaniu 100 μ M nadtlenu wodoru na okres 24 h,
3. K_C – komórki transfekowane siRNA kontrolnym, które nie zostały poddane działaniu nadtlenu wodoru,
4. 100_C – komórki transfekowane siRNA kontrolnym, które zostały poddane działaniu 100 μ M nadtlenu wodoru przez okres 24 h,
5. K_T - komórki transfekowane siRNA wobec TRPM2, które nie zostały poddane działaniu nadtlenu wodoru,
6. 100_T – komórki transfekowane siRNA wobec TRPM2, które zostały poddane działaniu 100 μ M nadtlenu wodoru przez okres 24 h,

gdzie siRNA kontrolne stanowiło siRNA o sekwencji niemającej miejsc rozpoznania w ludzkim mRNA, natomiast siRNA wobec TRPM2 posiada miejsce wiązania w obrębie mRNA dla TRPM2.

W drugim etapie badań zastosowano: (i) kwas flufenamowy (FFA) i kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy (ACA) jako inhibitory TRPM2 oraz (ii) 3-aminobenzamid (3-AB) i 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon (DPQ) jako inhibitory PARP (wszystkie zakupiono z Targetmol). Po selekcji związków i ich stężeń na podstawie testu MTT, komórki zostały podzielone na następujące grupy:

1. K – komórki kontrolne, które hodowano w medium hodowlanym bez dodatku inhibitorów oraz nadtlenu wodoru,
2. ACA – komórki, które zostały poddane działaniu 10 μM ACA przez okres 24 h,
3. DPQ – komórki, które zostały poddane działaniu 1 μM DPQ przez okres 24 h,
4. FFA - komórki, które zostały poddane działaniu 50 μM FFA przez okres 24 h,
5. ACA + 100 H_2O_2 – komórki, które zostały poddane działaniu 10 μM ACA przez 30 min, a następnie hodowane dodatkowo w obecności 100 μM nadtlenu wodoru przez okres 24 h,
6. DPQ + 100 H_2O_2 – komórki, które zostały poddane działaniu 1 μM DPQ przez 30 min, a następnie hodowane dodatkowo w obecności 100 μM nadtlenu wodoru przez okres 24 h,
7. FFA + 100 H_2O_2 – komórki, które zostały poddane działaniu 50 μM FFA przez 30 min, a następnie hodowane dodatkowo w obecności 100 μM nadtlenu wodoru przez okres 24 h,
8. H_2O_2 – komórki, które zostały poddane działaniu 100 μM nadtlenu wodoru przez okres 24 h.

Stężenia wszystkich substancji wybrano na podstawie dostępnych danych literaturowych. Sposób przygotowania roztworów inhibitorów przedstawiono w **Tabeli II**.

Tabela II. Sposób przygotowania roztworów wykorzystanych w badaniach inhibitorów kanału TRPM2 albo enzymu PARP.

Typ inhibitora	Rodzaj inhibitora	Roztwór I	Roztwór II	Stężenie końcowe
Inhibitory TRPM2	ACA	100 mg rozpuszczone w 1 ml DMSO (296 mM)	10 µL Roztwór I + 990 µL woda destylowana (296 µM)	10 albo 20 µM
	FFA	28 mg rozpuszczone w 1 ml DMSO (100 mM)	100 µL Roztwór I + 900 µL woda destylowana (10 mM)	50 albo 100 µM
Inhibitory PARP	3-AB	500 mg rozpuszczone w 20 mL DMSO (184 mM)	BRAK	2,5 albo 5 mM
	DPQ	1 mg rozpuszczony w 1 mL DMSO (3,3 mM)	100 µL Roztwór I + 900 µL woda destylowana (660 µM)	1 albo 10 µM

3.3 Transfekcja

W celu obniżenia poziomu ekspresji błonowego kanału wapniowego TRPM2 do modelowych komórek śródbłónka linii EA.hy926 wprowadzono siRNA przeciwko TRPM2 (SantaCruz Biotechnology, nr kat. sc-42674, Lot I1721) na drodze elektroporacji metodą nukleofekcji. Roztwór siRNA przygotowano poprzez rozpuszczenie 3,3 nmol liofilizowanego siRNA w 330 μ L wody destylowanej wolnej od RNAz, zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Po rozpuszczeniu i w okresach pomiędzy transfekcjami roztwór przechowywany był w zamrażarce (-20°C) z unikaniem długich cykli rozmrażania i ponownego zamrażania. Transfekcje wykonywano z wykorzystaniem nukleofektora 4D-Nucleofector (Lonza) oraz dedykowanego dla komórek EA.hy926 zestawu SE Cell Line 4D-Nucleofector[®] X kit (Lonza). W celu przeprowadzenia transfekcji, komórki najpierw odklejono z naczynia hodowlanego, policzono, a następnie 1×10^6 komórek zawieszono w mieszaninie złożonej z 82 μ L SE Cell Line Nucleofector[™] Solution, 12 μ L odczynnika Supplement 1 oraz 5 μ L 10 μ M roztworu siRNA. Ilość roztworu siRNA została dobrana eksperymentalnie z zakresu 1-10 μ L sugerowanego przez producenta. Dedykowane kuwetki elektroporacyjne, po przelaniu do nich zawiesiny komórek, zostały umieszczone w nukleofektorze. Elektroporację przeprowadzono za pośrednictwem programu DS 120, który został wybrany na podstawie wcześniejszych eksperymentów w celu uzyskania jak najwyższej efektywności transfekcji oraz żywotności komórek EA.hy926. Po nukleofekcji, do każdej z kuwetek elektroporacyjnych dodawane było po 500 μ L wcześniej ogrzanego medium wzrostowego, po czym komórki były wysiewane do naczyń hodowlanych, w gęstości zależnej od typu zaplanowanego eksperymentu. Po 24 h od nukleofekcji, komórkom wymieniano medium hodowlane, zgodnie z metodyką określoną przez producenta. W celu oceny wpływu procesu transfekcji na komórki, wykorzystano kontrolne siRNA o sekwencji niemającej miejsc rozpoznania w ludzkich mRNA (SantaCruz Biotechnology, nr kat. sc-37007, Lot H2O2021). Transfekcja komórek siRNA kontrolnym przebiegała zgodnie ze schematem opisanym powyżej. Efektywność procesu transfekcji oceniono na podstawie fluorescencji białka GFP w komórkach EA.hy926, do których wprowadzono wektor kontrolny pmaxGFP będący częścią zestawu do nukleofekcji.

3.4 Test cytotoksyczności MTT

W celu zbadania przeżywalności komórek nietransfekowanych, transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 oraz transfekowanych siRNA kontrolnym w odpowiedzi na

wzrastające dawki nadtlenku wodoru zastosowano test MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-difenylotetrazolowy, sól tetrazolowa). Roztwór podstawowy soli MTT (Merck) przygotowano poprzez rozpuszczenie 5 mg odczynnika w 1 ml buforu fosforanowego (PBS, *ang. phosphate buffered saline*). Po całkowitym rozpuszczeniu substancji, ciecz została przefiltrowana przez filtr strzykawkowy z porami o średnicy 0,2 μm (Florham Park). Roztwór przechowywano w temperaturze 4°C, chroniąc go od światła. Roztwór roboczy soli tetrazolowej przygotowywano bezpośrednio przed jego dodaniem do komórek poprzez rozcieńczenie go w stosunku 1 do 9 w medium wzrostowym DMEM pozbawionym czerwieni fenolowej.

W pierwszej fazie eksperymentów, komórki wszystkich trzech badanych grup (nietransfekowane, transfekowane siRNA kontrolnym oraz transfekowane siRNA wobec TRPM2) wysiano na płytki 24-dołkowe (BD Falcon) w ilości $0,06 \times 10^6$ komórek. Po osiągnięciu 90% konfluencji (około 24 h od wysiania) komórki potraktowano nadtlenkiem wodoru w stężeniach 50, 100, 200, 400 oraz 800 μM przez okres 24 h. Podobnie, dla eksperymentów drugiej fazy badań (z wykorzystaniem inhibitorów TRPM2 i PARP) komórki linii EA.hy926 wysiano na płytki 24-dołkowe w ilości $0,06 \times 10^6$ komórek na dołek. Po upływie doby, komórki potraktowano wybranymi inhibitorami przez 30 min, a następnie 50, 100, 200, 400 oraz 800 μM nadtlenkiem wodoru na okres 24 h. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w obecności samego nadtlenku wodoru albo w obecności odpowiednich inhibitorów TRPM2 i PARP.

Po zakończeniu hodowli komórek wobec badanych związków i ich kombinacji, komórki przepłukano dwukrotnie PBS, a następnie dodano świeżo przygotowany roztwór roboczy soli MTT. Kolejnym krokiem była inkubacja w standardowych warunkach hodowlanych przez 3 h (37°C, 5% CO₂, 95%). Kryształy formazanu, które powstały w wyniku redukcji soli MTT przez żywe komórki, rozpuszczono poprzez dodanie 1 ml izopropanolu (POCH S.A.) do każdego dołka płytki hodowlanej oraz inkubację w ciemności (10 min, 37°C). Absorbancję mierzono przy użyciu czytnika płytek BioTek 800TS Microplate (Agilent) przy długości fali 570 nm. Żywotność komórek niepoddanych działaniu żadnego związku przyjęto jako 100%. Całość procedury została powtórzona 6-krotnie, z zachowaniem tej samej ilości komórek oraz identycznych warunków hodowlanych.

3.5 Cytometryczna ocena indukowanej śmierci komórek

W celu przeprowadzenia cytometrycznej oceny rodzaju indukowanej śmierci, komórki linii EA.hy926 wysiano na płytkę 12-dołkową w ilości $0,12 \times 10^6$ na dołek. Po osiągnięciu 90% konfluencji, komórki potraktowano wybranymi związkami zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Następnie, komórki przepłukano dwukrotnie PBS i odklejono przy pomocy trypsyny (5 min, 37°C). Trypsynę neutralizowano za pomocą medium, w którym wcześniej wzrastały komórki danej grupy badanej. Próbkę odwirowano przy 400 g przez 7 min, usunięto supernatant, a komórki zawieszono w 100 μ l ABB (*ang. Annexin-Binding Buffer*). Zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta, do każdej z próbek dodano 5 μ l AV-Alexa Fluor 488 oraz 1 μ l jodku propidyny (PI, *ang. propidium iodide*; Thermo Fisher Scientific) oraz intensywnie wymieszano przy użyciu worteksu. Wszystkie próbki inkubowano w ciemności przez okres 10 min. Poziom fluorescencji Alexa Fluor 488 i PI zmierzono przy pomocy cytometru Guava EasyCyte 6HT-2L (Merck). Wygenerowane pliki FCS zostały przeanalizowane z użyciem InCyte Software 3.3 (Merck). Eksperyment wykonano w 6 niezależnych powtórzeniach.

3.6 Cytometryczna ocena rozkładu faz cyklu komórkowego

Celem oceny rozkładu faz cyklu komórkowego, komórki linii EA.hy926 wysiano na płytki 12-dołkowe w ilości $0,12 \times 10^6$ na dołek. Po osiągnięciu 90% konfluencji, komórki potraktowano wybranymi związkami zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Po upływie 24 h, komórki odklejono używając trypsyny (5 min, 37°C). Trypsynę neutralizowano za pomocą medium, w którym wcześniej wzrastały komórki danej grupy badanej. Próbkę odwirowano przy 400 g przez 7 min, usunięto supernatant z zachowaniem około 0,5 ml. Komórki zawieszono w pozostałym medium, do którego powoli dodano 1 ml zimnego 70% etanolu mieszając próbki przy użyciu worteksu. Tak przygotowane próby zostały natychmiast przeniesione do lodu, a następnie do zamrażarki (-20°C) na co najmniej 24 h, w celu dokładnego utrwalenia i permeabilizacji błon komórkowych. Następnie komórki odwirowano (650 g, 5 min, RT), alkohol usunięto, a do prób dodano 1 ml PBS w celu obniżenia stężenia resztek etanolu. Komórki zwirowano ponownie (500 g, 7 min, RT) po czym usunięto supernatant, a komórki zawieszono w 300 μ l FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific). Po dokładnym wymieszaniu wszystkich prób przy użyciu worteksu oraz 30 min inkubacji w ciemności, fluorescencję mierzono za pomocą

cytometru Guava EasyCyte 6HT-2L (Merck). Wygenerowane pliki FCS zostały przeanalizowane z użyciem InCyte Software 3.3 (Merck) oraz programu FlowJo 10 (FlowJo LLC). Eksperyment wykonano w 6 niezależnych powtórzeniach.

3.7 Pomiar poziomu jonów wapnia

W celu oceny czy traktowanie komórek linii EA.hy926 nadtlaniem wodoru skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} oraz czy obniżenie poziomu błonowego kanału wapniowego TRPM2 wpływa na ten proces, wykorzystano wskaźnik poziomu jonów Ca^{2+} – X-Rhod-1 (Thermo Fisher Scientific). Związek ten wykazuje fluorescencję w zakresie długości fali charakterystycznej dla koloru czerwonego, która wzrasta około 100-krotnie w momencie związania jonów Ca^{2+} .

Przygotowanie wskaźnika przeprowadzono zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu. Do probówki zawierającej 50 μg wskaźnika jonów Ca^{2+} X-Rhod-1 dodano 1 ml DMSO w celu uzyskania końcowego stężenia 5 mM. Roztwór roboczy przygotowywano przed wykonaniem serii eksperymentów, a następnie przechowywano przez maksymalnie 7 dni w zamrażarce (-20°C), chroniąc od światła. Ze względu na możliwą degradację odczynnika po upływie tego terminu fiolkę z indykatorem poddawano utylizacji.

Komórki linii EA.hy926 z endogennym oraz obniżonym poziomem ekspresji TRPM2 wysiano na szalki Petriego o średnicy 4,5 cm w ilości $0,5 \times 10^6$. Po uzyskaniu około 90% konfluencji, komórki zostały dwukrotnie przepłukane PBS. Przez wzgląd na właściwości fluorescencyjne, komórki zostały umieszczone w medium hodowlanym DMEM pozbawionym czerwieni fenolowej. Następnie, do medium dodano odpowiednie ilości roztworu roboczego X-Rhod-1. W procesie optymalizacji sprawdzono zakres stężeń wskaźnika jonów Ca^{2+} wskazany przez producenta (1-5 μM) oraz różne czasy inkubacji (30-60 min). Ze względu na wrażliwość komórek linii EA.hy926 na zmiany temperatury, inkubacje prowadzono w 37°C . Do dalszych eksperymentów wybrano najniższe stężenie wskaźnika poziomu jonów Ca^{2+} , dla którego uzyskano pozytywny wynik reakcji, tj. 4 μM oraz czas inkubacji wynoszący 60 min. Nadmiar barwnika usunięto poprzez dwukrotne dodanie i usunięcie medium hodowlanego DMEM pozbawionego czerwieni fenolowej. W celu osiągnięcia pełnej deestryfikacji wskaźnika poziomu Ca^{2+} , komórki były inkubowane przez kolejne 30 min w medium hodowlanym DMEM pozbawionym czerwieni fenolowej z zachowaniem temperatury 37°C . Następnie, pojedyncza szalka była umieszczana w komorze odwróconego zmotoryzowanego mikroskopu Axio

Observer Z1 (Zeiss) wyposażonego w system inkubacji do obrazowania żywych komórek (PeCon). Zdjęcia wykonano z maksymalną częstotliwością z wykorzystaniem obiektywu Zeiss EC Plan-Neofluar $\times 10/0.30$ Ph1, kamery mono Axiocam 503 i oprogramowania ZEN 2 (wszystkie firmy Zeiss). Po wykonaniu serii kilku zdjęć, do szalki dodano wodny roztwór nadtlenu wodoru, do uzyskania końcowego stężenia $100\ \mu\text{M}$. Serie zdjęć kontrastowo-fazowych oraz fluorescencyjnych dla kanału czerwonego, posłużyły do pomiaru intensywności fluorescencji, która odzwierciedlała wewnątrzkomórkowy poziom jonów Ca^{2+} . Eksperyment wykonano w 4 niezależnych powtórzeniach.

3.8 Test migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego

Pierwszym z testów oceniających potencjał migracyjny komórek był test migracji komórek wobec środowiska chemoatrakcyjnego przy wykorzystaniu insertów z membraną o średnicy porów $3\ \mu\text{m}$. Komórki linii EA.hy926 wysiano na płytkach 12-dołkowych w ilości $0,12 \times 10^6$ na dołek. Po osiągnięciu około 90% konfluencji, komórki potraktowano zgodnie ze schematem przedstawionym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Po upływie 24 h, komórki odklejono od dna naczynia hodowlanego przy użyciu trypsyny zgodnie z metodyką przedstawioną w rozdziale 3.1 *Materiał badawczy i hodowla komórkowa*. Następnie $0,1 \times 10^6$ komórek zawieszono w medium hodowlanym DMEM z dodatkiem 1% FBS. Do każdej ze studzienek płytki 24-dołkowej dodano DMEM suplementowane 20% FBS w roli chemoatraktantu. Następnie, na krawędziach dołków zawieszono plastikowe inserty zakończone perforowaną membraną o porach średnicy $3\ \mu\text{m}$ (Lonza), a ich górne komory wypełniono przygotowaną wcześniej zawiesiną komórek. Po 24 h inkubacji w standardowych warunkach hodowlanych, komórki na membranie insertów zostały utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA, *ang. paraformaldehyde*; Sigma-Aldrich) w PBS (20 min, RT). Następnie, resztki utrwalacza dokładnie wypłukano PBS (3×5 min). Komórki wybarwiono w 0,4% alkoholowym roztworze fioletu krystalicznego przez 5 min. Nadmiar barwnika usunięto poprzez delikatne zanurzanie insertów w PBS do momentu, kiedy po ponownym zanurzeniu bufor pozostawał bezbarwny. Komórki, które nie były w stanie przedostać się przez pory membrany zostały usunięte poprzez dokładne wyczyszczenie wewnętrznej powierzchni membrany bawełnianym patyczkiem higienicznym. Komórki, które znalazły się po zewnętrznej stronie membrany zostały sfotografowane przy użyciu mikroskopu świetlnego Eclipse E800 wyposażonego w obiektyw Plan Fluor $\times 10/0.30$, aparat DS-5Mc-U1 i NIS-Elements 3.30

(wszystkie firmy Nikon). Zdjęcia wykonywano w 10 losowo wybranych punktach każdego z insertów. Eksperyment wykonano w 6 niezależnych powtórzeniach. Komórki zostały zliczone przy użyciu programu ImageJ 1.51w (National Institutes of Health).

3.9 Test gojenia się ran

W celu oceny potencjału migracyjnego komórek linii EA.hy926, zastosowano również test „gojenia się ran”, który rozpoczęto od wysiania komórek na płytkę 6-dołkową w ilości $0,5 \times 10^6$ komórek na dołek. Po osiągnięciu blisko 100% konfluencji w monowarstwie komórkowej wykonano ranę z wykorzystaniem sterylnej końcówki do pipety 10 – 100 μ l. Dołki dwukrotnie przepłukano ciepłym PBS. Następnie komórki potraktowano wybranymi substancjami zgodnie ze schematem przedstawionym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Tak przygotowaną płytkę umieszczono w komorze odwróconego zmotoryzowanego mikroskopu Axio Observer Z1 (Zeiss) wyposażonego w system inkubacji do obrazowania żywych komórek (PeCon). Zdjęcia wykonano z wykorzystaniem obiektywu Zeiss EC Plan-Neofluar $\times 10/0.30$ Ph1, kamery mono Axiocam 503 i oprogramowania ZEN 2 (wszystkie firmy Zeiss). Zdjęcia zarastającej przestrzeni były wykonywane automatycznie co 10 min przez okres 36 h. Proces zamykania rany analizowano za pomocą programu ImageJ 1.51w (National Institutes of Health). Eksperyment wykonano w 6 niezależnych powtórzeniach.

3.10 Przeciwciała użyte w badaniach

Immunofluorescencyjne znakowanie białek oraz potranslacyjną ocenę ich ekspresji metodą Western Blot wykonywano techniką pośrednią z użyciem odpowiednich przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych. Rodzaje przeciwciał, producentów, numery katalogowe i zastosowane rozcieńczenia przedstawiono w **Tabeli III**.

Tabela III. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych w badaniach.

Przeciwciała pierwszorzędowe					
Cel molekularny	Producent	Numer katalogowy	Gatunek gospodarza	Rodzaj przeciwciała	Rozcieńczenie
VE-kadheryna	Thermo Fisher Scientific	PA5-19612	Królik	Poliklonalne	IF 1:100 WB 1:1000
ZO-1		33-9100	Mysz	Monoklonalne	IF 1:100
β-katenina		13-8400	Mysz	Monoklonalne	IF 1:100 WB 1:1000
Przeciwciała drugorzędowe					
Rodzaj	Producent	Numer katalogowy	Gatunek gospodarza	Częsteczka skonjugowana	Rozcieńczenie
Anty-mysie	Thermo Fisher Scientific	A11005	Koza	Alexa Fluor 594	IF 1:200
Anty-mysie		A11029	Koza	Alexa Fluor 488	
Anty-królicze		A11008	Koza	Alexa Fluor 488	
Anty-królicze		A21207	Osioł	Alexa Fluor 594	
Anty-mysie		31430	Koza	HRP	WB: 1:4000
Anty-królicze		31460	Koza	HRP	

IF – immunofluorescencja, WB – Western Blot, HRP – peroksydaza chrzanowa (*ang. horseradish peroxidase*)

3.11 Fluorescencyjne znakowanie białek

W celu fluorescencyjnego znakowania wybranych białek lub cytoszkieletu aktynowego, komórki linii EA.hy926 wysiano na płytce 12-dołkowe w ilości $0,12 \times 10^6$ komórek na dołek. Przed dodaniem zawiesiny komórek, na dnie każdego z dołków umieszczono szkiełko nakrywkowe. Po osiągnięciu 90% konfluencji, komórki traktowano wybranymi związkami zgodnie ze schematem przedstawionym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Po upływie 24 h, komórki utrwalono za pomocą ciepłego 4% PFA w PBS (20 min, RT). Następnie, PFA usunięto, a komórki przepłukano PBS (3×5 min) w celu minimalizacji stężenia utrwalacza. Tak przygotowany materiał przechowywano w lodówce do momentu przeprowadzenia dalszych etapów procedury.

Kolejnym krokiem fluorescencyjnego znakowania białek lub cytoszkieletu aktynowego była permeabilizacja błon komórkowych w celu umożliwienia penetracji przeciwciał lub falloidyny do wnętrza komórki. Do tego celu wykorzystano 0,25% roztwór detergentu Triton-X 100 (Serva) w PBS (5 min, RT). Po przepłukaniu za pomocą buforu PBS (3×5 min, RT), miejsca niespecyficznych wiązań przeciwciał blokowano poprzez inkubację komórek w 4% roztworze albuminy bydlęcej (BSA, *ang. bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich). Po upływie 60 min, komórki inkubowano z roztworami wybranych przeciwciał pierwszorzędowych w BSA przez kolejne 60 min. Po tak przeprowadzonej inkubacji, przeciwciała niezwiązane z celem molekularnym usunięto poprzez płukanie komórek w PBS (3×5 min, RT). Następnie, komórki inkubowano z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym rozcieńczonym w PBS przez 60 min. Charakterystyka oraz rozcieńczenia przeciwciał użytych w trakcie fluorescencyjnego znakowania białek zostały ujęte w **Tabeli III**. Niezwiązane przeciwciała ponownie usunięto poprzez płukanie komórek w PBS (3×5 min). Znakowanie cytoszkieletu aktynowego przeprowadzono z użyciem falloidyny skonjugowanej z fluorochromem o świetle emisji w zakresie światła czerwonego (Alexa Fluor™ 594 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific) lub zielonego (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, Thermo Fisher Scientific), w zależności od emisji świetlnej fluorochromu skonjugowanego z przeciwciałem drugorzędowym na wcześniejszych etapach procedury. Falloidynę rozcieńczono 1:40 w PBS oraz inkubowano z komórkami przez 20 min. Po przepłukaniu komórek PBS (3×5 min), jądra komórkowe wyznakowano poprzez inkubację w obecności 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI, Sigma-Aldrich, 10 min, RT) rozcieńczonym 1:20 000 w wodzie destylowanej. Po przepłukaniu komórek PBS (3×5 min),

preparaty zamknięto za pomocą Aqua Poly/Mount (Polysciences). Obserwację preparatów przeprowadzono przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego C1 przy użyciu obiektywu olejowego Plan VC Apo $\times$ 60/1.4 lub Plan VC Apo $\times$ 100/1.4 i oprogramowania EZ-C1 3.80 (wszystkie firmy Nikon). Do wzbudzenia emisji DAPI, Alexa Fluor 488 i Alexa Fluor 594 wykorzystano diodowy laser 408 nm i filtr emisyjny 450/35, diodowy laser 488 nm i filtr emisyjny 515/30 oraz He–Ne laser 543 nm i filtr emisyjny 650LP. Wszystkie obrazy konfokalne znakowanych białek zostały uzyskane z wykorzystaniem identycznych ustawień w zakresie mocy lasera, szybkości zbierania pikseli i wzmocnienia sygnału. Wzmocnienie zostało ustawione dla optymalnej widoczności określonych białek i minimalnego sygnału pochodzącego od tła próbki. Fluorescencyjne znakowanie każdego z białek wykonano w 3 niezależnych powtórzeniach.

3.12 Western Blot

W celu przeprowadzenia półilościowej analizy potranslacyjnej ekspresji białek metodą Western Blot, komórki EA.hy926 wysiano na butelki hodowlane (BD Falcon) w ilości 1×10^6 . Po osiągnięciu 90% konfluencji, do butelek dodano wybrane substancje zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale 3.2 *Traktowanie komórek*. Po upływie 24 h medium hodowlane zostało usunięte, a komórki dwukrotnie przepłukane ciepłym PBS. Następnie butelki umieszczono na lodzie w celu spowolnienia procesu degradacji białek i do każdej z nich dodano mieszaninę składającą się z 100 μ l buforu RIPA (Merck), 3 μ l inhibitorów proteaz, 3 μ l inhibitorów fosfataz (oba z Thermo Fisher Scientific) i 194 μ l wody destylowanej. Po 10 min inkubacji, komórki mechanicznie oderwano od powierzchni hodowlanej za pomocą przeznaczonych do tego celu skrobaczek. Tak przygotowane lizaty przeniesiono do probówek typu eppendorf i poddano klaryfikacji poprzez odwirowanie (10 000 g, 4°C, 15 min). Osad zawierający resztki struktur komórkowych oraz frakcję jądrową białek odrzucono, a supernatant przeniesiono do czystych probówek. Ilość białka całkowitego w każdej z prób mierzono w oparciu o BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Po wykonaniu szeregu rozcieńczeń albuminy, przeprowadzono ocenę spektrofotometryczną za pomocą czytnika płytek BioTek 800TS Microplate (Agilent). Na podstawie uzyskanych wyników wykreślono krzywą wzorcową. Podstawienie wartości absorbancji, którą wykazywały badane próby pozwoliło na określenie i ujednolicenie ilości białka dodawanego do każdej ze studzienek żelu elektroforetycznego. Pomiędzy analizami lizaty komórkowe były przechowywane w

temperaturze -80°C . Do elektroforetycznego rozdzielania białek przygotowano mieszaninę złożoną z objętości próbki zawierającej 20 μg całkowitego białka, odczynnika redukującego NuPAGE oraz SDS-TRIS glycine (oba z Thermo Fisher Scientific). Denaturację białka przeprowadzono w temperaturze 75°C (2 min). Tak przygotowane próbki umieszczono w studzienkach poliakrylamidowego żelu elektroforetycznego 4–12% NuPAGE Bis-Tris Gel (Novex/Life Technologies; Thermo Fisher Scientific). Elektroforezę prowadzono przez 35 min przy napięciu 220–225 V z wykorzystaniem buforu Tris Glycine Run Buffer (Invitrogen, Life Technologies) oraz aparatu XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Life Technologies). Po elektroforetycznym rozdzielaniu, białka zostały przetransferowane na membranę nitrocelulozową za pomocą zestawu do suchego transferu iBlot (Invitrogen, Life Technologies). Transfer białka na membrany potwierdzono przy pomocy niespecyficznego i odwracalnego barwienia Ponceau S (Thermo Fisher Scientific). Po dokładnym wypłukaniu barwnika przy użyciu wody destylowanej, membrany inkubowano z roztworami odpowiednich przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych (16 h, 4°C) w aparacie iBind Flex Western Blot System (Thermo Fisher Scientific) w rozcieńczeniach przedstawionych w **Tabeli III**. Wizualizacji prążków dokonano przy użyciu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) oraz aparatu ChemiDoc (Bio-Rad). Uzyskane zdjęcia prążków analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem ImageJ 1.51w (National Institutes of Health). Dla każdego z białek wykonano 3 niezależne powtórzenia eksperymentu.

3.13 Analiza statystyczna wyników

Statystyczne opracowanie wyników wykonano przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Wartości $p < 0,05$ zostały uznane jako istotne statystycznie. Istotności statystyczne wskazane na wykresach oznaczono w następujący sposób: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe. Test Shapiro-Wilka został wykorzystany do sprawdzenia zgodności rozkładu uzyskanych wartości z rozkładem normalnym. W przypadku testu MTT wykorzystano test Wilcoxona, który pozwolił na porównanie wartości uzyskanych dla prób badanych względem próby kontrolnej, której absorbancję przyjęto jako 100% żywotności komórek. W celu porównania różnic między kontrolą a komórkami potraktowanymi wybranymi związkami zastosowano nieparametryczny test Kruskal–Wallis z poprawką Dunn’a. Z kolei w przypadku porównywania ze sobą grup komórek nietransfekowanych, transfekowanych siRNA

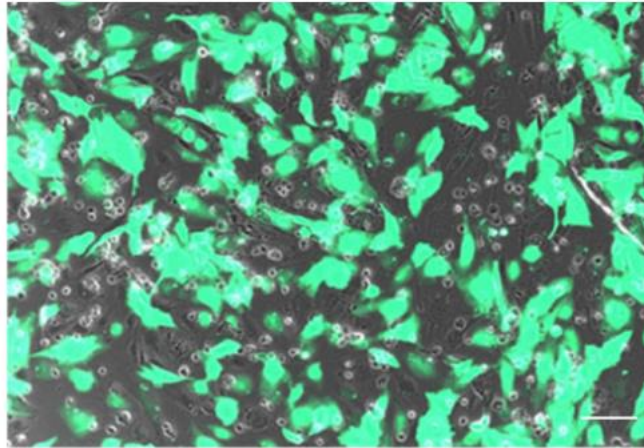
kontrolnym lub transfekowanych siRNA wobec TRPM2 zastosowano dwukierunkowy test ANOVA z uwzględnieniem wielokrotnych porównań. Podobnie, w części badań z zastosowaniem inhibitorów TRPM2 albo PARP, w celu wyznaczenia istotności różnic pomiędzy poszczególnymi grupami, wykorzystano dwukierunkowy test ANOVA z uwzględnieniem wielokrotnych porównań lub nieparametryczny test Kruskal–Wallis z poprawką Dunn’a w przypadku porównywania grup badanych z nietraktowaną kontrolą.

