

Agnieszka Kinga Seliga

**Udział kwasu palmitynowego w regulacji wytwarzania
czynnika von Willebranda
przez ludzkie komórki śródbłónka (HUVEC):
rola TLR4 i NF- κ B**

Praca doktorska
wykonana w Pracowni Metabolizmu Komórki
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:
dr hab. Joanna Bandorowicz-Pikuła,
prof. Instytutu Nenckiego

Warszawa, 2024

Niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana ze środków finansowych przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki dr hab. Joannie Bandorowicz-Pikule, profesorowi Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, na wykonanie projektu Opus 2016/23/B/NZ3/03116. Doktorantka pełniła w tym projekcie rolę głównego wykonawcy.

Pragnę serdecznie podziękować

Promotorowi niniejszej pracy

dr hab. Joannie Bandorowicz-Pikule

*za cierpliwość, życzliwość oraz wsparcie naukowe
podczas powstawania niniejszej pracy doktorskiej.*

Kierownikowi Pracowni Metabolizmu Komórki

prof. dr hab. Krzysztofowi Zabłockiemu

za zaangażowanie, poświęcony czas oraz dyskusje naukowe.

Współpracownikom z Pracowni Metabolizmu Komórki

za niepowtarzalną atmosferę pracy, wszelką pomoc oraz cenne rady.

Najbliższym

za wsparcie i motywację.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
Streszczenie	9
Abstract.....	11
1. Wstęp	13
1.1. Śródbłonek naczyniowy	13
1.2. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu śródbłonka związane z otyłością	14
1.3. Hemostaza	17
1.4. Czynniki von Willebranda.....	19
1.4.1. Modyfikacje potranslacyjne i multimerizacja vWF	19
1.4.2. Domeny vWF i ich funkcje	22
1.4.3. Magazynowanie czynnika von Willebranda w ciałkach Weibel-Palade'a ..	23
1.4.4. Wydzielanie czynnika von Willebranda	24
1.5. Kwas palmitynowy	26
1.6. Receptory Toll-like (TLR).....	28
1.7. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B	31
2. Założenia i cele pracy	34
3. Materiały i metody.....	35
3.1. Warunki hodowli komórek HUVEC	35
3.2. Doświadczenia z wykorzystaniem kwasu palmitynowego	35
3.2.1. Przygotowanie kompleksu kwasu palmitynowego z albuminą	35
3.2.2. Oznaczanie stężenia kwasu palmitynowego	36
3.3. Inhibitory	36
3.4. Stymulacja receptorów TLR2.....	37
3.5. Transfekcja komórek siRNA	37
3.6. Ocena przeżywalności komórek	38
3.7. Badanie wydzielania czynnika von Willebranda.....	38

3.7.1.	Stymulacja wydzielania czynnika von Willebranda	38
3.7.2.	Test immunoenzymatyczny ELISA	39
3.8.	Identyfikacja białek metodą Western blot	40
3.8.1.	Przygotowanie lizatów komórkowych	40
3.8.2.	Oznaczanie stężenia białka.....	40
3.8.3.	Elektroforeza żelowa białek w warunkach denaturujących	41
3.8.4.	Transfer białek na membranę PVDF.....	42
3.8.5.	Detekcja białek.....	42
3.9.	Zymografia	44
3.10.	Wytrącanie białek z roztworu.....	44
3.11.	Deglikozylacja białek przy użyciu <i>N</i> -glikozydazy peptydowej F	45
3.12.	Badanie ekspresji genów	45
3.12.1.	Izolowanie RNA.....	45
3.12.2.	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	46
3.12.3.	Analiza transkryptów z wykorzystaniem RT-qPCR	47
3.13.	Barwienie immunocytochemiczne	48
3.14.	Analiza statystyczna	48
4.	Wyniki	49
4.1.	Ustalenie warunków inkubacji komórek z kwasem palmitynowym	49
4.2.	Wpływ kwasu palmitynowego na wydzielanie vWF przez komórki HUVEC ..	51
4.3.	Badanie wpływu kwasu palmitynowego na potencjalne mechanizmy regulujące wydzielanie vWF	56
4.3.1.	Wpływ kwasu palmitynowego na ekspresję genów czynników transkrypcyjnych <i>ERG</i> i <i>GATA3</i>	56
4.3.2.	Wpływ kwasu palmitynowego na fuzję.....	57
4.3.3.	Wpływ kwasu palmitynowego na autofagię	61
4.3.4.	Wpływ kwasu palmitynowego na ciała Weibel-Palade'a	65

4.4.	Wpływ kwasu palmitynowego na aktywację ścieżki sygnałowej związanej ze zwiększonym wytwarzaniem vWF.....	68
4.4.1.	Ścieżka sygnałowa NF-κB	68
4.4.2.	Receptory TLR.....	72
5.	Dyskusja.....	86
5.1.	Wpływ kwasu palmitynowego na komórki śródbłónka i wydzielanie vWF	86
5.2.	Aktywacja ścieżki sygnałowej NF-κB w obecności kwasu palmitynowego za pośrednictwem TLR4	96
5.3.	Kompensacyjny efekt pomiędzy TLR2 i TLR4	100
6.	Podsumowanie i wnioski końcowe	105
	Bibliografia.....	107
	Lista publikacji autorki.....	132

Wykaz skrótów

7-AAD	7-aminoaktynomycyna D, ang. <i>7-Amino-Actinomycin D</i>
ADAM10	metaloproteinaza ADAM10, ang. <i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
ADAMTS13	metaloproteinaza ADAMTS13, ang. <i>disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13</i>
Anx	aneksyna, ang. <i>annexin</i>
AP-1	kompleks białek adaptorowych-1 oddziałujących z klatryną, ang. <i>adaptor protein-1</i>
BMI	wskaźnik masy ciała, ang. <i>body mass index</i>
BSA	albumina surowicy bydlęcej, ang. <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
CARD	kardamonina, ang. <i>cardamonin</i>
ctrl	próba kontrolna
DAMP	molekularne wzorce związane z uszkodzeniem, ang. <i>damage-associated molecular patterns</i>
DMSO	dimetylosulfotlenek, ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>
eNOS	śródbłonkowa syntaza tlenu azotu, ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
FA	kwasy tłuszczowe, ang. <i>fatty acids</i>
FBS	płodowa surowica bydlęca, ang. <i>foetal bovine serum</i>
FFA	wolne kwasy tłuszczowe, ang. <i>free fatty acids</i>
HA	histamina
HUVEC	ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej, ang. <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1, ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	interferon
IKK	kinaza I κ B, ang. <i>IκB kinase</i>
IL	interleukina
I κ B	inhibitor NF- κ B
LCFA	długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, ang. <i>long-chain fatty acids</i>
LPS	lipopolisacharyd bakteryjny

MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów-1, ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MMP	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej, ang. <i>matrix metalloproteinase</i>
MyD88	białko adaptorowe MyD88, ang. <i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NF-κB	jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B, ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ox-LDL	utleniona forma lipoprotein o małej gęstości, ang. <i>oxidized low-density lipoprotein</i>
PA	kwas palmitynowy, ang. <i>palmitic acid</i>
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAMP	molekularne wzorce związane z patogenami, ang. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem, ang. <i>phosphate buffered saline</i>
PE	fikoerytryna, ang. <i>phycoerythrin</i>
PNGaza F	N-glikozydaza peptydowa F, ang. <i>peptide -N-glycosidase F</i>
PRRs	receptory rozpoznające wzorce, ang. <i>pattern recognition receptors</i>
RBP	białka wiążące RNA, ang. <i>RNA binding proteins</i>
RFT	reaktywne formy tlenu
RQ	względna analiza ilościowa ekspresji genu, ang. <i>relative quantification</i>
RT-qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, ang. <i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
SDS	dodecylosiarczan sodu, ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, ang. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFA	nasycone kwasy tłuszczowe, ang. <i>saturated fatty acids</i>
siRNA	małe interferujące RNA, ang. <i>small interfering RNA</i>
TBS	sól fizjologiczna buforowana TRIS, ang. <i>TRIS buffered saline</i>
TBS-T	TBS z dodatkiem Tween 20
TCA	kwas trichlorooctowy, ang. <i>trichloroacetic acid</i>
TF	czynnik tkankowy, ang. <i>tissue factor</i>

TGN	sieć <i>trans</i> aparatu Golgiego, ang. <i>Trans-Golgi network</i>
TIR	domena homologiczna Toll/IL-1, ang. <i>Toll/IL-1 receptor</i>
TIRAP	białko adaptorowe posiadające domenę TIR, ang. <i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	receptory Toll-podobne, ang. <i>Toll-like receptors</i>
TNFRSF	nadrodzina receptorów czynnika martwicy nowotworów, ang. <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TNF- α	czynnik martwicy nowotworów, ang. <i>tumor necrosis factor-α</i>
t-PA	tkankowy aktywator plazminogenu, ang. <i>tissue plasminogen activator</i>
TRAM	białko adaptorowe związane z TRIF, ang. <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	białko zawierające domenę TIR indukujące IFN- β , ang. <i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
VCAM-1	cząsteczka adhezji komórkowej naczyń-1, ang. <i>vascular adhesion molecule-1</i>
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego, ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	czynnik von Willebranda, ang. <i>von Willebrand factor</i>
vWFpp	propeptyd vWF, ang. <i>vWF propeptide</i>
WPBs	ciałka Weibel-Palade'a, ang. <i>Weibel-Palade bodies</i>

Streszczenie

Dysfunkcja śródbłónka jest jednym z początkowych etapów zaburzeń w działaniu układu sercowo-naczyniowego obserwowanym u osób otyłych. Zwiększone stężenie kwasów tłuszczowych towarzyszące otyłości, w tym kwasu palmitynowego (PA) występującego w największej ilości, może przyczyniać się do rozwoju zaburzeń śródbłonkowych. Czynniki von Willebranda (vWF) wytwarzany i wydzielany głównie przez komórki śródbłónka, pełni ważną rolę w regulacji krzepnięcia. Wzrost stężenia vWF w osoczu osób chorych na otyłość może przyczyniać się do zwiększenia ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu PA na wydzielanie vWF przez komórki HUVEC. Doświadczenia prowadzono w łagodnych warunkach stresu wywołanego obecnością kwasu tłuszczowego, to znaczy takich, które były wystarczające do spowodowania wzrostu ilości białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, co jest znacznikiem odpowiedzi prozapalnej śródbłónka, ale nie obniżających przeżywalności komórek. Komórki inkubowano w obecności PA o stężeniu nieprzekraczającym 200 μ M nie dłużej niż 48 h. Takie podejście umożliwia badanie zmian adaptacyjnych odpowiedzi na bodziec. Wykazano, że w łagodnych warunkach, wydzielanie vWF jest zwiększone po inkubacji w obecności PA, co jest skutkiem zwiększonej ekspresji genu *VWF* oraz stymulacji dojrzewania tego białka. Podjęto próby identyfikacji mechanizmów regulacyjnego wpływu PA na dojrzewanie i wydzielanie vWF, ale nie uzyskano rozstrzygających wyników.

Potwierdzono, że PA aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B, biorący udział w regulacji odpowiedzi zapalnej. Ponadto wykazano, że PA wpływa na zawartość białek receptorowych TLR2, TLR4, TLR6. W celu identyfikacji szlaku sygnałowego aktywowanego przez PA stosowano inhibitory NF- κ B oraz TLR2 i TLR4, czyli odpowiednio kardamoninę, C29 i TAK-242. Wykazano, że zwiększona w obecności PA ekspresja genu *VWF* wynika z aktywacji NF- κ B. Ponadto potwierdzono udział receptora TLR4 w aktywowanej przez PA odpowiedzi komórek śródbłónka.

W obecności inhibitora TLR4 i PA, który jest jego ligandem, wykazano zwiększenie ekspresji genów *CD36*, *TIRAP*, *TLR6*, kodujących białka uczestniczące w przekazywaniu sygnału pochodzącego od receptorów TLR.

W obecności inhibitora TLR2 obserwowano zwiększenie aktywności TLR4. Co więcej, wyciszenie ekspresji genu *TLR2* spowodowało zwiększenie ilości białka TLR4. Z kolei wyciszenie ekspresji genu *TLR4* spowodowało zwiększenie ilości białka TLR2,

co zaobserwowano nawet wtedy, gdy na skutek wyciszenia obniżeniu ulegał jedynie poziom transkryptu *TLR4*.

Podsumowując, wykazano, że PA reguluje w komórkach śródbłónki wydzielanie vWF poprzez zwiększoną ekspresję genu *VWF* oraz nasilone dojrzewanie tego białka. Zidentyfikowano udział receptora *TLR4* oraz NF- κ B w odpowiedzi komórek na PA. Ponadto wykazano, że pomiędzy receptorami *TLR2* i *TLR4* występuje efekt kompensacyjny, obserwowany na poziomie zarówno aktywności receptorów, jak i mRNA oraz białka.

Uzyskane wyniki sugerują, że już stosunkowo niewielki wzrost stężenia kwasów tłuszczowych do poziomu, który aktywuje odpowiedź prozapalną, może być wystarczający do zwiększenia stężenia vWF pozakomórkowego, co potencjalnie powoduje zaburzenia krzepliwości krwi. Udział PA w regulacji wydzielania vWF częściowo tłumaczy zwiększenie stężenia vWF obserwowane w osoczu osób otyłych.

Abstract

Endothelial dysfunction is the earliest symptom of the cardiovascular system dysfunction observed in obesity. Increased concentration of fatty acids associated with obesity, including the most abundant palmitic acid (PA), may contribute to the development of endothelial dysfunction.

von Willebrand factor (vWF), produced and secreted mainly by endothelial cells, plays an important role in the regulation of coagulation. Increased vWF concentration in the plasma of obese patients is associated with an increased risk of developing cardiovascular diseases caused by increased thrombosis.

The aim of this thesis was to investigate the effect of PA on the vWF secretion by HUVEC cells. The experiments were carried out under mild fatty acid stress conditions that were sufficient to increase the amount of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules, which is a marker of the pro-inflammatory response of the endothelium, without affecting cell survival. The cells were incubated in the presence of PA at a concentration not exceeding 200 μ M for no longer than 48 h. This approach enables the study of adaptive changes in response to a stimulus. It has been shown that under relatively mild conditions vWF secretion is increased after incubation in the presence of PA, as a result of the increased VWF gene expression and stimulated maturation of this protein. Attempts have been made to identify the mechanisms of PA's regulatory influence on vWF maturation and secretion, but no conclusive results have been obtained.

The results presented in this study confirmed that PA activates NF- κ B, a transcription factor involved in the regulation of the inflammatory response. Moreover, it has been shown that PA affects the content of TLR2, TLR4 and TLR6 receptor proteins. To identify the signaling pathway activated by PA, inhibitors of NF- κ B and TLR2 and TLR4 receptors were used, that is cardamonin, C29 and TAK-242, respectively. It has been shown that VWF gene expression increased by PA is the result of NF- κ B activation. Moreover, the involvement of the TLR4 receptor in the PA-activated endothelial cells response was confirmed.

Additionally, in the presence of a TLR4 inhibitor and PA, which is its ligand, the expression of *CD36*, *TIRAP*, *TLR6* genes, encoding proteins involved in TLR receptor signal transduction, was increased.

In the presence of a TLR2 inhibitor, TLR4 activity was increased. Moreover, *TLR2* gene silencing increased TLR4 protein level. *TLR4* gene silencing increased TLR2 level,

which was observed even when only mRNA level of *TLR4* was decreased. This suggests a compensatory effect between TLR2 and TLR4 receptors.

To conclude, this thesis shows that PA regulates the vWF secretion from endothelial cells by increased expression of the *VWF* gene and maturation of this protein. The involvement of the TLR4 receptor and the NF- κ B signaling pathway in the cell response to PA was identified. Moreover, it has been shown that there is a compensatory effect between TLR2 and TLR4 receptors, observed at the receptor activity as well as mRNA and protein level.

The obtained results suggest that a relatively small increase in the concentration of fatty acids to a level that activates the pro-inflammatory response may be sufficient to increase concentration of the extracellular vWF, potentially resulting in thrombotic complications. The involvement of PA in the regulation of the vWF secretion partially explains the increased vWF concentration observed in the plasma of obese patients.

1. Wstęp

1.1. Śródbłonek naczyniowy

Śródbłonek naczyniowy tworzy warstwę komórek wyściełającą wewnętrzną stronę naczyń krwionośnych oraz limfatycznych, która jest barierą pomiędzy środowiskiem wewnątrznaczyniowym, a ścianą naczyń i znajdującymi się głębiej narządami. W organizmie człowieka znajduje się od 1 do 6×10^{13} komórek śródbłonka, zajmujących łączną powierzchnię około 3000-6000 m². Ich rozmiary zależą od typu naczynia i średnio wynoszą około 30-50 μm długości, 10-30 μm szerokości i 0,1-10 μm wysokości. Są one wydłużone wzdłuż osi naczyń, co zmniejsza powstawanie mechanicznych naprężeń spowodowanych przepływem krwi [1].

Śródbłonek naczyniowy w układzie krwionośnym pełni kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego i ukrwienia wszystkich narządów, poprzez wpływ na napięcie naczyniowe i średnicę naczyń krwionośnych. Ponadto ma zasadnicze znaczenie w regulacji krzepnięcia krwi, angiogenezie, rozwoju odpowiedzi zapalnej, a także regulacji migracji leukocytów przez ścianę naczyń. Komórki śródbłonka różnią się pod względem zarówno struktury, jak i funkcji na poziomie organów, ale także różnych odcinków naczyń krwionośnych w określonym organie, a nawet sąsiadujących komórek [2]. Ponadto komórki śródbłonka wykazują wyraźną polaryzację apikalno-bazalną [1]. Apikalna część błony komórkowej, skierowana do wnętrza naczyń, ma bezpośredni kontakt z krwią. Przeciwna część błony plazmatycznej komórek, bazalna, jest oddzielona od warstwy mięśni gładkich naczyń krwionośnych błoną podstawną, zbudowaną z glikoprotein, m.in. lamininy i kolagenu [3]. Komórki śródbłonka wydzielają białka macierzy pozakomórkowej, dzięki którym ulegają zakotwiczeniu w błonie podstawnej [1]. Błona podstawna jest niezbędna dla zachowania integralności strukturalnej i stabilności naczyń krwionośnych. Ponadto może mieć wpływ na komórki śródbłonka poprzez bezpośrednie oddziaływanie białek macierzy zewnątrzkomórkowej z receptorami lub poprzez magazynowanie różnych białek, w tym czynników wzrostu [4].

Pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonka występują połączenia międzykomórkowe kilku rodzajów: zamykających ścisłych (ang. *tight junctions*), przylegających (ang. *adherence junctions*) i komunikacyjnych (ang. *gap junctions*), które odgrywają ważną rolę w zachowaniu prawidłowego działania naczyń krwionośnych. Połączenia zamykające ściśle uszczelniają przestrzeń międzykomórkową, przylegające tworzą

silne mechaniczne połączenia, a komunikacyjne umożliwiają bezpośrednie połączenie cytoplazmy sąsiadujących komórek i przepływ małych cząsteczek [5,6].

Niejednorodność komórek śródbłónka w znacznym stopniu jest związana z różnicami występującymi w połączeniach między nimi. Na podstawie różnic morfologicznych wyróżnia się śródbłonek ciągły, okienkowy i nieciągły [7]. Śródbłonek ciągły wykazuje najmniejszą przepuszczalność i znajduje się w większości naczyń krwionośnych mózgu, skóry, płuc, serca, mięśni. Śródbłonek okienkowy charakteryzuje się tzw. fenestracjami o średnicy 50-60 nm i występuje w narządach charakteryzujących się nasilonymi procesami transportu i filtracji, takich jak gruczoły dokrewne i wydzielnicze, przewód pokarmowy, spłot naczyńiówkowy, kłębuszki nerkowe. Śródbłonek nieciągły (zatokowy) występuje w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym, wykazuje największą przepuszczalność i charakteryzuje się występowaniem porów o średnicy 100-200 nm i odstępów między komórkami, a także brakiem lub słabo ustrukturyzowaną błoną podstawną [8].

Śródbłonek w odpowiedzi na bodźce pełni ważną rolę endokrynną poprzez produkcję i wydzielanie różnych czynników wzrostu, czynników regulujących skurcz i rozkurcz mięśni gładkich, a także czynników pro- i przeciwzakrzepowych, przez co reguluje napięcie naczyń krwionośnych, hamuje aktywację płytek krwi oraz adhezję i migrację leukocytów, zapobiega tworzeniu zakrzepów i odpowiedzi prozapalnej, czy też wpływa na proliferację komórek mięśni gładkich [9] (Tabela 1).

1.2. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu śródbłónka związane z otyłością

Otyłość jest przewlekłą chorobą, która może prowadzić do wielu powikłań, takich jak insulinooporność, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, w tym miażdżycy i nadciśnienie [10]. Związane jest to m.in. ze stanem zapalnym i podniesionym poziomem cytokin prozapalnych [11]. Według definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) otyłość występuje u osób, których wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) wynosi powyżej 30 kg/m^2 [12]. Przyczyny otyłości i nadwagi są złożone i wynikają z wielu czynników, ale najczęściej związane są z nadmiernym spożyciem składników odżywczych, zwłaszcza tłuszczu i cukrów (niewłaściwa dieta) oraz zbyt małą aktywnością fizyczną [13,14]. Problem otyłości jest coraz bardziej powszechny, zwłaszcza w krajach rozwiniętych [15]. W Polsce w 2016 roku 23,7% mężczyzn i 22,2% kobiet chorowało na otyłość [16].

Nieprawidłowości w funkcjonowaniu śródbłónka są najwcześniej występującymi zaburzeniami funkcji układu naczyniowego obserwowanymi u osób chorych na otyłość.

Są one związane z rozwojem miażdżycy oraz mogą zwiększać ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [17–19]. Otyłość jest związana z występowaniem permanentnego stanu zapalnego o niskim nasileniu [20,21]. Zwiększenie ilości tkanki tłuszczowej zgromadzonej w organizmie przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego m.in. poprzez zmianę fenotypu wydzielniczego adipocytów. Jest to związane z wydzielaniem cytokin prozapalnych TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*), IL-6, IL-1 β .

Tabela 1. Niektóre czynniki wytwarzane przez komórki śródbłónka i ich funkcje (vWF, ang. *von Willebrand factor*; TF, ang. *tissue factor*; PAF, ang. *platelet-activating factor*; TxA2, ang. *thromboxane A2*; PAI-1, ang. *plasminogen activator inhibitor-1*; t-PA, ang. *tissue plasminogen activator*; EDHF, ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*; VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*; PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*; TGF- β , ang. *transforming growth factor beta*; FGF, ang. *fibroblastic growth factor*; EGF, ang. *epidermal growth factor*; ICAM-1, ang. *intercellular adhesion molecule-1*; VCAM-1, ang. *vascular adhesion molecule-1*; MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) [22].

Hemostaza	
Czynniki prozakrzepowe:	Czynniki przeciwzakrzepowe:
czynnik von Willebranda (vWF), czynnik tkankowy (TF), czynnik aktywujący płytki (PAF), tromboksan A2 (TxA2), inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1)	trombomodulina, antytrombina III, siarczan heparanu, prostacyklina, tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA)
Napięcie ściany naczyń krwionośnych	
Czynniki zwężające naczynia:	Czynniki rozszerzające naczynia:
angiotensyna II (Ang II), endotelina-1 (ET-1), TxA2, reaktywne formy tlenu (RFT), prostaglandyna	tlenek azotu (NO), prostacyklina, śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF)
Angiogeneza:	
czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu naskórka (EGF)	
Stan zapalny:	
leukotrieny, chemokiny, białka adhezji komórkowej (selektyny, integryny, immunoglobuliny), interleukiny (IL), np. P-selektyna, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-1 β , MCP-1	

Dysfunkcji śródbłónka towarzyszy zaburzenie rozszerzania naczyń krwionośnych, co sprzyja zwiększaniu ciśnienia tętniczego. Jest to konsekwencją obniżonej dostępności NO w osoczu. W warunkach zwiększonego wytwarzania RFT np. na skutek stymulacji komórek śródbłónka przez TNF- α , dochodzi do powstania szczególnie reaktywnych form azotu, takich jak nadtlenoazotyn, anion nitroksylowy i kation nitrozonowy, co z jednej strony obniża dostępność NO, a z drugiej potęguje efekt cytotoksyczny. Ponadto RFT powodują zwiększenie utleniania tetrahydrobiopteryny (BH₄), która jest kofaktorem śródbłónkowej syntazy tlenu azotu (eNOS, ang. *endothelial nitric oxide synthase*), co w efekcie dodatkowo zmniejsza wytwarzanie NO [20].

Otyłość jest związana ze zwiększoną ilością białka chemotaktycznego monocytów MCP-1. Jest ono produkowane w odpowiedzi na stan zapalny przez różne komórki, w tym komórki śródbłónka, jednak głównym jego źródłem są monocyty i makrofagi [23]. MCP-1 powoduje rekrutację monocytów do miejsca rozwoju stanu zapalnego i infiltrację tkanek. W przypadku otyłości infiltracja monocytów pod śródbłónek w połączeniu z obecnością utlenionej formy lipoprotein o małej gęstości (ox-LDL, ang. *oxidized low-density lipoprotein*) powoduje, że aktywowane makrofagi pobierają na drodze fagocytozy cząstki ox-LDL, przekształcają się w komórki piankowe i przyczyniają do rozwoju miażdżycy [18,24].

W odpowiedzi na stan zapalny na powierzchni komórek śródbłónka dochodzi do zwiększenia ilości białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, a także P-selektyny i E-selektyny. Białka te są związane z adhezją leukocytów i ich migracją w miejsce rozwoju stanu zapalnego. W początkowym etapie adhezji leukocytów do śródbłónka uczestniczy E-selektyna. ICAM-1 i VCAM-1 regulują zarówno adhezję jak i migrację leukocytów do tkanek położonych głębiej w stosunku do śródbłónka. P-selektyna odpowiada za oddziaływanie śródbłónka z leukocytami oraz płytkami krwi. W wyniku selektywnej proteolizy białek adhezyjnych i selektyn dochodzi do uwolnienia fragmentów zawierających domeny zewnątrzkomórkowe, które następnie w postaci rozpuszczalnej krążą we krwi. Zwiększone stężenie tych białek w osoczu może służyć jako marker dysfunkcji śródbłónka, a u osób z otyłością wiąże się to z występowaniem chorób metabolicznych, chorób sercowo-naczyniowych, w tym miażdżycy [25–31].

Szczególnie istotny w kontekście niniejszej pracy doktorskiej jest wytwarzany przez komórki śródbłónka vWF, który bierze udział w procesie krzepnięcia krwi [29,32]. vWF może służyć jako marker aktywacji lub dysfunkcji śródbłónka, a jego zwiększone stężenie może być związane z rozwojem zaburzeń krzepnięcia, miażdżycy i choroby

wieńcowej [32,33]. Stężenie vWF jest podwyższone w surowicy osób otyłych [27,34–38], co zwiększa ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych [39,40].

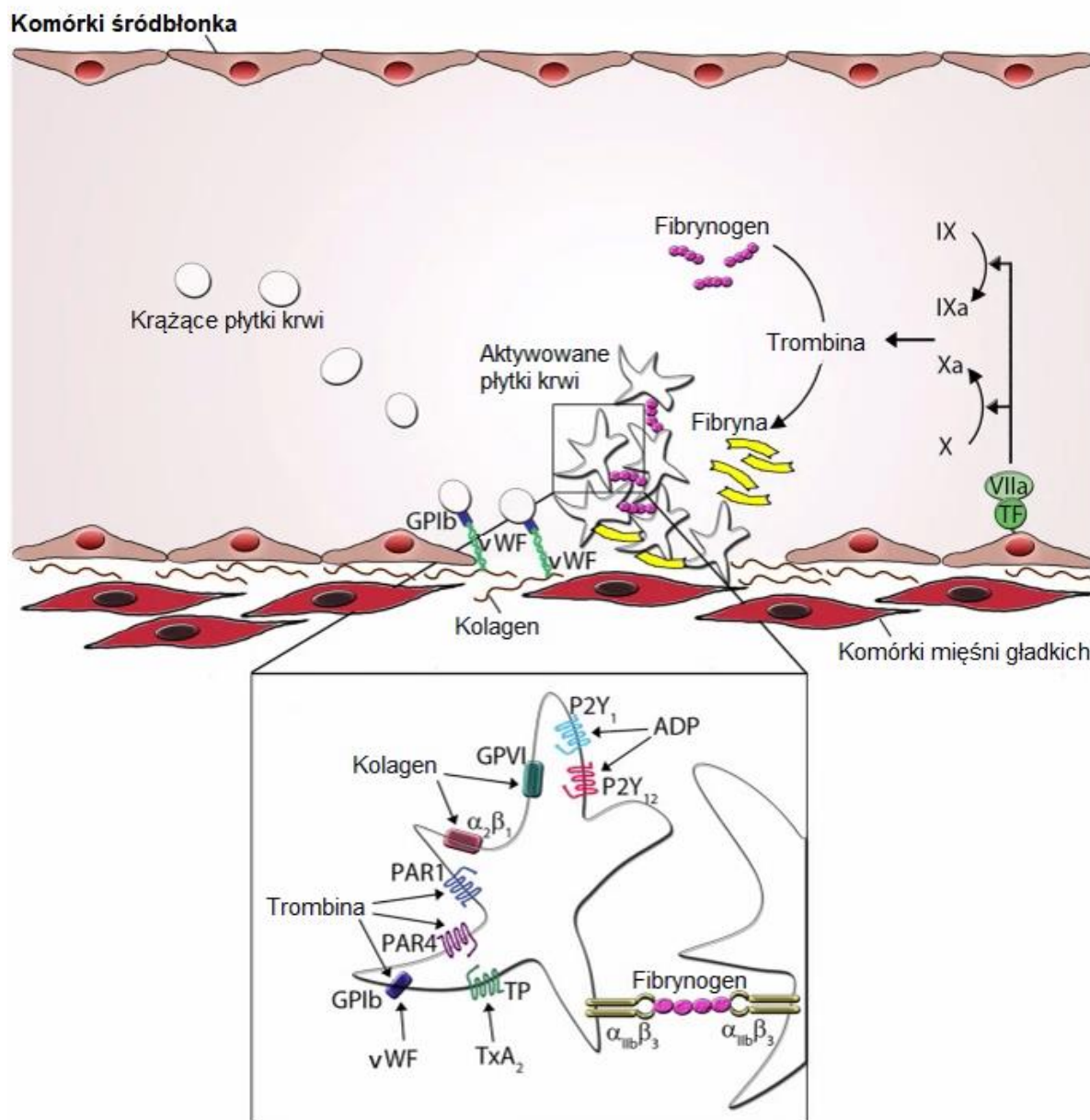
1.3. Hemostaza

Jedną z głównych funkcji komórek śródbłónka naczyniowego jest kontrola hemostazy, czyli mechanizmów obejmujących procesy zapobiegające wydostawaniu się krwi z naczyń krwionośnych, zarówno w warunkach prawidłowych, jak i w przypadku ich uszkodzenia, a jednocześnie zapewniające utrzymanie płynności krwi, poprzez regulację krzepnięcia i fibrynolizy [41]. W warunkach fizjologicznych cząsteczki znajdujące się na powierzchni apikalnej komórek śródbłónka wykazują działanie przeciwzakrzepowe, zapobiegające adhezji płytek krwi i leukocytów oraz aktywacji kaskady procesów prowadzących do powstawania skrzepu. Natomiast znajdujące się w błonie podstawnej białka wytworzone przez komórki śródbłónka mają właściwości prozakrzepowe. Aktywacja komórek śródbłónka również jest związana z wywołaniem odpowiedzi prozakrzepowej [8]. A zatem, śródbłonek pełni kluczową rolę w zachowaniu przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, a w przypadku przerwania ciągłości naczyń zapobiega utracie krwi poprzez utworzenie skrzepu.

Wyróżnia się hemostazę pierwotną i wtórną. Pierwotna związana jest z aktywacją, adhezją i agregacją płytek krwi w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego. Ponadto dochodzi do zwężenia naczyń krwionośnych, co ma na celu zatrzymanie przepływu krwi. Hemostaza wtórna polega na aktywacji kaskady krzepnięcia oraz powstawaniu i gromadzeniu włókien fibryny, a ostatecznie powstaniu skrzepu [42].

Podczas uszkodzenia naczyń krwionośnych dochodzi do przerwania ciągłości śródbłónka, co wiąże się z odsłonięciem błony podstawnej. Głównym elementem pełniącym rolę w rekrutacji płytek krwi jest produkowany przez śródbłonek vWF [8]. vWF stabilizuje czynnik VIII kaskady krzepnięcia, a także oddziałuje z kolagenem w błonie podstawnej i wiąże płytki krwi poprzez receptor GPIIb-IX-V. Umożliwia to oddziaływanie płytek bezpośrednio z kolagenem oraz ich aktywację i adhezję. Płytki krwi wiążą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym fibronektyną, lamininą i kolagenem za pośrednictwem białek adhezyjnych - integryn. Aktywowane płytki krwi zmieniają swoją morfologię i wydzielają ziarnistości zawierające różne czynniki prozakrzepowe, w tym ADP, ATP, serotoninę, TxA_2 , vWF. Substancje te w sposób parakrynnny aktywują płytki krwi znajdujące się w otoczeniu, powodując dodatnie sprzężenie zwrotne i sprzyjają powstawaniu czopu płytkowego [41].

Rycina 1 przedstawia w sposób schematyczny rolę śródbłónka w procesie krzepnięcia.



Rycina 1. Rola komórek śródbłónka w procesie krzepnięcia. Przygotowano na podstawie [41], zmienione.

Pierwszym elementem rozpoczynającym kaskadę krzepnięcia jest czynnik tkankowy (TF) znajdujący się w warstwie podśródbłonnej, który jest uwalniany w wyniku uszkodzenia naczyń. W wyniku następujących po sobie reakcji aktywujących kolejne etapy kaskady krzepnięcia dochodzi końcowo do powstania trombiny, która poprzez proteolizę przekształca fibrynogen w fibrynę, która następnie polimeryzuje, a powstałe włókna wraz z płytkami krwi tworzą skrzep [8]. Trombina jest również silnym aktywatorem płytek krwi [43]. Komórki śródbłónka wytwarzają trombomodulinę, która poprzez wiązanie krążącej trombiny obniża jej zdolność do tworzenia fibryny [41].

Proces rozpuszczania skrzepu, czyli fibrynoliza jest ważnym elementem hemostazy, którego celem jest przywrócenie normalnego przepływu krwi. Białkiem odpowiedzialnym za ten proces jest plazmina, powstająca z plazminogenu w wyniku przekształcenia przez aktywatory plazminogenu typu tkankowego t-PA oraz typu urokinazy (u-PA, ang. *urokinase-type plasminogen activator*). Aktywna plazmina degradowuje fibrynogen i fibrynę. Ważnym negatywnym regulatorem procesu fibrynolizy jest produkowany przez komórki śródbłónka inhibitor aktywatora plazminogenu PAI-1 [44].

1.4. Czynniki von Willebranda

Czynnik von Willebranda (vWF) jest glikoproteiną występującą w postaci multimerów w osoczu krwi, macierzy błony podstawnej komórek śródbłónka, ciałkach Weibel-Palade'a (WPBs, ang. *Weibel-Palade bodies*) komórek śródbłónka i α -granulach płytek krwi [45]. vWF bierze udział w hemostazie zarówno pierwotnej jak i wtórnej. W hemostazie pierwotnej powoduje aktywację płytek krwi i pośredniczy w ich przyłączeniu do kolagenu. Natomiast w hemostazie wtórnej tworzy kompleks z czynnikiem VIII, co powoduje jego stabilizację i wydłuża czas trwania, a dzięki zdolności wiązania kolagenu zwiększa jego lokalne stężenie w miejscu uszkodzenia naczynia krwionośnego [46].

1.4.1. Modyfikacje potranslacyjne i multimeryzacja vWF

Gen kodujący białko vWF jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 12 i składa się z 52 eksonów o całkowitej wielkości 178 kb [47,48]. vWF jest syntetyzowany jako preprobiałko o masie cząsteczkowej 350 kDa, zbudowane z 2813 reszt aminokwasowych. W białku tym wyróżnia się fragment peptydowy zbudowany z 22 reszt aminokwasowych tworzących tzw. sekwencję sygnałową, probiałko vWFpp (ang. *vWF propeptide*; 741 reszt aminokwasowych) oraz dojrzały vWF (2050 reszt aminokwasowych) (Rycina 2) [49,50]. Po usunięciu peptydu sygnałowego w siateczce śródplazmatycznej, vWF tworzy dimery i w aparacie Golgiego ulega dalszym etapom modyfikacji potranslacyjnych, dojrzewania i tworzenia multimerów [48]. Powstające multimery mogą składać się z różnej liczby (od 2 do ponad 60) podjednostek vWF [45].

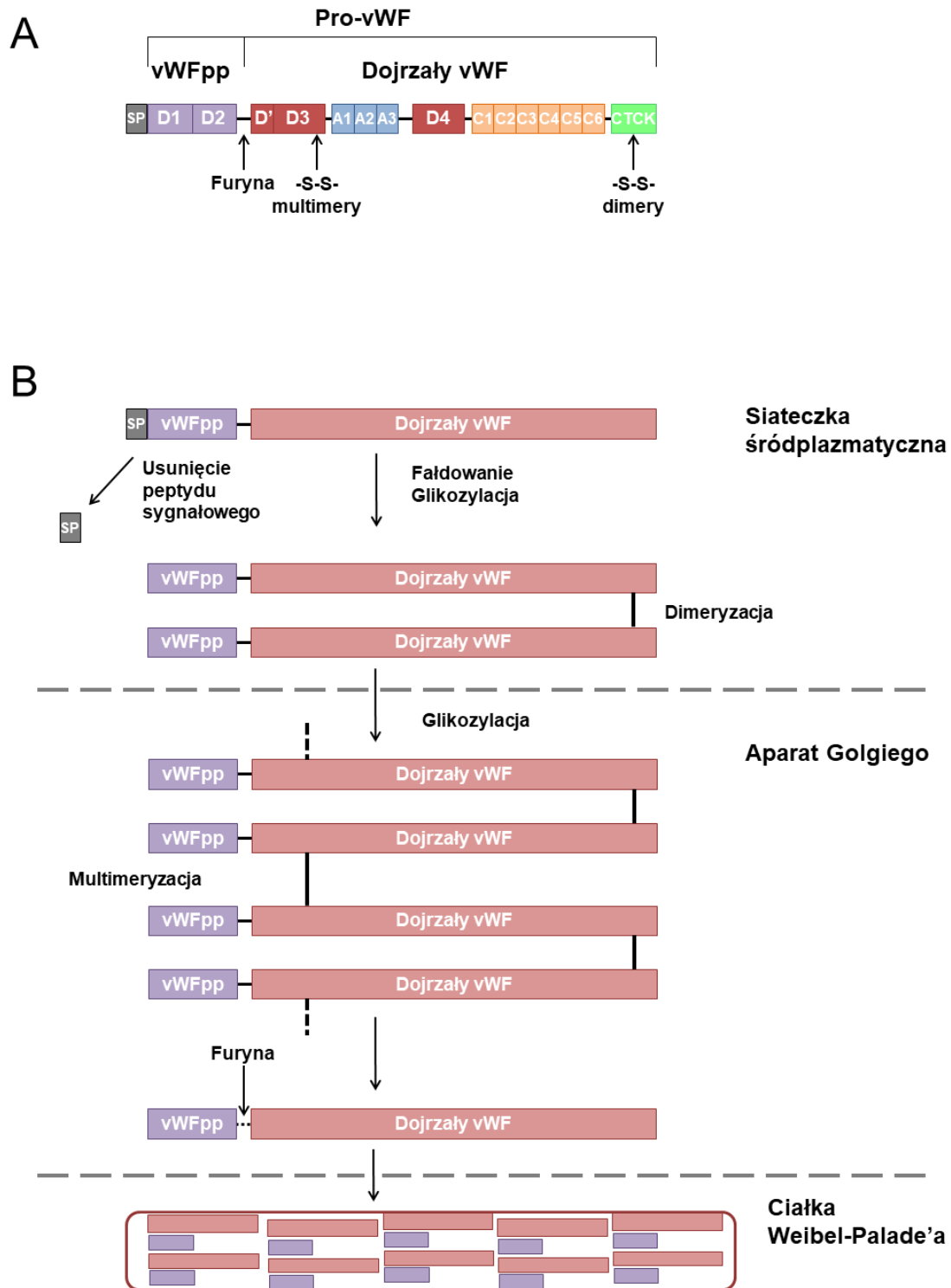
vWF ulega modyfikacjom potranslacyjnym, które umożliwiają zwijanie białka. Proces ten zaczyna się od *N*-glikozylacji zachodzącej w siateczce śródplazmatycznej. vWF ma 16 miejsc *N*-glikozylacji, z czego 4 zlokalizowane są w vWFpp, a 12 w dojrzałym vWF [51]. vWF zawiera wyjątkowo dużo, bo aż 234 reszty cysteiny, która stanowi 8,2% wszystkich aminokwasów, czyli 4-krotnie więcej niż w przeciętnym białku. Wiązania

dwusiarczkowe tworzone pomiędzy większością reszt cysteiny są elementem koniecznym dla prawidłowego fałdowania i wydzielania białka z komórek [52]. Powstawanie tych wiązań jest katalizowane przez znajdujące się w siateczce śródplazmatycznej oksydoreduktazy tiolowe. Następnie dochodzi do powstawania dimerów pro-vWF, co dzieje się przez utworzenie trzech wiązań dwusiarczkowych na końcach C, zapewniających stabilność utworzonych struktur. Kolejnym etapem modyfikacji jest O-glikozylacja zachodząca w aparacie Golgiego. Przyłączone reszty cukrowe mogą stanowić nawet 20% końcowej masy cząsteczki [51].

Następnym krokiem dojrzewania vWF jest tworzenie multimerów. Polega to na tworzeniu wiązań dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny w domenie D3 położonej na N-końcu dimerów pro-vWF. vWFpp uczestniczy w prawidłowym tworzeniu multimerów. Domeny D1 i D2 należące do vWFpp oraz domena D' należąca do vWF są konieczne do prawidłowego ułożenia dimerów pro-vWF i umożliwiają utworzenie wiązania pomiędzy nimi zgodnie z modelem zamka błyskawicznego [45]. Powstawanie multimerów jest związane z występowaniem w domenach D1 i D2 vWFpp motywu CGLC, który odpowiada za powstawanie mostków dwusiarczkowych [53], dzięki czemu vWFpp pełni funkcję specyficzną wobec vWF oksydoreduktazy. Multimeryzację umożliwia utworzenie przejściowego wiązania pomiędzy vWFpp, a domeną D'D3 vWF [54,55].

Regulacja multimeryzacji jest związana z różnym odczynem (pH) odpowiednich przedziałów komórkowych [56]. W środowisku o obojętnym pH w siateczce śródplazmatycznej dochodzi do powstawania homodimerów vWFpp wymagających wytworzenia wiązań niekowalencyjnych. Zbliża to do siebie domeny D3 i lokalizuje w sposób ułatwiający utworzenie wiązań między nimi po dotarciu do aparatu Golgiego. Natomiast w niższym pH występującym w aparacie Golgiego homodimery vWFpp ulegają dysocjacji, a vWFpp wiąże się niekowalencyjnie z vWF [54].

Po powstaniu multimerów w sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN, ang. *trans-Golgi network*) dochodzi do proteolizy pro-vWF, w wyniku czego powstaje vWFpp o masie cząsteczkowej około 100 kDa i dojrzały vWF około 250 kDa. Reakcję tę katalizuje konwertaza zwana furyną [57,58]. vWFpp pozostaje niekowalencyjnie związany z dojrzłym vWF do momentu ich wydzielania poza komórkę, co także zależy od pH [59,60].

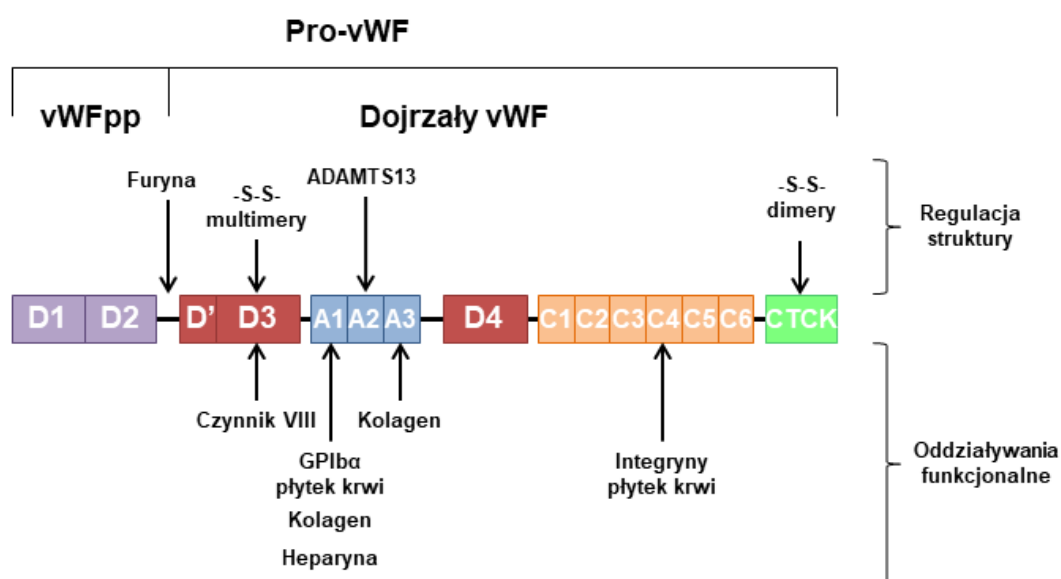


Rycina 2. Budowa domenowa vWF i modyfikacje potranslacyjne. A) vWF wytwarzany jest jako preprobiałko składające się z peptydu sygnałowego (SP, ang. *signal peptide*) oraz pro-vWF, z którego na skutek proteolizy katalizowanej przez furynę powstaje vWFpp i dojrzały vWF. B) Schematyczne przedstawienie modyfikacji potranslacyjnych oraz multimeryzacji vWF. Przygotowano na podstawie [49,61].

1.4.2. Domeny vWF i ich funkcje

Cząsteczka vWF zawiera kilka homologicznych domen A-D, które ze względu na występujące miejsca oddziaływania z innymi białkami, a także miejsca proteolizy pełnią różne funkcje (Rycina 3) [49]. vWFpp tworzą 2 domeny D: D1 i D2. Dojrzały vWF zbudowany jest z szeregów domen A i C oraz zespołów domen D [61,62]. Miejsce przecięcia przez furynę jest zlokalizowane pomiędzy końcem domeny D2 vWFpp, a domeną D' vWF. Domena D3 zawiera miejsce wiązania czynnika VIII kaskady krzepnięcia. Oddziaływanie z płytkami krwi zachodzi poprzez wiązanie receptora GPIIb α w domenie A1 [63] oraz integrzyn w domenie C4 [64]. vWF wiąże kolagen typu IV oraz VI w domenie A1, a kolagen typu I oraz III w domenach A1 i A3 [49]. Funkcje hemostatyczne vWF mogą być hamowane w wyniku wiązania heparyny w domenie A1, w miejscu znajdującym się niedaleko wiązania receptora GPIIb α płytek krwi. Heparyna wykazuje wysokie powinowactwo do vWF, a jej przyłączenie obniża zdolność vWF do wiązania płytek krwi [50].

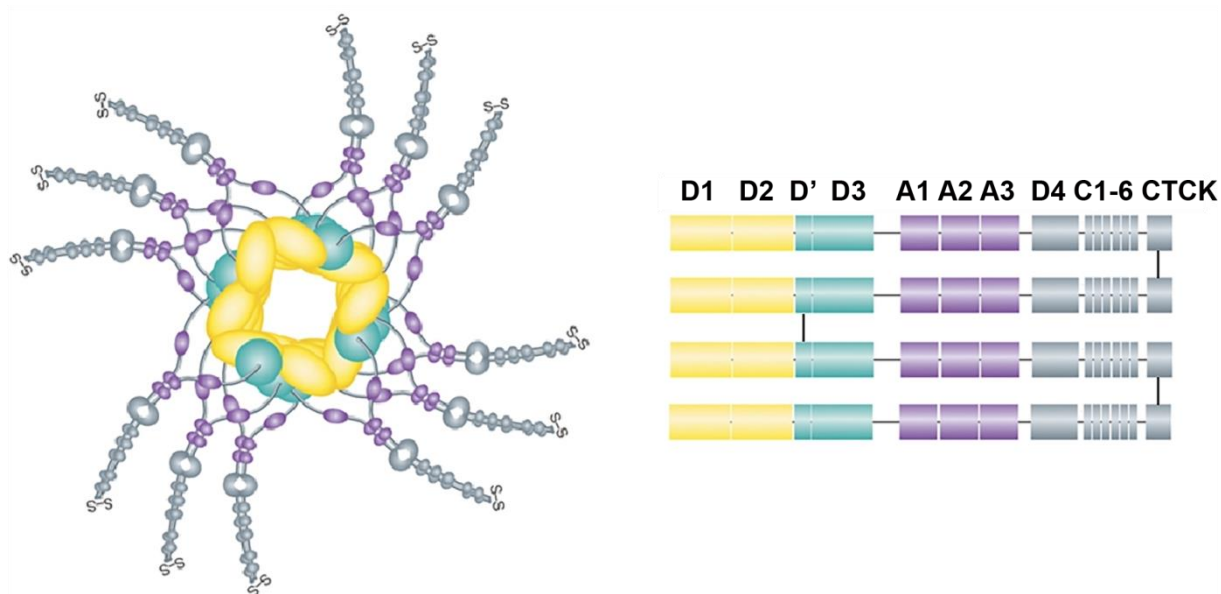
Podczas dimeryzacji wiązania dwusiarczkowe tworzą się z udziałem reszt cysteinowych w znajdującej się na C-końcu domenie CTCK (ang. *C-terminal cysteine knot*), a podczas multimeryzacji w domenie D3. Właściwości prozakrzepowe wydzielonych multimerów vWF zależą od ich długości. Metaloproteinaza ADAMTS13 reguluje wielkości multimerów poprzez ich fragmentację na drodze proteolizy w obrębie domeny A2 vWF. Jest to jeden z mechanizmów regulacji krzepnięcia krwi [65].



Rycina 3. Organizacja domen vWF z uwzględnieniem miejsc biorących udział w regulacji struktury białka oraz oddziaływaniach funkcjonalnych. Przygotowano na podstawie [61].

