

Oksana Stępińska

**Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej w odpowiedzi
metabolicznej komórek śródbłónka wywołanej
lipopolisacharydem**

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

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Krzysztof Zabłocki

Warszawa, 2024

Badania opisane w niniejszej pracy zostały częściowo sfinansowane w ramach konsorcyjnego projektu badawczego **Narodowego Centrum Nauki 2015/19/B/NZ3/02302** „Rola N-metylotransferazy nikotynoamidowej (NNMT) i mechanizmów mitochondrialnych w dysfunkcji śródbłonna”

Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w:

Stępińska, O., Dymkowska, D., Mateuszuk, Ł., & Zabłocki, K. (2022). Lipopolysaccharide affects energy metabolism and elevates nicotinamide N-methyltransferase level in human aortic endothelial cells (HAEC). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 151, 106292. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106292>

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	5
Streszczenie	9
Abstract	11
1. Wstęp	13
1.1. Charakterystyka i funkcje śródbłonka naczyń krwionośnych	13
1.1.1. Mitochondria w komórkach śródbłonka naczyniowego	16
1.2. Sepsa.....	19
1.2.1. Bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) jako czynnik wywołujący sepsę	20
1.2.2. Rola śródbłonka naczyniowego w sepsie.....	21
1.3. NNMT	22
1.3.1. Rola NNMT w wątrobie i tkance tłuszczowej.....	24
1.3.2. Rola NNMT w stanach zapalnych.....	26
1.3.3. NNMT a nowotwory	28
1.3.4. Rola NNMT w śródbłonku naczyń krwionośnych	29
2. Założenia i cel pracy.....	32
3. Metodologia.....	33
3.1. Hodowla komórek	33
3.2. Model doświadczalny	34
3.3. Wyciszanie genu <i>NNMT</i> metodą si-RNA (małe interferujące RNA).....	34
3.4. Wykrywanie białek metodą Western Blot.....	34
3.4.1. Otrzymywanie lizatów komórkowych.....	34
3.4.2. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych.....	35
3.4.3. Elektroforeza SDS-PAGE	35
3.4.4. Transfer białek na błonę z polifluorku winylidenu (PVDF).....	35
3.4.5. Wizualizacja białek na błonie.....	36
3.4.6. Usuwanie przeciwciał z błony PVDF („stripping”)	37
3.5. Oznaczanie stężenia białka w próbach	38
3.5.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda.....	38
3.5.2. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry’ego	38
3.6. Pomiar masy mitochondrialnej.....	39
3.7. Wykrywanie reaktywnych form tlenu (RFT)	39

3.8.	Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej.....	40
3.9.	Oznaczanie metabolitów metodą HPLC i spektrometrii mas	41
3.9.1.	Oznaczanie metabolitów oraz nukleotydów adeninowych metodą HPLC-MS.....	41
3.9.2.	Oznaczanie NAD ⁺ metodą HPLC.....	41
3.9.3.	Oznaczanie nikotynamidu w pożywce hodowlanej.....	42
3.10.	Ocena pojemnościowego napływu wapnia.....	42
3.11.	Immunocytochemia.....	43
3.11.1.	Barwienie mitochondriów	43
3.11.2.	Barwienie lizosomów.....	44
3.11.3.	Barwienie metylowanej i acetylowanej lizyny 9 histonu 3	44
3.12.	Pomiar szybkości zużywania tlenu.....	44
3.12.1.	Pomiar przy pomocy urządzenia Oroboros-2k	44
3.12.2.	Pomiar przy pomocy Seahorse XFe96 Analyzer.....	45
3.13.	Analiza wyników	46
4.	Wyniki	47
4.1.	Ustalenie warunków doświadczalnych i ogólna charakterystyka komórek HAEC traktowanych LPS, ze szczególnym uwzględnieniem mitochondriów	47
4.1.1.	Metabolizm energetyczny komórek HAEC.....	52
4.2.	Wpływ wyciszenia ekspresji genu kodującego <i>NNMT</i> na wybrane aspekty odpowiedzi komórek HAEC na LPS	57
4.2.1.	Białka stresu oksydacyjnego i prozapalne cząsteczki adhezyjne	63
4.2.2.	Mitochondria i metabolizm energetyczny komórek HAEC	67
4.2.2.1.	Organizacja sieci mitochondrialnej w komórkach (architektura mitochondriów). 67	
4.2.2.2.	Metabolity glikolizy i cyklu Krebsa oraz fosfonukleozydów	74
4.2.3.	Pomiar napływu pojemnościowego wapnia w komórkach HAEC	78
4.2.3.1.	Aktywacja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu	80
4.2.4.	Wpływ wyciszenia genu kodującego <i>NNMT</i> na markery odpowiedzi na LPS niezwiązane bezpośrednio z metabolizmem energetycznym.....	80
4.2.4.1.	<i>NNMT</i> a markery autofagii i stresu siateczki śródplazmatycznej	81
5.	Dyskusja	89
6.	Podsumowanie	111
7.	Wnioski.....	113
8.	Piśmiennictwo	114

WYKAZ SKRÓTÓW

2OG	- 2-oksoglutaran
ACC	- karboksylaza acetylo-CoA
ADMA	- asymetryczna dimetyloarginina
Akt	- kinaza białkowa Akt (kinaza białkowa B)
AMPK	- kinaza aktywowana 5' AMP
AngI	- angiotensyna I
AngII	- angiotensyna II
APS	- nadsiarczan amonu
ATF4	- aktywujący czynnik transkrypcyjny 4
ATG16L	- białko związane z autofagią 16L
ATG3	- białko związane z autofagią 3
BAEC	- bydlęce komórki śródbłonna aorty
BH4	- tetrahydrobiopteryna
BSA	- albumina surowicy bydlęcej
BSS	- buforowany roztwór soli do oznaczeń jonów wapnia
CCCP	- m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu
Citr	- cytrynian
COX-1	- cyklooksyzgenaza-1
COX-2	- cyklooksyzgenaza-2
Cu/Zn-SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo-cynkowa
DFP	- karboksy-2',7' -difluorodihydrofluoresceina
DHE	- dihydroetydium
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DRP-1	- białko związane z dynaminą-1
EA.hy926	- unieśmiertelnione ludzkie komórki śródbłonna
EDHF	- śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
eIF2a	- eukariotyczny czynnik inicjacji translacji alfa
eNOS	- śródbłonkowa syntaza tlenu azotu
ERAD	- szlak degradacji białek zależny od siateczki śródplazmatycznej
ET-1	- endotelina-1
FBP	- fruktozo-1,6-bisfosforan

FBS	- bydlęca surowica płodowa
FCCP	- 4-(trifluorometoksy) <i>fenylohydrazon</i> cyjanku karbonylu
Fis1	- białko odpowiedzialne za fragmentację mitochondriów
Fum	- fumaran
G6P	- glukoza-6-fosforan
GAMT	- N-metylotransferaza guanidynooctowa
Grp78	- białko regulowane glukozą o masie 78kDa
HAEC	- Pierwotne ludzkie komórki śródbłónka aorty
HPLC-MS	- wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem mas
Hsp90	- białko szoku cieplnego 90
HUVEC	- ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej
ICAM-1	- wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna
IL-4	- interleukina 4
IL-6	- interleukina 6
iNOS	- indukowalna syntaza tlenu azotu
LC3 α/β	- ubikwitynopodobne białko związane z mikrotubulami alfa/beta
Leu	- leucyna
LPS	- lipopolisacharyd
Lys	- lizyna
MAPKs	- kinazy białkowe aktywowane mitogenami
MFF	- czynnik rozszczepienia mitochondriów
Mfn1	- mitofuzyna 1
Mfn2	- mitofuzyna 2
MMP-2	- metaloproteinaza 2
MNA	- N ¹ -metylonikotynoamid
MnSOD	- manganowa dysmutaza ponadtlenkowa
NAM	- Nikotynoamid
NAD ⁺	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy forma zredukowana
NAMPT	- fosforybozylotransferaza nikotynoamidowa
NF- κ B	- jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NNMT	- N-metylotransferaza nikotynoamidowa

nNOS	- neuronalna syntaza tlenku azotu
NOX	- oksydaza NADPH
Nrf1	- jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 1
Nrf2	- jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
OPA1	- białko 1 zaniku nerwu wzrokowego
p53	- czynnik transkrypcyjny p53
PADs	- deiminazy peptydylo-argininowe
PAEC	- komórki śródbłonna tętnicy płucnej
PBS	- wodny roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem
PEP	- fosfoenolopirogronian
PFA	- paraformaldehyd
PGA	- 3-fosfoglicerynian
PGC-1 α	- koaktywator receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów 1-alfa
PGI ₂	- prostacyklina
Phe	- fenyloalanina
PI3K	- kinaza 3-kinaza fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforanowa
PKM2	- kinaza pirogronianowa M2
POChP	- przewlekła obturacyjna choroba płuc
PP2A	- białkowa fosfataza 2A
PVDF	- polifluorek winylidenu
Pyr	- pirogronian
RFT	- reaktywne formy tlenu
SAH	- S-Adenozylhomocysteina
SAM	- S-adenozylometionina
SDS	- dodecylosiarczan sodu
Ser	- seryna
siRNA	- małe interferujące RNA
SNP	- polimorfizmy pojedynczego nukleotydu
SQSTM/p62	- białko wiążące ubikwitynę p62
Succ	- bursztynian
TBS	- wodny roztwór soli fizjologicznej buforowany Trisem