4. WYNIKI

4.1 Obniżenie poziomu TRPM2 z wykorzystaniem siRNA

4.1.1 Ocena efektywności transfekcji komórek z wykorzystaniem elektroporacji metodą nukleofekcji

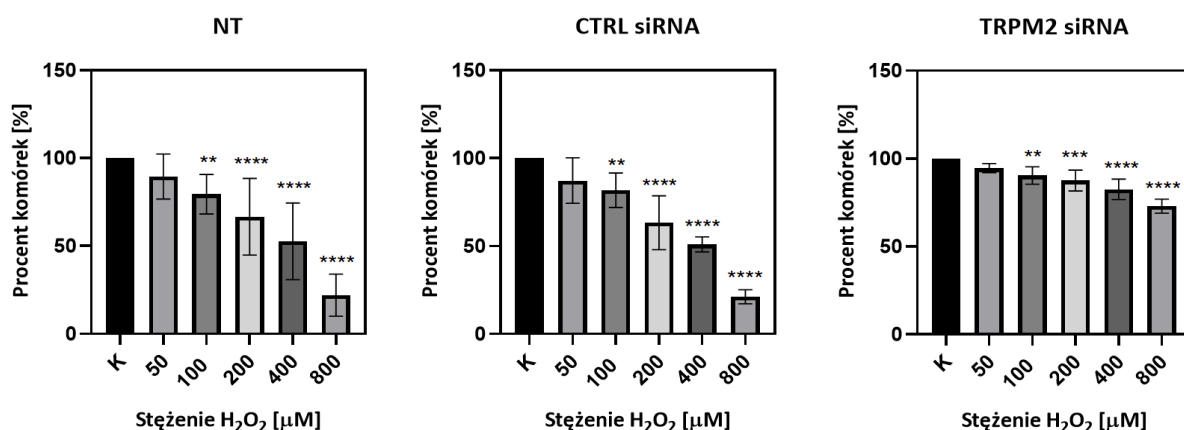
siRNA wobec TRPM2 zostało wprowadzone do komórek EA.hy926 z wykorzystaniem elektroporacji metodą nukleofekcji. Na podstawie oceny efektywności transfekcji oraz zmian w morfologii komórek EA.hy926 zastosowano program oznaczony jako DS 120. W celu potwierdzenia efektywności transfekcji do komórek wprowadzono plazmid pmaxGFP. Jako kontrolę wobec zmian morfologicznych po procedurze elektroporacji zastosowano komórki nietransfekowane. Po upływie 24 h, komórki sfotografowano przyżyciowo z wykorzystaniem techniki mikroskopii kontrastowo-fazowej oraz fluorescencyjnej. Parametry akwizycji obrazów ustawiono tak, aby w komórkach nietransfekowanych zielona autofluorescencja nie była widoczna. W przypadku komórek transfekowanych pmaxGFP zdecydowana większość z nich charakteryzowała się zieloną fluorescencją. Z 3 niezależnych preparatów wykonano po 10 zdjęć z losowych pól. Następnie zliczono całkowitą ilość komórek oraz ilość komórek charakteryzujących się pozytywnym sygnałem dla GFP. Otrzymane dane pozwoliły ocenić efektywność transfekcji na poziomie 84,79%. Reprezentatywne zdjęcie przedstawiające komórki transfekowane pmaxGFP z użyciem programu DS 120 przedstawiono na **Rycinie 5**.



Rycina 5. Ekspresja GFP w komórkach EA.hy926 transfekowanych wektorem pmaxGFP. Bar = 100 μ m. GFP – białko zielonej fluorescencji (*ang. green fluorescence protein*).

4.1.2 Ocena żywotności komórek

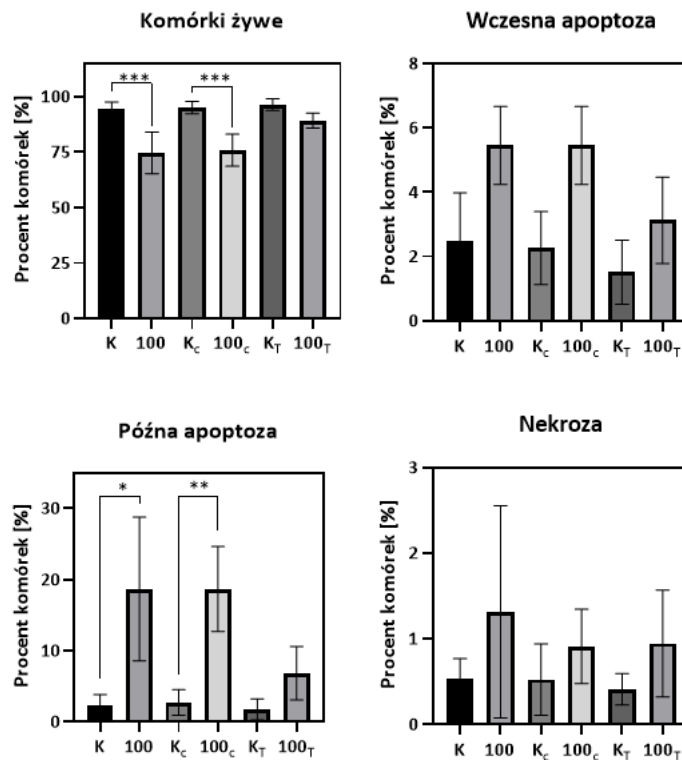
Test MTT wykonano w celu oceny cytotoksycznego działania nadtlenu wodoru na komórki śródbłonna linii EA.hy926. Wyniki wskazują, że traktowanie nadtlakiem wodoru komórek nietransfekowanych przez 24 h prowadzi do spadku przeżywalności komórek w sposób zależny od stężenia substancji. W przypadku stężeń 50, 100, 200, 400 oraz 800 μM nadtlenu wodoru, zaobserwowano obniżenie przeżywalności do odpowiednio 90, 79, 67, 53 i 22% w porównaniu do kontroli, która wyznaczyła teoretyczną wartość pełnej żywotności komórek. Obserwowane różnice w żywotności komórek były istotne statystycznie w porównaniu do nietraktowanej kontroli dla stężeń od 100 μM i wyższych. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku komórek transfekowanych siRNA kontrolnym. Co więcej, nie wykazano znaczących różnic w oddziaływaniu nadtlenu wodoru pomiędzy komórkami nietransfekowanymi a transfekowanymi siRNA kontrolnym. Stąd należy stwierdzić, że metodologia procesu transfekcji nie wpływa na odpowiedź komórek na działanie nadtlenu wodoru. Natomiast po obniżeniu poziomu TRPM2 zaobserwowano znacznie ograniczoną odpowiedź komórek na działanie nadtlenu wodoru. Na podstawie wyników testu MTT do dalszej części eksperymentów wybrano 100 μM nadtlenu wodoru. Było to najniższe stężenie, dla którego zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w przeżywalności w stosunku do kontroli. Wyniki testu MTT przedstawiono na **Rycinie 6**.



Rycina 6. Zmiana żywotności komórek linii EA.hy926 hodowanych w obecności nadtlenu wodoru. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. Na Rycinie zaznaczono statystycznie istotne różnice względem nietraktowanych komórek kontrolnych, które wyznaczyły teoretyczną wartość 100% żywotności. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. CTRL siRNA – komórki transfekowane siRNA kontrolnym, NT – komórki nietransfekowane, TRPM2 siRNA – komórki z obniżonym poziomem TRPM2.

4.1.3 Ocena rodzaju indukowanej śmierci

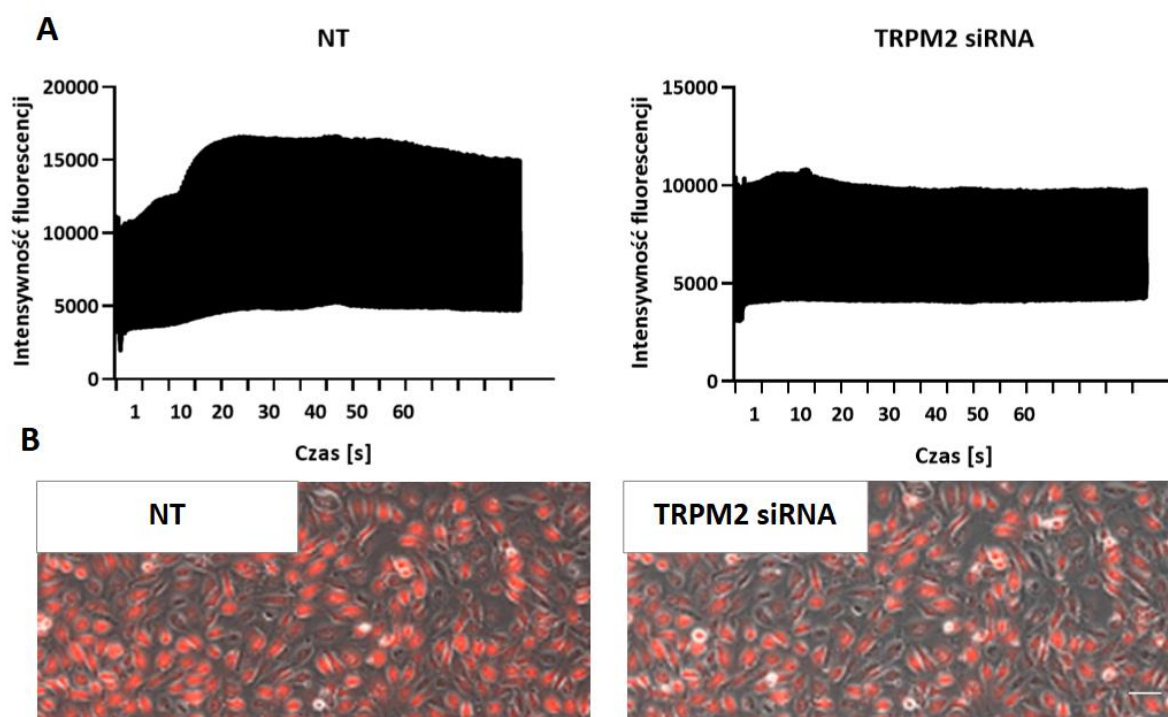
Analiza śmierci komórek z wykorzystaniem podwójnego barwienia AV/PI wykazała, że obserwowany spadek przeżywalności komórek nietransfekowanych oraz transfekowanych siRNA kontrolnym po traktowaniu nadtlaniem wodoru był spowodowany głównie śmiercią na drodze apoptozy. W przypadku obu wymienionych grup po 24 h od momentu dodania nadtlenu wodoru obserwowano statystycznie istotne obniżenie odsetka komórek żywych (94,64 vs. 74,62% dla nietransfekowanych oraz 94,99 vs. 75,82% dla transfekowanych siRNA kontrolnym) przy jednoczesnym wzroście dla komórek późnoapoptotycznych w porównaniu do nietraktowanych kontroli (odpowiednio 2,37 vs. 18,67% oraz 2,73 vs. 18,69%). Dla odsetka komórek we wczesnej apoptozie oraz nekrotycznych nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian. W przypadku komórek z obniżonym poziomem TRPM2 hodowla w obecności nadtlenu wodoru nie spowodowała znaczących zmian dla żadnej z badanych populacji (żywe: 96,31 vs. 89,11%, wczesnoapoptotyczne: 1,5 vs. 3,13%, późnoapoptotyczne: 1,77 vs. 6,85% oraz nekrotyczne: 0,41 vs. 0,95%). Jednocześnie obniżenie poziomu TRPM2 w sposób istotny statystycznie hamowało spadek odsetka komórek żywych i wzrost dla komórek późnoapoptotycznych w porównaniu do grupy komórek nietransfekowanych oraz transfekowanych kontrolnym siRNA i traktowanych nadtlaniem wodoru (żywe: 89,11% dla transfekowanych siRNA wobec TRPM2 vs. 74,62 oraz 75,82% dla komórek nietransfekowanych i transfekowanych kontrolnym siRNA, późnoapoptotyczne: 6,85 vs. 18,67 i 18,69%, odpowiednio). Wyniki otrzymane w trakcie cytometrycznej oceny rodzaju indukowanej śmierci komórek przedstawiono na **Rycinie 7**. Ze względu na brak istotnych różnic pomiędzy komórkami nietransfekowanymi a transfekowanymi kontrolnym siRNA zarówno w teście MTT, jak i w analizie rodzaju indukowanej śmierci komórek, a także z uwagi na oszczędności finansowe, w dalszych eksperymentach jako kontrolę wykorzystywano wyłącznie komórki nietransfekowane.



Rycina 7. Rodzaj indukowanej nadtlaniem wodoru śmierci komórek linii EA.hy926. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. K – komórki nietransfekowane nietraktowane, 100 – komórki nietransfekowane i potraktowane 100 μ M nadtlaniem wodoru, K_c – komórki transfekowane siRNA kontrolnym, 100_c – komórki transfekowane siRNA kontrolnym i potraktowane 100 μ M nadtlaniem wodoru, K_t – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2, 100_t – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 i potraktowane 100 μ M nadtlaniem wodoru.

4.1.4 Ocena poziomu jonów wapnia

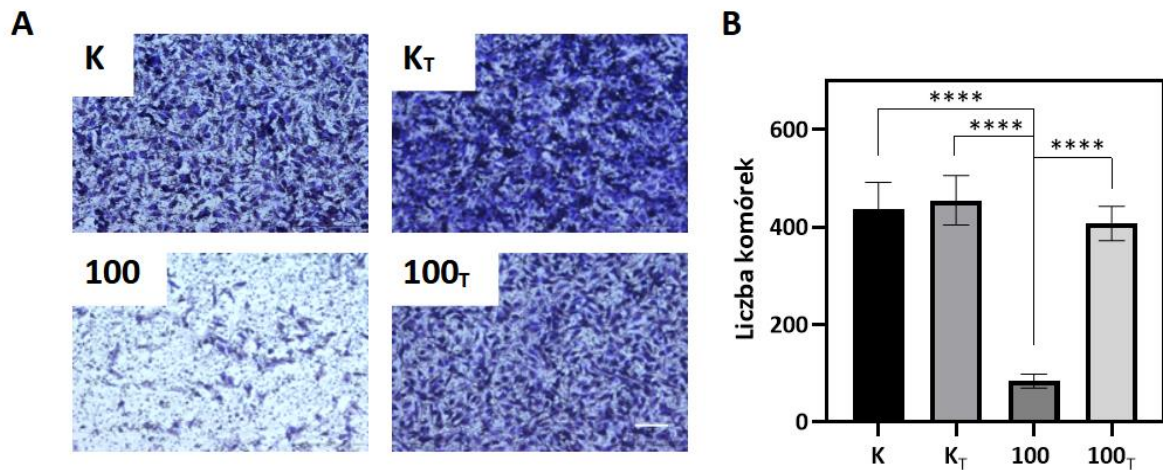
W celu oceny zależnych od nadtlenu wodoru zmian wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} w komórkach nietransfekowanych i transfekowanych siRNA wobec TRPM2 zastosowano wskaźnik jonów Ca^{2+} X-Rhod-1. W przypadku komórek nietransfekowanych widoczny był znaczny wzrost fluorescencji wskaźnika po potraktowaniu komórek 100 μM nadtlakiem wodoru. Dodatkowo wzrost ten można było podzielić na dwie fazy. Pierwsza z nich była prawdopodobnie związana z uwolnieniem jonów Ca^{2+} z ER, a druga mogła być skutkiem otwarcia błonowych kanałów jonowych. W przypadku komórek z obniżonym poziomem TRPM2, wzrost fluorescencji wskaźnika po dodaniu do komórek nadtlenu wodoru był ograniczony. Co więcej, w zmianie tej można było wyróżnić pojedynczy pik, który prawdopodobnie związany był z uwolnieniem Ca^{2+} z magazynu wewnątrzkomórkowego. W porównaniu do wyników otrzymanych dla komórek nietransfekowanych, nie zaobserwowano drugiej fazy wzrostu fluorescencji wskaźnika jonów Ca^{2+} . Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rycinie 8**.



Rycina 8. Zmiana intensywności fluorescencji wkaźnika jonów wapnia X-Rhod-1 po dodaniu nadtlenku wodoru do komórek linii EA.hy926. A – wyniki pomiaru intensywności fluorescencji komórek w trakcie 80 s od momentu dodania nadtlenku wodoru. B – reprezentatywne zdjęcia komórek linii EA.hy926 nietransfekowanych oraz transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 w 30 s po dodaniu nadtlenku wodoru. Bar = 100 μ m. NT – komórki nietransfekowane, TRPM2 siRNA – komórki transfekowane TRPM2 siRNA.

4.1.5 Ocena migracji komórek wobec środowiska chemoatrakcyjnego

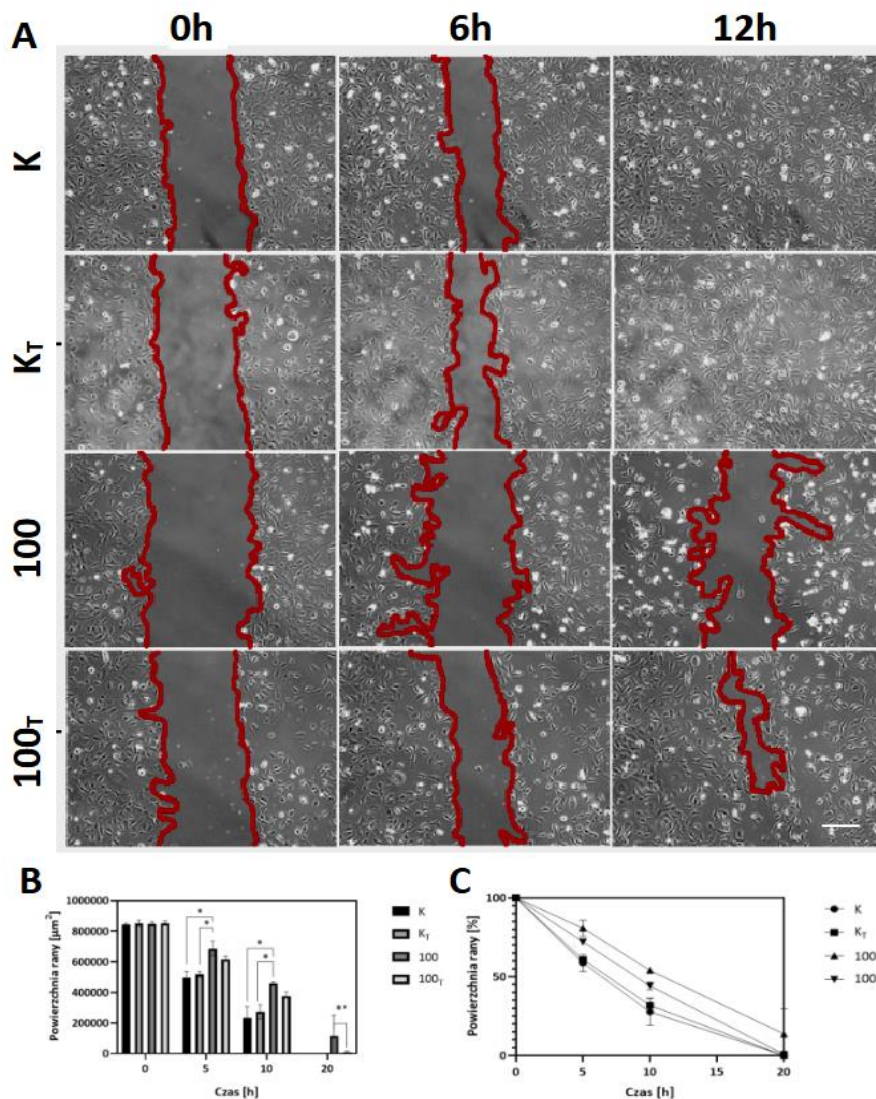
Komórki zdolne do migracji przez 3 μm pory membrany w kierunku medium z dodatkiem 20% FBS uznano za komórki o wysokim potencjale migracyjnym. Komórki te wybarwiono fioletem krystalicznym, sfotografowano i policzono. Uzyskane wyniki wskazują, że nadtlenek wodoru nie upośledza zdolności migracyjnych komórek z obniżonym poziomem TRPM2, jak miało to miejsce w przypadku komórek nietransfekowanych. Dla komórek nietransfekowanych i transfekowanych siRNA wobec TRPM2 średnia ilość komórek zliczona z 40 zdjęć wyniosła odpowiednio 436,67 oraz 454,83. Z kolei w przypadku komórek traktowanych nadtlenkiem wodoru liczba ta spadła odpowiednio do 83,5 oraz 407,33. Wszystkie grupy wykazywały istotne statystycznie różnice względem komórek nietransfekowanych traktowanych nadtlenkiem wodoru. Nie odnotowano natomiast znaczących różnic pomiędzy ilością komórek niepotraktowanych nadtlenkiem wodoru a ilością komórek z obniżonym poziomem TRPM2 hodowanych w obecności nadtlenku wodoru. Wyniki eksperymentu przedstawiono na **Rycinie 9**.



Rycina 9. Ocena migracji komórek linii EA.hy926 wobec środowiska chemoatrakcyjnego. A – reprezentatywne zdjęcia powierzchni membran. Bar = 200 μm . B – średnia liczba komórek o wysokim potencjale migracyjnym. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. K – komórki nietransfekowane nietraktowane, 100 – komórki nietransfekowane i potraktowane 100 μM nadtlaniem wodoru, K_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2, 100_T – komórki transfekowane siRNA wobec TRPM2 i potraktowane 100 μM nadtlaniem wodoru.

4.1.6 Ocena migracji komórek z wykorzystaniem testu gojenia się ran

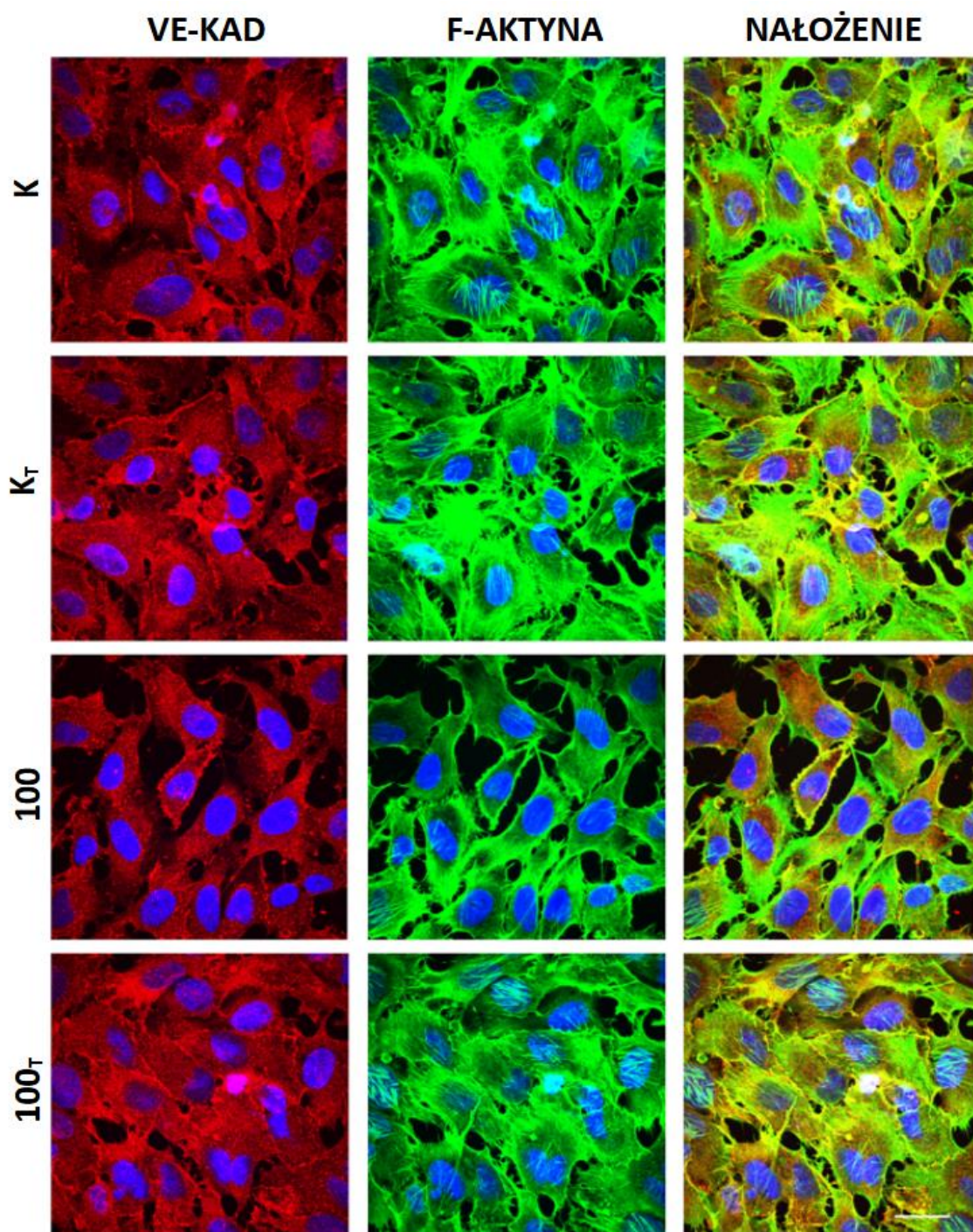
Test „gojenia się ran” wykonano w celu uzupełnienia wyników uzyskanych podczas oceny migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego. Dane uzyskane w obu testach były ze sobą spójne. Tempo zarastania rany było podobne w przypadku obu nietraktowanych kontroli – nietransfekowanej i z obniżonym poziomem TRPM2 (58,73 oraz 60,86% początkowej powierzchni rany po 5 h od rozpoczęcia eksperymentu, 27,72 i 31,87% po 10 h i całkowite zamknięcie rany około 12 h testu). Z kolei poddanie komórek nietransfekowanych działaniu 100 μ M nadtlenu wodoru spowodowało znaczący spadek ich zdolności migracyjnych. W 5 h eksperymentu powierzchnia rany stanowiła 80,76%, a w 10 h 54,01% swojej początkowej powierzchni. Po 20 h od rozpoczęcia obserwacji, obrys rany był nadal widoczny i stanowił 13,73% jej początkowej powierzchni. We wszystkich wymienionych punktach czasowych różnice w powierzchni ran pomiędzy komórkami nietransfekowanymi traktowanymi nadtlakiem wodoru a obiema kontrolami były istotne statystycznie. W przypadku komórek transfekowanych siRNA wobec TRPM2 obserwowano zahamowanie indukowanego nadtlakiem wodoru obniżenia potencjału migracyjnego komórek. Po upływie 5 oraz 10 h od rozpoczęcia eksperymentu, rana stanowiła odpowiednio 72,16 i 44,17% swojej początkowej powierzchni, natomiast w 20 h ulegała ona już niemal całkowitemu zamknięciu. Ponadto różnica w powierzchni rany pomiędzy obiema grupami komórek traktowanymi nadtlakiem wodoru w 20 h eksperymentu była istotna statystycznie. Wyniki uzyskane w trakcie testu gojenia ran przedstawiono na **Rycinie 10**.



Rycina 10. Ocena migracji komórek linii EA.hy926 z wykorzystaniem testu gojenia się ran. A – reprezentatywne zdjęcia powierzchni ran w momencie rozpoczęcia eksperymentu oraz po 6 i 12 h ekspozycji na nadtlenek wodoru. Bar = 200 μm. B – średnia powierzchnia ran wyrażona w μm² w momencie rozpoczęcia eksperymentu oraz po 5, 10 i 20 h ekspozycji na nadtlenek wodoru. C – średnia procentowa powierzchnia ran w stosunku do powierzchni początkowej po 5, 10 i 20 h ekspozycji na nadtlenek wodoru. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. K – komórki nietransfekowane nietraktowane, 100 – komórki nietransfekowane i potraktowane 100 μM nadtlenkiem wodoru, K_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 nietraktowane, 100_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 i potraktowane 100 μM nadtlenkiem wodoru.

4.1.7 Ocena fluorescencji VE-kadheryny i F-aktyny

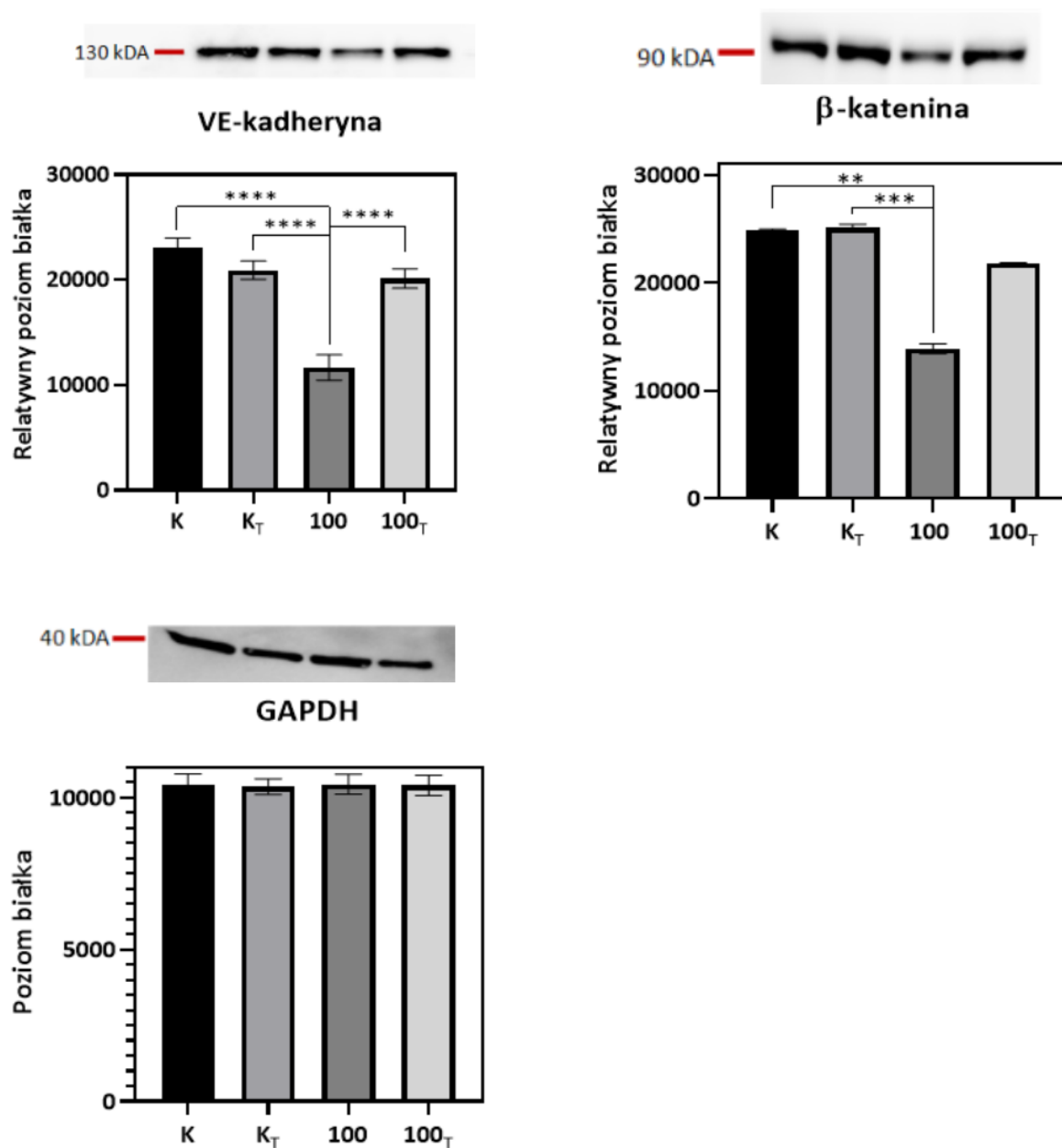
Immunofluorescencyjne znakowanie VE-kadheryny wykazało zmianę w obrębie struktury regionu połączeniowego w grupie komórek nietransfekowanych i potraktowanych nadtlaniem wodoru w porównaniu do analizowanych grup kontrolnych. W przypadku komórek niepotraktowanych nadtlaniem wodoru nie obserwowano większych przestrzeni pomiędzy komórkami, a struktura regionów interakcyjnych pozostawała ciągła. Natomiast potraktowanie komórek nadtlaniem wodoru skutkowało przekształceniem się wzoru połączeń międzykomórkowych na rozkład punktowy. Co więcej, utrata komórek poprzez ich śmierć na drodze apoptozy oraz ograniczenie ciągłości połączeń międzykomórkowych skutkowały pojawieniem się dodatkowych przestrzeni pomiędzy komórkami. Ponadto zmiana organizacji interakcyjnej komórek oraz zwiększenie się przestrzeni międzykomórkowych zostały potwierdzone poprzez fluorescencyjne znakowanie F-aktyny. Obniżenie poziomu TRPM2 wykazywało działanie protekcyjne względem monowarstwy komórkowej. Nawet pod wpływem działania nadtlenu wodoru, zachowany został ciągły charakter połączeń międzykomórkowych oraz nie zaobserwowano istotnie większych przestrzeni pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Nie widać było również zwiększonej ilości komórek umierających na drodze apoptozy. Wyniki fluorescencyjnego znakowania VE-kadheryny oraz F-aktyny przedstawiono na **Rycinie 11**.



Rycina 11. Fluorescencyjne znakowanie VE-kadheryny, F-aktyny oraz DNA w komórkach linii EA.hy926. VE-kadheryna – kolor czerwony, F-aktyna – kolor zielony, DNA – kolor niebieski. Bar = 100 μm . K – komórki nietransfekowane nietraktowane, 100 – komórki nietransfekowane i potraktowane 100 μM nadtlaniem wodoru, K_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 nietraktowane, 100_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 i potraktowane 100 μM stężeniem nadtlaniem wodoru, VE-KAD – VE-kadheryna.