1.4.3. Magazynowanie czynnika von Willebranda w ciałkach Weibel-Palade'a

vWF jest magazynowany w komórkach śródbłónka w WPBs oraz w płytkach krwi i megakariocytach w α -granulach. Powstawanie WPBs zachodzi tylko w przypadku wytwarzania vWF [49,66]. WPBs mają charakterystyczny kształt pałeczki, co jest spowodowane obecnością struktur o kształcie rurki tworzonych przez vWF. Podczas multimeryzacji vWF ulega znacznej zmianie organizacji umożliwiającej jego ściśle upakowanie w WPBs, co pozwala na nawet 100-krotne skompresowanie białka [67]. Konieczna do tego jest obecność vWFpp. Dochodzi do utworzenia helikalnej rurki, której środek stanowią domeny D'D3 oddziałujące między sobą (Rycina 4). Pozostałe domeny białka są skierowane na zewnątrz helisy tworząc regularne odstępy pomiędzy helisami [45].



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie helikalnego ułożenia multimerów vWF podczas upakowywania w WPBs. Przygotowano na podstawie [68], zmienione.

vWFpp i vWF stanowią ponad 95% zawartości WPBs [69], jednakże WPBs magazynują również inne białka związane z procesem krzepnięcia i stanem zapalnym, w tym np. P-selektynę, t-PA, IL-8, MCP-1, angiopoetynę-2, czy też w niektórych rodzajach śródbłónka czynnik VIII [70–72]. Powstałe WPBs są obecne w komórce przez co najmniej 24 h od powstania [73–75]. W odpowiedzi na specyficzne bodźce zewnętrzne w komórkach śródbłónka mogą powstawać WPBs różniące się zawartością [76,77]. W obecności cytokin prozapalnych dochodzi do zwiększonej syntezy niektórych z białek m.in. IL-8, IL-6, MCP-1, eotaksyny, w wyniku czego są one magazynowane w nowo powstających WPBs w sposób

przypadkowy [70]. Natomiast P-selektyna oddziałuje bezpośrednio z vWF, co może determinować jej specyficzne magazynowanie w WPBs [78,79].

Do utworzenia WPBs konieczna jest obecność w błonie TGN klatryny oraz kompleksu białek adaptorowych AP-1 (ang. *adaptor protein 1*). Podczas procesu dojrzewania WPBs dochodzi do dołączenia kolejnych białek [76]. Wśród nich ważne jest CD63, które jest aktywatorem i regulatorem funkcji P-selektyny [80]. AnxA8 uczestniczy w procesie dojrzewania WPBs poprzez dostarczanie CD63 [81]. Dojrzewanie WPBs jest związane również z obniżeniem pH do około 5,5 oraz zwiększeniem stężenia jonów wapnia wewnątrz WPBs, co umożliwia ściśle upakowanie vWF [62,67,82–86].

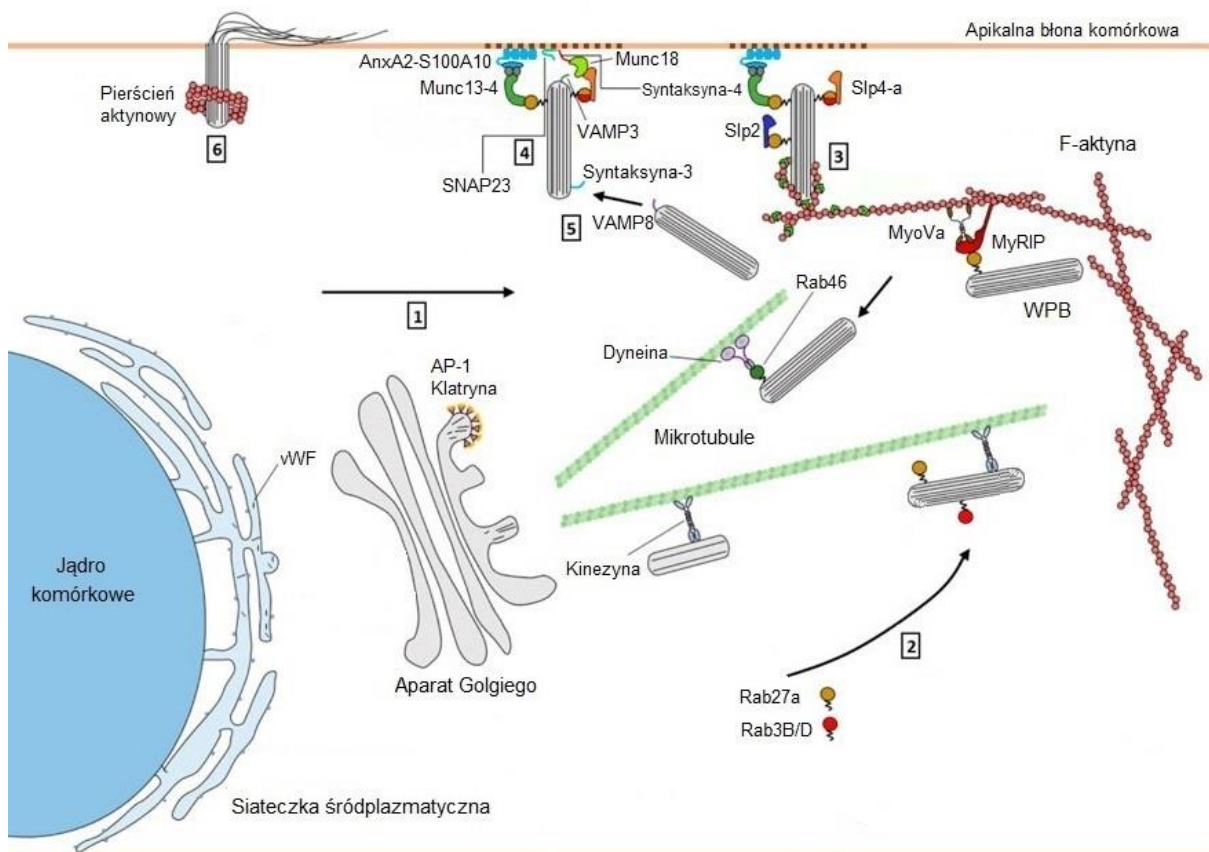
1.4.4. Wydzielanie czynnika von Willebranda

Wyróżnia się 3 sposoby wydzielania vWF z komórek śródbłonka: konstytutywne, podstawowe i regulowane. Wydzielanie konstytutywne przebiega bez udziału WPBs i w warunkach normalnych jest znikome [87]. Zaobserwowano je doświadczalnie w warunkach zaburzonego powstawania WPBs w komórkach pozbawionych klatryny lub braku oddziałującego z klatryną kompleksu białek adaptorowych AP-1 [88]. Wydzielenie podstawowe zachodzi spontanicznie w komórkach śródbłonka i zapewnia podstawowy poziom vWF we krwi [74]. Może wynikać z przypadkowego przemieszczania się WPBs w komórce [89]. Wydzielanie regulowane ma miejsce w przypadku aktywacji komórek przez agonistę, np. trombinę, histaminę, adrenalinę [90]. Konstytutywne wydzielanie zachodzi po stronie bazalnej komórki. Natomiast wydzielanie podstawowe i regulowane w większości zachodzi w kierunku apikalnym, czyli do światła naczynia krwionośnego [91].

WPBs po odłączeniu od TGN oddziałują z mikrotubulami i przemieszczają się na obrzeża komórki [76]. Następnie dochodzi do przyłączenia WPBs do filamentów aktynowych, co wymaga udziału białek Rab27a, MyRIP oraz miozyny Va (MyoVa) [92,93]

Regulowane wydzielanie WPBs jest stymulowane przez agonistów aktywujących receptory sprzężone z białkami G (GPCRs, ang. *G protein coupled receptors*) i w efekcie powodujących wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia lub cyklicznego AMP (cAMP) [90]. Część poznanych mechanizmów wydzielania jest wspólna dla obu typów agonistów, ale nadal wiele szczegółów różniących oba procesy nie jest wyjaśnionych [76]. Histamina i trombina powodują znaczne wydzielenie WPBs aktywując ścieżkę sygnałową związaną z jonami wapnia. Natomiast forskolina poprzez aktywację cyklicznej adenylanowej, prowadzi do zwiększenia stężenia cAMP, podobnie jak ma to miejsce w przypadku aktywacji receptorów adrenergicznych typu β_2 przez adrenalinę, i powoduje wydzielenie wybranych

frakcji WPBs na obrzeżach komórki [94]. Ważnym elementem biorącym udział w wydzielaniu WPBs jest właściwa organizacja cytoszkieletu [92,95]. Zaburzenia organizacji mikrotubul hamują wydzielanie stymulowane na drodze zależnej od jonów wapnia, ale nie mają wpływu na wydzielanie zależne od cAMP [94].



Rycina 5. Schemat wydzielania WPBs z komórek śródbłonna. 1) Do utworzenia WPBs w TGN konieczny jest udział klatryny i AP-1. 2) Dojrzwanie WPBs związane jest z dołączaniem różnych białek. 3) Przylączenia WPBs do błony komórkowej. 4) Fuzja WPBs z błoną komórkową. 5) Połączenie się WPBs zachodzi z udziałem VAMP8 i syntaksyny-3. 6) Pierścień aktynowy umożliwia efektywne wydzielenie zawartości WPBs. Przygotowano na podstawie [96], zmienione.

Wydzielanie WPBs zachodzi wieloetapowo (Rycina 5). Do tej pory zidentyfikowano część białek zaangażowanych w ten proces, wśród nich małe białka wiążące GTP należące do rodzin Rab, Ral, Rho, m.in. RalA [32], ale lista ta jest dłuższa. Białko Munc13-4 uczestniczy w przylączeniu WPBs do błony komórkowej poprzez oddziaływanie z kompleksem utworzonym przez aneksynę (Anx, ang. *annexin*) A2 i białko S100A10 [97-99]. Proces fuzji błony WPBs z błoną komórkową jest zależny od białek SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), w tym białek znajdujących się na WPBs v-SNARE (ang. *vesicle SNARE*) oraz na docelowej

błonie komórkowej t-SNARE (ang. *target SNARE*). Dochodzi do utworzenia kompleksu składającego się z białka v-SNARE VAMP3 (ang. *vesicle-associated membrane protein 3*) i białek znajdujących się na błonie komórkowej SNAP23 (ang. *synaptosomal-associated protein 23*) oraz jednego z białek z rodziny synakstyn (syntaksyny 2, syntaksyny 3 lub syntaksyny 4) [100–103].

Podczas wydzielania dochodzi do fuzji błony WPBs z błoną komórkową, co powoduje uwolnienie zgromadzonej zawartości. W odpowiedzi na stymulację wydzielenie zachodzi w czasie krótszym niż 10 sekund, a sam proces wydzielania trwa mniej niż 1 sekundę [82,104]. W momencie utworzenia pora fuzyjnego i kontaktu z neutralnym pH występującym w przestrzeni pozakomórkowej, multimery vWF ściśle upakowane w postaci tubularnych helis w WPBs ulegają nagłemu rozwinięciu [67,82]. Dochodzi wówczas do natychmiastowego odłączenia vWFpp od vWF, do tej pory związanego niekowalencyjnie. Odłączenie vWFpp powoduje zmianę struktury multimerów vWF i umożliwia ich rozwinięcie i uzyskanie właściwej konformacji w krwiobiegu [67,105]. WPBs mogą być wydzielane pojedynczo poprzez fuzję z błoną komórkową, bądź też może dochodzić do poprzedzającego wydzielenie połączenia się wielu WPBs wewnątrz komórki [76].

Ponadto małe białka mogą być wydzielane z WPBs w sposób selektywny. Tak dzieje się w przypadku utworzenia pora fuzyjnego o stosunkowo małej średnicy wynoszącej około 12 nm. Ze względu na rozmiar vWFpp i vWF białka te pozostają wówczas w WPBs, natomiast dochodzi do wydzielenia m.in. IL-8, a także znajdującego się w błonie CD63. Taka sytuacja zachodzi szczególnie w przypadku stymulacji komórek śródbłónka agonistą w niskim stężeniu i może być mechanizmem kontroli odpowiedzi prozapalnej, służącej ograniczeniu ryzyka tworzenia zakrzepów [69].

1.5. Kwas palmitynowy

Jednym z kluczowych czynników powodujących komplikacje związane z rozwojem stanu zapalnego i zaburzeń metabolizmu lipidów obserwowane u osób otyłych jest zwiększone stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, ang. *free fatty acids*) [106-109]. Związki te są uwalniane z tkanki tłuszczowej, a także pochodzą z diety. Szczególne istotne znaczenie w kontekście dysfunkcji śródbłónka ma kwas palmitynowy (PA, ang. *palmitic acid*; 16:0).

PA jest FFA występującym w osoczu krwi w najwyższym stężeniu [110], stanowiąc około 25-30% wszystkich FFA i 65% nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA, ang. *saturated fatty acids*) [111–113]. U osób otyłych stężenie PA jest zwiększone nie tylko

w osoczu [114], ale też w płynie mózgowo-rdzeniowym [115]. Wysokie stężenie PA w osoczu wykazano także u kobiet w ciąży ze stwierdzoną cukrzycą ciążową [116].

Zwiększenie stężenia FFA w osoczu u osób z otyłością wynika ze zwiększonej lipolizy triacylogliceroli nagromadzonych w tkance tłuszczowej do wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu [117]. Szczególnie istotna w rozwoju zaburzeń metabolicznych wydaje się trzewna tkanka tłuszczowa, która stale uwalnia FFA do osocza [118]. Dodatkowo cukry przyjmowane w nadmiarze w diecie są wykorzystywane jako substrat w procesie lipogenezy, co doprowadza do akumulacji triacylogliceroli [119–122]. PA jest także dostarczany egzogennie w diecie (Tabela 2) [123,124], lecz ma to stosunkowo mniejszy wpływ na jego stężenie w osoczu [111,125].

Zwiększone stężenie krążącego w krwiobiegu PA jest związane z większym ryzykiem rozwoju insulinooporności i cukrzycy typu 2 [122,126], a także chorób sercowo-naczyniowych, w tym choroby niedokrwiennej serca i udaru [127]. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku innych SFA zbudowanych z parzystej liczby węgli, takich jak kwas mirystynowy (14:0) i kwas stearynowy (18:0) [126,127], przy czym PA ma spośród nich największy udział w rozwoju chorób metabolicznych i sercowo-naczyniowych [127].

Tabela 2. Zawartość PA w niektórych olejach i tłuszczach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego wyrażona jako % całkowitej ilości kwasów tłuszczowych (FA, ang. *fatty acids*) [125].

Źródła roślinne	% FA
Olej palmowy	40,1-47,5
Masło kakaowe	25,4
Oliwa z oliwek	7,5-20,0
Olej kokosowy	8,2
Olej lniany	4,0-7,0
Olej rzepakowy	1,5-6,0
Olej słonecznikowy	5,4-5,9
Źródła zwierzęce	% FA
Smalec	21,07
Masło	20,86

Wpływ PA na metabolizm i funkcje różnych typów komórek, w tym komórek śródbłónka, jest przedmiotem wielu badań prowadzonych *in vivo* i *in vitro* w licznych laboratoriach na świecie. Wykazano, że związek ten indukuje insulinooporność [128–132], zwiększa wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) [133–135], moduluje metabolizm mitochondriów [136], stymuluje rozwój stanu zapalnego [131,137–141] i może indukować apoptozę [137,142]. Efekty te są niejednakowe we wszystkich narządach, a także zależą od stężenia PA i czasu ekspozycji komórek na ten związek. Ze względu na rozwój chorób sercowo-naczyniowych szczególnie istotne skutki działania PA dotyczą komórek śródbłónka.

1.6. Receptory Toll-like (TLR)

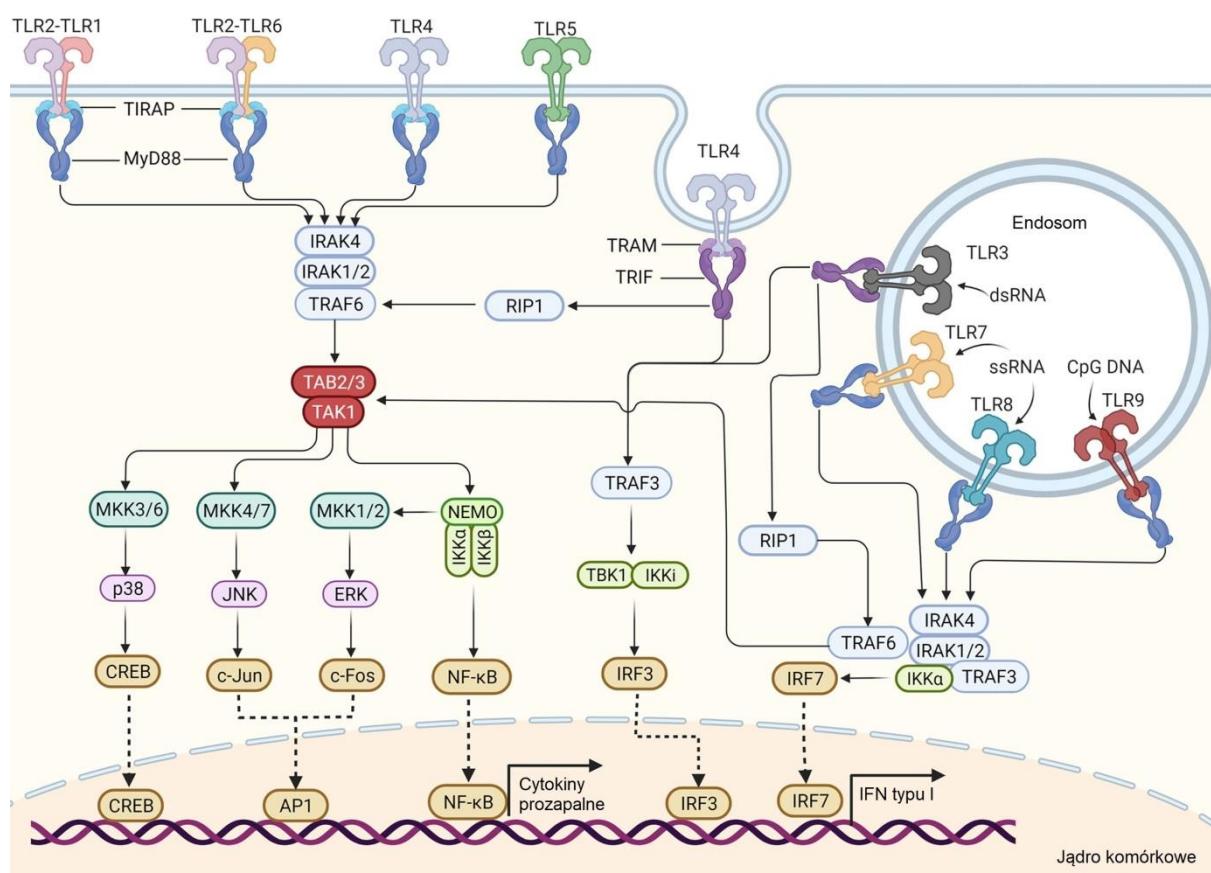
Receptory TLR (ang. *Toll-like receptors*) należą do receptorów rozpoznających wzorce (PRRs, ang. *pattern recognition receptors*) i uczestniczą w nieswoistej (wrodzonej) odpowiedzi immunologicznej. Białka te mają zdolność do wykrywania patogenów poprzez rozpoznawanie molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMP, ang. *pathogen-associated molecular patterns*), które są elementami ich budowy, a także endogennych cząsteczek powstałych w wyniku uszkodzenia tkanek, czyli DAMP (ang. *damage-associated molecular patterns*). Wiązanie liganda przez TLR aktywuje ścieżki sygnałowe prowadzące do wytwarzania cytokin i chemokin prozapalnych, które aktywują i regulują odpowiedź zapalną [143]. TLR są receptorami transbłonowymi, w których wyróżnia się domenę zewnątrzkomórkową zawierającą powtórzenia bogate w leucynę (LRR, ang. *leucine rich repeats*) odpowiadającą za identyfikację i wiązanie ligandów oraz wewnątrzkomórkową domenę sygnałową TIR (ang. *Toll-IL-1 receptor*), połączone transbłonową helisą.

U człowieka zidentyfikowano dziesięć rodzajów receptorów TLR. Występują one w komórkach układu odpornościowego, w tym w związanych z odpowiedzią nieswoistą makrofagach, komórkach dendrytycznych oraz związanych z odpowiedzią swoistą limfocytach, a także w komórkach nabłónka, śródbłónka, czy też w fibroblastach. Na podstawie lokalizacji TLR w komórce, co jest również związane z ich funkcją, wyróżnia się receptory występujące w błonie komórkowej oraz wewnątrzkomórkowe, występujące w endosomach. Receptory zlokalizowane w błonie komórkowej, w tym TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, odpowiadają za rozpoznawanie składników budowy mikroorganizmów, czyli peptydoglikanów, lipopolisacharydów, lipoprotein pochodzących ze ściany komórkowej i otoczki bakterii. Receptory zlokalizowane w endosomach, w tym TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, rozpoznają kwasy nukleinowe pochodzące

z patogenów [143,144]. Niektóre z nich, w tym TLR2 i TLR4, mają zdolność do wiązania różnych ligandów [145]. W Tabeli 3 przedstawiono specyficznym rozpoznawane ligandy TLR.

Tabela 3. Charakterystyka TLR człowieka z uwzględnieniem lokalizacji, specyficznych ligandów oraz białek adaptorowych i efektorowych (IFN-interferon; EDA, ang. *extra domain A*) [146–149].

TLR	Lokalizacja	Ligandy PAMP	Ligandy DAMP	Białka adaptorowe	Białka efektorowe
TLR2/1	błona komórkowa	lipoproteiny, triacylowane lipopeptydy	nieznane	TIRAP/MyD88	cytokiny prozapalne
TLR2/6	błona komórkowa	lipoproteiny, kwas lipotejchowy, peptydoglikan, zymosan	białka szoku cieplnego, HMGB1, kwas hialuronowy	TIRAP/MyD88	cytokiny prozapalne
TLR3	błona endosomów	dwuniciowe RNA wirusów	mRNA	TRIF	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR4	błona komórkowa, błona endosomów	lipopolisacharyd (LPS)	białka szoku cieplnego, HMGB1, β -defensyna 2, domena EDA fibronektyny, fibrynogen, kwas hialuronowy, siarczan heparanu,	TIRAP/MyD88, TRAM/TRIF	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR5	błona komórkowa	flagellina	HMGB1, domena EDA fibronektyny	MyD88	cytokiny prozapalne
TLR7	błona endosomów	jednoniciowe RNA wirusów	małe jądrowe RNA (U11snRNA)	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR8	błona endosomów	jednoniciowe RNA wirusów	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR9	błona endosomów	niemetylowane sekwencje CpG DNA, hemozoina Plasmodium	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne, IFN typu I
TLR10	błona komórkowa	białko profilinopodobne	nieznane	MyD88	cytokiny prozapalne



Rycina 6. Schemat szlaku sygnałowego TLR. Przygotowano na podstawie [150], zmienione.

Rozpoznanie i związanie liganda przez TLR umożliwia dimeryzację receptorów, a przez to ich aktywację. TLR2 tworzy heterodimery z TLR1 lub TLR6, natomiast pozostałe TLR tworzą homodimery. Dimeryzacja TLR umożliwia oddziaływanie pomiędzy domenami TIR receptorów i białek adaptorowych, a w konsekwencji utworzenie kompleksu sygnałowego. W zależności od liganda, rodzaju aktywowanego TLR i białka adaptorowego dochodzi do aktywacji różnych szlaków sygnałowych (Tabela 3 i Rycina 6).

Białko adaptorowe MyD88 (ang. *myeloid differentiation primary-response protein 88*) bierze udział w przekazywaniu sygnału od wszystkich TLR, z wyjątkiem TLR3. Białka TLR2 i TLR4 wymagają dodatkowo udziału białka adaptorowego TIRAP (ang. *TIR domain-containing adaptor protein*), które pośredniczy w oddziaływaniu z białkiem MyD88. Następnie dochodzi do rekrutacji IRAK (ang. *interleukin-1 receptor-associated kinase*) 4, IRAK 1, IRAK 2. W wyniku fosforylacji IRAK 1 zostaje uwolnione z kompleksu do cytoplazmy, gdzie wiąże się do TRAF 6. Powoduje to tworzenie kompleksu TAK 1 z TAB, co z kolei aktywuje kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein*) oraz kinazy IKK (ang. *IκB kinase*), czyli kinazy inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF-κB (ang. *nuclear*

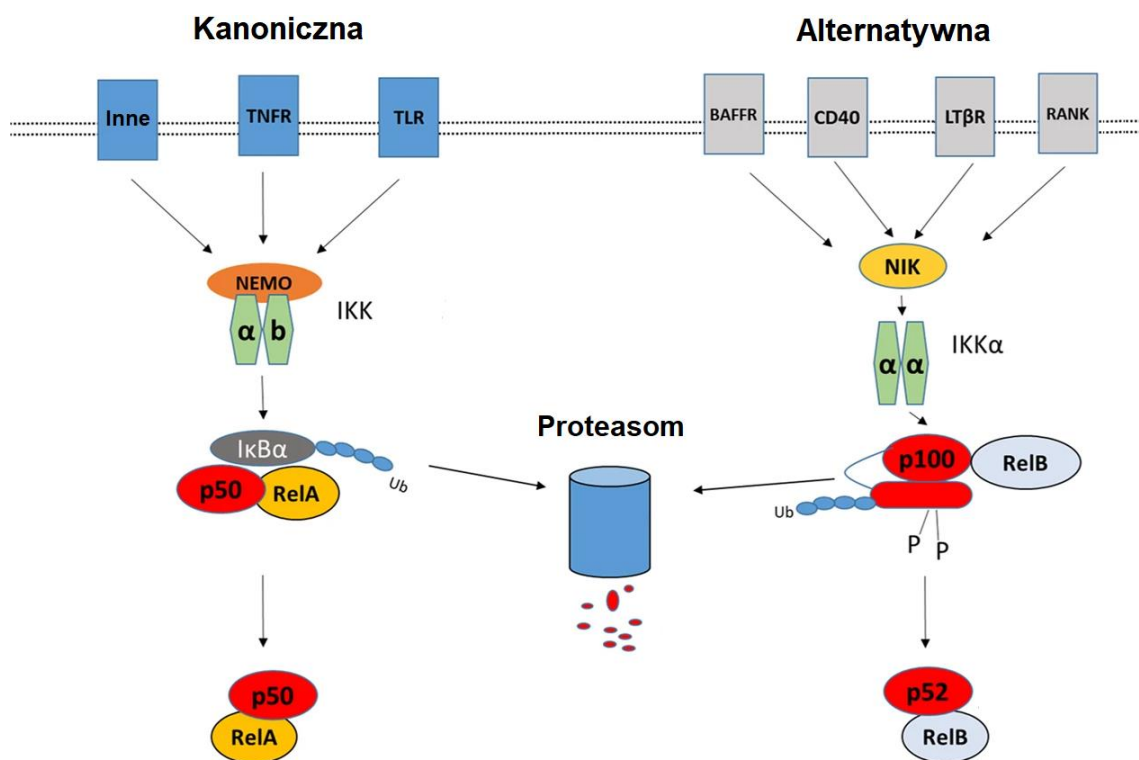
factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) I κ B. Kinazy MAP przez aktywację p38 i JNK przekazują sygnał do czynników transkrypcyjnych CREB (ang. *cAMP-responsive element*) i AP-1 (ang. *activator protein-1*). Kompleks kinaz IKK katalizuje reakcję fosforylacji I κ B, co umożliwia jego ubikwitylację i degradację. W konsekwencji dochodzi do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, który ulega przemieszczeniu do jądra. Ścieżka sygnałowa zależna od białka MyD88 prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących m.in. cytokiny prozapalne, w tym TNF- α , interleukiny, MCP-1. W przypadku TLR7, TLR8, TLR9 aktywacja ścieżki zależnej od MyD-88 prowadzi do zwiększonego wytwarzania interferonów typu I, ale także cytokin prozapalnych.

Białko adaptorowe TRIF (ang. *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*) bierze udział w przekazywaniu sygnału wyłącznie od TLR3 i TLR4. W tym mechanizmie TLR4 wymaga udziału białka adaptorowego TRAM (ang. *TRIF-related adaptor molecule*). Następnie oddziaływanie TRIF z TRAF 3, poprzez aktywację kinaz IKK ϵ i TBK1 powoduje fosforylację i przemieszczenie do jądra czynników transkrypcyjnych IRF (ang. *interferon regulatory factor*) 3 i IRF 7. Zależna od TRIF ścieżka sygnałowa prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących interferony typu I [144,145,151].

1.7. Czynniki transkrypcyjne NF- κ B

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B pełni kluczową rolę w regulacji ekspresji genów związanych z odpowiedzią zapalną i odpornościową, a także proliferacją komórek i apoptozą w odpowiedzi na bodźce naturalne lub czynniki stresowe. Rodzinę NF- κ B tworzy 5 białek: NF- κ B1/p50, NF- κ B2/p52, RelA/p65, RelB oraz c-Rel, które funkcjonują jako 15 różnych dimerów [152]. Regulacja transkrypcji genów zależnych od NF- κ B następuje poprzez przyłączenie dimeru do właściwej sekwencji nukleotydowej w cząsteczce DNA. Charakterystyczna w budowie białek NF- κ B jest obecność domeny RHD (ang. *Rel homolog domain*), która odpowiada za wiązanie DNA, tworzenie dimerów, a także oddziaływanie z inhibitorem I κ B. Ponadto białka będące prekursorami p50 i p52, czyli odpowiednio p105 i p100 mają na C-końcu fragment podobny do I κ B, a zatem hamujący aktywność NF- κ B [153]. W stanie nieaktywnym dimery NF- κ B lokalizują się w cytoplazmie w wyniku wiązania z inhibitorami I κ B. Przyłączony I κ B maskuje sekwencję NLS (ang. *nuclear localization sequence*) warunkującą lokalizację jądrową. W wyniku odłączenia I κ B, NF- κ B zostaje uwolnione, a NLS ulega odsłonięciu, co umożliwia przemieszczenie do jądra i regulację ekspresji genów [154]. RelA/p65, RelB i c-Rel mają domenę TAD (ang. *transcription activation domain*), która odpowiada za aktywację transkrypcji genów [155].

Aktywacja NF- κ B następuje w odpowiedzi na szereg bodźców, m.in. ligandów aktywujących receptory PRRs, w tym z rodziny TLR, receptory TNF- α TNFRSF (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily*), TCR (ang. *T-cell receptor*) limfocytów T, BCR (ang. *B-cell receptor*) limfocytów B. Wyróżnia się kanoniczną (klasyczną) i niekanoniczną (alternatywną) ścieżkę aktywacji NF- κ B (Rycina 7). Kanoniczna aktywacja zachodzi z udziałem kompleksu kinaz IKK. Aktywacja sygnału prowadzi do fosforylacji I κ B, a w konsekwencji uwolnienia NF- κ B. Następnie dochodzi do ubikwitylacji i degradacji I κ B przez proteasom. Kanoniczna aktywacja zachodzi głównie z udziałem dimerów p50/p65 i p50/c-Rel. Alternatywna aktywacja ma miejsce w odpowiedzi na tylko niektóre ligandy, w tym wybrane cytokiny aktywujące receptory z rodziny TNFRSF. W przekazywaniu sygnału uczestniczy kinaza NIK (ang. *NF- κ B-inducing kinase*), która katalizuje reakcję fosforylacji IKK α . Następnie dochodzi do fosforylacji białka p100, co umożliwia jego ubikwitylację, a w konsekwencji selektywną degradację C-końca podobnego do I κ B, funkcjonującego jako inhibitor. Wówczas białko prekursorowe p100 zostaje przekształcone w białko p52, a dimer p52/RelB ulega przemieszczeniu do jądra [153].



Rycina 7. Schemat kanonicznej i alternatywnej aktywacji szlaku sygnałowego NF- κ B. Przygotowano na podstawie [156], zmienione.

Zwiększenie ekspresji genów na skutek aktywacji NF- κ B zależy od rodzaju bodźca i udziału właściwej ścieżki sygnałowej. Ponadto NF- κ B podlega modyfikacjom potranslacyjnym wpływającym na jego aktywność, spośród których fosforylacja wydaje się najistotniejsza. W zależności od miejsca w cząsteczce NF- κ B fosforylacja ma wpływ na jego oddziaływanie z innymi białkami, stabilność i umożliwia selektywną aktywację transkrypcji wybranych genów [157].

Ważnymi genami regulowanymi przez NF- κ B są geny kodujące TNF- α , interleukiny, białka adhezyjne ICAM-1, VCAM-1, metaloproteinazy MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) 2, MMP-9 i indukowalną syntazę tlenku azotu (iNOS). Dodatkowo aktywowana jest ekspresja genu kodującego I κ B, co stanowi negatywny mechanizm regulacji ścieżki NF- κ B.

2. Założenia i cele pracy

Nieprawidłowości w funkcjonowaniu śródbłónka naczyń krwionośnych są jednym z początkowych zaburzeń sercowo-naczyniowych towarzyszących otyłości. Jednym z parametrów zmienionych u osób otyłych jest zwiększone stężenie kwasów tłuszczowych w osoczu. Szczególne znaczenie w tym kontekście ma PA, który występuje w najwyższym stężeniu oraz wykazuje działanie prozapalne.

Czynnik von Willebranda (vWF) jest wydzielany przez komórki śródbłónka naczyniowego na skutek aktywacji. U osób otyłych stężenie tego czynnika w osoczu jest podwyższone, co ze względu na jego prozakrzepowe działanie przynajmniej częściowo może być związane z rozwojem zaburzeń sercowo-naczyniowych. Jednakże mechanizm biochemiczny leżący u podstaw tych zmian, a zwłaszcza potencjalna rola kwasów tłuszczowych w regulacji zwiększonego stężenia vWF nie są poznane.

W związku z rozwojem odpowiedzi prozapalnej wywołanej przez PA istotny wydaje się udział czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Dane literaturowe wskazują na możliwy udział zarówno receptorów TLR2, jak i TLR4, ale także innych mechanizmów w aktywacji odpowiedzi komórek na PA.

W niniejszej pracy celem było scharakteryzowanie odpowiedzi komórek śródbłónka na PA, w takich warunkach, by dochodziło do zwiększenia ilości białek adhezyjnych, co jest typową odpowiedzią śródbłónka na stres, ale nie powodowało zmniejszonej przeżywalności komórek. Taka strategia pozwala na obserwację odpowiedzi komórek w stosunkowo łagodnych warunkach, w których jak można przypuszczać, zminimalizowane były inne efekty np. związane z apoptozą.

A zatem, celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było ustalenie czy, a jeżeli tak, to w jaki sposób, PA wpływa na wydzielanie vWF przez ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (HUVEC).

Cele szczegółowe niniejszej pracy obejmowały:

1. Zbadanie wpływu PA na wytwarzanie i wydzielanie vWF w komórkach HUVEC.
2. Zbadanie wpływu PA na potencjalne mechanizmy regulujące wydzielanie vWF.
3. Zbadanie wpływu PA na ścieżkę sygnałową NF- κ B oraz wybrane receptory TLR w komórkach HUVEC i sprawdzenie, czy biorą udział w zależnym od PA zwiększeniu wytwarzania vWF.

3. Materiały i metody

3.1. Warunki hodowli komórek HUVEC

Wszystkie doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem ludzkich pierwotnych komórek śródbłónka żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; PCS-100-013; ATCC). Komórki hodowano w pożywce przeznaczanej do tych komórek EBM-2 (Lonza) uzupełnionej EGM-2 (Lonza), zawierającym 2% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. *foetal bovine serum*) oraz hydrokortyzon, ludzki czynnik wzrostu fibroblastów (hFGF, ang. *human fibroblastic growth factor*), VEGF, rekombinowany analog ludzkiego insulिनopodobnego czynnika wzrostu (R3-IGF-1, ang. *R3-insulin-like growth factor-1*), kwas askorbinowy, ludzki czynnik wzrostu naskórka (hEGF, ang. *human epidermal growth factor*), heparynę, gentamycynę i amfoterycynę.

Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C przy wilgotności 95% i w obecności 5% CO₂. Komórki pasażowano w stosunku 1 do 4 po osiągnięciu 70-80% konfluencji, czyli co 2 dni, wykorzystując w celu ich odklejenia od podłoża 0,025% trypsynę (Trypsin/EDTA, Lonza), a następnie roztwór hamujący jej aktywność (TNS, ang. *Trypsin Neutralizing Solution*; Lonza). Zawiesinę komórek wirowano przez 3 minuty przy przyspieszeniu 200 x g i zawieszano w pożywce, a następnie wysiewano. Doświadczenia wykonywano z wykorzystaniem komórek z pasażu 4-5.

Czas i warunki hodowli ustalono na podstawie doświadczeń LoMonaco i Lowenstein [158] przeprowadzonych w celu optymalizacji warunków wydzielania vWF. Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem komórek hodowanych na szalkach pokrytych kolagenem I (Sigma-Aldrich). Czas hodowli od wysiania komórek do zakończenia doświadczenia wynosił 10 dni. Do doświadczeń wykorzystywano hodowle w stanie 100% konfluencji, co następowało w ciągu 2 dni od wysiania komórek.

3.2. Doświadczenia z wykorzystaniem kwasu palmitynowego

3.2.1. Przygotowanie kompleksu kwasu palmitynowego z albuminą

Kompleks PA z albuminą surowicy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumin*) przygotowywano wykorzystując zmodyfikowaną metodę Cousin i wsp. [159]. Zawiesinę PA w 0,1 M NaOH ogrzewano w łaźni z wytrząsaniem w temperaturze 70°C do momentu uzyskania klarownego roztworu o końcowym stężeniu PA wynoszącym 100 mM. Jednocześnie przygotowywano 10% roztwór wolnej od kwasów tłuszczowych BSA

(Sigma-Aldrich) rozpuszczonej w PBS. Następnie do roztworu BSA ogrzanego do 52°C i intensywnie mieszanego dodawano stopniowo kroplami PA. Uzyskiwano w ten sposób kompleks o nominalnym stężeniu PA wynoszącym około 25 mM. Preparat filtrowano dwukrotnie przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm, a następnie dzielono na mniejsze porcje w celu uniknięcia wielokrotnego rozmrażania i przechowywano w temperaturze -20°C. Roztwór wykorzystywano w ciągu roku od przygotowania.

Komórki inkubowano przez 6, 24 lub 48 godzin w obecności 100 lub 200 µM PA. Informacja na temat czasu inkubacji i stężenia jest podana na rycinach lub w legendach do rycin. W przypadku inkubacji trwających 48 h po upływie 24 h pożywkę wymieniano na świeżą również zawierającą PA. Komórki kontrolne inkubowano w obecności roztworu BSA w stężeniu odpowiadającym BSA w kompleksie z PA.

3.2.2. Oznaczanie stężenia kwasu palmitynowego

W przefiltrowanym preparacie kompleksu PA z BSA oznaczano rzeczywiste stężenie kwasu tłuszczowego z wykorzystaniem Non-Esterified Fatty Acids (NEFA) Assay (Randox) zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie PA wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej z wykorzystaniem standardu NEFA dostarczonego przez producenta. Do probówek zawierających 1 ml R1 pipetowano odpowiednio H₂O, standard NEFA (25, 50, 100 µl) oraz odpowiednio rozcieńczony (10 do 20-krotnie) uzyskany PA. Roztwory inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C, dodawano 2 ml R2 i ponownie inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C. Następnie przeprowadzano pomiar absorbancji z wykorzystaniem spektrofotometru Hitachi U-2900 przy długości fali 550 nm. Uzyskiwane roztwory PA miały stężenie mieszczące się między 7,94 mM a 12,21 mM.

3.3. Inhibitory

W celu identyfikacji ścieżki sygnałowej aktywowanej przez PA zastosowano inhibitory przedstawione w Tabeli 4. Inhibitory kardamonina i TAK-242 zostały wybrane w oparciu o doświadczenia z wykorzystaniem komórek HUVEC traktowanych PA [140]. Inhibitory były rozpuszczane w DMSO, w związku z czym w próbach kontrolnych komórki inkubowano w obecności 0,1% DMSO, takiego samego jakie stosowano w próbach z inhibitorami. Komórki inkubowano w obecności inhibitorów przez 1 h przed dodaniem PA, a następnie przez cały czas inkubacji jednocześnie z PA.

Tabela 4. Inhibitory wykorzystane w doświadczeniach.

Nazwa inhibitora	Cel	Numer katalogowy (producent)	Stężenie	
			6 h	48 h
kardamonina (CARD)	NF-κB	C8249 (Sigma-Aldrich)	20 μM	5 μM
C29	TLR2	HY-100461 (MedChemExpress)	100 μM	
TAK-242	TLR4	614316 (Calbiochem)	20 μM	

3.4. Stymulacja receptorów TLR2

Komórki inkubowano przez 48 h w obecności 200 μM PA, a następnie na 2 h podawano peptydoglikan z *Bacillus subtilis* (69554, Sigma-Aldrich) w stężeniu 10 μg/ml. Próby izolowano w TRI-Reagent i analizowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.12. (Badanie ekspresji genów) w celu zbadania ekspresji genu *TNF* na skutek aktywacji TLR2.

3.5. Transfekcja komórek siRNA

W celu wyciszenia genów *TLR2* i *TLR4* zastosowano metodę transfekcji siRNA (ang. *small interfering RNA*). Sekwencje nukleotydowe wykorzystanych w tym celu siRNA (Invitrogen) zamieszczono w Tabeli 5. Komórki wysiewano 24 h przed transfekcją, tak aby w momencie transfekcji ich konfluencja wynosiła około 100%. siRNA dostarczano do komórek za pomocą odczynnika jetPRIME (Polypus-transfection). Jako kontrolę negatywną stosowano Silencer Select Negative Control #2 siRNA (siRNA neg; 4390846, Invitrogen). W celu przygotowania mieszaniny transfekcyjnej do buforu jetPRIME dodawano siRNA tak, aby końcowe stężenie wynosiło 30 nM i mieszano. Następnie dodawano odczynnik jetPRIME, mieszano delikatnie i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Mieszaninę uzupełniano odpowiednią ilością pożywki hodowlanej i podawano do hodowli komórek. W celu zwiększenia efektywności wyciszenia ekspresji genu *TLR4* wykorzystano również mieszaninę zawierającą dwa różne siRNA. Wówczas stężenie siRNA neg zwiększano dwukrotnie do 60 nM (siRNA negx2). Po 24 h transfekcji pożywkę zmieniano na nową, niezawierającą siRNA. Następnie 48, 72 i 96 h od transfekcji komórki poddawano lizie i analizowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.8. (Identyfikacja białek metodą Western blot) lub izolowano w TRI-Reagent i analizowano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.12. (Badanie ekspresji genów).

Tabela 5. siRNA wykorzystane do wyciszenia ekspresji genów.

Gen	Oznaczenie siRNA	siRNA ID	Sekwencja (5'→3')
TLR2	siTLR2	s168	GCCUUGACCUGUCCAACAAtt
TLR4	siTLR4#1	s14194	GAGCCGCUGGUGUAUCUUUtt
	siTLR4#2	s14195	CAUGAAGAAUUCGGAUUAtt

3.6. Ocena przeżywalności komórek

Przeżywalność komórek oceniano za pomocą zestawu PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (559763, BD Pharmingen) zgodnie z zaleceniami producenta. Proces apoptozy związany jest z przemieszczaniem fosfatydyloseryny z cytoplazmatycznej na zewnątrzkomórkową stronę błony komórkowej. Aneksyna V wykazuje duże powinowactwo do fosfatydyloseryny, co wykorzystywane jest w celu wykrywania komórek apoptotycznych. Podczas analizy zastosowano aneksynę V sprzężoną z fluorescencyjną fikoerytryną (PE, ang. *phycoerythrin*) oraz fluorescencyjny związek 7-AAD (ang. *7-Amino-Actinomycin D*), który usuwany jest z żywych komórek, a w uszkodzonych i martwych silnie wiąże się z DNA.

Komórki po 48 h inkubacji z 200 μ M PA przemywano PBS o temperaturze 37°C i odklejano tak jak przy pasażu za pomocą trypsyny oraz roztworu hamującego jej aktywność. Następnie przemywano zimnym PBS i zawieszano w buforze (Binding Buffer). Do każdej próby dodawano 5 μ l odczynnika PE Annexin V i 5 μ l 7-AAD, po czym inkubowano przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Wyznakowane komórki identyfikowano ilościowo metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem urządzenia FACs Calibur (BD Biosciences), a następnie uzyskane dane analizowano z wykorzystaniem programu BD CellQuest software (BD Biosciences). Analizy dokonano we współpracy z dr hab. Dorotą Dymkowską z Pracowni Metabolizmu Komórki z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego.

3.7. Badanie wydzielania czynnika von Willebranda

3.7.1. Stymulacja wydzielania czynnika von Willebranda

Komórki HUVEC rosnące w 12-dołkowych płytkach inkubowano przez 48 h w obecności 100 lub 200 μ M PA, po czym pożywkę odsysano i dodawano pożywkę EBM-2 bez FBS oraz czynników wzrostu. Po 1 h pożywkę delikatnie zbierano i wykorzystywano

do oznaczenia stężenia wydzielonego vWF. Wydzielanie podstawowe oznaczano w pożywce nie zawierającej żadnych dodatkowych czynników wpływających na wydzielanie vWF. W celu oznaczenia stymulowanego wydzielania vWF do pożywki dodawano 1 μ M histaminę lub 10 μ M forskolinę. Dla forskoliny rozpuszczonej w DMSO kontrolę stanowiły komórki inkubowane w obecności 0,01% DMSO. Pożywkę zbierano do probówek, wirowano 10 minut przy 2000 x g w 4°C, a następnie supernatanty przenoszono do nowych probówek. Uzyskane próby przechowywano w temperaturze -80°C.

3.7.2. Test immunoenzymatyczny ELISA

Stężenie vWF w pożywce oznaczano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). W tym celu wykorzystano zestaw Human Von Willebrand Factor SimpleStep ELISA Kit (ab223864, Abcam). Przed przystąpieniem do analizy przygotowywano odczynniki zgodnie z zaleceniami producenta:

- stężony bufor do płukania (Wash Buffer PT 10X) rozcieńczano 10-krotnie wodą,
- liofilizowane przeciwciało wychwytyjące (ang. *capture antibody*) wirowano przez 2 minuty przy 10 000 x g, dodawano 660 μ l roztworu do rozcieńczania prób (Sample Diluent NS), inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie mieszano przez odwracanie probówki i delikatne pipetowanie, uzyskując roztwór przeciwciała wychwytyjącego o stężeniu 10x,
- mieszaninę przeciwciał przygotowano rozcieńczając dziesięciokrotnie uzyskane w poprzednim punkcie przeciwciało wychwytyjące 10x oraz przeciwciało rozpoznające 10x (ang. *detector antibody*) w roztworze do rozcieńczania przeciwciał (Antibody Diluent 5BI),
- liofilizowany standard ludzkiego vWF rozpuszczono w 500 μ l roztworu do rozcieńczania prób (Sample Diluent NS) uzyskując standard vWF o stężeniu 60 ng/ml, który następnie użyto do przygotowania serii dwukrotnych rozcieńczeń o stężeniu od 30 ng/ml do 0,469 ng/ml, na podstawie których wyznaczano krzywą wzorcową, a następnie obliczano stężenie vWF w badanych próbach.

Próby badane rozcieńczano przed pomiarem 10-30-krotnie w roztworze do rozcieńczania prób (Sample Diluent NS). Wszystkie oznaczenia przeprowadzano w dwóch powtórzeniach technicznych.

Do dołków mikropłytki dołączonej do zestawu dodawano odpowiednio 50 μ l standardów krzywej wzorcowej lub rozcieńczonych prób pożywki. Następnie do każdego dołka dodawano 50 μ l mieszaniny przeciwciał. Płytkę zaklejano folią dołączoną do zestawu i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 400 rpm na mieszadle

do mikropłytek. Następnie płyn usuwano i dołki przemywano 3-krotnie dodając 350 μ l roztworu do płukania. Do każdego dołka dodawano 100 μ l roztworu substratu (TMB Development Solution) i płytkę inkubowano przez 10 minut w ciemności w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 400 rpm. Reakcję przerywano dodając 100 μ l roztworu zatrzymującego reakcję (Stop Solution), po czym płytkę inkubowano z wytrząsaniem przez 1 minutę. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm na czytniku płytek Infinite M1000 PRO (Tecan).

3.8. Identyfikacja białek metodą Western blot

3.8.1. Przygotowanie lizatów komórkowych

Komórki przemywano dwukrotnie zimnym PBS, który dokładnie usuwano. Szalki z komórkami przenoszono na lód i dodawano roztwór do lizy (Cell Signaling Technology) z dodatkiem inhibitorów proteaz (cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail; Roche), 1 mM PMSF i 10 mM NaF. W zależności od wielkości szalek hodowlanych używano różnych objętości roztworu do lizy: 70 μ l w szalkach o średnicy 35 mm, 120 μ l w szalkach o średnicy 60 mm. Komórki zdrapywano z dna szalki i przenoszono do probówki kilkakrotnie pipetując w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Następnie próby homogenizowano poprzez 10-krotne intensywne pobieranie i wypuszczanie za pomocą strzykawki o pojemności 1 ml z igłą G25 0,5 x 16 mm. Próby inkubowano 20 minut na lodzie, po czym wirowano przez 20 minut przy 16 000 x g w 4°C. Supernatanty przenoszono do nowych probówek. Małą porcję pobierano w celu oznaczenia stężenia białka. Do pozostałej części dodawano 4-krotnie stężony roztwór obciążający do nakładania prób (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% glicerol; 8% SDS; 20% β -merkaptotanol; 0,01% błękit bromofenolowy), mieszano i denaturowano inkubując przez 5 minut w temperaturze 95°C. Tak przygotowane próby przechowywano w -20°C do dalszej analizy.

3.8.2. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w otrzymanych próbach lizatów komórkowych oznaczano metodą Bradforda [160]. Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej przygotowanej z wykorzystaniem roztworu białka referencyjnego BSA o stężeniu 2 mg/ml. Do kuwety pomiarowej zawierającej końcowo 1,2 ml wody oraz próby badanej dodawano 300 μ l odczynnika Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). Zawartość kuwet mieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

Następnie przeprowadzano pomiar absorbancji z wykorzystaniem spektrofotometru Hitachi U-2900 przy długości fali 595 nm.

3.8.3. Elektroforeza żelowa białek w warunkach denaturujących

Rozdział białek przeprowadzono z wykorzystaniem metody elektroforezy jednokierunkowej w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Wykorzystywano żele rozdzielające o różnym stężeniu poliakryloamidu (8%, 10%, 12%), w zależności od masy cząsteczkowej badanych białek. Przygotowywano 10 ml mieszaniny do żelu rozdzielającego i 3 ml mieszaniny do żelu zagęszczającego (5%) zgodnie z Tabelą 6.

Tabela 6. Skład mieszanin żeli poliakryloamidowych zastosowanych w elektroforezie SDS-PAGE.

