

Wpływ białka HMGB1 na barierowe i immunomodulujące właściwości ludzkiego śródbłonka naczyniowego

The effect of HMGB1 on barrier and immunomodulatory properties of human vascular endothelium

ALEKSANDRA LEGĘZA¹, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI¹, EMILIA ŁUCZAK¹, KATARZYNA WOJDAN¹, PAULINA GORZELAK-PABIŚ¹, MACIEJ BOROWIEC^{2,3}, MARLENA BRONCEL¹

¹ Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej Zakładu Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

³ Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Badania finansowane z następujących grantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi: 502-03/5-165-01/502-54-150 oraz 502-03/5-165-01/502-54-162.

Streszczenie

Wprowadzenie. Białko HMGB1 (*high mobility group box 1*) jest sygnałem zagrożenia uwalnianym przez uszkodzone tkanki i indukującym procesy zapalne. Śródbłonek naczyniowy, który tworzy barierę między krwią, a tkanką i jest silnym źródłem prozapalnych cytokin moduluje lokalne procesy immunologiczne.

Cel pracy. Celem badania była ocena wpływu białka HMGB1 na właściwości barierowe i immunomodulujące śródbłonka naczyniowego.

Materiał i metody. Ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC) indukowano białkiem HMGB1 (100 µg/ml, 1 i 2,5 µg/ml) w systemie RTCA-DP w celu oceny jego wpływu na integralność śródbłonka. Ekspresję mRNA okludyny and MCP-1 oceniano po 24 godz. hodowli metodą real-time pcr. Apoptozę komórek śródbłonka oceniano po 24 godz. hodowli metodą cytometrii przepływowej z użyciem zestawu zawierającego Annexynę V-FITC i jodek propydydny (PI).

Wyniki. Białko HMGB1 obniżyło wartość wskaźnika nCI śródbłonka naczyniowego hodowanego w systemie RTCA-DP w ciągu pierwszych 12 godz. hodowli, podczas gdy w 24 godz. wskaźnik nCI był porównywalny z hodowlą spontaniczną. HMGB1 w stężeniu 0,1 µg/ml spowodowało spadek ekspresji mRNA okludyny o 50% ($p < 0.01$), podczas gdy w stężeniu 1 i 2,5 µg/ml zaobserwowano blisko 2-krotny wzrost tej ekspresji ($p < 0.05$) w porównaniu do kontroli spontanicznej. Nie zaobserwowano wpływu HMGB1 na odsetek komórek żywych oraz puli komórek apoptotycznych. Białko HMGB1 spowodowało 2-krotny wzrost ekspresji mRNA MCP-1 ($p < 0.05$).

Wniosek. HMGB1 uwalniane w wyniku uszkodzenia tkanek może indukować procesy zapalne poprzez krótkotrwałe zmniejszenie integralności śródbłonka naczyniowego oraz zwiększenie ekspresji czynników chemotaktycznych.

Słowa kluczowe: HMGB1, śródbłonek naczyniowy, zapalenie, właściwości barierowe, okludyna

Summary

Introduction. High mobility group box 1 (HMGB1) is a protein belonging to the "danger signals". It is released by injured tissues and it induces inflammatory processes. Vascular endothelium, which serves as a barrier between the blood and tissues, is a potent source of proinflammatory chemokines, thus modulating local immune responses.

Aim. The aim of the study was to assess the effect of HMGB1 on endothelial integrity and its chemotactic properties.

Material and methods. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were induced with HMGB1 (0.1 µg/ml, 1 i 2.5 µg/ml) in RTCA-DP system in order to assess its effect on the barrier functions of endothelium. Occludin and MCP-1 mRNA expression was analyzed in real-time pcr after 24 hours of the culture. Apoptosis of endothelial cells was assessed in flow cytometry with use of Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) kit.

Results. HMGB1 decreased nCI index of HUVEC in RTCA-DP system during first 12 hours of incubation, whereas in hour 24 nCI index was comparable to the spontaneous control. HMGB1 in concentration 100 µg/ml decreased occludin mRNA expression; whereas in higher concentrations (1 i 2.5 µg/ml) HMGB1 caused significant increase of occludin mRNA expression in HUVEC. We did not observe the effect of HMGB1 on apoptosis. Finally, HMGB1 caused twofold increase of MCP-1 mRNA expression in HUVEC.