4.1.8 Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny i β -kateniny

W celu określenia czy zmianom strukturalnym obserwowanym w obrębie regionów połączeniowych komórek z zachowaną endogenną ekspresją TRPM2 traktowanych nadtlaniem wodoru towarzyszą zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w utrzymanie struktury połączeń międzykomórkowych wykorzystano technikę Western Blot. Oceniano potranslacyjną ekspresję VE-kadheryny oraz β -kateniny. Ze względu na stabilną i konstytutywną ekspresję, jako białko referencyjne wykorzystano dehydrogenazę 3-fosforanu gliceroaldehydu (GAPDH, *ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Analiza potranslacyjnej ekspresji białek nie wykazała statystycznie istotnych różnic w poziomie GAPDH pomiędzy żadną z badanych prób. Natomiast w przypadku VE-kadheryny, poziom tego białka był niezmienny w przypadku obu grup kontrolnych. Dla komórek nietransfekowanych i potraktowanych nadtlaniem wodoru zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie ekspresji VE-kadheryny. Dowodzi to, że zmiana w strukturze połączeń międzykomórkowych widoczna podczas obserwacji mikroskopowej preparatów po fluorescencyjnym znakowaniu tego białka związana była z rozkładem struktur połączeniowych oraz degradacją VE-kadheryny. Ponadto badanie potwierdziło, że obniżenie poziomu TRPM2 miało działanie protekcyjne w obrębie organizacji regionów połączeniowych pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Po potraktowaniu komórek z obniżoną ekspresją TRPM2 nadtlaniem wodoru, zaobserwowano niewielki spadek poziomu VE-kadheryny, jednakże zmiana ta nie była znacząca względem grup kontrolnych. Co więcej, wykazano istotną statystycznie różnicę w poziomach VE-kadheryny pomiędzy grupami komórek potraktowanymi nadtlaniem wodoru. Podobne wyniki otrzymano dla potranslacyjnej oceny ekspresji β -kateniny. W przypadku obu grup kontrolnych poziom tego białka utrzymywał się na podobnym poziomie, a potraktowanie komórek nietransfekowanych nadtlaniem wodoru prowadziło do istotnego statystycznie obniżenia poziomu β -kateniny. Natomiast w komórkach z obniżoną ekspresją TRPM2 poddanych działaniu 100 μ M nadtlenu wodoru nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian względem pozostałych grup. Wyniki potranslacyjnej oceny poziomu VE-kadheryny i β -kateniny metodą Western Blot przedstawiono na **Rycinie 12**.



Rycina 12. Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny, β-kateniny i GAPDH metodą Western Blot w komórkach linii EA.hy926. Wyniki przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001. K – komórki nietransfekowane, 100 – komórki nietransfekowane i potraktowane 100 μM nadtlaniem wodoru, K_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2, 100_T – komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 i potraktowane 100 μM nadtlaniem wodoru.

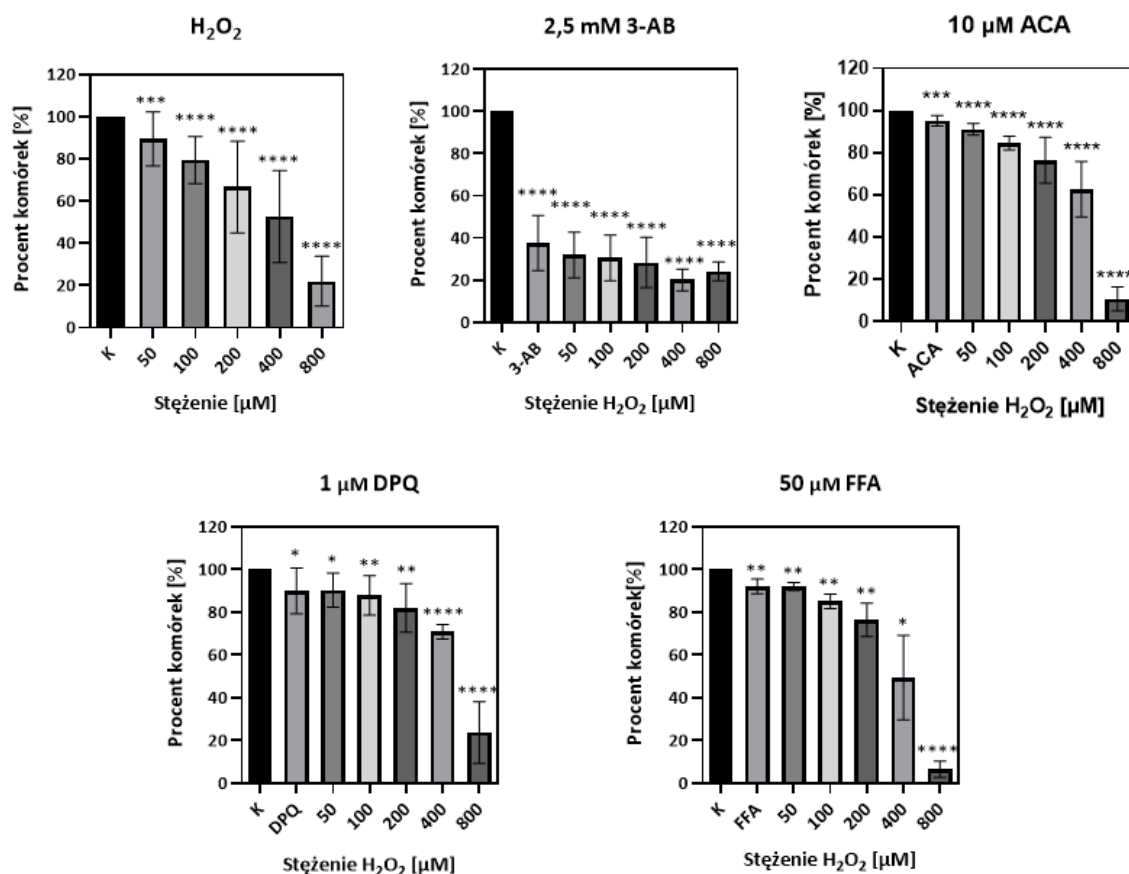
4.2 Inhibicja kanału TRPM2 oraz enzymu PARP

4.2.1 Ocena żywotności komórek

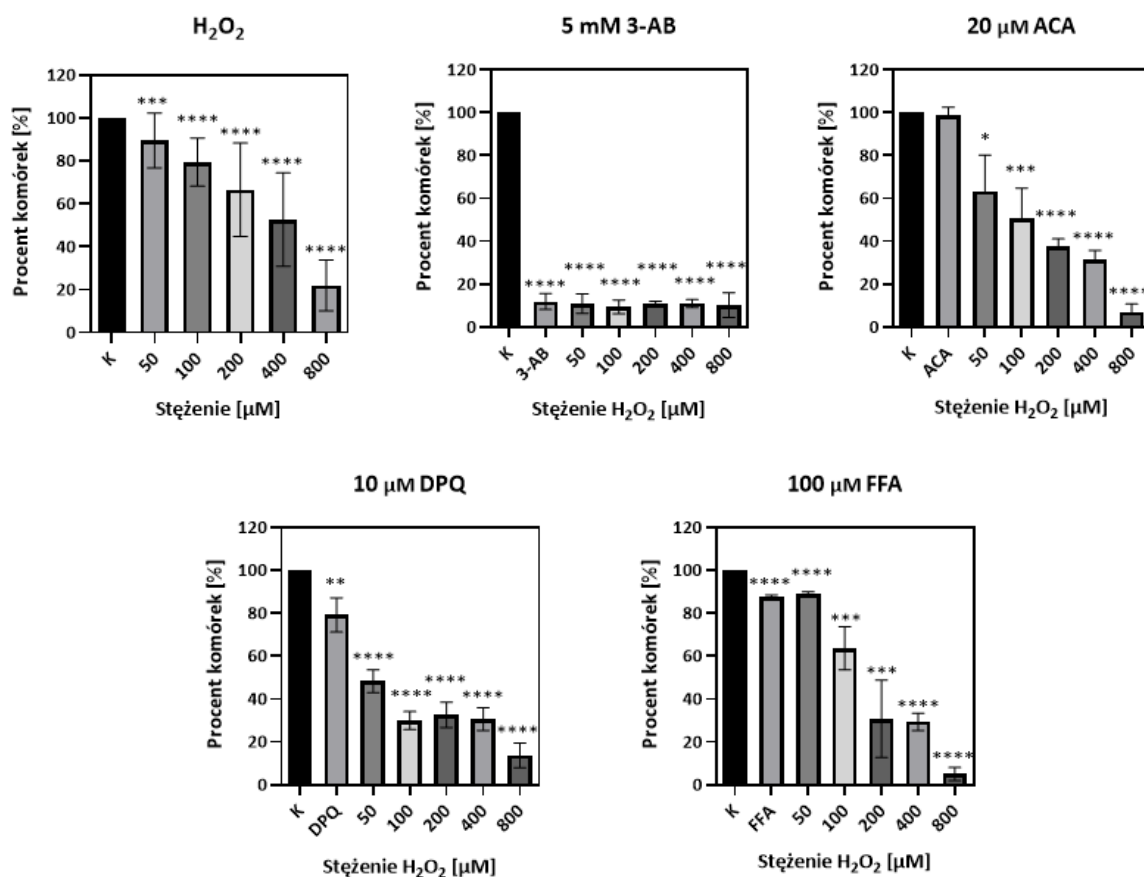
Stężenia inhibitorów TRPM2 (ACA i FFA) albo PARP (3-AB i DPQ) wybrano na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz badań eksperymentalnych. Jako strategię badawczą przyjęto inhibicję kanału TRPM2 albo PARP rozpoczętą 30 min przed potraktowaniem komórek nadtlaniem wodoru. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w warunkach standardowych oraz komórki potraktowane wyłącznie pojedynczymi związkami, tj. nadtlaniem wodoru albo inhibitorami TRPM2 albo PARP. Dla poszczególnych inhibitorów wybrano następujące stężenia: ACA – 10 i 20 μ M, FFA – 50 i 100 μ M, 3-AB – 2,5 i 5 mM oraz DPQ – 1 i 10 μ M. Wszystkie zastosowane inhibitory powodowały niewielkie, lecz istotne statystycznie, obniżenie przeżywalności komórek linii EA.hy926 względem kontroli. Dla poszczególnych związków i stężeń, odsetek komórek żywych wynosił odpowiednio: ACA – 95 i 99%, FFA – 92 i 88%, 3-AB – 38 i 12%, DPQ – 90 i 79%. Jedynie w przypadku 20 μ M ACA zmiana nie była istotna statystycznie względem kontroli. Ze względu na wysoką cytotoksyczność z dalszych badań całkowicie wyeliminowano inhibitor 3-AB oraz wyższe stężenia inhibitorów: ACA, FFA i DPQ. Średnie wartości procentowe uzyskanych wyników zostały przedstawione w **Tabeli IV** oraz na **Rycinach 13 i 14**. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach ponownie wybrano 100 μ M stężenie nadtlenu wodoru.

Tabela IV. Macierz przedstawiająca średnią procentową żywotność komórek linii EA.hy926. Intensywność koloru czerwonego odzwierciedla nasilenie indukowanych zmian w stosunku do nietraktowanej kontroli, która wyznaczyła teoretyczną wartość 100% żywotności. 3-AB – 3-aminobenzamid, ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ - 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy

Inhibitor		50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M	800 μ M
		H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
H ₂ O ₂	-	90	79	67	53	22
2,5 mM						
3-AB	38	32	31	28	20	24
5 mM						
3-AB	12	11	9	11	11	10
10 μ M						
ACA	95	91	85	77	63	11
20 μ M						
ACA	99	63	51	37	32	7
1 μ M						
DPQ	90	90	88	82	71	24
10 μ M						
DPQ	79	48	30	33	31	14
50 μ M						
FFA	92	92	85	76	49	7
100 μ M						
FFA	88	89	64	31	29	5



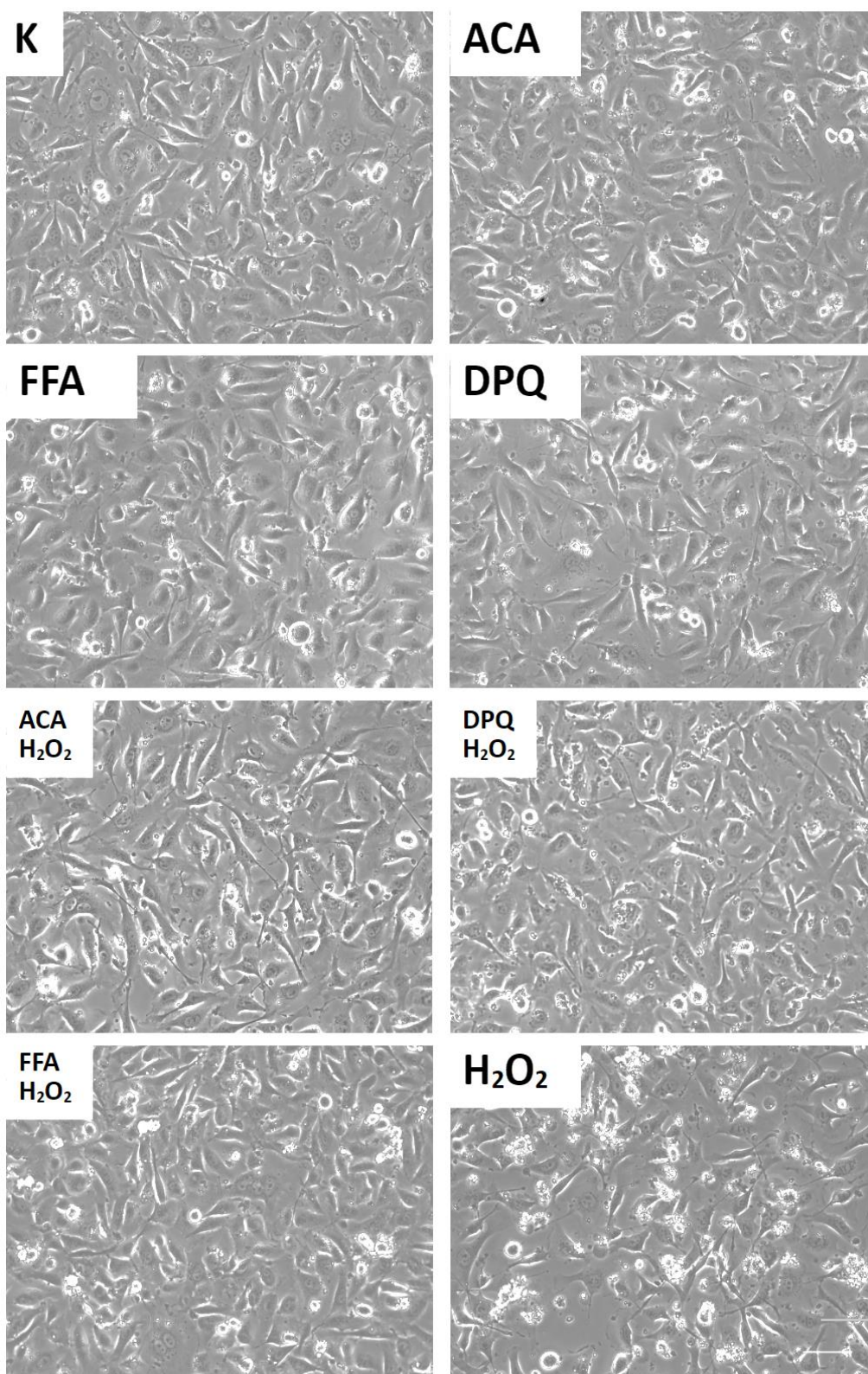
Rycina 13. Wyniki testu MTT dla komórek linii EA.hy926 traktowanych niższym zakresem stężeń inhibitorów TRPM2 i PARP. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. 3-AB – 3-aminobenzamid, ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.



Rycina 14. Wyniki testu MTT dla komórek linii EA.hy926 traktowanych wyższym zakresem stężeń inhibitorów TRPM2 i PARP. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. 3-AB – 3-aminobenzamid, ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPG – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

4.2.2 Ocena morfologii komórek

Obserwacja mikroskopowa niewybarwionych komórek linii EA.hy926 techniką kontrastowo-fazową pozwoliła na wstępną ocenę ich stanu i kondycji. W przypadku komórek kontrolnych zaobserwowano ścisły układ rozplaszczonych komórek oraz liczne figury podziałowe. Podobnym obrazem morfologicznym charakteryzowały się komórki potraktowane wyłącznie inhibitorami TRPM2 lub PARP. Przeciwnie, komórki hodowane w obecności nadtlenu wodoru charakteryzował niższy stopień konfluencji. Widoczne były również liczne komórki odklejone od powierzchni dna naczynia hodowlanego o cechach morfologicznych apoptozy (obkurczenie, obecność ciałek apoptotycznych). Co więcej, komórki potraktowane nadtlaniem wodoru charakteryzowały się wzmożoną częstością formowania włókien retrakcyjnych oraz zdolnością do tworzenia struktur przypominających pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. W przypadku komórek potraktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 i PARP przez 30 min, a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez okres 24 h, widoczne były liczne figury podziałowe, a jedynie pojedyncze komórki wykazywały cechy komórek umierających na drodze apoptozy. Nie zaobserwowano istotnych różnic w gęstości zarówno wobec komórek kontrolnych, jak i komórek potraktowanych wyłącznie inhibitorami TRPM2 i PARP. Jedynie w komórkach wstępnie potraktowanych ACA, a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru zaobserwowano wzmożone formowanie się włókien retrakcyjnych. Reprezentatywne zdjęcia wykonane z wykorzystaniem mikroskopu kontrast-fazowego obrazujące morfologię niewybarwionych komórek z poszczególnych grup badanych przedstawiono na **Rycinie 15**.



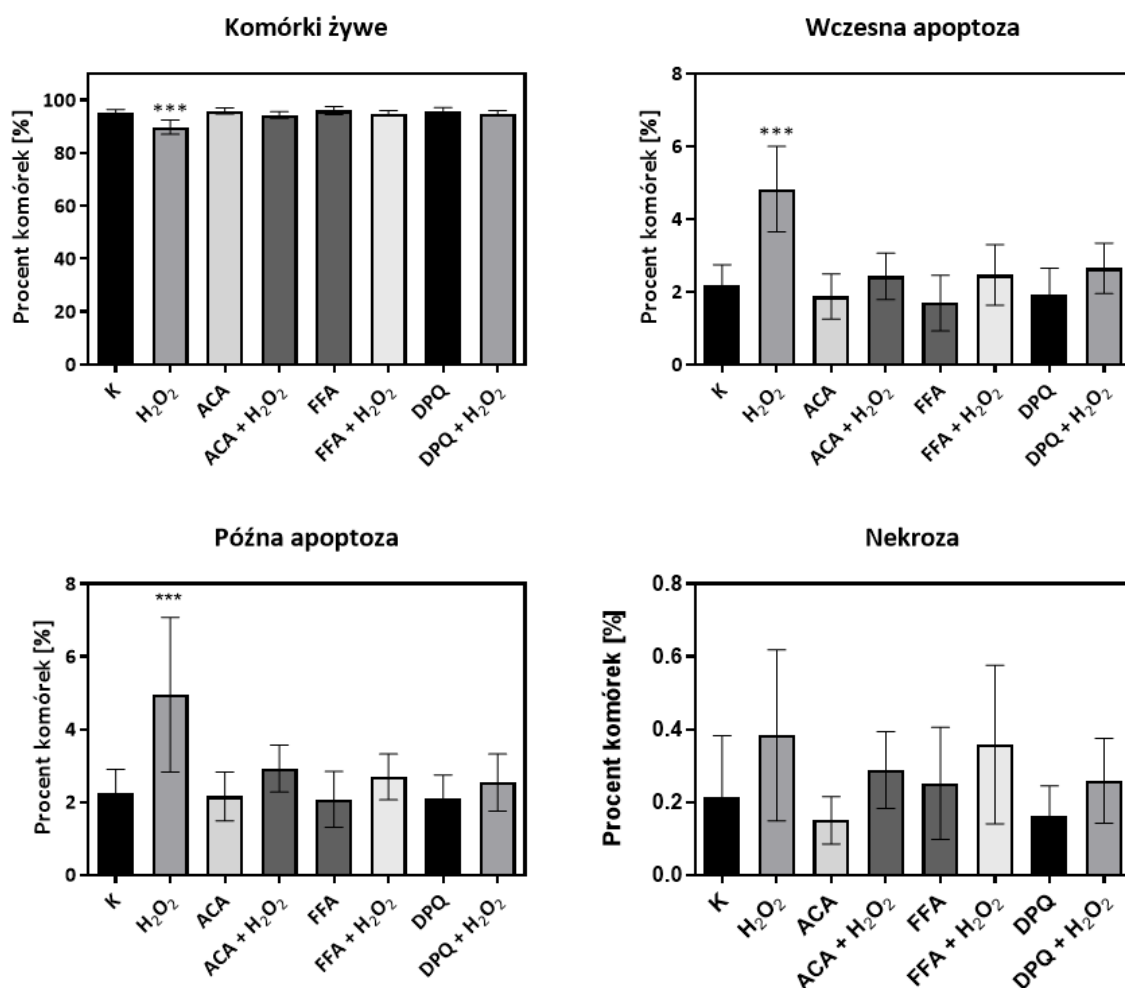
Rycina 15. Obraz morfologiczny komórek linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola. Bar = 100 μm .

4.2.3 Ocena rodzaju indukowanej śmierci komórek

Podwójne znakowanie AV/PI wykazało, że traktowanie komórek linii EA.hy926 100 μ M nadtlaniem wodoru przez 24 h indukuje istotny statystycznie wzrost odsetka komórek apoptotycznych (z 4,4 do 9,8 %) oraz spadek odsetka komórek żywych (z 95,4 do 89,7%) w porównaniu do kontroli. Inkubacja komórek z ACA, FFA oraz DPQ nie powodowała istotnych zmian. Podobne wyniki zaobserwowano również dla komórek potraktowanych inhibitorami 30 min a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez okres 24 h. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian ani w porównaniu do poszczególnych prób traktowanych wyłącznie inhibitorami, ani do komórek kontrolnych. Sugeruje to, że wszystkie z wybranych inhibitorów są w stanie hamować wpływ stresu oksydacyjnego w zakresie indukcji śmierci komórek. Średnie wartości procentowe uzyskane dla poszczególnych grup komórek przedstawiono w **Tabeli V** oraz na **Rycinie 16**.

Tabela V. Średnie wartości procentowe rodzajów indukowanej śmierci komórki. Kolorem czerwonym zaznaczono wyniki istotne statystycznie względem kontroli. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ - 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

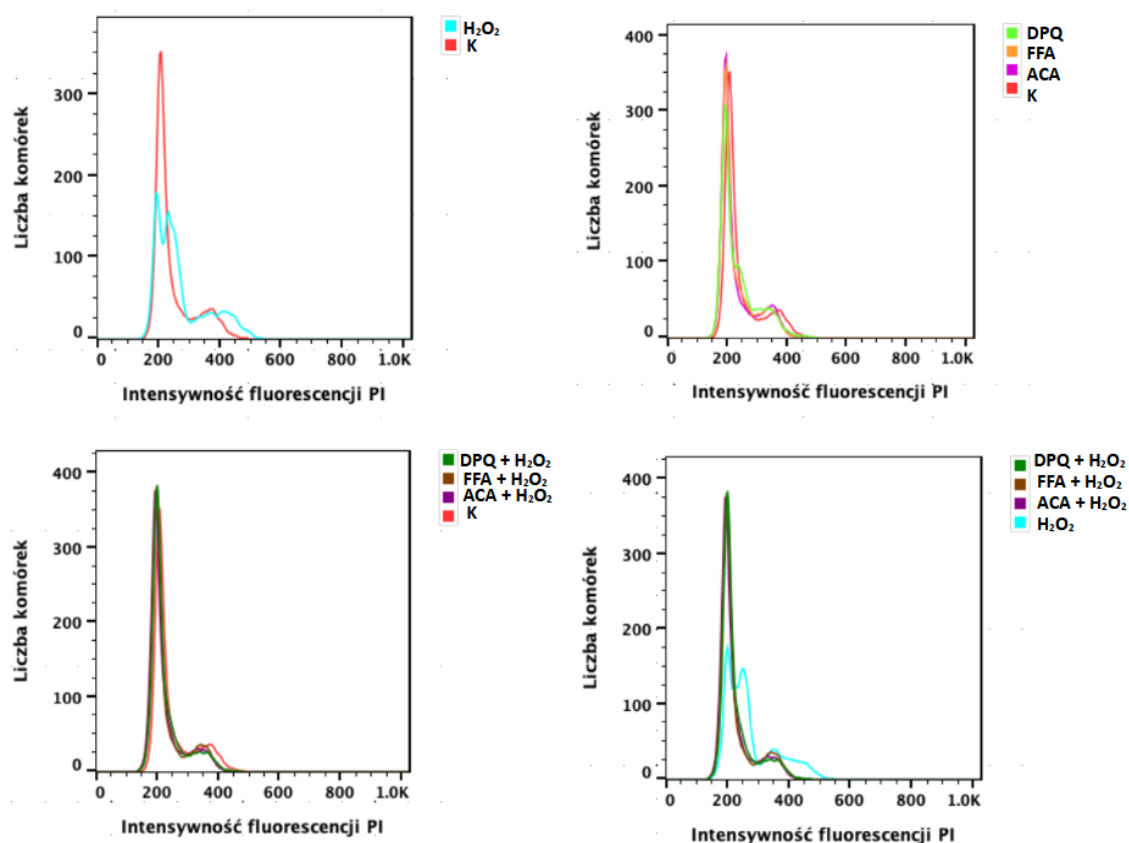
Grupa komórek	Żywe	Wczesna apoptoza	Późna apoptoza	Całkowita apoptoza	Nekroza
K	95,35	2,2	2,24	4,43	0,21
H ₂ O ₂	89,71	4,82	4,95	9,77	0,38
ACA	95,83	1,87	2,16	4,03	0,15
ACA + H ₂ O ₂	94,28	2,42	2,93	5,35	0,29
FFA	95,97	1,69	2,08	3,77	0,25
FFA + H ₂ O ₂	94,49	2,46	2,69	5,16	0,36
DPQ	95,83	1,92	2,09	4,01	0,16
DPQ + H ₂ O ₂	94,56	2,65	2,54	5,19	0,26



Rycina 16. Rodzaj indukowanej śmierci komórek linii EA.hy926. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ względem kontroli. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ - 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

4.2.4 Ocena rozkładu faz cyklu komórkowego w komórkach żywych

Cytometryczna ocena intensywności fluorescencji PI w obecności RNAz wykazała zmianę w zakresie rozkładu cyklu komórek traktowanych 100 μ M nadtlaniem wodoru przez 24 h względem komórek kontrolnych. Pod wpływem działania nadtlenu wodoru obserwowano obniżenie ilości komórek charakteryzujących się intensywnością fluorescencji PI typową dla fazy G1 na rzecz wzrostu populacji komórkowej charakteryzującej się zawartością DNA specyficzną dla komórek pomiędzy fazą G1 a G2. Co więcej, zaobserwowano wzrost ilości komórek o zawartości DNA wyższej niż 4N, co cechuje komórki poliploidalne. Inkubacja komórek z ACA i FFA nie powodowała widocznych zmian w zakresie rozkładu cyklu komórkowego w odniesieniu do kontroli. Natomiast w przypadku grupy hodowanej w obecności DPQ, zaobserwowano niewielki wzrost ilości komórek o zawartości DNA specyficznej dla tych, które znajdują się pomiędzy fazą G1 a G2 cyklu. Nie potwierdzono zmian w zakresie rozkładu cyklu komórek potraktowanych ACA, FFA oraz DPQ a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h w odniesieniu do komórek kontrolnych. Sugeruje to, że wszystkie z wybranych inhibitorów znoszą działanie nadtlenu wodoru w zakresie zmiany w rozkładzie cyklu komórkowego. Reprezentatywne histogramy prezentujące rozkłady cyklu komórkowego przedstawiono na **Rycinie 16**.



Rycina 16. Rozkład faz cyklu komórkowego komórek linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolin, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola, PI – jodek propidyny.

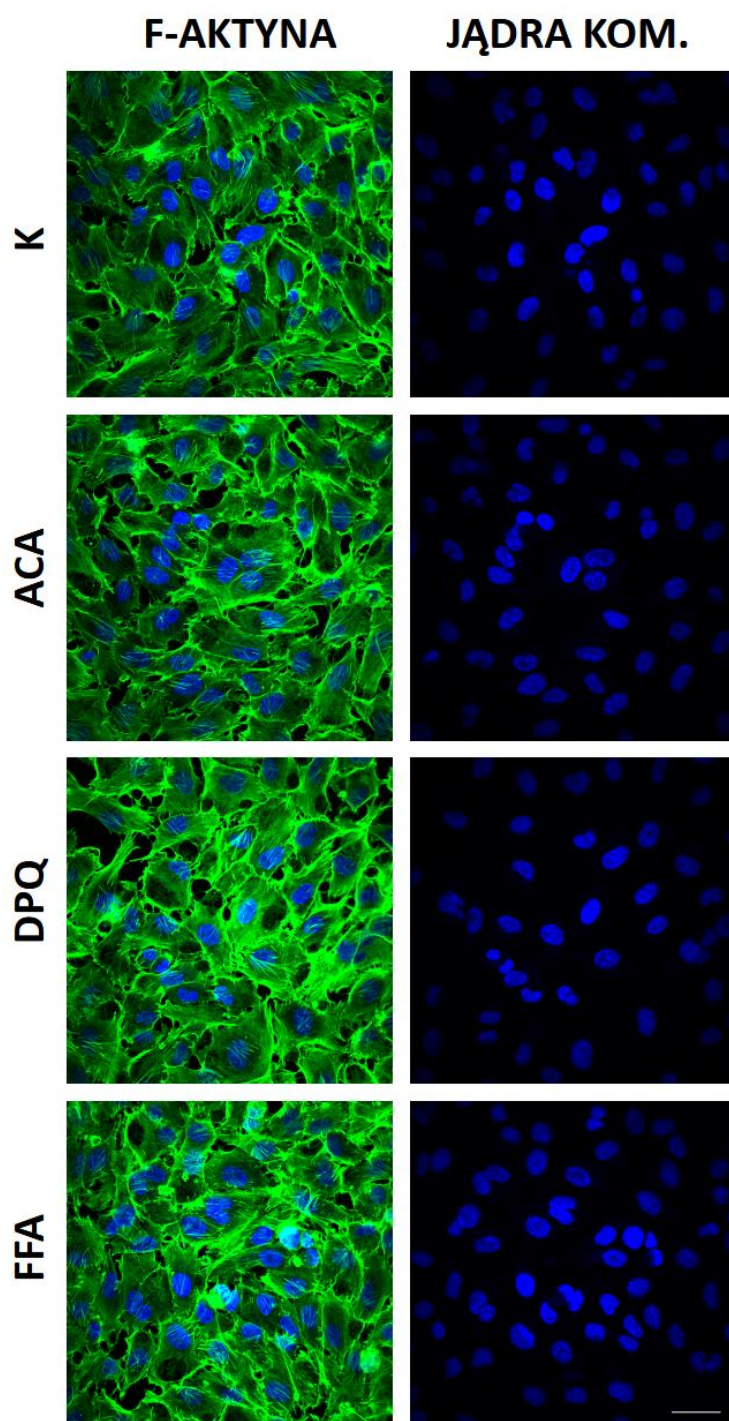
4.2.5 Ocena fluorescencji

4.2.5.1 F-aktyna i jądra komórkowe

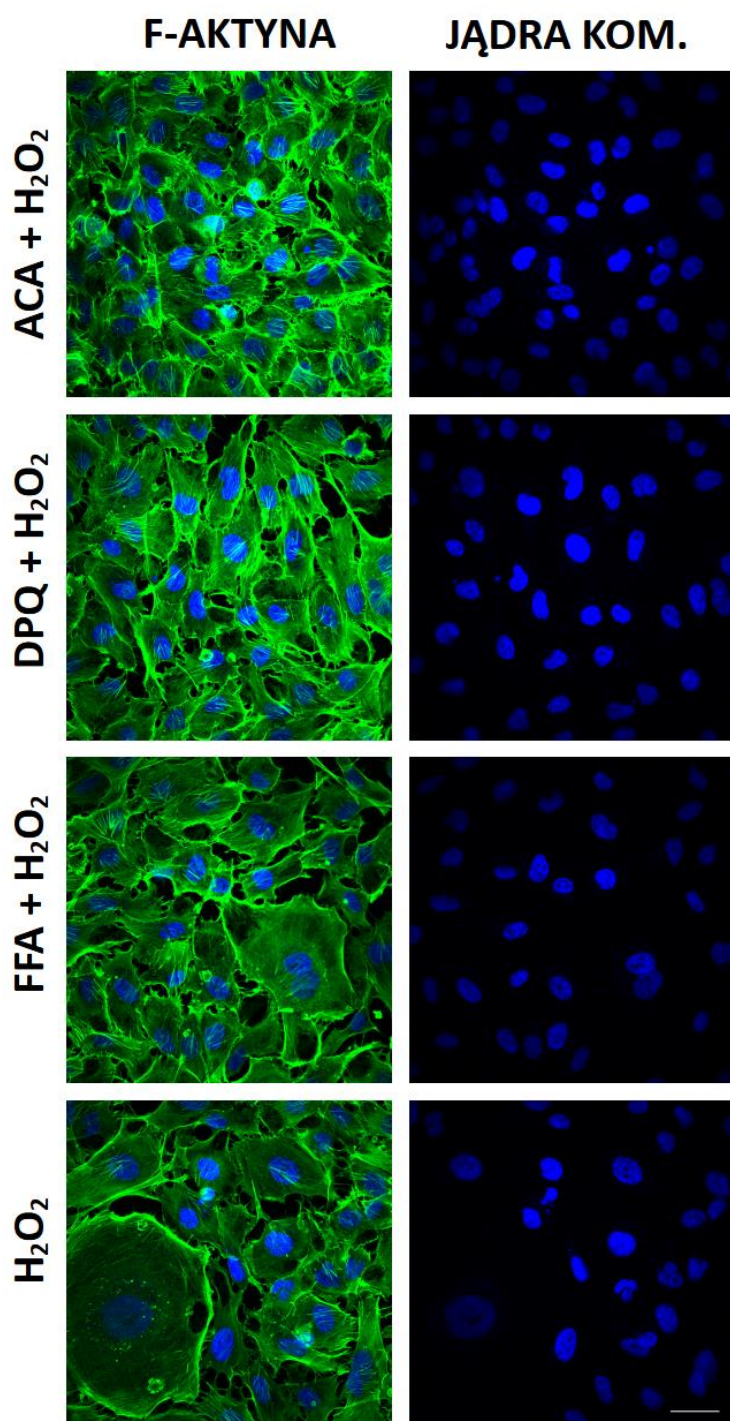
Komórki kontrolne charakteryzowały się gęstym, zwartym układem komórek bez widocznych nadmiernie formujących się przestrzeni międzykomórkowych. Większość jąder komórkowych charakteryzowało się owalnym kształtem. Komórki z reguły posiadały jedno lub dwa jądra komórkowe, co jest zgodne z charakterystyką linii EA.hy926. Podobnym fenotypem charakteryzowały się komórki traktowane wybranymi inhibitorami kanału TRPM2 i enzymu PARP. Nie zaobserwowano większych różnic pomiędzy wspomnianymi grupami również w zakresie lokalizacji i organizacji F-aktyny, poziomu jej fluorescencji, czy obrazu morfologicznego jąder komórkowych znakowanych DAPI. Przykładowe zdjęcia obrazujące wyniki fluorescencyjnego znakowania F-aktyny oraz DNA w opisanych powyżej komórkach przedstawiono na **Rycinie 17**.