Składniki	Żel rozdzielający			Żel zagęszczający
	8%	10%	12%	5%
Woda	4,6 ml	4 ml	3,3 ml	2,1 ml
30% akryloamid/bis-akryloamid (37,5:1)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	0,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
1,5 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,38 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl
TEMED	6 µl	4 µl	4 µl	3 µl

Na żel nakładano próby w objętości odpowiadającej 20-30 µg białka oraz 5 µl wzorca wielkości białek od 10 do 180 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) lub od 10 do 250 kDa (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Rozdział białek prowadzono przy stałym napięciu, początkowo przez około 20 minut, wynoszącym 80 V, a następnie około 1,5 h 120 V, w buforze do elektroforezy (25,6 mM Tris-HCl, pH 8,3; 250 mM glicyna; 0,1% SDS).

3.8.4. Transfer białek na membranę PVDF

Białka z żelu przenoszono na membranę PVDF Immobilon-E (Millipore) metodą transferu mokrego. Transfer prowadzono przy natężeniu 350 mA przez 1,5 h w 4°C w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicyna; 0,1% SDS; 20% metanol).

3.8.5. Detekcja białek

Membranę blokowano przez 1 h w 5% BSA lub 5% odtłuszczonego mleka rozpuszczonych w TBS-T (25 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,01% Tween), a następnie płukano trzykrotnie przez 5 minut w TBS-T. Membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym spośród wymienionych w Tabeli 7.

Następnego dnia membrany płukano trzy razy po 10 minut w TBS-T, po czym inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP, ang. *horseradish peroxidase*) rozpuszczonym w 5% odtłuszczonego mleku. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu po 10 minut w TBS-T membranę inkubowano przez 5 minut z odczynnikiem chemiluminescencyjnym (Immobilon-Classico; Millipore). Nadmiar odczynnika usuwano, a membranę umieszczano w urządzeniu Fusion FX (Vilber Lourmat) w celu detekcji sygnału. Uzyskane wyniki analizowano densytometrycznie za pomocą programu BIO-1D software (Vilber Lourmat).

Intensywności prążków w specyficznych położeniach, ustalonych na podstawie wzorca masy białka, normalizowano względem endogennej kontroli β -aktyny lub β -tubuliny, a następnie przedstawiano jako procent kontroli dla danych warunków doświadczalnych.

Tabela 7. Zastosowane przeciwciała.

Przeciwciało I-rzędowe skierowane przeciw białku	Masa białka [kDa]	Rozcieńczenie	Pochodzenie	Numer katalogowy i producent
ADAM10	60, 80	1:500	mysz	sc-28358, Santa Cruz Biotechnology
ATG12	15/63	1:1000	królik	4180, Cell Signaling
ATG16L1	66/68	1:1000	królik	8089, Cell Signaling
ATG3	40	1:1000	królik	3415, Cell Signaling
ATG5	55	1:1000	królik	12994, Cell Signaling
ATG7	78	1:1000	królik	8558, Cell Signaling
beklina-1	60	1:1000	królik	3495, Cell Signaling
fosfo-NF-κB p65 (Ser536)	65	1:1000	królik	3033, Cell Signaling
furyna	87/100	1:500	królik	ab3467, Abcam
ICAM-1	85-110	1:1000	mysz	sc-8439, Santa Cruz Biotechnology
IκBα	39	1:1000	królik	9242, Cell Signaling
p62	62	1:1000	królik	5114, Cell Signaling
TLR2	90-100	1:1000	królik	A19125, ABclonal
TLR4	70-100	1:1000	królik	AF7017, Affinity Biosciences
TLR6	95-110	1:1000	królik	22240-1-AP, ProteinTech
VCAM-1	110	1:500	mysz	sc-13160, Santa Cruz Biotechnology
vWF	309	1:1000	królik	ab6994, Abcam
vWFpp	309-320/100	1:1000	królik	11778-1-AP, ProteinTech
Białka referencyjne				
β-aktyna	42	1:50000	sprzężone z HRP	A3854, Sigma-Aldrich
β-tubulina	50	1:5000	sprzężone z HRP	ab21058, Abcam
Przeciwciało II-rzędowe skierowane przeciw IgG	Masa białka [kDa]	Rozcieńczenie	Pochodzenie	Numer katalogowy i producent
królik	-	1:5000	koza; sprzężone z HRP	ab6721, Abcam
mysz	-	1:5000	królik; sprzężone z HRP	ab6728, Abcam

3.9. Zymografia

Aktywność metaloproteinaz oceniano na podstawie zymografii [161]. Komórki inkubowane 48 h z 200 μ M PA poddawano lizie zgodnie z metodą opisaną w punkcie 3.8.1. (Przygotowanie lizatów komórkowych). Do uzyskanych prób dodawano roztwór obciążający bez β -merkaptoetanolu (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% glicerol; 8% SDS; 0,01% błękit bromofenolowy), a także nie poddawano ich denaturacji termicznej. Uzyskane próby wykorzystywano w celu rozdzielenia białek stosując jednokierunkową elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących jak opisano w punkcie 3.8.3. (Elektroforeza żelowa białek w warunkach denaturujących). Dodatkowo żel rozdzielający o 10% stężeniu poliakrylamidu zawierał domieszkę 0,1% żelatyny, będącej substratem dla testowanych metaloproteinaz. Elektroforezę przeprowadzono w temperaturze 4°C. Następnie żel z rozdzielonymi białkami inkubowano dwukrotnie po 30 minut w temperaturze pokojowej w roztworze renaturującym (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2,5% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂). Triton X-100 w tym roztworze usuwa SDS obecny podczas elektroforezy. W kolejnym etapie żel inkubowano przez 48 h w temperaturze 37°C w roztworze do inkubacji (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂), co zapewnia optymalne warunki do proteolizy żelatyny katalizowanej przez metaloproteinazy specyficzne wobec tego substratu.

Żel płukano w wodzie, po czym barwiono za pomocą błękitu Commassie. W tym celu żel inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w roztworze barwiącym zawierającym 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), 50% metanol, 10% kwas octowy. Żel odbarwiano w roztworze zawierającym 40% metanol i 10% kwas octowy przez około 30-60 minut do momentu uzyskania wyraźnych jasnych prążków. Żelatyna znajdująca się w żelu rozdzielającym powoduje ciemne zabarwienie, natomiast jasne prążki powstają w wyniku proteolizy żelatyny przez metaloproteinazy. Zdjęcia uzyskano za pomocą urządzenia Fusion FX (Vilber Lourmat).

3.10. Wytrącanie białek z roztworu

W celu wytrącenia (precypitacji) białek znajdujących się w pożywce zastosowano kwas trichlorooctowy (TCA) oraz deoksycholan sodu (DOC) [162]. Komórki inkubowano z 200 μ M PA przez 48 h, a następnie przez 1 h stymulowano 1 μ M histaminą w pożywce EBM-2 (Lonza) bez FBS i czynników wzrostu. Całą objętość pożywki delikatnie zbierano i używano w celu wytrącenia wydzielonych do pożywki białek, a komórki poddawano lizie.

Do 1 ml próby dodawano 100 μ l 0,15% DOC, mieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie dodawano 50 μ l TCA, ponownie mieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C. Próby wirowano 15 minut przy 10 000 x g w 4°C. Supernatant dokładnie usuwano tak, aby nie naruszyć osadu. W celu usunięcia pozostałości TCA powstały osad płukano dwukrotnie poprzez dodawanie 500 μ l etanolu i wirowanie 5 minut przy 10 000 x g w 4°C, po czym supernatant usuwano. Osad osuszano, a następnie zawieszano w około 40 μ l roztworu obciążającego (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% glicerol; 8% SDS; 20% β -merkaptotanol; 0,01% błękit bromofenolowy) i inkubowano 5 minut w 95°C. Próby analizowano zgodnie z 3.8. (Identyfikacja białek metodą Western blot), nakładając całą objętość uzyskanej próby.

3.11. Deglikozylacja białek przy użyciu *N*-glikozydazy peptydowej F

W celu potwierdzenia identyfikacji specyficznego prążka odpowiadającego TLR2 metodą Western blot przeprowadzono deglikozylację białka przy użyciu *N*-glikozydazy peptydowej F (PNGazy F; V4831, Promega). Komórki lizowano zgodnie z protokołem opisanym w 3.8.1. (Przygotowanie lizatów komórkowych) i oznaczano w próbach stężenie białka. Do próby dodawano SDS i β -merkaptotanol w stężeniach końcowych odpowiednio 0,3% i 1%. Następnie próby denaturowano termicznie przez 5 minut w 95°C. Po schłodzeniu w temperaturze pokojowej dodawano PNGazę F w stężeniu 6 U na 30 μ g białka. Próby inkubowano 2 h w 37°C, a następnie dodawano roztwór obciążający, denaturowano przez 5 minut w 95°C i przechowywano w -20°C do dalszej analizy zgodnie z 3.8. (Identyfikacja białek metodą Western blot).

3.12. Badanie ekspresji genów

3.12.1. Izolowanie RNA

RNA izolowano z komórek HUVEC wykorzystując odczynnik TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Komórki rosnące na szalce przemywano zimnym roztworem PBS, a następnie dodawano 1 ml odczynnika TRI-Reagent. Komórki inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie pipetowano wielokrotnie w celu uzyskania homogennego lizatu. Próby przechowywano w temperaturze -80°C.

Do oczyszczania całkowitego RNA wykorzystywano zestaw Total RNA Mini (A&A Biotechnology). Próby rozmrażano i ich objętość uzupełniano odczynnikiem TRI-Reagent do 1 ml. Następnie dodawano 200 μ l chloroformu, wytrząsano energicznie

przez 15 sekund, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut i wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut przy 12 000 x g. Po wirowaniu uzyskano rozdział na 3 fazy: górną wodną, zawierającą RNA; pośrednią zawierającą DNA; organiczną zawierającą białka. 500 µl górnej warstwy pobierano tak, aby nie naruszyć pozostałych warstw i przenoszono do probówki zawierającej 500 µl izopropanolu. Próby mieszano delikatnie i nanoszono na minikolumny dwuetapowo po 500 µl, za każdym razem wirując 1 minutę przy 12 000 x g i usuwając przesącz. Następnie minikolumny przenoszono do nowej probówki i dodawano roztwór płuczający A1 dwukrotnie po 700 µl, a następnie trzeci raz 200 µl, po czym wirowano 1 minutę przy 12 000 x g i przesącz odrzucano. Po ostatnim etapie płukania prowadzono dodatkowe wirowanie trwające 2 minuty. Minikolumny przynoszono do nowych probówek, a do złożeń znajdującego się na dnie dodawano po 100 µl ultraczystej wody wolnej od nukleaz. Po 3 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej próby wirowano przez 2 minuty przy 12 000 x g i minikolumny usuwano. Uzyskane oczyszczone całkowite RNA przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Stężenie oraz czystość uzyskanych prób RNA oceniano korzystając ze spektrofotometru do mikroobjętości NanoDrop One (Thermo Scientific). Pomiaru dokonywano w próbach o objętości 2 µl.

3.12.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

W celu uzyskania cDNA (ang. *complementary DNA*) przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji oczyszczonego całkowitego RNA z wykorzystaniem zestawu First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Do reakcji używano 1 µg RNA będącego matrycą uzupełniając objętość jego roztworu do 10 µl ultraczystą wodą wolną od nukleaz, a następnie dodawano 1 µl starterów syntezy nici DNA oligo(dT)₁₈. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodziło: 4 µl buforu reakcyjnego (5X Reaction Buffer), 1 µl inhibitora RNaz (RiboLock 20 U/µl), 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów (10 mM dNTP Mix, ang. *deoxy nucleoside triphosphate*), 2 µl enzymu M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl), którą dodawano do próby i delikatnie mieszano przez pipetowanie. Probówki umieszczano w bloku grzejmym i przeprowadzono odwrotną transkrypcję poprzez inkubację 5 minut w temperaturze 25°C, następnie 60 minut w 37°C i reakcję zakończono inkubacją przez 5 minut w 70°C, po czym próby chłodzono do 4°C. Uzyskane w ten sposób cDNA przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych etapów analizy.

3.12.3. Analiza transkryptów z wykorzystaniem RT-qPCR

Ilościową analizę ekspresji wybranych genów przeprowadzono metodą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym RT-qPCR (ang. *real-time-quantitative polymerase chain reaction*). W tym celu wykorzystano wyznakowane fluorescencyjnie sondy TaqMan (Applied Biosystems). Reakcje PCR prowadzono z wykorzystaniem urządzenia StepOnePlus (Applied Biosystems), a wyniki analizowano stosując program StepOnePlus Software v2.3. Sondy wykorzystane w doświadczeniach przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Sondy Taqman wykorzystywane do RT-qPCR.

Gen	ID testu
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1
<i>ADAMTS13</i>	Hs00260148_m1
<i>ANXA2</i>	Hs00743063_s1
<i>ANXA8</i>	Hs04192999_gH
<i>CD36</i>	Hs00354519_m1
<i>CD63</i>	Hs01041238_g1
<i>FUR</i>	Hs00965485_g1
<i>MYD88</i>	Hs01573837_g1
<i>SELP</i>	Hs00927900_m1
<i>TIRAP</i>	Hs00364644_m1
<i>TLR2</i>	Hs02621280_s1
<i>TLR4</i>	Hs00152939_m1
<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
<i>VWF</i>	Hs01109446_m1

Na 96-dołkową płytkę reakcyjną (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml; Applied Biosystems) nanoszono mieszaninę reakcyjną o objętości 10 µl, w której skład wchodziło: 0,5 µl sondy TaqMan, 5 µl TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG (Applied Biosystems) oraz matryca cDNA w objętości między 0,2 µl, a 4,5 µl, odpowiednio rozcieńczona i uzupełniona wodą wolną od nukleaz. Na płytkę przyklejano folię (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) i wirowano. Przeprowadzano reakcję PCR w warunkach: 20 sekund w 95°C, a następnie 40 cykli jednosekundowych w 95°C i 20-to sekundowych w 60 °C.

Uzyskane wyniki analizowano metodą porównawczą $2^{-\Delta\Delta CT}$. Względą ekspresję danego genu (wartość RQ, ang. *relative quantification*) normalizowano względem ekspresji genu endogennej kontroli *ACTB* i odnoszono wobec wybranej referencyjnej próby kontrolnej, przyjętej jako 1. W celu analizy ilościowej reakcje przeprowadzano w dwóch lub trzech powtórzeniach technicznych.

3.13. Barwienie immunocytochemiczne

Komórki wysiewano na szkiełka o średnicy 12 mm pokryte kolagenem. Po inkubacji 48 h w obecności 200 μ M PA komórki przemywano dwukrotnie roztworem PBS, a następnie utrwalano przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu w PBS, po czym trzykrotnie przemywano PBS, po 5 minut za każdym razem. W celu uprzeczyszczenia komórek prowadzono ich inkubację przez 5 minut w PBS zawierającym 0,1% Triton X-100, po czym płukano PBS trzykrotnie po 5 minut. Następnie preparaty blokowano przez 1 h w 5% roztworze BSA rozpuszczonym w PBS. Po trzykrotnym płukaniu po 5 minut w PBS, preparaty inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w obecności przeciwciała przeciw vWF (ab6994, Abcam) rozcieńczonego 1:200 w roztworze 1% BSA w PBS. Po trzykrotnym płukaniu po 5 minut w PBS preparaty inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej z przeciwciałem drugorzędowym anty-króliczym znakowanym barwnikiem fluorescencyjnym Alexa 555 (4413, Cell Signaling) rozcieńczonym w stosunku 1:1000 w roztworze 1% BSA w PBS. Po ponownym płukaniu w celu wizualizacji filamentów F-aktyny preparaty inkubowano przez 20 minut ze 100 nM falloidyną znakowaną fluorescencyjnie Alexa 488 (Cytoskeleton). Następnie preparaty przemywano PBS i w celu wyznakowania jądra komórkowego inkubowano przez 5 minut z Hoechst 33342 (Thermo Scientific) w stężeniu 2 μ g/ml, po czym odpłukiwano barwnik. Przygotowane preparaty nakładano na szkiełka podstawowe z użyciem odczynnika Vectashield (Vector Laboratories). Do wizualizacji zastosowano mikroskop konfokalny Zeiss Spinnig Disc oraz obiektyw olejowy 63x. Uzyskane zdjęcia analizowano za pomocą programu ImageJ.

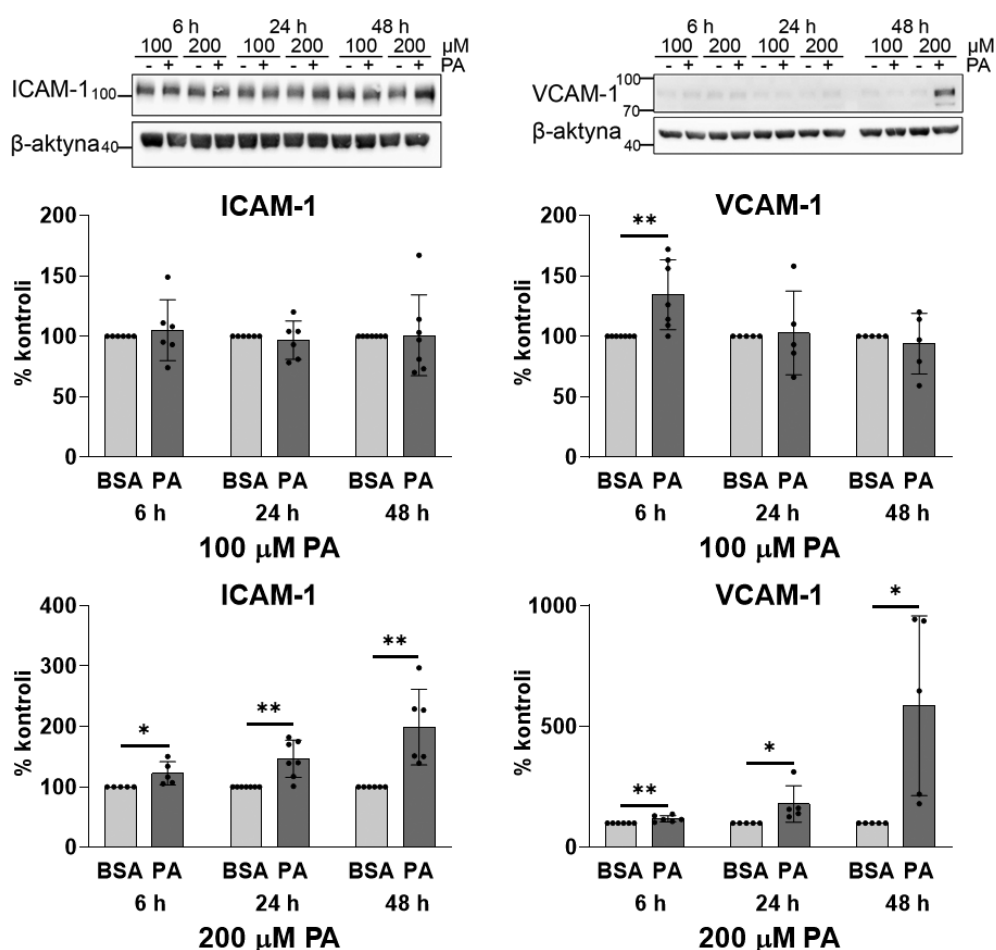
3.14. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy analizowano z wykorzystaniem GraphPad Prism 9. Dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD, ang. *standard deviation*) oraz wartości indywidualne. Istotność statystyczną analizowano na podstawie testu t-Studenta lub jednoczynnikowej analiza wariancji (one-way ANOVA) z testem *post hoc* Dunnetta. Wartości $p \leq 0,05$ uznawano za istotne statystycznie.

4. Wyniki

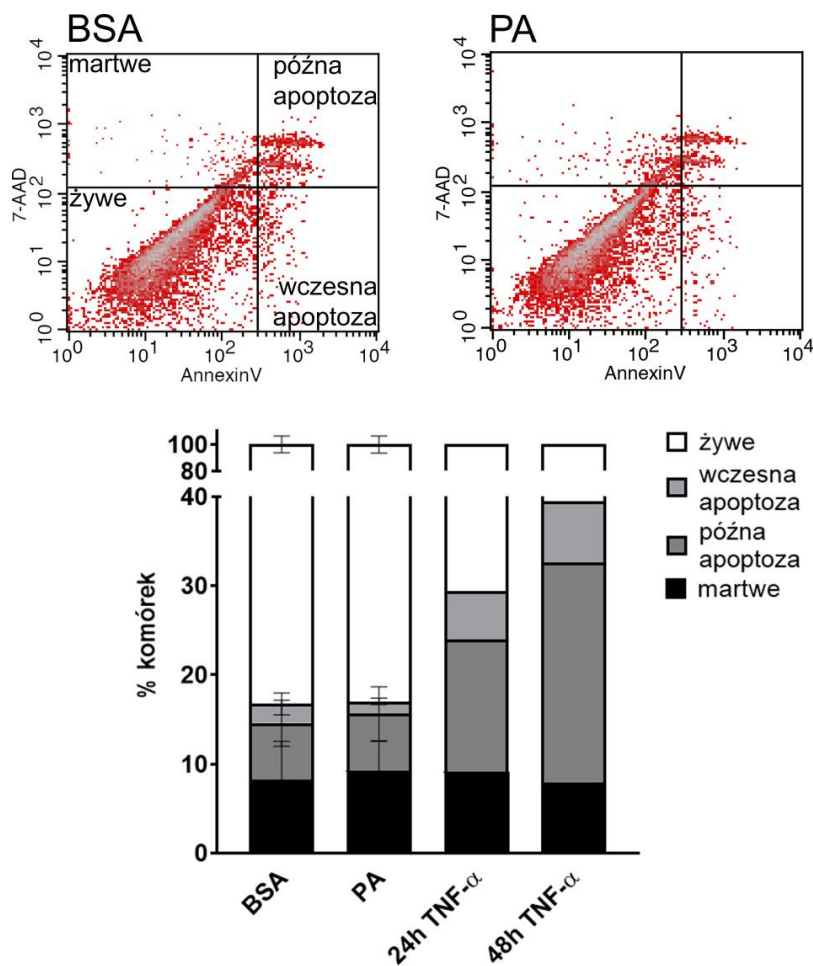
4.1. Ustalenie warunków inkubacji komórek z kwasem palmitynowym

Podstawowym kryterium skuteczności działania PA przyjętym w badanym układzie doświadczalnym było zwiększenie ilości białek adhezyjnych. Stwierdzono, że inkubacja komórek HUVEC w obecności 200 μ M PA powoduje nasilające się w czasie zwiększenie ilości białek ICAM-1 i VCAM-1. Obserwacja ta wskazuje na prawidłową odpowiedź komórek na stres wywołany podaniem PA. Przejściowe zwiększenie zawartości białka VCAM-1 obserwowano również po 6 h inkubacji w obecności 100 μ M PA, ale odpowiedź komórek w tych warunkach jest znacznie mniejsza (Rycina 8).



Rycina 8. Wpływ PA na ilość białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej uzyskanych danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, n=5-7). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

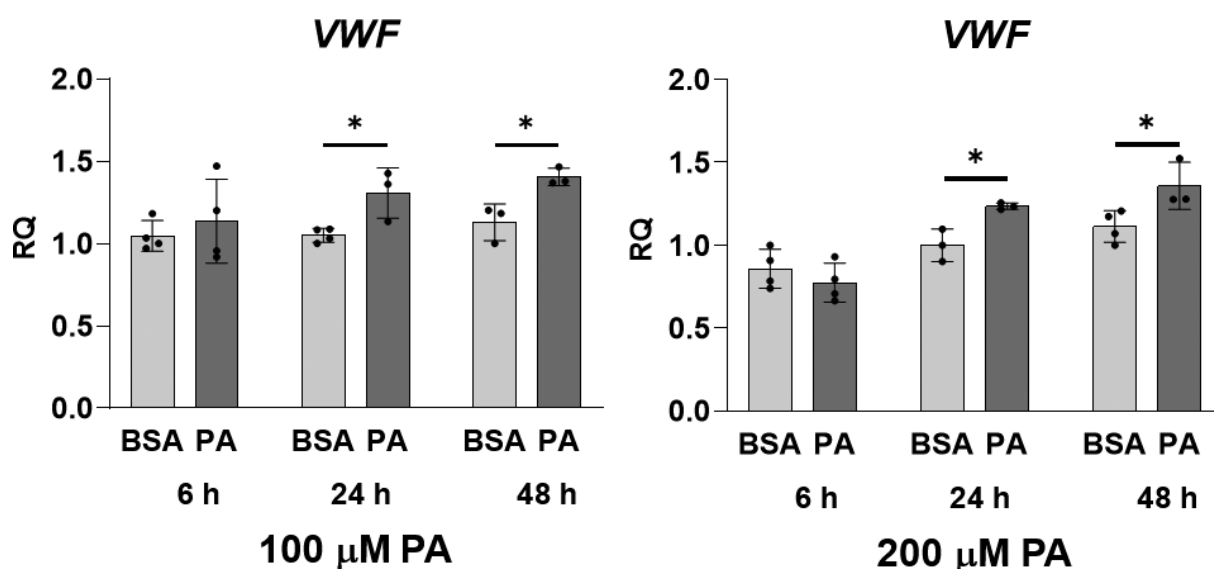
Przeprowadzone testy na apoptozę (znakowanie komórek aneksyną V sprzężoną z fluorescencyjną PE) i nekrozę komórek (znakowanie 7-AAD) nie wskazują na zmniejszenie przeżywalności HUVEC inkubowanych w obecności 200 μ M PA przez 48 h (Rycina 9). Ta obserwacja wraz z obserwowanym zwiększeniem ilości białek adhezyjnych (Rycina 8) wskazuje, że zastosowane warunki doświadczalne spełniają zakładane kryteria, czyli dochodzi do odpowiedzi komórek na PA, bez wpływu na ich przeżywalność. Wobec tego w żadnym z opisywanych dalej doświadczeń nie przekroczono tych granicznych wartości czasu i stężenia. Wyniki uzyskane dla komórek traktowanych TNF- α (10 ng/ml TNF- α przez 24 i 48 h) przedstawione na Rycinie 9 należy traktować, jako próbę kontrolną pozytywną, potwierdzającą poprawność wykorzystywanego protokołu doświadczalnego. Przedstawiono zależne od czasu inkubacji w obecności TNF- α zwiększenie proporcji komórek apoptotycznych i obniżenie udziału żywych komórek HUVEC.



Rycina 9. Wpływ inkubacji 48 h w obecności 200 μ M PA na przeżywalność komórek. Wykres przedstawia reprezentatywne wyniki cytometrii przepływowej fluorescencji aneksyny V sprzężonej z PE i 7-AAD oraz analizę ilościową uzyskanych wyników, przedstawionych jako % wszystkich komórek (n=4 dla PA; n=1 dla 10 ng/ml TNF- α).

4.2. Wpływ kwasu palmitynowego na wydzielanie vWF przez komórki HUVEC

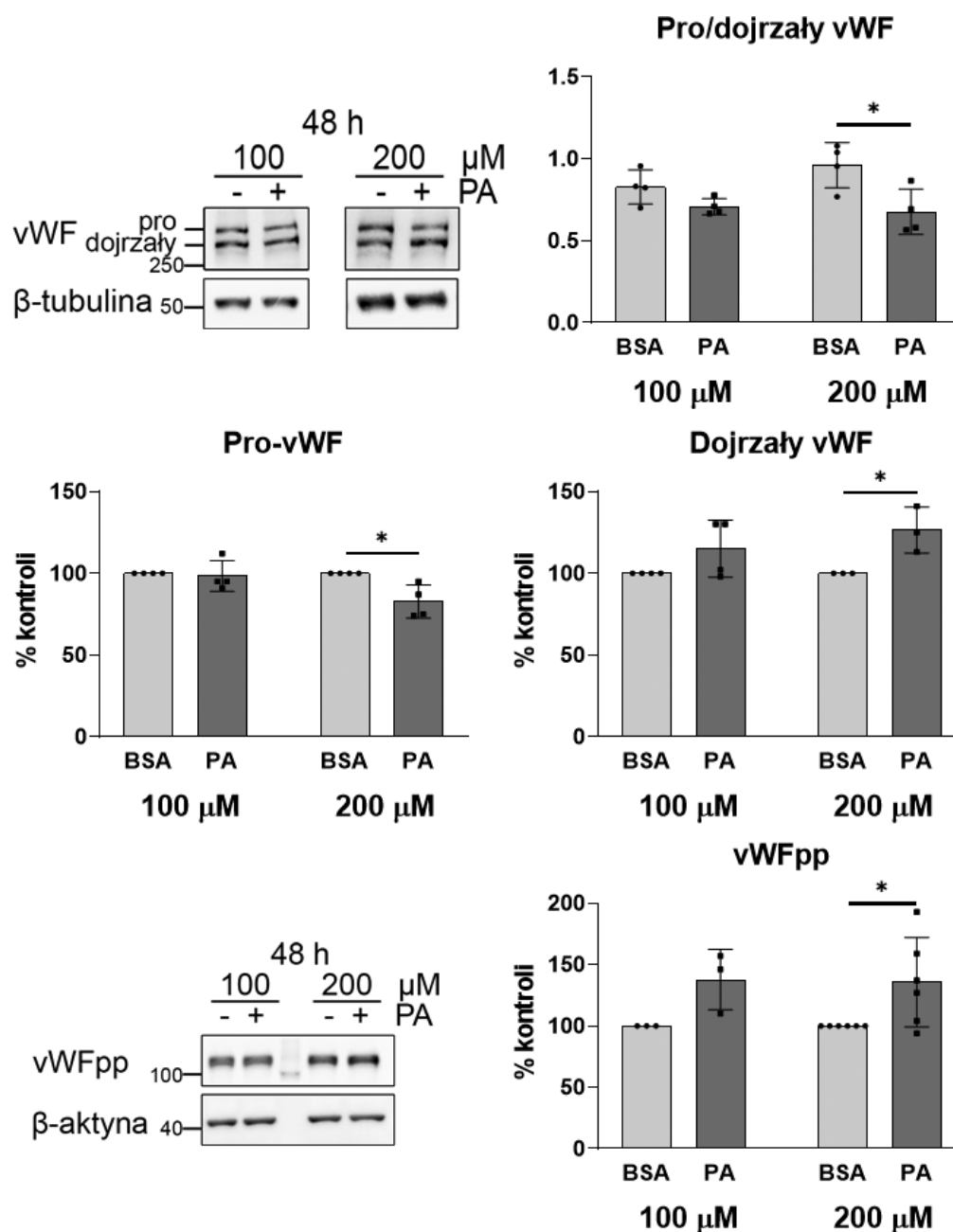
Wydzielanie vWF przez komórki śródbłonna może ulegać zwiększeniu w wyniku aktywacji w warunkach stresu i stanu zapalnego [163]. Inkubacja komórek HUVEC z PA, zarówno w stężeniu 100 μ M, jak i 200 μ M powoduje zwiększenie ekspresji genu *VWF* po 24 h traktowania, utrzymujące się co najmniej do 48 h obecności PA w pożywce (Rycina 10). Ta obserwacja wskazuje, że względnie łagodne (Rycina 8 i Rycina 9) traktowanie HUVEC, zgodne z ustalonym wcześniej protokołem, jest wystarczające do indukcji odpowiedzi genu kodującego vWF.



Rycina 10. Wpływ PA na ekspresję genu *VWF*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, $n=3-4$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: $*p \leq 0,05$.

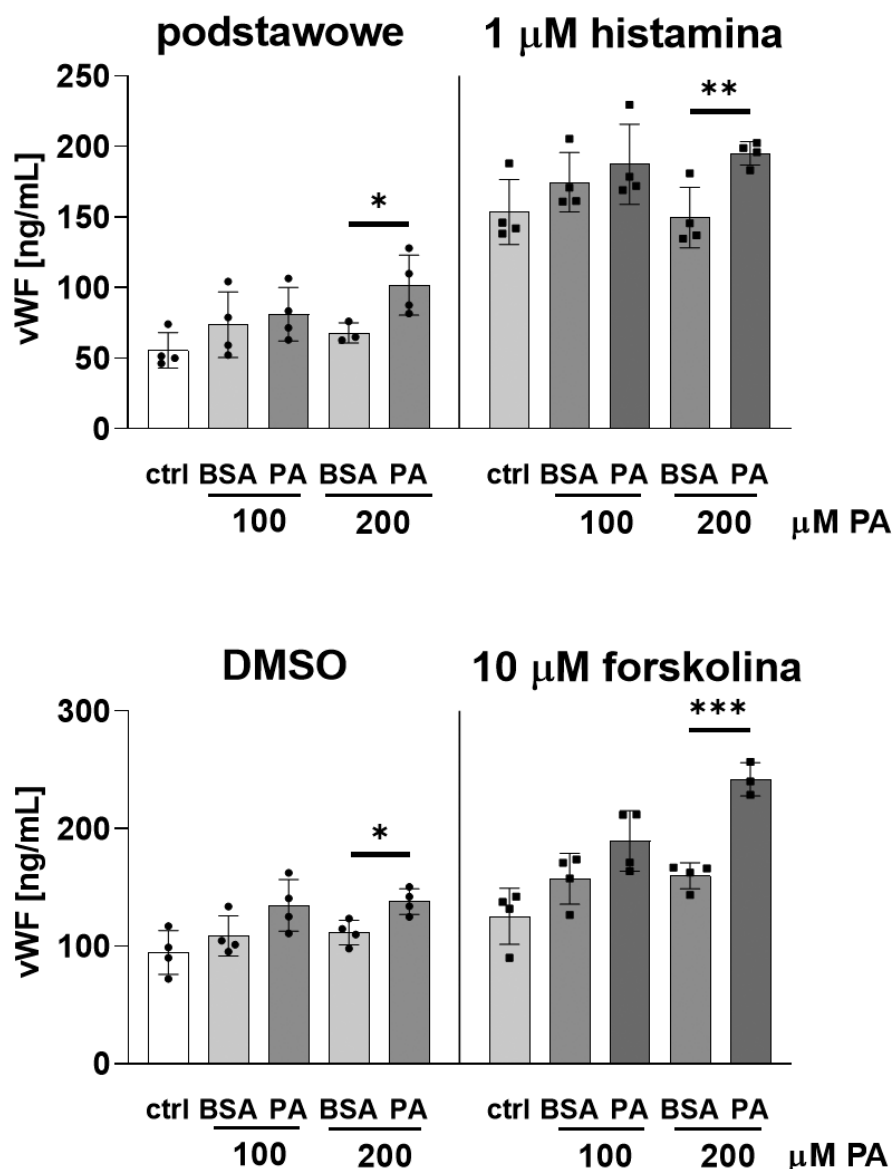
Dodatkowo stwierdzono, że 200 μ M PA podany do komórek na 48 h wpływa na ilość białka vWF ocenianą w lizatach komórkowych metodą Western blot. Wykazano obniżenie zawartości pro-vWF i wzrost frakcji dojrzałego vWF, a także vWFpp. Stosunek formy pro-vWF do dojrzałego vWF jest znacząco obniżony w komórkach hodowanych w opisanych powyżej warunkach doświadczalnych (Rycina 11). Dojrzała forma białka vWF oraz vWFpp powstają w wyniku proteolizy pro-vWF. Obie wymienione formy są magazynowane w WPBs, a następnie wydzielane z komórek śródbłonna.

Wpływ PA na ilość białka vWF zależy od tego, w jakim stężeniu podawany jest kwas tłuszczowy. Dane przedstawione na Rycinie 11 wskazują, że w wyniku 48 h inkubacji w obecności 200 μM PA ulega nasileniu proces dojrzewania vWF. W komórkach znajduje się więcej dojrzałego vWF, gotowego do wydzielenia. Natomiast w obecności 100 μM PA takich zmian nie obserwowano.



Rycina 11. Wpływ PA na ilość białek vWF i vWFpp w lizatach. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej uzyskanych danych, po ich normalizacji w stosunku do β -tubuliny lub β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, $n=3-6$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: $*p \leq 0,05$.

Wykorzystując metodę ELISA zbadano także ilość vWF wydzielonego do pożywki w wyniku stymulacji komórek poddanych uprzednio inkubacji w obecności PA. WPBs magazynujące vWF mogą być wydzielane przez komórki śródbłónka w odpowiedzi na aktywację przez histaminę ścieżki zależnej od Ca^{2+} lub przez forskolinę aktywującą ścieżkę zależną od cAMP. Komórki HUVEC inkubowano przez 48 h w obecności 100 lub 200 μM PA, a następnie przez 1 h stymulowano 1 μM histaminą lub 10 μM forskoliną.



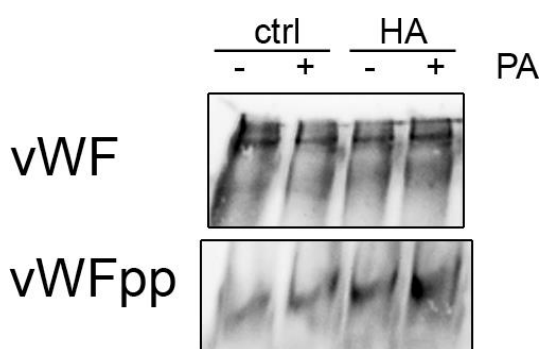
Rycina 12. Wpływ PA na stężenie vWF w pożywce. Komórki inkubowano 48 h w obecności 100 lub 200 μM PA, a następnie przez 1 h stymulowano 1 μM histaminą lub 10 μM forskoliną (komórki kontrolne do forskoliny inkubowano z odpowiednią ilością DMSO). Stężenie vWF w pożywce oznaczono metodą ELISA i wyniki przedstawiono w postaci średniej $\pm$ SD ($n=3-4$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Wykazano, że PA w stężeniu 200 μM powoduje zwiększenie wydzielania vWF zarówno podstawowego, jak i stymulowanego w obecności każdego z użytych agonistów (Rycina 12). W obecności 100 μM PA nie obserwowano znaczącego wpływu na wydzielanie vWF.

Co istotne, zwiększenie wydzielania vWF po traktowaniu komórek PA wykazano w warunkach zwiększonego dojrzewania vWF, czyli po 48 h inkubacji w obecności 200 μM kwasu tłuszczowego (Rycina 11). W komórkach traktowanych PA w stężeniu 100 μM mimo tego, że dochodzi do wzmożonej ekspresji genu *VWF* (Rycina 10), nie wykazano zwiększonego dojrzewania tego białka, przynajmniej w stopniu wykrywalnym metodą Western blot w lizatach komórkowych, ani wydzielania vWF do pożywki wykrywanego metodą ELISA.

Technikę Western blot wykorzystano też do ustalenia, w jakiej formie vWF jest wydzielany z komórek. Tak jak w poprzednim doświadczeniu komórki inkubowano w obecności 200 μM PA i stymulowano 1 μM histaminą. Następnie wytrącano białka znajdujące się w pożywce i poddawano je identyfikacji specyficznie skupiając się na vWF.

Wyniki przedstawione na Rycinie 13 wskazują na obecność w pożywce zarówno dojrzałej formy vWF, jak i formy vWFpp. Przy czym po inkubacji w obecności PA, jak i po dodatkowej stymulacji komórek histaminą zwiększona jest jedynie ilość vWFpp, podczas gdy ilość dojrzałego vWF wydaje się nie ulegać znaczącej zmianie. Obie formy, czyli dojrzały vWF oraz vWFpp są magazynowane w WPBs w tej samej proporcji, więc można było oczekiwać, że będą obecne we frakcji białek wydzielonych przez HUVEC po stymulacji.

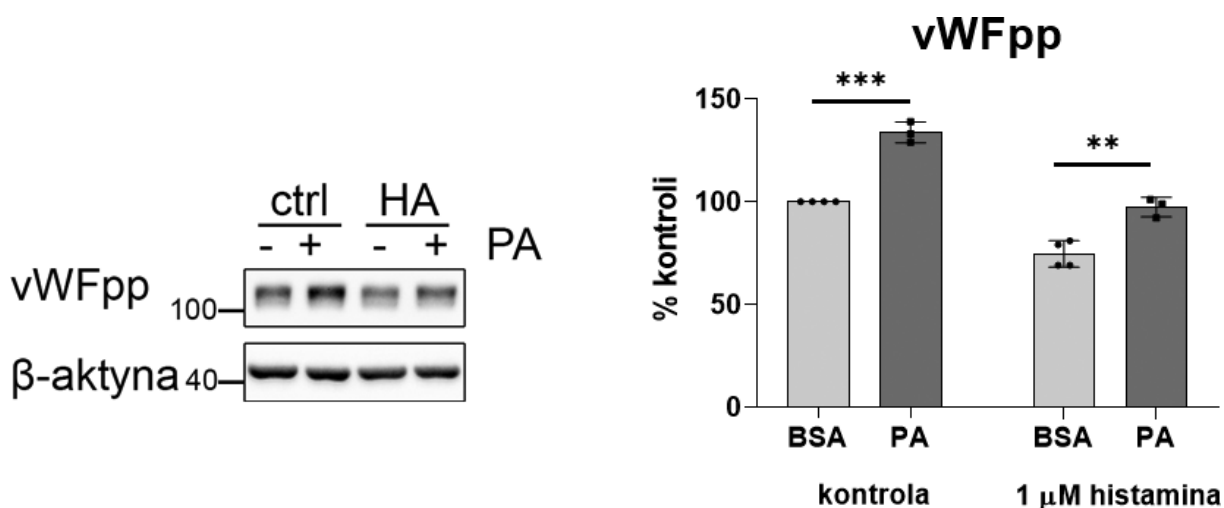


Rycina 13. Identyfikacja białka vWF wydzielonego przez komórki HUVEC do pożywki. Komórki inkubowano 48 h w obecności 200 μM PA, a następnie przez 1 h stymulowano wydzielanie do pożywki 1 μM histaminą (HA). Białka znajdujące się w pożywce wytrącano TCA i analizowano. Przedstawiono reprezentatywny wynik Western blot wybrany z 4 niezależnych doświadczeń.

W celu ustalenia, czy inkubacja komórek z PA wpływa stymulująco na proces wydzielania vWF, sprawdzono, czy stymulacja histaminą komórek uprzednio inkubowanych w obecności PA zmienia zawartość białka vWFpp pozostającą w komórkach. Stosując takie podejście doświadczalne założono, że vWFpp wykrywany w lizatach komórkowych odzwierciedla frakcję tego białka, jaka pozostaje w komórkach po stymulacji wydzielania. Doświadczenia, których wynik przedstawiono na Rycinie 14 wykonano jednocześnie z przedstawionymi na Rycinie 13, wykorzystując te same szalki komórek.

Zgodnie z tym, co pokazano wcześniej (Rycina 11), w obecności PA ilość białka vWFpp w komórkach ulega zwiększeniu (Rycina 14). Ten efekt utrzymuje się pomimo obserwowanego w warunkach kontrolnych zwiększonego wydzielania vWF (Rycina 12).

Stymulacja komórek HUVEC histaminą powoduje znaczne obniżenie ilości vWFpp zarówno w komórkach kontrolnych inkubowanych w obecności BSA, jak i inkubowanych w obecności PA. Jednakże po stymulacji wydzielania ilość vWFpp pozostająca w lizatach komórkowych nadal jest większa w komórkach inkubowanych w obecności PA w stosunku do kontroli BSA (Rycina 14).



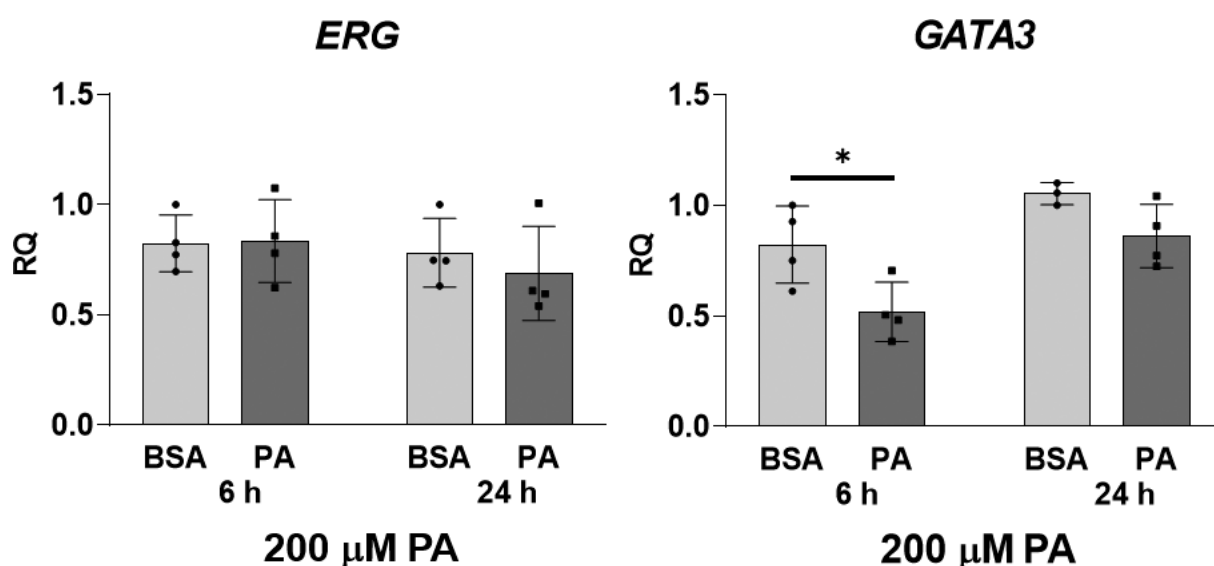
Rycina 14. Ilość białka vWFpp pozostającego w komórkach po stymulacji wydzielania. Komórki inkubowano 48 h w obecności 200 μM PA, a następnie przez 1 h stymulowano wydzielanie w obecności 1 μM histaminy (HA). Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β-aktyny (średni % kontroli BSA ± SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

4.3. Badanie wpływu kwasu palmitynowego na potencjalne mechanizmy regulujące wydzielanie vWF

4.3.1. Wpływ kwasu palmitynowego na ekspresję genów czynników transkrypcyjnych *ERG* i *GATA3*

Ekspresja genu *VWF* jest regulowana przez szereg czynników transkrypcyjnych, w tym m.in. *ERG* i *GATA3* [164–169], a zatem wydawało się, że jednym z możliwych mechanizmów wpływu PA może być aktywacja genów kodujących te czynniki. Ze względu na to, że zwiększenie ilości transkryptu genu *VWF* obserwowano już po 24 h inkubacji w obecności 200 μ M PA, oznaczenia ekspresji genów *ERG* i *GATA3* przeprowadzono także po 24 h i dodatkowo po czasie krótszym (6 h) traktowania komórek PA.

Jak pokazano na Rycinie 15 nie udało się potwierdzić wpływu PA na ekspresję genu *ERG*. Natomiast wbrew przewidywaniom ekspresja genu *GATA3* jest obniżona po 6 h inkubacji z PA, a po 24 h inkubacji jest na poziomie kontroli BSA. A zatem nie udało się potwierdzić przypuszczenia, że zwiększenie transkrypcji genu *VWF* w obecności PA jest związane z aktywacją genów kodujących *ERG* i *GATA3*.

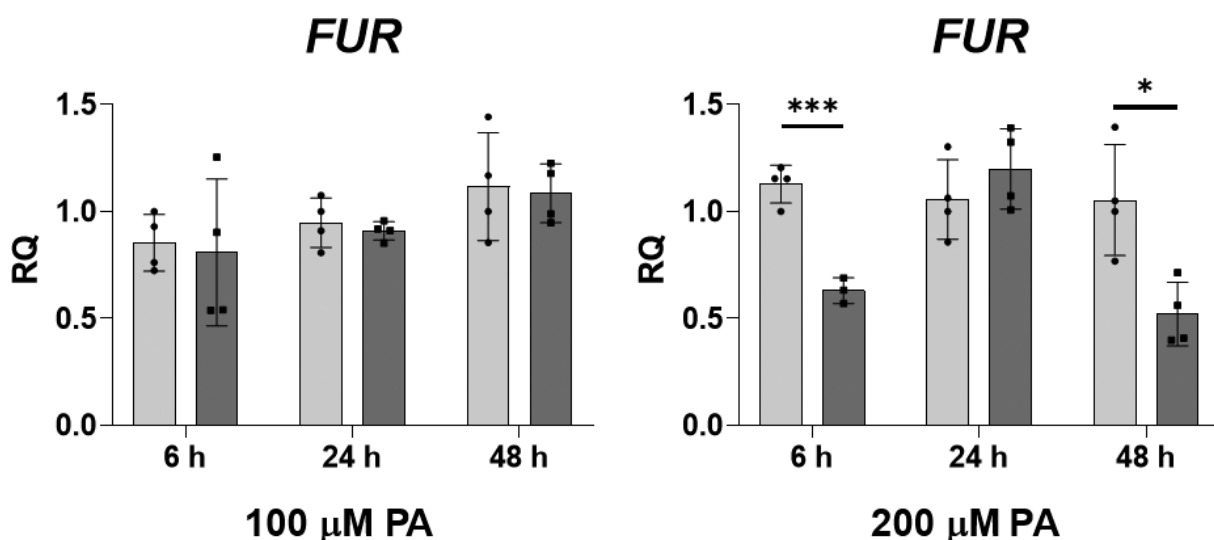


Rycina 15. Wpływ 6 i 24 h inkubacji w obecności 200 μ M PA na ekspresję genów *ERG*, *GATA3*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *p $\leq$ 0,05.

4.3.2. Wpływ kwasu palmitynowego na furynę

vWF jest syntetyzowane jako preprobiałko. Po odcięciu peptydu sygnałowego pro-vWF ulega w TGN proteolizie katalizowanej przez furynę (konwertazę probiałkową) z wytworzeniem formy vWFpp i dojrzałej formy vWF. Powstało zatem pytanie, czy obserwowane przyspieszenie procesu dojrzewania vWF, jest związane ze zwiększeniem ilości furyny w komórkach.