Conclusion. HMGB1, which is released during tissue injury, may induce inflammatory processes by the decrease of endothelial integrity and the increase of chemotactic mediators expression.

Keywords: HMGB1, vascular endothelium, inflammation, barrier functions, occludin

Wykaz skrótów:

DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem

EGM-2 (*endothelial growth medium-2*) – medium wzrostu śródbłonna-2

HMGB1 (*high mobility group box1*) – białko grupy wysokiej mobilności-1

HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) – ludzkie komórki śródbłonna naczyniowego z żyły pępowinowej

ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) – międzykomórkowa cząstka adhezyjna-1

IFN- γ (interferon- γ) – interferon-gamma

MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) – chemokina dla monocytów-1

nCI (*normalized cell index*) – znormalizowany indeks komórkowy

WSTĘP

Białko HMGB1 (*high mobility group box 1*) to niehistonowe, zasadowe białko chromosomalne o dużej ruchliwości elektroforetycznej [1]. Zbudowane jest z 3 domen: A, B i C, składających się z 215 aminokwasów, kodowanych przez gen zlokalizowany w rejonie chromosomu 13q12 [2,3]. Występuje i oddziałuje zarówno w jądrze komórkowym, jak i w przestrzeni pozakomórkowej, do której uwalniane jest w sposób aktywny w efekcie oddziaływania czynników prozapalnych, takich jak: czynnik martwicy nowotworów- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ) czy endotoksyny (lipopolisacharyd, LPS), oraz w sposób bierny z uszkodzonych komórek podlegających nekrozie [4-7].

HMGB1 zalicza się do grupy tzw. „sygnałów zagrożenia” (*danger signals*), zwanych również „wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem” (*damage associated molecular patterns*, DAMPs) [8]. Jego rolą jest pobudzanie procesów immunologicznych niezbędnych do rozwoju stanu zapalnego i eliminacji zagrożenia. Oddziałując poprzez receptory RAGE (*receptors for advanced glycation and products*) i TLR (*toll like receptors*) obecne w błonie komórek immunologicznych i śródbłonna naczyniowego, HMGB1 zachowuje się jak prozapalna cytokina [6,7]. Aktywuje makrofagi, monocyty, neutrofile i limfocyty Th, nasila ich chemotaksję oraz zwiększa syntezę szeregu mediatorów prozapalnych (IL-1, IL-6, IL-8) [6,9-11]. W komórkach śródbłonna nasila produkcję IL-8 i TNF- α oraz ekspresję cząstek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 [3,6]. Pobudzając migrację i proliferację komórek macierzystych oraz inicjując proces angiogenezy, bierze udział w regeneracji i odbudowie uszkodzonych tkanek [12,13]. Podwyższony poziom białka HMGB1 obserwuje się w surowicy pacjentów ze wstrząsem septycznym, chorobami nowotworowymi i autoimmunologicznymi [14,15].

Śródbłonek naczyniowy pokrywający wewnętrzną powierzchnię naczyń krwionośnych tworzy barierę kontrolującą wymianę związków chemicznych i komórek immunologicznych między krwią, a tkanką. Przepuszczalność śródbłonna podlega regulacji przez endo- i egzogenne czynniki, takie jak prozapalne cytokiny (TNF- α , IFN- γ , VEGF, IL-33, IL-4), składniki ściany bakterii Gram-ujemnych (LPS) oraz utlenione formy cholesterolu [16,20]. Za właściwości barierowe śródbłonna odpowiedzialne są połączenia ścisłe (*tight junctions*) zbudowane z okludyny (*occludin*), ZO-1 (*Zonu-*

no (*nitric oxide*) – tlenek azotu

RAGE (*receptors for advanced glycation and products*) – receptory końcowych produktów I zaawansowanej glikacji

RTCA-DP (*Real-time Cell Electric Impedance Sensing system*) – system oceny impedancji elektrycznej w czasie rzeczywistym

TLR (*toll like receptors*) – receptory Toll-podobne

TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) – czynnika martwicy nowotworów-alfa

TNS (*trypsin neutralizing solution*) – roztwór neutralizujący trypsynę

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) – cząstka adhezyjna komórek naczyniowych

la occludens-1) i białek z rodziny kładyn (*claudins*), oraz połączenia adherentne (*adherens junctions*), w skład których wchodzi VE-kadheryna (*VE-cadherin*). Białka te obecne w błonie komórkowej zwierają sąsiadujące ze sobą komórki, dzięki czemu tworzą one ścisłą monowarstwę [18].