TBS-T	- wodny roztwór soli fizjologicznej buforowany Trisem z dodatkiem Tween-20
TCA	- cykl kwasów trikarboksylowych/cykl Krebsa
Temed	- tetrametyloetylenodiamina
TGF- β	- transformujący czynnik wzrostu beta
Thr	- treonina
TLRs	- receptory toll-podobne
TNF- α	- czynnik martwicy nowotworów alfa
TP	- receptory tromboksanowo-prostanoidowe
TxA ₂	- tromboksan A ₂
Tyr	- tyrozyna
ULK1	- kinaza aktywująca autofagię podobna do Unc-51 1
UPR	- odpowiedź komórek na nieprawidłowo sfałdowane białka
VCAM-1	- cząsteczka adhezyjna komórek naczyń 1
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

STRESZCZENIE

Śródbłonek naczyniowy tworzy warstwa wyspecjalizowanych komórek wyściełająca wewnętrzne ściany naczyń krwionośnych. Będąc narządem wydzielniczym, śródbłonek moduluje odpowiedź zapalną, reguluje przepływ krwi i przepuszczalność naczyń oraz utrzymuje równowagę między krzepnięciem i fibrynolizą, a także odgrywa istotną rolę w procesach angiogenezy oraz w regulacji ciśnienia krwi. Ze względu na swoje umiejscowienie w organizmie stanowi on jedną z pierwszych barier chroniących przed czynnikami patogennymi krążącymi we krwi, w tym lipopolisacharydem (LPS). LPS jest silnym induktorem odpowiedzi zapalnej i jego działanie jest szeroko badane w kontekście sepsy, którą wywołuje. Ciekawym, a zarazem stosunkowo mało dyskutowanym w piśmiennictwie enzymem, który wydaje się mieć wpływ na procesy zapalne w organizmie jest N-metylotransferaza nikotynoamidowa (NNMT) katalizująca przeniesienie reszty metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) na amid kwasu nikotynowego. Udział NNMT w odpowiedzi na stres oraz w stanie zapalnym związanym z różnorodnymi zaburzeniami został udowodniony na różnych modelach *in vitro* i *in vivo*, ale jego rola w śródbłonku w szczególności w kontekście sepsy jest słabo poznana.

Niniejsza rozprawa składa się z dwóch części. W pierwszej skoncentrowano się na scharakteryzowaniu odpowiedzi niezmiennych komórek HAEC na LPS podawany w warunkach stężenia i czasu traktowania na tyle łagodnych by uzyskać typową prozapalną odpowiedź komórek, ale nie wystarczających do zmniejszenia ich przeżywalności. Takie podejście pozwala na zminimalizowaniu dodatkowych nieodwracalnych skutków utrudniających rozpoznanie i interpretację procesów adaptacyjnych. Część uzyskanych wyników była zgodna z oczekiwaniami i potwierdziła wcześniej znane efekty oraz poprawność ustalonego modelu, natomiast część stanowiła nowe obserwacje dotyczące odwracalności zmian organizacji sieci mitochondrialnej oraz profilu metabolitów glikolizy i cyklu kwasów trikarboksylowych oraz szybkości oddychania komórek. Na szczególną uwagę zasługuje ustalenie, że traktowanie komórek HAEC LPS powoduje istotne zwiększenie ilości NNMT. Ta całkowicie nowa obserwacja stała się inspiracją do podjęcia badań opisanych w drugiej części rozprawy.

Ich celem było sprawdzenie czy obecność białka NNMT pozostaje w związku z obserwowanymi zmianami indukowanymi przez LPS. Zastosowano technikę siRNA w celu wyciszenia genu *NNMT* i wykazano, że odpowiedź na LPS komórek ze zmniejszonym

poziomem tego enzymu była w wielu aspektach wyraźnie złagodzona. Dotyczyło to zmniejszenia stresu oksydacyjnego, zmian architektury sieci mitochondrialnej oraz stymulowanego przez LPS wzrostu zawartości białek Opa1 i Mfn1 odpowiedzialnych za fuzję mitochondriów oraz białka Fis1 uczestniczącego w ich fragmentacji. Co więcej, w komórkach z wyciszonym *NNMT* normalizacja poziomu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa w komórkach traktowanych LPS była znacznie przyspieszona. Ponadto, wyciszenie *NNMT* zapobiegało wzmożonej aktywacji pojemnościowego napływu jonów wapnia obserwowanej w komórkach z niezmienioną ekspresją tego genu traktowanych LPS oraz wydaje się, że sprzyja normalizacji procesu autofagii oraz aktywacji stresu siateczki śródplazmatycznej.

Nie udało się powiązać zmian spowodowanych podaniem LPS z oczekiwanymi i bezpośrednimi skutkami związanymi z obniżeniem poziomu białka i aktywności *NNMT* jakimi są zwiększenie poziomu SAM oraz ograniczenie ilości NAD^+ w komórkach. W pierwszym przypadku działanie samego LPS maskowało oczekiwany wynik, a w drugim obecność nikotynamidu w pożywce nie pozwalała na ewentualne powstanie deficytu NAD^+ . A zatem wyjaśnienie mechanizmu biochemicznego wiążącego aktywność *NNMT* ze skutkami działania LPS w komórkach HAEC wymaga dalszych badań. Niemniej w niniejszej rozprawie zgromadzono szereg całkowicie nowych obserwacji, które poza aspektem poznawczym mogą dać podstawę do badań aplikacyjnych.

ABSTRACT

The vascular endothelium is a layer of specialized cells that lines the inner walls of all blood vessels. As a secretory organ, the endothelium modulates the inflammatory response, regulates blood flow, controls vascular permeability and the balance between coagulation and fibrinolysis, and also plays an important role in the processes of angiogenesis and in the regulation of blood pressure. Due to its location, it constitutes one of the first protective barriers against pathogenic factors circulating in the blood, including lipopolysaccharide (LPS). LPS is a strong inducer of the inflammatory response and is widely studied in the context of the sepsis it causes. An interesting, yet little discussed, factor that seems to influence inflammatory processes in the body is the enzyme nicotinamide N-methyltransferase (NNMT), which catalyzes the transfer of the methyl residue from S-adenosylmethionine (SAM) to nicotinic acid amide. The involvement of NNMT in the response to stress and inflammation associated with various disorders has been proven in numerous *in vitro* and *in vivo* models, but its role in the endothelium, especially in the context of sepsis, is poorly understood.

This dissertation consists of two parts. The first one focused on characterizing the response of unchanged HAEC cells to LPS administered under conditions of concentration and treatment time mild enough to obtain the typical pro-inflammatory response of the cells, but not sufficient to reduce their survival. This approach allows for minimizing irreversible effects that make the interpretation of adaptation processes difficult. Some of the obtained results were consistent with expectations and confirmed previously known effects and the correctness of the established model, while some were new observations regarding the reversibility of changes in the organization of the mitochondrial network and the profile of glycolytic metabolites and the tricarboxylic acid cycle, as well as the rate of cell respiration. Of particular note is the finding that treatment of HAECs with LPS results in a significant increase in the amount of the NNMT. This completely new observation became the inspiration to undertake the research described in the second part of the dissertation. Their aim was to check whether the presence of the NNMT was related to the observed changes induced by LPS. The siRNA technique was used to silence the *NNMT* and it was shown that the response of cells with reduced levels of this enzyme to LPS was clearly attenuated. This concerned the reduction of oxidative stress, alleviation of changes in the architecture of the mitochondrial network, and the LPS-stimulated increase in the content of Opa1 and Mnf1 responsible for mitochondrial fusion, as well as the Fis1 involved