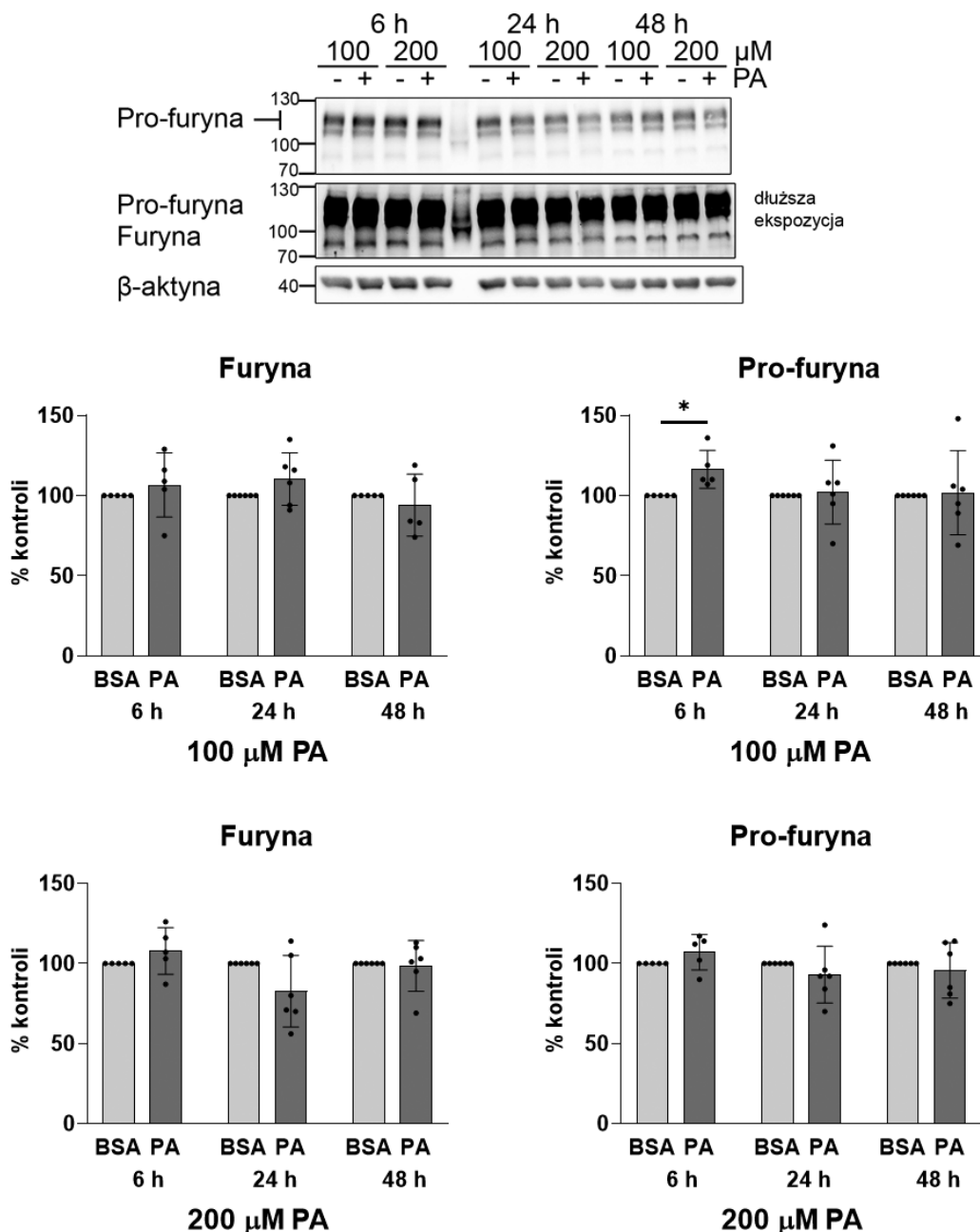
Wbrew oczekiwaniom w komórkach traktowanych 200 μ M PA przez 6 i 48 h ekspresja genu *FUR* jest obniżona (Rycina 16). Co ciekawe, po 24 h inkubacji efekt inkubacji z PA jest niezauważalny, co jest trudne do interpretacji. Natomiast w obecności 100 μ M PA nie obserwowano żadnych zmian dotyczących ilości transkryptu genu *FUR* niezależnie od czasu inkubacji.



Rycina 16. Wpływ PA na ekspresję genu *FUR*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

Z zastosowaniem metody Western blot zidentyfikowano prążek o masie cząsteczkowej odpowiadającej 110-120 kDa i prążek o masie cząsteczkowej około 85 kDa (Rycina 17). Furyna jest syntetyzowana w postaci nieaktywnego probiałka, które jest aktywowane przez autokatalityczną proteolizę, w wyniku czego powstaje funkcjonalne białko [170], a ponadto jest glikozylowana, co może wpływać na migrację białka w żelu poliakryloamidowym. Górny prążek przypisano pro-furynie, a dolny dojrzałej formie furyny, podobnie jak interpretowali to inni autorzy [171,172].

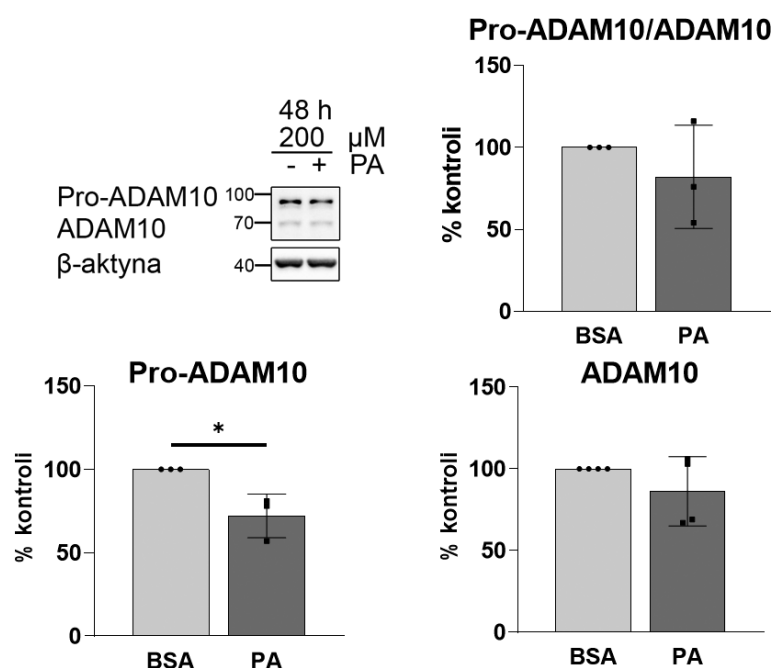
Nie obserwowano znaczącego wpływu PA na ilość furyny w komórkach HUVEC. Wykazano nieznaczne obniżenie zawartości białka w komórkach po 24 h inkubacji z PA w stężeniu 200 μ M oraz niewielki wzrost ilości pro-furyny po 6 h inkubacji w obecności 100 μ M PA. Wydaje się zatem, że dostępność furyny nie jest czynnikiem wyjaśniającym zwiększone dojrzewanie vWF w komórkach HUVEC poddanych działaniu PA.



Rycina 17. Wpływ PA na ilość białka furyny. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, $n=5-7$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$.

Ze względu na to, że ilość białka nie zawsze odzwierciedla jego aktywność, a kluczowa może być aktywność białka w konkretnym przedziale komórkowym, przeprowadzono dodatkowe testy. W zależności od lokalizacji furyna modyfikuje i aktywuje ponad 150 substratów, m.in.: czynników wzrostu, receptorów, białek adhezyjnych, metaloproteinaz, toksyn bakteryjnych i białek fuzyjnych wirusów [173]. Wobec tego, sprawdzono jej aktywność wobec białka innego niż vWF, wybranego spośród znanych substratów na podstawie pracy López-López i wsp. [174], w której wykazano, że aktywacja receptorów TLR za pomocą m.in. LPS jest związana ze zwiększoną ilością furyny i dojrzałej formy metaloproteinazy ADAM10, oraz dodatkowych informacji wskazujących na to, że katalizowane przez furynę przekształcanie ADAM10 zachodzi tak jak w przypadku vWF w TGN [175,176] A zatem zbadano efekt PA na dojrzewanie białka ADAM10, traktując to jako marker aktywności furyny.

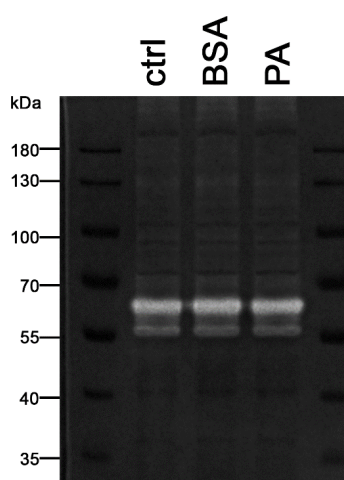
Jak pokazano na Rycinie 18, 48 h inkubacji w obecności 200 μ M PA nie wpływa na ilość dojrzałego ADAM10 (68 kDa), a zawartość probiałka (90 kDa) jest obniżona. Na podstawie tej obserwacji nie można stwierdzić wpływu PA na wydajność przekształcania ADAM10, a wpływ jedynie na zawartość probiałka sugeruje inny mechanizm regulacyjny.



Rycina 18. Wpływ PA na ilość białka ADAM10. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *p $\leq$ 0,05.

Aktywność furyny jest związana również z aktywacją metaloproteinaz [177–179]. W przypadku części metaloproteinaz wynika to z bezpośredniej selektywnej proteolizy tych białek, lub pośrednio jest związane z regulacją tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP, ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*). W celu sprawdzenia, czy w komórkach traktowanych PA dochodzi do aktywacji metaloproteinaz dokonano oceny ich aktywności posługując się metodą elektroforetycznej zymografii żelatynowej. Metoda ta pozwala na wykrywanie aktywności metaloproteinaz, dla których substratem jest żelatyna, czyli głównie MMP-2 i MMP-9, ale także MMP-1, MMP-7, MMP-8 i MMP-13, których specyficzność wobec żelatyny jest mniejsza [180,181].

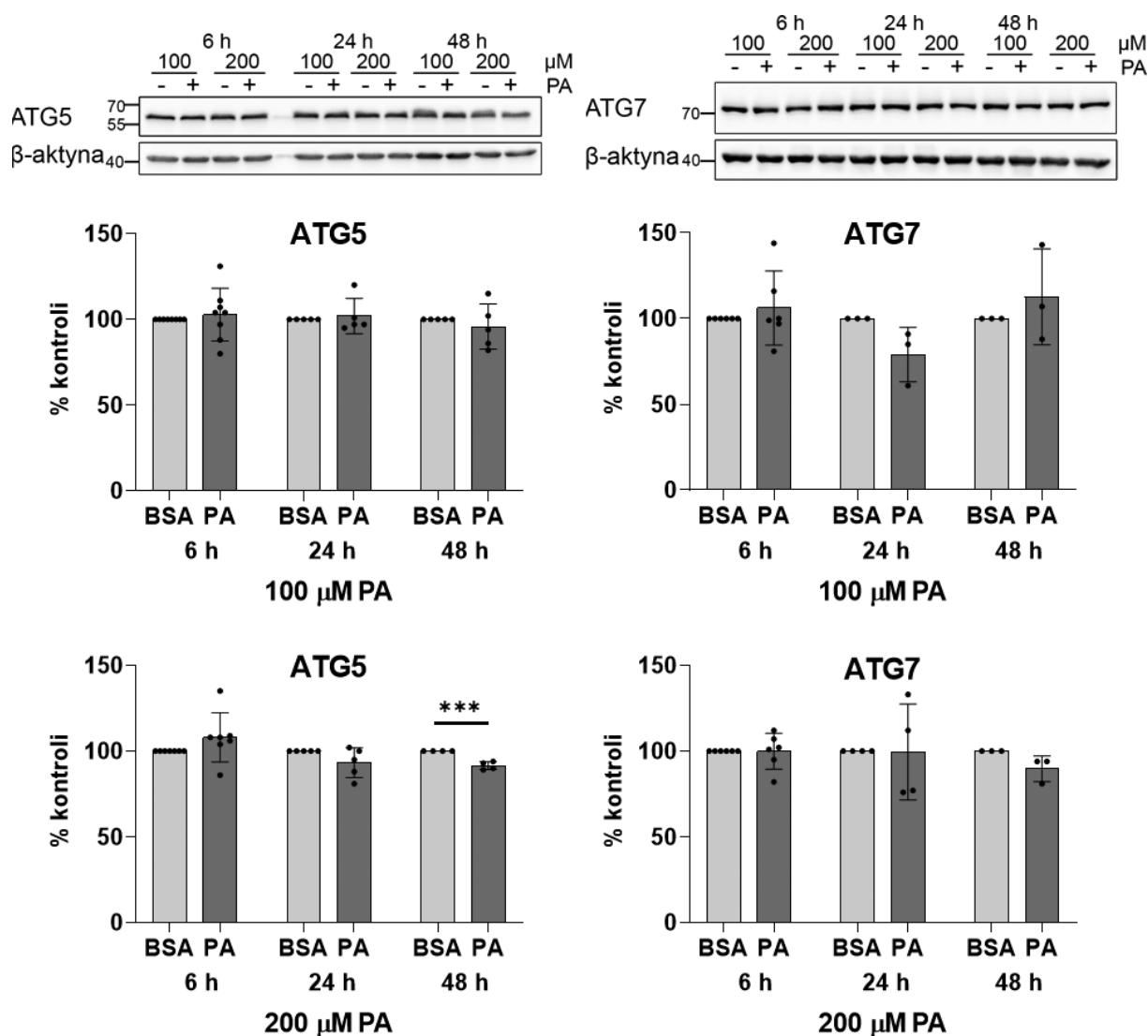
Komórki inkubowane przez 48 h w obecności 200 μ M PA nie wykazują zmienionej aktywności metaloproteinaz wobec żelatyny (Rycina 19). Na podstawie wzorca mas zidentyfikowano wyraźną aktywność białek o masie cząsteczkowej około 55 kDa i 65 kDa. Masa cząsteczkowa pro-MMP-9 wynosi około 93 kDa, a pro-MMP-2 72 kDa, jednakże nie stwierdzono aktywności enzymatycznej zlokalizowanej w miejscach na żelu odpowiadających ich masie. Prążek około 65 kDa może odpowiadać aktywnej formie MMP-2, a prążek 55 kDa pro-MMP-1 [181]. Niezależnie od trafności tej identyfikacji nie udało się potwierdzić wpływu PA na aktywność metaloproteinaz specyficznych wobec żelatyny w badanych komórkach. Wynik ten potwierdza wcześniej sformułowane obserwacje sugerujące, że w komórkach traktowanych PA nie dochodzi do aktywacji furyny. A zatem nie uzyskano dowodów wskazujących na to, że zwiększone dojrzewanie vWF w obecności PA może być zależne od aktywacji tego enzymu.



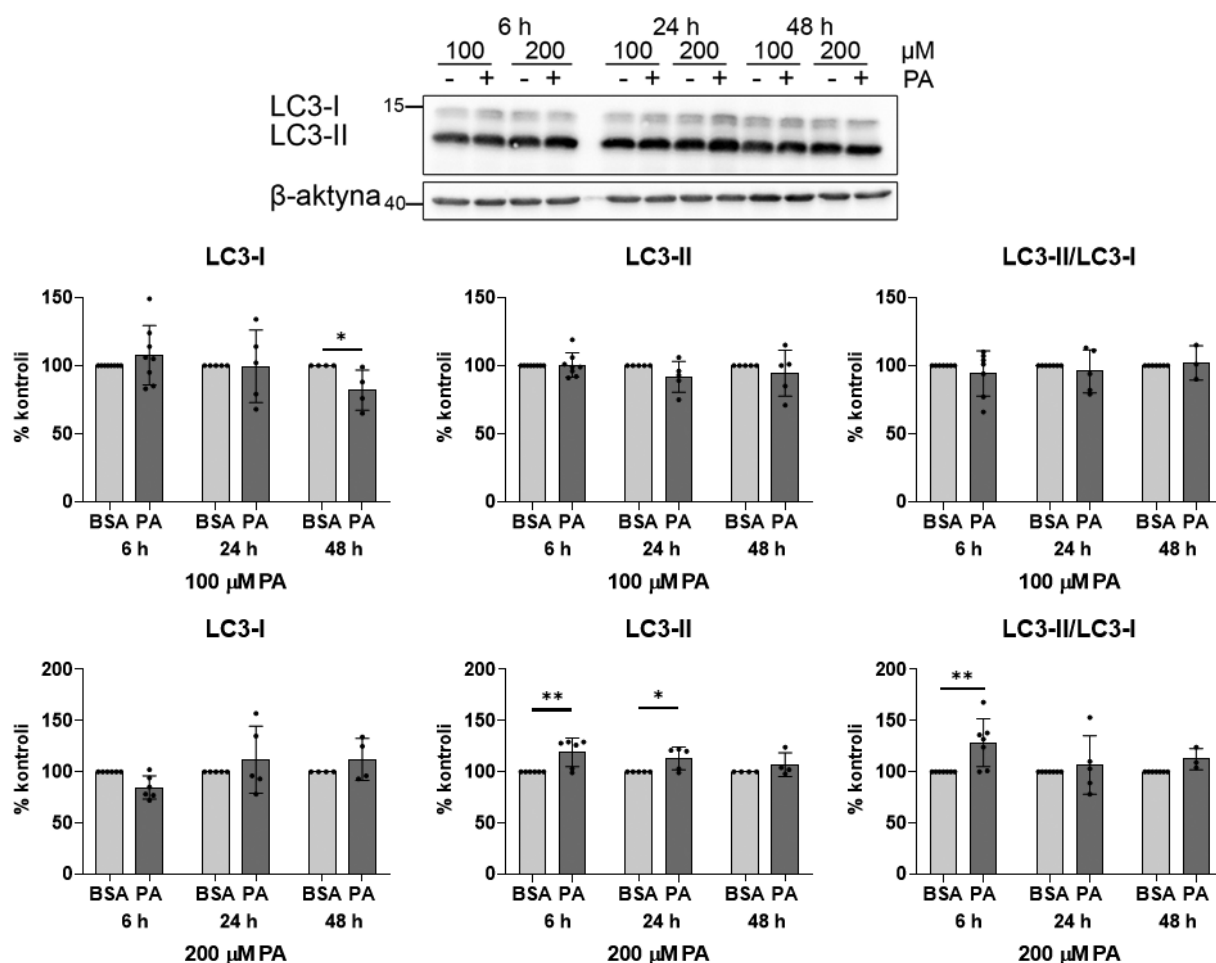
Rycina 19. Aktywności metaloproteinaz specyficznych wobec żelatyny w komórkach inkubowanych 48 h w obecności 200 μ M PA. Przedstawiono zymogram reprezentatywny dla 3 niezależnych doświadczeń.

4.3.3. Wpływ kwasu palmitynowego na autofagie

Pozornie oddzielnym zagadnieniem w stosunku do głównego wątku rozprawy, czyli zwiększonego wydzielania vWF przez komórki HUVEC, jest aktywacja autofagii w obecności PA. Jednakże istnieją przekonujące doniesienia wskazujące na to, że dojrzewanie i wydzielanie vWF jest związane z autofagią [182–184]. Natomiast wyniki Western blot przedstawione na Rycinie 20 nie pozwalają na stwierdzenie, że PA w stosowanych warunkach ma znaczący wpływ na aktywację tego procesu. Nie wykazano pozytywnego wpływu inkubacji komórek HUVEC w obecności PA na ilość białka ATG7. Co więcej ilość białka ATG5 jest w niewielkim stopniu obniżona po 48 h inkubacji w obecności 200 μ M PA.



Rycina 20. Wpływ PA na ilość białek ATG5 i ATG7. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, n=3-8). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: ***p $\leq$ 0,001.

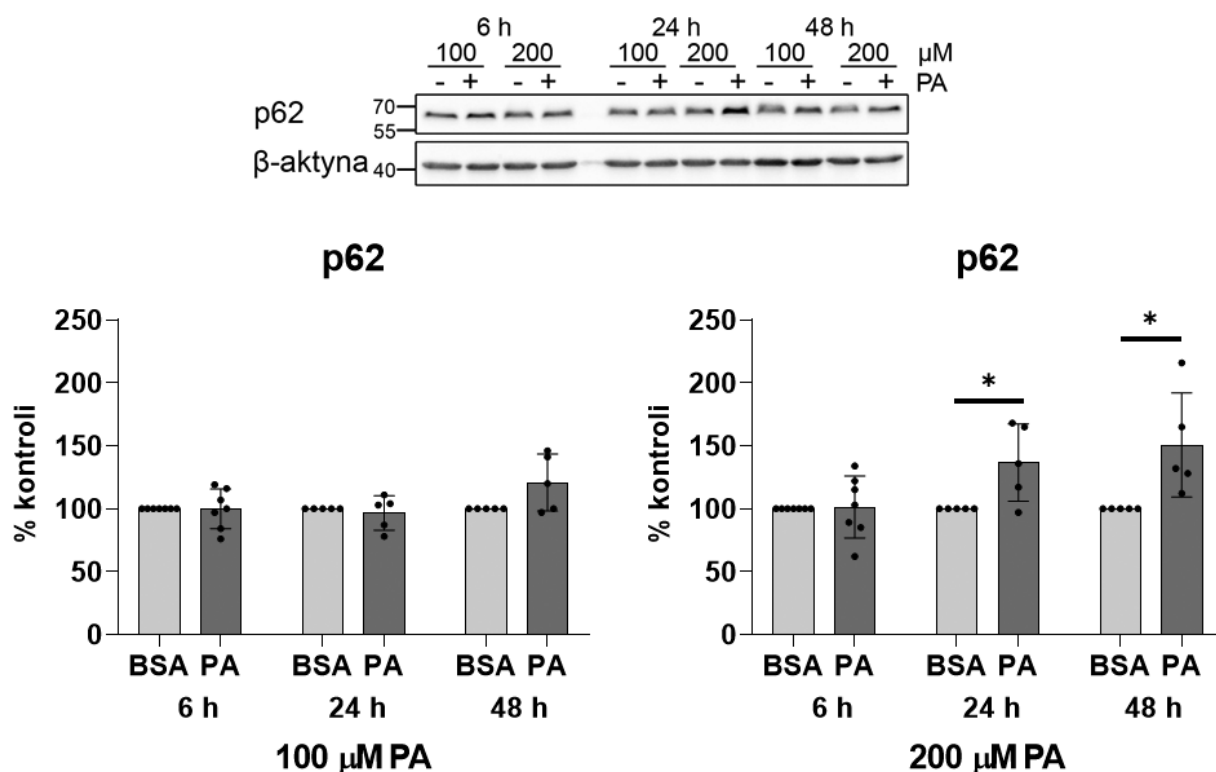


Rycina 21. Wpływ PA na ilość białka LC3. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β-aktyny (średni % kontroli BSA ± SD, n=3-8). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01.

Z drugiej jednak strony PA wpływa w zauważalnym stopniu na inne białka często wykorzystywane w celu identyfikacji autofagii w komórkach, w tym białko LC3, które jest wykrywane metodą Western blot w postaci dwóch form LC3-I oraz LC3-II. Pod wpływem PA dochodzi do przejściowego wzrostu ilości białka LC3-II oraz obniżenia LC3-I po 6 h inkubacji w obecności 200 μM PA, przez co stosunek LC3-II do LC3-I jest podniesiony (Rycina 21). Po 24 h obserwowano jedynie niewielki wzrost ilości LC3-II. Obserwowane zmiany mają charakter przejściowy i po 48 h traktowania komórek PA zawartość LC3-II wraca do poziomu obserwowanego w kontroli BSA.

Innym markerem autofagii jest białko p62/SQSTM1. W przypadku aktywacji autofagii jego zawartość w komórkach jest obniżona w wyniku degradacji, natomiast zahamowanie autofagii prowadzi do jego nagromadzenia się [185]. PA powoduje zależne od czasu

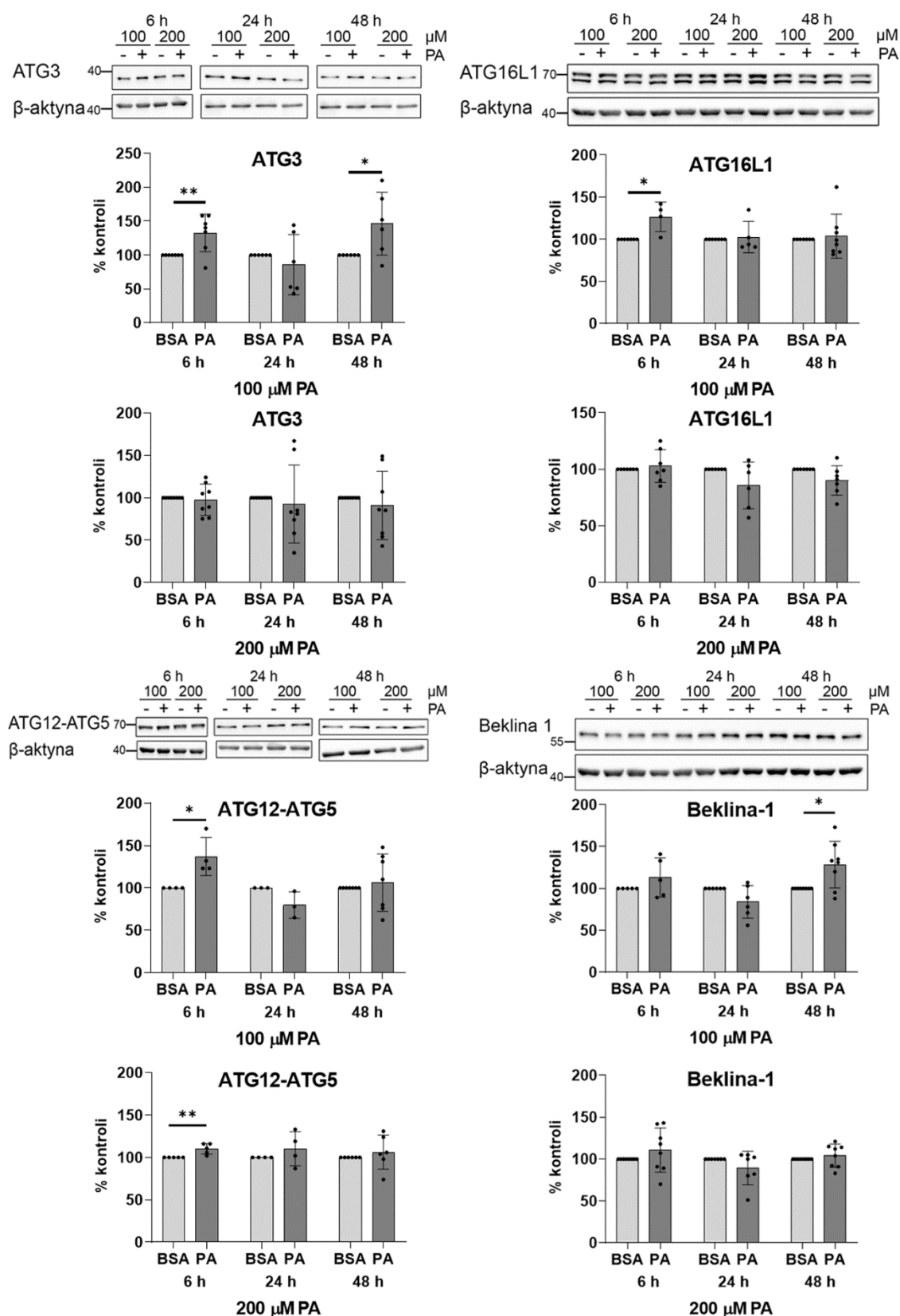
zwiększenie ilości p62 (Rycina 22). Wykazano istotny wzrost ilości tego białka w komórkach inkubowanych w obecności PA w stężeniu 200 μ M po 24 i 48 h inkubacji.



Rycina 22. Wpływ PA na ilość białka p62. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, $n=5-7$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

PA w stężeniu 100 μ M powoduje zwiększenie ilości białka ATG3 po 6 i 48 h inkubacji (Rycina 23), co może świadczyć o przejściowym dodatnim wpływie na proces autofagii. Natomiast nie obserwowano wpływu 200 μ M PA na zawartość tego białka. W tworzeniu autofagosomów uczestniczy również kompleks białek ATG12-ATG5 oraz ATG16L1. Zaobserwowano, że ich ilość jest zwiększona po 6 h inkubacji w obecności 100 μ M PA, a w stężeniu 200 μ M jedynie ATG12-ATG5. W pozostałych zbadanych warunkach doświadczalnych jest taka jak w kontroli BSA. Dodatkowo PA w stężeniu 100 μ M powoduje zwiększenie ilości bekliny-1 po 48 h inkubacji.

Przedstawione wyniki nie wykluczają udziału autofagii w odpowiedzi komórek HUVEC na PA, ale nie są na tyle spójne i istotne statystycznie, żeby jednoznacznie tłumaczyć zwiększone dojrzewanie i wydzielanie vWF.



Rycina 23. Wpływ PA na ilość białek ATG3, ATG12-ATG5, ATG16L1, beklina-1. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, $n=5-7$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

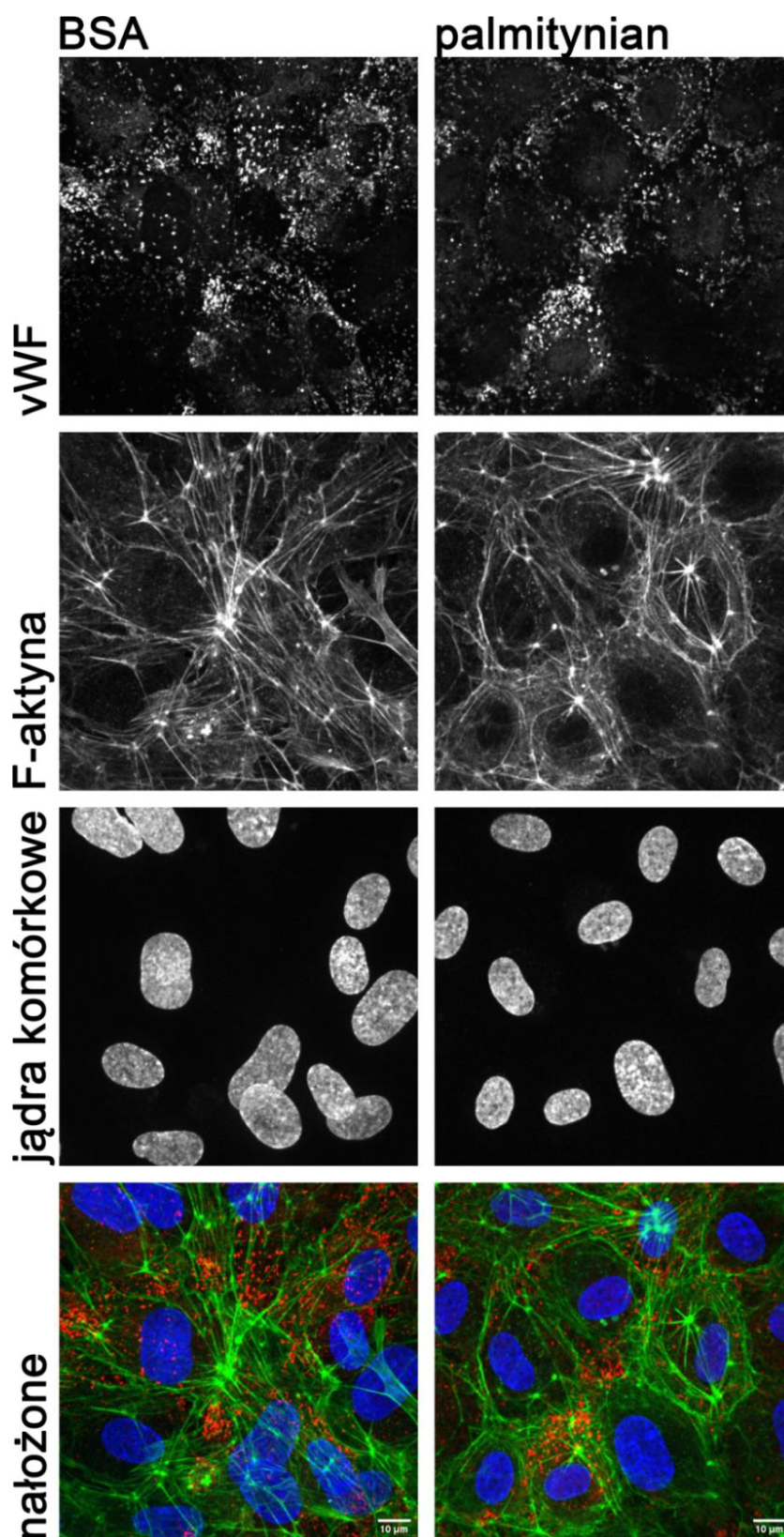
4.3.4. Wpływ kwasu palmitynowego na ciała Weibel-Palade'a

Wydzielanie WPBs jest związane ze zmianą organizacji filamentów aktynowych [92,95]. Zmiany architektury szkieletu komórkowego pod wpływem PA były opisywane w innym kontekście oraz innych warunkach doświadczalnych [186,187], w związku z czym nie można wykluczyć, że obserwowane zwiększone wydzielanie vWF może być też związane ze zmianą architektury cytoszkieletu wpływającą na przemieszczanie się i wydzielanie WPBs. Dlatego sprawdzono, czy obecność PA w pożywce wpływa na lokalizację WPBs, co nie wykluczałoby wcześniej wykazanego istotnego znaczenia zwiększonej ekspresji genu, ale mogłoby uzupełnić ten obraz.

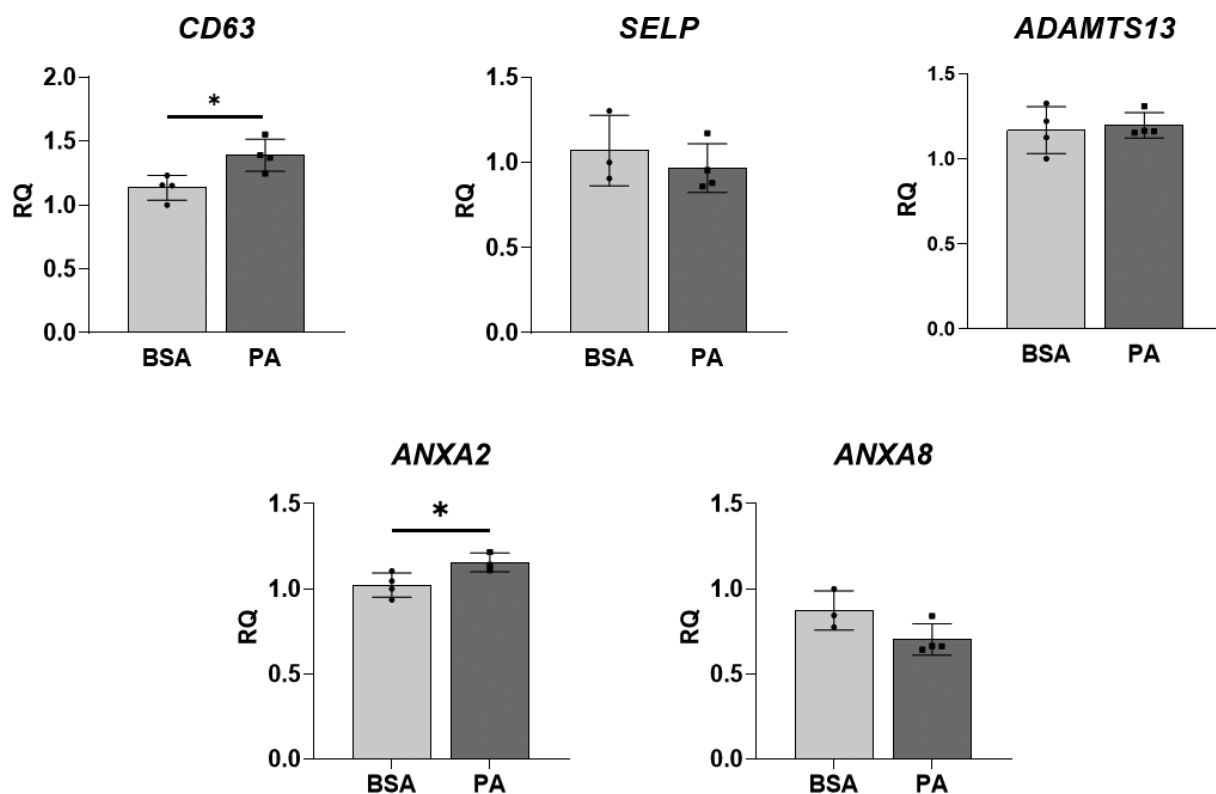
Stosując barwienie immunocytochemiczne uwidoczniono wewnątrzkomórkową lokalizację vWF, a stosując falloidynę sprzężoną ze znacznikiem fluorescencyjnym wyznakowano F-aktynę. Barwienia te przeprowadzono w komórkach inkubowanych 48 h w obecności 200 μ M PA. Uzyskane zdjęcia nie wskazują, że PA ma wpływ na lokalizację komórkową WPBs (Rycina 24). Podobnie, nie wykazano wpływu PA na organizację szkieletu aktynowego komórek, co mogłoby być potencjalnie związane z wydzielaniem WPBs. Ta obserwacja wzmacnia wniosek przedstawiony wcześniej wskazujący na to, że PA w zastosowanych warunkach doświadczenia nie wpływa na wydzielanie WPBs przez komórki HUVEC. Jednocześnie dodatkowo podkreśla łagodność stosowanych warunków doświadczalnych w porównaniu do stosowanych przez wspomnianych autorów [186,187].

Sprawdzono także, czy obecność PA w pożywce wpływa wybiórczo jedynie na wytwarzanie vWF, czy także na wytwarzanie innych białek wchodzących w skład WPBs, lub związanych z dojrzewaniem i wydzielaniem WPBs, oraz regulacją wydzielonego poza komórkę vWF. W tym celu zbadano wpływ PA na ekspresję genów kodujących niektóre białka związane z tymi procesami. Stwierdzono, że PA wpływa stymulująco na ekspresję genów *CD63* i *ANXA2*, podczas gdy poziom ekspresji pozostałych badanych genów, czyli *SELP*, *ADAMTS13*, *ANXA8* nie ulega znaczącej zmianie (Rycina 25).

Te obserwacje sugerują, że stymulujący wpływ PA na wydzielanie vWF wynika raczej z wybiórczej aktywacji ekspresji genu *VWF*, a nie jest skutkiem jakichkolwiek zmian dotyczących tworzenia WPBs.



Rycina 24. Porównanie lokalizacji vWF i F-aktyny w komórkach kontrolnych (BSA) i inkubowanych 48 h w obecności 200 μ M PA. Na zdjęciach kolorem czerwonym oznaczono vWF, zielonym F-aktynę (falloidyna), niebieskim jądra komórkowe (Hoechst). Odcinek na rycinie odpowiada 10 μ m w rzeczywistości.



Rycina 25. Wpływ 48 h inkubacji w obecności 200 μ M PA na ekspresję genów *CD63*, *SELP*, *ADAMTS13*, *ANXA2*, *ANXA8*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$.

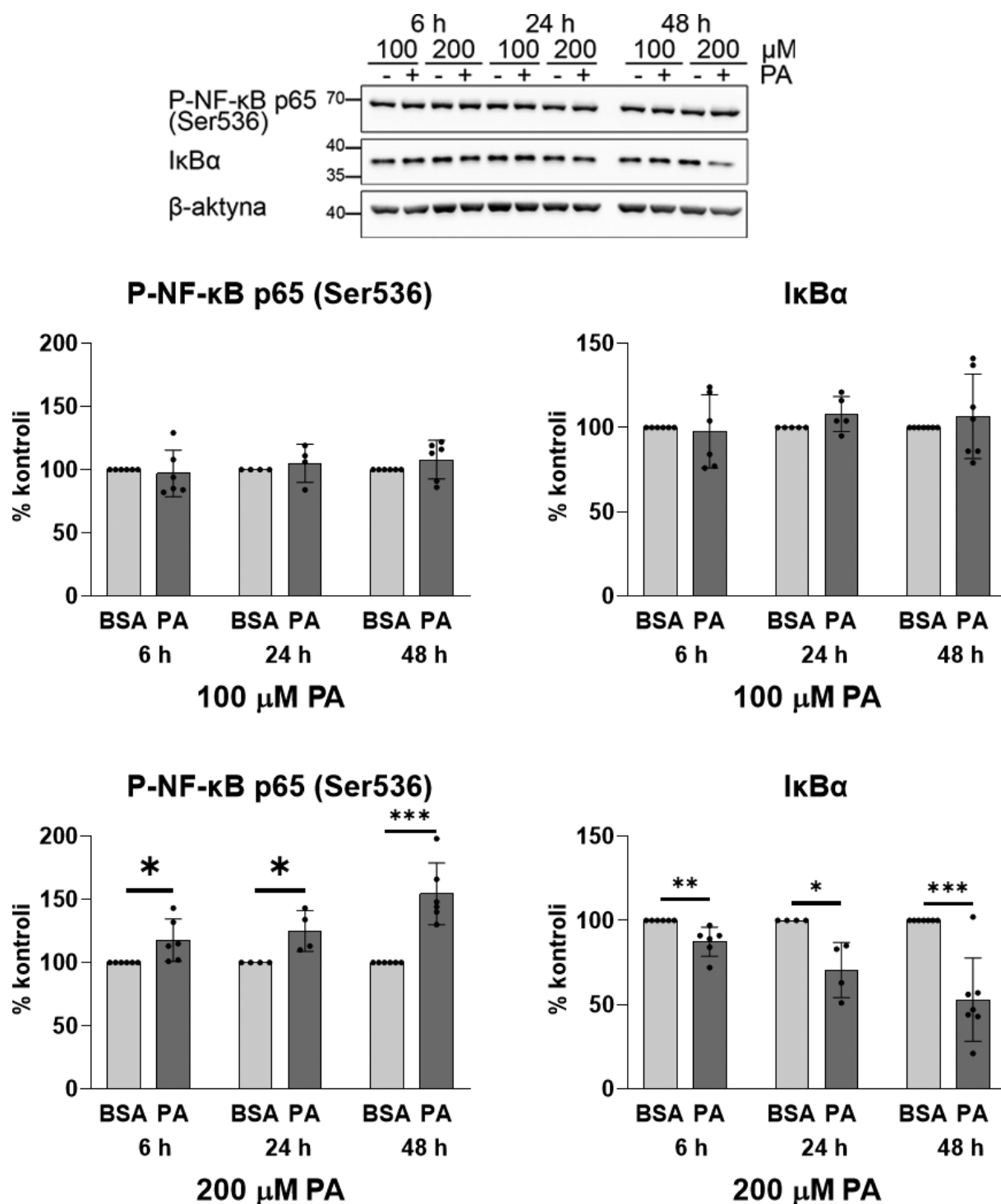
Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zwiększenie wydzielania vWF przez komórki inkubowane w obecności PA odzwierciedla zwiększenie ilości dojrzałego vWF znajdującego się WPBs. Jest to zapewne efektem zwiększonej ekspresji genu *VWF* oraz nasilonego procesu dojrzewania białka, na co wskazują zmiany proporcji między różnymi formami vWF.

4.4. Wpływ kwasu palmitynowego na aktywację ścieżki sygnałowej związanej ze zwiększonym wytwarzaniem vWF

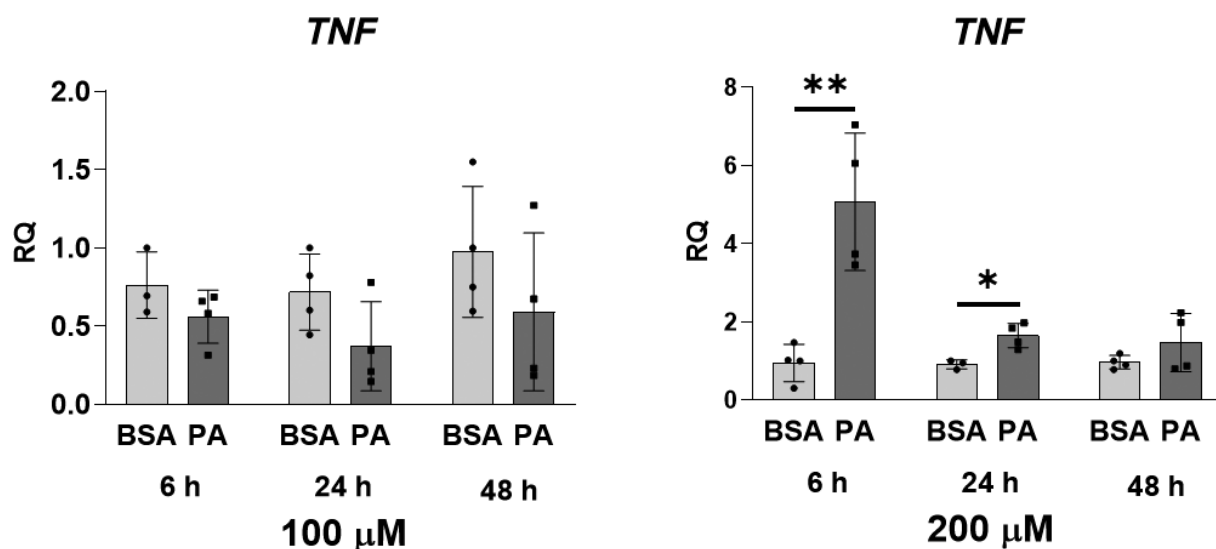
4.4.1. Ścieżka sygnałowa NF-κB

Dane piśmiennictwa wskazują, że w komórkach inkubowanych z PA dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB [135,188–190]. Istotnie jak pokazano na Rycinie 26, 200 μM PA powoduje postępujące w czasie jednoczesne zwiększenie proporcji ufosforylowanego w pozycji Ser536 białka NF-κB p65 oraz obniżenie ilości IκBα. Uzyskane wyniki jednoznacznie świadczą o aktywacji ścieżki sygnałowej NF-κB przez PA podany w stężeniu 200 μM. Natomiast w obecności 100 μM PA nie obserwowano podobnych zmian.

Ze względu na to, że zmiany ekspresji genu *VWF* indukowane przez PA chociaż istotne statystycznie są stosunkowo niewielkie, a przez to ich analiza ilościowa jest trudniejsza i mniej pewna, w opisywanych doświadczeniach aktywacja ścieżki sygnałowej związanej z NF-κB jest oceniana pośrednio na podstawie wpływu PA na ekspresję genu *TNF*. Aktywacja transkrypcji tego genu przez NF-κB pod wpływem PA jest dobrze opisana w piśmiennictwie [115,191], a zatem wydaje się, że może to być wykorzystane jako wskaźnik rzeczywistej aktywacji NF-κB. Jak pokazano na Rycinie 27 inkubacja w obecności 200 μM PA znacznie, ale przejściowo zwiększa ekspresję genu *TNF*. Największy wzrost obserwowano po 6 h inkubacji, po 24 h jest mniejszy, a po 48 h ekspresja genu *TNF* jest na poziomie kontroli BSA. 100 μM PA nie wpływa na transkrypcję genu *TNF*, podobnie jak nie powoduje aktywacji NF-κB, pomimo wykazanego zwiększenia transkrypcji genu *VWF* (Rycina 10).

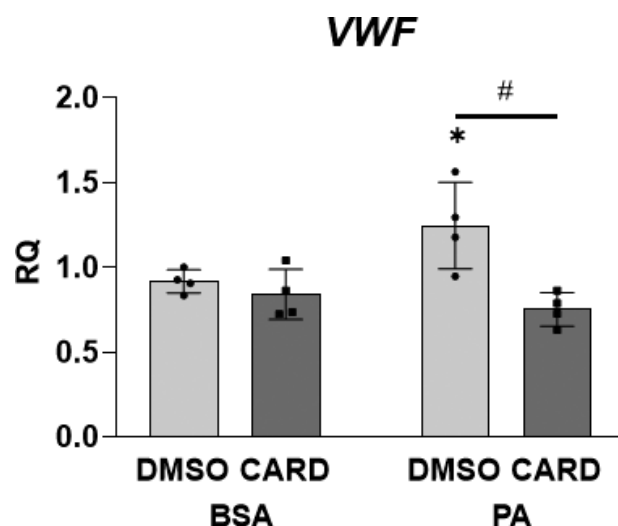


Rycina 26. Wpływ PA na ilość białek fosforylowanego NF-κB p65 (Ser536) i IκBα. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β-aktyny (średni % kontroli BSA ± SD, n=4-7). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.



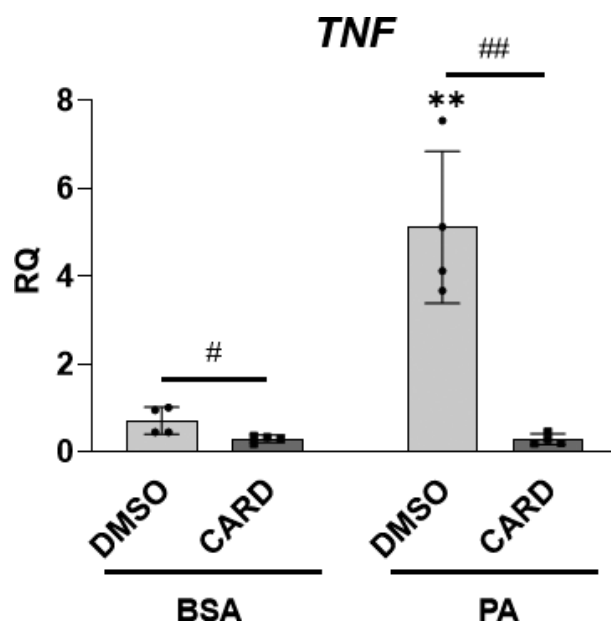
Rycina 27. Wpływ PA na ekspresję genu *TNF*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, $n=3-4$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA dla danego czasu inkubacji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$.

A zatem potwierdzono aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B przez PA podany w stężeniu 200 μ M (Rycina 26). Natomiast dostępne informacje dotyczące regulacji ekspresji genu *VWF* przez NF- κ B są bardzo ograniczone i niejednoznaczne [192–194]. W celu sprawdzenia, czy ścieżka sygnałowa NF- κ B aktywowana przez PA jest związana ze zwiększoną ekspresją genu *VWF*, przeprowadzono doświadczenia, których celem było sprawdzenie, czy zahamowanie NF- κ B przez kardamoninę wpływa na transkrypcję genu *VWF*? Mimo, że działanie kardamoniny nie jest bardzo specyficzne, jest ona często stosowanym inhibitorem NF- κ B i związanego z nim stanu zapalnego, a jej działanie hamujące wpływ PA na komórki HUVEC zostało potwierdzone przez Pillon i wsp. [140]. Komórki inkubowano przez 1 h w obecności 5 μ M kardamoniny, a następnie inkubowano jednocześnie w obecności kardamoniny i 100 μ M PA przez 48 h. W tych warunkach obserwowano wcześniej wzrost ekspresji genu *VWF* (Rycina 10), a jednocześnie nie wykazano aktywacji NF- κ B (Rycina 26), ani wzrostu transkrypcji genu *TNF* (Rycina 27), co sugeruje inny niż zależny od NF- κ B mechanizm regulacji transkrypcji *VWF*. Z drugiej jednak strony w komórkach inkubowanych w obecności PA kardamonina powoduje obniżenie ekspresji genu *VWF* do poziomu obserwowanego w warunkach kontrolnych z BSA (Rycina 28). To sugeruje, że zwiększona w obecności PA ekspresja genu *VWF* jest mimo wszystko związana z aktywacją ścieżki sygnałowej NF- κ B.



Rycina 28. Wpływ inhibitora kardamoniny (CARD) na zwiększoną przez PA ekspresję genu *VWF*. Komórki preinkubowano przez 1 h w obecności 5 μ M kardamoniny, a następnie przez 48 h w jednoczesnej obecności 100 μ M PA. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$ PA vs. BSA; # $p \leq 0,05$ CARD vs. DMSO.