Komórki potraktowane 100 μ M nadtlenkiem wodoru przez okres 24 h charakteryzowały się niższą konfluencją i obecnością większych przestrzeni międzykomórkowych. Dodatkowo widoczne były liczne oznaki nieprawidłowości w strukturze jąder komórkowych, tj. multinukleacja czy zmiany w ich wielkości. Obecność nadmiarowych jąder komórkowych oraz ich nieprawidłowy rozmiar były charakterystyczne dla komórek, których średnica dochodziła do nawet 300 μ m. Ponadto w komórkach tych widoczna była znaczna reorganizacja przestrzenna F-aktyny przejawiająca się akumulacją białka w korowej części cytoplazmy. Zaobserwowano również komórki o fenotypie charakterystycznym dla apoptozy, tj. obkurczone, z nieregularną powierzchnią i skondensowaną chromatyną lub jądrami resztkowymi. Potwierdzono także obecność licznych włókien retrakcyjnych. W przypadku komórek potraktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 i PARP 30 min przed właściwym traktowaniem nadtlenkiem wodoru przez 24 h, zaobserwowano również drobne zmiany w obrębie jąder komórkowych, tj. głównie obecności dodatkowych mikrojąder. Zmiany te nie były jednak tak nasilone jak w przypadku komórek potraktowanych wyłącznie nadtlenkiem wodoru. Dodatkowo nie zaobserwowano obecności olbrzymich komórek, których obecność potwierdzono w próbach komórek hodowanych w obecności samego nadtlenku wodoru. Co więcej, widocznych było wyraźnie mniej komórek o cechach sugerujących śmierć na drodze apoptozy, a gęstość monowarstwy była zbliżona do tej

obserwowanej w kontroli. Reprezentacyjne zdjęcia przedstawiające wyniki fluorescencyjnego znakowania F-aktyny i DNA w opisanych powyżej komórkach przedstawiono na **Rycinie 18**.



Rycina 17. Znakowanie F-aktyny oraz jąder komórkowych w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – nietraktowana kontrola. Bar = 100 μ m.



Rycina 18. Znakowanie F-aktyny oraz jąder komórkowych w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – nietraktowana kontrola. Bar = 100 μ m.

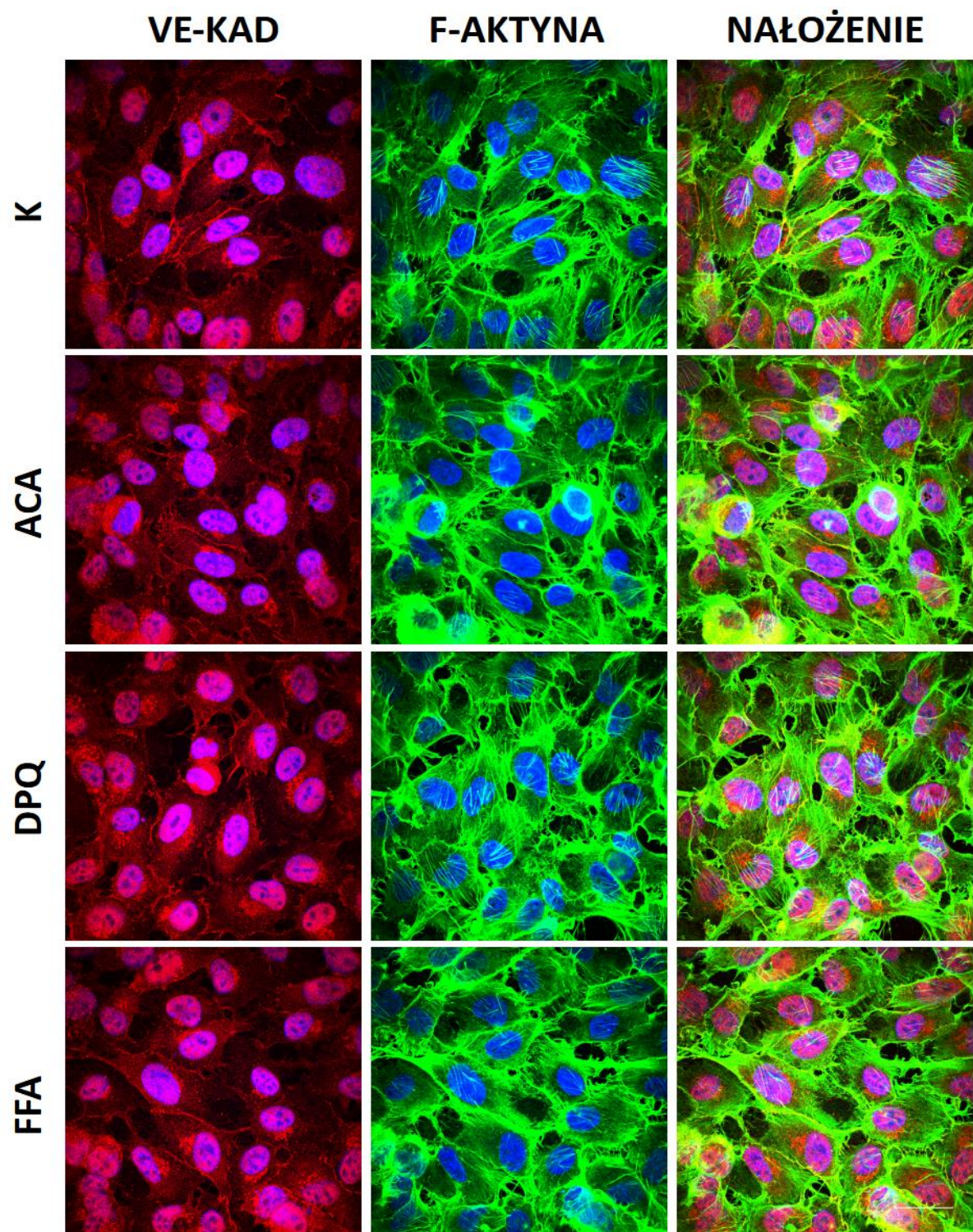
4.2.5.2 Białka połączeniowe (VE-kadheryna, β -katenina, ZO-1)

W celu oceny zmian w obrębie regionów wzajemnego kontaktu pomiędzy sąsiadującymi komórkami wykorzystano immunofluorescencyjne znakowanie białek wchodzących w skład połączeń zwierających (VE-kadheryna, β -katenina) oraz zamykających (ZO-1). Pozytywny wynik barwienia VE-kadheryny we wszystkich badanych grupach komórek potwierdził śródbłonkowy charakter komórek linii EA.hy926. Najsilniejszy sygnał fluorescencji dla tego białka widoczny był w regionie połączeniowym, ale również na terenie jąder komórkowych i dookoła nich, prawdopodobnie w obrębie siateczki śródplazmatycznej. W przypadku komórek kontrolnych oraz komórek traktowanych wyłącznie inhibitorami TRPM2 i PARP, sygnał fluorescencyjny odpowiadający VE-kadherynie widoczny był głównie na granicy komórka-komórka i przyjmował ciągły wzór. Podobną lokalizację i ciągłość organizacyjną VE-kadheryny w obrębie regionów połączeniowych obserwowano w przypadku komórek potraktowanych inhibitorami przez 30 min, a następnie traktowanych nadtlaniem wodoru przez okres 24 h. Największa zmiana dotyczyła komórek traktowanych wyłącznie nadtlaniem wodoru. Fluorescencja VE-kadheryny w regionie połączeniowym była słabiej widoczna, a jej rozkład był bardziej punktowy. Dla tej grupy komórek najsilniejszą fluorescencję VE-kadheryny zaobserwowano w regionie okołojądrowym, co sugeruje możliwość jej translokacji z obszarów połączeń międzykomórkowych. Zmiana lokalizacji VE-kadheryny jest jednym ze sposobów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej związanej z rozkładaniem połączeń międzykomórkowych. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające fluorescencyjne znakowania VE-kadheryny oraz F-aktyny przedstawiono na **Rycinach 19 i 20**.

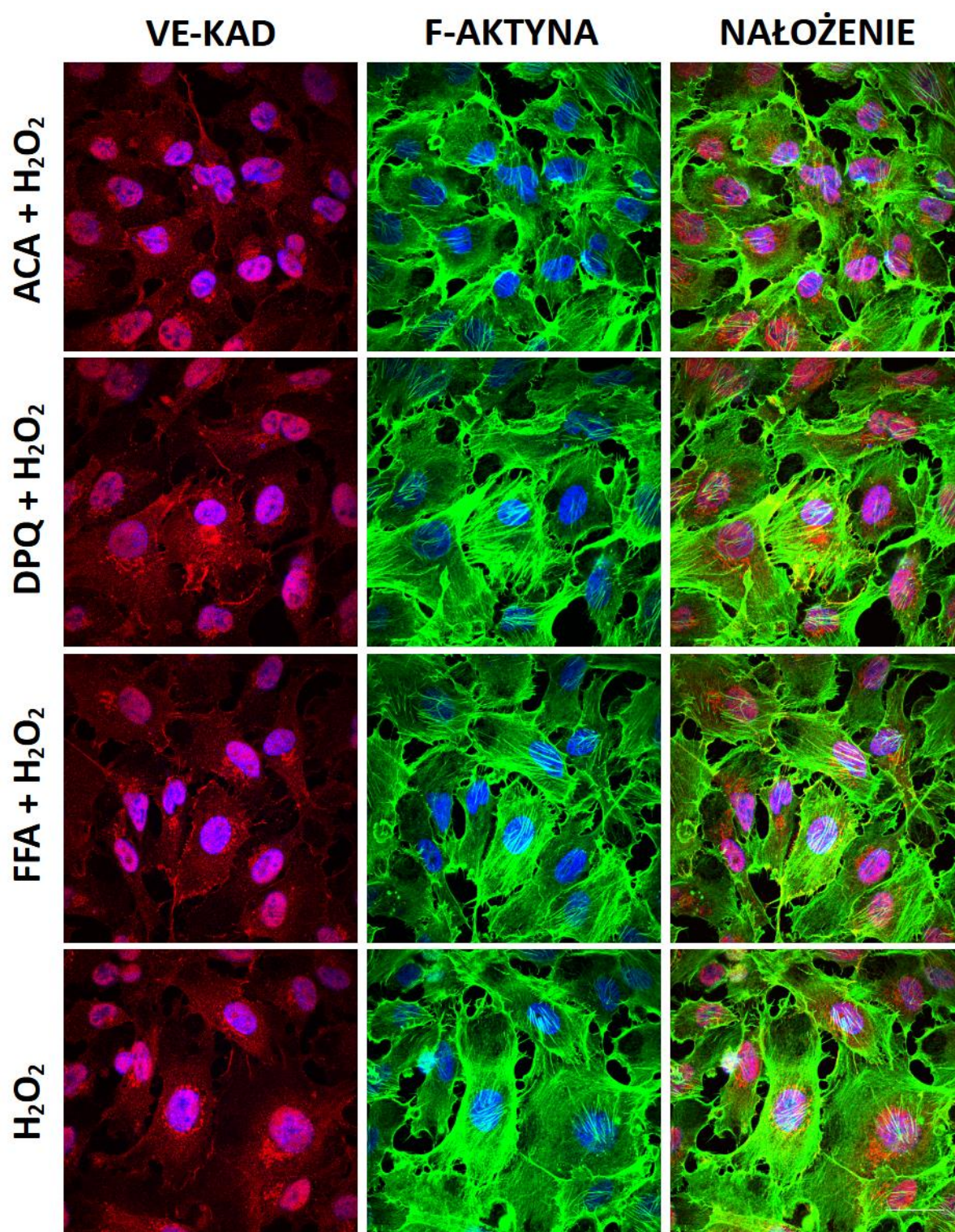
W przypadku oceny lokalizacji β -kateniny, najsilniejszy sygnał jej fluorescencji obserwowano w obrębie ciągłych miejsc kontaktu pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Wyjątek stanowiły komórki poddane działaniu wyłącznie nadtlenu wodoru, w których zaobserwowano obniżenie widocznej intensywności fluorescencji oraz ziarnisty rozkład β -kateniny. Dodatkowo preparaty te charakteryzowała duża ilość sygnałów pozytywnych zlokalizowanych poza komórkami, co mogło być spowodowane wzmożonym uwalnianiem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych albo pozostałością gruzu komórkowego. Jest to o tyle prawdopodobne, że zewnątrzkomórkowa fluorescencja β -kateniny często kolokalizowała z fluorescencją F-aktyny. Intensywniejszy sygnał fluorescencyjny widoczny był również w obrębie włókien retrakcyjnych oraz komórek o cechach fenotypowych apoptozy. Otrzymane

wyniki wskazują na zależną od nadtlenu wodoru dezintegrację struktur połączeniowych, w których skład wchodzi VE-kadheryna oraz β -katenina. Wykazano również, że zarówno inhibitory TRPM2 albo PARP są w stanie przeciwdziałać tym skutkom. Reprezentacyjne zdjęcia przedstawiające fluorescencyjne znakowanie β -kateniny oraz F-aktyny w komórkach przedstawiono na **Rycinach 21 i 22**.

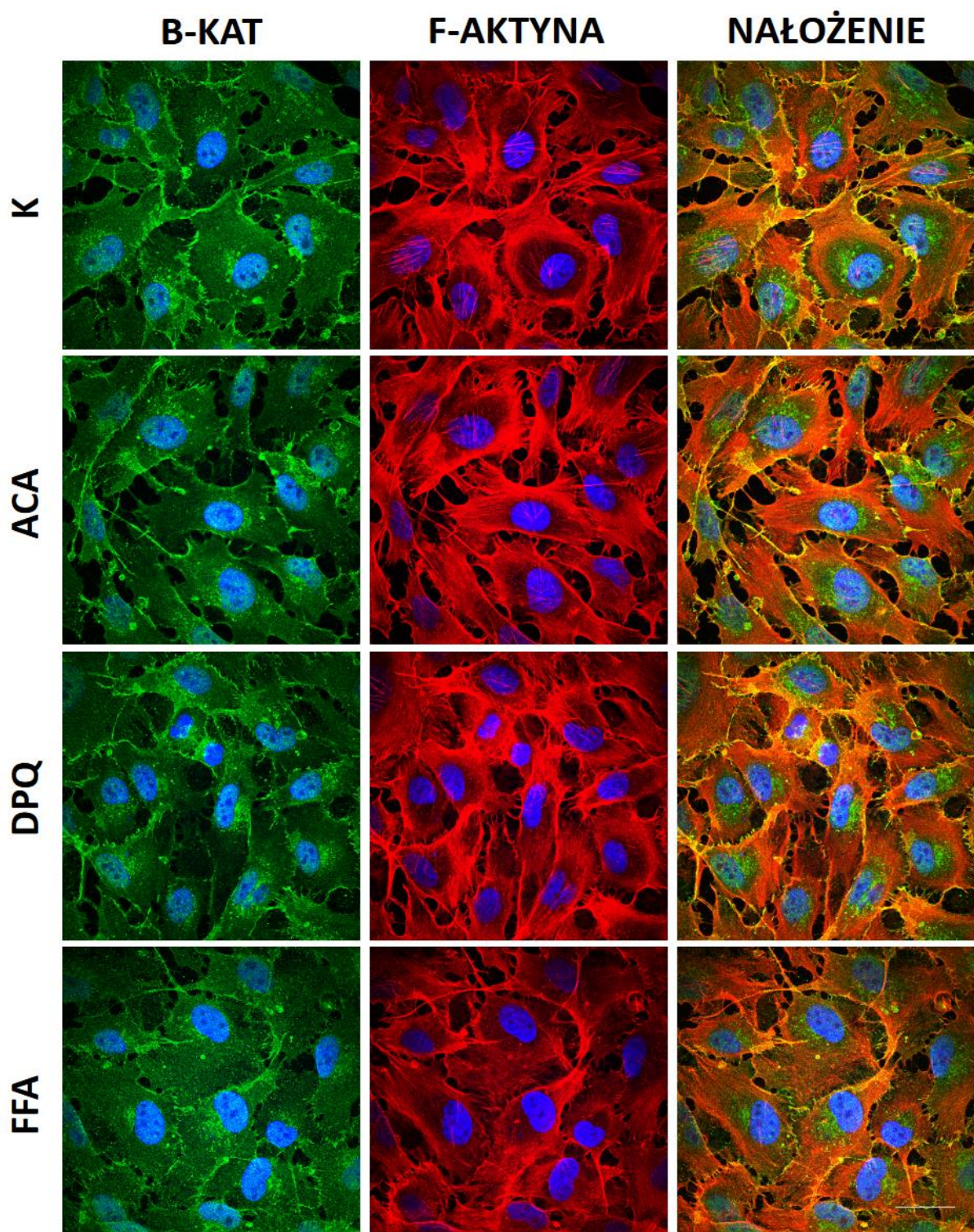
Podobne rezultaty uzyskano dla białka wchodzącego w skład połączeń zamykających, tj. ZO-1. Fluorescencyjne znakowanie tego białka wykazało zależną od nadtlenu wodoru zmianę w zakresie wzorca lokalizacji i widocznej intensywności fluorescencji. W porównaniu do nietraktowanej kontroli, rozkład sygnałów pozytywnych był bardziej punktowy, natomiast ogólny poziom fluorescencji był zauważalnie niższy. Ponownie, w grupach traktowanych poszczególnymi inhibitorami TRPM2 albo PARP oraz nadtlaniem wodoru, wynik znakowania był bardziej zbliżony do komórek kontrolnych, z najintensywniejszą fluorescencją w obrębie miejsc kontaktu pomiędzy sąsiadującymi komórkami oraz ciągłym rozkładem tego sygnału. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające fluorescencyjne znakowanie ZO-1 oraz F-aktyny przedstawiono na **Rycinach 23 i 24**.



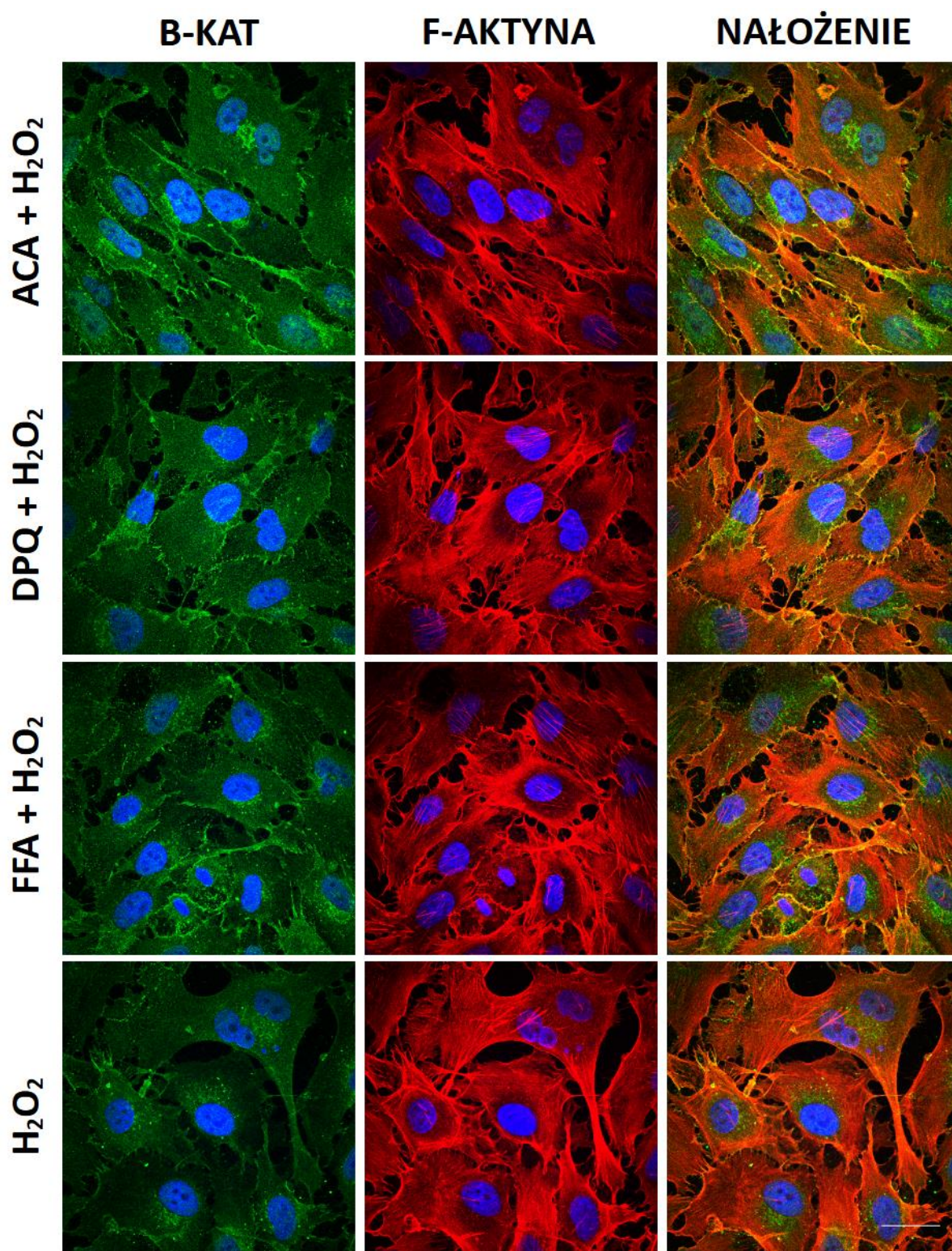
Rycina 19. Fluorescencyjne znakowanie VE-kadheryny (czerwony), F-aktyny (zielony) i DNA (niebieski) w komórkach EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPO – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola, VE-kad – VE-kadheryna. Bar = 100 μ m.



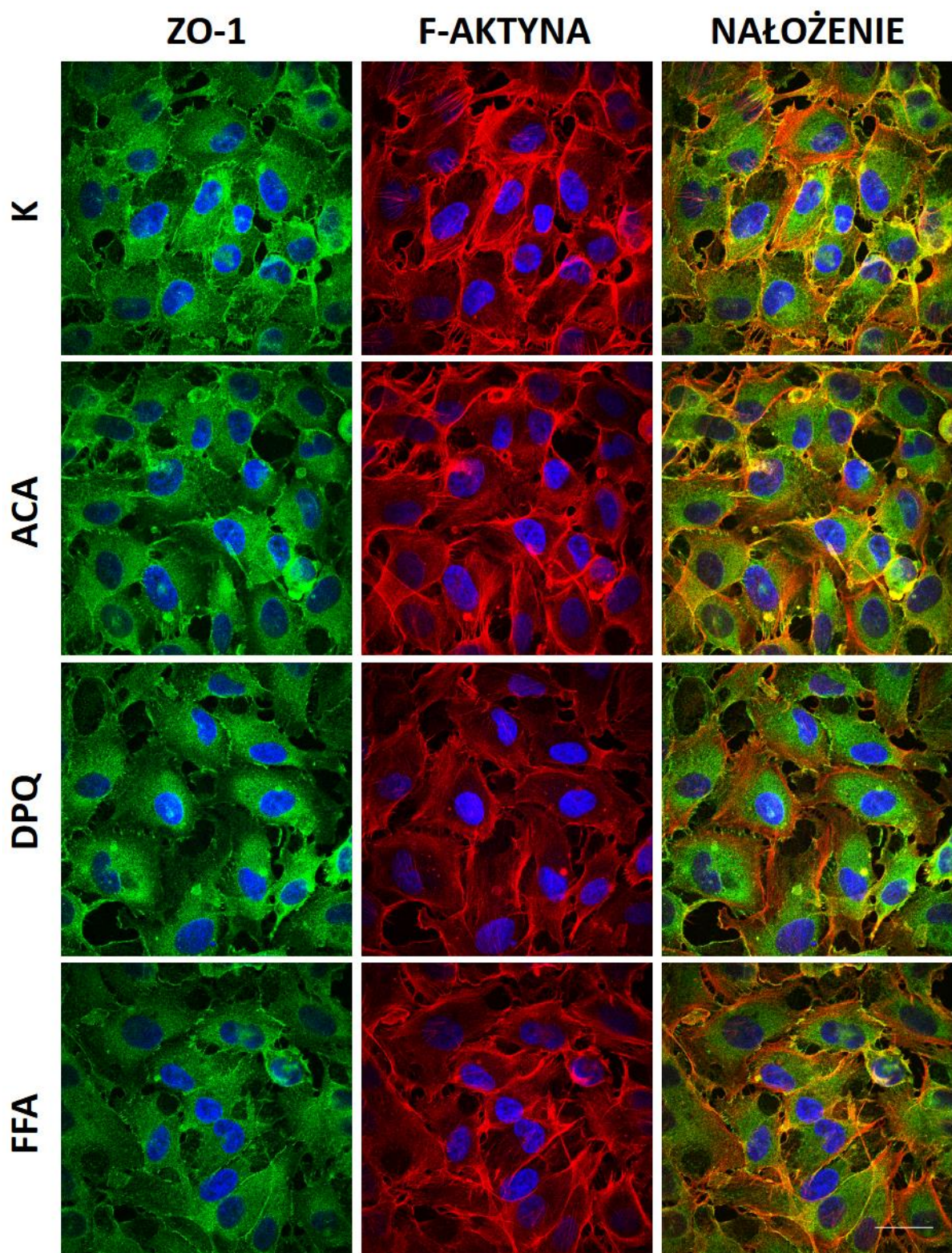
Rycina 20. Fluorescencyjne znakowanie VE-kadheryny (czerwony), F-aktyny (zielony) oraz DNA (niebieski) w komórkach EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, VE-kad – VE-kadheryna. Bar = 100 μ m.



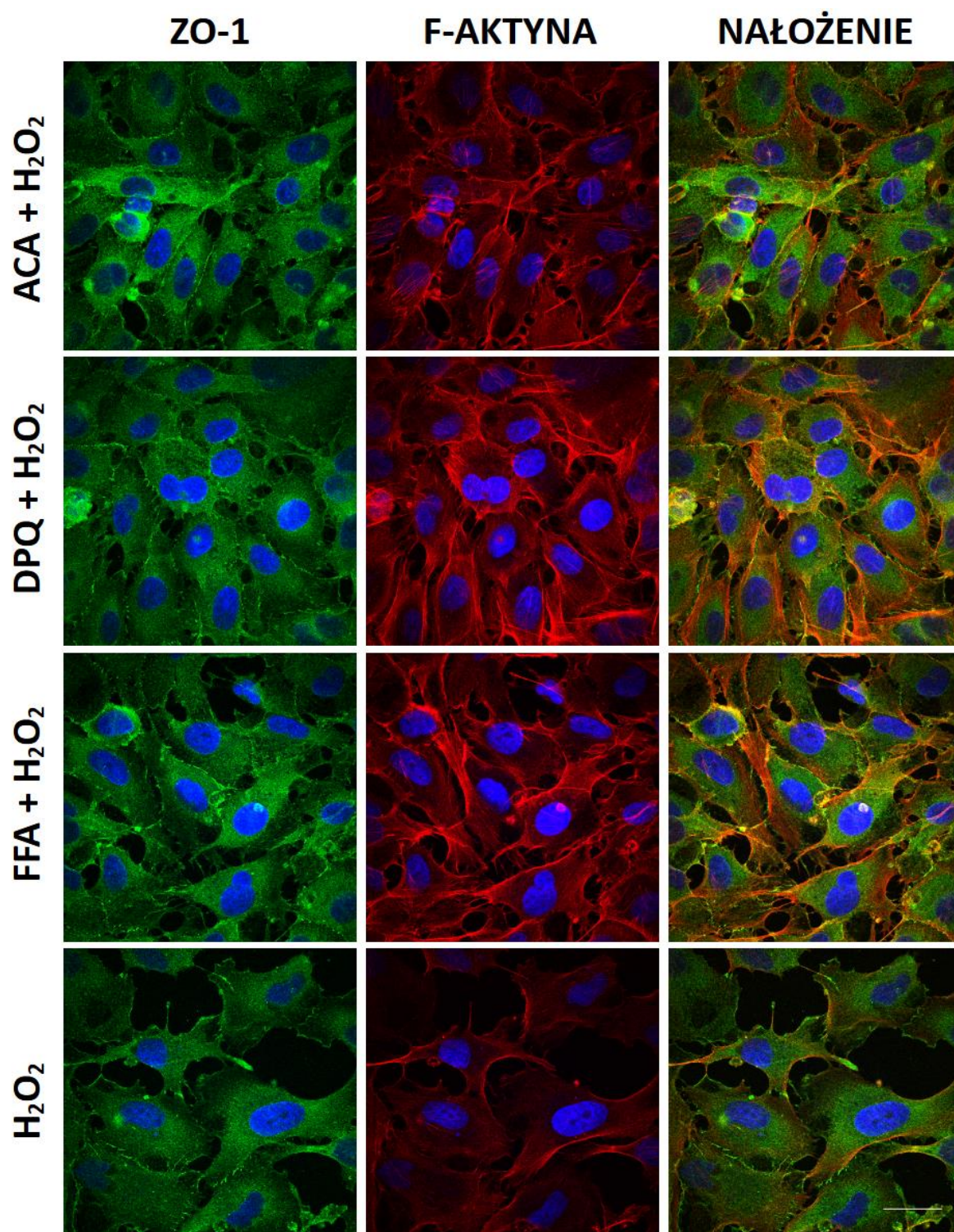
Rycina 21. Fluorescencyjne znakowanie β -kateniny (zielony), F-aktyny (czerwony) i DNA (niebieski) w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, B-KAT – β -katenina, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola. Bar = 100 μ m.



Rycina 22. Fluorescencyjne znakowanie β -kateniny (zielony), F-aktyny (czerwony) oraz DNA (niebieski) w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, B-KAT – β -katenina, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy. Bar = 100 μ m.