Do aktywacji śródbłonna naczyniowego oraz fizjologicznego wzrostu jego przepuszczalności dla związków chemicznych i komórek immunologicznych dochodzi w trakcie procesów zapalnych, niezbędnych w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki lub infekcje. Śródbłonek inicjuje bowiem i podtrzymuje zjawiska naprawcze prowadzące do rezolucji zapalenia, odbudowy uszkodzonych tkanek narządu i przywrócenia jego prawidłowego funkcjonowania [21]. Natomiast nadmierne, niekontrolowane i przewlekłe zwiększenie przepuszczalności śródbłonna może przyczyniać się do patologicznej destabilizacji lokalnej homeostazy, co – jeśli ma miejsce w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) czy siatkówce oka w przebiegu cukrzycy – może stanowić jeden z elementów mechanizmu rozwoju stwardnienia rozsianego czy retinopatii cukrzycowej [22,23].

Celem tego badania była ocena wpływu białka HMGB1 na właściwości barierowe śródbłonna naczyniowego oraz jego potencjał do regulowania procesów zapalnych. Wyniki badania wykazały, że HMGB1 może obniżać barierę śródbłonkową, nie wpływa na apoptozę komórek śródbłonna i zwiększa syntezę mediatorów odpowiedzialnych za migrację komórek immunologicznych, przyczyniając się w ten sposób do rozwoju zapalenia.

MATERIAŁ I METODY

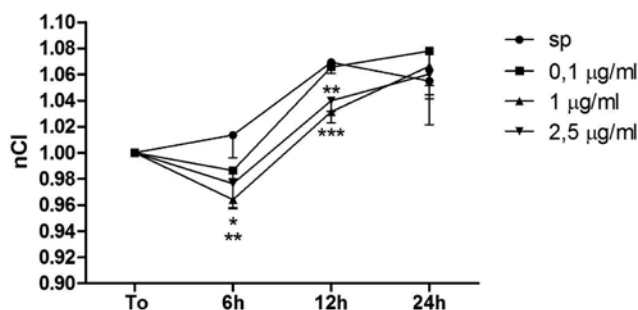
Komórki

Pierwotne ludzkie komórki śródbłonna naczyniowego żyły pępowinowej (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) (Lonza, C2517A) rozproliferowywano w medium *Endothelial Basal Medium-2* (EGM-2) (Lonza, Clonetics, CC-3162) uzupełnionym EGM-2 BulletKit (Lonza, Clonetics, CC-3156 and 4176). Po uzyskaniu 80-90% konfluencji komórki HUVEC trypsynizowano 0,05% trypsyną z 0,02% EDTA (SAFC Biosciences, 59417C) przez 4 minuty, a następnie neutralizowano roztworem neutralizującym trypsynę (TNS) (Clonetics, Lonza, CC-5002) w celu uzyskania zawiesiny komórkowej gotowej do wysiania komórek celem wykonania doświadczeń.

Hodowla HUVEC w systemie *Real-time Cell Electric Impedance Sensing system* (RTCA-DP)

Hodowla HUVEC w systemie *Real-time Cell Electric Impedance Sensing system* (RTCA-DP) umożliwia ocenę integralności monowarstwy komórek adherentnych w czasie rzeczywistym na podstawie oporu elektrycznego generowanego przez tę monowarstwę (impedancja). Impedancja wyrażona jest w jednostkach tzw. *Cell Index* (CI), który odzwierciedla właściwości barierowe, przepuszczalność, liczebność żywych komórek, ich adhezję oraz morfologię. Na wykresie ukazane są wartości tzw. „znormalizowanego” *Cell Index* (nCI), który uzyskuje się poprzez podzielenie wartości CI w danym punkcie czasowym przez wartość CI w referencyjnym punkcie czasowym (ryc. 1). W przypadku tych doświadczeń referencyjny punkt czasowy stanowił ostatni pomiar CI przed indukcją komórek śródbłonka białkiem HMGB1.

Strypsyzowane komórki HUVEC wysiano na płytce E-16 o gęstości 10,000 komórek na dołek w pełnowartościowym medium EGM-2. HUVEC osiągnęły pełną konfluencję oraz stabilną fazę plateau po 24 godz. hodowli. Następnie komórki zaindukowano białkiem HMGB1 w trzech stężeniach (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$) (1690-HM-025, R&D Systems). Okres monitorowania impedancji wynosił 24 godziny. Do analizy statystycznej wybrano następujące punkty czasowe: 6, 12 i 24 godz. Optymalne stężenia HMGB1 oraz czas obserwacji zastosowane w badaniu wybrano na podstawie badań pilotażowych.