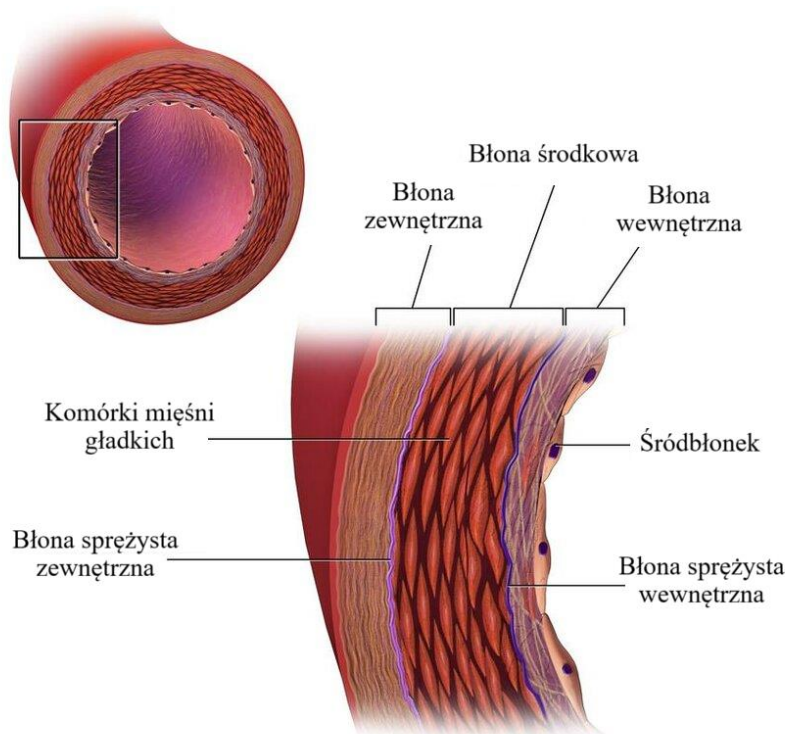
in their fragmentation. Importantly, in cells with a silenced *NNMT* gene, the normalization of the level of glycolysis and the Krebs cycle metabolites in LPS-treated cells was significantly accelerated. Moreover, silencing the *NNMT* prevented the increased activation of the store operated calcium entry (SOCE) observed in cells with unchanged expression of this gene treated with LPS and appears to promote the normalization of the autophagy process and the activation of endoplasmic reticulum stress.

It was not possible to link the changes caused by LPS with the expected and direct effects related to the reduction of protein levels and NNMT activity, such as increasing the level of SAM and reducing the amount of NAD⁺ in cells. In the first case, the effect of LPS itself masked the expected result, and in the second, the presence of nicotinamide in the medium did not allow for a possible NAD⁺ deficit. Therefore, elucidating the biochemical mechanism linking NNMT activity with the effects of LPS in HAEC cells requires further research. Nevertheless, this dissertation collects a number of new observations which, apart from the cognitive aspect, can provide the basis for application research.

1. WSTĘP

1.1. Charakterystyka i funkcje śródbłonka naczyń krwionośnych

Śródbłonek naczyniowy jest narządem endokrynnym wyściełającym wewnętrzne ściany wszystkich naczyń krwionośnych w organizmie człowieka. Do lat 80-ch ubiegłego wieku przypisywano mu jedynie bierną rolę warstwy oddzielającej światło naczynia od głębiej położonych komórek jednak okazało się, że pełni on liczne funkcje związane z utrzymaniem ciśnienia tętniczego, hemostazą czy odpowiedzią prozapalną, a także jest odpowiedzialny za selektywny transport różnych substancji z osocza np. hormonów [Durand i Gutterman, 2013; Wilson i Lerman, 2001]. Śródbłonek jest utworzony przez pojedynczą warstwę komórek, która może spełniać swoją rolę dzięki obecności receptorów specyficznych dla licznych białek, cząsteczek transportujących lipidy, metabolitów i hormonów, a także poprzez selektywne kanały i receptory błonowe regulujące interakcje macierz-komórka i komórka-komórka [Cines i wsp., 1998].



Rys. 1.1. Przekrój przez naczynie krwionośne [w/g Bardin, 2022, zmienione]

Komórki śródbłonka naczyniowego są spolaryzowane, co oznacza, że ta część ich błony, która jest skierowana do światła naczynia, jest ekspozycja bezpośrednio na działanie

składników krwi oraz krążących w niej komórek i cząsteczek, podczas gdy powierzchnia podstawno-boczna jest oddzielona od otaczającego (pozanaczyniowego) środowiska przez błonę podstawną złożoną z zakotwiczonych w błonie komórkowej glikoprotein. Komórki wyściełające naczynie są ułożone w sposób minimalizujący naprężenia ścinające, ulegając spłaszczeniu i przylegając do podłoża [Lee i wsp., 1999]. Śródbłonek odpowiada na zmiany hemodynamiczne oraz liczne czynniki przenoszone przez krew i może reagować na nie poprzez wydzielanie t.zw. substancji wazoaktywnych, czyli takich, które modulują stopień relaksacji naczynia. W warunkach prawidłowych homeostaza naczyniowa jest utrzymywana dzięki zrównoważonemu wydzielaniu czynników odpowiadających za rozkurcz i zwężanie się naczyń [Tesauro i Cardillo, 2011].

Kluczową funkcją śródbłonka naczyniowego jest regulacja skurczu i rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a tym samym wpływanie na ciśnienie tętnicze krwi. Wśród wielu cząsteczek sygnałowych wydzielanych przez komórki śródbłonka jest tlenek azotu (NO). Związek ten jest wytwarzany z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu, której forma śródbłonkowa (eNOS) jest charakterystyczna dla tych komórek. W innych komórkach mogą występować także dwie inne izoformy tego enzymu: indukowalna syntaza tlenu azotu (iNOS) oraz neuronalna syntaza tlenu azotu (nNOS) [Förstermann i Sessa, 2012]. eNOS jest enzymem wytwarzanym konstytutywnie i modulującym wiele opisywanych funkcji śródbłonka łącząc m.in. zmiany w przepływie krwi z odpowiednią przebudową architektury naczyniowej i regulacją średnicy naczynia. Jego wytwarzanie jest największe w przypadku dużych naczyń krwionośnych takich jak aorta (do 50 ng/mg białka całkowitego w homogenatach), maleje wraz ze zmniejszaniem się średnicy naczynia, zupełnie zanikając w naczyniach włosowatych [Heiss i wsp., 2010]. Aktywność eNOS jest zależna od wielu białek i ich modyfikacji posttranslacyjnych. Obecność kalmoduliny związanej z jonami wapnia jest niezbędna do aktywacji tego enzymu, a zatem zwiększonego wytwarzania NO [Hemmens i wsp., 1998]. Białko szoku cieplnego 90 (Hsp90) jest allosterycznym aktywatorem eNOS – przyłączenie się zarówno kalmoduliny jak i Hsp90 do eNOS powoduje odłączenie się kaweoliny-1, która hamuje aktywność tego enzymu [Garcia-Gardena i wsp., 1998; Gratton i wsp., 2000]. W cząsteczce eNOS znajduje się kilka miejsc fosforylacji. Najlepiej poznanymi są fosforylacja w pozycji Ser¹¹⁷⁷, która zwiększa aktywność enzymu, ponieważ stymuluje przepływ elektronów przez domenę reduktazową syntazy NO i zwiększa wrażliwość w stosunku do Ca²⁺ oraz fosforylacja Thr⁴⁹⁵ zaburzająca przyłączanie kalmoduliny, a zatem zmniejszająca aktywność eNOS [Fleming i wsp., 2003]. Ekspresja genu kodującego eNOS znacznie wzrasta w odpowiedzi na zwiększenie naprężenia ścinającego. Zwiększenie

wytwarzania NO w tych warunkach powoduje relaksację naczyń i obniżenie sił ścinających. [Xiao i wsp., 1997]. W warunkach patologicznych, gdy zmniejszona jest dostępność tlenu azotu np. na skutek jego utleniania do reaktywnych form azotu, może dochodzić do kompensacyjnego wzrostu aktywności eNOS, co stwarza ryzyko rozprzęgania tego enzymu i wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT) zamiast NO [Förstermann i Sessa, 2012].