Dodatkowo efekt kardamoniny zbadano również obserwując jej wpływ na ekspresję genu *TNF* w obecności PA. W tym przypadku komórki inkubowano przez 1 h w obecności 20 μ M kardamoniny, a następnie jednocześnie w obecności kardamoniny i 200 μ M PA przez kolejne 6 h, czyli w warunkach doświadczalnych, w których wpływ PA na transkrypt *TNF* jest największy (Rycina 27). Kardamonina całkowicie blokuje efekt PA na zwiększoną transkrypcję *TNF* (Rycina 29), podobnie jak w przypadku genu *VWF* (Rycina 28). W komórkach kontrolnych inkubowanych w obecności BSA również obserwowano obniżenie ekspresji genu *TNF* pod wpływem kardamoniny, co może wskazywać na hamowanie podstawowej (niestymulowanej PA) aktywności NF- κ B.

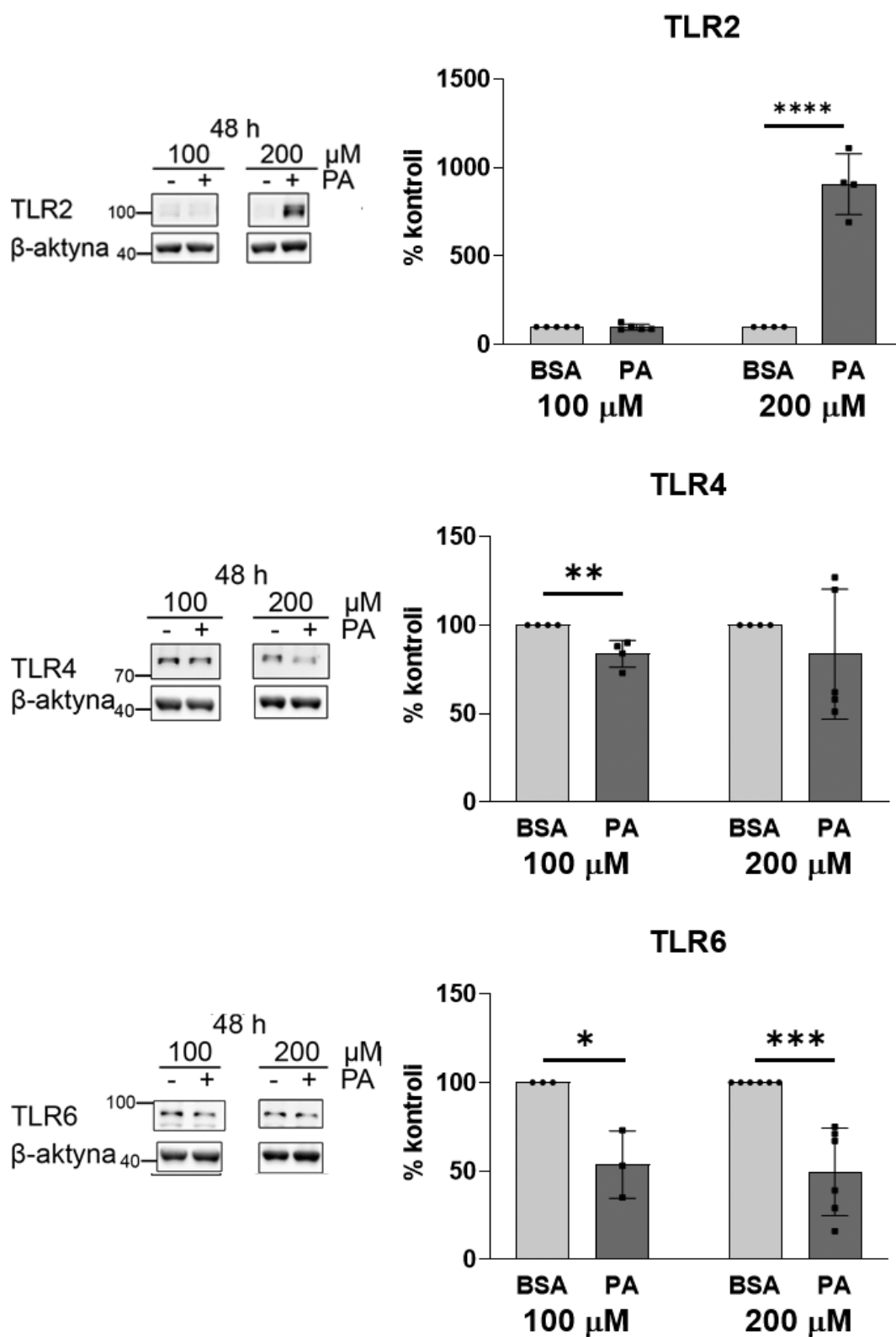


Rycina 29. Wpływ inhibitora kardamoniny (CARD) na zwiększoną przez PA ekspresję genu *TNF*. Komórki preinkubowano przez 1 h w obecności 20 μ M kardamoniny, a następnie przez 6 h inkubowano w jednoczesnej obecności 200 μ M PA. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=4). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: **p $\leq$ 0,01 PA vs. BSA; #p $\leq$ 0,05, ##p $\leq$ 0,01 CARD vs. DMSO.

4.4.2. Receptory TLR

NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym biorącym udział w ścieżce przekazywania sygnału od receptorów TLR. Dane piśmiennictwa wskazują, że TLR2, jak i TLR4 mogą uczestniczyć w odpowiedzi komórek na PA w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, jak wykazano u myszy z otyłością indukowaną dietą wysokotłuszczową [140,195–207]. Z kolei TLR6 uczestniczy w tworzeniu dimerów z TLR2 po związaniu specyficznego liganda. Zbadano zatem wpływ inkubacji komórek HUVEC w obecności PA na względną ilość białka wybranych receptorów TLR, które potencjalnie mogą być aktywowane przez PA.

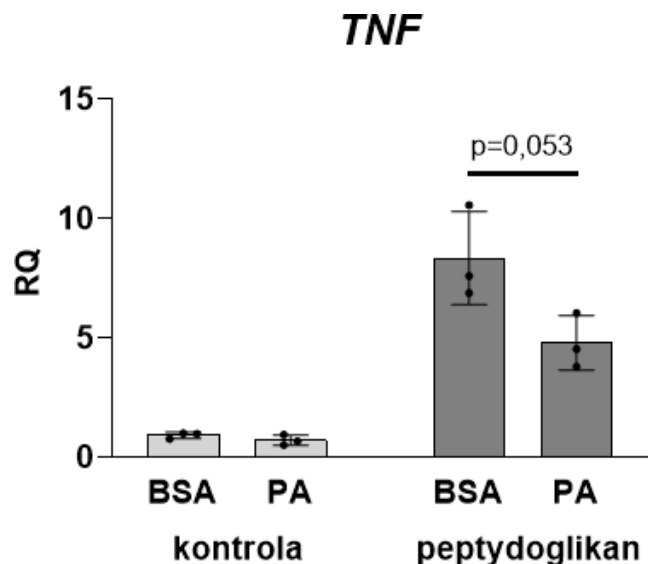
Inkubacja komórek przez 48 h z 200 μ M PA powoduje bardzo duże zwiększenie ilości białka TLR2 (Rycina 30). Przeciwny efekt występuje w przypadku białka TLR4, którego ilość jest istotnie obniżona w komórkach inkubowanych w obecności 100 μ M PA i nieznacznie (brak istotności statystycznej jest spowodowany rozrzutem wyników) w obecności PA w stężeniu 200 μ M. Co więcej, ilość białka TLR6 jest obniżona w obecności PA w obu zastosowanych stężeniach.



Rycina 30. Wpływ PA na ilość TLR2, TLR4, TLR6. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli BSA $\pm$ SD, $n=3-6$). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Znacznie zwiększona w obecności PA ilość białka TLR2 (Rycina 30) może sugerować zwiększoną odpowiedź prozapalną na specyficzną aktywację tego receptora. Dlatego sprawdzono, czy przekłada się to na zwiększenie jego aktywności. Komórki inkubowano przez 48 h w obecności 200 μ M PA, a następnie przez 2 h inkubowano w obecności 10 μ g/ml peptydoglikanu z *Bacillus subtilis*, który jest specyficznym ligandem receptora TLR2. Oceny aktywacji TLR2 dokonano na podstawie transkrypcji genu *TNF*, która powinna się zwiększać w wyniku regulacji przez NF- κ B i może być wyznacznikiem aktywacji. Oczekiwano, że w komórkach traktowanych PA efekt peptydoglikanu ze względu na większą ilość receptora będzie większy niż w komórkach kontrolnych z BSA.

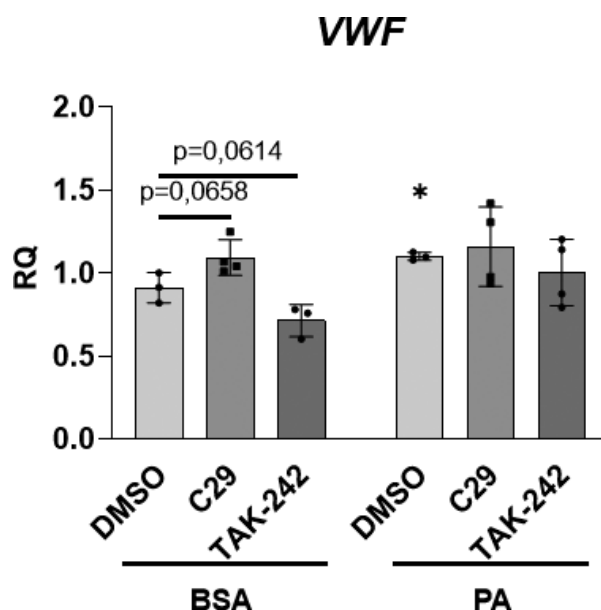
Peptydoglikan powoduje zwiększenie ekspresji genu *TNF* zarówno w komórkach kontrolnych inkubowanych z BSA, jak i inkubowanych z PA (Rycina 31). Jednakże po stymulacji peptydoglikanem ekspresja genu *TNF* jest niższa w komórkach inkubowanych w obecności PA w stosunku do BSA. Uzyskane wyniki sugerują, że inkubacja komórek HUVEC w obecności PA powoduje, że specyficzna odpowiedź receptorów TLR2 w odpowiedzi na peptydoglikan jest mniejsza, co jest zaskakującą obserwacją, uwzględniając zwiększenie ilości białka TLR2 ocenianej metodą Western blot (Rycina 30).



Rycina 31. Wpływ PA na aktywację przez peptydoglikan ekspresji genu *TNF*. Komórki inkubowano 48 h w obecności 200 μ M PA, a następnie przez 2 h w obecności 10 μ g/ml peptydoglikanu z *Bacillus subtilis*. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej BSA niestymulowanej peptydoglikanem (średnia $\pm$ SD, n=3). Analizę statystyczną pomiędzy przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta.

W celu ustalenia, który z receptorów rodziny TLR jest aktywowany przez PA i bierze udział w przekazywaniu sygnału powodującego zwiększenie ekspresji genu *VWF*, komórki HUVEC preinkubowano przez 1 h z inhibitorami C29 i TAK-242 specyficznymi odpowiednio dla TLR2 i TLR4, a następnie dodawano do pożywki PA w stężeniu 100 μ M na 48 h. Wpływ C29 i TAK-242 badano w takich samych warunkach doświadczalnych, jak w przypadku kardamoniny (Rycina 28), a więc w warunkach, w których obserwowano zwiększoną ekspresję genu *VWF* pod wpływem PA (Rycina 10), a jednocześnie nie wykazano aktywacji NF- κ B (Rycina 26).

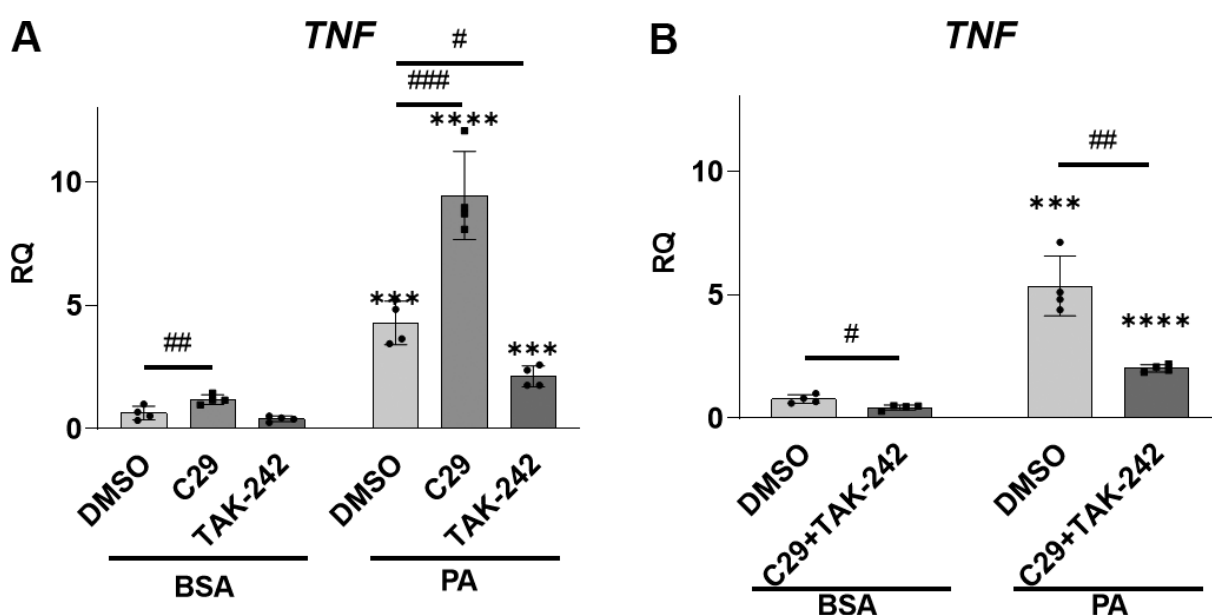
Nie udało się wykazać wpływu tych inhibitorów na stymulowany przez PA wzrost ekspresji genu *VWF* (Rycina 32). Co więcej, jedynie w kontrolnych komórkach inkubowanych z BSA obserwowano nieznaczne zmiany ekspresji genu *VWF*. W obecności C29 obserwowano tendencję do wzrostu ekspresji genu *VWF*, natomiast pod wpływem TAK-242 do jej obniżenia. W komórkach traktowanych PA żaden z inhibitorów nie powoduje istotnych zmian. Na podstawie uzyskanych wyników nie można określić, który z receptorów TLR jest bezpośrednio aktywowany przez PA.



Rycina 32. Wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 na zwiększoną w obecności PA ekspresję genu *VWF*. Komórki preinkubowano przez 1 h w obecności 100 μ M C29 lub 20 μ M TAK-242, a następnie przez 48 h w jednoczesnej obecności 100 μ M PA. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem ACTB i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$ PA vs. BSA; analizę statystyczną pomiędzy inhibitorami a kontrolą DMSO przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem *post hoc* Dunnetta.

Jak wykazano wcześniej (Rycina 28 i Rycina 29), zwiększona w obecności PA ekspresja genów *VWF* i *TNF* jest związana z aktywacją NF- κ B, a więc są regulowane przez tą samą ścieżkę sygnałową. Dlatego, aby wyjaśnić, który z receptorów TLR jest aktywowany przez PA, sprawdzono wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 na aktywację transkrypcji genu *TNF*.

Co zaskakujące, C29 zarówno w komórkach kontrolnych BSA, jak i inkubowanych z PA, zwiększa ekspresję genu *TNF*. Natomiast TAK-242 hamuje obserwowany w obecności PA wzrost poziomu mRNA *TNF* (Rycina 33). Pozwala to stwierdzić, że PA aktywuje odpowiedź komórek obserwowaną na podstawie zwiększonej ekspresji genu *TNF* poprzez aktywację receptora TLR4.



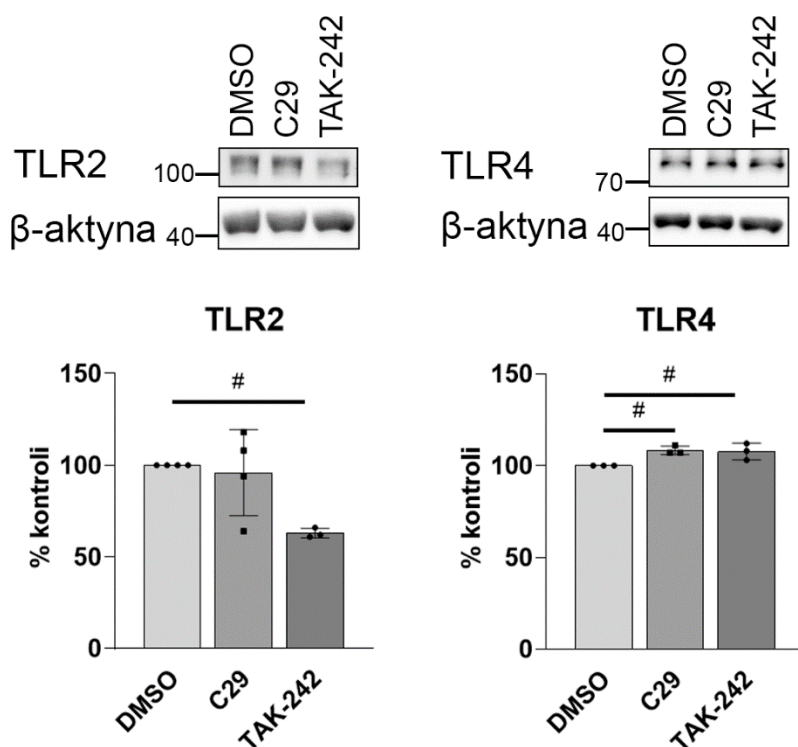
Rycina 33. Wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 na zwiększoną w obecności PA ekspresję genu *TNF*. Komórki preinkubowano przez 1 h w obecności A) 100 μ M C29 lub 20 μ M TAK-242, B) obu inhibitorów, a następnie przez 6 h inkubowano w jednoczesnej obecności 200 μ M PA. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ PA vs. BSA; analizę statystyczną pomiędzy inhibitorami a kontrolą DMSO przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem *post hoc* Dunnetta: # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ inhibitor vs. DMSO.

Aby wyjaśnić niespodziewany wpływ inhibitora C29, komórki inkubowano jednocześnie w obecności PA oraz inhibitorów obu badanych receptorów. W obecności TAK-242 stymulujący wpływ C29 na ekspresję genu *TNF* jest zahamowany, a poziom transkryptu genu *TNF* zbliżony do zaobserwowanego w próbach inkubowanych w obecności jedynie TAK-242

(Rycina 33). Ta nieoczekiwana obserwacja może sugerować, że zahamowanie aktywności TLR2 przez C29 powoduje zwiększoną aktywację receptora TLR4.

W celu dokładniejszego zbadania wpływu inhibitora TLR2 na zwiększoną aktywność TLR4, zbadano wpływ obu inhibitorów na ilość białka receptorów TLR2 i TLR4. Ponieważ zwiększenie transkrypcji *TNF* przez C29 jest niezależne od obecności PA i wykazano je również w komórkach kontrolnych inkubowanych z BSA (Rycina 33), to wpływ inhibitorów w tym doświadczeniu zbadano w komórkach nietraktowanych PA. Komórki inkubowano w obecności C29 i TAK-242 przez 7 h, co odpowiada całkowitemu czasowi inkubacji z inhibitorami w poprzednim doświadczeniu.

W zastosowanych warunkach nie obserwowano wpływu C29 na ilość receptora TLR2 (Rycina 34). Natomiast TAK-242 powoduje jego obniżenie. Ilość TLR4 jest istotnie zwiększona zarówno przez C29, jak i TAK-242, jednak ta zmiana, choć istotna statystycznie jest bardzo mała i jej znaczenie jest niepewne.



Rycina 34. Wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 na ilość TLR2 i TLR4. Komórki inkubowano przez 7 h w obecności 100 μ M C29 i 20 μ M TAK-242. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % kontroli $\pm$ SD, $n=3-4$). Analizę statystyczną pomiędzy inhibitorami a kontrolą DMSO przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem *post hoc* Dunnetta: # $p \leq 0,05$ inhibitor vs. DMSO.

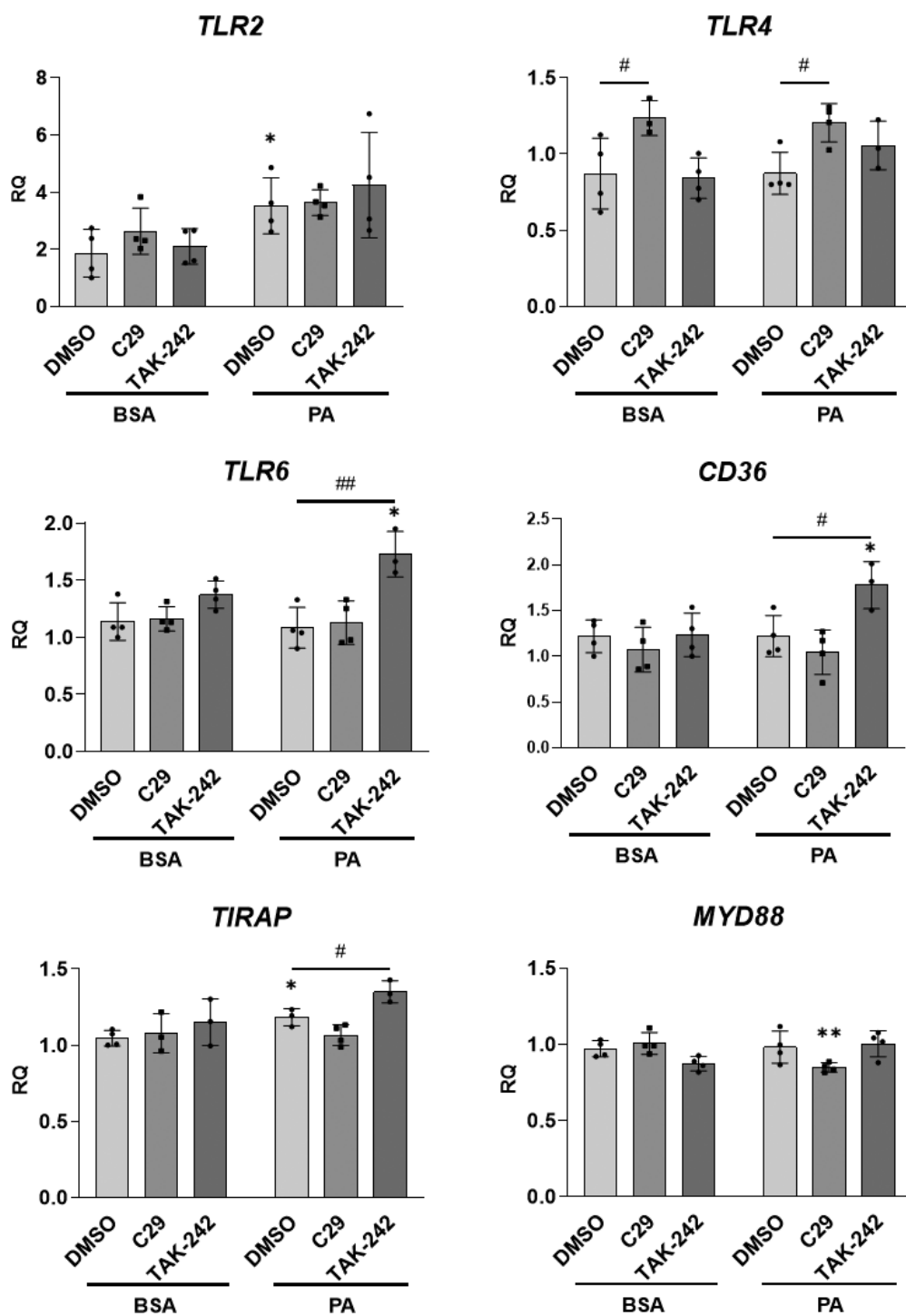
Przekazywanie sygnału od aktywowanych receptorów TLR wymaga udziału wielu białek (Rycina 6). Wśród nich, poza samymi receptorami są m.in. białka adaptorowe TIRAP i MyD88 oraz białko CD36, będące koreceptorem dla TLR2 i TLR4 [208–212], a w pewnych warunkach uczestniczące w tworzeniu dimerów receptorów TLR4 i TLR6 [213,214].

Na Rycinie 35 przedstawiono wyniki doświadczeń, w których sprawdzono, czy i jeżeli tak, to w jaki sposób inhibitory C29 i TAK-242 oraz PA wpływają na ekspresję genów kodujących receptory TLR oraz wymienione białka towarzyszące. Doświadczenie to przeprowadzono w warunkach, w których obserwowano znaczny wpływ obu badanych inhibitorów na ekspresję genu *TNF* (Rycina 33).

Wykazano, że inkubacja komórek w obecności PA powoduje zwiększenie ekspresji genu *TLR2* oraz w mniejszym stopniu *TIRAP*. W obecności C29 wykazano zwiększoną ekspresję genu *TLR4* niezależnie od obecności PA, co jest zgodne z obserwowanym wcześniej zwiększeniem ilości białka TLR4 (Rycina 34). Natomiast w obecności jednocześnie C29 i PA obserwowano jedynie niewielkie obniżenie ekspresji genu *MYD88*.

Dodatkowo wykazano, że inkubacja w jednoczesnej obecności PA z inhibitorem TAK-242, a więc w warunkach, w których odpowiedź na PA obserwowana na podstawie ekspresji genu *TNF* jest zahamowana (Rycina 33), powoduje zwiększenie ekspresji genów *TLR6*, *CD36* i *TIRAP*.

A zatem wykazano, że C29 zwiększa zarówno ekspresję genu jak i ilość białka TLR4, co zapewne tłumaczy zwiększoną aktywność TLR4, obserwowaną na podstawie wzmożonej transkrypcji *TNF* (Rycina 33). Nie udało się zaobserwować innego dodatkowego wpływu C29 na geny kodujące białka związane z przekazywaniem sygnału, który mógłby wyjaśniać zwiększenie poziomu transkryptu *TNF*. Jednakże nieoczekiwanie w komórkach z zahamowaną przez TAK-242 aktywnością receptora TLR4, PA powoduje wzrost ekspresji genów kodujących białka, które mogą bezpośrednio oddziaływać z TLR4 i uczestniczyć w przekazywaniu sygnału, czyli TLR6, CD36 i TIRAP.

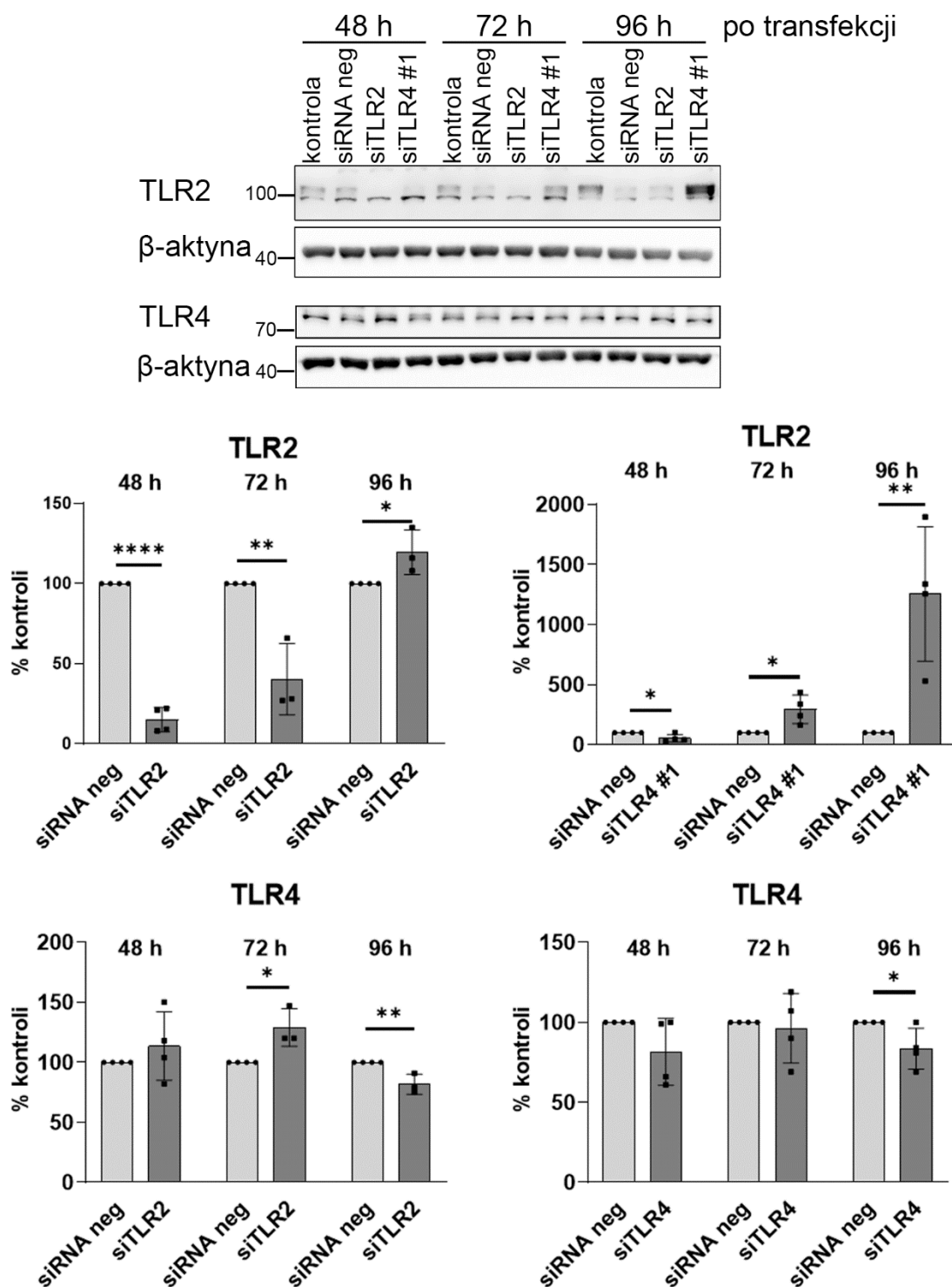


Rycina 35. Wpływ inhibitorów C29 i TAK-242 w obecności PA na ekspresję genów *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *CD36*, *TIRAP*, *MYD88*. Komórki preinkubowano przez 1 h w obecności 100 μ M C29 lub 20 μ M TAK-242, a następnie przez 6 h inkubowano w jednoczesnej obecności 200 μ M PA. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy PA a kontrolą BSA przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ PA vs. BSA; analizę statystyczną pomiędzy inhibitorami a kontrolą DMSO przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem *post hoc* Dunnetta: # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ inhibitor vs. DMSO.

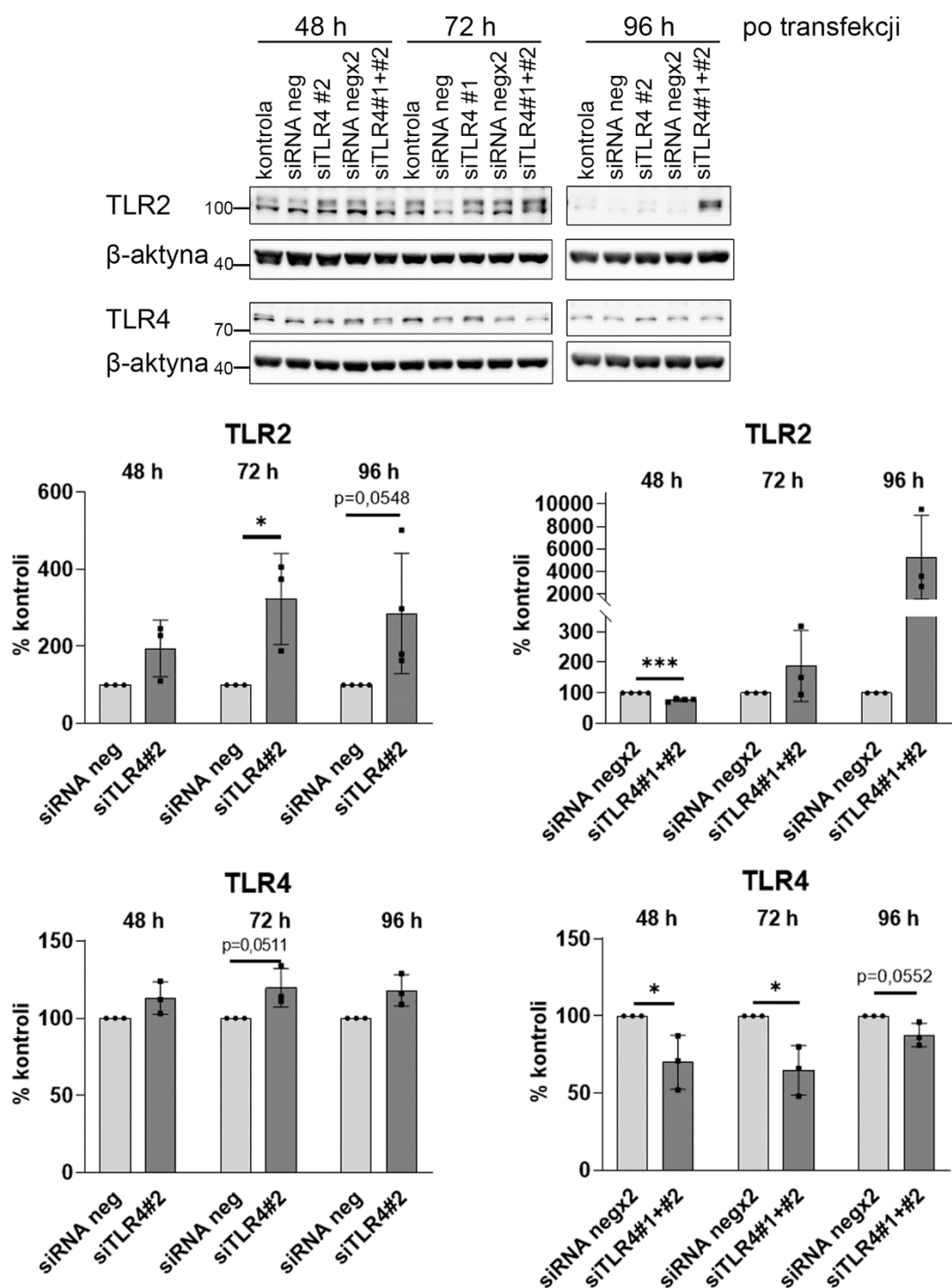
Zwiększona aktywacja TLR4 w obecności inhibitora TLR2 (Rycina 33) sugeruje istnienie zjawiska kompensacji między tymi białkami. Aby przyjrzeć się bliżej tej obserwacji zastosowano metodę wyciszania ekspresji genów *TLR2* i *TLR4* z wykorzystaniem odpowiednich siRNA.

Transfekcja komórek przy pomocy siTLR2 powoduje efektywne obniżenie ilości białka TLR2 po 48 i 72 h, natomiast po 96 h zawartości białka TLR2 wzrasta. Jednocześnie po 72 h od transfekcji obserwowano zwiększanie ilości białka TLR4 i jej istotny spadek po 96 h (Rycina 36). W celu wyciszenia genu *TLR4* zastosowano 2 różne rodzaje siRNA. Żaden z nich podany osobno nie powoduje efektywnego zmniejszenia ilości białka. Jedynie w przypadku siTLR4#1 po 96 h od transfekcji obserwowano niewielki spadek (o około 17%; Rycina 36). Mimo to wykazano zmieniający się w czasie wpływ wyciszenia *TLR4* na zawartość białka TLR2. Po 48 h od podania siTLR4#1 obserwowano przejściowe obniżenie ilości białka TLR2. Natomiast po dłuższym czasie wykazano jego wzrost jego zawartości, zarówno w przypadku podania siTLR4#1 (Rycina 36), jak i siTLR4#2 (Rycina 37). Szczególnie silny efekt siTLR4#1 występuje po 96 h.

Jednoczesna transfekcja dwoma różnymi siRNA wyciszającymi gen *TLR4* powoduje znaczące obniżenie ilości białka TLR4. Po 48 i 72 h od jednoczesnego podania obu siRNA ilość białka TLR4 zmniejsza się odpowiednio o około 30% i 35% (Rycina 37). Ilość białka TLR2 jest obniżona 48 h po transfekcji jednocześnie siTLR4#1 i siTLR4#2, co odpowiada wynikowi obserwowanemu w przypadku podania wyłącznie siTLR4#1 (Rycina 36). Następnie 72 i 96 h po transfekcji obserwowano wzrost ilości TLR2 zależny od czasu. Ilość białka TLR2 96 h po transfekcji dwoma rodzajami siRNA wyciszającymi TLR4 jest znacznie zwiększona, stanowiąc nawet około 30-90-krotność kontroli. Ze względu na wielkość tego przedziału efekt ten nie uzyskuje istotności statystycznej, ale jest niewątpliwie bardzo znaczący.



Rycina 36. Wpływ transfekcji siTLR2 i siTLR4#1 na ilość TLR2 i TLR4. Komórki analizowano 48, 72 i 96 h po transfekcji. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β -aktyny (średni % negatywnej kontroli transfekcji siRNA (siRNA neg) $\pm$ SD, n=3-4); Analizę statystyczną pomiędzy siRNA a kontrolą siRNA neg dla danego czasu transfekcji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.



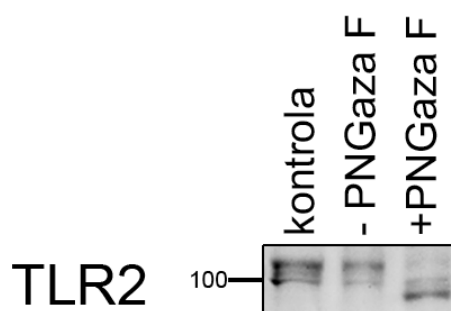
Rycina 37. Wpływ transfekcji siTLR4#2 oraz jednocześnie siTLR4#1 i siTLR4#2 (siTLR4#1+#2) na ilość TLR2 i TLR4. Komórki analizowano 48, 72 i 96 h po transfekcji. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wyniki Western blot oraz analizy densytometrycznej danych, po ich normalizacji w stosunku do β-aktyny (średni % negatywnej kontroli transfekcji siRNA (siRNA neg lub siRNA negx2) ± SD, n=3-4). Analizę statystyczną pomiędzy siRNA a kontrolą siRNA neg dla danego czasu transfekcji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ****p ≤ 0,0001.

Podsumowując, wyciszenie genu *TLR2* powoduje wzrost ilości białka TLR4. Transfekcja jednym rodzajem siTLR4, mimo tego, że nie udało się wykazać efektywnego obniżenia zawartości białka TLR4, powoduje wzrost ilości białka TLR2. Wyciszenie genu *TLR4* poprzez transfekcję jednocześnie dwoma siRNA powoduje znaczny, nawet kilkudziesięciokrotny wzrost ilości białka TLR2 (Tabela 9).

Tabela 9. Podsumowanie wpływu transfekcji siRNA na ilość TLR2 i TLR4.

siRNA	Ilość białka	Czas po transfekcji		
		48 h	72 h	96 h
siTLR2	TLR2	↓	↓	↑
	TLR4	–	↑	↓
siTLR4#1	TLR2	↓	↑	↑
	TLR4	–	–	↓
siTLR4#2	TLR2	↑	↑	↑
	TLR4	–	–	–
siTLR4#1+#2	TLR2	↓	↑	↑↑
	TLR4	↓	↓	–/↓

Na Rycinie 36 i Rycinie 37 przedstawiających wyniki Western blot dla TLR2 obserwowano 2 prążki na zbliżonej wysokości, które na podstawie wzorca mas mogą odpowiadać temu białku. Transfekcja siTLR2 powoduje obniżenie sygnału górnego prążka (Rycina 36). TLR2 ulega glikozylacji w 4 pozycjach, co może mieć wpływ na migrację białka podczas elektroforezy. W związku z tym w celu potwierdzenia, który z prążków odpowiada TLR2 przeprowadzono deglikozylację z użyciem PNGazy F. Jak przedstawiono na Rycinie 38, po zastosowaniu PNGazy F nadal widoczny jest dolny prążek około 100 kDa, co wskazuje raczej na niespecyficzność tego sygnału. Górny prążek przestaje być widoczny, a poniżej pojawia się prążek dotychczas nieobserwowany. Potwierdza to, że specyficznym dla białka TLR2 jest jedynie górny prążek.

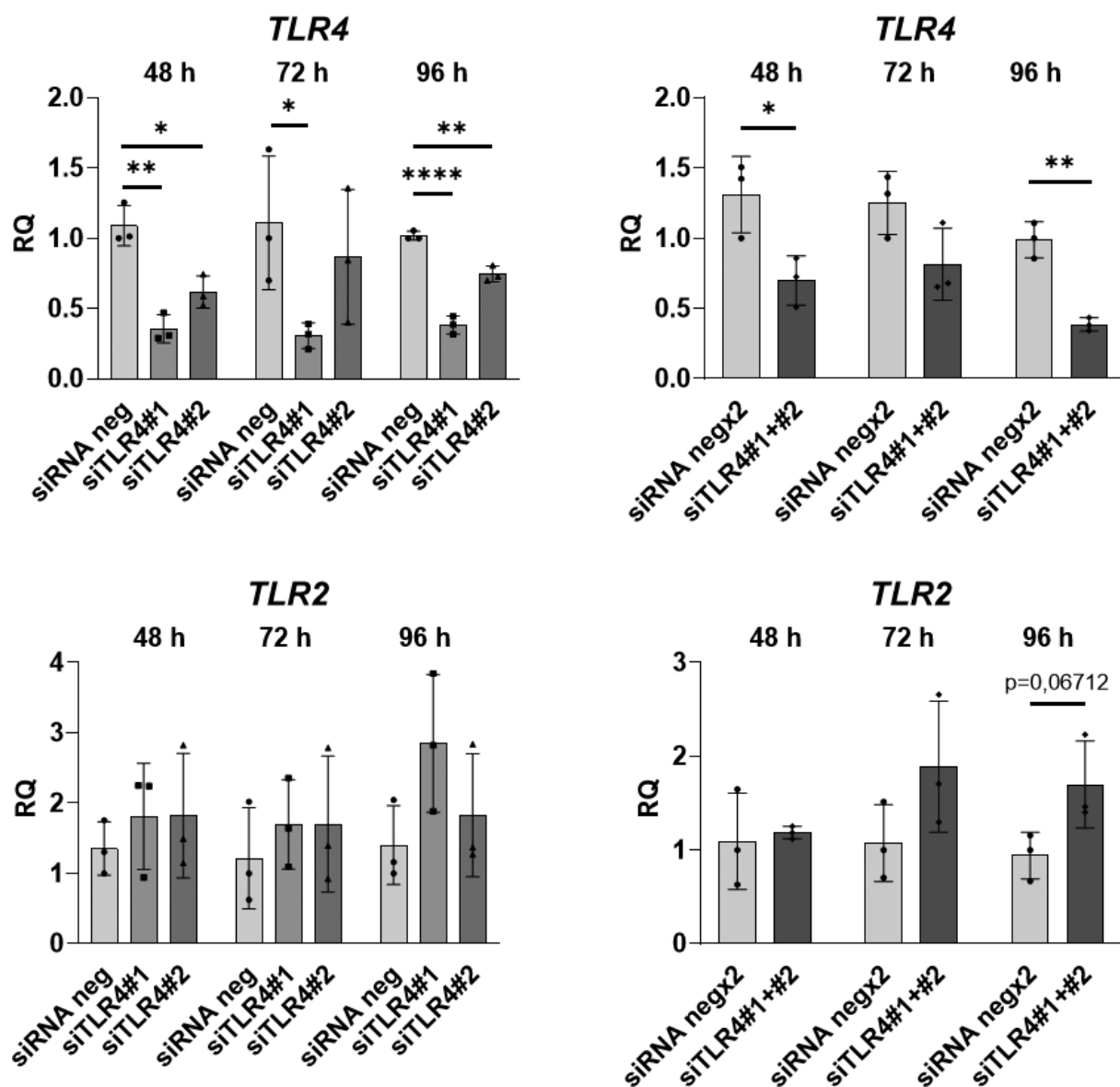


Rycina 38. Deglikozylacja białka TLR2 przy użyciu PNGazy F w lizatach komórek HUVEC. Przedstawiono reprezentatywny wynik Western blot wybrany z trzech niezależnych doświadczeń.

Efekt transfekcji siTLR4 na białko TLR2 obserwowano niezależnie od efektywności wyciszenia ocenianej na podstawie ilości białka TLR4. W związku z tym w celu potwierdzenia skuteczności stosowanych siRNA sprawdzono wpływ siTLR4 na poziom transkryptu *TLR4*.

Transfekcja siTLR4#1 znacznie obniża poziom mRNA genu *TLR4* w każdym badanym punkcie czasowym (Rycina 39). Efekt siTLR4#2 jest nieco mniejszy, natomiast również istotny statystycznie 48 i 96 h po podaniu siRNA, ale po 72 h nieznaczny. W przypadku jednoczesnej transfekcji dwoma siTLR4 obserwowano istotnie statystyczne obniżenie ilości transkryptu *TLR4* 48 i 96 h po transfekcji oraz tendencję po 72 h, podobnie jak w przypadku podania siTLR4#2.

Jednocześnie sprawdzono jak podanie siTLR4 wpływa na poziom transkryptu genu *TLR2*. W przypadku transfekcji siTLR4 nie udało się zaobserwować istotnej statystycznie zmiany poziomu mRNA *TLR2*, chociaż obserwowano pewien wzrost po 96 h od podania siTLR4#1. W przypadku podania obu siRNA wyciszających TLR4 zaobserwowany niewielki wzrost poziomu po 72 i 96 h również nie wykazuje istotności statystycznej.



Rycina 39. Wpływ transfekcji siTLR4#1, siTLR4#2 oraz jednocześnie siTLR4#1 i siTLR4#2 (siTLR4#1+#2) na ekspresję genów *TLR2* i *TLR4*. Komórki analizowano 48, 72 i 96 h po transfekcji. Wyniki RT-qPCR przedstawiono jako względną ekspresję genu (RQ) po normalizacji względem *ACTB* i w odniesieniu do wybranej próby kontrolnej (średnia $\pm$ SD, n=3). Analizę statystyczną pomiędzy siRNA a kontrolą siRNA neg dla danego czasu transfekcji przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$.

5. Dyskusja

5.1. Wpływ kwasu palmitynowego na komórki śródbłónka i wydzielanie vWF

Dysfunkcja śródbłónka naczyń krwionośnych jest jednym z początkowych zaburzeń układu sercowo-naczyniowego, a nieleczona przyczynia się do rozwoju miażdżycy, nadciśnienia, choroby niedokrwiennej, udarów i przedwczesnej śmierci [17,19]. Zaburzenia funkcji śródbłónka związane są z krzepnięciem krwi, regulacją średnicy naczyń krwionośnych i przepływu krwi, wytwarzaniem czynników wzrostu, RFT, cytokin prozapalnych oraz cząsteczek adhezyjnych [17]. Ważnym czynnikiem o znaczeniu patogennym, związanym z otyłością i zaburzeniami metabolicznymi, jest zwiększone stężenie FFA w osoczu, wynikające z zaburzeń gospodarki lipidowej, a głównie ze zwiększonej lipolizy w adipocytach. Wzrost stężenia FFA sprzyja rozwojowi insulinooporności mięśni i niektórych innych narządów, a w kontekście śródbłónka prowadzi do rozwoju odpowiedzi zapalnej i chorób sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia i miażdżycy [215].

W niniejszej rozprawie badano wpływ PA na komórki śródbłónka HUVEC, szczególnie koncentrując się na wydzielaniu vWF oraz ustaleniu, jaka ścieżka sygnałowa bierze udział w odpowiedzi komórkowej na PA. Co prawda, układ *in vitro* nie odzwierciedla złożoności zaburzeń obserwowanych w skali organizmu, ale badania takie pozwalają na identyfikację procesów biochemicznych leżących u podstaw odpowiedzi komórek na badany czynnik, zachodzących w kontrolowanych warunkach.

Ze względu na niską rozpuszczalność w roztworach wodnych FFA są transportowane w osoczu w kompleksie z albuminą, która jest wytwarzana w wątrobie. W doświadczeniach *in vitro* PA jest podawany w różny sposób, co może mieć wpływ na jego dostępność i skutki oddziaływania na komórki. Najczęściej stosowaną metodą jest podawanie kwasów tłuszczowych w postaci kompleksów z BSA, ponieważ albumina ludzka i bydlęca wykazują zbliżone właściwości dotyczące wiązania tych związków. W cząsteczce albuminy zidentyfikowano 6 lub 7 miejsc wiązania FA o wysokim powinowactwie [216]. Istotne znaczenie podczas przygotowywania preparatu PA ma zachowanie właściwej proporcji kwasu tłuszczowego do albuminy. W przypadku przekroczenia stosunku ilościowego albuminy i cząsteczek FA, które mogą być związane w kompleksie z tym białkiem, część pozostaje w formie niezwiązanej. W pełni powtarzalne przygotowywanie kompleksu kwasów tłuszczowych z BSA jest trudne i może być przyczyną niepowtarzalności wyników

doświadczeń, zwłaszcza uzyskiwanych przez różnych autorów. Może to być spowodowane nie zawsze identycznym stopniem wysycenia miejsc wiązania kwasów tłuszczowych BSA oraz wpływem FA niezwiązanego [217,218].

BSA w warunkach *in vitro* może indukować zmiany prozapalne [219], co częściowo może wynikać z opisywanej obecności zanieczyszczeń [220]. Natomiast wpływ BSA jako takiego może być również związany z aktywacją receptora TLR4 i ścieżki sygnałowej NF- κ B [221]. Zazwyczaj, a także w niniejszej pracy, próbami do których odnoszono działanie PA były komórki inkubowane z BSA w stężeniu takim jak w kompleksie z podanym FA. Takie podejście wydaje się najwłaściwsze, chociaż działanie kompleksu BSA-FA nie jest prostą sumą działania każdego składnika osobno. Inną przyczyną pewnej niepowtarzalności wyników jest stosowanie różnych pożywek, a szczególnie różniących się stężeniem FBS, zawierającej również BSA. W niniejszej pracy stosowano surowicę w stężeniu 2%, czyli taką, jaka jest rekomendowana do hodowli komórek HUVEC. Inni autorzy wzbogacają często pożywkę dodając surowicę w wyższym stężeniu, nawet do 20% [222]. Ze względu na to, że FBS zawiera albuminę w swoim składzie, końcowa proporcja między PA a BSA może być zmieniona. Co więcej, przy niskim stężeniu FBS w pożywce dodatek BSA w kompleksie z PA bądź w kontroli może mieć stosunkowo większe znaczenie, co może być dodatkowym powodem obserwowanych niepowtarzalności. Interpretując i porównując wyniki z uzyskanymi przez innych autorów trzeba zdawać sobie sprawę z potencjalnych przyczyn istniejących różnic.