Ryc. 1. Analiza integralności śródbłonka naczyniowego krwi pępowinowej (HUVEC) indukowanych HMGB1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$) w systemie RTCA-DP; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 9$ z 3 niezależnie przeprowadzonych eksperymentów

Indukcja HUVEC białkiem HMGB1 w tradycyjnej hodowli

Strypsyzowane komórki HUVEC wysiano na 24-dołkową płytkę o gęstości 50,000 na dołek w pełnowartościowym medium EGM-2. Po uzyskaniu pełnej konfluencji komórki indukowano rekombinowanym ludzkim HMGB1 w trzech stężeniach (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$) (1690-HM-025, R&D Systems). Po 24-godzinnej stymulacji zakończono hodowlę, oznaczono apoptozę lub zebrano materiał komórkowy i zabezpieczono w buforze RLT z dodatkiem β -merkaptioetanolu w -80°C w celu oznaczenia ekspresji mRNA wybranych czynników metodą *Real-time pcr*.

Ocena ekspresji mRNA w HUVEC metodą *Real-time pcr*

mRNA z materiału komórkowego po hodowli wyizolowano za pomocą kolumn RNAesy (Qiagen) zgodnie z pro-

tokółem producenta. Stężenie uzyskanego mRNA oceniano poprzez pomiar absorbancji przy długości światła 260 nm. Na podstawie stosunku absorbancji przy długości światła 260/280 nm oceniano czystość wyizolowanego mRNA. Następnie mRNA zabezpieczano w temperaturze -80°C w celu przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji. Odwrotną transkrypcję przeprowadzano z użyciem kitu i primerów random (*High-Capacity cDNA reverse transcription kit*, Pharmingen) na podstawie protokołu producenta. Ekspresję mRNA okludyny i MCP-1 oznaczano w urządzeniu Agilent Technologies stratagene Mx3005P. Jako gen referencyjny zastosowano *elongation factor - 1 α* (EF-1 α). Do oceny ekspresji mRNA EF-1 α zastosowano primery: FW 5'-CTG AAC CAT CCA GGC CAA AT-3', RV 5'-GCC GTG TGG CAA TCC AAT-3'. Do oceny ekspresji okludyny zastosowano następującą parę primerów: FW 5'-GAT GAG CAG CCC CCC AAT-3' i RV 5'-GGT GAA GGC ACG TCC TGT GT-3'. Do oceny ekspresji MCP-1 zastosowano następującą parę primerów: FW 5'-AGT CTC TGC CGC CCT TCT-3' i RV 5'-GTG ACT GGG GCA TTG ATT G-3'. Dla każdej analizowanej próby obliczano średnią wartość C_t dla genu referencyjnego EF-1 α uzyskaną po przeprowadzeniu reakcji *real-time pcr*. Kolejno dla każdej próby obliczano wartość ΔC_t odrębnie dla każdego z badanych genów poprzez odjęcie od wartości C_t danej próby wartości średniej C_t dla genu referencyjnego w danej próbie. Następnie dla każdego z badanych genów wyprowadzano wartość $\Delta\Delta C_t$, poprzez różnicę pomiędzy wartością ΔC_t danego genu w danej próbie a średnią wartością C_t tego genu obliczoną dla prób z układów niestymulowanych (kontrolnych). Obliczając krotność zmiany ekspresji dla każdego genu z badanych prób uzyskane wartości podstawiano do wzoru $2^{\Delta\Delta C_t}$.

Ocena apoptozy HUVEC metodą cytometrii przepływowej

W celu oceny wpływu HMGB1 na apoptozę komórki HUVEC były indukowane HMGB1 (1690-HM-025, R&D Systems) w stężeniach 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$. W 24 godz. stymulacji HMGB1 komórki zostały strypsyzowane w celu oceny apoptozy. Apoptozę HUVEC oceniono za pomocą cytometru przepływowego Beckman-Coulter FC500 (Szpital im. Władysława Biegańskiego) przy użyciu Anneksyny V-FITC oraz jodku propydydny (PI) (*FITC-Annexin V Apoptosis detection kit*, BD Pharmingen, 556547) zgodnie z protokołem producenta. Komórki Anneksyna V(-)PI(-) uznawano jako żywe, natomiast pulę komórek Anneksyna V(+PI(-) i Anneksyna V(+PI(+)) uznawano jako apoptotyczne. Komórki Anneksyna(+PI(+)) uznawano jako komórki w późnej fazie apoptozy.

Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM. Rozkład poszczególnych zmiennych zweryfikowano testem W Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji sprawdzano testem Leven'a. W przypadku rozkładu normalnego i nieróżniących się wariancji istotność różnic opisano testem t Studenta dla prób niezależnych, a gdy przynajmniej jedno z wyżej wymienionych kryteriów nie było spełnione, stosowano test U Manna-Whitney'a. Do analiz wykorzystano program Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK., USA).

WYNIKI

Wpływ HMGB1 na barierowe właściwości HUVEC w systemie *Real-time Cell Electric Impedance Sensing system* (RTCA-DP)

Białko HMGB1 to czynnik zagrożenia uwalniany przez uszkodzone tkanki. Celem badania była ocena jego wpływu

na właściwości barierowe śródbłonka naczyniowego (ryc. 1). Białko HMGB1 w stężeniach 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$ spowodowało nieznaczny, ale istotnie statystyczny spadek integralności śródbłonka w stosunku do hodowli kontrolnej zarówno w 6 godz., (nCI średnia \pm SEM odpowiednio: $0,96 \pm 0,007$; $0,97 \pm 0,01$ versus $1,01 \pm 0,01$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$), jak i w 12 godz. stymulacji (nCI średnia \pm SE odpowiednio: $1,03 \pm 0,008$; $1,04 \pm 0,008$ versus $1,07 \pm 0,008$, $p < 0,001$ i $p < 0,01$). Efekt ten był jednak krótkotrwały, bowiem w 24 godz. inkubacji wartości nCI śródbłonka indukowanego białkiem HMGB1 nie różniły się od wartości obserwowanych w kontrolnej hodowli spontanicznej (nCI średnia \pm SEM odpowiednio: $1,06 \pm 0,02$; $1,06 \pm 0,01$ versus $1,05 \pm 0,03$; $p > 0,05$). HMGB1 w stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ nie wpłynęło na integralność śródbłonka. Wyniki badania wskazują, że białko HMGB1 może powodować krótkotrwałą destabilizację integralności śródbłonka naczyniowego.

Wpływ HMGB1 na ekspresję mRNA okludyny w HUVEC

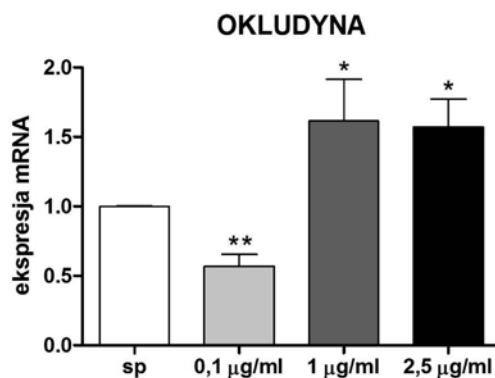
W celu analizy mechanizmu zmniejszenia integralności śródbłonka naczyniowego przez HMGB1 zaobserwowanego w poprzednim badaniu dokonano oceny ekspresji mRNA okludyny – jednego z białek budujących połączenia ścisłe (ryc. 2). W tym celu HUVEC indukowano białkiem HMGB1 w stężeniach 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 oraz 2,5 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny. Ekspresja mRNA okludyny w HUVEC poddanych działaniu HMGB1 w większych stężeniach była 2-krotnie większa w porównaniu z kontrolą spontaniczną. Natomiast białko HMGB1 w najniższym stężeniu spowodowało 50% spadek ekspresji mRNA okludyny. Powyższe wyniki wskazują, że HMGB1 zmniejsza integralność śródbłonka naczyniowego podczas pierwszych 12 godzin indukcji. Zniesieniu wpływu HMGB1 na integralność obserwowanemu w 24 godzinie stymulacji towarzyszy paradoksalny wzrost ekspresji mRNA dla okludyny.