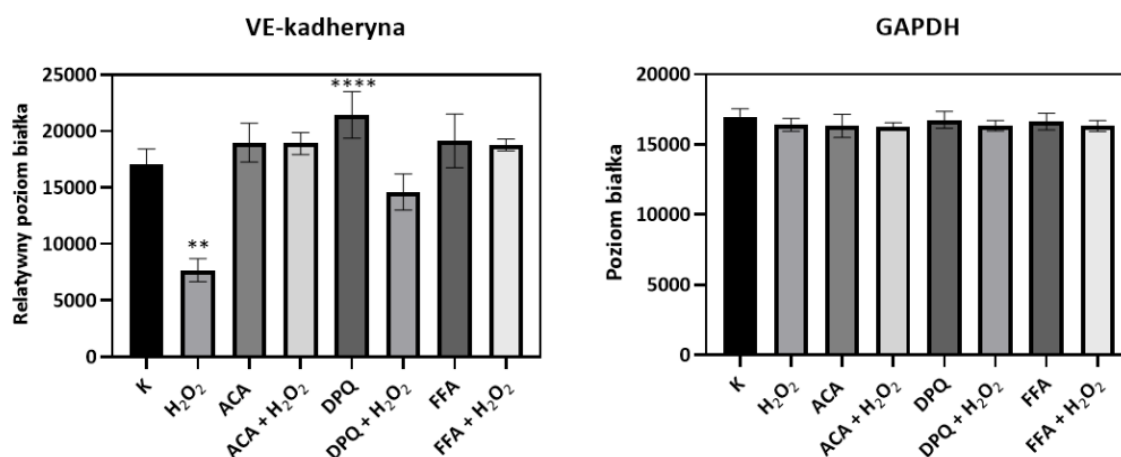
Rycina 23. Fluorescencyjne znakowanie ZO-1 (zielony), F-aktyny (czerwony) oraz DNA (niebieski) w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K - kontrola, ZO-1 – zonula occludens 1. Bar = 100 μ m.



Rycina 24. Fluorescencyjne znakowanie ZO-1 (zielony), F-aktyny (czerwony) oraz DNA (niebieski) w komórkach linii EA.hy926. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, ZO-1 – zonula occludens 1. Bar = 100 μ m.

4.2.6 Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny

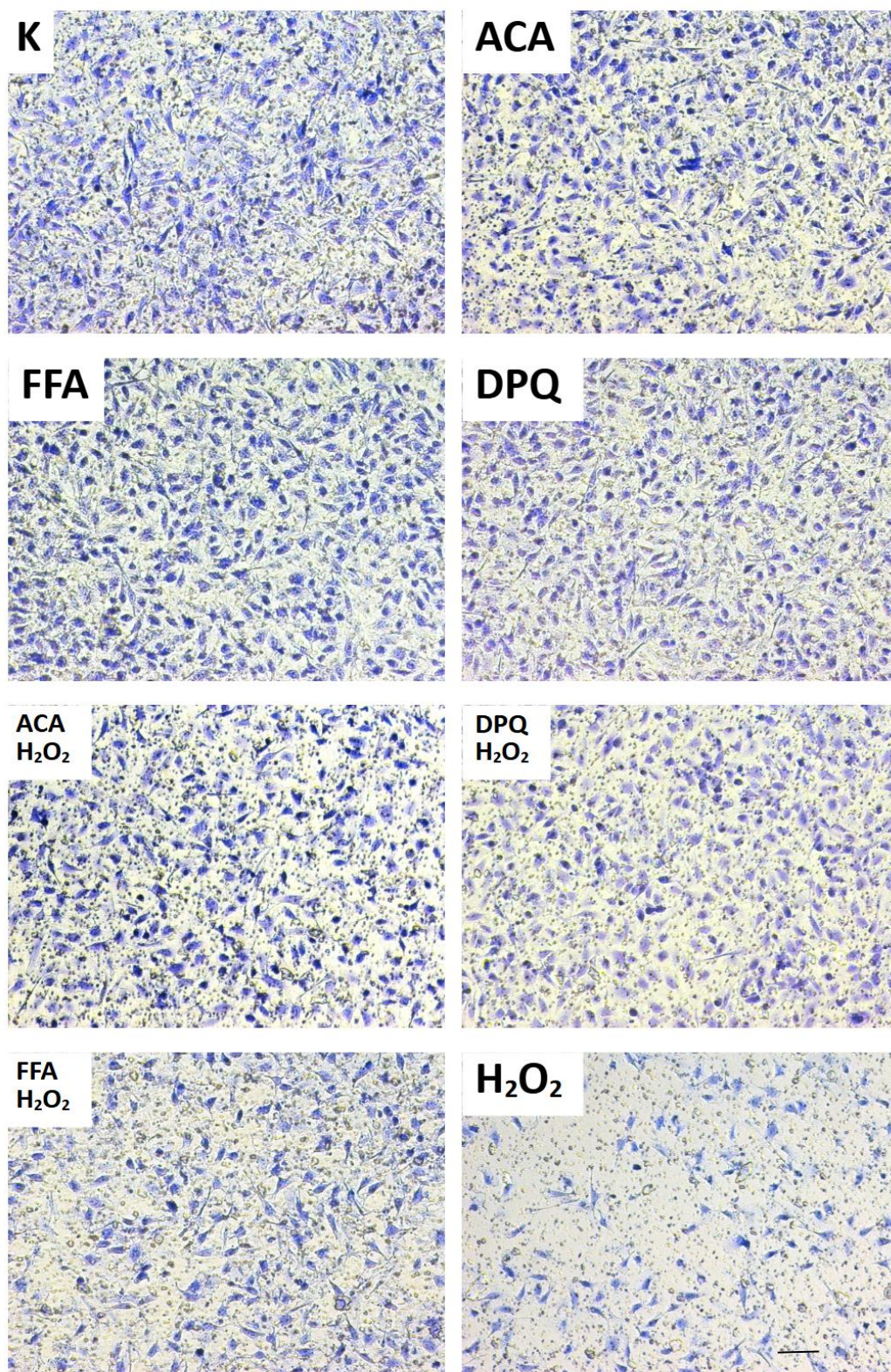
W celu określenia czy zmianom w strukturze regionu połączeniowego komórek linii EA.hy926 hodowanych w obecności nadtlenu wodoru i/lub wybranych inhibitorów TRPM2 albo PARP towarzyszą zmiany w ekspresji VE-kadheryny wykorzystano technikę Western Blot. Analiza potranslacyjnej ekspresji białek nie wykazała znaczących różnic w poziomie GAPDH pomiędzy badanymi próbkami. W przypadku VE-kadheryny nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian pomiędzy grupami komórek hodowanych w obecności ACA lub FFA a komórkami kontrolnymi. Z kolei dla komórek traktowanych DPQ potwierdzono znaczący wzrost poziomu VE-kadheryny. W przypadku komórek traktowanych samym nadtlakiem wodoru zaobserwowano znaczący spadek poziomu tego białka, co wskazuje na degradację struktur połączeń międzykomórkowych. Ponadto badanie potwierdziło, że inhibicja TRPM2 lub PARP wykazuje działanie protekcyjne w obrębie organizacji regionów połączeniowych pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Dla komórek wstępnie traktowanych DPQ, a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h zaobserwowano spadek poziomu VE-kadheryny, jednakże zmiana ta nie była znacząca względem kontroli. W przypadku grup traktowanych zgodnie ze schematem ACA + H₂O₂ oraz FFA + H₂O₂ poziom VE-kadheryny był zbliżony do tego obserwowanego w komórkach hodowanych w obecności poszczególnych inhibitorów. Sugeruje to o protekcyjnym działaniu inhibitorów względem negatywnego wpływu nadtlenu wodoru na strukturę regionów połączeń komórka-komórka. Wyniki potranslacyjnej oceny ekspresji VE-kadheryny techniką Western Blot zaprezentowano na **Rycinie 25**.



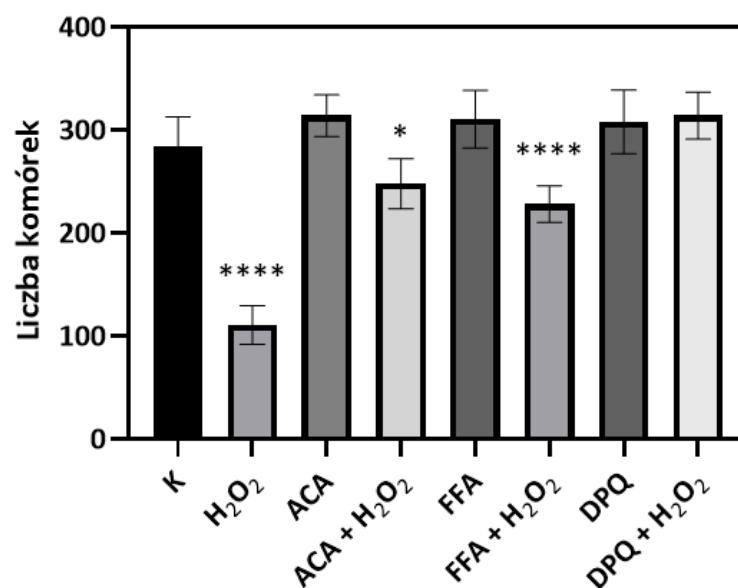
Rycina 25. Ocena potranslacyjnej ekspresji VE-kadheryny i GAPDH metodą Western Blot w komórkach linii EA.hy926. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ względem nietraktowanej kontroli. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

4.2.7 Ocena migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego

Przeprowadzona ocena migracji komórek EA.hy926 wykazała, że w przypadku kontroli ilość komórek zdolnych do migracji przez 3 μm pory wyniosła średnio 284. Grupy komórek hodowanych w obecności inhibitorów TRPM2 albo PARP charakteryzowały się wyższą średnią ilością komórek o wysokim potencjale migracyjnym (314, 308 i 310 odpowiednio dla ACA, DPQ i FFA). W przypadku komórek potraktowanych inhibitorami TRPM2 albo PARP na 30 min przed 24 h traktowaniem nadtlaniem wodoru, średnia ilość komórek wynosiła 248, 228, 314 (odpowiednio dla ACA + H_2O_2 , FFA + H_2O_2 i DPQ + H_2O_2). Świadczy to o skutecznym ograniczeniu negatywnego oddziaływania nadtlenu wodoru na migrację komórek, gdyż w przypadku komórek potraktowanych wyłącznie nadtlaniem wodoru średnia ilość komórek zdolnych do migracji przez 3 μm pory wyniosła 110. Co więcej, DPQ najskuteczniej zahamował ograniczenie migracji komórek spowodowane działaniem nadtlenu wodoru. Reprezentatywne zdjęcia powierzchni membran przedstawiono na **Rycinie 26**, natomiast wykres prezentujący średnią ilość komórek zliczonych z 40 zdjęć powierzchni membran na **Rycinie 27**. Dodatkowo wartości liczbowe oraz istotności statystyczne względem poszczególnych grup przedstawione zostały w **Tabeli VI**.



Rycina 26. Reprezentatywne zdjęcia powierzchni membran o średnicy porów 3 µm przedstawiające komórki o wysokim potencjale migracyjnym. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola. Bar = 100 µm.



Rycina 27. Średnia ilość komórek w pojedynczym widoku membran o średnicy porów 3 μm . Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Wskazane istotności statystyczne dotyczą zmian względem nietraktowanej kontroli. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

Tabela VI. Wyniki testu migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego.

Grupa	Średnia ilość komórek	Istotność statystyczna względem	
K	284,2	ACA + H ₂ O ₂	p = 0,0280
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
ACA	314,0	ACA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
DPQ	308,1	ACA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
FFA	310,4	ACA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
ACA + H ₂ O ₂	247,9	K	p = 0,0280
		ACA	p < 0,0001
		DPQ	p < 0,0001
		FFA	p < 0,0001
		DPQ + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
DPQ + H ₂ O ₂	314,1	ACA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
FFA + H ₂ O ₂	228,3	K	p < 0,0001
		ACA	p < 0,0001
		DPQ	p < 0,0001
		FFA	p < 0,0001
		DPQ + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		H ₂ O ₂	p < 0,0001
H ₂ O ₂	110,6	K	p < 0,0001
		ACA	p < 0,0001
		DPQ	p < 0,0001
		FFA	p < 0,0001
		ACA + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		DPQ + H ₂ O ₂	p < 0,0001
		FFA + H ₂ O ₂	p < 0,0001

ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.

4.2.8 Ocena migracji komórek z wykorzystaniem testu gojenia się ran

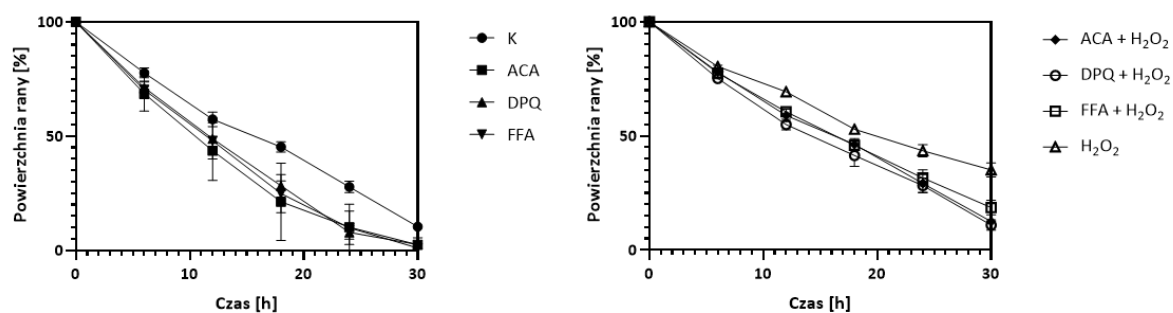
W przypadku komórek kontrolnych, powierzchnia rany zmniejszyła się do 78, 57, 45, 28 i 10% odpowiednio po 6, 12, 18, 24 i 30 h obserwacji mikroskopowej. W komórkach traktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 albo PARP zaobserwowano nieznaczne nasilenie tempa migracji, przy czym dla większości analizowanych punktów czasowych różnica pomiędzy wynikami prób badanych a kontrolą nie była statystycznie istotna. Badania wykazały również, że nadtlenek wodoru znacząco ograniczył potencjał migracyjny komórek w stosunku do komórek kontrolnych, a powierzchnia rany wyniosła średnio 80, 69, 52, 44 i 35% swojej początkowej powierzchni odpowiednio po 6, 12, 18, 24 oraz 30 h od rozpoczęcia eksperymentu. Podobnie jak w przypadku migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego, w komórkach potraktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 albo PARP zaobserwowano ograniczenie działania nadtlenu wodoru na migrację komórek. Zastosowane inhibitory wykazywały podobną skuteczność, co potwierdzono brakiem istotności statystycznej pomiędzy powierzchniami ran w monowarstwie komórek hodowanych w obecności poszczególnych inhibitorów TRPM2 albo PARP oraz nadtlenu wodoru. Średnie wartości procentowe powierzchni ran po 12 i 24 h od rozpoczęcia eksperymentu przedstawiono w **Tabeli VII**, a średnie tempo zamykania ran na **Rycinie 28**. Dodatkowo czasowe zmiany powierzchni ran przedstawiono na **Rycinie 29**, a reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe na **Rycinie 30 i 31**. Powierzchnie ran obliczono zgodnie ze wzorem:

$$\text{Powierzchnia rany [\%]} = \frac{\text{Powierzchnia rany w danym punkcie czasowym} * 100\%}{\text{Początkowa powierzchnia rany}}$$

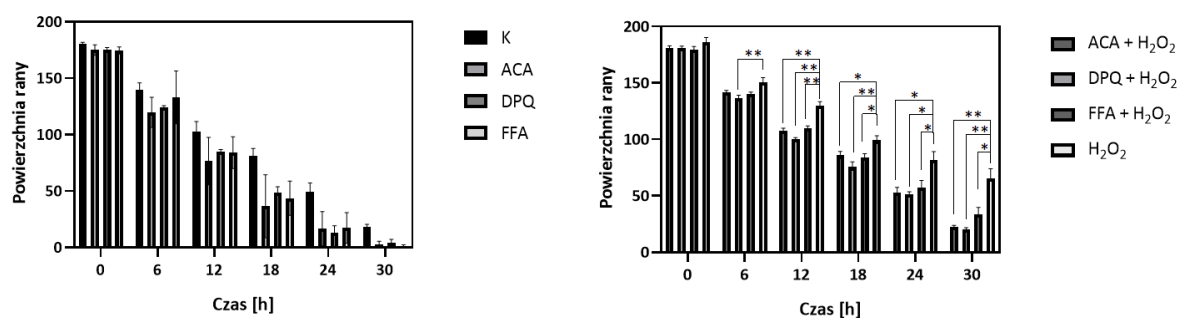
Tabela VII. Średnia procentowa powierzchnia rany po 12 i 24 h od rozpoczęcia eksperymentu.

Punkt czasowy	Grupa	Powierzchnia rany [%]	Istotność statystyczna względem	
12	K	57,41	H ₂ O ₂	p = 0,0161
24		27,83	DPQ	p = 0,0007
			H ₂ O ₂	p = 0,0016
12	ACA	43,59	-	-
24		10,14	H ₂ O ₂	p = 0,0353
12	DPQ	48,84	ACA + H ₂ O ₂	p = 0,0139
			FFA + H ₂ O ₂	p = 0,0007
			H ₂ O ₂	p < 0,0001
			K	p = 0,0007
24		7,9	ACA + H ₂ O ₂	p = 0,0019
			DPQ + H ₂ O ₂	p = 0,0011
			FFA + H ₂ O ₂	p = 0,0007
			H ₂ O ₂	p < 0,0001
12	FFA	48,00	-	-
24		9,87	FFA + H ₂ O ₂	p = 0,0388
			H ₂ O ₂	p = 0,0098
12	ACA + H ₂ O ₂	59,04	DPQ	p = 0,0139
			H ₂ O ₂	p = 0,0132
24		29,19	DPQ	p = 0,0019
			H ₂ O ₂	p = 0,0132
12	DPQ + H ₂ O ₂	55,08	H ₂ O ₂	p = 0,0014
24		28,29	DPQ	p = 0,0011
			H ₂ O ₂	p = 0,0044
12	FFA + H ₂ O ₂	60,62	H ₂ O ₂	p = 0,0034
24		31,61	DPQ	p = 0,0007
			FFA	p = 0,0388
			H ₂ O ₂	p = 0,0044
12	H ₂ O ₂	69,36	K	p = 0,0161
			DPQ	p < 0,0001
			ACA + H ₂ O ₂	p = 0,0132
			DPQ + H ₂ O ₂	p = 0,0014
			FFA + H ₂ O ₂	p = 0,0034
			K	p = 0,0016
			ACA	p = 0,0353
			DPQ	p < 0,0001
24		43,64	FFA	p = 0,0098
			ACA + H ₂ O ₂	p = 0,0132
			DPQ + H ₂ O ₂	p = 0,0044
			FFA + H ₂ O ₂	p = 0,0044

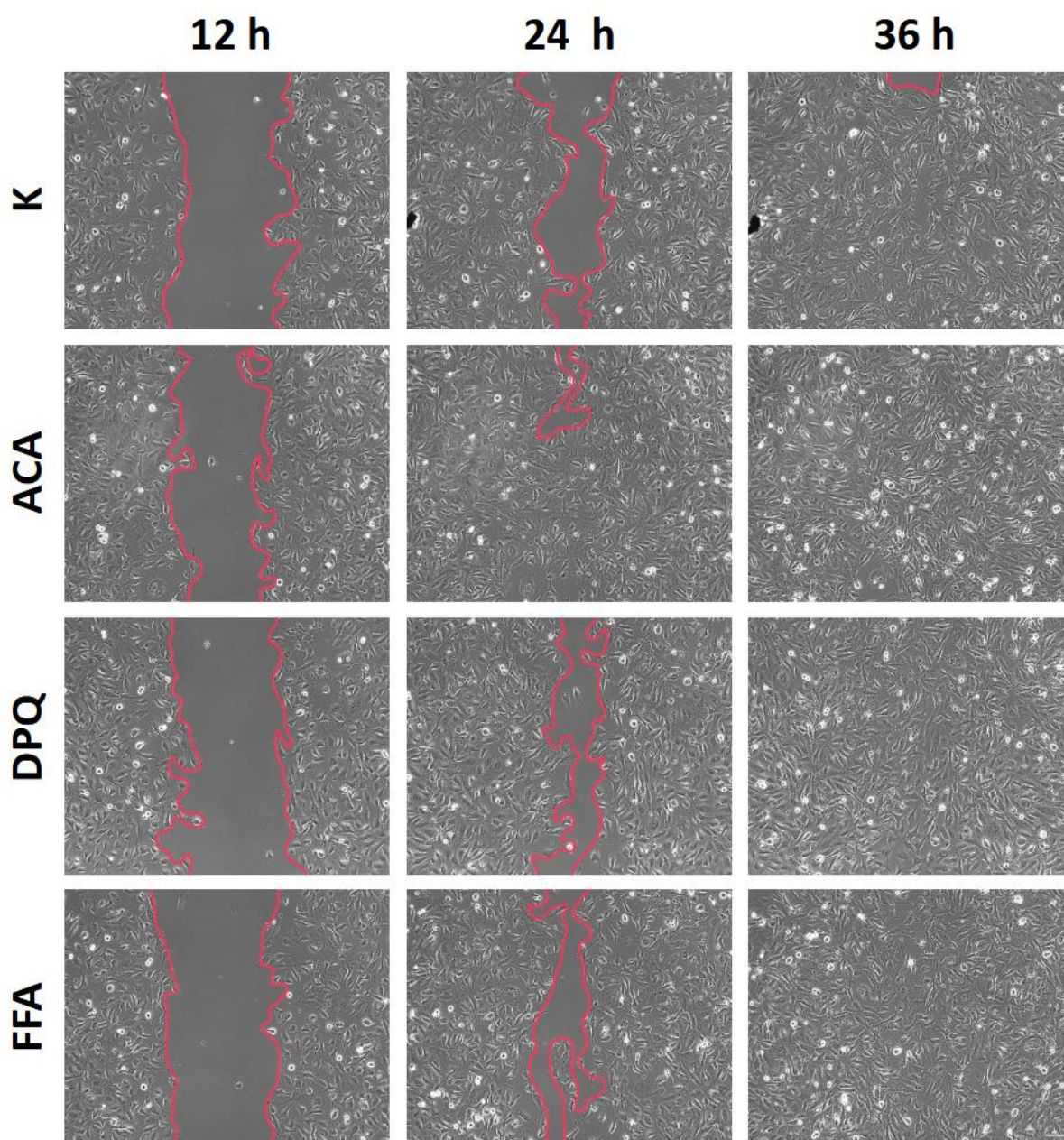
ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.



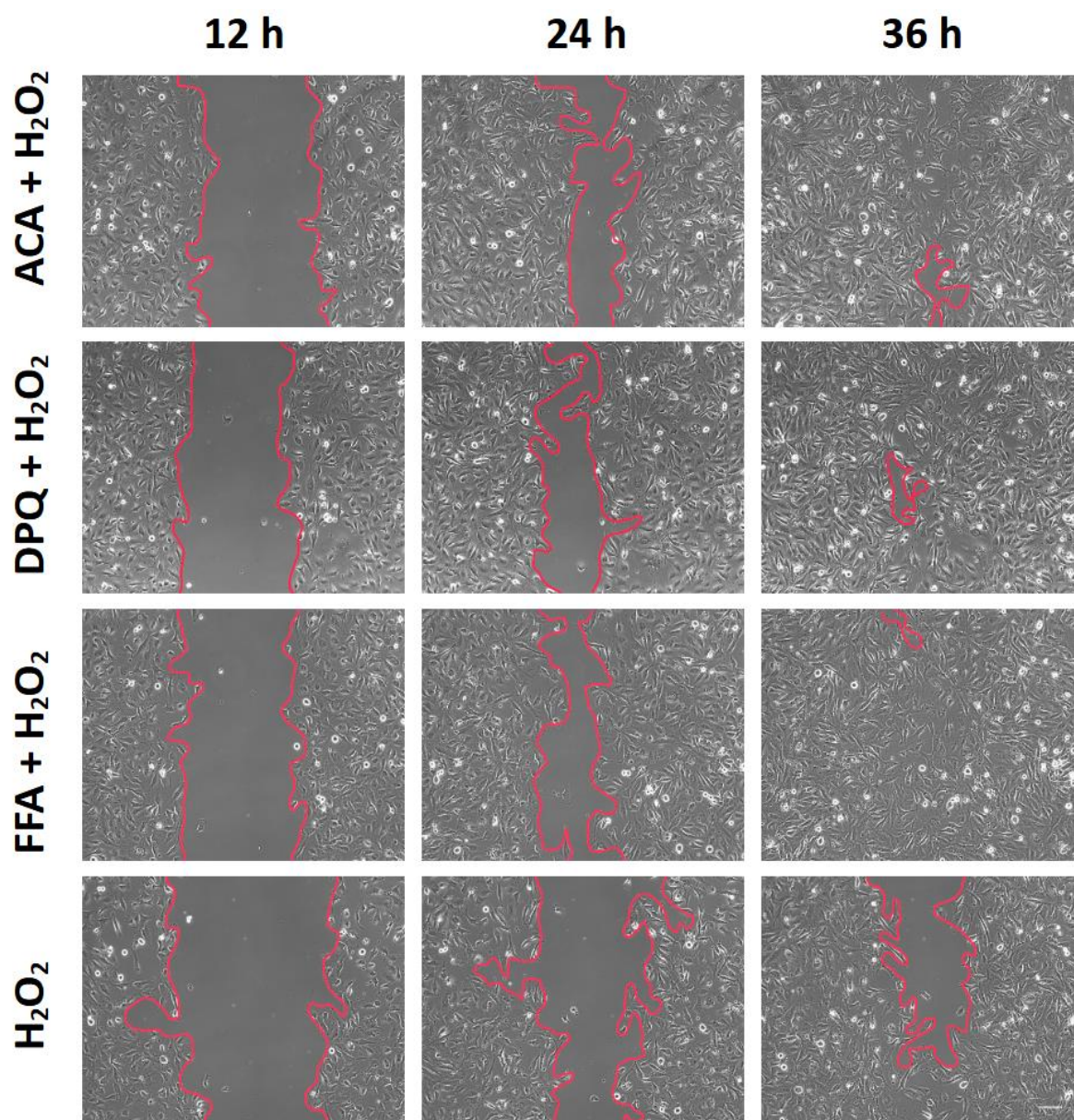
Rycina 28. Tempo zarastania powierzchni ran w poszczególnych grupach komórek. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.



Rycina 29. Średnia powierzchnia ran w punktach czasowych 6, 12, 18, 24 i 30 h od rozpoczęcia eksperymentu. Wyniki przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola.



Rycina 30. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające powierzchnię ran po 12, 24 i 36 h od rozpoczęcia eksperymentu. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K – kontrola. Bar = 100 μm .



Rycina 31. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające powierzchnię ran po 12, 24 i 36 h od rozpoczęcia eksperymentu. ACA – kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy, DPQ – 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon, FFA – kwas flufenamowy, K - kontrola. Bar = 100 μ m.

5. DYSKUSJA

Prawidłowe działanie śródbłonna naczyniowego pozwala utrzymać homeostazę układu sercowo-naczyniowego. Ta pojedyncza warstwa płaskich komórek nabłonkowych odpowiada między innymi za takie funkcje, jak selektywna przepuszczalność składników krwi do otaczających tkanek, regulacja napięcia ściany naczyń, czy odpowiedź zapalna organizmu. Przedłużające się zaburzenia w funkcjonowaniu bariery śródbłonkowej prowadzą do rozwoju jego trwałej dysfunkcji [7]. Na poziomie komórkowym manifestuje się ona jako rozluźnienie struktury połączeń międzykomórkowych w następstwie zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego i ekspresji białek zaangażowanych w tworzenie połączeń międzykomórkowych. Obserwuje się również wzmożoną śmierć komórek śródbłonna na drodze apoptozy oraz nasilenie procesu TEM. Na poziomie funkcji śródbłonna obserwowane jest zaburzenie proporcji w produkcji czynników wazodylatacyjnych i wazokonstrykcyjnych, na rzecz czynników prowadzących do skurczu naczyń. Utrzymanie barierowej funkcji endotelium jest zatem jednym z kluczowych warunków prawidłowego działania całego układu krążenia. Stąd dysfunkcja śródbłonna towarzyszy licznym schorzeniom związanym z układem sercowo-naczyniowym, jak nadciśnienie tętnicze, miażdżyca, czy naczyniowe powikłania cukrzycy [15].

Stres oksydacyjny jest wynikiem dysproporcji pomiędzy produkcją i akumulacją czynników oksydacyjnych, tj. ROS, a zdolnościami systemu biologicznego do ich neutralizacji lub usuwania skutków ich działania. ROS w komórkach mogą powstawać w wyniku metabolizmu komórkowego poprzez uwolnienie ich z mitochondriów w przebiegu procesu oddychania tlenowego. Produkcja ROS i nadtlenków może być również indukowana przez czynniki zewnętrzne np. dym tytoniowy czy ekspozycja na promieniowanie UV. Organizm posiada szereg mechanizmów antyoksydacyjnych, które oparte są w dużej mierze na enzymach, tj. SOD, katalaza oraz peroksydaza glutationowa. Jednym z procesów, w którym obserwuje się wzmożoną produkcję ROS jest stan zapalny. Podczas toczącej się reakcji zapalnej, ROS produkowane są przez leukocyty. Neutrofile w warunkach stymulacji aktywują oksydazę NADPH, która jest źródłem dużej ilości nadtlenków [133]. Jednocześnie, stres oksydacyjny może aktywować różne czynniki transkrypcyjne tj. jądrowy czynnik kappa B (NF- κ B, *ang. nuclear factor kappa B*), przełącznik sygnałów i aktywator transkrypcji 3 (STAT3, *ang. signal transducer and activator of transcription 3*), czynnik indukowany hipoksją-1 α (HIF1- α , *ang. hypoxia-inducible factor-1 α*), czy białko aktywatorowe-1 (AP-1, *ang. activator protein-1*),

co prowadzi do ekspresji cytokin i chemokin zaangażowanych w odpowiedź zapalną, np. IL-1, IL-6, IL-11 oraz IL-8 [134]. Dodatkowo nasilone działanie czynników o właściwościach utleniaczy może prowadzić do martwicy komórek, która z kolei indukuje odpowiedź zapalną. Stres oksydacyjny i stan zapalny pozostają więc ze sobą nierozdzielnie połączone, a warunki zachwiania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej komórek śródbłónka wiązane są z takimi schorzeniami jak nadciśnienie czy miażdżyca [135,136].

Jony Ca^{2+} są drugorzędowym przekaznikiem informacji wewnątrz komórki. Nawet niewielkie wahania poziomu Ca^{2+} w cytozolu mogą prowadzić do poważnych zmian w strukturze i funkcji komórek. Stężenie tych jonów jest ściśle kontrolowane przez liczne kanały i pompy jonowe wbudowane w ER oraz błonę komórkową. Jednym z błonowych kanałów wapniowych, którego ekspresję potwierdzono w komórkach śródbłónka jest TRPM2 [14]. Co więcej, jego aktywacja jest ściśle powiązana ze stresem oksydacyjnym [128]. Najlepiej opisanym szlakiem aktywacji TRPM2 jest ten z udziałem ADPR. Cząsteczka ta powstaje przy udziale enzymów PARP oraz PARG, które indukowane są uszkodzeniami DNA występującymi w przebiegu stresu oksydacyjnego. Przedłużający się podwyższony poziom ROS przyczynia się do rozwoju ED. Kanał TRPM2 stanowi więc punkt łączący ED ze stresem oksydacyjnym [106,110].