Tlenek azotu nie jest jedyną wydzielaną przez śródbłonek naczyniową cząsteczką powodującą rozkurcz naczyń krwionośnych. Podobny efekt jest wywoływany przez prostacyklinę (PGI₂). Jest to związek wytwarzany konstytutywnie w wyniku przekształcania kwasu arachidonowego w reakcjach katalizowanych przez cyklooksygenazę i syntazę prostacykliny, przy czym jego synteza zwiększa się w odpowiedzi na stres. Prostacyklina hamuje agregację płytek krwi oraz proliferację komórek gładkich mięśni szkieletowych, obniża ciśnienie tętnicze i działa rozkurczowo na naczynia krwionośne poprzez aktywację cyklazy adenylowej [Nejabat i wsp., 2017]. Tlenek azotu i prostacyklina nie wyczerpują całej gamy substancji powodujących relaksację naczyń krwionośnych.

Wykazano, że nawet przy braku NO i prostacykliny naczynia krwionośne zachowują zdolność do relaksacji. Dzieje się to za sprawą śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDHF), również będącego metabolitem kwasu arachidonowego. Wytwarzany jest przez enzymy z rodziny monooksygenaz cytochromu 450 (CYP), a jego udział wydaje się być znacznie większy w małych naczyniach oporowych niż w dużych naczyniach przewodowych [Fleming i wsp., 1996; Luksha i wsp., 2010]. Wzrost stężenia jonów wapnia w śródbłonku aktywuje EDHF oraz stymuluje kanały potasowe aktywowane Ca²⁺, w tym o średnim przewodnictwie (IK_{Ca}) znajdujące się w domenach skierowanych na komórki mięśni gładkich i o małym przewodnictwie (SK_{Ca}) znajdujące się blisko połączeń między komórkami śródbłonka. W wyniku aktywacji tych kanałów dochodzi do hiperpolaryzacji komórek śródbłonka. Stan ten rozprzestrzenia się przez połączenia międzybłonowe zlokalizowane na wypustkach śródbłonka do mięśni gładkich naczyń krwionośnych zapobiegając ich skurczowi [Krüger-Genge i wsp., 2019].

Komórki śródbłonka wytwarzają także czynniki powodujące skurcz naczyń krwionośnych. Jednym z nich jest tromboksan A₂ (TxA₂), wytwarzany podobnie jak prostaglandyna z kwasu arachidonowego przy udziale COX-1 (cyklooksygenaza-1) i syntazy tromboksanu [Bunting i wsp., 1983]. W działaniu TxA₂ pośredniczą receptory tromboksanowo-prostanoidowe (TP) znajdujące się na płytkach krwi (aktywacja powoduje agregację płytek) oraz komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (biorą udział w zwiększaniu

wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia prowadzącego do skurczu naczyń) [FitzGerald, 1991; Sandoo i wsp., 2010].

Ostatni istotny czynnik wazokonstrykcyjny (powodujący skurcz naczyń) – endotelina-1 (ET-1) - wytwarzany jest głównie w odpowiedzi na stan zapalny przez konwertazę endoteliny. Endotelina-1 działa poprzez receptory na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ET_A i ET_{B2}) oraz na komórkach śródbłonna (ET_{B1}). Podobnie jak tromboksan A₂, ET-1 wywołuje skurcz naczyń na drodze zależnej od jonów wapnia. Co ciekawe, aktywacja receptorów ET_{B1} powoduje indukcję PGI₂ i tlenu azotu i następnie relaksację naczyń. Prostacyklina i NO mają natomiast zdolność do obniżania wytwarzania endoteliny-1, tym samym tworząc pętlę sprzężenia zwrotnego między tymi związkami [Bacon i wsp., 1995; deNucci i wsp., 1988; Sandoo i wsp., 2010].

1.1.1. Mitochondria w komórkach śródbłonna naczyniowego

Mitochondria są organellami komórkowymi znajdującymi się w centrum procesów energetycznych i mają kluczowe znaczenie w regulacji metabolizmu komórek. Oprócz wytwarzania ATP na drodze oksydacyjnej fosforylacji ADP, mitochondriom przypisuje się wpływ na proliferację komórek, apoptozę, starzenie się komórek, a także udział w sygnalizacji wapniowej oraz wytwarzanie reaktywnych form tlenu. W komórkach śródbłonna naczyniowego całkowita masa mitochondriów jest stosunkowo mała – stanowi 2-6% objętości cytoplazmy [Oldendorf i wsp., 1977]. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że śródbłonek wytwarza ponad 80% swojego ATP na drodze glikolizy, a rola mitochondriów polega przede wszystkim na regulacji odpowiedzi sygnałowych na różnorakie bodźce [Culic i wsp., 1997]. Komunikacja mitochondriów z innymi organellami jest zdeterminowana poprzez ich dystrybucję, biogenezę i dynamikę organizacji przestrzennej. Skoordynowana aktywność mitochondriów i innych organelli komórkowych wymaga skoordynowanej ekspresji genów kodowanych zarówno przez mitochondrialne jak i jądrowe DNA, za co odpowiada przede wszystkim PGC-1 α (koaktywator receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów 1-alfa). PGC-1 α aktywuje czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję jądrowych genów kodujących enzymy niezbędne do biogenezy mitochondriów i odpowiedzi na stres oksydacyjny (Nrf1 i Nrf2 - jądrowe czynniki transkrypcyjne pochodzenia erytroidalnego typu 1 i 2), a także czynniki regulujące ekspresję genów kodowanych przez mtDNA czyli mitochondrialne DNA (TFAM i TFBM - mitochondrialne czynniki transkrypcyjne A i B) [Kluge i wsp., 2013; Valle i wsp., 2005].

Mitochondria są dynamicznymi organellami, podlegającymi procesom fuzji i fragmentacji (ang. *fusion/fission*). Odpowiedzialne za to są enzymy mitofuzyna 1 i 2 (Mfn1 i Mfn2) oraz GTP-aza Opa1 (białko 1 zaniku nerwu wzrokowego) uczestniczące w tworzeniu sieci mitochondrialnej oraz białko Fis1 (ang. *fission-1*) odpowiedzialne za jej fragmentację które rekrutuje DRP-1 (białko związane z dynamina-1) zapoczątkowując Proporcja między intensywnością obu procesów zmienia się w cyklu komórkowym, a także jest związane ze stanem metabolicznym komórek oraz z odpowiedzią komórek na stres. Fuzja mitochondriów ułatwia dystrybucję metabolitów, białek i mtDNA [Kluge i wsp., 2013; Lugus i wsp., 2011]. W komórkach śródbłonna fuzja mitochondriów jest konieczna dla prawidłowego przebiegu angiogenezy reakcją na VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego) i aktywując eNOS. Fragmentacja sieci mitochondrialnej jest istotna w czasie angiogenezy kiełkującej (ang. *sprouting*), mającej miejsce w procesie nowotworzenia, a także pełni kluczową rolę w usuwaniu uszkodzonych mitochondriów w przebiegu mitofagii [Suen i wsp., 2008; Shen i wsp., 2015]. W warunkach fizjologicznych procesy fuzji i fragmentacji są zrównoważone, a zaburzenie ich prowadzi do rozwoju stanu zapalnego, śmierci komórek i dysfunkcji śródbłonna, co może mieć konsekwencje w skali całego organizmu.

Na stan metaboliczny oraz architekturę mitochondriów w komórkach śródbłonna naczyniowego mogą wpływać takie czynniki jak dostępność tlenu i składników odżywczych oraz zjawiska hemodynamiczne naczyń krwionośnych. Monowarstwa komórek śródbłonna transportuje większość tlenu z krwi do tkanek okołonaczyniowych, zużywając tylko nieznaczną jego część (około 15%) [De Bock i wsp., 2013]. Oddychanie komórkowe może ulec przyspieszeniu w warunkach stresu oksydacyjnego czy braku glukozy, będącej podstawą glikolizy [Dranka i wsp., 2010; Mertens i wsp., 1990]. W tej sytuacji może dochodzić do zwiększonej biogenezy mitochondriów na ścieżce zależnej od VEGF i kinazy białkowej Akt, podobnie jak przy tworzeniu rozgałęzień naczyń krwionośnych w odpowiedzi na hipoksję [Wright i wsp., 2008]. Nie tylko niedobór, ale także nadmiar glukozy może wpływać na funkcjonowanie mitochondriów. Podwyższone stężenie glukozy we krwi np. w cukrzycy, powoduje uszkodzenie i apoptozę komórek śródbłonna, prowadząc do zaburzonej integralności ich monowarstwy i upośledzenia jej funkcji. Taki stan wpływa na dynamikę mitochondriów w komórkach czemu towarzyszy wzmożone wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz zwiększenie się odsetka uszkodzonych mitochondriów na skutek zaburzenia procesów fuzji i fragmentacji [Pangare i wsp., 2012]. Lokalne siły hemodynamiczne przyczyniają się zaś do dysfunkcji śródbłonna poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, przy czym zjawiska hemodynamiczne w naczyniach nie są jednorodne i mogą wywoływać różne odpowiedzi