Wpływ HMGB1 na apoptozę HUVEC

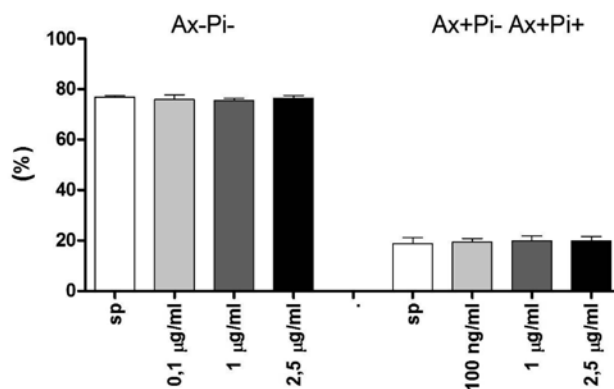
Dezintegracja śródbłonka naczyniowego może wynikać ze śmierci jego komórek prowadzącej do uszkodzenia monowarstwy. Stąd w następnym etapie badania zanalizowano wpływ białka HMGB1 na apoptozę HUVEC (ryc. 3). Białko HMGB1 w żadnym ze stężeń (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ i 2,5 $\mu\text{g/ml}$) nie wpłynęło na odsetek komórek żywych w porównaniu z hodowlą spontaniczną (Ax-Pi- średnia \pm SEM: $75,93 \pm 1,89$; $75,5 \pm 0,93\%$ i $76,35 \pm 1,2\%$ versus $76,88 \pm 0,69\%$; $p > 0,05$) (ryc. 3). Nie odnotowano też wpływu HMGB1 na odsetek komórek apoptotycznych (suma odsetków komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy) w stosunku do hodowli spontanicznej (Ax+Pi- + Ax+Pi+ średnia \pm SEM: $19,38 \pm 1,4$; $19,85 \pm 1,9\%$ i $19,90 \pm 1,8\%$ versus $18,75 \pm 2,36\%$; $p > 0,05$) (ryc. 3).

Wpływ HMGB1 na ekspresję MCP-1 przez HUVEC

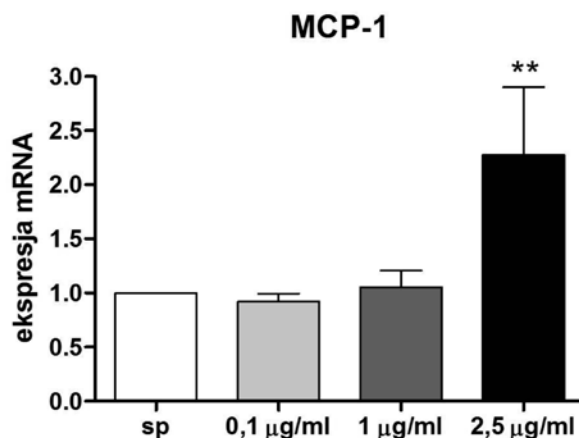
W celu oceny wpływu HMGB1 na aktywację zapalną śródbłonka naczyniowego komórki HUVEC indukowano białkiem HMGB1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$) przez 24 godziny, a następnie oceniono ekspresję mRNA MCP-1 (ryc. 4). HMGB1 w największym stężeniu spowodowało ponad dwukrotny wzrost ekspresji mRNA MCP-1 (ryc. 4). Powyższe wyniki wskazują, że HMGB1 posiada właściwości aktywujące śródbłonek naczyniowy do wydzielania chemokin, regulując w ten sposób jego immunomodulujące właściwości.



Ryc. 2. Analiza ekspresji mRNA okludyny w komórkach śródbłonka naczyniowego krwi pępowinowej (HUVEC) indukowanych HMGB1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, wykres przedstawia wartości ekspresji mRNA w komórkach śródbłonka indukowanych HMGB-1 znormalizowane względem kontroli (komórki niestymulowane); $n = 8$ z 3 niezależnie przeprowadzonych eksperymentów; *Real-time pcr*



Ryc. 3. Analiza apoptozy komórek śródbłonka naczyniowego krwi pępowinowej (HUVEC) indukowanych HMGB1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$); Ax-Pi-: komórki żywe, Ax+Pi-+Ax+Pi+: pula komórek podlegających apoptozie, $n = 5$ z 3 niezależnie przeprowadzonych eksperymentów; cytometria przepływową