W pierwszej części przedstawionych badań oceniono wpływ stresu oksydacyjnego, indukowanego nadtlaniem wodoru, na komórki EA.hy926. Zbadano również rolę obniżenia poziomu błonowego kanału wapniowego TRPM2 w odpowiedzi komórek na nadtlenek wodoru. Uzyskane wyniki wskazują, że 24 h traktowanie komórek linii EA.hy926 100 μM nadtlaniem wodoru prowadzi do zmian typowych dla zaburzenia barierowej funkcji śródbłónka. Zaobserwowane efekty obejmowały obniżenie żywotności komórek z nasileniem apoptozy, zwiększenie poziomu jonów wapnia w cytoplazmie, obniżenie potencjału migracyjnego, jak również zmiany w organizacji obszarów wzajemnej interakcji pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Jest to zgodne z dostępnymi doniesieniami literaturowymi. Hu i wsp. wykazali, że komórki HUVEC pod wpływem działania LPS produkują ROS przy jednoczesnym ograniczeniu zdolności antyoksydacyjnych, co prowadzi między innymi do śmierci komórek na drodze apoptozy, nasilenia produkcji cytokin prozapalnych np. $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 i IL-1 β oraz wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 [137]. Podobnie, Wang i wsp. wykazali, że w mysich komórkach śródbłónka mikrounaczynienia wysp

trzustkowych linii MS-1, nadtlenuk wodoru prowadzi do znaczącego wzrostu odsetka komórek apoptotycznych, co potwierdzone zostało metodą TUNEL, podwójnym barwieniem komórek AV/PI oraz poprzez potranslacyjną ocenę ekspresji białek Bax, Bcl-2 i kaspazy-3 [138]. Ponadto odnotowano wzrost ekspresji VCAM oraz ograniczenie funkcji eNOS. Ciekawym jest, że wykazano również podwyższony poziom β -kateniny [138]. Białko to jest istotnym elementem kompleksu połączeń typu zwierającego. Jednakże, zaangażowane jest także w szlak Wnt/ β -katenina, który fizjologicznie związany jest z regulacją takich procesów, jak specjalizacja, proliferacja, migracja, czy śmierć komórek. Prawdopodobne jest, że obserwowany wzrost poziomu β -kateniny związany był z aktywacją szlaku sygnałowego Wnt, co dalej prowadziło do śmierci komórek na drodze apoptozy [138]. W przypadku badań przedstawionych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, efektem działania nadtlenuku wodoru na komórki linii EA.hy926 było obniżenie poziomu β -kateniny, co potwierdzono metodą Western Blot. Obniżenie ekspresji tego białka wykazano również za pośrednictwem oceny intensywności fluorescencji β -kateniny w obrębie kontaktu pomiędzy sąsiadującymi komórkami na poziomie zdjęć konfokalnych, wykluczając jednocześnie jej translokację do jądra komórkowego. Wyjaśnieniem tych rozbieżności może być silna heterogenność obserwowana wśród komórek śródbłonna pochodzących z różnych lokalizacji w obrębie drzewa naczyniowego. Wprawdzie komórki śródbłonna linii EA.hy926 oraz MS-1 odpowiadają podobnie na nadtlenuk wodoru, to jednak sposób indukcji zmian oraz aktywacja i przebieg wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych mogą zachodzić w sposób odmienny. Możliwa jest tu aktywacja niekanonicznej ścieżki szlaku Wnt, która zależna jest od jonów Ca^{2+} [139].

Efektem 24 h hodowli komórek linii EA.hy926 w obecności nadtlenuku wodoru było również wzmożone formowanie się włókien retrakcyjnych oraz struktur podobnych do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Włókna retrakcyjne są wypustkami komórkowymi formującymi się podczas migracji komórek, na biegunie przeciwnym do kierunku migracji. Wyniki badań naszego zespołu pokazały formowanie się tych struktur jako cechę charakterystyczną dla ukierunkowanej migracji aktywowanych zapalnie ludzkich pierwotnych komórek śródbłonna tętnicy wieńcowej [59]. Pod wpływem mechanicznych naprężeń włókna retrakcyjne pękają pozostawiając otoczony błoną komórkową pęcherzyk zawierający cząsteczki RNA i białek, które mogą wpływać na funkcjonowanie innych komórek. Zjawisko to zaobserwowano w ludzkich komórkach śródbłonna tętnicy wieńcowej traktowanych $\text{TNF}\alpha$ [59]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to heterogenna grupa kulistych struktur, których

rozmiary wahają się od 30 nm do 5 μ m, a ich główną rolę przypisuje się sygnalizacji międzykomórkowej [140]. Ze względu na potencjalne znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne, struktury te budzą szerokie zainteresowanie w świecie naukowym. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, w grupie komórek traktowanych nadtlaniem wodoru, obserwowano liczne sygnały fluorescencyjne o charakterze drobnych kulistych struktur zlokalizowanych poza obszarem komórek. Występowanie tych struktur odnotowano podczas analizy fluorescencyjnie znakowanych komórek wobec β -kateniny, które poddano wcześniejszemu działaniu nadtlenu wodoru. Ponadto o komórkowym pochodzeniu tych struktur świadczy pozytywne znakowanie wobec F-aktyny [141]. Badania przeprowadzone przez Dovrat i wsp. wskazują, że β -katenina może być transportowana przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe [142]. Wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą wchodzić w interakcje z sąsiednimi komórkami wywołując zmiany w ich funkcjonowaniu, w tym aktywować szlak Wnt/ β -katenina [142]. Wprawdzie opisaną powyżej aktywację kanonicznej ścieżki szlaku Wnt dowiedziono w badaniach przeprowadzonych na liniach komórek nowotworowych, możliwym jest, że podobne zjawisko zachodzi z udziałem komórek śródbłonna.

Badania ujęte w niniejszej pracy, wykazały zmianę lokalizacji VE-kadheryny pod wpływem działania nadtlenu wodoru. W komórkach kontrolnych sygnał pozytywny wobec VE-kadheryny obserwowano głównie na granicy komórka-komórka, na terenie jąder komórkowych oraz częściowo dokoła nich. Z kolei w komórkach hodowanych w obecności 100 μ M nadtlenu wodoru przez okres 24 h skupiony był on głównie w okolicy subjądrowej, prawdopodobnie w obrębie siateczki śródplazmatycznej. VE-kadheryna, podobnie jak β -katenina, jest białkiem wielofunkcyjnym. Wykazano, że wchodzi w interakcje z VE-kadheryną integralną z błoną komórkową sąsiadującej komórki tworząc połączenia zwierające, co czyni ją jednym z głównych czynników regulujących zwartość budowy komórek śródbłonna i stanowi istotny element strukturalny dla nowopowstających połączeń zamykających. Potwierdzono również znaczenie tego białka w procesie angiogenezy [143]. Wprawdzie VE-kadheryna jest markerem charakterystycznym dla komórek śródbłonna. Jednakże, ekspresję tego białka potwierdzono również w komórkach nowotworowych zdolnych do mimikry naczyniowej [144]. Jest to zjawisko formowania struktur tubularnych, które są w stanie transportować różne substancje. Proces ten zachodzi bez udziału komórek śródbłonna, co odróżnia go od angiogenezy. VE-kadheryna i jej translokacja pomiędzy regionem połączeniowym a

cytoplazmą ma znaczenie sygnalizacyjne. Badania przeprowadzone przez Rudini i wsp. wykazały, że białko to jest istotną częścią odpowiedzi komórek śródbłónka na działanie TGF- β [145]. Ponadto VE-kadheryna koprecypituje ze wszystkimi składnikami kompleksu receptorowego dla TGF- β [145]. Jednakże, dokładna rola VE-kadheryny i jej internalizacji w procesie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej nie została dokładnie zbadana. Dla innego białka z rodziny kadheryn – E-kadheryny, w badaniach przeprowadzonych na *Drosophila melanogaster*, potwierdzono, że utrata funkcji ATPazy SERCA, odpowiedzialnej za transport Ca^{2+} z cytozolu do ER, skutkuje nagromadzeniem się tego białka w obrębie ER [146]. Wykazano, że związany z tym stres prowadzi do śmierci komórek na drodze apoptozy. Autorzy badania zasugerowali, że obniżenie poziomu Ca^{2+} w ER w wyniku utraty funkcji ATPazy SERCA ogranicza translokację E-kadheryny do błony komórkowej [146]. Możliwym jest, że podobne zjawisko zachodzi wobec VE-kadheryny w komórkach śródbłónka, w szczególności, że nadtlenek wodoru wpływa również na funkcję ATPazy SERCA [136].

Ekspozycja komórek linii EA.hy926 na 100 μM stężenie nadtlenu wodoru prowadziła również do ograniczenia zdolności migracyjnych komórek, co jest jedną z cech dysfunkcji śródbłónka. Zmiany te mogą przyjmować różne formy tj. ograniczenie tempa migracji jak i możliwości komórek do zmiany kierunku ruchu. W niniejszych badaniach wykazano, że komórki linii EA.hy926 charakteryzują się istotnym ograniczeniem potencjału migracyjnego w odpowiedzi na działanie nadtlenu wodoru. Jednakże, inne badania naszego zespołu pokazały zależną od stymulacji TNF α ukierunkowaną migrację ludzkich pierwotnych komórek śródbłónka tętnicy wieńcowej, która miała charakter masowy. Było to powiązane ze specyficzną zmianą organizacji cytoszkieletu aktynowego, z charakterystycznych dla tego rodzaju komórek gwieździstych form do grubych prostych włókien stresowych ustawionych zgodnie z kierunkiem ruchu masy komórkowej [59]. O ile zwiększone tempo endotelializacji wydaje się korzystne pod względem praktycznym, np. w reendotelializacji stentów naczyniowych, to towarzysząca temu zmiana formy organizacyjnej cytoszkieletu aktynowego promuje nieciągły kontakt pomiędzy sąsiadującymi komórkami oraz formowanie się przestrzeni międzykomórkowych. Podczas zabiegu implantacji stentu dochodzi do poważnych uszkodzeń w obrębie śródbłónka. Wiąże się to z indukcją stanu zapalnego, dalszym rozwojem lokalnej dysfunkcji naczynia oraz zwiększonym przerostem neointymy. Obecnie, kluczowym elementem brany pod uwagę przy projektowaniu stentów jest doprowadzenie do jak najszybszej endotelializacji jego powierzchni, gdyż zmniejsza ono ryzyko wystąpienia

zакрепicy oraz wpływa pozytywnie na funkcjonowanie układu krążenia [147]. Poddaje to również w wątpliwość sens wykorzystywania stentów uwalniających tylko leki zapobiegające proliferacji komórek. W zamyśle pokrycie uwalniające te leki miało hamować przerost mięśniówki gładkiej oraz aktywację leukocytów, a więc ograniczać proces zwężania światła naczynia. Jednak wydłużały one proces endotelializacji, prowadząc do późnej lub bardzo późnej zакрепicy [148]. Obecnie trendem w procesie projektowania lub ulepszania stentów jest działanie przyspieszające pokrycie powierzchni komórkami endotelium oraz ograniczanie stanu zapalnego [149]. Zachowanie zdolności migracyjnych komórek śródbłónka, zwłaszcza z towarzyszącym utrzymaniem funkcji barierowej, jest kluczowe w procesie regeneracji uszkodzeń naczynia i utrzymania homeostazy całego układu sercowo-naczyniowego.

Doniesienia literaturowe wskazują, że TRPM2 uczestniczy w odpowiedzi komórek śródbłónka na działanie nadtlenu wodoru [14,90]. W wyniku traktowania komórek nadtlakiem wodoru dochodzi do ich śmierci na drodze apoptozy oraz manifestowania się innych zmian charakterystycznych dla niepoprawnie funkcjonującego śródbłónka. W badaniach ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że obniżenie poziomu TRPM2 w komórkach EA.hy926 skutkowało zahamowaniem negatywnego działania nadtlenu wodoru. Komórki te charakteryzowały się wyższą żywotnością oraz mniejszym odsetkiem komórek apoptotycznych w porównaniu do komórek z endogenną ekspresją TRPM2. Powyższe rezultaty są zgodne z dostępnymi doniesieniami literaturowymi. W przypadku komórek śródbłónka mikrounaczynienia serca linii H5V, jednym z obserwowanych efektów działania nadtlenu wodoru było obniżenie aktywności metabolicznej komórek [90]. Ponadto badanie poziomu kaspazy i fragmentacji DNA wykazały, że zależny od nadtlenu wodoru spadek żywotności komórek był spowodowany ich śmiercią na drodze apoptozy [90]. Wykazano również, że obniżenie ekspresji TRPM2 ograniczyło aktywację kaspazy inicjatorowych (kaspazy-8 i -9) oraz efektorowej (kaspazy-3), co wskazuje na zahamowanie apoptozy. Sun i wsp. zaobserwowali także, że TRPM2 ma znaczenie dla śmierci komórek H5V indukowanej przez TNF α , gdyż efekt ten został ograniczony zarówno po zastosowaniu przeciwciała blokującego TRPM2 (TM2E3) specyficznego wobec regionu E3 w pobliżu porów przenikania jonów oraz poprzez obniżenie ekspresji TRPM2 z wykorzystaniem shRNA [90].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazały również szybki wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca²⁺ w komórkach z endogenną ekspresją TRPM2

traktowanych nadtlaniem wodoru, co wiązało ze zmianą organizacji połączeń pomiędzy komórkami EA.hy926 i powstawaniem przestrzeni międzykomórkowych. Hecquet i wsp. wykazali, że napływ jonów Ca^{2+} do ludzkich komórek śródbłónka tętnicy płucnej został prawie całkowicie zablokowany po obniżeniu poziomu TRPM2 zarówno za pomocą siRNA, jak i przeciwciał. Ponadto wzrost obserwowanego poziomu wapnia był podzielony na dwa etapy: (i) uwolnienie jonów Ca^{2+} z ER oraz (ii) aktywacja błonowych kanałów wapniowych. W przypadku komórek o niższym poziomie TRPM2 obserwowano tylko pierwszy z etapów. Sugeruje to, że kanał wapniowy TRPM2 jest głównym elementem odpowiedzi komórek śródbłónka linii EA.hy926 na stres oksydacyjny. Co więcej, wykazano, że TRPM2 bierze udział w regulacji przepuszczalności ludzkich komórek śródbłónka tętnicy płucnej w odpowiedzi na działanie nadtlenu wodoru [14]. Hecquet i wsp. pokazali również, że traktowanie wspomnianych powyżej komórek nienajwyższymi dawkami nadtlenu wodoru powoduje wewnątrzkomórkowy napływ jonów Ca^{2+} , co wiąże się z rozluźnieniem sieci połączeń międzykomórkowych objawiającym się zmniejszeniem przezśródbłonkowej rezystancji elektrycznej. Negatywny wpływ nadtlenu wodoru ograniczono również poprzez inhibitory PARP, a także nadekspresję TRPM2-S, który działa jak antagonist TRPM2 [14]. W badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy, zaobserwowano zmiany w lokalizacji i ekspresji VE-kadheryny i β -kateniny, a więc białek zaangażowanych w tworzenie połączeń zwierających. Barierna funkcja śródbłónka jest jednym z czynników niezbędnych dla utrzymania homeostazy układu sercowo-naczyniowego. Podobnie jak w przypadku badań Hecqueta i wsp., eksperymenty przeprowadzone w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały ograniczenie działania nadtlenu wodoru w obrębie regionów połączeń pomiędzy komórkami o obniżonym poziomie TRPM2. Przebudowa struktury połączeniowej i zmiana lokalizacji białek zaangażowanych w tworzenie połączeń międzykomórkowych jest kluczowym zjawiskiem w procesie transmigracji leukocytów [150]. Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że w komórkach śródbłónka pochodzących od zwierząt pozbawionych ekspresji TRPM2 zachodzi ograniczona fosforylacja VE-kadheryny w pozycjach Y658 oraz Y731, co jest kluczowe w demontażu połączeń typu zwierającego i internalizacji tego białka [109].

Wang i wsp., w badaniach przeprowadzonych na ludzkich komórkach śródbłónka mikrounaczynienia płuc ekspozowanych na cząstki stałe będące częścią pyłów zawieszonych izolowanych z powietrza, wykazali, że zależny od TRPM2 dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} wpływa również na stabilność ZO-1 [151]. Potraktowanie komórek śródbłónka cząstkami

stałymi pyłów izolowanych z powietrza doprowadziło do jego zwiększonej przepuszczalności w następstwie spadku poziomu białek ZO-1 i ZO-2. Co ciekawe, poziomy VE-kadheryny i β -kateniny pozostały niezmiennie [151]. Efekt ten został przez autorów pracy powiązany z formowaniem się ROS w komórkach śródbłonna, ponieważ degradacja ZO-1 była zahamowana zarówno przez N-acetylocysteinę, jak i katalazę. Udowodniono również, że cząstki stałe pyłu zawieszonego z powietrza prowadzą do zależnej od ROS aktywacji TRPM2, co skutkuje szybkim dokomórkowym napływem jonów Ca^{2+} . Podobnie jak w przypadku N-acetylocysteiny i katalazy, obniżenie endogennej ekspresji TRPM2 oraz zastosowanie przeciwciał przeciwko TRPM2 hamowało demontaż ZO-1 i uszkodzenia w obrębie połączeń zamykających. Ponadto degradację ZO-1 powiązano z funkcją kalpajny, która jest zależną od Ca^{2+} proteazą odpowiedzialną między innymi za degradację ZO-1, a potraktowanie komórek inhibitorami kalpajny albo kalpeptyną prowadziło do utrzymania ciągłości bariery śródbłonkowej [151]. W przypadku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, jako jeden z efektów działania nadtlenu wodoru na komórki EA.hy926, zaobserwowano obniżenie poziomów zarówno β -kateniny, VE-kadheryny, jak i ZO-1, a obniżenie ekspresji TRPM2 powodowało redukcję tych zmian. Wyniki badań mikroskopowych, w tym fluorescencyjnego znakowania białek, wykazały, że komórki z obniżoną ekspresją TRPM2 hodowane w obecności nadtlenu wodoru miały wygląd zbliżony do komórek kontrolnych wykazujących endogenną ekspresję TRPM2. Sugeruje to protekcyjne działanie obniżenia ekspresji TRPM2 w komórkach linii EA.hy926 w zakresie utrzymania bariery śródbłonkowej.

Podsumowując pierwszą część przeprowadzonych badań, wykazano, że potraktowanie modelowych komórek śródbłonna linii EA.hy926 100 μM nadtlakiem wodoru przez okres 24 h prowadzi do znacznego uszkodzenia w obrębie monowarstwy komórkowej i zmian charakterystycznych dla działania stresu oksydacyjnego. Obserwowano spadek żywotności komórek spowodowany ich śmiercią na drodze apoptozy, rozkład i zmianę lokalizacji białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych, jak również ograniczenie potencjału migracyjnego. Zmianom tym towarzyszył dokomórkowy napływ jonów Ca^{2+} , który odnotowano poniżej 1 min od momentu rozpoczęcia ekspozycji komórek na działanie nadtlenu wodoru. Efekt działania nadtlenu wodoru został znacznie ograniczony w komórkach z obniżoną ekspresją TRPM2 poprzez transfekcję z wykorzystaniem siRNA przeciwko TRPM2. Sugeruje to, że kanał TRPM2 jest istotnym elementem odpowiedzi komórek śródbłonna na nadtlak wodoru, a zahamowanie jego aktywności może być

rozważane w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego o podłożu związanym ze stresem oksydacyjnym. Z tego powodu, w drugiej części badań, postanowiono ocenić wpływ inhibicji TRPM2 na odpowiedź komórek śródbłonna linii EA.hy926 na nadtlenuk wodoru. W tym celu zastosowano inhibitory TRPM2 (ACA i FFA) oraz inhibitory enzymu PARP (3-AB i DPQ). Wybór inhibitorów enzymu PARP oparto o fakt, że bierze on udział w tworzeniu ADPR, który poprzez wiązanie się do TRPM2 w obrębie domeny NUDT9-H aktywuje otwieranie się kanałów TRPM2 [152].

Poszukiwanie efektywnych inhibitorów TRPM2 stało się przedmiotem intensywnych badań przez powiązanie tego kanału z różnymi jednostkami chorobowymi. Jak dotąd rolę TRPM2 wykazano w urazach niedokrwienno-reperfuzyjnych licznych narządów, stanach zapalnych, chorobach neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych [119,153–155]. Zastosowanie niektórych z inhibitorów, w tym FFA, jest rozpatrywane również w terapii COVID-19 [156]. Kierunek ten jest obiecujący również ze względu na fakt, że niektóre z inhibitorów TRPM2 są dopuszczone do obrotu jako produkty lecznicze. Dla przykładu, pochodne ACA (np. Difortan, którego substancję czynną stanowi etofenamat) albo jego metabolity są stosowane jako niesteroidowe leki przeciwzapalne, a klotrymazol (np. Clotrimazolum GSK) i azotan ekonazolu (np. Pevazol) stanowią leki przeciwgrzybicze. Do przeprowadzenia badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wybrano dwa stężenia ACA (10 i 20 μM), jednakże tylko niższe ze stężeń okazało się skuteczne w hamowaniu negatywnego wpływu nadtlenuku wodoru względem modelowych komórek śródbłonna linii EA.hy926, prawdopodobnie poprzez redukcję dokomórkowego napływu jonów Ca^{2+} . Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na skuteczne blokowanie TRPM2 przez ACA w stężeniu 20 μM zarówno w embrionalnych komórkach nerki człowieka linii HEK293, jak i w modelu białaczki histiocytarnej linii U937 [117]. Ponadto to samo stężenie ACA hamowało zmiany zapalne indukowane stresem hiperosmotycznym w pierwotnych komórkach nabłonka rogówki [157]. Warto wspomnieć, że inhibitor ten nie działa jednak w sposób specyficzny, gdyż zaobserwowano, że ACA poza TRPM2 oddziałuje również na inne kanały należące do tej samej rodziny, tj. TRPM8 i TRPC6 [117]. W niniejszych badaniach wykorzystano również FFA, który jest pochodną ACA i tak jak swój prekursor należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Podobnie jak inni przedstawiciele tej grupy, FFA hamuje działanie COX i powstawanie prostaglandyn. Badania przeprowadzone na embrionalnych komórkach nerki człowieka linii HEK293 pokazały, że FFA w zakresie dawek 50-1000 μM jest w stanie prawie

całkowicie zablokować aktywację kanału TRPM2 [115]. Co ciekawe, efekt ten był zależny od pH, którego obniżenie skutkowało nasileniem inhibitorowego działania FFA. Z kolei w neuronach zwojowych rogów grzbietowych rdzenia kręgowego, stężenie 100 μM FFA w około 50% ograniczyło dokomórkowy napływ Ca^{2+} . W tym przypadku, lepszym wyborem okazało się 2-APB, którego 50 μM stężenie prawie całkowicie zablokowało aktywację TRPM2 wywoływaną 1 mM ADPR. W badaniu tym wyeliminowano wpływ zmian pH na działanie inhibitorów poprzez stały monitoring i utrzymywanie tego parametru na poziomie 7,4 [158]. Dodatkowo w komórkach jajnika chomika chińskiego linii CHO zaobserwowano, że 100 μM FFA było wystarczające, by efektywnie zredukować dokomórkowy napływ Ca^{2+} w odpowiedzi na nadtlenek wodoru [159]. Na podstawie powyższych doniesień, do badań ujętych w niniejszej pracy doktorskiej, wybrano dwa stężenia FFA (50 i 100 μM). Jak dotąd, nie przeprowadzono eksperymentów z zastosowaniem tego związku wobec komórek śródbłonna. Oba stężenia powodowały niewielki, choć istotny statystycznie i zależny od dawki spadek przeżywalności komórek. Bezpieczny zakres stężeń FFA wydaje się ściśle zależeć od typu komórek, gdyż w niektórych przypadkach stężenia powyżej 100 μM nie indukują istotnego statystycznie spadku żywotności komórek [160]. Niższe z zastosowanych stężeń okazało się bardziej skuteczne w hamowaniu indukcji śmierci komórek linii EA.hy926 w odpowiedzi na nadtlenek wodoru. Cytometryczna analiza komórek barwionych AV/PI pokazała, że związek ten redukuje odsetek komórek apoptotycznych w odpowiedzi na działanie nadtlenu wodoru. Jest to efekt zgodny z dostępnymi danymi literaturowymi. Roberge i wsp. zaobserwowali, że ekspozycja mysich kardiomiocytów na działanie $\text{TNF}\alpha$ prowadziła do aktywacji kanału TRPM2 oraz śmierci komórek na drodze apoptozy, podczas gdy inhibicja TRPM2 za pośrednictwem 100 μM stężenia FFA znacząco hamowała aktywację kaspazy-8, co świadczy o ograniczeniu indukcji apoptozy [161]. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano również, że FFA chroni komórki śródbłonna linii EA.hy926 przed negatywnym działaniem nadtlenu wodoru w zakresie rozkładu białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych przy zachowaniu pełnego potencjału migracyjnego komórek. Obecnie w literaturze brak jest doniesień analizujących ten aspekt działania FFA.

W kontekście potencjału aplikacyjnego, należy wspomnieć, że choć FFA jest dopuszczony do użytku farmakologicznego jako niesteroidowy lek przeciwzapalny, to jego wykorzystanie jest ograniczone z uwagi na reakcje niepożądane ze strony układu

pokarmowego u 30-60% pacjentów, nawet przy stosowaniu dawek rekomendowanych [160]. Potwierdzono również przypadki trombocytopenii oraz zmian skórnych [160].

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano również inhibitory enzymu PARP. Jest to szeroko badana grupa związków, głównie ze względu na możliwość ich zastosowania w terapii nowotworów. Zostały one dopuszczone do użytku w leczeniu raka piersi i jajnika z mutacjami BRCA1/2. PARP aktywowany jest poprzez wiązanie się jego N-końcowej domeny w obrębie pęknięć DNA, rekrutując tym samym elementy strukturalne kompleksu naprawczego [162]. Jego funkcja jest więc istotna dla zachowania stabilności materiału genetycznego. W niniejszej pracy wykazano, że nadtlenek wodoru powoduje zmiany w obrębie jąder komórkowych. Fluorescencyjne barwienie DNA wykazało obecność gigantycznych komórek z zaburzeniami w postaci olbrzymich jąder komórkowych albo z cechami multinukleacji. Obserwowano również liczne komórki z jądrami komórkowymi o nieregularnym kształcie. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi, które potwierdzają uszkodzenie materiału genetycznego komórek traktowanych nadtlakiem wodoru [163]. Obserwowane nieprawidłowości obejmują również pęknięcia pojedynczych nici, w których naprawę zaangażowany jest PARP [164]. Z drugiej strony, rozmiar tych komórek wraz z organizacją F-aktyny oraz morfologią jąder komórkowych wskazują na cechy typowe dla komórek w stanie katastrofy mitotycznej. Wykazano między innymi, że silne inhibitory PARP, tj. olaparib albo talazoparib, pozwalają na przejście komórek neuroblastomy z amplifikacją i nadekspresją MYCN przez mitozę w obecności uszkodzonego DNA i promują śmierć komórki poprzedzoną intensywnym stresem replikacyjnym wyrażonym stanem katastrofy mitotycznej [165]. W badaniach opisanych w niniejszej pracy zahamowanie działania PARP skutkowało ograniczeniem negatywnych zmian indukowanych przez nadtlenek wodoru, a więc możliwym jest, że w komórkach linii EA.hy926 aktywowany jest inny mechanizm naprawy DNA, który kompensuje obniżoną aktywność PARP. Warto jednak wskazać, że inhibicja PARP może mieć też negatywne skutki ogólnoustrojowe. U myszy z niedoborem tego enzymu zaobserwowano przyspieszone starzenie się oraz nasilenie spontanicznej karcinogenezy [166]. Porównanie poziomów PARP u osobników 13 różnych gatunków wykazało, że jego ekspresja koreluje z oczekiwaną długością życia danego gatunku [167]. Z drugiej strony potwierdzono również liczne pozytywne efekty zastosowania inhibitorów PARP w modelach chorób układu sercowo-naczyniowego. W takich schorzeniach jak miażdżyca, zawał mięśnia sercowego, czy zastoinowa niewydolność serca obserwuje się nadmierną aktywację PARP. Efektem tego jest

wyczerpywanie się wewnątrzkomórkowych zapasów NAD oraz ATP i kierowanie komórek na drogę śmierci przez apoptozę albo, przy dużym nasileniu stresu oksydacyjnego, nekrozę [168]. W badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym potwierdzono, że hamowanie aktywności PARP ma działanie protekcyjne względem komórek śródbłonna i miocytów gładkich ściany naczyń [168]. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano dwa stężenia selektywnego inhibitora PARP-1 – DPQ (1 i 10 μ M), które prowadziły do nieznacznego, choć istotnego statystycznie i zależnego od stężenia spadku żywotności komórek linii EA.hy926. Z tego względu, w dalszych badaniach wykorzystywano jedynie niższe ze stężeń. Przeprowadzone eksperymenty wykazały protekcyjne działanie DPQ względem komórek linii EA.hy926 hodowanych w obecności nadtlenu wodoru. Potwierdza to wyniki badań przeprowadzonych przez inne grupy naukowe. Działanie DPQ prowadzące do zahamowania apoptozy indukowanej poprzez aktywację TRPM2 zostało opisane dla mysich modeli ostrego uszkodzenia płuc, zmian neurodegeneracyjnych oraz migreny [169–171]. An i wsp., zaobserwowali, że nadekspresja TRPM2 w ludzkich komórkach neuroblastomy linii SH-SY5Y nasila indukcję śmierci spowodowanej działaniem nadtlenu wodoru, podczas gdy DPQ promuje przeżycie komórek [172]. Sugeruje to, że aktywność kanału TRPM2 ma znaczenie w procesach neurodegeneracyjnych [172]. Na chwilę obecną nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu DPQ na komórki śródbłonna.

Innym inhibitorem PARP, który wykorzystano podczas realizacji niniejszej pracy była pochodna benzamidu – 3-AB. Jednakże został on wyeliminowany z dalszych eksperymentów na wczesnym etapie badań z uwagi na znaczne obniżenie żywotności komórek i brak cytoprotekcyjnego działania względem komórek linii EA.hy926 potraktowanych nadtlakiem wodoru. Związek ten jest jednym z najlepiej poznanych i często wykorzystywanych inhibitorów PARP zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Efektywność 3-AB w hamowaniu aktywności PARP jest większa niż dla nikotynamidu czy benzamidu [173]. Nie mniej jednak, wykazano, że zastosowanie 3-AB może prowadzić np. do zahamowania metabolizmu glukozy czy syntezy DNA w komórkach limfoidalnych oraz zaburzać reakcje z udziałem mono i poli(ADPR) [174–176]. W badaniach będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej wykorzystano milimolowe stężenia 3-AB (2,5 oraz 5 mM) wybrane na podstawie przeglądu dostępnej literatury, która potwierdziła efektywne hamowanie aktywności PARP przez 3-AB dla zakresu stężeń 2-10 mM. Warto podkreślić, że konieczność wykorzystania wysokich dawek, wspomniane skutki uboczne oraz niespecyficzne działanie 3-AB znacznie ograniczają

możliwość jego wykorzystania w praktyce klinicznej. Jednakże pozytywne działanie 3-AB zostało zaprezentowane np. w badaniach przedklinicznych na modelu mysim [177]. Zaobserwowano, że jednoczesne podanie memantyny oraz 3-AB w celu zablokowania receptorów NMDA i enzymu PARP znosiło immunocytotoksyczność spowodowaną podaniem kwasu 3-nitropropionowego, który indukuje zmiany neurodegeneracyjne, podobne do tych obserwowanych w chorobach Alzheimera, Huntingtona oraz Parkinsona [177]. Pomimo zastosowania dość wysokiej dawki 3-AB, bo sięgającej 20 mg/kg masy ciała, nie zaobserwowano przy tym istotnych efektów ubocznych. Co ciekawe, podanie substancji miało również pozytywny wpływ na wewnątrzkomórkowy poziom ATP i NAD oraz aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, jednocześnie prowadząc do obniżenia poziomu mediatorów prozapalnych, tj. $\text{TNF}\alpha$ i IL-6 [177]. Podanie 3-AB było również korzystne u myszy z cukrzycą indukowaną streptozotocyną i prowadziło do obniżenia poziomu glukozy oraz cholesterolu w osoczu zwierząt [178]. Co ciekawe, Pandya i wsp. potwierdzili przy tym wyższą skuteczność 3-AB w hamowaniu funkcji PARP względem innych inhibitorów enzymu, jak nikotynamid i tauryna. Tu również nie zaobserwowano istotnych efektów ubocznych działania 3-AB [178]. Istnieją również doniesienia naukowe dotyczące zastosowania 3-AB w celu poprawy lub ochrony funkcji śródbłonna. Yu i wsp. wykorzystali myszy, u których stosowano dietę bogatą w metioninę w celu indukcji hiperhomocysteinemii [179]. Wykazano, że w aortach myszy, które nie otrzymały inhibitora PARP zaobserwowano zmiany charakterystyczne dla dysfunkcji śródbłonna oraz podniesiony poziom endoteliny-1. Natomiast w grupie zwierząt, którym podano dodatkowo 3-AB w dawce 20 mg/kg dziennie zmiany te zostały w istotny sposób zahamowane [179]. Potwierdzono również ogólną poprawę struktury naczynia na poziomie transmisyjnego mikroskopu elektronowego w zakresie ciągłości błony wewnętrznej oraz struktury komórek mięśni gładkich, jednakże obserwowano obrzmienie i wakuolizację cytoplazmy komórek śródbłonna, które charakteryzowały się wyeksponowanymi do światła naczynia i wrębiastymi jądrami komórkowymi [179]. Nie potwierdzono za to żadnych skutków ubocznych samego zastosowania 3-AB. W innym badaniu, opublikowanym przez Mazzon i wsp., komórki HUVEC potraktowano 1 mM 3-AB na 10 min przed ekspozycją na działanie nadtlendioazotynu [180]. Jest to bardzo aktywna cząsteczka, która łatwo wchodzi w reakcje redoks z innymi związkami np. z lipidami błonowymi, niszcząc ich strukturę i przyczyniając się tym samym do rozwoju ED [181]. Zarówno w modelu komórkowym, jak i zwierzęcym, 3-AB istotnie hamował indukowane nadtlendioazotynem zaburzenia funkcji mitochondriów oraz

międzykomórkowych połączeń typu zamykającego. Jednoczenie nie wykazano statystycznie istotnego spadku przeżywalności komórek HUVEC po zastosowaniu 1 mM 3-AB [180]. Powyższe doniesienia nie pokrywają się z rezultatami uzyskanymi w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej, gdzie przy zastosowaniu milimolowych stężeń związku obserwowano drastyczny spadek przeżywalności komórek oraz brak hamowania odpowiedzi na działanie nadtlenu wodoru. Przyczyną tych rozbieżności może być fakt, że Mazzon i wsp. analizowali komórki już po 40 min od dodania 3-AB do medium wzrostowego, podczas gdy efekt działania na komórki EA.hy926 został oceniony po 24 h. Możliwym jest więc, że 3-AB negatywnie wpływa na komórki śródbłónka w dłuższej perspektywie czasu lub zastosowano zbyt wysokie stężenie tego związku. Inną możliwością jest różna odpowiedź pomiędzy pierwotnymi komórkami HUVEC a unieśmiertelnionymi komórkami linii EA.hy926 na działanie 3-AB. Wprawdzie linię komórkową EA.hy926 wyprowadzono poprzez fuzję komórek HUVEC z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549, jednak porównawcza analiza ujawniła różnice w ich wzajemnym wzorcu proteomicznym [182]. Wykazano również różnice w zakresie morfologii komórek, ich adhezji, a także ekspresji genów związanych z różnicowaniem komórek śródbłónka [182,183].