komórkowe. Zasadniczo wyróżnia się trzy rodzaje przepływu krwi wywołujące różne skutki, którymi są: laminarne naprężenie ścinające (LSS), kiedy prędkość płynu nie ulega zmianom; pulsacyjne naprężenie ścinające (PSS), gdy występuje przepływ jednokierunkowy z okresowymi zmianami wielkości oraz oscylacyjne naprężenie ścinające (OSS), gdy przepływ jest dwukierunkowy z okresowymi zmianami wielkości [Caja i Enriquez, 2017]. Naprężenie ścinające przejściowo zwiększa komórkową zawartość jonów wapnia, co z kolei stymuluje wytwarzanie RFT poprzez zwiększenie aktywności cyklu kwasów trikarboksylowych oraz stymulację przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym. W przypadku PSS błona mitochondrialna ulega hiperpolaryzacji, co również prowadzi do zwiększonej produkcji RFT. Jednocześnie dochodzi do aktywacji eNOS oraz w przypadku PSS i LSS – do zwiększenia poziomu MnSOD (manganowa dysmutaza ponadtlenkowa). Natomiast w przypadku OSS aktywacji ulega oksydaza NADPH (NOX), dodatkowo zwiększająca stres oksydacyjny, bez indukcji enzymów usuwających RFT [Ai i wsp., 2008; Scheitlin i wsp., 2014; Sorescu i wsp., 2004].

Reaktywne formy tlenu wytwarzane w mitochondriach śródbłonna mogą odgrywać w dwojaką rolę. Z jednej strony są istotnymi przekaźnikami sygnału, powodującymi np. rozkurcz mięśni gładkich ścian naczyń i obniżenie ciśnienia tętniczego oraz uczestniczącymi w przekazywaniu bodźców pozakomórkowych do mitochondriów. Biorą udział w regulacji autofagii, odpowiedzi prozapalnej, odpowiedzi na hipoksję oraz regulacji relaksacji naczyń krwionośnych. Z drugiej strony uczestniczą w rozwoju stanów patologicznych w układzie sercowo naczyniowym takich jak miażdżycy i nadciśnienie. Jednak podsumowując, nadmierne wytwarzanie RFT przez mitochondria jest toksyczne dla komórki powodując patologiczną odpowiedź śródbłonna i całego narządu (naczynia) [Caja i Enriquez, 2017; Widlansky i Gutterman, 2011].

1.2. Sepsa

Pierwszą współczesną definicję sepsy – inaczej posocznicy - stworzył Hugo Schottmuller w 1914 roku i brzmiała ona następująco: „posocznica jest obecna, jeśli rozwinęło się ognisko, z którego chorobotwórcze bakterie, stale lub okresowo, wnikają do krwiobiegu w taki sposób, że powoduje to subiektywne i obiektywne objawy” [Gül i wsp., 2017]. Jest to nagły przypadek medyczny, opisujący ogólnoustrojową odpowiedź organizmu na proces infekcyjny, który w ostateczności może prowadzić do niewydolności wielonarządowej i śmierci. Pomimo znacznego rozwoju w rozumieniu patofizjologii posocznicy oraz postępu medycznego wciąż pozostaje ona jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród krytycznie chorych pacjentów [Kaukonen i wsp., 2014].

Pierwszym etapem rozwoju odpowiedzi immunologicznej jest przyłączenie się wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMPs) takich jak bakteryjne endotoksyny i grzybicze β -glukany do specyficznych receptorów rozpoznających wzorce na powierzchni komórek układu odpornościowego. Innym źródłem takich wzorców mogą być struktury molekularne związane z uszkodzeniem (DAMPs) wydzielane przez martwe lub uszkodzone komórki gospodarza. Przyłączają się one do receptorów na powierzchni makrofagów i monocytów takich jak receptory toll-podobne (TLRs) czy receptory leptyny typu C. W efekcie następuje uruchomienie kaskad sygnałowych prowadzących do wytwarzania cytokin prozapalnych oraz aktywacji kaspaz. Cytokiny prozapalne z kolei powodują aktywację i proliferację leukocytów, aktywację układu dopełniacza, wzrost poziomu molekuł adhezyjnych śródbłonna i ekspresję chemokin. Taka znacznie nasilona odpowiedź układu odpornościowego prowadzi do uszkodzenia i śmierci komórek oraz tkanek samego gospodarza [Gyawali i wsp., 2019].

Podstawowym mechanizmem prowadzącym do dysfunkcji tkanek i narządów w sepsie jest zmniejszona dystrybucja i wykorzystanie przez komórki tlenu w wyniku hipoperfuzji, do której dochodzi w efekcie zaburzeń sercowo-naczyniowych. Kardiomiopatia septyczna jest zjawiskiem o ostrym początku i rozwija się prawdopodobnie w odpowiedzi na krążące cytokiny prozapalne prowadzącej do zaburzenia funkcji mitochondriów w kardiomiocytach [Vieillard-Baron, 2011]. Ponadto, ze względu na wywołany przez pośredniki stanu zapalnego rozkurcz naczyń krwionośnych, posocznica wywołuje stan niedociśnienia i szoku dystrybucyjnego, czyli ograniczenia dostępu tlenu i substancji odżywczych. W konsekwencji hipoperfuzji może dochodzić do patologicznie zwiększonej glikolizy, a co za tym idzie kwasicy mleczanowej.

Ponadto reaktywne formy tlenu wytwarzane w odpowiedzi zapalnej potęgują dysfunkcję mitochondriów i dodatkowo obniżenie stężenia ATP [Gyawali i wsp., 2019].

1.2.1. Bakteryjny lipopolisacharyd (LPS) jako czynnik wywołujący sepsę

Bakteryjny lipopolisacharyd jest integralną amfifilową częścią zewnętrznej błony komórkowej osłony bakterii Gram-ujemnych. Składa się on z trzech fragmentów: zakotwiczonego w błonie lipidu A, który właśnie jest odpowiedzialny za toksyczność LPS w sepsie; zewnętrznego oligosacharydu rdzeniowego oraz O-antygeny, który różni się pomiędzy gatunkami bakterii i nadaje specyficzny gatunkowo serotyp. Lipid A i oligosacharyd rdzeniowy są niezbędne do przeżycia bakterii, natomiast O-antygen może być nieobecny. Możemy wyróżnić gładki LPS (S-LPS, ang. *smooth*), gdy wszystkie trzy składniki są na miejscu oraz szorstki LPS (R-LPS, ang. *rough*) gdy brakuje O-antygeny [Dickson i Lehmann, 2019].

LPS wywołuje odpowiedź immunologiczną poprzez przyłączanie się do receptorów błonowych – u ssaków najlepiej opisaną ścieżką jest zależna od TLR4 oraz czynnika różnicowania mieloidalnego 2 (MD-2) [Shimazu i wsp., 1999]. Białko wiążące lipopolisacharyd w surowicy (LBP) oraz związane z błoną CD14 wspomagają przyłączanie się LPS do kieszeni hydrofobowej MD-2 poprzez łańcuchy kwasów tłuszczowych lipidu A. Dochodzi do uformowania multimeru składającego się z dwóch kompleksów MD-2-TLR4 połączonych LPS-em [Park i wsp., 2009]. Następuje rekrutacja białek adaptorowych TIRAP (białko adaptorowe zawierające domenę receptora 1 toll-interleukiny) i MYD88 (białko pierwotnej odpowiedzi różnicowania mieloidalnego), które aktywują jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B oraz kinazy aktywowane mitogenami (MAPKs), aktywując wytwarzanie cytokin prozapalnych. Kompleks LPS-receptor może również ulegać internalizacji na drodze endocytozy, w której pośredniczą klatryna i dynamina i indukować sygnalizację z wnętrza endosomu przez drugą parę receptorów: TRAM (translokowalne białko błonowe związane z łańcuchem) oraz TRIF (interferon β indukujący adapter zawierający domenę receptora toll-interleukiny) [Zanoni i wsp., 2011]. Badania pokazują, że dużo bardziej niebezpieczny i silniej aktywujący odpowiedź immunologiczną jest wolny LPS w porównaniu do związanego z błoną bakterii, dlatego należy zachować szczególną ostrożność przy stosowaniu antybiotykoterapii u osób zakażonych [Lepper i wsp., 2002; Moreland i wsp., 2004].