Ryc. 4. Analiza ekspresji mRNA MCP-1 w komórkach śródbłonka naczyniowego krwi pępowinowej (HUVEC) indukowanych HMGB1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$); ** $p < 0,01$, wykres przedstawia wartości ekspresji mRNA w komórkach śródbłonka indukowanych HMGB-1 znormalizowane względem kontroli; $n = 8$ z 3 niezależnie przeprowadzonych eksperymentów; *Real-time pcr*

DYSKUSJA

Wyniki uzyskane w badaniu wskazują, że białko HMGB1 może destabilizować barierę śródbłonka naczyniowego. Spadek integralności śródbłonka pod wpływem HMGB1 odnotowany w badaniu był krótkotrwały, bowiem mimo różnic obserwowanych w 6 i 12 godz. hodowli, wartości nCl śródbłonka indukowanego HMGB1 po 24 godz. dorównywały wartościom kontroli spontanicznej (ryc. 1). Spadek integralności śródbłonka na skutek oddziaływania HMGB1 może ułatwiać przedostawanie się związków chemicznych i cytokin uwalnianych przez uszkodzoną tkankę do krwioobiegu oraz ich oddziaływanie na komórki immunologiczne we krwi, przyczyniając się do rozwoju procesów zapalnych.

W celu oceny mechanizmu spadku integralności śródbłonka wywołanego przez HMGB1 oznaczono ekspresję mRNA okludyny, białka połączenia ścisłego. Wyniki badania wykazały, że w komórkach śródbłonka indukowanych białkiem HMGB1 w stężeniach 1 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ekspresja mRNA okludyny była po 24 godz. inkubacji istotnie wyższa w porównaniu z komórkami kontrolnymi (ryc. 2). Powyższy wynik sugeruje, że spadek integralności śródbłonka wywołany przez HMGB1 w początkowym okresie indukcji mógł spowodować włączenie mechanizmów kompensacyjnych, polegających na reaktywnym zwiększeniu ekspresji okludyny i w efekcie odbudowę integralności śródbłonka. Co ciekawe, białko HMGB1 w najniższym stężeniu spowodowało spadek ekspresji mRNA okludyny w komórkach śródbłonka, czemu nie towarzyszyło zmniejszenie integralności monowarstwy. Wybór 24 godz. do oceny ekspresji mRNA dla okludyny wiązał się z zaobserwowanym w tym punkcie czasowym zniwelowaniem spadku integralności monowarstwy śródbłonka naczyniowego w obecności białka HMGB-1.

Zaburzenie bariery indukowane przez HMGB1 porównywalne z odnotowanym w naszym badaniu zaobserwowano również na bydłęcym śródbłonku naczyń krwionośnych siatkówki; towarzyszył mu jednakże spadek ekspresji białek połączeń ścisłych [24]. Wykazano też, że surowice pacjentów ze wstrząsem septycznym indukowały wzrost przepuszczalności śródbłonka *in vitro* dzięki obecności białka HMGB1 generowanego w trakcie wstrząsu i efekcie

obecnego w tych surowicach [25]. Wpływ białka HMGB1 na wzrost przepuszczalności śródbłonka zaobserwował też Huang i wsp. [26].

W następnym etapie badania zadaliśmy pytanie o wpływ HMGB1 na apoptozę komórek śródbłonka w kontekście regulacji jego właściwości barierowych. Wyniki badania wykazały, że odsetek zarówno komórek żywych, jak i podlegających apoptozie, był w przypadku indukcji białkiem HMGB1 porównywalny do hodowli spontanicznej (ryc. 3). Co więcej, nie zaobserwowano również zmian odsetek komórek ani we wczesnej, ani w późnej fazie apoptozy. Uzyskany wynik wskazuje, że apoptoza nie jest mechanizmem destabilizacji integralności śródbłonka naczyniowego przez HMGB1. Inni autorzy wykazali, że HMGB1 może indukować apoptozę w komórkach kardiomiocytów i komórkach śródbłonka naczyniowego siatkówki [27,28].

Śródbłonek naczyniowy jest źródłem wielu cytokin i chemokin, dzięki którym może on w odpowiedzi na szereg bodźców modulować procesy zapalne zachodzące w tkankach. Części adhezyjne obecne na jego powierzchni umożliwiają migrację komórek immunologicznych z krwi do tkanki. Celem kolejnego etapu badania była ocena wpływu HMGB1 na ekspresję MCP-1 (ryc. 4). MCP-1 to chemokina odpowiedzialna za migrację monocytów z krwi do tkanek, uwalniana w wyniku uszkodzenia tkanek lub infekcji. Wyniki obecnego badania wykazały, że białko HMGB1 zwiększa ekspresję MCP-1 w komórkach śródbłonka naczyniowego. Dzięki uwolnieniu MCP-1 i innych chemokin ze śródbłonka naczyniowego białko HMGB1 może przyczynić się do nasilenia migracji komórek immunologicznych z krwi do uszkodzonej tkanki, umożliwiając w ten sposób rozwój procesów zapalnych w początkowym okresie uszkodzenia [29].