Badania podstawowe obciążone są pewnymi ograniczeniami. W przypadku przedstawionych badań jednym z czynników limitujących jest wykorzystana linia komórkowa. Ze względu na unieśmiertelnienie komórek, badania z ich użyciem są tańsze i prostsze w zaplanowaniu oraz wykonaniu. Stąd linia EA.hy926 pozostaje jednym z szeroko wykorzystywanych modeli śródbłónka. Jednakże materiał ten nie jest pozbawiony wad. W celu zapewnienia najwyższej wiarygodności wyników badania z wykorzystaniem tej linii śródbłónka należy prowadzić na komórkach pochodzących z niskiej liczby pasaży oraz regularnie sprawdzać ekspresję VE-kadheryny jako markera charakterystycznego dla komórek śródbłónka. Dodatkowo same komórki niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549 również charakteryzują się ekspresją kanału TRPM2. Ponadto wykazano, że zmiany poziomu TRPM2 wpływają na odpowiedź tego rodzaju komórek na różne czynniki, takie jak radiacja czy cytostatyki [184,185]. Co więcej, śródbłonek jest grupą niezwykle heterogenną. W zależności od lokalizacji różnić może się ekspresja oraz znaczenie poszczególnych białek dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Komórki HUVEC, a tym samym i pochodząca od nich linia EA.hy926 stanowią raczej model zbliżony do komórek śródbłónka właściwych dla mikrounaczynienia. Warto więc w przyszłości określić czy komórki śródbłónka pochodzące z

większych naczyń krwionośnych oraz naczyń tętniczych odpowiadają na stres oksydacyjny indukowany nadtlaniem wodoru oraz obniżenie lub inhibicję TRPM2 w sposób podobny jak komórki EA.hy926. Naturalnym następnym krokiem wydają się być komórki pierwotne pochodzące z tętnicy wieńcowej. W przypadku tego rodzaju naczyń zaburzenia funkcji barierowej będące objawem dysfunkcji śródbłonna prowadzą do gromadzenia się substancji wewnątrz ściany naczynia. Prowadzi to do zwężenia światła naczynia i rozwoju procesu miażdżycowego.

Elementem, który również warto wprowadzić w eksperymentach z wykorzystaniem śródbłonna jest hodowla w przepływie. Przepływ krwi przez naczynia i jej nacisk na powierzchnię śródbłonna są istotne dla funkcjonowania bariery. Same siły ścinające są w stanie wpłynąć na zachowanie komórek śródbłonna. Stąd w celu utrzymania warunków jak najbardziej zbliżonych do tych fizjologicznych istotna wydaje się być hodowla komórek śródbłonna z wykorzystaniem pomp perystaltycznych imitujących przepływ krwi. Zastosowanie przepływu medium pozwoli również lepiej odzwierciedlić sygnalizację redoks fizjologicznie oddziałującą na komórki śródbłonna. Wiadomo, że lokalna produkcja ROS jest istotna dla funkcjonowania bariery śródbłonkowej i odpowiedzi komórek na zmieniające się warunki. Zarówno podniesienie poziomu ROS, jak późniejszy napływ jonów Ca^{2+} do komórek są zjawiskami ograniczonymi w czasie i przestrzeni. Traktowanie monowarstwy komórek danym stężeniem nadtlenu wodoru może przynieść inne wyniki niż chwilowy stres oksydacyjny oddziałujący na komórki w warunkach fizjologicznych.

Dodatkowym ograniczeniem dotyczącym wszystkich badań nad sygnalizacją wapniową w komórkach są sprzętowe limity w rozdzielczości i szybkości zbierania danych. Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} jest niezwykle szybka. Jony uwalniane są lokalnie z ER i ponownie w niej zamykane. Błonowe kanały jonowe ulegają otwarciu, a pompy jonowe wypompowują wapń z powrotem do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Szybkość tych zjawisk sprawiła, że zaczęto mówić o zjawisku rozbłysków wapniowych ograniczonych do skali submikronowej i submilisekundowej. Zdarzenia takie obserwowane są na przykład w trakcie migracji komórek, gdzie rozbłyski wapniowe korelują z miejscami reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Choć komercyjna dostępność wskaźników jonów Ca^{2+} sprawiła, że stosunkowo łatwo można ocenić zmiany poziomu wapnia w całej objętości komórki. Jednakże, obserwacja rozbłysków wapniowych możliwa jest nadal w niewielu ośrodkach naukowych na świecie, gdyż

wymaga niezwykle czułej i szybkiej aparatury detekcyjnej. Nie każdy wskaźnik daje również możliwość bezpośredniego przełożenia intensywności jego fluorescencji na stężenie jonów Ca^{2+} .

Kolejnym elementem, który należałoby doprecyzować to wpływ inhibitorów TRPM2 oraz enzymu PARP na inne rodzaje komórek. Ekspresję TRPM2 potwierdzono w przypadku wielu różnych typów komórek, w tym w neuronach, komórkach gleju, hepatocytach, czy nabłonku kanalików proksymalnych nerki [153,186,187]. Z kolei enzym PARP jest elementem odpowiedzi komórek na uszkodzenia materiału genetycznego. Rodzi się więc pytanie o potencjalne skutki uboczne systemowego podania tego typu inhibitorów. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano również niewielki spadek żywotności komórek w wyniku podania samych inhibitorów, przy czym efekt ten, w większości przypadków, był zależny od stężenia substancji. Kluczowe więc jest takie dobranie stężeń inhibitorów, by zachować jak największą skuteczność przy jednoczesnej dbałości o bezpieczeństwo stosowania.

6. WNIOSKI

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania pozwoliły na postawienie następujących wniosków:

1. Stres oksydacyjny imitowany poprzez hodowlę komórek EA.hy926 w obecności nadtlenu wodoru w linii EA.hy926 indukuje zmiany charakterystyczne dla dysfunkcji śródbłonna.
2. Obniżenie endogennej ekspresji kanału TRPM2 w komórkach linii EA.hy926 nie wpływa na ich funkcje życiowe oraz organizację cytoszkieletu aktynowego.
3. Obniżenie endogennej ekspresji kanału TRPM2 w komórkach linii EA.hy926 znacząco ogranicza negatywne skutki działania nadtlenu wodoru.
4. Inhibitory TRPM2 (ACA, FFA) i PARP (DPQ) wykazują działanie protekcyjne względem komórek śródbłonna linii EA.hy926 traktowanych nadtlakiem wodoru w podobnym stopniu, co obniżenie endogennej ekspresji.
5. 3-AB w stężeniach milimolowych nasila śmierć komórek śródbłonna linii EA.hy926, co uniemożliwia jego potencjalne wykorzystanie jako inhibitora PARP, a pośrednio również TRPM2 w prewencji i terapii chorób układu krążenia.
6. Błonowy kanał wapniowy TRPM2 może być rozważany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, których podłożem jest stres oksydacyjny.

7. STRESZCZENIE

Prawidłowe funkcjonowanie bariery śródbłonkowej jest jednym z warunków zachowania homeostazy układu sercowo-naczyniowego. W przebiegu dysfunkcji śródbłonka obserwowane są zmiany w adhezji na poziomie komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, organizacji cytoszkieletu, migracji i śmierci komórek, a co za tym idzie, również w przepuszczalności śródbłonka. Jednym z czynników prowadzących do dysfunkcji śródbłonka jest stres oksydacyjny. Skutkiem zaburzeń równowagi oksydoredukcyjnej w komórce jest uszkodzenie cząsteczek lipidów, białek oraz DNA. Nasilone działanie reaktywnych form tlenu prowadzi również do wzrostu poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Jony te stanowią istotny wewnątrzkomórkowy przekaznik informacji, stąd ich stężenie jest ściśle kontrolowane przez liczne kanały i pompy jonowe zlokalizowane w błonie komórkowej i siateczce śródplazmatycznej. Jednym z błonowych kanałów wapniowych, którego aktywację obserwuje się w przebiegu stresu oksydacyjnego jest kanał potencjału receptora przejściowego dla melastatyny 2 (TRPM2, ang. *transient receptor potential melastatin 2*). Najlepiej opisanym aktywatorem TRPM2 jest ADP-ryboza. Wzrost poziomu ADP-rybozy następuje z udziałem enzymów PARP i PARG w odpowiedzi na jednoniciowe pęknięcia w obrębie DNA, co może być skutkiem działania stresu oksydacyjnego. Kanał TRPM2 stanowi więc punkt łączący stres oksydacyjny, jony Ca^{2+} i dysfunkcję śródbłonka.

Celem pracy była ocena znaczenia kanału wapniowego TRPM2 w kontekście funkcjonowania i odpowiedzi komórek śródbłonka naczyniowego na warunki stresu oksydacyjnego, jak również ocena możliwości potencjalnego wykorzystania inhibitorów kanału TRPM2 albo enzymu PARP w prewencji i terapii chorób układu krążenia, których powstawanie związane jest ze stanem dysfunkcji śródbłonka.

Materiałem wykorzystanym w badaniach były modelowe komórki śródbłonka linii EA.hy926. W celu indukcji stresu oksydacyjnego komórki hodowano w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h. W celu manipulacji poziomem ekspresji TRPM2 do komórek wprowadzono siRNA przeciwko TRPM2 wykorzystując technikę elektroporacji metodą nukleofekcji. Jako kontrolę zastosowano zarówno komórki nietransfekowane, jak i transfekowane siRNA o sekwencji niemającej miejsc rozpoznania w ludzkich mRNA. Różnice w odpowiedzi komórek na działanie nadtlenu wodoru wobec ekspresji TRPM2 badano w zakresie: ich żywotności,

rodzaju indukowanej śmierci, wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , zdolności migracyjnych, poziomu i lokalizacji wybranych białek połączeń międzykomórkowych oraz organizacji cytoszkieletu aktynowego. W celu obniżenia aktywności kanału TRPM2 wykorzystano wstępną inkubację komórek z inhibitorami kanału (kwas N-(p-Amylocynamoilo)antranilowy – ACA oraz kwas flufenamowy – FFA) lub enzymu PARP (3-amonobenzamid – 3-AB oraz 3,4-dihydro-5[4-(1-piperydynylo)butoksy]-1(2H)-izochinolinon – DPQ) na 30 min przed ekspozycją komórek na działanie nadtlenu wodoru. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w medium wzrostowym bez dodatku nadtlenu wodoru. Odpowiedź komórek na wybrane inhibitory TRPM2 albo PARP, nadtlenek wodoru oraz kombinację danego inhibitora i nadtlenu wodoru oceniono z wykorzystaniem: testu MTT, w zakresie zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego, rodzaju indukowanej śmierci komórek, potencjału migracyjnego oraz znakowania fluorescencyjnego wybranych białek połączeń międzykomórkowych oraz cytoszkieletu aktynowego. Stężenia zastosowanych inhibitorów TRPM2 lub PARP oraz nadtlenu wodoru zostały wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz wyników testu MTT.

Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTT wykazała, że w grupie komórek nietransfekowanych po potraktowaniu nadtlakiem wodoru dochodzi do spadku ich aktywności metabolicznej w sposób zależny od stężenia. Podobnie, komórki transfekowane siRNA kontrolnym odpowiadały na wybrane stężenia nadtlenu wodoru w sposób zbliżony do komórek nietransfekowanych. Z kolei komórki transfekowane siRNA przeciwko TRPM2 cechowały się wyższą żywotnością w porównaniu do grupy komórek nietransfekowanych lub transfekowanych siRNA kontrolnym potraktowanych poszczególnymi stężeniami nadtlenu wodoru. Obniżenie aktywności kanału TRPM2 poprzez wstępną inkubację komórek z wybranymi inhibitorami kanału TRPM2 albo enzymu PARP hamowało również negatywne oddziaływanie nadtlenu wodoru na komórki linii EA.hy926. Wyjątkiem był 3-AB, który indukował znaczny spadek żywotności komórek linii EA.hy926 i nie wykazywał działania protekcyjnego względem obecności nadtlenu wodoru w medium wzrostowym, przez co wyeliminowano go z dalszych badań. Na podstawie wyników testu MTT, do kolejnych eksperymentów wybrano stężenie 100 μM nadtlenu wodoru, jako najniższe, dla którego zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w odpowiedzi komórek nietransfekowanych oraz z obniżoną aktywnością lub poziomem TRPM2. Podwójne barwienie komórek aneksyną

V i jodkiem propidyny wykazało, że hodowla komórek linii EA.hy926 w obecności nadtlenu wodoru indukuje śmierć komórek na drodze apoptozy, co było widoczne zarówno w grupie komórek nietransfekowanych oraz transfekowanych siRNA kontrolnym. W przypadku komórek transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w odsetku komórek apoptotycznych pomiędzy nietraktowaną kontrolą a komórkami hodowanymi w obecności nadtlenu wodoru. Indukowana nadtlaniem wodoru śmierć komórek na drodze apoptozy została również efektywnie zahamowana poprzez zastosowanie wybranych inhibitorów kanału TRPM2 albo enzymu PARP. Ponadto, nadtlenek wodoru skutkował szybkim wzrostem fluorescencji wskaźnika jonów Ca^{2+} w komórkach nietransfekowanych. Efekt ten został znacząco ograniczony w komórkach transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2. Cytometryczna ocena intensywności fluorescencji PI w obecności RNAz wykazała zmianę w zakresie rozkładu cyklu komórek traktowanych nadtlaniem wodoru przez 24 h względem komórek kontrolnych. Inkubacja komórek z ACA i FFA nie powodowała widocznych zmian w zakresie rozkładu cyklu komórkowego w odniesieniu do kontroli. Natomiast w przypadku komórek poddanych działaniu DPQ, zaobserwowano niewielki wzrost ilości komórek o zawartości DNA specyficznej dla tych, które znajdują się pomiędzy fazą G1 a G2 cyklu. Nie zaobserwowano zmian w odniesieniu do komórek kontrolnych w zakresie rozkładu cyklu komórek potraktowanych ACA, FFA oraz DPQ a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru przez 24 h. Testy migracyjne, tj. test gojenia się ran oraz test migracji wobec środowiska chemoatrakcyjnego, wykazały, że hodowla komórek linii EA.hy926 w obecności 100 μM nadtlenu wodoru przez 24 h skutkuje ograniczeniem zdolności migracyjnych komórek. W grupie komórek nietransfekowanych po potraktowaniu ich 100 μM nadtlaniem wodoru zaobserwowano istotne statystycznie różnice względem kontroli w powierzchni ran w wybranych punktach czasowych oraz zmniejszenie ilości komórek zdolnych do migracji przez membranę insertów o porach wielkości 3 μm . W przypadku komórek transfekowanych siRNA przeciwko TRPM2 również widoczny był niewielki spadek zdolności migracyjnych komórek, jednak różnice te nie były znaczące względem komórek kontrolnych. Hodowla komórek w obecności wybranych inhibitorów TRPM2 albo PARP nie wpływała istotnie na zdolność ruchu komórek. W przypadku komórek potraktowanych wstępnie inhibitorami przez 30 min, a następnie hodowanych w obecności nadtlenu wodoru, potwierdzono skuteczne ograniczenie negatywnego oddziaływania nadtlenu wodoru na migrację komórek. Wykorzystany do badań inhibitor enzymu PARP – DPQ, najskuteczniej

hamował ograniczenie migracji komórek spowodowane działaniem nadtlenu wodoru. Fluorescencyjne znakowanie białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych oraz cytoszkieletu aktynowego wykazało, że potraktowanie komórek nadtlakiem wodoru skutkowało przekształceniem się wzoru połączeń międzykomórkowych na rozkład punktowy. Co więcej, utrata komórek poprzez ich śmierć na drodze apoptozy oraz ograniczenie ciągłości połączeń międzykomórkowych skutkowało pojawieniem się dodatkowych przestrzeni pomiędzy komórkami. Obniżenie poziomu TRPM2 wykazywało działanie protekcyjne względem monowarstwy komórkowej. Nawet pod wpływem działania nadtlenu wodoru, zachowany został ciągły charakter połączeń międzykomórkowych oraz nie obserwowano istotnie większych przestrzeni pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Nie widać było również zwiększonej ilości komórek o cechach śmierci na drodze apoptozy. Wprawdzie w przypadku komórek potraktowanych wybranymi inhibitorami TRPM2 albo PARP 30 min przed właściwym traktowaniem nadtlakiem wodoru przez 24 h zaobserwowano cechy poliploidii wyrażone obecnością dodatkowych mikrojąder, to zmiany te nie były jednak tak nasilone jak w przypadku komórek potraktowanych wyłącznie nadtlakiem wodoru. Co więcej, obserwowano wyraźnie mniej komórek o cechach sugerujących śmierć komórek na drodze apoptozy, a gęstość monowarstwy oraz ciągłość struktury połączeń międzykomórkowych była zbliżona do tej obserwowanej w kontroli. Wyniki te potwierdzono wykorzystując ocenę potranslacyjnej ekspresji białek metodą Western blot. W komórkach nietransfekowanych po potraktowaniu ich nadtlakiem wodoru 100 μ M przez 24 h potwierdzono znaczący spadek ekspresji białek wchodzących w skład połączeń międzykomórkowych, czego nie potwierdzono dla żadnej z pozostałych grup badanych.

Uzyskane wyniki wskazują, że stres oksydacyjny imitowany w komórkach linii EA.hy926 poprzez traktowanie ich nadtlakiem wodoru prowadzi do zmian charakterystycznych dla dysfunkcji śródbłona. Ograniczenie poziomu kanału TRPM2 poprzez transfekcję komórek siRNA przeciwko TRPM2 oraz zmniejszenie aktywności kanału z wykorzystaniem inhibitorów TRPM2 albo PARP wykazują działanie protekcyjne względem komórek śródbłona linii EA.hy926 traktowanych nadtlakiem wodoru. Błonowy kanał wapniowy TRPM2 może więc być rozważany jako potencjalny cel terapeutyczny w prewencji i terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, których podłożem jest stres oksydacyjny. Ponadto, wykorzystane w badaniach inhibitory kanału TRPM2 (ACA i FFA) lub enzymu PARP (DPQ) skutecznie hamują

odpowieć komórek linii EA.hy926 na działanie nadtlenu wodoru, jednak możliwość ich aplikacji klinicznej wymaga dalszych badań.

8. SUMMARY

The proper functioning of the endothelial barrier is one of the conditions for maintaining homeostasis of the cardiovascular system. In the course of endothelial dysfunction, changes in cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion, cytoskeleton organization, cell migration and death, and thus also in endothelial permeability are observed. One of the factors leading to endothelial dysfunction is oxidative stress. The result of redox imbalance in the cell is damage to lipids, proteins and DNA molecules. Increased activity of reactive oxygen species also leads to an increase in the level of Ca^{2+} in the cytoplasm. These ions are an important intracellular messenger, hence their concentration is strictly controlled by numerous channels and ion pumps located in the cell membrane and endoplasmic reticulum. One of the membrane calcium channels, which activation is observed in the course of oxidative stress is the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel. The best described TRPM2 activator is ADP-ribose. The increase in the level of ADP-ribose occurs with the participation of PARP and PARG enzymes in response to single-strand breaks within the DNA, which may be the result of oxidative stress. Thus, the TRPM2 channel is the connector between oxidative stress, Ca^{2+} ions and endothelial dysfunction.

The study aimed to assess the role of the TRPM2 calcium channel in the context of the functioning and response of vascular endothelial cells to oxidative stress conditions, as well as to assess the potential use of TRPM2 channel or the PARP enzyme inhibitors in the prevention and treatment of cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction.

The material used in the study were model endothelial cells of the EA.hy926 cell line. To induce oxidative stress, the cells were cultured in the presence of hydrogen peroxide for 24 h. Downregulation of TRPM2 channel was performed using TRPM2 siRNA introduced into the cells using nucleofection and electroporation technique. Both non-transfected and transfected cells with siRNA sequences lacking human mRNA recognition sites were used as controls. Differences in the response of cells to hydrogen peroxide to TRPM2 expression were examined in terms of: cell viability, type of induced death, intracellular level of Ca^{2+} ions, migration potential, level and localization of selected junctional proteins and organization of the actin cytoskeleton. In order to reduce the activity of the TRPM2 channel, cells were pre-incubated with channel inhibitors (N-(p-Amylcinnamoyl)anthranilic acid – ACA and flufenamic acid – FFA) or the PARP enzyme (3-amonobenzamide – 3-AB and 3,4-dihydro-5 [4-(1-

piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone – DPQ) 30 min before exposing the cells to hydrogen peroxide. Cells cultured in growth medium without the addition of hydrogen peroxide served as a control. The response of cells to selected TRPM2 or PARP inhibitors, hydrogen peroxide and a combination of a given inhibitor and hydrogen peroxide was assessed using: the MTT assay, in terms of changes in the distribution of cell cycle phases, type of induced cell death, migration potential and fluorescent labeling of selected junctional proteins and the F-actin cytoskeleton. The concentrations of the TRPM2 or PARP inhibitors and hydrogen peroxide used were selected on the basis of available literature data and the results of the MTT assay.

The assessment of cell viability using the MTT assay showed that in the group of non-transfected cells, after treatment with hydrogen peroxide, their metabolic activity decreases in a concentration-dependent manner. The response of cells transfected with control siRNA responded to selected concentrations of hydrogen peroxide was similar to non-transfected cells. In turn, cells transfected with TRPM2 siRNA were characterized by higher viability compared to the group of non-transfected or control siRNA-transfected cells treated with hydrogen peroxide. Reducing the activity of the TRPM2 channel by pre-incubation of cells with selected inhibitors of the TRPM2 channel or the PARP enzyme also inhibited the negative effect of hydrogen peroxide on EA.hy926 cells. The exception was 3-AB, which induced a significant decrease in cell viability of the EA.hy926 cells and did not show a protective effect against the presence of hydrogen peroxide in the growth medium, which was why it was eliminated from further research. Based on the results of the MTT assay, the concentration of 100 μ M hydrogen peroxide was selected for subsequent experiments as the lowest concentration for which a statistically significant difference was observed in the response of non-transfected cells and cells with reduced TRPM2 activity or level. Double staining of cells with annexin V and propidium iodide showed that culture of EA.hy926 cells in the presence of hydrogen peroxide induces apoptotic cell death, which was visible in the group of non-transfected and control siRNA-transfected cells. For cells transfected with TRPM2 siRNA, there was no statistically significant difference in the percentage of apoptotic cells between untreated control and cells cultured in the presence of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death was also effectively limited by the use of selected inhibitors of the TRPM2 channel or the PARP enzyme. In addition, hydrogen peroxide resulted in a rapid increase in fluorescence of the Ca^{2+} ion indicator in non-transfected cells. This effect was significantly reduced in cells transfected with TRPM2 siRNA. Cytometric evaluation of PI

fluorescence intensity in the presence of RNase showed a change in cycle distribution of cells treated with hydrogen peroxide for 24 h compared to control cells. Incubation of cells with ACA and FFA resulted in no apparent changes in cell cycle distribution relative to controls. In contrast, in the case of cells treated with DPQ, a slight increase in the number of cells with DNA content specific to those between the G1 and G2 phase of the cycle was observed. No changes were confirmed in relation to control cells in terms of cell cycle distribution in groups of cells treated with ACA, FFA and DPQ and then cultured in the presence of hydrogen peroxide for 24 h. Wound-healing and transwell migration assays showed that the culture of EA.hy926 cells in the presence of 100 μ M hydrogen peroxide for 24 h results in a reduction in the migratory capacity of the cells. In the group of non-transfected cells, after treating them with 100 μ M hydrogen peroxide, statistically significant differences were observed in relation to the control in the wound area at selected time points as well as a decrease in the number of cells able to migrate through the membrane of inserts with pores of 3 μ m. In the case of cells transfected with TRPM2 siRNA there was also a slight decrease in the migratory potential of the cells, but these differences were not significant comparing to control cells. Cell culture in the presence of selected TRPM2 or PARP inhibitors did not significantly affect the motility of the cells. In the case of cells pretreated with inhibitors for 30 min and then cultured in the presence of hydrogen peroxide, the negative effect of hydrogen peroxide on cell migration was limited. The inhibitor of the PARP enzyme – DPQ almost blocked the reduction of cell migration caused by hydrogen peroxide. Fluorescent labeling of junctional proteins and the actin cytoskeleton showed that treatment of cells with hydrogen peroxide resulted in the conversion of the intercellular junction pattern into a punctuate distribution. Moreover, the loss of cells through apoptosis and the reduction of the continuity of intercellular connections resulted in the appearance of additional spaces between cells. Downregulation of TRPM2 showed a protective effect on the cell monolayer. Even under the influence of hydrogen peroxide, the continuous nature of intercellular connections was preserved and no significantly larger spaces between adjacent cells were observed. There was also no increase in the number of cells with features of apoptosis. However, in the case of cells treated with selected TRPM2 or PARP inhibitors 30 min before treatment with hydrogen peroxide for 24 h, features of polyploidy were observed, expressed by the presence of additional micronuclei, but these changes were not as intense as in the case of cells treated only with hydrogen peroxide. Moreover, significantly fewer cells with features suggestive of apoptosis were

observed, while the density of the monolayer and the continuity of the structure of intercellular junctions were similar to those observed in the control. These results were confirmed by assessing post-translational protein expression by Western blot. In non-transfected cells, after treating them with 100 μ M hydrogen peroxide for 24 h, a significant decrease in the expression of intercellular junctions proteins was confirmed, which was not observed for any of the other study group.

The obtained results indicate that oxidative stress in EA.hy926 cells leads to changes characteristic of endothelial dysfunction. Downregulation of TRPM2 channel by transfection with TRPM2 siRNA and reduction of its activity using TRPM2 or PARP inhibitors show a protective effect on endothelial cells of the EA.hy926 cell line treated with hydrogen peroxide. The TRPM2 channel may therefore be considered as a potential therapeutic target in the prevention and therapy of cardiovascular diseases caused by oxidative stress. In addition, the inhibitors of the TRPM2 channel (ACA and FFA) or the PARP enzyme (DPQ) used in the research effectively inhibit the response of EA.hy926 cells to hydrogen peroxide, but the possibility of their clinical application requires further research.

9. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 787/2019

Bydgoszcz, 19.11.2019 r.

Działając na podstawie art.29 Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), zarządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U.Nr 47 poz.480) oraz Zarządzeniem Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **19.11.2019 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- **prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka, dr n. med. Maciej Gagat,**
mgr Wioletta Zielińska,

w sprawie badania:

„Rola jonów wapnia w reakcji zapalnej ludzkiego śródbłonka naczyń krwionośnych.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (19.11.2019 r.) do końca 2024r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii.

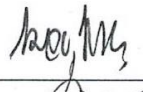
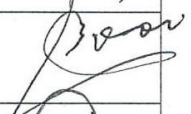
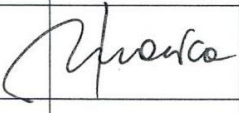
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 19.11.2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	Przewodniczący <i>medycyna sądowa</i>	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	Z – ca przewodniczącego <i>prawniczka</i>	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	<i>pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca</i>	
4.	Prof. dr hab. med. Anna Balcar-Boroń	<i>pediatria, nefrologia</i>	
5.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	<i>położnictwo, ginekologia onkologiczna</i>	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	<i>chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna</i>	
7.	Dr hab. n. med. Katarzyna Pawlak-Osińska, prof. UMK	<i>organizacja ochrony zdrowia, otolaryngologia</i>	
8.	Dr hab. n. med. Maria Kłopotka	<i>choroby wewnętrzne, gastroenterologia</i>	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	<i>duchowny</i>	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	<i>pediatria, choroby płuc</i>	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	<i>prawniczka</i>	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	<i>farmaceutka</i>	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	<i>pielęgniarska</i>	

10. LITERATURA

1. Le Guelte A, Gavard J. Role of endothelial cell-cell junctions in endothelial permeability. *Methods Mol Biol.* 2011;763:265–79.
2. Hellenthal KEM, Brabenec L, Wagner NM. Regulation and Dysregulation of Endothelial Permeability during Systemic Inflammation. *Cells.* 15 czerwiec 2022;11(12):1935.
3. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci.* 8 kwiecień 2021;22(8):3850.
4. Incalza MA, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* styczeń 2018;100:1–19.
5. Ježek P, Holendová B, Plecítá-Hlavatá L. Redox Signaling from Mitochondria: Signal Propagation and Its Targets. *Biomolecules.* 6 styczeń 2020;10(1):93.
6. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *Biomed Res Int.* 2014;2014:404680.
7. Shaito A, Aramouni K, Assaf R, Parenti A, Orekhov A, Yazbi AE, i in. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front Biosci (Landmark Ed).* 18 marzec 2022;27(3):105.
8. Islam MS. Calcium Signaling: From Basic to Bedside. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1131:1–6.
9. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell.* 16 wrzesień 2013;26(5):441–54.
10. Takeda S, Fujiwara I, Sugimoto Y, Oda T, Narita A, Maéda Y. Novel inter-domain Ca²⁺-binding site in the gelsolin superfamily protein fragmin. *J Muscle Res Cell Motil.* marzec 2020;41(1):153–62.
11. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, i in. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 6 listopad 2020;21(21):E8323.
12. Thakore P, Earley S. Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol.* 12 czerwiec 2019;9(3):1249–77.
13. Ramirez GA, Coletto LA, Sciorati C, Bozzolo EP, Manunta P, Rovere-Querini P, i in. Ion Channels and Transporters in Inflammation: Special Focus on TRP Channels and TRPC6. *Cells.* 4 lipiec 2018;7(7):70.
14. Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Role of TRPM2 Channel in Mediating H₂O₂-Induced Ca²⁺ Entry and Endothelial Hyperpermeability. *Circulation Research.* 15 luty 2008;102(3):347–55.

15. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 13 marzec 2007;115(10):1285–95.
16. Kuzu I, Bicknell R, Fletcher CD, Gatter KC. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab Invest*. wrzesień 1993;69(3):322–8.
17. Otani T, Nguyen TP, Tokuda S, Sugihara K, Sugawara T, Furuse K, i in. Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J Cell Biol*. 7 październik 2019;218(10):3372–96.
18. Liang GH, Weber CR. Molecular aspects of tight junction barrier function. *Curr Opin Pharmacol*. grudzień 2014;19:84–9.
19. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. luty 2008;28(2):223–32.
20. Campbell HK, Maier JL, DeMali KA. Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res*. 1 wrzesień 2017;358(1):39–44.
21. Gemel J, Mao Y, Lapping-Carr G, Beyer EC. Gap Junctions between Endothelial Cells Are Disrupted by Circulating Extracellular Vesicles from Sickle Cell Patients with Acute Chest Syndrome. *Int J Mol Sci*. 24 listopad 2020;21(23):8884.
22. Cerutti C, Ridley AJ. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res*. 1 wrzesień 2017;358(1):31–8.
23. M F. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. maj 2016;67(5).
24. Le NT, Abe JI. MicroRNA 199a and the eNOS (Endothelial NO Synthase)/NO Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. październik 2018;38(10):2278–80.
25. Tenopoulou M, Doulias PT. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-1190.
26. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol*. styczeń 2008;93(1):141–7.
27. Puybasset L, Béa ML, Ghaleh B, Giudicelli JF, Berdeaux A. Coronary and systemic hemodynamic effects of sustained inhibition of nitric oxide synthesis in conscious dogs. Evidence for cross talk between nitric oxide and cyclooxygenase in coronary vessels. *Circ Res*. sierpień 1996;79(2):343–57.
28. da Costa TJ, Echem C, Colli LG, Akamine EH, Dantas AP, de Carvalho MHC. Chapter 6 - Characteristics of the Endothelium in Both Sexes. W: Da Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, redaktorzy. *Endothelium and Cardiovascular Diseases*. Academic Press; 2018; 63–81.