1.2.2. Rola śródbłonka naczyniowego w sepsie

Śródbłonek tworzy półprzepuszczalną barierę, regulującą dwukierunkowy przepływ komórek i cząsteczek między krwiobiegiem a tkankami tworzącymi i otaczającymi naczynie krwionośne. Zatem komórki śródbłonka mają bezpośredni kontakt z krążącymi w krwiobiegu czynnikami fizjologicznymi oraz patogenami, w tym wywołującymi sepsę. Komórki śródbłonka cechuje wysoki stopień niejednorodności zarówno w kontekście rodzaju naczynia jak i narządów, jednak podczas posocznicy dwie najbardziej wyraźne jego reakcje, czyli wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej oraz aktywacja układu krzepnięcia wydają się w znacznym stopniu niezależne od typu naczynia i jego lokalizacji narządowej. Ponadto, ze względu na to, że śródbłonek stanowi zarówno źródło stanu zapalnego jak i jego cel jest on łącznikiem między lokalną a ogólnoustrojową odpowiedzią odpornościową [Hack i Zeerleder, 2001]. W odpowiedzi na cytokiny prozapalne krążące we krwi w trakcie zakażenia, drastycznie wzrasta ekspresja genów cząsteczek adhezyjnych takich jak selektyny, integryny, ICAM-1 (wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna) czy VCAM-1 (cząsteczka adhezyjna komórek naczyń 1). Molekuły te umożliwiają przyłączenie się leukocytów do komórek śródbłonka i ich dalszą migrację w głąb naczynia i do uszkodzonych tkanek [Martinez-Mier i wsp., 2000].

Jedną z najpoważniejszych komplikacji u pacjentów z sepsą, będącą zarazem częstą przyczyną ich zgonów jest rozsiane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe. Nieznany jest dokładny mechanizm powstawania tego zjawiska, ale uważa się, że śródbłonek odgrywa tu kluczową rolę [Iba i wsp., 2019]. Jednym z sugerowanych mechanizmów jest rozerwanie warstwy komórek śródbłonka przez kompleks atakujący błonę (MAC), co dodatkowo nasila stan zapalny i aktywuje szlak mikrozakrzepowy. Aktywacja szlaku mikrozakrzepowego z kolei pośredniczy w agregacji płytek krwi oraz egzocytozie bardzo dużych multimerów czynnika Von Willebranda inicjujących mikrotrombogenezę [Kerr i Richards, 2012]. W warunkach normalnych takie multimery są fragmentowane na nieszkodliwe mniejsze cząsteczki przez dezintegrynę i ADAMTS-13 (metaloproteinazę z motywem trombospondyny 13), białka te są jednak inaktywowane podczas długotrwałego stanu zapalnego [Studt i wsp., 2005].

Wysoce selektywna bariera śródbłonkowa jest niezbędna do utrzymania homeostazy płynów w tkankach i do wspierania prawidłowego funkcjonowania narządów. Głównym problemem, który dotyczy śródbłonka w sepsie jest jego zwiększona przepuszczalność lub wręcz utrata funkcji bariery. Cytokiny prozapalne hamują ścieżkę sygnałową cAMP/Rac1 (cykliczny adenosinomonofosforan/substrat toksyny botulinowej C3 związanej z Ras 1), aktywując kinazę Rho i przyczyniając się do fosforylacji śródbłonkowej (VE)-kadheryny

[Alingham i wsp., 2007]. Fosforylacja ta powoduje jej oddysocjowanie od p120 kateniny i skierowanie (VE)-kadheryny na ścieżkę endocytozy, co właśnie jest przyczyną zwiększonej przepuszczalności monowarstwy śródbłonka naczyniowego [Radeva i Waschke, 2018]. Również glikokaliks jest krytycznym regulatorem przepuszczalności bariery śródbłonkowej. Wpływa on na funkcje bariery poprzez mechanotransdukcję, a odpowiedź prozapalna występująca w sepsie powoduje zanik glikokaliksu, co naraża komórki śródbłonka na adhezję leukocytów i płytek krwi, dodatkowo nasilając stan zapalny i aktywując kaskadę krzepnięcia [Chapell i wsp., 2009; Chelazzi i wsp., 2015].

Podczas sepsy zaktywowane komórki układu odpornościowego uwalniają reaktywne formy tlenu, których znaczenie polega na zwalczaniu patogenów. Niestety RFT mogą także bezpośrednio atakować komórki śródbłonka naczyniowego, uszkadzając glikokaliks, zwiększając ekspresję molekuł adhezyjnych, powodując przebudowę cytoszkieletu oraz aktywując kinazę p38MAPK, fosfodiesterazy i kinazę białkową C [Usatyuk i wsp., 2003]. Wszystko to prowadzi do zwiększonej przepuszczalności naczyń i spadku ciśnienia tętniczego. Same komórki śródbłonka również wytwarzają RFT poprzez kompleks I i III łańcucha oddechowego oraz enzymy z rodziny NOX i niesprzężoną eNOS. W warunkach fizjologicznych RFT są niezbędne do utrzymania prawidłowego napięcia naczyń krwionośnych i angiogenezy, lecz w warunkach sepsy dochodzi do uszkodzenia komórek od wewnątrz [Craigie i wsp., 2015]. Istotnym zagrożeniem stają się też reaktywne formy azotu, powstające na skutek reakcji produkowanego w dużych ilościach przez śródbłonek tlenu azotu z reaktywnymi formami tlenu. Dochodzi do nitrozytacji białek i utraty ich funkcji, a zatem do dysfunkcji komórek [Dolmatova i wsp., 2020].

1.3. NNMT

N-metylotransferaza nikotynoamidowa (NNMT, EC 2.1.1.1.) jest cytosolowym enzymem katalizującym reakcję metylacji nikotynoamidu (NAM) z utworzeniem N¹-metylonikotynoamidu (MNA), z wykorzystaniem S-adenozylometioniny (SAM) jako donora grup metylowych, [Aksoy i wsp., 1994]. NNMT ma także zdolność metylacji innych pirydyn, takich jak chinolina, izochinolina czy 3-acetylopirydyna, tworząc przy tym jony pirydynowe, lecz znaczenie biologiczne tej funkcji jest nieznanne [Alston i Abeles, 1988]. NNMT jest białkiem stosunkowo mocno zachowanym w toku ewolucji – stopień homologii między sekwencją ludzką i mysią wynosi 85% [Shmeisser i wsp., 2013]. Jediną znaną modyfikacją

posttranslacyjną NNMT, wpływającą na jego aktywność jest cytrulinizacja, która destabilizuje strukturę przestrzenną samego białka. Reakcja ta katalizowana jest przez deiminazy peptydylo-argininowe (PADs), przy czym PAD1 i PAD2 powodują całkowite zahamowanie aktywności NNMT, a PAD3 i PAD4 tylko częściowe [Nemmara i wsp., 2018].

Gen *NNMT* znajduje się na chromosomie 11 i został sklonowany w 1994 roku [Aksoy i wsp., 1994]. U ludzi sekwencja *NNMT* jest wysoce polimorficzna. Scharakteryzowano blisko 100 polimorfizmów, z których większość to polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP). Dane literaturowe dotyczące wpływu polimorfizmów na aktywność NNMT są niezgodne, co może wynikać z faktu, że niektóre z nich występują niezwykle rzadko w populacji lub są ograniczone tylko do pewnych grup etnicznych. Yan i wsp. [1999] oraz Smith i wsp. [1998] nie wykryli żadnego związku między polimorfizmami *NNMT* a jego aktywnością w zdrowej populacji natomiast Saito i wsp. [2001] sugerują, że niektóre polimorfizmy w 5' regionie flankującym mogą wpływać na wydajność transkrypcji genu *NNMT*.

Po raz pierwszy NNMT zostało scharakteryzowane i opisane w publikacji z 1951 roku przez włoskiego lekarza i naukowca Giulio L. Cantoniego [1951]. Wyizolował on enzymy z wątroby szczura (badane było także kilka innych zwierząt) i udowodnił, że ekstrakt ten powoduje przemianę nikotynamidu do N¹-metylonikotynoamidu w obecności jonów magnezu i trifosforanu adenozyne. Kwas nikotynowy natomiast nie ulegał reakcji w tych warunkach. Cantoni zasugerował nazwę metylokinaza nikotynoamidowa. Rola S-Adenozylo-metioniny jako uniwersalnego donora grup metylowych nie była znana w tamtych czasach – została ona odkryta i opisana również przez Cantoniego dopiero rok później [1952].