W doświadczeniach, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie, komórki inkubowano w obecności PA o niskim stężeniu (do 200 μ M) przez stosunkowo długi czas (do 48 h), co umożliwia indukcję procesów adaptacyjnych i zapewne lepiej niż krótkotrwała inkubacja odzwierciedla sytuację, jaka zdarza się *in vivo*, pozwalając na obserwację zmian w komórkach w warunkach przedłużonego stresu. Warunki doświadczalne ustalono tak, aby PA nie zmniejszał przeżywalność komórek (Rycina 9). Dane literaturowe wskazują, że wyższe stężenie PA powoduje apoptozę w różnych typach komórek, w tym komórkach śródbłónka, poprzez wpływ na mitochondria, stres oksydacyjny, czy też stres siateczki śródplazmatycznej [223–228]. Natomiast obserwowana w obecności 200 μ M PA zwiększona zawartość białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 (Rycina 8) świadczy o zmianach właściwych dla odpowiedzi prozapalnej charakterystycznej dla komórek śródbłónka [136,140,229].

Stężenie vWF w osoczu jest wypadkową procesów biorących udział w jego wytwarzaniu, dojrzewaniu, wydzielaniu i degradacji. Wydzielanie vWF było badane w różnych modelach

doświadczalnych *in vitro* i *in vivo*. W badaniach z wykorzystaniem myszy wykazano, że otyłość spowodowana dietą wysokotłuszczową powoduje podwyższenie stężenia vWF w osoczu oraz zwiększone powstawanie zakrzepów [37]. W warunkach hiperglikemii w modelu cukrzycy typu 2 *in vitro* wykazano związane z obniżeniem ilości miR-24 zwiększenie ekspresji genu i wydzielania vWF [230]. W innym doświadczeniu z wykorzystaniem modelu hiperglikemii obserwowano zwiększoną ekspresję genu VWF w wyniku spowodowanego stresem oksydacyjnym zwiększenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego GATA1 [231]. A zatem fakt, że zaburzenia gospodarki lipidowej oraz zaburzenia metabolicznie sprzyjają wzrostowi stężenia vWF w osoczu wydaje się potwierdzony. Natomiast wskazanie, co jest bezpośrednią przyczyną tego stanu w otyłości nie jest oczywiste, zwłaszcza uwzględniając fakt, że jest to złożona choroba, w której wiele parametrów krwi ulega zmianie. Wydawało się jednak prawdopodobne, że jednym z czynników istotnym w tym kontekście mogą być FFA, a zwłaszcza PA, mający udokumentowany wpływ na śródbłonek.

W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że PA zwiększa transkrypcję genu kodującego vWF (Rycina 10) i przyspiesza dojrzewanie tego białka (Rycina 11). Dojrzewanie białka vWF oceniono na podstawie obniżonego poziomu prekursorowego pro-vWF, które jest pierwotnym produktem translacji, oraz zwiększonego poziomu dojrzałego vWF i vWFpp, powstających w procesie dojrzewania w wyniku proteolizy katalizowanej przez furynę. Badanie stosunku formy pro-vWF do dojrzałego vWF pozwala na szczegółową ocenę wpływu PA na proces dojrzewania vWF. Stosując takie podejście doświadczalne Torisu i wsp. wykazali, że dojrzewanie vWF było zahamowane w komórkach pozbawionych białka ATG7 [182].

W tych samych warunkach doświadczalnych, w których wykazano pod wpływem PA zwiększone dojrzewanie vWF, zwiększone jest także wydzielanie vWF do pożywki (Rycina 12), co jest nowym ustaleniem. Nie było jednak oczywiste, czy stymulacja wydzielania białka vWF jest wynikiem aktywacji wydzielania WPBs, czy też odzwierciedla jedynie zwiększone dojrzewanie vWF. W celu wyjaśnienia tej niejasności zastosowano kilka podejść doświadczalnych. Jednym z nich było ustalenie, czy PA wpływa na wydzielanie vWF stymulowane agonistami: histaminą i forskoliną, powodującymi odpowiednio zwiększenie stężenia jonów wapnia oraz cAMP w komórkach [94]. Wpływ histaminy i forskoliny są addytywne z efektami PA, co sugeruje, że mechanizmy działania każdego z nich oraz PA na wydzielanie vWF mogą być różne. Wydaje się, że stymulujący efekt PA na wydzielanie vWF nie jest bezpośrednio związany z aktywowanymi agonistami wydzielaniem WPBs.

Występuje on również w przypadku podstawowego wydzielania obserwowanego bez dodatkowej stymulacji. Sugeruje to, że PA zwiększa ilość vWF na wcześniejszym niż wydzielanie etapie. Prawdopodobnie wynika to ze zwiększania ilości dojrzałego vWF zgromadzonego w WPBs.

Zaskakująca wydaje się obserwacja uzyskana przy pomocy techniki Western blot wskazująca na to, że zarówno po traktowaniu PA, jak i dodatkowej stymulacji histaminą, w pożywce zwiększona jest ilość vWFpp, czego nie potwierdzono dla dojrzałego vWF (Rycina 13). Obie formy tego białka są gromadzone w WPBs i wydzielane w tym samym stopniu, a więc wydawało się, że efekt stymulacji komórek powinien być podobny [232]. Obserwowana różnica może wynikać z funkcji vWF, jaką jest przyłączanie się do kolagenu eksponowanego w wyniku uszkodzenia śródbłonna. Komórki hodowano w szalkach pokrytych kolagenem typu I ze skóry cielęcej. Wydaje się więc prawdopodobne, że wydzielony do pożywki vWF może przynajmniej częściowo wiązać się z kolagenem pokrywającym naczynia hodowlane, zaniżając jego ilość oznaczaną w zbieranej pożywce. Kolagen pochodzenia cielęcego lub bydlęcego był w przeszłości używany do badania wiązania vWF do kolagenu [233].

Ponadto przedstawiane wyniki uzyskano z wykorzystaniem różnych metod. Metodą ELISA, która wykazuje wysoką czułość i pozwala na oznaczenia ilościowe, wykazano zwiększone wydzielanie vWF do pożywki po inkubacji z PA oraz dodatkowej stymulacji wydzielania (Rycina 12). Natomiast metodą Western blot, która jest półilościowa, obserwowano różnicę dotyczącą jedynie vWFpp, a nie dojrzałego vWF (Rycina 13). Zatem porównywanie wyników uzyskanych różnymi metodami jest obarczone niepewnością.

Dodatkowo wykazano, że po stymulacji histaminą komórek wcześniej inkubowanych w obecności PA, w lizatach komórkowych nadal jest więcej vWFpp (Rycina 14). W sytuacji, gdyby PA stymulował wydzielanie WPBs ilość vWFpp pozostającego w komórkach byłaby mniejsza. Wówczas już po inkubacji tylko w obecności PA ilość zarówno dojrzałego vWF, jak i vWFpp w lizatach komórkowych byłaby obniżona. Z kolei, gdyby PA zwiększał wrażliwość komórek na bodźce stymulujące wydzielanie, to ilość białka pozostającego po traktowaniu histaminą byłaby obniżona, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że obserwuje się w tym układzie zwiększenie stężenia vWF w pożywce. Przedstawione wyniki sugerują, że PA nie wpływa na mechanizm wydzielania WPBs, a zwiększone wydzielanie vWF wynika raczej ze zwiększonej zawartości dojrzałego białka zmagazynowanego w tych organellach.

Transkrypcja genu *VWF* jest regulowana przez wiele czynników transkrypcyjnych, które mogą powodować zarówno indukcję jak i represję ekspresji genu [163,234].

Zbadano wpływ PA na wybrane białka, które mogą być związane z większą ekspresją genu *VWF*. Nie wykazano żadnego wpływu PA na poziom ekspresji genu *ERG*, a nawet ilość transkryptu *GATA3* jest obniżona w komórkach traktowanych PA (Rycina 15). Obniżenie ekspresji *GATA3* obserwowano wcześniej w komórkach traktowanych $TNF-\alpha$ [235,236], a sam $TNF-\alpha$ zmniejsza ekspresję genu *VWF* [237]. W niniejszej pracy wykazano obniżenie ekspresję genu *GATA3* po 6 h inkubacji komórek z 200 μM PA, co odpowiada warunkom doświadczalnym, w których ekspresja genu *TNF* jest zwiększona (Rycina 27). Przejściowe zmniejszenie ekspresji genu kodującego *GATA3* wydaje się nie mieć znaczenia w regulacji ekspresji genu *VWF*. Niewykluczone, że obniżona ekspresja genu *GATA3* jest skutkiem zwiększonego wytwarzania $TNF-\alpha$. Wydaje się zatem, że w przypadku inkubacji komórek w obecności PA ekspresja genu *VWF* podlega innym mechanizmom regulacyjnym, które nie są związane z *ERG* i *GATA3*.

Dojrzała forma vWF i vWFpp powstają w wyniku specyficznej proteolizy prekursora pro-vWF katalizowanej przez konwertazę zwaną furyną. Istnieją dane wskazujące na pozytywną zależność między otyłością, zwiększoną ilością furyny i pojawieniem się zaburzeń metabolicznych [238,239]. W przeciwieństwie do oczekiwań wynikających z danych piśmiennictwa inkubacja komórek z PA powoduje zmniejszenie ilości transkryptu genu kodującego furynę (Rycina 16). Nie wykazano wpływu PA na ilość dojrzałej formy tego białka, a jedynie przejściowy wzrost ilości prekursora pro-furyny (Rycina 17). Wydaje się zatem, że nasilone dojrzewanie vWF pod wpływem PA nie jest bezpośrednio regulowane przez zwiększenie ilości furyny. Wskazuje to na inny mechanizm regulacyjny niż wcześniej opisany, w którym kluczową rolę odgrywa miR-24 [230]. U pacjentów z cukrzycą oraz w modelach hiperglikemii wyższemu stężeniu vWF w osoczu oraz zwiększonej ekspresji genu i białka vWF towarzyszył obniżony poziom miR-24. Xiang i wsp. [230] wykazali, że miR-24 reguluje nie tylko ekspresję genu kodującego vWF, ale także genu furyny i receptora histaminy, a więc nie tylko wytwarzanie vWF, ale też procesy jego dojrzewania i wydzielania.

Furyna należy do rodziny konwertaz probiałkowych, z których część, w tym furyna oraz PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 i PC7 wykazują specyficzność substratową wobec podobnych motywów aminokwasowych. W pewnych warunkach aktywność wobec danego substratu mogą wykazywać różne konwertazy, a dokładne różnice pozwalające na rozróżnienie specyficzności substratowej nie są znane. Kluczowa jest lokalizacja danego enzymu i substratu w komórce. TGN, w którym dochodzi do proteolizy pro-vWF jest miejscem występowania furyny, ale także innych enzymów o podobnym działaniu [240,241].

Wydaje się zatem, że w dojrzewaniu vWF mogą uczestniczyć również inne konwertazy, chociaż potwierdzenie tego wymagałoby dalszych badań.

Nieoczywisty efekt PA na furynę skłonił do wykonania dodatkowych doświadczeń, które mogłyby go potwierdzić. Furyna w komórce jest zlokalizowana w sieci TGN i endosomach oraz na błonie komórkowej [242]. Biorąc pod uwagę, że vWF ulega proteolizie przez furynę w TGN, aktywność konwertazy w tym przedziale komórkowym wydaje się szczególnie istotna. Innym substratem furyny jest białko pro-ADAM10, które również jest przetwarzane w TGN do dojrzałego ADAM10. Dlatego zbadano wpływ PA na dojrzewanie ADAM10. Zwiększone dojrzewanie ADAM10 pod wpływem PA wskazywałoby, że aktywność furyny wobec substratów jest niezależna od ilości białka obserwowanej w lizatach komórkowych.

Jednakże w niniejszej pracy nie wykazano wpływu PA na dojrzewanie ADAM10 (Rycinie 18). Co prawda obserwowano obniżenie poziomu białka pro-ADAM10, ale nie wykazano zmiany ilości dojrzałego białka ADAM10, co mogłoby świadczyć o nasileniu dojrzewania. Dlatego też nie można potwierdzić wpływu PA na aktywność furyny ocenianą na podstawie dojrzewania ADAM10. Wyniki dotyczące dojrzewania ADAM10 potwierdzają wniosek, że obserwowane w obecności PA przyspieszone dojrzewanie vWF nie jest wynikiem wpływu PA na furynę.

Również wyniki zymogramów pokazanych na Rycinie 19 nie wskazują na zwiększenie aktywności MMP, których aktywacja zachodzi z udziałem furyny bezpośrednio, albo pośrednio poprzez proteolizę aktywującą inne białka regulujące ich aktywność, w tym MT-MMP (ang. *membrane-type matrix metalloproteinase*) oraz inhibitorów TIMP [179,243,244]. Dostępne w literaturze dane wskazują na wpływ PA na MMP-2 oraz MMP-9 [245–249]. Wyższa aktywność metaloproteinaz, w tym szczególnie MMP-1, MMP-2, MMP-9, występująca u osób otyłych jest obserwowana u osób ze stwierdzonymi chorobami sercowo-naczyniowych [250,251]. Jednakże w niniejszej pracy nie potwierdzono aktywacji pod wpływem PA metaloproteinaz specyficznych wobec żelatyny, do których należą MMP-2 oraz MMP-9, co jest wynikiem nieoczekiwanym. Być może wynika to z faktu stosowania innego typu komórek lub, co wydaje się bardziej prawdopodobne, ze stosunkowo łagodnych warunków doświadczalnych. Podsumowując, nie udało się potwierdzić udziału furyny w odpowiedzi komórek indukowanej PA.

W piśmiennictwie istnieją doniesienia wskazujące na to, że dojrzewanie i wydzielanie vWF jest związane z procesem autofagii. W przypadku zahamowania autofagii na skutek

zastosowania inhibitorów oraz poprzez wyciszenie genów kodujących kluczowe w procesie autofagii białka: ATG5 i ATG7, dochodzi do zahamowania procesu dojrzewania vWF, obniżenia jego wydzielania oraz obniżenia ilości WPBs w komórkach HUVEC [182]. Z drugiej strony zaobserwowano, że zwiększenie ilości magazynowanego oraz wydzielanego vWF towarzyszy aktywacji autofagii pod wpływem pewnych czynników. Jednym z nich było białko p17 wydzielane przez komórki w wyniku infekcji HIV-1. W przypadku traktowania nim komórek HUVEC obserwowany efekt zwiększonej ilości WPBs był zahamowany pod wpływem inhibitorów autofagii, bądź w wyniku wyciszenia ekspresji genów kodujących białka związane z autofagii, w tym beclinę-1 [183]. Innym czynnikiem zwiększającym wydzielanie vWF jest akroleina, której wytwarzanie jest zwiększone w wyniku uszkodzenia mózgu, co jest związane ze zwiększoną krzepliwością. W tym przypadku wykazano w komórkach HUVEC, że akroleina aktywuje autofagię, co obserwowano na podstawie zwiększenia ilości białek ATG5, ATG7, LC3-II, bekliny-1, a towarzyszyło temu zwiększenie ilości wydzielanego vWF. Inhibitor autofagii zapobiegał tym zmianom [184]. Co więcej, liczne dane piśmiennictwa wskazują na istotny, aktywujący wpływ PA autofagię w różnych typach komórek, również w komórkach śródbłónka [133,252–258].

Dlatego zbadanie aktywacji autofagii przez PA, jako jeden z potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększone dojrzewanie vWF wydało się uzasadnione i interesujące. Jednak wbrew oczekiwaniom nie wykazano wpływu PA na ilość białka ATG7, a ilość ATG5 jest w małym stopniu obniżona (Rycina 20). Z drugiej strony obniżenie ilości białka ATG5 mógłby sugerować hamowanie autofagii. Negatywna regulacja tego procesu pod wpływem PA poprzez zwiększoną degradację ATG5 została opisana przez innych autorów [249], chociaż inne doniesienia potwierdzają udział ATG5 w aktywowanej przez PA autofagii [259]. Być może tylko niewielkie obniżenie poziomu białka ATG5 w komórkach traktowanych PA nie ma znaczenia wobec innych czynników pozytywnie wpływających na nasilone dojrzewanie vWF zaobserwowane w tych samych warunkach doświadczalnych (Rycina 11).

Chociaż fakt, że nie wykazano zmian ilości białek ATG5 i ATG7 zdaje się sugerować brak aktywacji autofagii pod wpływem PA, to zmiany zawartości innych białek związanych z tym procesem, nie pozwalają na wykluczenie jego aktywacji. Jednym z badanych białek było LC3. Wzrost proporcji LC3-II w stosunku do LC3-I świadczy o zwiększeniu liczby autofagosomów [260]. Wykazano przejściowe zwiększenie ilości białka LC3-II po 6 i 24 h inkubacji komórek z 200 μ M PA (Rycina 21). Po 48 h inkubacji zawartość białka LC3-II powraca do obserwowanej w kontroli BSA, co może sugerować degradację zwiększonej

wcześniej liczby autolizosomów [261]. Natomiast zwiększenie ilości LC3-II może być również interpretowane jako zahamowanie degradacji powstałych autolizosomów [262].

Innym białkiem używanym uzupełniająco w celu oceny autofagii metodą Western blot jest p62 [260,261]. p62 poprzez wiązanie ubikwitylowanych białek, a następnie oddziaływanie z LC3 w tworzącym się autofagosomie, kieruje białka do degradacji na drodze autofagii i jednocześnie samo także ulega degradacji w autolizosomie. Zwiększenie ilości białka p62 może świadczyć o jego zmagazynowaniu na skutek zahamowania natężenia autofagii. Aktywacja autofagii jest związana ze zmniejszeniem ilości p62, wynikającym z jego degradacji w autolizosomie [185]. Ilość białka p62 może zależeć również od regulacji transkrypcji lub translacji [263]. Dodatkowo oprócz degradacji w autolizosomie, białko p62 może ulegać degradacji proteasomalnej [185,260]. W niniejszej pracy zaobserwowano, że ilość białka p62 jest zwiększona pod wpływem PA, co sugeruje zahamowanie autofagii (Rycina 22). Podobny efekt PA w połączeniu ze zwiększonym poziomem LC3-II został wcześniej opisany i zinterpretowany, jako zahamowanie procesu autofagii [264,265]. Efekt zwiększonej ilości białka p62 po 24 h inkubacji w obecności 200 μ M PA obserwowano również po 48 h, podczas gdy w tych warunkach doświadczalnych ilość LC3-II jest taka jak w kontroli BSA. Na podstawie przejściowo zwiększonej ilości białka LC3-II można przypuszczać, że PA powoduje przejściowe zwiększenie liczby autofagosomów. Natomiast uwzględniając zmiany ilości obu białek LC3 i p62 nie można jednoznacznie potwierdzić stymulującego wpływu PA na proces autofagii.

Ekspresja genu kodującego p62 jest regulowana przez NF- κ B [266], a co więcej, pod wpływem stresu oksydacyjnego, jest zależna od fosforylacji Ser536 NF- κ B p65 [267]. Z kolei białko p62 reguluje aktywność NF- κ B [268,269]. Jednym z kluczowych elementów regulacji szlaku NF- κ B jest degradacja ubikwitylowanych białek, w tym I κ B [267]. Warto zauważyć, że w niniejszej rozprawie obserwowano stabilny wzrost proporcji NF- κ B p65, ulegającego fosforylacji w pozycji Ser536 i obniżonego poziomu I κ B α (Rycina 26), co mogłoby potwierdzać związek między p62 i NF- κ B. Jednakże wpływ PA na ekspresję genu kodującego białko p62 nie był przedmiotem prowadzonych w trakcie realizacji niniejszej rozprawy badań, dlatego przedstawione przypuszczenie sformułowano jedynie na podstawie danych piśmiennictwa [266–269], a obserwacje opisane w tej pracy wymagałyby potwierdzenia.

Obserwowany wpływ PA na zawartość innych białek związanych z autofagią, w tym ATG3, kompleksu ATG12-ATG5, ATG16L1 i bekliny-1, sugeruje przejściową aktywację procesów autofagii i mitofagii. ATG3 jest związane z autofagią poprzez udział

w tworzeniu autofagosomu w procesie lipidacji LC3 [270], a także uczestniczy w regulacji mitofagii [271,272]. W powstawaniu autofagosomów, oprócz ATG3 biorą udział zarówno kompleks ATG12-ATG5, jak i ATG16L1 [273], podczas gdy Beclin-1 odgrywa rolę w autofagii poprzez inicjację tworzenia fagoforu, ale także jest związana z mitofagią [274] oraz negatywnie reguluje apoptozę [275].

Co zaskakujące, w przypadku większości badanych białek efekt obserwowano w obecności 100 μ M stężenia PA (Rycina 23), a nie 200 μ M, tak jak to ma miejsce w przypadku LC3-II oraz białka p62. Obserwowana po 6 h inkubacji zwiększona ilość ATG3, ATG16L1 oraz kompleksu ATG12-ATG5 może sugerować przyspieszenie procesu powstawania autofagosomów. Jedynie w przypadku kompleksu ATG12-ATG5 obserwowano wzrost ilości w 200 μ M stężeniu po 6 h inkubacji. Natomiast po 48 h inkubacji zwiększona zawartość ATG3 i bekliny-1 może sugerować aktywację mitofagii. Aktywacja mitofagii przez PA była również zaobserwowana wcześniej [276].

Także powstawanie WPBs wydaje się być w istotny sposób związane z procesem autofagii. Badania Torisu i wsp. [182] sugerują, że WPBs mogą bezpośrednio oddziaływać z autofagosomami, co zostało stwierdzone na podstawie bliskiej lokalizacji WPBs i LC3 [182]. Niedawne badania wskazują, że LC3 może mieć też znaczenie inne niż związane z klasyczną autofagią. Wykazano, że LC3 uczestniczy w powstawaniu i wydzielaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych [277,278]. Choć do tej pory nie udowodniono lokalizacji LC3 w WPBs [279], wydaje się że weryfikacja udziału LC3 w powstawaniu WPBs, niezależnie od klasycznej autofagii, może być interesującym kierunkiem dalszych badań.

Przedstawione tutaj wyniki doświadczeń nie pozwalają na jednoznaczne wykazanie związku między aktywacją autofagii, a zwiększonym pod wpływem PA wytwarzaniem i w efekcie wydzielaniem vWF. Chociaż nie przeczą temu, że PA powoduje pewne zmiany zawartości niektórych białek związanych z autofagią. Być może przyczyną rozbieżności między wynikami przedstawianymi przez innych autorów oraz pokazanymi w niniejszej pracy jest to, że PA zazwyczaj był stosowany w wyższym stężeniu, przy którym dochodziło do innych zmian w komórkach, w tym apoptozy. W niniejszej pracy dążono do uniknięcia takiej sytuacji.

Indukcja ekspresji genu *VWF* przyczynia się do stymulacji powstawania WPBs, również w przypadku niektórych typów komórek innych niż śródbłonek [49]. Sugeruje to, że efekt PA, poprzez zwiększenie ekspresji genu *VWF*, może dotyczyć także w szerszym ujęciu WPBs, w których vWF uległ nagromadzeniu. Nie wykazano jednak wyraźnych zmian

rozmieszczenia WPBs (Rycina 24) w komórkach traktowanych PA. Wydzielanie WPBs wymaga prawidłowego oddziaływania z filamentami F-aktyny, a zatem może być wrażliwe na zmiany organizacji cytoszkieletu [96], a istniejące dane wskazują na to, że PA może powodować zaburzenia tej struktury. Jednakże podobnie jak w przypadku autofagii zmiany te obserwowano przy wyższym stężeniu PA [186,187]. W warunkach niskiego stężenia PA stosowanych w niniejszej pracy nie zauważono żadnych zmian w organizacji szkieletu aktynowego, co jest zresztą zgodne z wynikami Choroszy i wsp. [280].

Zbadano również wpływ PA na poziom ekspresji genów kodujących wybrane białka wchodzące w skład WPBs oraz uczestniczące w procesach ich dojrzewania i wydzielania z komórki, a także biorące udział w regulacji wydzielonych multimerów vWF poza komórką. Wśród nich, P-selektyna i CD63 są składnikami WPBs [90]. AnxA8 poprzez dostarczanie CD63 do WPBs bierze udział w ich dojrzewaniu. AnxA2 bierze udział w późnych etapach wydzielania WPBs [98,99]. Wykazano wpływ PA jedynie na ekspresję genów *CD63* i *ANXA2*, które kodują białka związane nie tylko z WPBs, ale też z innymi procesami biologicznymi. CD63 należy do białek tetraspanin, występuje również m.in. w błonie komórkowej, późnych endosomach oraz lizosomach, a także może być związane z autofagią [281,282]. Wśród wielu funkcji AnxA2 [283–285] w kontekście tej pracy szczególnie istotna wydaje się udział w regulacji aktywności NF- κ B [286,287].

Wydaje się zatem, że wpływ PA dotyczy selektywnie ekspresji genu *VWF*. Podobnie wybiórczy efekt wykazano w doświadczeniu z wykorzystaniem myszy otyłych na skutek diety wysokotłuszczowej, u których obserwowano wyższe stężenie vWF w osoczu, natomiast nie obserwowano zwiększenia stężenia angiopoetyny 2, również magazynowanej w WPBs [37].

W kontekście komplikacji zakrzepowych związanych ze zwiększonym poziomem wydzielonego vWF istotne znaczenie przypisuje się białku ADAMTS13, które poprzez proteolityczne przecinanie multimerów vWF krążących we krwi po wydzieleniu WPBs reguluje krzepnięcie krwi [65]. Jego niższa aktywność wobec vWF wiąże się ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych [288]. W przypadku pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową zaobserwowano, że zwiększone stężenie ADAMTS13 towarzyszące wyższemu stężeniu vWF wydaje się być mechanizmem obronnym, regulującym proces krzepnięcia [289]. W niniejszej pracy nie wykazano wpływu PA na ekspresję genu kodującego ADAMTS13 (Rycina 25). Chociaż, tak jak to opisano w innych pracach, także tutaj wykryto obecność w komórkach śródbłonna transkryptu genu *ADAMTS13*,

to nie są one źródłem ADAMTS13 w układzie krążenia, gdyż białko to jest wytwarzane głównie przez komórki gwiaździste wątroby [290].

Podsumowując nie obserwowano wpływu PA na lokalizację WPBs w komórkach, a wpływ na ekspresję genów kodujących białka związane z WPBs jest ograniczony. Dlatego nie można potwierdzić wpływu PA na regulację powstawania i wydzielania WPBs. Wzmacnia to wcześniejszą hipotezę, że obserwowane pod wpływem PA zmiany są ograniczone do zwiększenia ekspresji genu *VWF* oraz dojrzewania tego białka, a w konsekwencji jego wydzielania.

Warto zwrócić uwagę, że znaczna część danych piśmiennictwa dotyczących wpływu PA na komórki *in vitro* pochodzi z doświadczeń, w których stres wywołany PA powoduje obniżenie przeżywalności komórek. Przy takim podejściu obserwowane zmiany są bardziej uwidocznione, natomiast pokazują inną, zazwyczaj bardziej złożoną, odpowiedź komórek niż obserwowana w niższym zakresie stężeń, kiedy to dochodzi do odpowiedzi adaptacyjnej na stres, co może odzwierciedlać zmiany mieszczące się w warunkach fizjologicznych. Podobne podejście stosowane było wcześniej w doświadczeniach w Pracowni Metabolizmu Komórki dotyczących wpływu zarówno PA, ale też glukozy, TNF- α oraz LPS na komórki śródbłónka [136,291–293].

5.2. Aktywacja ścieżki sygnałowej NF- κ B w obecności kwasu palmitynowego za pośrednictwem TLR4

Odpowiedź na pytanie, jaki mechanizm jest odpowiedzialny za rozwój dysfunkcji śródbłónka pod wpływem PA, nie jest jednoznaczna. W kontekście rozwoju reakcji prozapalnej szczególnie ważny wydaje się udział czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Dane piśmiennictwa wskazują też na możliwy udział receptorów TLR2 i TLR4. Nie można wykluczyć także innych mechanizmów w aktywacji odpowiedzi komórek śródbłónka na PA.

W niniejszej pracy potwierdzono wcześniej już opisywany wpływ PA na aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B [135,140,191,294], co wykazano na podstawie obniżonej ilości białka I κ B α oraz zwiększonego udziału ufosforylowanego NF- κ B p65 (Rycina 26). Zmiany zaobserwowane pod wpływem 200 μ M PA pogłębiają się w czasie doświadczenia od 6 do 48 h, natomiast nie stwierdzono wpływu 100 μ M PA na aktywację NF- κ B.

Aktywacja ścieżki sygnałowej NF- κ B prowadzi do regulacji ekspresji wielu genów, w tym kodującego związaną z odpowiedzią zapalną TNF- α . Wykazany w niniejszej pracy zwiększony przez PA poziom ekspresji genu *TNF* potwierdza aktywację tej ścieżki (Rycina 27) i jest to zgodne z danymi piśmiennictwa [115,191]. Ze względu na to, że efekt ten

jest bardzo silny i łatwiejszy do uwidocznienia niż odpowiedź obserwowana na podstawie ekspresji genu *VWF*, został uznany w niniejszej pracy jako użyteczny marker odpowiedzi komórek na stymulację przez PA. Największy i stopniowo zanikający w czasie inkubacji efekt obserwowano po 6 h obecności 200 μ M PA.

Wpływ PA w stężeniu 200 μ M na aktywację ścieżki sygnałowej NF- κ B potwierdzono także na podstawie zwiększenia zawartości białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 oraz aktywacji ekspresji genu kodującego TNF- α , co w efekcie potwierdza indukcję zmian prozapalnych. Natomiast wpływ PA na ekspresję genu *VWF* obserwowano również w obecności 100 μ M PA.

Według danych literaturowych NF- κ B może regulować ekspresję genu *VWF* zarówno pozytywnie jak i negatywnie [192,193]. Natomiast wykazano, że zwiększona w obecności 100 μ M PA ekspresja genu *VWF* jest związana z aktywacją ścieżki sygnałowej NF- κ B. Zastosowany inhibitor kardamonina całkowicie hamuje wpływ PA na zwiększoną ekspresję genu *VWF* (Rycina 32). Kardamonina jest chalkonem występującym naturalnie w roślinach należących do rodziny imbirowatych (*Alpinia*) o właściwościach przeciwzapalnych, działa poprzez zahamowanie aktywności NF- κ B [295,296]. W tym doświadczeniu zastosowano warunki, w których zaobserwowano w obecności PA zwiększony poziom ekspresji genu *VWF* (Rycina 10), a jednocześnie nie wykazano aktywacji NF- κ B, czyli 48 h inkubacji z 100 μ M PA. Obserwacja ta sugeruje regulację ekspresji genu *VWF* przez inny mechanizm niż aktywacja NF- κ B. Jednakże wykazany wpływ inhibitora NF- κ B wskazuje zdecydowanie na udział tej ścieżki sygnałowej w stymulacji ekspresji genu *VWF* przez PA. Powstaje zatem pytanie jak interpretować te z pozoru rozbieżne obserwacje.

NF- κ B p65 oraz I κ B α są związane z kanoniczną ścieżką sygnałową NF- κ B. Natomiast dane piśmiennictwa wskazują, że regulacja ekspresji genu *VWF* jest związana z alternatywną ścieżką NF- κ B, a szczególnie ekspresją genu *NF- κ B2* kodującego białko p100, będące prekursorem p52, oraz genu *RELB* [193]. Niekanoniczna ścieżka NF- κ B według dostępnych danych jest aktywowana specyficznie przez receptory należące do rodziny TNFRSF [297], chociaż jej aktywacja została zasugerowana również po stymulacji receptora TLR4 przez LPS [298,299]. Kanoniczna ścieżka związana z dimerem NF- κ B p50/p65 może regulować niekanoniczną ścieżkę p52/RelB pośrednio poprzez wpływ na ekspresję genu *RELB* [300]. Ponadto dane literaturowe wskazują na zwiększoną przez PA ekspresję genu *RELB* w makrofagach [301].

Na podstawie uzyskanych wyników oraz piśmiennictwa można wnioskować, że PA aktywuje ścieżkę sygnałową NF- κ B, ale to, która ze ścieżek, kanoniczna, czy alternatywna

jest związana ze zwiększoną przez PA ekspresją genu *VWF* wymaga dalszych badań. Ocena aktywacji NF- κ B metodą Western blot na podstawie ilości fosforylowanego NF- κ B p65 (Ser536) oraz I κ B α przedstawiona w niniejszej pracy wskazuje na aktywację ścieżki kanonicznej w warunkach inkubacji komórek z 200 μ M PA. Przy 100 μ M stężeniu PA aktywacja NF- κ B oceniana na podstawie powyższych markerów nie była potwierdzona. Nie można jednak wykluczyć niedostatecznej czułości metody Western blot. Odpowiedź na kardamoninę, chociaż wskazuje na udział NF- κ B, to nie daje precyzyjnej odpowiedzi, co do tego, czy aktywowana jest kanoniczna, czy alternatywna ścieżka, ze względu na małą specyficzność tego inhibitora.

Dodatkowa trudność interpretacyjna wynika z faktu, że jednym z mechanizmów negatywnej regulacji ścieżki sygnałowej NF- κ B jest aktywacja ekspresji genu kodującego I κ B α i zwiększenie ilości I κ B α , co może wpływać na obserwowaną zawartość białka i maskować jego degradację [157]. Ponadto, mimo że fosforylacja Ser536 NF- κ B p65 jest jedną z najczęściej badanych modyfikacji związanych z aktywacją NF- κ B, to nie jest absolutnie konieczna dla jego aktywacji, a nawet wykazano, że może je regulować negatywnie zapobiegając rozwojowi nadmiernej odpowiedzi [302]. A zatem fakt, że nie wykazano aktywacji NF- κ B na podstawie zawartości oraz fosforylacji badanych białek nie wyklucza, że może do niej dochodzić.

W celu szczegółowego wyjaśnienia obserwowanej pod wpływem PA zwiększonej ekspresji genu *VWF* należałoby zbadać również aktywację alternatywnej ścieżki NF- κ B, np. na podstawie zawartości białka p100, pełniącego funkcję jej inhibitora. Inną metodą, bardziej bezpośrednią, mogłoby być potwierdzenie przemieszczenia do jądra aktywujących ekspresję genów białek NF- κ B związanych z aktywacją ścieżki kanonicznej (p50/p65) oraz alternatywnej (p52/RelB) [303].

Kardamonina istotnie obniżała stymulujące działanie PA na ekspresję genu *TNF*, tak jak na ekspresję genu *VWF* (Rycina 33), co jest potwierdzeniem aktywacji ścieżki NF- κ B w aktywacji obu tych genów. Natomiast nie jest jasne który z możliwych receptorów uczestniczy w tej odpowiedzi [138]. Informacje pochodzące z piśmiennictwa wskazują udział zarówno TLR2, jak i TLR4 [140,195–207], ale dane te nie są do końca rozstrzygające.

W niniejszej pracy wykazano wpływ PA na ilość białka receptorów TLR2, TLR4, a także receptora TLR6, który tworzy dimery z TLR2 (Rycina 30). Zawartość białka TLR2 jest znacznie podniesiona pod wpływem PA stosowanego w stężeniu 200 μ M, co może wynikać z wpływu PA na poziom transkryptu *TLR2* [140]. Prawdopodobnie wynika to z regulacji ekspresji genu *TLR2* przez NF- κ B [304]. W przypadku TLR4 wykazano,

że po związaniu liganda dochodzi do internalizacji receptora, a następnie degradacji lizosomalnej [305]. Mechanizm ten może być związany z regulacją sygnału i ostatecznie odpowiedzi zapalnej. Także w przypadku heterodimeru TLR2/TLR6 aktywacja sygnału również może być związana z jego internalizacją, a proces ten jest zależny od koreceptora CD36 [306]. Obserwowane pod wpływem PA obniżenie ilości TLR4 i TLR6 mogłoby świadczyć o ich degradacji, potencjalnie na skutek aktywacji i internalizacji, a to mogłoby sugerować, że PA aktywuje receptor TLR4 oraz TLR6. Dane literaturowe potwierdzają dimeryzację w odpowiedzi na PA zarówno TLR2/TLR1, jak i TLR2/TLR6, a także TLR4 [307]. Co prawda autorzy cytowanej pracy stosowali komórki z nadekspresją tych receptorów, a zatem nie można wykluczyć, że ze względu na wysoką zawartość tych białek w komórkach dochodzi do „wymuszonej” dimeryzacji receptorów niezależnie od związania liganda. Dodatkowo jak wskazują dane piśmiennictwa możliwe jest także tworzenie heterodimeru TLR4/TLR6, co wymaga udziału CD36 jako koreceptora. Do tej pory zjawisko takie obserwowano jedynie w odpowiedzi na β -amyloid i ox-LDL [213,214]. W niniejszej pracy nie badano tworzenia heterodimerów TLR4/TLR6 w odpowiedzi na PA, ale zapewne byłoby to interesujące w kontekście mechanizmu molekularnego odpowiedzi komórek na PA.

Znacznie zwiększona zawartość TLR2 w komórkach traktowanych PA sugeruje, że w obecności liganda specyficznie aktywującego ten receptor może dochodzić do silniejszej odpowiedzi w skali komórki. W doświadczeniach prezentowanych w niniejszej pracy komórki inkubowano w obecności PA w warunkach, w których obserwowano zwiększony poziom białka TLR2, czyli po 48 h inkubacji z PA w stężeniu 200 μ M (Rycina 30), a następnie stymulowano peptydoglikanem, który jest specyficznym ligandem tego receptora [308]. Skutek takiego traktowania oceniano na podstawie wzrostu poziomu ekspresji genu *TNF*. We wcześniejszych doświadczeniach nie wykazano istotnego statystycznie wpływu PA na transkrypt genu *TNF* w stosowanych tu warunkach (Rycina 27). Zgodnie z oczekiwaniami peptydoglikan powoduje znaczne zwiększenie ekspresji genu *TNF* (Rycina 31). Natomiast w komórkach traktowanych PA efekt peptydoglikanu jest zdecydowanie mniejszy niż w komórkach kontrolnych z BSA. A zatem pod wpływem PA pomimo zwiększania ilości TLR2 komórki wykazują mniejszą wrażliwość na peptoglikan. Mimo, że obserwacja ta jest nieoczekiwana i trudna do interpretacji, to podobny fenomen został opisany dla różnych typów komórek: mikrogleju myszy, neuroblastoma oraz makrofagów inkubowanych z PA, a następnie traktowanych kwasem lipoteichojowym (LTA, ang. *lipoteichoic acid*), również będącym ligandem TLR2 [309]. Wydaje się zatem,

że w obecności PA, pomimo zwiększonej ilości białka TLR2, jego aktywacja obserwowana na podstawie transkrypcji *TNF* jest obniżona (Rycina 31).

Receptory TLR2 i TLR4 aktywują tą samą ścieżkę sygnałową, która może być negatywnie regulowana na skutek aktywacji jednego z nich, co jest znanym zjawiskiem [310]. Mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego może zapobiegać ostatecznie rozwojowi nadmiernej odpowiedzi zapalnej. Dodatkowo PA powoduje obniżenie zawartość białka TLR6 (Rycina 30), co może mieć ograniczający wpływ na powstawanie dimerów TLR2/TLR6 i dalsze przekazywanie sygnału, a więc być jednym z mechanizmów regulujących odpowiedź.

W celu ustalenia, który receptor z rodziny TLR jest aktywowany przez PA zastosowano inhibitory C29 i TAK-242 hamujące aktywność odpowiednio TLR2 i TLR4. Niestety nie udało się wykazać hamującego efektu tych inhibitorów na zwiększoną w obecności PA ekspresję genu *VWF*. Zwiększenie ekspresji genu *VWF* obserwowane w obecności PA, chociaż istotne statystycznie jest stosunkowo małe. Dodatkowo przedłużona inkubacja z tymi inhibitorami, a zwłaszcza zwiększanie ich stężenia dla uzyskania efektu w obecności PA prowadziło do obniżenia przeżywalności komórek.

Natomiast receptor specyficznie aktywowany przez PA wskazano na podstawie zmiany ekspresji genu *TNF*, co ze względu na znacznie silniejszą odpowiedź jest łatwiejsze do śledzenia. Wykazano, że inhibitor TLR4 istotnie hamuje efekt PA na zwiększoną ilość transkryptu *TNF* (Rycina 33). Wynik ten wskazuje, że w komórkach HUVEC PA jest ligandem TLR4.

5.3. Kompensacyjny efekt pomiędzy TLR2 i TLR4

Nieoczekiwanie, doświadczenia wykonane z inhibitorami receptorów TLR dostarczyły kilku zaskakujących obserwacji, niezwiązanych wprost z wpływem PA. Wykazano, że inhibitor TLR2 (C29) istotnie zwiększa ekspresję genu *TNF* niezależnie od obecności PA aktywującego receptor TLR4 (Rycina 33). Co więcej, efekt ten jest całkowicie hamowany przez inhibitor TLR4. C29 jest specyficznym inhibitorem TLR2, wiążącym się z jego domeną TIR. Dotychczas nie opisano jego wpływu na aktywność TLR4 lub poziom mRNA genu *TNF* [311,312]. Natomiast uzyskane wyniki po raz pierwszy sugerują, że w warunkach zahamowania aktywności TLR2 przez inhibitor dochodzi do kompensacyjnej aktywacji TLR4, obserwowanej na podstawie zmian ekspresji genu *TNF*.

Podobne zjawisko zwiększonej odpowiedzi prozapalnej było obserwowane u myszy pozbawionych TLR2, które w okresie prenatalnym były ekspozowane na LPS,

będący ligandem TLR4, a więc w przypadku aktywacji receptora [313]. Oprócz zwiększonej ekspresji genu *TNF* i *TLR4*, Cao i wsp. [313] wykazali, że efekt dotyczy również genów kodujących białka związane z przekazywaniem sygnału od TLR, w tym MyD88 i TRAF6, oraz zasugerowali kompensacyjny efekt pomiędzy receptorami TLR2 i TLR4. Natomiast wykazany w niniejszej pracy efekt jest niezależny od aktywacji receptora TLR4 przez PA, ponieważ występuje również w komórkach kontrolnych inkubowanych z BSA.

Ścieżka związana z aktywacją odpowiedzi zapalnej przez NF- κ B jest zależna od białka adaptorowego MyD88. Dodatkowo w przypadku TLR2 i TLR4 oddziaływanie z MyD88 zachodzi za pośrednictwem TIRAP. W niektórych przypadkach konieczne jest również oddziaływanie z koreceptorami. W przypadku TLR2 i TLR4 szczególnie istotnym koreceptorem wydaje się białko CD36.

CD36 występuje w różnych typach komórek i pełni różne funkcje w zależności od wiązanego liganda oraz oddziaływania z innymi receptorami, ale także jest transporterem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA, ang. *long-chain fatty acids*). Transport LCFA wydaje się ważny zwłaszcza w przypadku komórek tłuszczowych i mięśniowych.

W przypadku komórek śródbłónka białko CD36 odgrywa ważną rolę w kapilarach w transporcie krążących LCFA do tkanek docelowych. Występowanie białka CD36 wykazuje zróżnicowanie w zależności od typu naczyń krwionośnych. Jest związane z małymi naczyniami i kapilarami, w których transport składników odżywczych z osocza jest szczególnie istotny [314]. W komórkach śródbłónka głównym procesem energetycznym jest glikoliza, a wytwarzanie ATP jedynie w niewielkim stopniu związana jest z utlenianiem FA [315]. Co ciekawe, w porównaniu do komórek śródbłónka mikronaczyń MVEC (ang. *microvascular endothelial cells*), w komórkach HUVEC nie wykazano obecności białka CD36 na powierzchni komórek [316].

CD36 nie zawiera domeny, która mogłaby uczestniczyć w przekazywaniu sygnału [317]. Natomiast wiązanie liganda przez CD36 może aktywować odpowiedź poprzez oddziaływanie z innymi białkami, za pośrednictwem których dochodzi do przekazywania sygnału, w tym m.in. TLR2, TLR4, TLR6 [214,318,319]. Z drugiej strony CD36 jest istotne również w przekazywaniu sygnału od TLR2 oraz TLR4 [208–212]. Ponadto opisano powstawanie kompleksu CD36 z TLR4 oraz TLR6, co prawda jak wspomniano wcześniej, jedynie w odpowiedzi na ox-LDL oraz β -amyloid [214]. Dane dotyczące białka CD36 oraz receptorów TLR2 lub TLR4 sugerują, że mogą one funkcjonować w postaci kompleksów w tratwach lipidowych, a w przypadku związania liganda przez jedno z tych białek, może dochodzić do ich wzajemnej aktywacji [211]. W przypadku aktywacji odpowiedzi

na PA udział CD36 wykazano w makrofagach [211], natomiast w komórkach śródbłonnka go nie potwierdzono [140], w związku z czym CD36 nie był rozpatrywany w tej pracy jako potencjalny receptor aktywowany przez PA.

W celu ustalenia mechanizmu odpowiedzialnego za spowodowaną zahamowaniem TLR2 zwiększoną aktywność TLR4 obserwowaną na podstawie zwiększonej ekspresji genu *TNF* (Rycina 33), zbadano poziom ekspresji genów kodujących wybrane białka związane z przekazywaniem sygnału TLR. C29 zwiększa ekspresję genu *TLR4*, a efekt ten jest niezależny od PA (Rycina 35), co potwierdza zaobserwowaną wcześniej w obecności tego inhibitora zwiększoną zawartość białka TLR4 (Rycina 34). Ta zmiana może być przynajmniej w pewnym stopniu odpowiedzialna za zwiększoną aktywność TLR4. Natomiast nie wykazano innego wpływu C29, np. na ekspresję genów kodujących białka adaptorowe, który sugerowałby dodatkowy mechanizm wyjaśniający tę obserwację.

Stwierdzona w obecności PA zwiększona ekspresja *TLR2* na poziomie transkryptu (Rycina 35) jest spójna ze znaczącym zwiększeniem zawartości białka zaobserwowanym po dłuższej inkubacji (Rycina 30), a także zgodna z danymi literaturowymi [140]. Natomiast nie wykazano w tym przypadku hamującego efektu inhibitora TLR4. Jest to o tyle nieoczekiwane, że w tych samych warunkach doświadczalnych wykazano hamujący efekt TAK-242 na zwiększony w obecności PA poziom ekspresji genu *TNF* (Rycina 33).

Ponadto w obecności inhibitora TLR4 oraz PA zwiększona jest ekspresja genów *CD36*, *TLR6* i *TIRAP* (Rycina 35), a więc kodujących białka, które mogą bezpośrednio uczestniczyć w przekazywaniu sygnału od TLR4. Potencjalnie mogłoby to umożliwić przekazywanie sygnału i odpowiedź na aktywację receptora pomimo częściowego obniżenia jego aktywności. W literaturze brak jest danych dotyczących wpływu inhibitora TLR4, które mogłyby wzmocnić tę obserwację. Mechanizm działania TAK-242 wynika z blokowania oddziaływania domeny TIR receptora TLR4 z białkami adaptorowymi TIRAP oraz TRAM, związanymi ze ścieżkami sygnałowymi zależnymi odpowiednio od MyD-88 oraz TRIF [320]. W tym przypadku jedną z możliwości wydaje się tworzenie kompleksu TLR4 z TLR6 oraz CD36. Ponadto zwiększenie ekspresji genu kodującego białko adaptorowe TIRAP, znajdującego się dalej w ścieżce przekazywania sygnału, może kompensować efekt zahamowania przekazywania sygnału od TLR4. Nadekspresja genów kodujących białka adaptorowe, w tym TIRAP, powoduje aktywację ścieżki sygnałowej NF-κB [321]. Dodatkowo fakt, że w niniejszej pracy hamujący przekazywanie sygnału od TLR4 efekt TAK-242 zdaje się być selektywny, ponieważ dotyczy tylko ekspresji genu *TNF*, a nie wykazano go w stosunku do zwiększonej ekspresji *VWF* i *TLR2*, wydaje się potwierdzać

przynajmniej częściowe przekazywanie sygnału. Przedstawiony wynik dotyczy ilości mRNA i należałoby to potwierdzić również na poziomie białka. Być może niezależnie od faktu, że inhibitor blokuje przekazywanie sygnału poprzez hamowanie oddziaływania receptora w domenie TIR, dodatkowo może wpływać na oddziaływanie receptora z innymi białkami lub zwiększenie aktywności białek znajdujących się dalej w kaskadzie przekazywania sygnału. Wyjaśnienie tego zjawiska może to być interesującym kierunkiem dalszych badań, szczególnie w kontekście terapeutycznego zastosowania inhibitorów TLR. Działanie TAK-242 wykazano wcześniej w prowadzonych *in vitro* i *in vivo* badaniach nad sepsą [322-326], reumatoidalnym zapaleniem stawów [327], zaburzeniami sercowo-naczyniowych i dysfunkcją nerek [328], ostrą niewydolnością wątroby [329], zaburzeniami neurodegeneracyjnymi [330], chorobą Alzheimera [331] oraz urazowym uszkodzeniem mózgu [332]. Mimo że w badaniu klinicznym TAK-242 był dobrze tolerowany, to nie wykazano jego istotnej skuteczności w leczeniu sepsy [333].

Wyciszanie ekspresji genu przy pomocy siRNA pokazało, że obniżeniu zawartości białka TLR2 towarzyszy zwiększenie zawartości białka TLR4 (Rycina 36). Sugeruje to istnienie mechanizmu kompensacji między wymienionymi białkami. Podobnie w komórkach z wyciszonym genem TLR4 obserwowano zwiększenie poziomu białka TLR2. Co ciekawe, podobny rezultat obserwowano również, gdy wyciszenie genu TLR4 jest efektywne jedynie na poziomie mRNA (Rycina 39), a nie obserwowano skutków wyciszenia na poziomie zawartości białka TLR4 (Rycina 36 i Rycina 37). Zastosowanie dwóch rodzajów siRNA specyficznych wobec TLR4 pozwoliło na bardziej efektywne wyciszenie syntezy białka (Rycina 37) i było związane ze znacznie większym wzrostem zawartości białka TLR2 niż przy wyciszaniu TLR4 tylko jednym rodzajem siRNA. Wzrost poziomu mRNA *TLR2* w tych warunkach był nieznaczący (Rycina 39). Dlatego wydaje się, że nawet kilkudziesięciokrotnie podwyższona zawartość białka TLR2, raczej nie wynika z aktywacji transkrypcji, a być może odpowiadają za to inne mechanizmy. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

W regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym uczestniczą m.in. cząsteczki miRNA oraz białka wiążące RNA (RBP, ang. *RNA binding proteins*) rozpoznające sekwencje bogate w reszty adeniny i uracylu (ARE, ang. *AU-rich elements*) w rejonie mRNA nieulegającym translacji 3'UTR (ang. *untranslated regions*). Zarówno miRNA, jak i niektóre RBP, mogą powodować obniżenie translacji oraz degradację docelowego mRNA [334]. Udział zarówno aktywacji TLR w regulacji miRNA, jak i udział miRNA w regulacji ekspresji białek związanych z kaskadą sygnałową TLR,

w tym bezpośrednio TLR, ale także białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału, czynników transkrypcyjnych, cytokin prozapalnych został już opisany w piśmiennictwie [335].