29. Nawate S, Fukao M, Sakuma I, Soma T, Nagai K, Takikawa O, i in. Reciprocal changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide-system in the mesenteric artery of adult female rats following ovariectomy. *Br J Pharmacol.* styczeń 2005;144(2):178–89.
30. Davis CM, Siler DA, Alkayed NJ. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. *Womens Health (Lond).* maj 2011;7(3):293–303.
31. Fleming I. Myoendothelial Gap Junctions. *Circulation Research.* 18 luty 2000;86(3):249–50.
32. Khimji A karim, Rockey DC. Endothelin—Biology and disease. *Cellular Signalling.* 1 listopad 2010;22(11):1615–25.
33. Kalles V, Papapanagiotou I, Matiatou M, Georgiou G, Theodoropoulos C, Triantafyllou T, i in. Evaluation of plasma and tissue expression levels of Endothelins (ET-1, Big ET-1) and VEGF in lobular neoplasia of the breast. *J BUON.* 2019;24(5):1913–9.
34. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* czerwiec 2005;43(1):19–29.
35. Liu J, Zhuang T, Pi J, Chen X, Zhang Q, Li Y, i in. Endothelial Forkhead Box Transcription Factor P1 Regulates Pathological Cardiac Remodeling Through Transforming Growth Factor- β 1-Endothelin-1 Signal Pathway. *Circulation.* 20 sierpień 2019;140(8):665–80.
36. Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF- α . *Am J Physiol.* kwiecień 1992;262(4 Pt 1):C854-861.
37. Müller DN, Fiebeler A, Park JK, Dechend R, Luft FC. Angiotensin II and endothelin induce inflammation and thereby promote hypertension-induced end-organ damage. *Clin Nephrol.* lipiec 2003;60 Suppl 1:S2-12.
38. Strawbridge AB, Elmendorf JS, Mather KJ. Interactions of endothelin and insulin: expanding parameters of insulin resistance. *Curr Diabetes Rev.* sierpień 2006;2(3):317–27.
39. Sumner MJ, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol.* listopad 1992;107(3):858–60.
40. Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):295–329.
41. Coletti D, Silvestroni L, Naro F, Molinaro M, Adamo S, Palleschi S. Vesicle-mediated phosphatidylcholine reapposition to the plasma membrane following hormone-induced phospholipase D activation. *Exp Cell Res.* 10 kwiecień 2000;256(1):94–104.

42. Friedlaender MM, Jain D, Ahmed Z, Hart D, Barnett RL, Nord EP. Endothelin activation of phospholipase D: dual modulation by protein kinase C and Ca²⁺. *Am J Physiol.* maj 1993;264(5 Pt 2):F845-853.
43. Walter M, Reinecke H, Gerdes U, Nofer JR, Höbbel G, Seedorf U, i in. Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms. *J Clin Invest.* 15 listopad 1996;98(10):2315–23.
44. Pulido T, Zayas N, de Mendieta MA, Plascencia K, Escobar J. Medical therapies for pulmonary arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* maj 2016;21(3):273–83.
45. Filippi MD. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood.* 16 maj 2019;133(20):2149–58.
46. Choe K, Moon J, Lee SY, Song E, Back JH, Song JH, i in. Stepwise transmigration of T- and B cells through a perivascular channel in high endothelial venules. *Life Sci Alliance.* sierpień 2021;4(8):e202101086.
47. Metzemaekers M, Gouwy M, Proost P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol.* maj 2020;17(5):433–50.
48. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* 20 listopad 2014;41(5):694–707.
49. He P. Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? *Cardiovasc Res.* 15 lipiec 2010;87(2):281–90.
50. Demir R, Yaba A, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem.* maj 2010;112(3):203–14.
51. Fan Z, Turiel G, Ardicoglu R, Ghobrial M, Masschelein E, Kocijan T, i in. Exercise-induced angiogenesis is dependent on metabolically primed ATF3/4+ endothelial cells. *Cell Metab.* 7 wrzesień 2021;33(9):1793-1807.e9.
52. Zabrzynski J, Gagat M, Paczesny L, Grzanka D, Huri G. Correlation between smoking and neovascularization in biceps tendinopathy: a functional preoperative and immunohistochemical study. *Therapeutic Advances in Chronic Disease.* 1 styczeń 2020;11:2040622320956418.
53. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Miha C, Istrate M, i in. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455–67.
54. de Heer EC, Jalving M, Harris AL. HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest.* 1 październik 2020;130(10):5074–87.

55. Calabrese C, Bocchino V, Vatrella A, Marzo C, Guarino C, Mascitti S, i in. Evidence of angiogenesis in bronchial biopsies of smokers with and without airway obstruction. *Respir Med.* sierpień 2006;100(8):1415–22.
56. Pfarrer C, Macara L, Leiser R, Kingdom J. Adaptive angiogenesis in placentas of heavy smokers. *Lancet.* 24 lipiec 1999;354(9175):303.
57. Rinderknecht H, Nussler AK, Steinestel K, Histing T, Ehnert S. Smoking Impairs Hematoma Formation and Dysregulates Angiogenesis as the First Steps of Fracture Healing. *Bioengineering (Basel).* 24 kwiecień 2022;9(5):186.
58. Su Y, Cao W, Han Z, Block ER. Cigarette smoke extract inhibits angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells: the role of calpain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* październik 2004;287(4):L794-800.
59. Gagat M, Zielińska W, Mikołajczyk K, Zabrzyński J, Krajewski A, Klimaszewska-Wiśniewska A, i in. CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of TPM1 Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α . *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:668032.
60. Gagat M, Grzanka D, Izdebska M, Grzanka A. Effect of L-homocysteine on endothelial cell-cell junctions following F-actin stabilization through tropomyosin-1 overexpression. *Int J Mol Med.* lipiec 2013;32(1):115–29.
61. Gagat M, Grzanka D, Izdebska M, Sroka WD, Marszał MP, Grzanka A. Tropomyosin-1 protects endothelial cell-cell junctions against cigarette smoke extract through F-actin stabilization in EA.hy926 cell line. *Acta Histochem.* maj 2014;116(4):606–18.
62. Modun D, Giustarini D, Tsikas D. Nitric oxide-related oxidative stress and redox status in health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:129651.
63. Wang L, Cheng CK, Yi M, Lui KO, Huang Y. Targeting endothelial dysfunction and inflammation. *J Mol Cell Cardiol.* lipiec 2022;168:58–67.
64. Vitverova B, Blazickova K, Najmanova I, Vicen M, Hyšpler R, Dolezelova E, i in. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis.* kwiecień 2018;271:15–25.
65. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int.* 2014;2014:406960.
66. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes.* maj 2017;9(5):434–49.
67. Plank MJ, Wall DJN, David T. Atherosclerosis and calcium signalling in endothelial cells. *Prog Biophys Mol Biol.* lipiec 2006;91(3):287–313.
68. Harraz OF, Jensen LJ. Vascular calcium signalling and ageing. *J Physiol.* grudzień 2021;599(24):5361–77.

69. Avdonin PV, Rybakova EY, Avdonin PP, Trufanov SK, Mironova GY, Tsitrina AA, i in. VAS2870 Inhibits Histamine-Induced Calcium Signaling and vWF Secretion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Cells*. 23 luty 2019;8(2):196.
70. Wei XN, Han BC, Zhang JX, Liu XH, Tan CY, Jiang YY, i in. An integrated mathematical model of thrombin-, histamine-and VEGF-mediated signalling in endothelial permeability. *BMC Syst Biol*. 15 lipiec 2011;5:112.
71. Qu YY, Wang LM, Zhong H, Liu YM, Tang N, Zhu LP, i in. TRPC1 stimulates calcium-sensing receptor-induced store-operated Ca^{2+} entry and nitric oxide production in endothelial cells. *Mol Med Rep*. październik 2017;16(4):4613–9.
72. Abdullaev IF, Bisaillon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M. Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 21 listopad 2008;103(11):1289–99.
73. Ding Y, Winters A, Ding M, Graham S, Akopova I, Muallem S, i in. Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J Biol Chem*. 9 wrzesień 2011;286(36):31799–809.
74. Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. Ca^{2+} signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol*. 1 czerwiec 2001;533(Pt 2):433–45.
75. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, i in. Endothelial Cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Function as Signaling Receptors. *J Cell Biol*. 7 wrzesień 1998;142(5):1381–91.
76. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. listopad 2013;17(3):638–50.
77. Weber EW, Han F, Tauseef M, Birnbaumer L, Mehta D, Muller WA. TRPC6 is the endothelial calcium channel that regulates leukocyte transendothelial migration during the inflammatory response. *J Exp Med*. 19 październik 2015;212(11):1883–99.
78. Kielbassa K, Schmitz C, Gerke V. Disruption of endothelial microfilaments selectively reduces the transendothelial migration of monocytes. *Exp Cell Res*. 25 sierpień 1998;243(1):129–41.
79. Saito H, Minamiya Y, Kitamura M, Saito S, Enomoto K, Terada K, i in. Endothelial myosin light chain kinase regulates neutrophil migration across human umbilical vein endothelial cell monolayer. *J Immunol*. 1 sierpień 1998;161(3):1533–40.
80. Stevens T. Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells. *Proc Am Thorac Soc*. listopad 2011;8(6):453–7.
81. Earley S, Brayden JE. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol Rev*. kwiecień 2015;95(2):645–90.

82. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, i in. LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell*. styczeń 2002;9(1):163–73.
83. Zhang W, Chu X, Tong Q, Cheung JY, Conrad K, Masker K, i in. A Novel TRPM2 Isoform Inhibits Calcium Influx and Susceptibility to Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*. 2 maj 2003;278(18):16222–9.
84. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Lückhoff A. Activation of the Cation Channel Long Transient Receptor Potential Channel 2 (LTRPC2) by Hydrogen Peroxide: A SPLICE VARIANT REVEALS A MODE OF ACTIVATION INDEPENDENT OF ADP-RIBOSE. *Journal of Biological Chemistry*. 28 czerwiec 2002;277(26):23150–6.
85. Fliegert R, Bauche A, Wolf Pérez AM, Watt JM, Rozewitz MD, Winzer R, i in. 2'-Deoxyadenosine 5'-diphosphoribose is an endogenous TRPM2 superagonist. *Nat Chem Biol*. wrzesień 2017;13(9):1036–44.
86. Tong Q, Zhang W, Conrad K, Mostoller K, Cheung JY, Peterson BZ, i in. Regulation of the Transient Receptor Potential Channel TRPM2 by the Ca²⁺ Sensor Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*. 7 kwiecień 2006;281(14):9076–85.
87. Zhang H, Yu P, Lin H, Jin Z, Zhao S, Zhang Y, i in. The Discovery of Novel ACA Derivatives as Specific TRPM2 Inhibitors that Reduce Ischemic Injury Both In Vitro and In Vivo. *J Med Chem*. 8 kwiecień 2021;64(7):3976–96.
88. Miyanohara J, Kakae M, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, Arai K, i in. TRPM2 Channel Aggravates CNS Inflammation and Cognitive Impairment via Activation of Microglia in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *J Neurosci*. 4 kwiecień 2018;38(14):3520–33.
89. Zeng X, Sikka SC, Huang L, Sun C, Xu C, Jia D, i in. Novel role for the transient receptor potential channel TRPM2 in prostate cancer cell proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. czerwiec 2010;13(2):195–201.
90. Sun L, Yau HY, Wong WY, Li RA, Huang Y, Yao X. Role of TRPM2 in H₂O₂-Induced Cell Apoptosis in Endothelial Cells. *PLoS One*. 20 sierpień 2012;7(8).
91. Zhao Q, Li J, Ko WH, Kwan YW, Jiang L, Sun L, i in. TRPM2 promotes autophagic degradation in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep*. 26 listopad 2020;10.
92. Kühn FJP, Lückhoff A. Sites of the NUDT9-H Domain Critical for ADP-ribose Activation of the Cation Channel TRPM2. *Journal of Biological Chemistry*. 5 listopad 2004;279(45):46431–7.
93. Zielińska W, Zabrzyński J, Gagat M, Grzanka A. The Role of TRPM2 in Endothelial Function and Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 16 lipiec 2021;22(14):7635.
94. Perraud AL, Shen B, Dunn CA, Rippe K, Smith MK, Bessman MJ, i in. NUDT9, a Member of the Nudix Hydrolase Family, Is an Evolutionarily Conserved Mitochondrial ADP-ribose Pyrophosphatase. *Journal of Biological Chemistry*. styczeń 2003;278(3):1794–801.

95. Bian C, Zhang C, Luo T, Vyas A, Chen SH, Liu C, i in. NADP+ is an endogenous PARP inhibitor in DNA damage response and tumor suppression. *Nat Commun.* 11 luty 2019;10(1):693.
96. Harrison D, Gravells P, Thompson R, Bryant HE. Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vs. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) – Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 28 sierpień 2020;7.
97. Fliegert R, Watt JM, Schöbel A, Rozewitz MD, Moreau C, Kirchberger T, i in. Ligand-induced activation of human TRPM2 requires the terminal ribose of ADPR and involves Arg1433 and Tyr1349. *Biochemical Journal.* 16 czerwiec 2017;474(13):2159–75.
98. Wang L, Fu TM, Zhou Y, Xia S, Greka A, Wu H. Structures and gating mechanism of human TRPM2. *Science [Internet].* 21 grudzień 2018;362(6421).
99. Luo Y huan, Yu X fei, Ma C, Yang F, Yang W. Effects of calcium-binding sites in the S2–S3 loop on human and *Nematostella vectensis* TRPM2 channel gating processes. *J Zhejiang Univ Sci B.* 1 grudzień 2019;20(12):972–82.
100. Fliegert R, Riekehr WM, Guse AH. Does Cyclic ADP-Ribose (cADPR) Activate the Non-selective Cation Channel TRPM2? *Front Immunol.* 11 sierpień 2020;11.
101. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-Ribose and Hydrogen Peroxide Synergize with ADP-Ribose in the Activation of TRPM2 Channels. *Molecular Cell.* 1 kwiecień 2005;18(1):61–9.
102. Heiner I, Eisfeld J, Warnstedt M, Radukina N, Jüngling E, Lückhoff A. Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochemical Journal.* 15 sierpień 2006;398(2):225–32.
103. Yu P, Liu Z, Yu X, Ye P, Liu H, Xue X, i in. Direct Gating of the TRPM2 Channel by cADPR via Specific Interactions with the ADPR Binding Pocket. *Cell Reports.* 18 czerwiec 2019;27(12):3684-3695.e4.
104. Tóth B, Iordanov I, Csanády L. Ruling out pyridine dinucleotides as true TRPM2 channel activators reveals novel direct agonist ADP-ribose-2'-phosphate. *J Gen Physiol.* maj 2015;145(5):419–30.
105. Huang Y, Roth B, Lü W, Du J. Ligand recognition and gating mechanism through three ligand-binding sites of human TRPM2 channel. *eLife.* 12 września 2019;8.
106. Huang Y, Winkler PA, Sun W, Lü W, Du J. Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium. *Nature.* październik 2018;562(7725):145–9.
107. Tan CH, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature.* 25 sierpień 2016;536(7617):460–3.

108. Mittal M, Nepal S, Tsukasaki Y, Hecquet CM, Soni D, Rehman J, i in. Neutrophil Activation of Endothelial Cell-Expressed TRPM2 Mediates Transendothelial Neutrophil Migration and Vascular Injury. *Circulation Research*. 13 październik 2017;121(9):1081–91.
109. Mittal M, Urao N, Hecquet CM, Zhang M, Sudhahar V, Gao X pei, i in. Novel Role of ROS-Activated trp Melastatin Channel-2 (TRPM2) in Mediating Angiogenesis and Post-Ischemic Neovascularisation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. kwiecień 2015;35(4):877–87.
110. Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, i in. Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. *Circ Res*. 31 styczeń 2014;114(3):469–79.
111. Osmanlioğlu HÖ, Yıldırım MK, Akyuva Y, Yıldızhan K, Nazıroğlu M. Morphine Induces Apoptosis, Inflammation, and Mitochondrial Oxidative Stress via Activation of TRPM2 Channel and Nitric Oxide Signaling Pathways in the Hippocampus. *Mol Neurobiol*. sierpień 2020;57(8):3376–89.
112. Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q, Conrad K, Sun SC, Penn L, i in. TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol*. kwiecień 2006;290(4):C1146-1159.
113. Zhang H, Zhao S, Yu J, Yang W, Liu Z, Zhang L. Medicinal chemistry perspective of TRPM2 channel inhibitors: where we are and where we might be heading? *Drug Discov Today*. grudzień 2020;25(12):2326–34.
114. Hill K, Benham CD, McNulty S, Randall AD. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels. *Neuropharmacology*. wrzesień 2004;47(3):450–60.
115. Chen GL, Zeng B, Eastmond S, Elsenussi SE, Boa AN, Xu SZ. Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels. *Br J Pharmacol*. listopad 2012;167(6):1232–43.
116. Hill K, McNulty S, Randall AD. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1 październik 2004;370(4):227–37.
117. Kraft R, Grimm C, Frenzel H, Harteneck C. Inhibition of TRPM2 cation channels by N-(p-aminylcinnamoyl)anthranilic acid. *Br J Pharmacol*. czerwiec 2006;148(3):264–73.
118. Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *British Journal of Pharmacology*. 2008;153(6):1324–30.
119. Belrose JC, Jackson MF. TRPM2: a candidate therapeutic target for treating neurological diseases. *Acta Pharmacol Sin*. maj 2018;39(5):722–32.

120. Cruz-Torres I, Backos DS, Herson PS. Characterization and Optimization of the Novel Transient Receptor Potential Melastatin 2 Antagonist tatM2NX. *Mol Pharmacol.* 1 luty 2020;97(2):102–11.
121. Fourgeaud L, Dvorak C, Faouzi M, Starkus J, Sahdeo S, Wang Q, i in. Pharmacology of JNJ-28583113: A novel TRPM2 antagonist. *Eur J Pharmacol.* 15 czerwiec 2019;853:299–307.
122. Shimizu T, Dietz RM, Cruz-Torres I, Strnad F, Garske AK, Moreno M, i in. Extended therapeutic window of a novel peptide inhibitor of TRPM2 channels following focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology.* 1 wrzesień 2016;283:151–6.
123. Zielińska W, Gagat M, Mikołajczyk K, Hałas-Wiśniewska M, Grzanka A. Low Effectiveness of the Introduction of pmaxGFP into Primary Human Coronary Endothelial Cells Using Cell-Penetrating Peptides and Nuclear-Localization Sequences in Non-Covalent Interactions. *Applied Sciences.* styczeń 2021;11(5):1997.
124. Starkus JG, Poerzgen P, Layugan K, Kawabata KG, Goto JI, Suzuki S, i in. Scalaradial Is a Potent Inhibitor of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Ion Channels. *J Nat Prod.* 27 październik 2017;80(10):2741–50.
125. Zhang H, Liu H, Luo X, Wang Y, Liu Y, Jin H, i in. Design, synthesis and biological activities of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives as TRPM2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 25 maj 2018;152:235–52.
126. Yamamoto S, Ishii T, Mikami R, Numata T, Shimizu S. Short TRPM2 prevents the targeting of full-length TRPM2 to the surface transmembrane by hijacking to ER associated degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 grudzień 2019;520(3):520–5.
127. Li X, Bu F, Ma S, Cananzi F, Zhao Y, Xiao M, i in. The Janus-faced role of TRPM2-S in retroperitoneal liposarcoma via increasing ROS levels. *Cell Commun Signal.* 25 sierpień 2022;20(1):128.
128. Buelow B, Song Y, Scharenberg AM. The Poly(ADP-ribose) polymerase PARP-1 is required for oxidative stress-induced TRPM2 activation in lymphocytes. *J Biol Chem.* 5 wrzesień 2008;283(36):24571–83.
129. Shimizu T, Macey TA, Quillinan N, Klawitter J, Perraud ALL, Traystman RJ, i in. Androgen and PARP-1 regulation of TRPM2 channels after ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* październik 2013;33(10):1549–55.
130. Nazıroğlu M, Lückhoff A. Effects of antioxidants on calcium influx through TRPM2 channels in transfected cells activated by hydrogen peroxide. *J Neurol Sci.* 15 lipiec 2008;270(1–2):152–8.
131. Celik O, Nazıroğlu M. Melatonin modulates apoptosis and TRPM2 channels in transfected cells activated by oxidative stress. *Physiol Behav.* 10 październik 2012;107(3):458–65.

132. Nazıroğlu M, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal R. Selenium modulates oxidative stress-induced TRPM2 cation channel currents in transfected Chinese hamster ovary cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* luty 2013;112(2):96–102.
133. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem.* 2 czerwiec 2016;85:765–92.
134. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7432797.
135. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* październik 2009;16(5):532–8.
136. Mattson DL, Abais-Battad JM. T Cell Immunometabolism and Redox Signaling in Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 9 grudzień 2021;23(12):45.
137. Hou X, Yang S, Yin J. Blocking the REDD1/TXNIP axis ameliorates LPS-induced vascular endothelial cell injury through repressing oxidative stress and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1 styczeń 2019;316(1):C104–10.
138. Wang L, Qing L, Liu H, Liu N, Qiao J, Cui C, i in. Mesenchymal stromal cells ameliorate oxidative stress-induced islet endothelium apoptosis and functional impairment via Wnt4- β -catenin signaling. *Stem Cell Res Ther.* 14 sierpień 2017;8(1):188.
139. Alharbi KS, Singh Y, Afzal O, Alfawaz Altamimi AS, Kazmi I, Al-Abbasi FA, i in. Molecular explanation of Wnt/ β catenin antagonist pyrvinium mediated calcium equilibrium changes in aging cardiovascular disorders. *Mol Biol Rep.* listopad 2022;49(11):11101–11.
140. Mikołajczyk K, Spyt D, Zielińska W, Żuryń A, Faisal I, Qamar M, i in. The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation. *Int J Mol Sci.* 6 grudzień 2021;22(23):13157.
141. Holliday LS, Faria LP de, Rody WJ. Actin and Actin-Associated Proteins in Extracellular Vesicles Shed by Osteoclasts. *Int J Mol Sci.* 25 grudzień 2019;21(1):158.
142. Dovrat S, Caspi M, Zilberberg A, Lahav L, Firsow A, Gur H, i in. 14-3-3 and β -catenin are secreted on extracellular vesicles to activate the oncogenic Wnt pathway. *Mol Oncol.* lipiec 2014;8(5):894–911.
143. Chrifi I, Louzao-Martinez L, Brandt MM, van Dijk CGM, Bürgisser PE, Zhu C, i in. CMTM4 regulates angiogenesis by promoting cell surface recycling of VE-cadherin to endothelial adherens junctions. *Angiogenesis.* luty 2019;22(1):75–93.
144. Shuai Q, Cao L, Qin Z, Zhang Y, Gu Z, Yang J. VE-cadherin fusion protein substrate enhanced the vasculogenic mimicry capability of hepatocellular carcinoma cells. *J Mater Chem B.* 26 luty 2020;8(8):1699–712.

145. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirsding K, i in. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J.* 9 kwiecień 2008;27(7):993–1004.
146. Suisse A, Treisman JE. Reduced SERCA Function Preferentially Affects Wnt Signaling by Retaining E-Cadherin in the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep.* 8 styczeń 2019;26(2):322-329.e3.
147. Nguyen DT, Smith AF, Jiménez JM. Stent strut streamlining and thickness reduction promote endothelialization. *J R Soc Interface.* sierpień 2021;18(181):20210023.
148. Diaz-Rodriguez S, Rasser C, Mesnier J, Chevallier P, Gallet R, Choqueux C, i in. Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *Eur Heart J.* 7 maj 2021;42(18):1760–9.
149. McKavanagh P, Zawadowski G, Ahmed N, Kutryk M. The evolution of coronary stents. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* marzec 2018;16(3):219–28.
150. Arif N, Zinnhardt M, Nyamay'Antu A, Teber D, Brückner R, Schaefer K, i in. PECAM-1 supports leukocyte diapedesis by tension-dependent dephosphorylation of VE-cadherin. *EMBO J.* 3 maj 2021;40(9):e106113.
151. Wang T, Wang L, Moreno-Vinasco L, Lang GD, Siegler JH, Mathew B, i in. Particulate matter air pollution disrupts endothelial cell barrier via calpain-mediated tight junction protein degradation. *Part Fibre Toxicol.* 29 sierpień 2012;9:35.
152. Raghunatha P, Vosoughi A, Kauppinen TM, Jackson MF. Microglial NMDA receptors drive pro-inflammatory responses via PARP-1/TRMP2 signaling. *Glia.* lipiec 2020;68(7):1421–34.
153. Gao G, Wang W, Tadagavadi RK, Briley NE, Love MI, Miller BA, i in. TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. *J Clin Invest.* listopad 2014;124(11):4989–5001.
154. Yuan H, Li W, Lou N, Yu T, Meng X, Xiao W, i in. TRPM2 facilitates tumor progression of clear cell renal cell carcinoma by relieving Endoplasmic Reticulum Stress. *Int J Med Sci.* 2023;20(1):57–69.
155. Loh KP, Ng G, Yu CY, Fhu CK, Yu D, Vennekens R, i in. TRPM4 inhibition promotes angiogenesis after ischemic stroke. *Pflugers Arch.* marzec 2014;466(3):563–76.
156. Kouhpayeh S, Shariati L, Boshtam M, Rahimmanesh I, Mirian M, Esmaeili Y, i in. The Molecular Basis of COVID-19 Pathogenesis, Conventional and Nanomedicine Therapy. *Int J Mol Sci.* 21 maj 2021;22(11):5438.
157. Zheng Q, Tan Q, Ren Y, Reinach PS, Li L, Ge C, i in. Hyperosmotic Stress-Induced TRPM2 Channel Activation Stimulates NLRP3 Inflammasome Activity in Primary Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2 lipiec 2018;59(8):3259–68.

158. Nazıroğlu M, Özgül C, Çelik Ö, Çiğ B, Sözbir E. Aminoethoxydiphenyl borate and flufenamic acid inhibit Ca^{2+} influx through TRPM2 channels in rat dorsal root ganglion neurons activated by ADP-ribose and rotenone. *J Membr Biol.* maj 2011;241(2):69–75.
159. Nazıroğlu M, Lückhoff A, Jüngling E. Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(4):383–7.
160. Aronson JK, redaktor. Flufenamic acid and meclofenamic acid. W: *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Oxford: Elsevier; 2016; s. 361.
161. Roberge S, Roussel J, Andersson DC, Meli AC, Vidal B, Blandel F, i in. TNF- α -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1 lipiec 2014;103(1):90–9.
162. Ali AAE, Timinszky G, Arribas-Bosacoma R, Kozłowski M, Hassa PO, Hassler M, i in. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognise DNA strand-breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 10 czerwiec 2012;19(7):685–92.
163. Iglesias-Pedraz JM, Comai L. Measurements of Hydrogen Peroxide and Oxidative DNA Damage in a Cell Model of Premature Aging. *Methods Mol Biol.* 2020;2144:245–57.
164. Driessens N, Versteijhe S, Ghaddhab C, Burniat A, De Deken X, Van Sande J, i in. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr Relat Cancer.* wrzesień 2009;16(3):845–56.
165. Colicchia V, Petroni M, Guarguaglini G, Sardina F, Sahún-Roncero M, Carbonari M, i in. PARP inhibitors enhance replication stress and cause mitotic catastrophe in MYCN-dependent neuroblastoma. *Oncogene.* 17 sierpień 2017;36(33):4682–91.
166. Piskunova TS, Yurova MN, Ovsyannikov AI, Semenchenko AV, Zabezhinski MA, Popovich IG, i in. Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2008;2008:754190.
167. Grube K, Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 grudzień 1992;89(24):11759–63.
168. Henning RJ, Bourgeois M, Harbison RD. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and PARP Inhibitors: Mechanisms of Action and Role in Cardiovascular Disorders. *Cardiovasc Toxicol.* grudzień 2018;18(6):493–506.
169. Wang G, Huang X, Li Y, Guo K, Ning P, Zhang Y. PARP-1 inhibitor, DPQ, attenuates LPS-induced acute lung injury through inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory response. *PLoS One.* 2013;8(11):e79757.

170. Çınar R, Nazıroğlu M. TRPM2 Channel Inhibition Attenuates Amyloid β 42-Induced Apoptosis and Oxidative Stress in the Hippocampus of Mice. *Cell Mol Neurobiol.* 15 lipiec 2022;
171. Yazğan Y, Nazıroğlu M. Involvement of TRPM2 in the Neurobiology of Experimental Migraine: Focus on Oxidative Stress and Apoptosis. *Mol Neurobiol.* listopad 2021;58(11):5581–601.
172. An X, Fu Z, Mai C, Wang W, Wei L, Li D, i in. Increasing the TRPM2 Channel Expression in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells Augments the Susceptibility to ROS-Induced Cell Death. *Cells.* 8 styczeń 2019;8(1):28.
173. Rose M, Burgess JT, O’Byrne K, Richard DJ, Bolderson E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:564601.
174. Marecki JC, McCord JM. The inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances growth rates of ataxia telangiectasia cells. *Arch Biochem Biophys.* 15 czerwiec 2002;402(2):227–34.
175. Cleaver JE. Structure of repaired sites in human DNA synthesized in the presence of inhibitors of DNA polymerases alpha and beta in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 15 kwiecień 1983;739(3):301–11.
176. Milam KM, Cleaver JE. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science.* 10 luty 1984;223(4636):589–91.
177. Chidambaram SB, Vijayan R, Sekar S, Mani S, Rajamani B, Ganapathy R. Simultaneous blockade of NMDA receptors and PARP-1 activity synergistically alleviate immunoexcitotoxicity and bioenergetics in 3-nitropropionic acid intoxicated mice: Evidences from memantine and 3-aminobenzamide interventions. *Eur J Pharmacol.* 15 maj 2017;803:148–58.
178. Pandya KG, Patel MR, Lau-Cam CA. Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards PARP and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide. *J Biomed Sci.* 24 sierpień 2010;17 Suppl 1(Suppl 1):S16.
179. Yu X, Cheng X, Xie J jiao, Liao M yang, Yao R, Chen Y, i in. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* kwiecień 2009;23(2):121–7.
180. Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP, Cuzzocrea S. Role of tight junction derangement in the endothelial dysfunction elicited by exogenous and endogenous peroxynitrite and poly(ADP-ribose) synthetase. *Shock.* listopad 2002;18(5):434–9.
181. Zou MH, Cohen R, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium.* 2004;11(2):89–97.

182. Baranska P, Jerczynska H, Pawlowska Z, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS. Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. *Cancer Genomics Proteomics*. 2005;2(5):265–9.
183. Stolbovaya AY, Smirnov IV, Pinevich AA, Vartanyan NL, Krutetskaya IY, Terekhina LA, i in. Comparative Analysis of HUVEC and EA.hy926 Functional Characteristics under the Influence of Anti-Endoglin Antibodies. *Cell Tiss Biol*. 1 listopad 2021;15(6):503–17.
184. Ma LY, Xie XW, Ma L, Pang JL, Xiong XM, Zheng HD, i in. Downregulated long non-coding RNA TRPM2-AS inhibits cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells via activation of p53- p66shc pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. czerwiec 2017;21(11):2626–34.
185. Masumoto K, Tsukimoto M, Kojima S. Role of TRPM2 and TRPV1 cation channels in cellular responses to radiation-induced DNA damage. *Biochim Biophys Acta*. czerwiec 2013;1830(6):3382–90.
186. Turlova E, Feng ZP, Sun HS. The role of TRPM2 channels in neurons, glial cells and the blood-brain barrier in cerebral ischemia and hypoxia. *Acta Pharmacol Sin*. maj 2018;39(5):713–21.
187. Zhang T, Huang W, Ma Y. Down-regulation of TRPM2 attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury through activation of autophagy and inhibition of NLRP3 inflammasome pathway. *Int Immunopharmacol*. marzec 2022;104:108443.