Największą ekspresję genu *NNMT* obserwuje się w wątrobie, a zróżnicowanie międzyosobnicze w zakresie aktywności tego enzymu u ludzi jest nawet pięciokrotne [Rini i wsp., 1990]. Enzym ten występuje również w innych narządach takich jak nerki, mózg, tkanka tłuszczowa, mięśnie, płuca czy serce, a jego aktywność jest kojarzona z różnorodnymi zaburzeniami, najczęściej związanymi z występowaniem stanu zapalnego, takimi jak choroba Parkinsona [Green i wsp., 1991], arterosklerozą [Mateuszuk i wsp., 2009] czy przewlekłą obturacyjną chorobą płuc [Debigare i wsp., 2008]. Wielu autorów opisało podwyższenie poziomu NNMT w różnych typach nowotworów [Markert i wsp., 2001; Xu i wsp., 2003; Rogers i wsp., 2006; Sartini i wsp., 2007; Tomida i wsp., 2009 i in.] oraz skorelowało je z opornością na chemoterapię [Szakacs i wsp., 2004].

Najlepiej poznanym dotąd substratem NNMT jest nikotynoamid, prekursor NAD⁺ (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). Metylacja nikotynamidu przez NNMT jest nieodwracalna i stanowi alternatywną ścieżkę dla syntezy NAD⁺. Przez długi czas proces ten

uważany był jedynie za sposób usuwania nadmiaru NAM, lecz doniesienia z ostatniej dekady pokazują, że może mieć inny głęboki sens biologiczny [Pissios, 2017].

1.3.1. Rola NNMT w wątrobie i tkance tłuszczowej

Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy jest koenzymem w ponad 200 reakcjach oksydoredukcyjnych w komórkach eukariotycznych, a jego metabolizm stanowi potencjalny cel terapeutyczny w różnych chorobach metabolicznych [Ganji i wsp., 2014]. NAD^+ jest także ko-substratem enzymów rodziny sirtuin czyli deacetylaz zależnych od NAD^+ oraz ADP-rybozylotransferaz, katalizujących reakcję ADP rybozylacji białek. Enzymy te są zaangażowanych w regulację metabolizmu glukozy, odpowiedź komórek na stres, biogenezę mitochondriów, utlenianie kwasów tłuszczowych, różnicowanie komórek macierzystych i wiele innych ważnych procesów komórkowych [Dang, 2014].

Wśród białek należących do sirtuin szczególnie zainteresowanie wzbudza Sirtuina 1, która deacetyluje zarówno histonów jak i licznych białek niehistonowych takich jak p53, FoxO1 czy eNOS modulując ich aktywność [Rahman i Islam, 2011]. Sirtuina 1 reguluje glukoneogenezę poprzez deacetylację PGC1 α , czynnika transkrypcyjnego FoxO1 oraz CRTC2 (koaktywator transkrypcji 2 regulowany przez CREB), a także hamuje lipogenezę i syntezę cholesterolu poprzez deacetylację Srebp 1 i 2 (białka wiążące sterolowy element regulatorowy 1 i 2) [Ponugoti i wsp., 2010; Rodgers i wsp., 2005]. Zwiększenie aktywności sirtuiny 1 ma zazwyczaj korzystny wpływ na profil metaboliczny np. łagodzi konsekwencje indukowanej diety otyłości u gryzoni [Pfluger i wsp., 2008]. Aktywność sirtuiny 1 jest regulowana zarówno przez modyfikacje posttranslacyjne jak i poprzez dostępność NAD^+ , co skłania ku bliższemu przyjrzeniu się enzymom regulującym syntezę NAD^+ . Jednym z takich enzymów jest NNMT. Jego zdolność do metylacji nikotynamidu a tym samym potencjalnego ograniczenia wytwarzania NAD^+ a także wysoka ekspresja genu *NNMT* w wątrobie i tkance tłuszczowej sprawiły, że stał się interesującym obiektem badań [Hong i wsp., 2015].

Wiadomo, że powinowactwo NNMT do nikotynoamidu jest stosunkowo małe (K_m 430 μM), zwłaszcza w porównaniu do powinowactwa do NAM fosforybozylotransferazy nikotynoamidowej (NAMPT) pierwszego i ograniczającego enzymu szlaku syntezy NAD^+ (K_m 1 μM) [Aksoy i wsp., 1994; Revollo i wsp., 2004]. Badania pokazują także, że wyciszenie *NNMT* w wątrobie czy tkance tłuszczowej nie powoduje akumulacji nikotynamidu ani nie wpływa na poziom wewnątrzkomórkowego NAD^+ [Hong i wsp., 2015; Kraus i wsp., 2014]. Wszystkie te dane wskazują, że wbrew przewidywaniom NNMT nie wpływa bezpośrednio na poziom NAD^+ .

Hong i wsp. w swojej pracy postulują, że to nie NNMT bezpośrednio ma pozytywny wpływ na metabolizm, a raczej produkt katalizowanej przez niego reakcji N¹-metylonikotynoamid. Udało im się wykazać, że wzrost poziomu NNMT lub MNA stabilizuje białko sirtuiny 1, chroniąc je przed degradacją i tym samym zwiększając aktywność tego enzymu, a to z kolei łagodzi skutki wysokotłuszczowej diety u myszy. Natomiast wyciszenie genu kodującego *NNMT* zaburzało metabolizm glukozy i cholesterolu [2015]. Zhang i wsp. również wykazali, że MNA może aktywować sirtuinę 1 a także poprawiać morfologię wątroby, zmniejszyć akumulację lipidów, obniżyć poziom kluczowych enzymów szlaku glukoneogenezy oraz poziom glukozy na czczo i insuliny w krwi otyłych myszy z cukrzycą typu II [2020]. U myszy z wywołanym konkanawaliną A zapaleniem wątroby zaobserwowano wzrost aktywności NNMT i stężenia MNA w surowicy. Co ciekawe, dodatkowa suplementacja MNA złagodziła wywołane preparatem uszkodzenie wątroby, obniżając poziom interleukiny 4 (IL-4) oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α), lecz efektu tego nie obserwowano po podaniu antagonisty receptora prostacykliny, co sugerowałoby, że korzystny wpływ MNA zależy jest właśnie od PGI₂ [Sternak i wsp., 2010; Jakubowski i wsp., 2016].

Poziom MNA jest też znacznie wyższy w surowicy krwi pacjentów cierpiących na marskość wątroby niż u osób zdrowych. Po podaniu doustnym nikotynamidu u osób chorych obserwowano wyższy poziom N¹-metylonikotynamidu w moczu. Zwiększone wytwarzanie MNA w tym wypadku może być czynnikiem ochronnym przed nadmiarem NAM wynikającym z choroby [Cuomo i wsp., 1994; Pumpo i wsp., 2001].

Odmienne wyniki można znaleźć natomiast w pracy Komatsu i wsp. [2018], którzy stworzyli myszy transgeniczne z nadekspresją genu *NNMT*, a następnie karmili je wysokotłuszczową dietą z suplementacją MNA. U tych myszy rozwinęło się stłuszczenie wątroby w następstwie zwiększonej ekspresji genów pośredniczących w wychwycie kwasów tłuszczowych i zmniejszonego wydzielania lipoprotein o bardzo małej gęstości. Autorzy ci także jako pierwsi opisali spadek poziomu NAD⁺ w wątrobach badanych zwierząt oraz zmniejszoną aktywność sirtuiny 3.

Z badań Songa i wsp. [2020] wynika, że czynnikiem zaangażowanym we wzrost poziomu NNMT w wątrobie może być indukcja stresu retikularnego, a w szczególności ścieżki PERK-ATF4 (kinaza siateczki śródplazmatycznej podobna do kinazy białkowej R aktywujący czynnik transkrypcyjny 4) w odpowiedzi na spożywanie alkoholu u myszy. Nadekspresja genu *NNMT* prowadziła do alkoholowego stłuszczenia wątroby, a jego wyciszenie hamowało rozwój tego zaburzenia.

W odróżnieniu od wątroby, gdzie rola NNMT jest sporna, w tkance tłuszczowej wydaje się ona być jednoznacznie negatywna. Zawartość NNMT koreluje pozytywnie z otyłością i opornością na insulinę, natomiast zabiegi zwiększające wrażliwość na insulinę takie jak ćwiczenia i operacje bariatryczne znacznie zmniejszyły poziom NNMT w tkance tłuszczowej badanych osób [Kannt i wsp., 2015]. Również u myszy utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej wyciszenie NNMT chroniło je przed odkładaniem się triglicerydów i poprawiało ich tolerancję na glukozę [Kraus i wsp., 2014]. Poziom MNA w tkance tłuszczowej także pozytywnie koreluje zarówno z insulinoopornością jak i z BMI (wskaźnik masy ciała) [Kannt i wsp., 2015; Liu i wsp., 2015].