Białko HUR (ang. *human antigen R*) nazywane również ELAVL1 (ang. *embryonic lethal vision-like protein 1*) jest jednym z RBP stabilizującym mRNA oraz sprzyjającym translacji. Wśród sekwencji nukleotydowych mRNA rozpoznawanych przez ELAVL1 zidentyfikowano związane z aktywacją ścieżki sygnałowej NF- κ B oraz TLR, w tym również genów *TLR2* i *TLR4* [336]. Wydaje się zatem możliwe, że w sytuacji obniżonego poziomu mRNA *TLR4*, obserwowanego w wyniku wyciszenia, może dochodzić do zwiększonego wiązania i stabilizacji mRNA *TLR2* przez ELAVL1, co następnie jest związane ze zwiększoną translacją zaobserwowaną na podstawie zwiększonego poziomu białka TLR2. Zaproponowany potencjalny mechanizm mógłby wyjaśniać regulację pomiędzy TLR2 i TLR4 zaobserwowaną po wyciszeniu genu.

W niniejszej rozprawie po raz pierwszy pokazano istnienie zjawiska kompensacji pomiędzy TLR2 a TLR4 na podstawie różnych poziomów regulacji: aktywności (Rycina 33), mRNA oraz białka (Rycina 36 i Rycina 37). Podobne zjawisko zostało zaobserwowane także na poziomie genetycznym u myszy pozbawionych TLR2 lub TLR4 [313,337]. Natomiast wyniki niniejszej pracy wskazują na występowanie bardziej wrażliwej regulacji pomiędzy TLR2 i TLR4. Wyjaśnienie podstaw biochemicznych tych efektów wymaga dalszych badań.

Dane literaturowe potwierdzające występowanie efektu kompensacyjnego pomiędzy receptorami TLR2 i TLR4 są bardzo ograniczone. Konsekwencją kompensacji pomiędzy ścieżkami sygnałowymi jest zwiększona aktywność szlaku sygnałowego zastępującego ten o obniżonej aktywności, co może powodować zaburzenia odpowiedzi prozapalnej. Chociaż w niniejszej pracy ograniczono się do TLR, to omówione mechanizmy mogą także dotyczyć różnych receptorów PRRs związanych z odpowiedzią układu odpornościowego [338].

6. Podsumowanie i wnioski końcowe

Podsumowując, w niniejszej pracy badano wpływ PA na komórki śródbłónka w warunkach, w których dochodzi do zwiększenia zawartości białek adhezyjnych, ale nie obserwuje się obniżenia przeżywalności komórek:

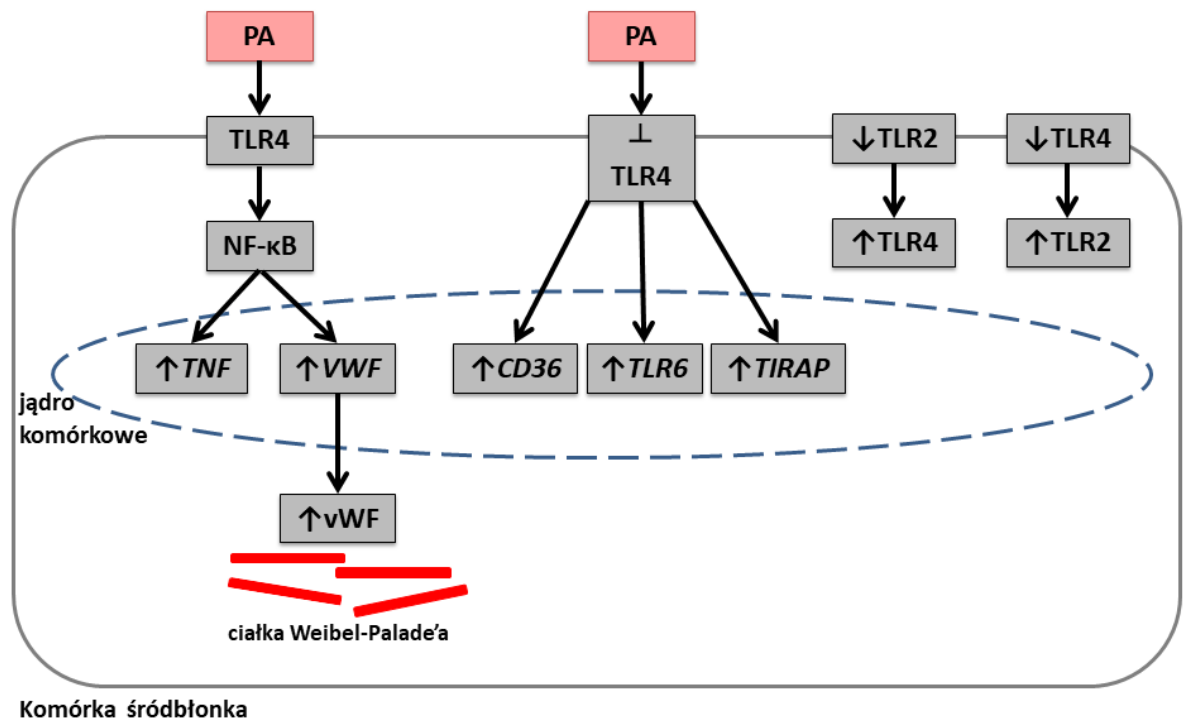
1. Wykazano, że PA zwiększa wydzielanie vWF, co wynika ze zwiększonej ekspresji genu *VWF* i przyspieszonego dojrzewania białka vWF.
2. Wykazano udział ścieżki sygnałowej NF- κ B w aktywacji ekspresji genu *VWF* w obecności PA.
3. Potwierdzono udział TLR4 w aktywacji ekspresji genu *TNF* w obecności PA.

Dodatkowo:

4. Wykazano, że zahamowanie aktywności TLR2 za pomocą inhibitora C29 zwiększa aktywność TLR4.
5. Wykazano, że w warunkach zahamowania aktywności TLR4 i obecności PA dochodzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących białka związane ze szlakiem sygnałowym TLR.
6. Posługując się techniką wyciszania genów siRNA wykazano występowanie efektu kompensacyjnego między TLR2 i TLR4.

Najważniejsze wyniki pracy przedstawiono schematycznie na Rycinie 40.

A zatem, zwiększenie wytwarzania i wydzielania vWF przez komórki HUVEC następuje już w wyniku stosunkowo łagodnego traktowania komórek PA. To sugeruje, że PA może mieć istotne znaczenie w regulacji hemostazy już w niskim stężeniu, nieznacznie odbiegającym od normy. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, prowadząca do zwiększenia wytwarzania vWF pod wpływem PA, jest przynajmniej częściowo związana z aktywacją receptora TLR4. Pomiędzy receptorami TLR2 i TLR4 występuje zjawisko kompensacji.



Rycina 40. Schematyczne przedstawienie najważniejszych wyników pracy. PA aktywuje receptor TLR4, czego wynikiem jest aktywacja ścieżki sygnałowej NF-κB, a w konsekwencji zwiększeniem ekspresji genów *TNF* i *VWF*. Dochodzi do przyspieszenia procesu dojrzewania białka vWF, przez co większa ilość dojrzałego vWF jest magazynowana w WPBs, co przekłada się na jego wydzielanie w większej ilości. PA w obecności inhibitora TLR4 powoduje zwiększenie ekspresji genów *CD36*, *TLR6*, *TIRAP*, co może mieć wpływ na przekazywanie sygnału. Pomędzy receptorami TLR2 i TLR4 występuje efekt kompensacji, co wykazano na podstawie aktywności oraz ilości mRNA i białka.

Bibliografia

- [1] Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung, Vascular Endothelial Cell Biology: An Update, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>.
- [2] W.C. Aird, Endothelial Cell Heterogeneity, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a006429–a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>.
- [3] M.S. Thomsen, L.J. Routhe, T. Moos, The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37 (2017) 3300–3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>.
- [4] A.C. Mutgan, K. Jandl, G. Kwapiszewska, Endothelial Basement Membrane Components and Their Products, Matrikines: Active Drivers of Pulmonary Hypertension?, *Cells* 9 (2020) 2029. <https://doi.org/10.3390/cells9092029>.
- [5] X. Cong, W. Kong, Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease, *Cell. Signal.* 66 (2020) 109485. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109485>.
- [6] T. Okamoto, K. Suzuki, The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell–Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2254. <https://doi.org/10.3390/ijms18112254>.
- [7] H.S. Bennett, J.H. Luft, J.C. Hampton, Morphological classifications of vertebrate blood capillaries, *Am. J. Physiol.-Leg. Content* 196 (1959) 381–390. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1959.196.2.381>.
- [8] M. Félétou, *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*, Morgan & Claypool Life Sciences Publishers, 2011.
- [9] J. Gao, X. Pan, G. Li, E. Chatterjee, J. Xiao, Physical Exercise Protects Against Endothelial Dysfunction in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *J Cardiovasc. Transl. Res.* 15 (2022) 604–620. <https://doi.org/10.1007/s12265-021-10171-3>.
- [10] H. Yatsuya, Y. Li, E.H. Hilawe, A. Ota, C. Wang, C. Chiang, Y. Zhang, M. Uemura, A. Osako, Y. Ozaki, A. Aoyama, Global Trend in Overweight and Obesity and Its Association With Cardiovascular Disease Incidence, *Circ. J.* 78 (2014) 2807–2818. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-0850>.
- [11] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A.J. Scheen, N. Paquot, Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 105 (2014) 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>.
- [12] E.P. Williams, M. Mesidor, K. Winters, P.M. Dubbert, S.B. Wyatt, Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem, *Curr. Obes. Rep.* 4 (2015) 363–370. <https://doi.org/10.1007/s13679-015-0169-4>.
- [13] C.M. Apovian, Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden, *Am. J. Manag. Care* 22 (2016) s176–185.
- [14] K. Sánchez-Alegría, C. Arias, Functional consequences of brain exposure to saturated fatty acids: From energy metabolism and insulin resistance to neuronal damage, *Endocrinol. Diabetes Metab.* 6 (2023) e386. <https://doi.org/10.1002/edm2.386>.
- [15] A. Engin, The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome, in: A.B. Engin, A. Engin (Eds.), *Obes. Lipotoxicity*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1.
- [16] G. Ricci, D. Tomassoni, I. Pirillo, A. Sirignano, M. Sciotti, S. Zaami, I. Grappasonni, Obesity in the European region: social aspects, epidemiology and preventive strategies, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 6930–6939. https://doi.org/10.26355/eurrev_201810_16163.

- [17] M. Kajikawa, Y. Higashi, Obesity and Endothelial Function, *Biomedicines* 10 (2022) 1745. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071745>.
- [18] I.K. Kwaifa, H. Bahari, Y.K. Yong, S.M. Noor, Endothelial Dysfunction in Obesity-Induced Inflammation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications, *Biomolecules* 10 (2020) 291. <https://doi.org/10.3390/biom10020291>.
- [19] A. Mengozzi, S. Masi, A. Viridis, Obesity-Related Endothelial Dysfunction: moving from classical to emerging mechanisms, *Endocr. Metab. Sci.* 1 (2020) 100063. <https://doi.org/10.1016/j.endmts.2020.100063>.
- [20] A. Engin, Endothelial Dysfunction in Obesity, in: A.B. Engin, A. Engin (Eds.), *Obes. Lipotoxicity*, Springer International Publishing, Cham, 2017: pp. 345–379. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_15.
- [21] A. Viridis, Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation, *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* 23 (2016) 83–85. <https://doi.org/10.1007/s40292-016-0133-8>.
- [22] C.M. Sena, F. Carrilho, R.M. Seica, Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Targeting Inflammation, in: H. Lenasi (Ed.), *Endothel. Dysfunct. - Old Concepts New Chall.*, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76994>.
- [23] S.L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, B.E. Sawaya, Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview, *J. Interferon Cytokine Res.* 29 (2009) 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.
- [24] K. Jarząbek, A. Sobczyk, W. Sobczyk, K. Łabuzek, D. Belowski, B. Gabryel, Koncepcja niestabilnej blaszki miażdżycowej i farmakologiczne strategie terapeutyczne, *Chir. Pol.* 17 (2015) 49–68.
- [25] A. Mulhem, Y. Moulla, N. Klöting, T. Ebert, A. Tönjes, M. Fasshauer, A. Dietrich, M.R. Schön, M. Stumvoll, V. Richter, M. Blüher, Circulating cell adhesion molecules in metabolically healthy obesity, *Int. J. Obes.* 45 (2021) 331–336. <https://doi.org/10.1038/s41366-020-00667-4>.
- [26] M. Liu, P. Wang, P. Xie, X. Xu, L. He, X. Chen, S. Zhang, Y. Lin, Y. Huang, W. Xia, L. Wang, X. Liao, Y. Guo, X. Zhuang, Expression of ICAM-1 and E-selectin in different metabolic obesity phenotypes: discrepancy for endothelial dysfunction, *J. Endocrinol. Invest.* 46 (2023) 2379–2389. <https://doi.org/10.1007/s40618-023-02094-4>.
- [27] C. Ferri, G. Desideri, M. Valenti, C. Bellini, M. Pasin, A. Santucci, Giancarlo De Mattia, Early Upregulation of Endothelial Adhesion Molecules in Obese Hypertensive Men, *Hypertension* 34 (1999) 568–573. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.34.4.568>.
- [28] N.A. Widjaja, L.A. Caesar, S. Nova, E. Ardianah, Beyond the Scale: Investigating Adiponectin, ICAM-1, and VCAM-1 as Metabolic Markers in Obese Adolescents with Metabolic Syndrome, *J. Obes.* 2023 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2023/4574042>.
- [29] D. Das, N.R. Shruthi, A. Banerjee, G. Jothimani, A.K. Duttaroy, S. Pathak, Endothelial dysfunction, platelet hyperactivity, hypertension, and the metabolic syndrome: molecular insights and combating strategies, *Front. Nutr.* 10 (2023) 1221438. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1221438>.
- [30] E. Galkina, K. Ley, Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 2292–2301. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149179>.
- [31] R. Kaur, V. Singh, P. Kumari, R. Singh, H. Chopra, T.B. Emran, Novel insights on the role of VCAM-1 and ICAM-1: Potential biomarkers for cardiovascular diseases, *Ann. Med. Surg.* 84 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104802>.
- [32] L. Rusu, R.D. Minshall, Endothelial Cell von Willebrand Factor Secretion in Health and Cardiovascular Disease, in: H. Lenasi (Ed.), *Endothel. Dysfunct. - Old Concepts New Chall.*, InTech, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74029>.

- [33] S. Kozlov, S. Okhota, Y. Avtaeva, I. Melnikov, E. Matroze, Z. Gabbasov, Von Willebrand factor in diagnostics and treatment of cardiovascular disease: Recent advances and prospects, *Front. Cardiovasc. Med.* 9 (2022) 1038030. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1038030>.
- [34] K. Amaihunwa, E.A. Etim, E. Osime, Z.A. Jeremiah, Effect of Obesity on Soluble Vascular Cell–Adhesion Molecules, Fibrinogen, and von Willebrand Factor Antigen among Obese People in Sapele, Southern Nigeria, *Pathol. Lab. Med. Int. Volume 13* (2021) 21–26. <https://doi.org/10.2147/PLMI.S328891>.
- [35] A.D. Blann, D. Bushell, A. Davies, E.B. Faragher, J.P. Miller, C.N. McCollum, von Willebrand factor, the endothelium and obesity, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 17 (1993) 723–725.
- [36] M.E. Carter Febres, M.E. Fenchel, J. Pomales, C. Tarango, E.S. Mullins, Obesity and Race As Determinates of Plasma Von Willebrand and Factor VIII Levels, *Blood* 140 (2022) 5593–5594. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-169407>.
- [37] A. Michels, C.N. Dwyer, J. Mewburn, K. Nesbitt, C. Kawecki, P. Lenting, L.L. Swystun, D. Lillicrap, von Willebrand Factor Is a Critical Mediator of Deep Vein Thrombosis in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40 (2020) 2860–2874. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314690>.
- [38] S. Urazgildeeva, I. Shugurova, L. Vasina, M. Muzalevskaya, E. Baranova, V. Shurygina, V. Gurevich, N. Perepech, Obesity and elevated levels of von Willebrand factor in patients with hypertension and early coronary atherosclerosis, *J. Hypertens.* 39 (2021) e336. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000748400.54415.fb>.
- [39] D.S. Frankel, J.B. Meigs, J.M. Massaro, P.W.F. Wilson, C.J. O'Donnell, R.B. D'Agostino, G.H. Tofler, Von Willebrand Factor, Type 2 Diabetes Mellitus, and Risk of Cardiovascular Disease: The Framingham Offspring Study, *Circulation* 118 (2008) 2533–2539. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.792986>.
- [40] X. Peng, X. Wang, M. Fan, J. Zhao, L. Lin, J. Liu, Plasma levels of von Willebrand factor in type 2 diabetes patients with and without cardiovascular diseases: A meta-analysis, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 36 (2020) e3193. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3193>.
- [41] K. Neubauer, B. Zieger, Endothelial cells and coagulation, *Cell Tissue Res.* 387 (2022) 391–398. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03471-2>.
- [42] M.H. Periyah, A.S. Halim, A.Z. Mat Saad, Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis, *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.* 11 (2017) 319–327.
- [43] S.-H. Yun, E.-H. Sim, R.-Y. Goh, J.-I. Park, J.-Y. Han, Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers, *BioMed Res. Int.* 2016 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.1155/2016/9060143>.
- [44] J.A.D. De Pablo-Moreno, L.J. Serrano, L. Revuelta, M.J. Sánchez, A. Liras, The Vascular Endothelium and Coagulation: Homeostasis, Disease, and Treatment, with a Focus on the Von Willebrand Factor and Factors VIII and V, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 8283. <https://doi.org/10.3390/ijms23158283>.
- [45] P.J. Lenting, O.D. Christophe, C.V. Denis, von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends, *Blood* 125 (2015) 2019–2028. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-528406>.
- [46] V. Terraube, J.S. O'Donnell, P.V. Jenkins, Factor VIII and von Willebrand factor interaction: biological, clinical and therapeutic importance, *Haemophilia* 16 (2010) 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2009.02005.x>.
- [47] D.J. Mancuso, E.A. Tuley, L.A. Westfield, N.K. Worrall, B.B. Shelton-Inloes, J.M. Sorace, Y.G. Alevy, J.E. Sadler, Structure of the gene for human von Willebrand

- factor*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 19514–19527. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47144-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47144-5).
- [48] S.J. Yasar, O. Abdullah, W. Fay, S. Balla, Von Willebrand factor revisited, J. Intervent. Cardiol. 31 (2018) 360–367. <https://doi.org/10.1111/joic.12478>.
 - [49] S.L. Haberichter, von Willebrand factor propeptide: biology and clinical utility, Blood 126 (2015) 1753–1761. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-512731>.
 - [50] Md.I. Hassan, A. Saxena, F. Ahmad, Structure and function of von Willebrand factor, Blood Coagul. Fibrinolysis 23 (2012) 11–22. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834cb35d>.
 - [51] M. Brehm, Von Willebrand factor processing, Hämostaseologie 37 (2017) 59–72. <https://doi.org/10.5482/HAMO-16-06-0018>.
 - [52] S.E. Shapiro, A.A. Nowak, C. Wooding, G. Birdsey, M.A. Laffan, T.A.J. McKinnon, The von Willebrand factor predicted unpaired cysteines are essential for secretion, J. Thromb. Haemost. 12 (2014) 246–254. <https://doi.org/10.1111/jth.12466>.
 - [53] T.N. Mayadas, D.D. Wagner, Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly., Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (1992) 3531–3535. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3531>.
 - [54] A.R. Purvis, J.E. Sadler, A Covalent Oxidoreductase Intermediate in Propeptide-dependent von Willebrand Factor Multimerization, J. Biol. Chem. 279 (2004) 49982–49988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408727200>.
 - [55] J.E. Sadler, von Willebrand factor assembly and secretion, J. Thromb. Haemost. 7 (2009) 24–27. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03375.x>.
 - [56] L.T. Dang, A.R. Purvis, R.-H. Huang, L.A. Westfield, J.E. Sadler, Phylogenetic and Functional Analysis of Histidine Residues Essential for pH-dependent Multimerization of von Willebrand Factor, J. Biol. Chem. 286 (2011) 25763–25769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.249151>.
 - [57] A. Rehemtulla, R. Kaufman, Preferred sequence requirements for cleavage of pro-von Willebrand factor by propeptide-processing enzymes, Blood 79 (1992) 2349–2355. <https://doi.org/10.1182/blood.V79.9.2349.2349>.
 - [58] R.J. Wise, P.J. Barr, P.A. Wong, M.C. Kiefer, A.J. Brake, R.J. Kaufman, Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site., Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 9378–9382. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.23.9378>.
 - [59] S.R. Madabhushi, C. Shang, K.M. Dayananda, K. Rittenhouse-Olson, M. Murphy, T.E. Ryan, R.R. Montgomery, S. Neelamegham, von Willebrand factor (VWF) propeptide binding to VWF D'D3 domain attenuates platelet activation and adhesion, Blood 119 (2012) 4769–4778. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387548>.
 - [60] U. Vischer, D. Wagner, von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies, Blood 83 (1994) 3536–3544. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.12.3536.3536>.
 - [61] P. Chen, F. Kutzki, A. Mojzisch, B. Simon, E.-R. Xu, C. Aponte-Santamaría, K. Horny, C. Jeffries, R. Schneppenheim, M. Wilmanns, M.A. Brehm, F. Gräter, J. Hennig, Structure and dynamics of the von Willebrand Factor C6 domain, J. Struct. Biol. 214 (2022) 107923. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107923>.
 - [62] Y.-F. Zhou, E.T. Eng, J. Zhu, C. Lu, T. Walz, T.A. Springer, Sequence and structure relationships within von Willebrand factor, Blood 120 (2012) 449–458. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405134>.
 - [63] J.J. Dumas, R. Kumar, T. McDonagh, F. Sullivan, M.L. Stahl, W.S. Somers, L. Mosyak, Crystal Structure of the Wild-type von Willebrand Factor A1-Glycoprotein Iba Complex Reveals Conformation Differences with a Complex Bearing von

- Willebrand Disease Mutations, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 23327–23334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401659200>.
- [64] E.-R. Xu, S. Von Bülow, P.-C. Chen, P.J. Lenting, K. Kolšek, C. Aponte-Santamaría, B. Simon, J. Foot, T. Obser, R. Schneppenheim, F. Gräter, C.V. Denis, M. Wilmanns, J. Hennig, Structure and dynamics of the platelet integrin-binding C4 domain of von Willebrand factor, *Blood* 133 (2019) 366–376. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-843615>.
- [65] X. Zhang, K. Halvorsen, C.-Z. Zhang, W.P. Wong, T.A. Springer, Mechanoenzymatic Cleavage of the Ultralarge Vascular Protein von Willebrand Factor, *Science* 324 (2009) 1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.1170905>.
- [66] S.L. Haberichter, E.P. Merricks, S.A. Fahs, P.A. Christopherson, T.C. Nichols, R.R. Montgomery, Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells, *Blood* 105 (2005) 145–152. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0464>.
- [67] G. Michaux, K.B. Abbitt, L.M. Collinson, S.L. Haberichter, K.E. Norman, D.F. Cutler, The Physiological Function of von Willebrand’s Factor Depends on Its Tubular Storage in Endothelial Weibel-Palade Bodies, *Dev. Cell* 10 (2006) 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.012>.
- [68] V. Gerke, von Willebrand factor folds into a bouquet: von Willebrand factor folds into a bouquet, *EMBO J.* 30 (2011) 3880–3881. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.321>.
- [69] V. Babich, A. Meli, L. Knipe, J.E. Dempster, P. Skehel, M.J. Hannah, T. Carter, Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss, *Blood* 111 (2008) 5282–5290. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-113746>.
- [70] L. Knipe, A. Meli, L. Hewlett, R. Bierings, J. Dempster, P. Skehel, M.J. Hannah, T. Carter, A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells, *Blood* 116 (2010) 2183–2191. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-276170>.
- [71] J. Pan, T.T. Dinh, A. Rajaraman, M. Lee, A. Scholz, C.J. Czapalla, H. Kiefel, L. Zhu, L. Xia, J. Morser, H. Jiang, L. Santambrogio, E.C. Butcher, Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo, *Blood* 128 (2016) 104–109. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-684688>.
- [72] D. Van Breevoort, E.L. Van Agtmaal, B.S. Dragt, J.K. Gebbinck, I. Dienava-Verdoold, A. Kragt, R. Bierings, A.J.G. Horrevoets, K.M. Valentijn, J.C. Eikenboom, M. Fernandez-Borja, A.B. Meijer, J. Voorberg, Proteomic Screen Identifies IGFBP7 as a Novel Component of Endothelial Cell-Specific Weibel-Palade Bodies, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 2925–2936. <https://doi.org/10.1021/pr300010r>.
- [73] U. Fiedler, M. Scharpfenecker, S. Koidl, A. Hegen, V. Grunow, J.M. Schmidt, W. Kriz, G. Thurston, H.G. Augustin, The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies, *Blood* 103 (2004) 4150–4156. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3685>.
- [74] J.P. Giblin, L.J. Hewlett, M.J. Hannah, Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells, *Blood* 112 (2008) 957–964. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-130740>.
- [75] T. Kobayashi, U.M. Vischer, C. Rosnoblet, C. Lebrand, M. Lindsay, R.G. Parton, E.K.O. Kruithof, J. Gruenberg, The Tetraspanin CD63/lamp3 Cycles between Endocytic and Secretory Compartments in Human Endothelial Cells, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 1829–1843. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1829>.
- [76] M. Mourik, J. Eikenboom, Lifecycle of Weibel-Palade bodies, *Hämostaseologie* 37 (2017) 13–24. <https://doi.org/10.5482/HAMO-16-07-0021>.

- [77] M. Schillemans, E. Karampini, M. Kat, R. Bierings, Exocytosis of Weibel–Palade bodies: how to unpack a vascular emergency kit, *J. Thromb. Haemost.* 17 (2019) 6–18. <https://doi.org/10.1111/jth.14322>.
- [78] K.J. Harrison-Lavoie, G. Michaux, L. Hewlett, J. Kaur, M.J. Hannah, W.W.Y. Lui-Roberts, K.E. Norman, D.F. Cutler, P-Selectin and CD63 Use Different Mechanisms for Delivery to Weibel–Palade Bodies, *Traffic* 7 (2006) 647–662. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00415.x>.
- [79] G. Michaux, T.J. Pullen, S.L. Haberichter, D.F. Cutler, P-selectin binds to the D'-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies, *Blood* 107 (2006) 3922–3924. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3635>.
- [80] E.L. Doyle, V. Ridger, F. Ferraro, M. Turmaine, P. Saftig, D.F. Cutler, CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin, *Blood* 118 (2011) 4265–4273. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-321489>.
- [81] M. Poeter, I. Brandherm, J. Rossaint, G. Rosso, V. Shahin, B.V. Skryabin, A. Zarbock, V. Gerke, U. Rescher, Annexin A8 controls leukocyte recruitment to activated endothelial cells via cell surface delivery of CD63, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3738. <https://doi.org/10.1038/ncomms4738>.
- [82] M. Erent, A. Meli, N. Moiso, V. Babich, M.J. Hannah, P. Skehel, L. Knipe, G. Zupančič, D. Ogden, T. Carter, Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel–Palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells, *J. Physiol.* 583 (2007) 195–212. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.132993>.
- [83] R.-H. Huang, Y. Wang, R. Roth, X. Yu, A.R. Purvis, J.E. Heuser, E.H. Egelman, J.E. Sadler, Assembly of Weibel–Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 482–487. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710079105>.
- [84] T.N. Mayadas, D.D. Wagner, In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 13497–13503.
- [85] J. Terglane, D. Menche, V. Gerke, Acidification of endothelial Weibel-Palade bodies is mediated by the vacuolar-type H⁺-ATPase, *PLOS ONE* 17 (2022) e0270299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270299>.
- [86] J. Zeng, Z. Shu, Q. Liang, J. Zhang, W. Wu, X. Wang, A. Zhou, Structural basis of von Willebrand factor multimerization and tubular storage, *Blood* 139 (2022) 3314–3324. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014729>.
- [87] T. Nightingale, D. Cutler, The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story, *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 192–201. <https://doi.org/10.1111/jth.12225>.
- [88] W.W.Y. Lui-Roberts, L.M. Collinson, L.J. Hewlett, G. Michaux, D.F. Cutler, An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells, *J. Cell Biol.* 170 (2005) 627–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503054>.
- [89] T. Romani De Wit, M.G. Rondaij, P.L. Hordijk, J. Voorberg, J.A. Van Mourik, Real-Time Imaging of the Dynamics and Secretory Behavior of Weibel-Palade Bodies, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 755–761. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000069847.72001.E8>.
- [90] M.G. Rondaij, R. Bierings, A. Kragt, J.A. Van Mourik, J. Voorberg, Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1002–1007. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c>.

- [91] M. Lopes Da Silva, D.F. Cutler, von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells, *Blood* 128 (2016) 277–285. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-677054>.
- [92] T.D. Nightingale, K. Pattni, A.N. Hume, M.C. Seabra, D.F. Cutler, Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells, *Blood* 113 (2009) 5010–5018. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181206>.
- [93] I. Rojo Pulido, T.D. Nightingale, F. Darchen, M.C. Seabra, D.F. Cutler, V. Gerke, Myosin Va Acts in Concert with Rab27a and MyRIP to Regulate Acute Von-Willebrand Factor Release from Endothelial Cells, *Traffic* 12 (2011) 1371–1382. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01248.x>.
- [94] U.M. Vischer, H. Barth, C.B. Wollheim, Regulated von Willebrand Factor Secretion Is Associated With Agonist-Specific Patterns of Cytoskeletal Remodeling in Cultured Endothelial Cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 883–891. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.3.883>.
- [95] J.-B. Manneville, S. Etienne-Manneville, P. Skehel, T. Carter, D. Ogden, M. Ferenczi, Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 3927–3938. <https://doi.org/10.1242/jcs.00672>.
- [96] J. Naß, J. Terglane, V. Gerke, Weibel Palade Bodies: Unique Secretory Organelles of Endothelial Cells that Control Blood Vessel Homeostasis, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 813995. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.813995>.
- [97] I. Brandherm, J. Disse, D. Zeuschner, V. Gerke, cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2, *Blood* 122 (2013) 1042–1051. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475251>.
- [98] T. Chehab, N.C. Santos, A. Holthenrich, S.N. Koerdts, J. Disse, C. Schuberth, A.R. Nazmi, M. Neeft, H. Koch, K.N.M. Man, S.M. Wojcik, T.F.J. Martin, P. Van Der Sluijs, N. Brose, V. Gerke, A novel Munc13-4/S100A10/annexin A2 complex promotes Weibel–Palade body exocytosis in endothelial cells, *Mol. Biol. Cell* 28 (2017) 1688–1700. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-02-0128>.
- [99] M. Knop, E. Aaeskjold, G. Bode, V. Gerke, Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells, *EMBO J.* 23 (2004) 2982–2992. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600319>.
- [100] J. Fu, A.P. Naren, X. Gao, G.U. Ahmed, A.B. Malik, Protease-activated Receptor-1 Activation of Endothelial Cells Induces Protein Kinase C α -dependent Phosphorylation of Syntaxin 4 and Munc18c, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3178–3184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410044200>.
- [101] I.R. Pulido, R. Jahn, V. Gerke, VAMP3 is associated with endothelial Weibel–Palade bodies and participates in their Ca²⁺-dependent exocytosis, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813 (2011) 1038–1044. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.007>.
- [102] D. Van Breevoort, A.P. Snijders, N. Hellen, S. Weckhuysen, K.W.E.M. Van Hooren, J. Eikenboom, K. Valentijn, M. Fernandez-Borja, B. Ceulemans, P. De Jonghe, J. Voorberg, M. Hannah, T. Carter, R. Bierings, STXBP1 promotes Weibel-Palade body exocytosis through its interaction with the Rab27A effector Slp4-a, *Blood* 123 (2014) 3185–3194. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535831>.
- [103] Q. Zhu, M. Yamakuchi, C.J. Lowenstein, SNAP23 Regulates Endothelial Exocytosis of von Willebrand Factor, *PLOS ONE* 10 (2015) e0118737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118737>.

- [104] E.A. Cookson, I.L. Conte, J. Dempster, M.J. Hannah, T. Carter, Characterisation of Weibel-Palade body fusion by amperometry in endothelial cells reveals fusion pore dynamics and the effect of cholesterol on exocytosis, *J. Cell Sci.* (2013) jcs.138438. <https://doi.org/10.1242/jcs.138438>.
- [105] M.J. Hannah, P. Skehel, M. Erent, L. Knipe, D. Ogden, T. Carter, Differential Kinetics of Cell Surface Loss of von Willebrand Factor and Its Propolypeptide after Secretion from Weibel-Palade Bodies in Living Human Endothelial Cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22827–22830. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412547200>.
- [106] P. Arner, M. Rydén, Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance, *Obes. Facts* 8 (2015) 147–155. <https://doi.org/10.1159/000381224>.
- [107] G. Boden, Obesity and Free Fatty Acids, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37 (2008) 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.06.007>.
- [108] E. Fryk, J. Olausson, K. Mossberg, L. Strindberg, M. Schmelz, H. Brogren, L.-M. Gan, S. Piazza, A. Provenzani, B. Becattini, L. Lind, G. Solinas, P.-A. Jansson, Hyperinsulinemia and insulin resistance in the obese may develop as part of a homeostatic response to elevated free fatty acids: A mechanistic case-control and a population-based cohort study, *EBioMedicine* 65 (2021) 103264. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103264>.
- [109] G.M. Reaven, C. Hollenbeck, C.-Y. Jeng, M.S. Wu, Y.-D.I. Chen, Measurement of Plasma Glucose, Free Fatty Acid, Lactate, and Insulin for 24 h in Patients With NIDDM, *Diabetes* 37 (1988) 1020–1024. <https://doi.org/10.2337/diab.37.8.1020>.
- [110] S.A. Abdelmagid, S.E. Clarke, D.E. Nielsen, A. Badawi, A. El-Sohehy, D.M. Mutch, D.W.L. Ma, Comprehensive Profiling of Plasma Fatty Acid Concentrations in Young Healthy Canadian Adults, *PLOS ONE* 10 (2015) e0116195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>.
- [111] X. Song, Y. Huang, M.L. Neuhouser, L.F. Tinker, M.Z. Vitolins, R.L. Prentice, J.W. Lampe, Dietary long-chain fatty acids and carbohydrate biomarker evaluation in a controlled feeding study in participants from the Women’s Health Initiative cohort , *Am. J. Clin. Nutr.* 105 (2017) 1272–1282. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.153072>.
- [112] H. Staiger, K. Staiger, N. Stefan, H.G. Wahl, F. Machicao, M. Kellerer, H.-U. Häring, Palmitate-Induced Interleukin-6 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells, *Diabetes* 53 (2004) 3209–3216. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3209>.
- [113] Y. Yu, Z. Cai, J. Zheng, J. Chen, X. Zhang, X.-F. Huang, D. Li, Serum levels of polyunsaturated fatty acids are low in Chinese men with metabolic syndrome, whereas serum levels of saturated fatty acids, zinc, and magnesium are high, *Nutr. Res.* 32 (2012) 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.12.004>.
- [114] R. Feng, C. Luo, C. Li, S. Du, A.P. Okekunle, Y. Li, Y. Chen, T. Zi, Y. Niu, Free fatty acids profile among lean, overweight and obese non-alcoholic fatty liver disease patients: a case – control study, *Lipids Health Dis.* 16 (2017) 165. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0551-1>.
- [115] H.M. Melo, G.D.S. Seixas Da Silva, M.R. Sant’Ana, C.V.L. Teixeira, J.R. Clarke, V.S. Miya Coreixas, B.C. De Melo, J.T.S. Fortuna, L. Forny-Germano, J.H. Ledo, M.S. Oliveira, C.P. Figueiredo, R. Pardossi-Piquard, F. Checler, J.M. Delgado-García, A. Gruart, L.A. Velloso, M.L.F. Balthazar, D.E. Cintra, S.T. Ferreira, F.G. De Felice, Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α , *Cell Rep.* 30 (2020) 2180–2194.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.072>.
- [116] Z. Sun, Z. Deng, X. Wei, N. Wang, J. Yang, W. Li, M. Wu, Y. Liu, G. He, Circulating saturated fatty acids and risk of gestational diabetes mellitus: A cross-sectional study

- and meta-analysis, *Front. Nutr.* 9 (2022) 903689. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.903689>.
- [117] N. Sasaki, R. Maeda, R. Ozono, Y. Nakano, Y. Higashi, Association of obesity with serum free fatty acid levels in individuals at different stages of prediabetes, *Clin. Obes.* 12 (2022) e12496. <https://doi.org/10.1111/cob.12496>.
- [118] A. Chait, L.J. Den Hartigh, Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease, *Front. Cardiovasc. Med.* 7 (2020) 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>.
- [119] G. Carta, E. Murru, S. Banni, C. Manca, Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications, *Front. Physiol.* 8 (2017) 902. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>.
- [120] M.F.-F. Chong, L. Hodson, A.S. Bickerton, R. Roberts, M. Neville, F. Karpe, K.N. Frayn, B.A. Fielding, Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding, *Am. J. Clin. Nutr.* 87 (2008) 817–823. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.817>.
- [121] L.C. Hudgins, M. Hellerstein, C. Seidman, R. Neese, J. Diakun, J. Hirsch, Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet., *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2081–2091. <https://doi.org/10.1172/JCI118645>.
- [122] W. Ma, J.H. Wu, Q. Wang, R.N. Lemaitre, K.J. Mukamal, L. Djoussé, I.B. King, X. Song, M.L. Biggs, J.A. Delaney, J.R. Kizer, D.S. Siscovick, D. Mozaffarian, Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study, *Am. J. Clin. Nutr.* 101 (2015) 153–163. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092601>.
- [123] C.E. Annevelink, P.A. Sapp, K.S. Petersen, G.C. Shearer, P.M. Kris-Etherton, Diet-derived and diet-related endogenously produced palmitic acid: Effects on metabolic regulation and cardiovascular disease risk, *J. Clin. Lipidol.* (2023) S1933287423002295. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2023.07.005>.
- [124] F. Rosqvist, D. Iggman, J. Kullberg, J. Cedernaes, H.-E. Johansson, A. Larsson, L. Johansson, H. Ahlström, P. Arner, I. Dahlman, U. Risérus, Overfeeding Polyunsaturated and Saturated Fat Causes Distinct Effects on Liver and Visceral Fat Accumulation in Humans, *Diabetes* 63 (2014) 2356–2368. <https://doi.org/10.2337/db13-1622>.
- [125] E. Murru, C. Manca, G. Carta, S. Banni, Impact of Dietary Palmitic Acid on Lipid Metabolism, *Front. Nutr.* 9 (2022) 861664. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.861664>.
- [126] N.G. Forouhi, A. Koulman, S.J. Sharp, F. Imamura, J. Kröger, M.B. Schulze, F.L. Crowe, J.M. Huerta, M. Guevara, J.W. Beulens, G.J. Van Woudenberg, L. Wang, K. Summerhill, J.L. Griffin, E.J. Feskens, P. Amiano, H. Boeing, F. Clavel-Chapelon, L. Dartois, G. Fagherazzi, P.W. Franks, C. Gonzalez, M.U. Jakobsen, R. Kaaks, T.J. Key, K.-T. Khaw, T. Kühn, A. Mattiello, P.M. Nilsson, K. Overvad, V. Pala, D. Palli, J.R. Quirós, O. Rolandsson, N. Roswall, C. Sacerdote, M.-J. Sánchez, N. Slimani, A.M. Spijkerman, A. Tjønneland, M.-J. Tormo, R. Tumino, D.L. Van Der A, Y.T. Van Der Schouw, C. Langenberg, E. Riboli, N.J. Wareham, Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (2014) 810–818. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70146-9).
- [127] Z. Li, H. Lei, H. Jiang, Y. Fan, J. Shi, C. Li, F. Chen, B. Mi, M. Ma, J. Lin, L. Ma, Saturated fatty acid biomarkers and risk of cardiometabolic diseases: A meta-analysis of prospective studies, *Front. Nutr.* 9 (2022) 963471. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.963471>.

- [128] H. Amine, Y. Benomar, M. Taouis, Palmitic acid promotes resistin-induced insulin resistance and inflammation in SH-SY5Y human neuroblastoma, *Sci. Rep.* 11 (2021) 5427. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85018-7>.
- [129] D. Dymkowska, B. Drabarek, J. Jakubczyk, S. Wojciechowska, K. Zabłocki, Potassium channel openers prevent palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes, *Arch. Biochem. Biophys.* 541 (2014) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.11.003>.
- [130] J. Gustavo Vazquez-Jimenez, J. Chavez-Reyes, T. Romero-Garcia, A. Zarain-Herzberg, J. Valdes-Flores, J. Manuel Galindo-Rosales, A. Rueda, A. Guerrero-Hernandez, J. Alberto Olivares-Reyes, Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression, *Cell. Signal.* 28 (2016) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.10.001>.
- [131] B. Li, J.C.K. Leung, L.Y.Y. Chan, W.H. Yiu, S.C.W. Tang, A global perspective on the crosstalk between saturated fatty acids and Toll-like receptor 4 in the etiology of inflammation and insulin resistance, *Prog. Lipid Res.* 77 (2020) 101020. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101020>.
- [132] L. Xu, W. Wang, X. Zhang, H. Ke, Y. Qin, L. You, W. Li, G. Lu, W.-Y. Chan, P.C.K. Leung, S. Zhao, Z.-J. Chen, Palmitic acid causes insulin resistance in granulosa cells via activation of JNK, *J. Mol. Endocrinol.* 62 (2019) 197–206. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0214>.
- [133] P. Chen, H. Liu, H. Xiang, J. Zhou, Z. Zeng, R. Chen, S. Zhao, J. Xiao, Z. Shu, S. Chen, H. Lu, Palmitic acid-induced autophagy increases reactive oxygen species via the Ca²⁺/PKC α /NOX4 pathway and impairs endothelial function in human umbilical vein endothelial cells, *Exp. Ther. Med.* (2019). <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7269>.
- [134] L.D. Ly, S. Xu, S.-K. Choi, C.-M. Ha, T. Thoudam, S.-K. Cha, A. Wiederkehr, C.B. Wollheim, I.-K. Lee, K.-S. Park, Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes, *Exp. Mol. Med.* 49 (2017) e291–e291. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.157>.
- [135] E. Maloney, I.R. Sweet, D.M. Hockenbery, M. Pham, N.O. Rizzo, S. Tateya, P. Handa, M.W. Schwartz, F. Kim, Activation of NF- κ B by Palmitate in Endothelial Cells: A Key Role for NADPH Oxidase-Derived Superoxide in Response to TLR4 Activation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1370–1375. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.188813>.
- [136] D. Dymkowska, M. Kawalec, T. Wyszomirski, K. Zabłocki, Mild palmitate treatment increases mitochondrial mass but does not affect EA.hy926 endothelial cells viability, *Arch. Biochem. Biophys.* 634 (2017) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.006>.
- [137] A. Alnahdi, A. John, H. Raza, Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid, *Nutrients* 11 (2019) 1979. <https://doi.org/10.3390/nu11091979>.
- [138] J. Korbecki, K. Bajdak-Rusinek, The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms, *Inflamm. Res.* 68 (2019) 915–932. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>.
- [139] P. Li, L. Li, C. Zhang, X. Cheng, Y. Zhang, Y. Guo, M. Long, S. Yang, J. He, Palmitic Acid and β -Hydroxybutyrate Induce Inflammatory Responses in Bovine Endometrial Cells by Activating Oxidative Stress-Mediated NF- κ B Signaling, *Molecules* 24 (2019) 2421. <https://doi.org/10.3390/molecules24132421>.
- [140] N.J. Pilon, P.M. Azizi, Y.E. Li, J. Liu, C. Wang, K.L. Chan, K.E. Hopperton, R.P. Bazinet, B. Heit, P.J. Bilan, W.L. Lee, A. Klip, Palmitate-induced inflammatory pathways in human adipose microvascular endothelial cells promote monocyte

- adhesion and impair insulin transcytosis, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 309 (2015) E35–E44. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00611.2014>.
- [141] T. Qiu, X. Yang, J. Wang, C. Pan, X. Chu, J. Xiong, J. Xie, Y. Chang, C. Wang, J. Zhang, Obesity-induced elevated palmitic acid promotes inflammation and glucose metabolism disorders through GPRs/NF- κ B/KLF7 pathway, *Nutr. Diabetes* 12 (2022) 23. <https://doi.org/10.1038/s41387-022-00202-6>.
- [142] D.M. Lee, K.J. Sevits, M.L. Battson, Y. Wei, K.A. Cox-York, C.L. Gentile, Monounsaturated fatty acids protect against palmitate-induced lipoapoptosis in human umbilical vein endothelial cells, *PLOS ONE* 14 (2019) e0226940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226940>.
- [143] S.R. El-Zayat, H. Sibai, F.A. Mannaa, Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview, *Bull. Natl. Res. Cent.* 43 (2019) 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>.
- [144] M. Czerkies, K. Kwiatkowska, Receptory Toll-podobne (TLR) i ich udział we wrodzonej odpowiedzi odpornościowej na przykładzie aktywacji TLR4 przez lipopolisacharyd, *Postępy Biol. Komórki* 40 (2013) 39–64.
- [145] A.S. Sameer, S. Nissar, Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility, *BioMed Res. Int.* 2021 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/1157023>.
- [146] A. Ambesi, P. Maddali, P.J. McKeown-Longo, Fibronectin Functions as a Selective Agonist for Distinct Toll-like Receptors in Triple-Negative Breast Cancer, *Cells* 11 (2022) 2074. <https://doi.org/10.3390/cells11132074>.
- [147] N. Das, V. Dewan, P.M. Grace, R.J. Gunn, R. Tamura, N. Tzarum, L.R. Watkins, I.A. Wilson, H. Yin, HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia, *Cell Rep.* 17 (2016) 1128–1140. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.076>.
- [148] D. Łacheta, W. Olejarz, M. Wrzosek, G. Nowicka, Toll-like receptors as a potential therapeutic target for atherosclerosis and cardiovascular disease, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 72 (2018) 728–739. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.2340>.
- [149] H. Negishi, N. Endo, Y. Nakajima, T. Nishiyama, Y. Tabunoki, J. Nishio, R. Koshiba, A. Matsuda, K. Matsuki, T. Okamura, T. Negishi-Koga, T. Ichinohe, S. Takemura, H. Ishiwata, S. Iemura, T. Natsume, T. Abe, H. Kiyonari, T. Doi, S. Hangai, H. Yanai, K. Fujio, K. Yamamoto, T. Taniguchi, Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (2019) 23653–23661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915326116>.
- [150] T. Duan, Y. Du, C. Xing, H.Y. Wang, R.-F. Wang, Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity, *Front. Immunol.* 13 (2022) 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>.
- [151] A. Achek, D. Yesudhas, S. Choi, Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases, *Arch. Pharm. Res.* 39 (2016) 1032–1049. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0806-9>.
- [152] A.J. Fusco, D. Huang, D. Miller, V.Y. Wang, D. Vu, G. Ghosh, NF- κ B p52:RelB heterodimer recognizes two classes of κ B sites with two distinct modes, *EMBO Rep.* 10 (2009) 152–159. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.227>.
- [153] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun, NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct. Target. Ther.* 2 (2017) 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [154] B.C. Albensi, What Is Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Doing in and to the Mitochondrion?, *Front. Cell Dev. Biol.* 7 (2019) 154. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00154>.

- [155] M.R. Zinatizadeh, B. Schock, G.M. Chalbatani, P.K. Zarandi, S.A. Jalali, S.R. Miri, The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases, *Genes Dis.* 8 (2021) 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.06.005>.
- [156] F.-I.D. Dimitrakopoulos, A.G. Antonacopoulou, A.E. Kottorou, N. Panagopoulos, F. Kalofonou, F. Sampsonas, C. Scopa, M. Kalofonou, A. Koutras, T. Makatsoris, D. Dougenis, H. Papadaki, M. Brock, H.P. Kalofonos, Expression Of Intracellular Components of the NF- κ B Alternative Pathway (NF- κ B2, RelB, NIK and Bcl3) is Associated With Clinical Outcome of NSCLC Patients, *Sci. Rep.* 9 (2019) 14299. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50528-y>.
- [157] F. Christian, E. Smith, R. Carmody, The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation, *Cells* 5 (2016) 12. <https://doi.org/10.3390/cells5010012>.
- [158] M.B. LoMonaco, C.J. Lowenstein, Enhanced assay of endothelial exocytosis using extracellular matrix components, *Anal. Biochem.* 452 (2014) 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.02.015>.
- [159] S.P. Cousin, S.R. Hügl, C.E. Wrede, H. Kajio, M.G. Myers, C.J. Rhodes, Free Fatty Acid-Induced Inhibition of Glucose and Insulin-Like Growth Factor I-Induced Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Pancreatic β -Cell Line INS-1, *Endocrinology* 142 (2001) 229–240. <https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7863>.
- [160] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [161] Z. Ren, J. Chen, R.A. Khalil, Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors, in: J. Wilkesman, L. Kurz (Eds.), *Zymography*, Springer New York, New York, NY, 2017: pp. 79–102. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_8.
- [162] L. Koontz, TCA Precipitation, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier, 2014: pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X>.
- [163] X.D. Manz, H.J. Bogaard, J. Aman, Regulation of VWF (Von Willebrand Factor) in Inflammatory Thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 42 (2022) 1307–1320. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318179>.
- [164] F. Dong, X. Zhao, J. Wang, X. Huang, X. Li, L. Zhang, H. Dong, F. Liu, M. Fan, Dihydroartemisinin inhibits the expression of von Willebrand factor by downregulation of transcription factor ERG in endothelial cells, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 35 (2021) 321–330. <https://doi.org/10.1111/fcp.12622>.
- [165] J. Liu, L. Yuan, G. Molema, E. Regan, L. Janes, D. Beeler, K.C. Spokes, Y. Okada, T. Minami, P. Oettgen, W.C. Aird, Vascular bed-specific regulation of the von Willebrand factor promoter in the heart and skeletal muscle, *Blood* 117 (2011) 342–351. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-287987>.
- [166] J. Liu, Y. Kanki, Y. Okada, E. Jin, K. Yano, S.C. Shih, T. Minami, W.C. Aird, A +220 GATA motif mediates basal but not endotoxin-repressible expression of the von Willebrand factor promoter in Hpvt-targeted transgenic mice, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 1384–1392. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03501.x>.
- [167] J.-L. Schwachtgen, N. Janel, L. Barek, M. Duterque-Coquillaud, J. Ghysdael, D. Meyer, D. Kerbiriou-Nabias, Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene, *Oncogene* 15 (1997) 3091–3102. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201502>.
- [168] Y. Xu, S. Pan, J. Liu, F. Dong, Z. Cheng, J. Zhang, R. Qi, Q. Zang, C. Zhang, X. Wang, J. Zhang, F. Wang, T.D. Allen, J. Liu, GATA3-induced vWF upregulation in the lung adenocarcinoma vasculature, *Oncotarget* 8 (2017) 110517–110529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22806>.