Podsumowując, białko HMGB1 uwalniane w wyniku uszkodzenia tkanek może indukować procesy zapalne poprzez krótkotrwałe zmniejszenie integralności śródbłonka naczyniowego oraz zwiększenie ekspresji czynników chemotaktycznych. Ze względu na brak analizy wpływu HMGB-1 na okludynę oraz MCP-1 na poziomie białka, interpretacja wyników powinna być ostrożna oraz wymaga uzupełnienia w przyszłych badaniach.

Piśmiennictwo

1. Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002;72: 1084-91.
2. Lamore SD, Cabello CM, Wondrak GT. HMGB1-directed drug discovery targeting cutaneous inflammatory dysregulation. *Curr Drug Metab* 2010; 11: 250-65.
3. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331-42.
4. Jiang W, Pisetsky DS. The role of IFN-alpha and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide. *J Immunol* 2006; 177: 3337-43.
5. Tsung A, Sahai R, Tanaka H i wsp. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135-43.
6. Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy*; 113: 163-71.
7. Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity* 2007; 40: 285-9.
8. Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM i wsp. Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 315941.
9. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1-8.
10. Messmer D, Yang H, Telusma G i wsp. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 173: 307-13.
11. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B i wsp. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol* 2005; 174: 7506-15.
12. Mitola S, Belleri M, Urbinati C i wsp. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol* 2006; 176: 12-15.
13. Schlueter C, Weber H, Meyer B i wsp. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol* 2005; 166: 1259-63.

14. Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A i wsp. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 564-73.
15. Pilzweger C, Holdenrieder S. Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases. *Diagnostics (Basel)* 2015; 5: 219-53.
16. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 8-15.
17. Chalubinski M, Zemanek K, Skowron W i wsp. The effect of 7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol on the integrity of the human aortic endothelial and intestinal epithelial barriers. *Inflamm Res* 2013; 62: 1015-23.
18. Chiba H, Osanai M, Murata M i wsp. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 588-600.
19. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005; 437: 497-504.
20. Chalubinski M, Wojdan K, Luczak E i wsp. IL-33 and IL-4 impair barrier functions of human vascular endothelium via different mechanisms. *Vascul Pharmacol* 2015; 73: 57-63.
21. Fisher M. Injuries to the vascular endothelium: vascular wall and endothelial dysfunction. *Rev Neurol Dis* 2008; 5: S4-11.
22. Schmitz J, Owyang A, Oldham E i wsp. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005; 23: 479-90.
23. Blecharz KG, Haghikia A, Stasiolek M i wsp. Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16: 293-302.
24. Mohammad G, Siddiquei MM, Othman A i wsp. High-mobility group box-1 protein activates inflammatory signaling pathway components and disrupts retinal vascular-barrier in the diabetic retina. *Exp Eye Res* 2013; 107: 101-9.
25. Zheng YJ, Xu WP, Ding G i wsp. Expression of HMGB1 in septic serum induces vascular endothelial hyperpermeability. *Mol Med Rep* 2016; 13: 513-21.
26. Huang W, Liu Y, Li L i wsp. HMGB1 increases permeability of the endothelial cell monolayer via RAGE and Src family tyrosine kinase pathways. *Inflammation* 2012; 35: 350-62.
27. Ouyang F, Huang H, Zhang M i wsp. HMGB1 induces apoptosis and EMT in association with increased autophagy following H/R injury in cardiomyocytes. *Int J Mol Med* 2016; 37: 679-89.
28. Yu Y, Yang L, Lv J i wsp. The role of high mobility group box 1 (HMGB-1) in the diabetic retinopathy inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 6807-13.
29. Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, Siddiquei MM. High-Mobility Group Box-1 Modulates the Expression of Inflammatory and Angiogenic Signaling Pathways in Diabetic Retina. *Curr Eye Res* 2015; 40: 1141-52.