- [169] L. Yuan, V. Nikolova-Krstevski, Y. Zhan, M. Kondo, M. Bhasin, L. Varghese, K. Yano, C.V. Carman, W.C. Aird, P. Oettgen, Antiinflammatory Effects of the ETS Factor ERG in Endothelial Cells Are Mediated Through Transcriptional Repression of the Interleukin-8 Gene, *Circ. Res.* 104 (2009) 1049–1057. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.190751>.
- [170] G. Thomas, Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 753–766. <https://doi.org/10.1038/nrm934>.
- [171] J. Baumann, S.-F. Huang, M. Gassmann, C.-C. Tsao, O.O. Ogunshola, Furin inhibition prevents hypoxic and TGF β -mediated blood-brain barrier disruption, *Exp. Cell Res.* 383 (2019) 111503. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111503>.
- [172] S. Rezq, A.M. Huffman, J. Basnet, L.L. Yanes Cardozo, D.G. Romero, Cardiac and Renal SARS-CoV-2 Viral Entry Protein Regulation by Androgens and Diet: Implications for Polycystic Ovary Syndrome and COVID-19, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 9746. <https://doi.org/10.3390/ijms22189746>.
- [173] S. Tian, Q. Huang, Y. Fang, J. Wu, FurinDB: A Database of 20-Residue Furin Cleavage Site Motifs, Substrates and Their Associated Drugs, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 1060–1065. <https://doi.org/10.3390/ijms12021060>.
- [174] S. López-López, E.M. Monsalve, M.J. Romero De Ávila, J. González-Gómez, N. Hernández De León, F. Ruiz-Marcos, V. Baladrón, M.L. Nueda, M.J. García-León, I. Screpanti, M.P. Felli, J. Laborda, J.J. García-Ramírez, M.J.M. Díaz-Guerra, NOTCH3 signaling is essential for NF- κ B activation in TLR-activated macrophages, *Sci. Rep.* 10 (2020) 14839. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71810-4>.
- [175] E.M. Hwang, S.-K. Kim, J.-H. Sohn, J.Y. Lee, Y. Kim, Y.S. Kim, I. Mook-Jung, Furin is an endogenous regulator of α -secretase associated APP processing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.077>.
- [176] J.Z.A. Tan, P.A. Gleeson, The trans-Golgi network is a major site for α -secretase processing of amyloid precursor protein in primary neurons, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 1618–1631. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005222>.
- [177] P. Ottino, J. He, T.W. Axelrad, H.E.P. Bazan, PAF-Induced Furin and MT1-MMP Expression Is Independent of MMP-2 Activation in Corneal Myofibroblasts, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 46 (2005) 487. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0852>.
- [178] P. Stawowy, H. Meyborg, D. Stibenz, N.B.P. Stawowy, M. Roser, U. Thanabalasingam, J.P. Veinot, M. Chrétien, N.G. Seidah, E. Fleck, K. Graf, Furin-Like Proprotein Convertases Are Central Regulators of the Membrane Type Matrix Metalloproteinase–Pro-Matrix Metalloproteinase-2 Proteolytic Cascade in Atherosclerosis, *Circulation* 111 (2005) 2820–2827. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.502617>.
- [179] Z. Zhou, T. Shen, B.-H. Zhang, X.-Y. Lv, H.-Y. Lin, C. Zhu, L.-Q. Xue, H. Wang, The proprotein convertase furin in human trophoblast: Possible role in promoting trophoblast cell migration and invasion, *Placenta* 30 (2009) 929–938. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.09.003>.
- [180] J. Pietrzak, D. Wodziński, I. Franiak-Pietryga, M. Mirowski, Charakterystyka elektroforetyczna aktywności metaloproteinazowej surowicy pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową – badania wstępne, *Folia Medica Lodz.* 42 (2015) 49–62.
- [181] S. Ricci, V. D’Esposito, F. Oriente, P. Formisano, A. Di Carlo, Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples, *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* 0 (2015). <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0668>.
- [182] T. Torisu, K. Torisu, I.H. Lee, J. Liu, D. Malide, C.A. Combs, X.S. Wu, I.I. Rovira, M.M. Fergusson, R. Weigert, P.S. Connelly, M.P. Daniels, M. Komatsu, L. Cao, T.

- Finkel, Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor, *Nat. Med.* 19 (2013) 1281–1287. <https://doi.org/10.1038/nm.3288>.
- [183] A. Bugatti, S. Marsico, P. Mazzuca, K. Schulze, T. Ebbesen, C. Giagulli, E. Peña, L. Badimón, M. Slevin, A. Caruso, C.A. Guzman, F. Caccuri, Role of Autophagy in Von Willebrand Factor Secretion by Endothelial Cells and in the In Vivo Thrombin-Antithrombin Complex Formation Promoted by the HIV-1 Matrix Protein p17, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms21062022>.
- [184] W. Cui, X. Wu, D. Feng, J. Luo, Y. Shi, W. Guo, H. Liu, Q. Wang, L. Wang, S. Ge, Y. Qu, Acrolein Induces Systemic Coagulopathy via Autophagy-dependent Secretion of von Willebrand Factor in Mice after Traumatic Brain Injury, *Neurosci. Bull.* 37 (2021) 1160–1175. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00681-0>.
- [185] G. Bjørkøy, T. Lamark, S. Pankiv, A. Øvervatn, A. Brech, T. Johansen, Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier, 2009: pp. 181–197. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4).
- [186] C. Martínez-García, A. Izquierdo-Lahuerta, Y. Vivas, I. Velasco, T.-K. Yeo, S. Chen, G. Medina-Gomez, Renal Lipotoxicity-Associated Inflammation and Insulin Resistance Affects Actin Cytoskeleton Organization in Podocytes, *PLOS ONE* 10 (2015) e0142291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142291>.
- [187] V.L. Tokarz, S. Mylvaganam, A. Klip, Palmitate-induced insulin resistance causes actin filament stiffness and GLUT4 mis-sorting without altered Akt signalling, *J. Cell Sci.* 136 (2023) jcs261300. <https://doi.org/10.1242/jcs.261300>.
- [188] K.M. Ajuwon, M.E. Spurlock, Palmitate Activates the NF- κ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF α Expression in 3T3-L1 Adipocytes, *J. Nutr.* 135 (2005) 1841–1846. <https://doi.org/10.1093/jn/135.8.1841>.
- [189] P.P.H. Hommelberg, J. Plat, R.C.J. Langen, A.M.W.J. Schols, R.P. Mensink, Fatty acid-induced NF- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 296 (2009) E114–E120. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00436.2007>.
- [190] A. Sadeghi, A. Rostamirad, S. Seyyedebrahimi, R. Meshkani, Curcumin ameliorates palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by regulating JNK/NF- κ B pathway and ROS production, *Inflammopharmacology* 26 (2018) 1265–1272. <https://doi.org/10.1007/s10787-018-0466-0>.
- [191] M. Jové, A. Planavila, R.M. Sánchez, M. Merlos, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Palmitate Induces Tumor Necrosis Factor- α Expression in C2C12 Skeletal Muscle Cells by a Mechanism Involving Protein Kinase C and Nuclear Factor- κ B Activation, *Endocrinology* 147 (2006) 552–561. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0440>.
- [192] P.J. Harvey, A.M. Keightley, Y.M. Lam, C. Cameron, D. Lillicrap, A single nucleotide polymorphism at nucleotide –1793 in the von Willebrand factor (VWF) regulatory region is associated with plasma VWF:Ag levels: VWF Promoter Polymorphism and Plasma VWF Levels, *Br. J. Haematol.* 109 (2000) 349–353. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02000.x>.
- [193] X.D. Manz, R. Szulcek, X. Pan, P. Symersky, C. Dickhoff, J. Majolée, V. Kremer, E. Michielon, E.S. Jordanova, T. Radonic, I.V. Bijnsdorp, S.R. Piersma, T.V. Pham, C.R. Jimenez, A.V. Noordegraaf, F.S. De Man, R.A. Boon, J. Voorberg, P.L. Hordijk, J. Aman, H.J. Bogaard, Epigenetic Modification of the von Willebrand Factor Promoter Drives Platelet Aggregation on the Pulmonary Endothelium in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 205 (2022) 806–818. <https://doi.org/10.1164/rccm.202109-2075OC>.

- [194] X. Wang, F. Dong, F. Wang, S. Yan, X. Chen, H. Tozawa, T. Ushijima, C.M. Kapron, Y. Wada, J. Liu, Low dose cadmium upregulates the expression of von Willebrand factor in endothelial cells, *Toxicol. Lett.* 290 (2018) 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.03.020>.
- [195] A.M. Caricilli, P.H. Nascimento, J.R. Pauli, D.M.L. Tsukumo, L.A. Velloso, J.B. Carnevali, M.J.A. Saad, Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet, *J. Endocrinol.* 199 (2008) 399–406. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0354>.
- [196] J.E. Davis, N.K. Gabler, J. Walker-Daniels, M.E. Spurlock, Tlr-4 Deficiency Selectively Protects Against Obesity Induced by Diets High in Saturated Fat, *Obesity* 16 (2008) 1248–1255. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.210>.
- [197] J.A. Ehres, D.T. Meier, S. Wueest, J. Rytka, S. Boller, P.Y. Wielinga, A. Schraenen, K. Lemaire, S. Debray, L. Van Lommel, J.A. Pospisilik, O. Tschopp, S.M. Schultze, U. Malipiero, H. Esterbauer, H. Ellingsgaard, S. Rützi, F.C. Schuit, T.A. Lutz, M. Böni-Schnetzler, D. Konrad, M.Y. Donath, Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet, *Diabetologia* 53 (2010) 1795–1806. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1747-3>.
- [198] S. Gupta, A.G. Knight, S. Gupta, J.N. Keller, A.J. Bruce-Keller, Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes, *J. Neurochem.* 120 (2012) 1060–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x>.
- [199] R.W. Himes, C.W. Smith, *Tlr2* is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model, *FASEB J.* 24 (2010) 731–739. <https://doi.org/10.1096/fj.09-141929>.
- [200] S. Huang, J.M. Rutkowski, R.G. Snodgrass, K.D. Ono-Moore, D.A. Schneider, J.W. Newman, S.H. Adams, D.H. Hwang, Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2002–2013. <https://doi.org/10.1194/jlr.D029546>.
- [201] H.-J. Jang, H.-S. Kim, D.H. Hwang, M.J. Quon, J. Kim, Toll-like receptor 2 mediates high-fat diet-induced impairment of vasodilator actions of insulin, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 304 (2013) E1077–E1088. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00578.2012>.
- [202] F. Kim, M. Pham, I. Luttrell, D.D. Bannerman, J. Tupper, J. Thaler, T.R. Hawn, E.W. Raines, M.W. Schwartz, Toll-Like Receptor-4 Mediates Vascular Inflammation and Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity, *Circ. Res.* 100 (2007) 1589–1596. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.142851>.
- [203] J. Quan, J. Liu, X. Gao, J. Liu, H. Yang, W. Chen, W. Li, Y. Li, W. Yang, B. Wang, Palmitate induces interleukin-8 expression in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway, *J. Diabetes* 6 (2014) 33–41. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12073>.
- [204] J.J. Senn, Toll-like Receptor-2 Is Essential for the Development of Palmitate-induced Insulin Resistance in Myotubes, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26865–26875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513304200>.
- [205] R.G. Snodgrass, S. Huang, I.-W. Choi, J.C. Rutledge, D.H. Hwang, Inflammasome-Mediated Secretion of IL-1 β in Human Monocytes through TLR2 Activation; Modulation by Dietary Fatty Acids, *J. Immunol.* 191 (2013) 4337–4347. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300298>.
- [206] T. Suganami, T. Mieda, M. Itoh, Y. Shimoda, Y. Kamei, Y. Ogawa, Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.190>.

- [207] Z. Wang, D. Liu, F. Wang, S. Liu, S. Zhao, E.-A. Ling, A. Hao, Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling, *Br. J. Nutr.* 107 (2012) 229–241. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002868>.
- [208] T. Abe, M. Shimamura, K. Jackman, H. Kurinami, J. Anrather, P. Zhou, C. Iadecola, Key Role of CD36 in Toll-Like Receptor 2 Signaling in Cerebral Ischemia, *Stroke* 41 (2010) 898–904. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572552>.
- [209] I.N. Baranova, T.G. Vishnyakova, A.V. Bocharov, A. Leelahavanichkul, R. Kurlander, Z. Chen, A.C.P. Souza, P.S.T. Yuen, R.A. Star, G. Csako, A.P. Patterson, T.L. Eggerman, Class B Scavenger Receptor Types I and II and CD36 Mediate Bacterial Recognition and Proinflammatory Signaling Induced by *Escherichia coli*, Lipopolysaccharide, and Cytosolic Chaperonin 60, *J. Immunol.* 188 (2012) 1371–1380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100350>.
- [210] M.J. Jimenez-Dalmaroni, N. Xiao, A.L. Corper, P. Verdino, G.D. Ainge, D.S. Larsen, G.F. Painter, P.M. Rudd, R.A. Dwek, K. Hoebe, B. Beutler, I.A. Wilson, Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2, *PLoS ONE* 4 (2009) e7411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007411>.
- [211] Z. Lu, Y. Li, C. Brinson, K. Kirkwood, M. Lopes-Virella, Y. Huang, CD36 is upregulated in mice with periodontitis and metabolic syndrome and involved in macrophage gene upregulation by palmitate, *Oral Dis.* 23 (2017) 210–218. <https://doi.org/10.1111/odi.12596>.
- [212] M. Triantafilou, F.G.J. Gamper, R.M. Haston, M.A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung, K. Triantafilou, Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 31002–31011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602794200>.
- [213] L. Shmuel-Galia, Y. Klug, Z. Porat, M. Charni, B. Zarmi, Y. Shai, Intramembrane attenuation of the TLR4-TLR6 dimer impairs receptor assembly and reduces microglia-mediated neurodegeneration, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 13415–13427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784983>.
- [214] C.R. Stewart, L.M. Stuart, K. Wilkinson, J.M. Van Gils, J. Deng, A. Halle, K.J. Rayner, L. Boyer, R. Zhong, W.A. Frazier, A. Lacy-Hulbert, J.E. Khoury, D.T. Golenbock, K.J. Moore, CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 155–161. <https://doi.org/10.1038/ni.1836>.
- [215] G.C. Henderson, Plasma Free Fatty Acid Concentration as a Modifiable Risk Factor for Metabolic Disease, *Nutrients* 13 (2021) 2590. <https://doi.org/10.3390/nu13082590>.
- [216] G.J. Van Der Vusse, Albumin as Fatty Acid Transporter, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (2009) 300–307. <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>.
- [217] N. Alsabeeh, B. Chausse, P.A. Kakimoto, A.J. Kowaltowski, O. Shirihai, Cell culture models of fatty acid overload: Problems and solutions, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1863 (2018) 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.11.006>.
- [218] Y. Yang, Q. Yu, B. Li, Z. Yang, S. Zhang, F. Yuan, Palmitate lipotoxicity is closely associated with the fatty acid-albumin complexes in BV-2 microglia, *PLOS ONE* 18 (2023) e0281189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281189>.
- [219] K.D. Ono-Moore, M.L. Blackburn, S.H. Adams, Is palmitate truly proinflammatory? Experimental confounders and context-specificity, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 315 (2018) E780–E794. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00187.2018>.

- [220] C. Erridge, N.J. Samani, Saturated Fatty Acids Do Not Directly Stimulate Toll-Like Receptor Signaling, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1944–1949. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194050>.
- [221] D.S. Wheeler, J.S. Giuliano, P.M. Lahni, A. Denenberg, H.R. Wong, B. Zingarelli, The Immunomodulatory Effects of Albumin *In Vitro* and *In Vivo*, *Adv. Pharmacol. Sci.* 2011 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/691928>.
- [222] D.J. Medina-Leyte, M. Domínguez-Pérez, I. Mercado, M.T. Villarreal-Molina, L. Jacobo-Albavera, Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review, *Appl. Sci.* 10 (2020) 938. <https://doi.org/10.3390/app10030938>.
- [223] Z. Chen, D. Wen, F. Wang, C. Wang, L. Yang, Curcumin protects against palmitic acid-induced apoptosis via the inhibition of endoplasmic reticulum stress in testicular Leydig cells, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 17 (2019) 71. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0517-4>.
- [224] J.-E. Kim, S.E. Song, Y.-W. Kim, J.-Y. Kim, S.-C. Park, Y.-K. Park, S.-H. Baek, I.K. Lee, S.-Y. Park, Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase, *J. Endocrinol.* 207 (2010) 35–44. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0093>.
- [225] C. Rojas, B. Pan-Castillo, C. Valls, G. Pujadas, S. Garcia-Vallve, L. Arola, M. Mulero, Resveratrol Enhances Palmitate-Induced ER Stress and Apoptosis in Cancer Cells, *PLoS ONE* 9 (2014) e113929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113929>.
- [226] S. Xu, S.M. Nam, J.-H. Kim, R. Das, S.-K. Choi, T.T. Nguyen, X. Quan, S.J. Choi, C.H. Chung, E.Y. Lee, I.-K. Lee, A. Wiederkehr, C.B. Wollheim, S.-K. Cha, K.-S. Park, Palmitate induces ER calcium depletion and apoptosis in mouse podocytes subsequent to mitochondrial oxidative stress, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1976–e1976. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.331>.
- [227] W. Zhu, G. Yang, N. Chen, W. Zhang, Q. Gao, T. Li, N. Yuan, H. Jin, CTRP13 alleviates palmitic acid-induced inflammation, oxidative stress, apoptosis and endothelial cell dysfunction in HUVECs, *Tissue Cell* 86 (2024) 102232. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102232>.
- [228] L. Zou, X. Li, N. Wu, P. Jia, C. Liu, D. Jia, Palmitate induces myocardial lipotoxic injury via the endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis pathway, *Mol. Med. Rep.* 16 (2017) 6934–6939. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7404>.
- [229] D. Frattantonio, A. Speciale, D. Ferrari, M. Cristani, A. Saija, F. Cimino, Palmitate-induced endothelial dysfunction is attenuated by cyanidin-3-O-glucoside through modulation of Nrf2/Bach1 and NF- κ B pathways, *Toxicol. Lett.* 239 (2015) 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.020>.
- [230] Y. Xiang, J. Cheng, D. Wang, X. Hu, Y. Xie, J. Stitham, G. Atteya, J. Du, W.H. Tang, S.H. Lee, K. Leslie, G. Spollett, Z. Liu, E. Herzog, R.I. Herzog, J. Lu, K.A. Martin, J. Hwa, Hyperglycemia repression of miR-24 coordinately upregulates endothelial cell expression and secretion of von Willebrand factor, *Blood* 125 (2015) 3377–3387. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-620278>.
- [231] H.-S. Jeong, D.-H. Lee, S.-H. Kim, C.-H. Lee, H.M. Shin, H.-R. Kim, C.-H. Cho, Hyperglycemia-induced oxidative stress promotes tumor metastasis by upregulating vWF expression in endothelial cells through the transcription factor GATA1, *Oncogene* 41 (2022) 1634–1646. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02207-y>.
- [232] J. Eikenboom, A.B. Federici, R.J. Dirven, G. Castaman, F. Rodeghiero, U. Budde, R. Schneppenheim, J. Battle, M.T. Canciani, J. Goudemand, I. Peake, A. Goodeve, the MCMDM-1VWD Study Group, VWF propeptide and ratios between VWF, VWF

- propeptide, and FVIII in the characterization of type 1 von Willebrand disease, *Blood* 121 (2013) 2336–2339. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-455089>.
- [233] E.J. Favalaro, The Role of the von Willebrand Factor Collagen-Binding Assay (VWF:CB) in the Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease (VWD) and Way Beyond: A Comprehensive 36-Year History, *Semin. Thromb. Hemost.* (2023) s-0043-1763259. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1763259>.
- [234] Y. Xiang, J. Hwa, Regulation of VWF expression, and secretion in health and disease:, *Curr. Opin. Hematol.* 23 (2016) 288–293. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000230>.
- [235] H. Song, J. Suehiro, Y. Kanki, Y. Kawai, K. Inoue, H. Daida, K. Yano, T. Ohhashi, P. Oettgen, W.C. Aird, T. Kodama, T. Minami, Critical Role for GATA3 in Mediating Tie2 Expression and Function in Large Vessel Endothelial Cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29109–29124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041145>.
- [236] H. Wang, Y. Zhang, J. Luomei, P. Huang, R. Zhou, Y. Peng, The miR-155/GATA3/IL37 axis modulates the production of proinflammatory cytokines upon TNF- α stimulation to affect psoriasis development, *Exp. Dermatol.* 29 (2020) 647–658. <https://doi.org/10.1111/exd.14117>.
- [237] Y. Li, L. Li, F. Dong, L. Guo, Y. Hou, H. Hu, S. Yan, X. Zhou, L. Liao, T.D. Allen, J. Liu, Plasma von Willebrand factor level is transiently elevated in a rat model of acute myocardial infarction, *Exp. Ther. Med.* 10 (2015) 1743–1749. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2721>.
- [238] C. Fernandez, J. Rysä, P. Almgren, J. Nilsson, G. Engström, M. Orho-Melander, H. Ruskoaho, O. Melander, Plasma levels of the proprotein convertase furin and incidence of diabetes and mortality, *J. Intern. Med.* 284 (2018) 377–387. <https://doi.org/10.1111/joim.12783>.
- [239] P. Swärd, B.E. Rosengren, L. Jehpsson, M.K. Karlsson, Association between circulating furin levels, obesity and pro-inflammatory markers in children, *Acta Paediatr.* 110 (2021) 1863–1868. <https://doi.org/10.1111/apa.15774>.
- [240] W. Garten, Characterization of Proprotein Convertases and Their Involvement in Virus Propagation, in: E. Böttcher-Friebertshäuser, W. Garten, H.D. Klenk (Eds.), *Act. Viruses Host Proteases*, Springer International Publishing, Cham, 2018: pp. 205–248. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75474-1_9.
- [241] I. Małuch, A. Walewska, E. Sikorska, A. Prahl, Konwertazy probiałkowe - rodzina proteaz serynowych o szerokim spektrum funkcji fizjologicznych, *Postępy Biochem.* 62 (2016) 472–481.
- [242] I. Małuch, A. Walewska, E. Sikorska, A. Prahl, [Proprotein convertases - family of serine proteases with a broad spectrum of physiological functions], *Postępy Biochem.* 62 (2016) 472–481.
- [243] D.P.V. De Kleijn, J.P.G. Sluijter, J. Smit, E. Velema, W. Richard, A.H. Schoneveld, G. Pasterkamp, C. Borst, Furin and membrane type-1 metalloproteinase mRNA levels and activation of metalloproteinase-2 are associated with arterial remodeling, *FEBS Lett.* 501 (2001) 37–41. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02622-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02622-9).
- [244] A.G. Remacle, D.V. Rozanov, M. Fugere, R. Day, A.Y. Strongin, Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP, *Oncogene* 25 (2006) 5648–5655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209572>.
- [245] M.J. Binker-Cosen, D. Richards, B. Oliver, H.Y. Gaisano, M.G. Binker, L.I. Cosen-Binker, Palmitic acid increases invasiveness of pancreatic cancer cells AsPC-1 through TLR4/ROS/NF- κ B/MMP-9 signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484 (2017) 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.051>.

- [246] J. Girona, R. Rosales, P. Saavedra, L. Masana, J.-C. Vallvé, Palmitate decreases migration and proliferation and increases oxidative stress and inflammation in smooth muscle cells: role of the Nrf2 signaling pathway, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 316 (2019) C888–C897. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00293.2018>.
- [247] M. Nemezc, A. Constantin, M. Dumitrescu, N. Alexandru, A. Filippi, G. Tanko, A. Georgescu, The Distinct Effects of Palmitic and Oleic Acid on Pancreatic Beta Cell Function: The Elucidation of Associated Mechanisms and Effector Molecules, *Front. Pharmacol.* 9 (2019) 1554. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01554>.
- [248] S. Sindhu, A. Al-Roub, M. Koshy, R. Thomas, R. Ahmad, Palmitate-Induced MMP-9 Expression in the Human Monocytic Cells is Mediated through the TLR4-MyD88 Dependent Mechanism, *Cell. Physiol. Biochem.* 39 (2016) 889–900. <https://doi.org/10.1159/000447798>.
- [249] X. Zhang, X. Li, G. Xiong, F. Yun, Y. Feng, Q. Ni, N. Wu, L. Yang, Z. Yi, Q. Zhang, Z. Yang, Y. Kuang, B. Sai, Y. Zhu, Palmitic Acid Promotes Lung Metastasis of Melanomas via the TLR4/TRIF-Peli1-pNF-κB Pathway, *Metabolites* 12 (2022) 1132. <https://doi.org/10.3390/metabo12111132>.
- [250] S. Boumiza, K. Chahed, Z. Tabka, M.-P. Jacob, X. Norel, G. Ozen, MMPs and TIMPs levels are correlated with anthropometric parameters, blood pressure, and endothelial function in obesity, *Sci. Rep.* 11 (2021) 20052. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99577-2>.
- [251] B. Grzechocińska, F.A. Dąbrowski, J. Sierdzinski, A. Cyganek, M. Wielgoś, The association between serum metalloproteinase concentration, obesity, and hormone levels in reproductive-aged women, *Endokrynol. Pol.* 70 (2019) 49–56. <https://doi.org/10.5603/EP.a2018.0067>.
- [252] N. Cai, X. Zhao, Y. Jing, K. Sun, S. Jiao, X. Chen, H. Yang, Y. Zhou, L. Wei, Autophagy protects against palmitate-induced apoptosis in hepatocytes, *Cell Biosci.* 4 (2014) 28. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-28>.
- [253] X. Jiang, X. Chen, J. Wan, H. Gui, X. Ruan, X. Du, Autophagy Protects against Palmitic Acid-Induced Apoptosis in Podocytes in vitro, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42764. <https://doi.org/10.1038/srep42764>.
- [254] M.J. Khan, M. Rizwan Alam, M. Waldeck-Weiermair, F. Karsten, L. Groschner, M. Riederer, S. Hallström, P. Rockenfeller, V. Konya, A. Heinemann, F. Madeo, W.F. Graier, R. Malli, Inhibition of Autophagy Rescues Palmitic Acid-induced Necroptosis of Endothelial Cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 21110–21120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.319129>.
- [255] S. Park, T.S. Oh, S. Kim, E.-K. Kim, Palmitate-induced autophagy liberates monounsaturated fatty acids and increases *Agrp* expression in hypothalamic cells, *Anim. Cells Syst.* 23 (2019) 384–391. <https://doi.org/10.1080/19768354.2019.1696407>.
- [256] A. RostamiRad, S.S.S. Ebrahimi, A. Sadeghi, M. Taghikhani, R. Meshkani, Palmitate-induced impairment of autophagy turnover leads to increased apoptosis and inflammation in peripheral blood mononuclear cells, *Immunobiology* 223 (2018) 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.041>.
- [257] S.H. Tan, G. Shui, J. Zhou, J.J. Li, B.-H. Bay, M.R. Wenk, H.-M. Shen, Induction of Autophagy by Palmitic Acid via Protein Kinase C-mediated Signaling Pathway Independent of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 14364–14376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294157>.
- [258] J. Yin, Y. Wang, L. Gu, N. Fan, Y. Ma, Y. Peng, Palmitate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in mature adipocytes: Implications for apoptosis and inflammation, *Int. J. Mol. Med.* 35 (2015) 932–940. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2085>.

- [259] Q. Tu, R. Zheng, J. Li, L. Hu, Y. Chang, L. Li, M. Li, R. Wang, D. Huang, M. Wu, H. Hu, L. Chen, H. Wang, Palmitic acid induces autophagy in hepatocytes via JNK2 activation, *Acta Pharmacol. Sin.* 35 (2014) 504–512. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.170>.
- [260] E. Wysokińska, W. Kałas, Metody badania autofagii oparte na przemianach białek MAP1LC3 i p62/SQSTM1, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 67 (2013) 442–448. <https://doi.org/10.5604/17322693.1050029>.
- [261] T. Ueno, M. Komatsu, Monitoring Autophagy Flux and Activity: Principles and Applications, *BioEssays* 42 (2020) 2000122. <https://doi.org/10.1002/bies.202000122>.
- [262] M.C. Gomez-Puerto, H. Folkerts, A.T.J. Wierenga, K. Schepers, J.J. Schuringa, P.J. Coffey, E. Vellenga, Autophagy Proteins ATG5 and ATG7 Are Essential for the Maintenance of Human CD34+ Hematopoietic Stem-Progenitor Cells, *Stem Cells* 34 (2016) 1651–1663. <https://doi.org/10.1002/stem.2347>.
- [263] S.R. Yoshii, N. Mizushima, Monitoring and Measuring Autophagy, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1865. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>.
- [264] M.P. Hernández-Cáceres, K. Cereceda, S. Hernández, Y. Li, C. Narro, P. Rivera, P. Silva, Y. Ávalos, C. Jara, P. Burgos, L. Toledo-Valenzuela, P. Lagos, F. Cifuentes Araneda, C. Perez-Leighton, C. Bertocchi, D.J. Clegg, A. Criollo, C. Tapia-Rojas, P.V. Burgos, E. Morselli, Palmitic acid reduces the autophagic flux in hypothalamic neurons by impairing autophagosome-lysosome fusion and endolysosomal dynamics, *Mol. Cell. Oncol.* 7 (2020) 1789418. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1789418>.
- [265] M.P. Hernández-Cáceres, L. Toledo-Valenzuela, F. Díaz-Castro, Y. Ávalos, P. Burgos, C. Narro, D. Peña-Oyarzun, J. Espinoza-Caicedo, F. Cifuentes-Araneda, F. Navarro-Aguad, C. Riquelme, R. Troncoso, A. Criollo, E. Morselli, Palmitic Acid Reduces the Autophagic Flux and Insulin Sensitivity Through the Activation of the Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) in the Hypothalamic Neuronal Cell Line N43/5, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 176. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00176>.
- [266] J. Ling, Y. Kang, R. Zhao, Q. Xia, D.-F. Lee, Z. Chang, J. Li, B. Peng, J.B. Fleming, H. Wang, J. Liu, I.R. Lemischka, M.-C. Hung, P.J. Chiao, KrasG12D-Induced IKK2/β/NF-κB Activation by IL-1α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, *Cancer Cell* 21 (2012) 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.006>.
- [267] C. Song, S.K. Mitter, X. Qi, E. Beli, H.V. Rao, J. Ding, C.S. Ip, H. Gu, D. Akin, W.A. Dunn, C. Bowes Rickman, A.S. Lewin, M.B. Grant, M.E. Boulton, Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy, *PLOS ONE* 12 (2017) e0171940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171940>.
- [268] A. Duran, J.F. Linares, A.S. Galvez, K. Wikenheiser, J.M. Flores, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF-κB Mediator in Tumorigenesis, *Cancer Cell* 13 (2008) 343–354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>.
- [269] A. Schwob, E. Teruel, L. Dubuisson, F. Lormières, P. Verlhac, Y.P. Abudu, J. Gauthier, M. Naoumenko, F.-M. Cloarec-Ung, M. Faure, T. Johansen, H. Dutartre, R. Mahieux, C. Journo, SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF-κB activation through its ubiquitin binding function, *Sci. Rep.* 9 (2019) 16014. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52408-x>.
- [270] D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod, Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *J. Pathol.* 221 (2010) 3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- [271] D. Fang, H. Xie, T. Hu, H. Shan, M. Li, Binding Features and Functions of ATG3, *Front. Cell Dev. Biol.* 9 (2021) 685625. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685625>.

- [272] K. Liu, Q. Zhao, P. Liu, J. Cao, J. Gong, C. Wang, W. Wang, X. Li, H. Sun, C. Zhang, Y. Li, M. Jiang, S. Zhu, Q. Sun, J. Jiao, B. Hu, X. Zhao, W. Li, Q. Chen, Q. Zhou, T. Zhao, ATG3-dependent autophagy mediates mitochondrial homeostasis in pluripotency acquirement and maintenance, *Autophagy* 12 (2016) 2000–2008. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1212786>.
- [273] N. Okai, T. Watanabe, K. Minaga, K. Kamata, H. Honjo, M. Kudo, Alterations of autophagic and innate immune responses by the Crohn's disease-associated *ATG16L1* mutation, *World J. Gastroenterol.* 28 (2022) 3063–3070. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i26.3063>.
- [274] G. Chen, G. Kroemer, O. Kepp, Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020) 200. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00200>.
- [275] R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>.
- [276] S.E. Ehrlicher, H.D. Stierwalt, S.A. Newsom, M.M. Robinson, Short-Term High-Fat Feeding Does Not Alter Mitochondrial Lipid Respiratory Capacity but Triggers Mitophagy Response in Skeletal Muscle of Mice, *Front. Endocrinol.* 12 (2021) 651211. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.651211>.
- [277] A.M. Leidal, H.H. Huang, T. Marsh, T. Solvik, D. Zhang, J. Ye, F. Kai, J. Goldsmith, J.Y. Liu, Y.-H. Huang, T. Monkkonen, A. Vlahakis, E.J. Huang, H. Goodarzi, L. Yu, A.P. Wiita, J. Debnath, The LC3-conjugation machinery specifies the loading of RNA-binding proteins into extracellular vesicles, *Nat. Cell Biol.* 22 (2020) 187–199. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0450-y>.
- [278] J.O. Gardner, A.M. Leidal, T.A. Nguyen, J. Debnath, LC3-dependent EV loading and secretion (LDELS) promotes TFRC (transferrin receptor) secretion via extracellular vesicles, *Autophagy* 19 (2023) 1551–1561. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2140557>.
- [279] J. Streetley, A.-V. Fonseca, J. Turner, N.I. Kiskin, L. Knipe, P.B. Rosenthal, T. Carter, Stimulated release of intraluminal vesicles from Weibel-Palade bodies, *Blood* 133 (2019) 2707–2717. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874552>.
- [280] M. Choroszy, K. Środa-Pomianek, M. Wawrzyńska, M. Chmielarz, E. Bożemska, B. Sobieszczńska, The Role of Palmitic Acid in the Co-Toxicity of Bacterial Metabolites to Endothelial Cells, *Vasc. Health Risk Manag. Volume* 19 (2023) 399–409. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S408897>.
- [281] M.S. Pols, J. Klumperman, Trafficking and function of the tetraspanin CD63, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>.
- [282] S.N. Hurwitz, M.R. Cheerathodi, D. Nkosi, S.B. York, D.G. Meckes, Tetraspanin CD63 Bridges Autophagic and Endosomal Processes To Regulate Exosomal Secretion and Intracellular Signaling of Epstein-Barr Virus LMP1, *J. Virol.* 92 (2018) e01969-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01969-17>.
- [283] A. Bharadwaj, E. Kempster, D.M. Waisman, The Annexin A2/S100A10 Complex: The Mutualistic Symbiosis of Two Distinct Proteins, *Biomolecules* 11 (2021) 1849. <https://doi.org/10.3390/biom11121849>.
- [284] M. Christensen, C. Høgdall, K. Jochumsen, E. Høgdall, Annexin A2 and cancer: A systematic review, *Int. J. Oncol.* (2017). <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4197>.
- [285] V. Dallacasagrande, K.A. Hajjar, Annexin A2 in Inflammation and Host Defense, *Cells* 9 (2020) 1499. <https://doi.org/10.3390/cells9061499>.
- [286] H. Jung, J.S. Kim, W.K. Kim, K.-J. Oh, J.-M. Kim, H.J. Lee, B.S. Han, D.S. Kim, Y.S. Seo, S.C. Lee, S.G. Park, K.-H. Bae, Intracellular annexin A2 regulates NF-κB

- signaling by binding to the p50 subunit: implications for gemcitabine resistance in pancreatic cancer, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1606–e1606. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.558>.
- [287] X. Tian, W. Yang, W. Jiang, Z. Zhang, J. Liu, H. Tu, Multi-Omics Profiling Identifies Microglial Annexin A2 as a Key Mediator of NF- κ B Pro-inflammatory Signaling in Ischemic Reperfusion Injury, *Mol. Cell. Proteomics* 23 (2024) 100723. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2024.100723>.
- [288] Z. Ye, J. Zheng, Verification of the Role of ADAMTS13 in the Cardiovascular Disease Using Two-Sample Mendelian Randomization, *Front. Genet.* 12 (2021) 660989. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.660989>.
- [289] B.M. Mazetto, F.L. Orsi, A. Barnabé, É.V. De Paula, M.C. Flores-Nascimento, J.M. Annichino-Bizzacchi, Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 130 (2012) 889–893. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.09.009>.
- [290] J. Chen, D.W. Chung, Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13, *Blood* 132 (2018) 141–147. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-769000>.
- [291] D. Dymkowska, B. Drabarek, P. Podsiywałow-Bartnicka, J. Szczepanowska, K. Zabłocki, Hyperglycaemia modifies energy metabolism and reactive oxygen species formation in endothelial cells in vitro, *Arch. Biochem. Biophys.* 542 (2014) 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.11.008>.
- [292] D. Dymkowska, B. Drabarek, A. Michalik, N. Nowak, K. Zabłocki, TNF α stimulates NO release in EA.hy926 cells by activating the CaMKK β -AMPK-eNOS pathway, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 106 (2019) 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.11.010>.
- [293] O. Stępińska, D. Dymkowska, Ł. Mateuszuk, K. Zabłocki, Lipopolysaccharide affects energy metabolism and elevates nicotinamide N-methyltransferase level in human aortic endothelial cells (HAEC), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 151 (2022) 106292. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106292>.
- [294] M. Jové, A. Planavila, J.C. Laguna, M. Vázquez-Carrera, Palmitate-Induced Interleukin 6 Production Is Mediated by Protein Kinase C and Nuclear-Factor κ B Activation and Leads to Glucose Transporter 4 Down-Regulation in Skeletal Muscle Cells, *Endocrinology* 146 (2005) 3087–3095. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1560>.
- [295] L.M. Gonçalves, I.M. Valente, J.A. Rodrigues, An Overview on Cardamomin, *J. Med. Food* 17 (2014) 633–640. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0061>.
- [296] D. Israf, T. Khaizurin, A. Syahida, N. Lajis, S. Khozirah, Cardamomin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- κ B nuclear translocation and I κ -B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.04.025>.
- [297] S.-C. Sun, Non-canonical NF- κ B signaling pathway, *Cell Res.* 21 (2011) 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>.
- [298] S. Bhattacharyya, A. Borthakur, P.K. Dudeja, J.K. Tobacman, Lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B non-canonical pathway requires BCL10 serine 138 and NIK phosphorylations, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 3317–3327. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.004>.
- [299] B. Mordmüller, D. Krappmann, M. Esen, E. Wegener, C. Scheidereit, Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- κ B-p52 generation by a co-translational mechanism, *EMBO Rep.* 4 (2003) 82–87. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor710>.
- [300] S. Basak, V.F.-S. Shih, A. Hoffmann, Generation and Activation of Multiple Dimeric Transcription Factors within the NF- κ B Signaling System, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 3139–3150. <https://doi.org/10.1128/MCB.01469-07>.

- [301] V.S. Tanwar, M.A. Reddy, S. Das, V.A. Samara, M. Abdollahi, S. Dey, V. Malek, R. Ganguly, K. Stapleton, L. Lanting, P. Pirrotte, R. Natarajan, Palmitic Acid–Induced Long Noncoding RNA *PARAIL* Regulates Inflammation via Interaction With RNA-Binding Protein ELAVL1 in Monocytes and Macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 43 (2023) 1157–1175. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318536>.
- [302] J.-P. Pradère, C. Hernandez, C. Koppe, R.A. Friedman, T. Luedde, R.F. Schwabe, Negative regulation of NF- κ B p65 activity by serine 536 phosphorylation, *Sci. Signal.* 9 (2016). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2820>.
- [303] J. Meier-Soelch, C. Mayr-Buro, J. Juli, L. Leib, U. Linne, J. Dreute, A. Papantonis, M.L. Schmitz, M. Kracht, Monitoring the Levels of Cellular NF- κ B Activation States, *Cancers* 13 (2021) 5351. <https://doi.org/10.3390/cancers13215351>.
- [304] F. Belinky, N. Nativ, G. Stelzer, S. Zimmerman, T. Iny Stein, M. Safran, D. Lancet, PathCards: multi-source consolidation of human biological pathways, *Database* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1093/database/bav006>.
- [305] H. Husebye, Ø. Halaas, H. Stenmark, G. Tunheim, Ø. Sandanger, B. Bogen, A. Brech, E. Latz, T. Espevik, Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity, *EMBO J.* 25 (2006) 683–692. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600991>.
- [306] K. Miyake, S. Saitoh, R. Sato, T. Shibata, R. Fukui, Y. Murakami, Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors, *J. Leukoc. Biol.* 106 (2019) 853–862. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0119-020R>.
- [307] S. Huang, J.M. Rutkowski, R.G. Snodgrass, K.D. Ono-Moore, D.A. Schneider, J.W. Newman, S.H. Adams, D.H. Hwang, Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2002–2013. <https://doi.org/10.1194/jlr.D029546>.
- [308] J. Asong, M.A. Wolfert, K.K. Maiti, D. Miller, G.-J. Boons, Binding and Cellular Activation Studies Reveal That Toll-like Receptor 2 Can Differentially Recognize Peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative Bacteria, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8643–8653. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806633200>.
- [309] A.-M. Howe, S. Burke, M.E. O'Reilly, F.C. McGillicuddy, D.A. Costello, Palmitic Acid and Oleic Acid Differently Modulate TLR2-Mediated Inflammatory Responses in Microglia and Macrophages, *Mol. Neurobiol.* 59 (2022) 2348–2362. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02756-z>.
- [310] J. Brown, H. Wang, G.N. Hajishengallis, M. Martin, TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk, *J. Dent. Res.* 90 (2011) 417–427. <https://doi.org/10.1177/0022034510381264>.
- [311] S. Chen, C. Lyu, J. Zhou, S. Huang, Y. Zhang, G. Liu, K. Liu, D. Chen, Y. Hu, L. Zhou, Y. Gu, TLR4 signaling pathway mediates the LPS/ischemia-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in microglia, *Neurosci. Lett.* 686 (2018) 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.052>.
- [312] P. Mistry, M.H.W. Laird, R.S. Schwarz, S. Greene, T. Dyson, G.A. Snyder, T.S. Xiao, J. Chauhan, S. Fletcher, V.Y. Toshchakov, A.D. MacKerell, S.N. Vogel, Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 5455–5460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422576112>.
- [313] D. Cao, W. Wang, S. Li, W. Lai, X. Huang, J. Zhou, X. Chen, X. Li, TLR2-Deficiency Promotes Prenatal LPS Exposure-Induced Offspring Hyperlipidemia, *Front. Physiol.* 10 (2019) 1102. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01102>.
- [314] N.-H. Son, D. Basu, D. Samovski, T.A. Pietka, V.S. Peche, F. Willecke, X. Fang, S.-Q. Yu, D. Scerbo, H.R. Chang, F. Sun, S. Bagdasarov, K. Drosatos, S.T. Yeh, A.E.

- Mullick, K.I. Shoghi, N. Gumaste, K. Kim, L.-A. Huggins, T. Lhaxhang, N.A. Abumrad, I.J. Goldberg, Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 4329–4342. <https://doi.org/10.1172/JCI99315>.
- [315] K. De Bock, M. Georgiadou, S. Schoors, A. Kuchnio, B.W. Wong, A.R. Cantelmo, A. Quaegebeur, B. Ghesquière, S. Cauwenberghs, G. Eelen, L.-K. Phng, I. Betz, B. Tembuyser, K. Brepoels, J. Welte, I. Geudens, I. Segura, B. Cruys, F. Bifari, I. Decimo, R. Blanco, S. Wyns, J. Vangindertael, S. Rocha, R.T. Collins, S. Munck, D. Daelemans, H. Imamura, R. Devlieger, M. Rider, P.P. Van Veldhoven, F. Schuit, R. Bartrons, J. Hofkens, P. Fraisl, S. Telang, R.J. DeBerardinis, L. Schoonjans, S. Vinckier, J. Chesney, H. Gerhardt, M. Dewerchin, P. Carmeliet, Role of PFKFB3-Driven Glycolysis in Vessel Sprouting, *Cell* 154 (2013) 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.037>.
- [316] D.P. Ramakrishnan, R.A. Hajj-Ali, Y. Chen, R.L. Silverstein, Extracellular Vesicles Activate a CD36-Dependent Signaling Pathway to Inhibit Microvascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36 (2016) 534–544. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.307085>.
- [317] Y. Chen, J. Zhang, W. Cui, R.L. Silverstein, CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate, *J. Exp. Med.* 219 (2022) e20211314. <https://doi.org/10.1084/jem.20211314>.
- [318] L. Chávez-Sánchez, M.G. Garza-Reyes, J.E. Espinosa-Luna, K. Chávez-Rueda, M.V. Legorreta-Haquet, F. Blanco-Favela, The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans, *Hum. Immunol.* 75 (2014) 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.01.012>.
- [319] Z. Sun, W. Yuan, L. Li, H. Cai, X. Mao, L. Zhang, G. Zang, Z. Wang, Macrophage CD36 and TLR4 Cooperation Promotes Foam Cell Formation and VSMC Migration and Proliferation Under Circadian Oscillations, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 15 (2022) 985–997. <https://doi.org/10.1007/s12265-022-10225-0>.
- [320] N. Matsunaga, N. Tsuchimori, T. Matsumoto, M. Ii, TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules, *Mol. Pharmacol.* 79 (2011) 34–41. <https://doi.org/10.1124/mol.110.068064>.
- [321] T. Kawamoto, M. Ii, T. Kitazaki, Y. Iizawa, H. Kimura, TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain, *Eur. J. Pharmacol.* 584 (2008) 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.026>.
- [322] S.E. Hussey, H. Liang, S.R. Costford, A. Klip, R.A. DeFronzo, A. Sanchez-Avila, B. Ely, N. Musi, TAK-242, a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, unveils similarities and differences in lipopolysaccharide- and lipid-induced inflammation and insulin resistance in muscle cells, *Biosci. Rep.* 33 (2013) e00004. <https://doi.org/10.1042/BSR20120098>.
- [323] M. Ii, M. Sunamoto, M. Uekata, J. Sato, T. Kitazaki, Y. Iizawa, TAK-242, a novel Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, protects mice in Escherichia coli-induced and lipoteichoic acid-induced lethality models, *Crit. Care* 10 (2006) P153. <https://doi.org/10.1186/cc4500>.
- [324] T. Kawamoto, T. Sha, M. Ii, H. Kimura, Selective inhibition of Toll-like receptor 4 signaling by the small molecule TAK-242, *Crit. Care* 10 (2006) P154. <https://doi.org/10.1186/cc4501>.
- [325] Y. Ono, Y. Maejima, M. Saito, K. Sakamoto, S. Horita, K. Shimomura, S. Inoue, J. Kotani, TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice, *Sci. Rep.* 10 (2020) 694. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57714-3>.

- [326] H. Seki, S. Tasaka, K. Fukunaga, Y. Shiraishi, K. Moriyama, K. Miyamoto, Y. Nakano, N. Matsunaga, K. Takashima, T. Matsumoto, M. Ii, A. Ishizaka, J. Takeda, Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury, *Inflamm. Res.* 59 (2010) 837–845. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0195-3>.
- [327] S. Samarpita, J.Y. Kim, M.K. Rasool, K.S. Kim, Investigation of toll-like receptor (TLR) 4 inhibitor TAK-242 as a new potential anti-rheumatoid arthritis drug, *Arthritis Res. Ther.* 22 (2020) 16. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2097-2>.
- [328] Y. Zhang, W. Peng, X. Ao, H. Dai, L. Yuan, X. Huang, Q. Zhou, TAK-242, a Toll-Like Receptor 4 Antagonist, Protects against Aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injury, *PLOS ONE* 10 (2015) e0142456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142456>.
- [329] C. Engelmann, M. Sheikh, S. Sharma, T. Kondo, H. Loeffler-Wirth, Y.B. Zheng, S. Novelli, A. Hall, A.J.C. Kerbert, J. Macnaughtan, R. Mookerjee, A. Habtesion, N. Davies, T. Ali, S. Gupta, F. Andreola, R. Jalan, Toll-like receptor 4 is a therapeutic target for prevention and treatment of liver failure, *J. Hepatol.* 73 (2020) 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.01.011>.
- [330] A. Fellner, Y. Barhum, A. Angel, N. Perets, I. Steiner, D. Offen, N. Lev, Toll-Like Receptor-4 Inhibitor TAK-242 Attenuates Motor Dysfunction and Spinal Cord Pathology in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1666. <https://doi.org/10.3390/ijms18081666>.
- [331] W. Cui, C. Sun, Y. Ma, S. Wang, X. Wang, Y. Zhang, Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 444. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00444>.
- [332] Y. Feng, Y. Ju, Q. Wu, G. Sun, Z. Yan, TAK-242, a toll-like receptor 4 antagonist, against brain injury by alleviates autophagy and inflammation in rats, *Open Life Sci.* 18 (2023) 20220662. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0662>.
- [333] T.W. Rice, A.P. Wheeler, G.R. Bernard, J.-L. Vincent, D.C. Angus, N. Aikawa, I. Demeyer, S. Sainati, N. Amlot, C. Cao, M. Ii, H. Matsuda, K. Mouri, J. Cohen, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis, *Crit. Care Med.* 38 (2010) 1685–1694. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181e7c5c9>.
- [334] S. Carpenter, E.P. Ricci, B.C. Mercier, M.J. Moore, K.A. Fitzgerald, Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 361–376. <https://doi.org/10.1038/nri3682>.
- [335] X. He, Z. Jing, G. Cheng, MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/945169>.
- [336] K. Rothamel, S. Arcos, B. Kim, C. Reasoner, S. Lisy, N. Mukherjee, M. Ascano, ELAVL1 primarily couples mRNA stability with the 3' UTRs of interferon-stimulated genes, *Cell Rep.* 35 (2021) 109178. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109178>.
- [337] E. Latorre, E. Layunta, L. Grasa, J. Pardo, S. García, A.I. Alcalde, J.E. Mesonero, Toll-like receptors 2 and 4 modulate intestinal IL-10 differently in ileum and colon, *United Eur. Gastroenterol. J.* 6 (2018) 446–453. <https://doi.org/10.1177/2050640617727180>.
- [338] S. Nish, R. Medzhitov, Host Defense Pathways: Role of Redundancy and Compensation in Infectious Disease Phenotypes, *Immunity* 34 (2011) 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.009>.

Lista publikacji autorki

Praca, której wyniki weszły w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Seliga AK**, Zabłocki K, Bandorowicz-Pikuła J. 2023. Palmitate Stimulates Expression of the von Willebrand Factor and Modulates Toll-like Receptors Level and Activity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Int. J. Mol. Sci.* 25(1):254. doi: 10.3390/ijms25010254.