Kolejnym mechanizmem działania NNMT może być jego wpływ na stosunek S-Adenozylometioniny do S-Adenozylhomocysteiny (SAH) oraz pulę donora grup metylowych. W badaniach Kraussa i wsp. [2014] wyciszenie NNMT w komórkach tkanki tłuszczowej podniosło stosunek SAM do SAH, a także zwiększyło globalną metylację lizyny w pozycji 4 histonu 3 odpowiedzialną za aktywację transkrypcji. W wątrobie jednak sytuacja wygląda nieco inaczej, ponieważ NNMT nie jest główną metylotransferazą w tym narządzie. Obok niej aktywnie działają tam N-metylotransferaza guanidynooctowa (GAMT), N-metylotransferaza fosfatydyloetanolaminowa (PEMT) oraz N-metylotransferaza glicynowa (GNMT) [Mato i wsp., 2008]. GNMT chroni komórki wątroby przed zmianami SAM – podczas okresów intensywnego wykorzystywania SAM aktywność GNMT maleje i *vice versa* [Mudd i wsp., 2007]. Prawdopodobnie jest to przyczyną tego, że nie udało się zaobserwować zmian stosunku SAM/SAH po wyciszeniu genu *NNMT* u myszy prawidłowych [Hong i wsp., 2015]. Dopiero u zwierząt pozbawionych GNMT suplementacja nikotynamidu sprawiła, że można było zaobserwować obniżenie poziomu SAM [Varela-Rey i wsp., 2010].

1.3.2. Rola NNMT w stanach zapalnych

Podniesiony poziom NNMT w zaburzeniach związanych z występowaniem stanu zapalnego zaobserwowano już w latach 90 ubiegłego wieku. Ta zależność nie jest specyficzna pod względem narządu czy typu zaburzenia, co sprawia, że trudno jest ustalić, czy jest dziełem przypadku czy też uniwersalnym mechanizmem zaangażowanym w odpowiedź komórek na stres. W swojej publikacji Santiyagu i wsp. [2011] pokazali, że ekspresja genu kodującego *NNMT* jest znacznie podniesiona w płucach pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) w porównaniu do osób zdrowych. *NNMT* należało także do jednego z ośmiu genów, których ekspresja różniła się ponad 1,8-krotnie między łagodną i umiarkowaną postacią choroby, identyfikując je tym samym jako potencjalne markery stopnia zaawansowania

POChP. Inni autorzy pokazali wzrost ekspresji *NNMT* w przeponie i mięśni czworogłowym uda u pacjentów ze zdiagnozowanym POChP, przy czym obserwowany wzrost w mięśniach kończyn był dużo większy niż w przeponie. Odwrotnie niż w poprzedniej pracy, autorzy negatywnie korelowali poziom NNMT ze stopniem zaawansowania POChP, a także zanikiem mięśni kończyn. Również w mioblastach zauważono istotny wzrost poziomu NNMT w odpowiedzi na traktowanie interleukiną 6 (IL-6), transformującym czynnikiem wzrostu beta (TGF- β) i TNF- α . Nadekspresja *NNMT* w mioblastach zwiększała znacznie proliferację i migrację tych komórek, nie wpływając ich przeżywalność, a także chroniła przed stresem oksydacyjnym wywołanym nadtleniem wodoru. Autorzy ci postulują, że wzrost poziomu NNMT w mięśniach badanych pacjentów może być adaptacyjną odpowiedzią ochronną organizmu, poprawiającą miogenezę i stanowiącą ochronę przed reaktywnymi formami tlenu [Kim i wsp., 2010].

Podwyższony poziom NNMT obserwowano również u pacjentów z dystrofią mięśniową oraz w modelu mysim dystrofii Duchenna (*Mdx*). Wykazano, że suplementacja prekursora rybozydu nikotynamidu, który jest prekursorem NAD⁺ zapobiega starzeniu się komórek satelitowych mięśni szkieletowych u myszy z dystrofią mięśniową [Zhang i wsp., 2016]. Zahamowanie aktywności enzymatycznej NNMT przy pomocy inhibitora u myszy starych (24-miesięcznych) po uszkodzeniu mięśnia zwiększało proliferację komórek satelitowych i poprawiało regenerację włókien mięśniowych, co przekładało się nie tylko na ich wzrost mięśni, ale też na poprawę ich kurczliwości. Podobne wyniki uzyskano na mioblastach linii C2C12, gdzie zahamowanie NNMT promowało i wzmocniło różnicowanie komórek, a towarzyszyły temu zmiany w komórkowym NAD⁺/NADH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) stanie redox [Neelakantan i wsp., 2019].

Pomimo tego, że ekspresja genu *NNMT* w mózgu jest stosunkowo niska, udział tego białka w przebiegu chorób ośrodkowego układu nerwowego jest brany pod uwagę. Podwyższony poziom NNMT obserwowano w mózdkach pacjentów, którzy zmarli z powodu choroby Parkinsona. Autorzy podejrzewali, że NNMT może obniżać aktywność kompleksu I u tych pacjentów na dwa sposoby – obniżając pulę nikotynamidu potrzebnego do syntezy NAD⁺ oraz powodując wzrost metylacji tetrahydroizochinoliny czy beta-karboliny, które są endogennymi neurotoksynami i potencjalnymi inhibitorami kompleksu I łańcucha oddechowego [Parsons i wsp. 2002; Parsons i wsp., 2003]. W 2016 roku ten sam zespół potwierdził zdolność NNMT do katalizowania metylacji endogennej beta-karboliny – (norhamanu) w warunkach *in vitro*, co jednak miało pozytywny wpływ na przeżywalność komórek z racji mniej toksycznego efektu metabolitu takiej reakcji – N-metylonorhamanu w

porównaniu do swego prekursora [Thomas i wsp., 2016]. Dodatkowo, autorzy przeprowadzili nadekspresję *NNMT* w linii SH-SY5Y (komórki ludzkiej neuroblastoma), która naturalnie nie ma tego enzymu, zauważając istotny wzrost przeżywalności komórek i wytwarzanie ATP także w odpowiedzi na inkubacje z inhibitorami kompleksu I. Podobny efekt protekcyjny miała inkubacja z N₁-metylonikotynamidem [Parsons i wsp., 2015; Thomas i wsp., 2016]. Według tych autorów MNA chroni podjednostkę NDUFS3 kompleksu I przed degradacją, mając tym samym mitoprotekcyjny efekt [Parsons i wsp., 2011]. Nadekspresja *NNMT* powodowała znaczące zwiększenie poziomu sirtuin 1, 2 i 3. Wyciszenie sirtuiny 3 natomiast istotnie obniżało aktywność kompleksu I i poziom ATP w komórkach, co świadczy z kolei o tym, że właśnie ona pośredniczy w aktywowaniu kompleksu I przez *NNMT* [Liu i wsp., 2015].

1.3.3. *NNMT* a nowotwory

Komórki nowotworowe charakteryzują się zmienionym metabolizmem. Jest to efektem mutacji genów kodujących enzymy kluczowych szlaków metabolicznych, co przekłada się na ekspresję onkogenów i supresorów nowotworów [Wellen i Thompson, 2012]. Nie wykryto dotychczas mutacji *NNMT* w komórkach nowotworowych, natomiast liczne badania transkryptomyczne, pokazują wzrost poziomu mRNA kodującego *NNMT* w różnych ich typach. Również poziom białka *NNMT* jest podniesiony niemal we wszystkich badanych nowotworach, z wyjątkiem raka wątrobowokomórkowego [Kim i wsp., 2009].

Wzmoczona aktywność *NNMT* jest łączona z agresywnością i progresją choroby nowotworowej niezależnie od narządu, którego dotyczy. Obniżenie ekspresji *NNMT* hamowało proliferację i migrację komórek linii 253J nowotworu pęcherza moczowego oraz raka płaskonabłonkowego jamy ustnej [Pozii i wsp., 2013; Wu i wsp., 2008], a także obniżało zdolność do tworzenia przerzutów komórek raka jasnokomórkowego nerek na ścieżce zależnej od MMP-2 (metaloproteiny 2) oraz PI3K/Akt (kinazy 3-fosfoinozytowej i kinazy białkowej Akt) [Tang i wsp., 2011]. W komórkach raka płaskonabłonkowego przełyku wyciszenie *NNMT* również hamowało migrację komórek a także zmniejszało ich przeżywalność indukując apoptozę oraz zatrzymanie cyklu komórkowego na ścieżce zależnej od szlaku sygnalizacyjnego białek Wnt/ β -kateniny [Cui i wsp., 2019]. Nadekspresja *NNMT* skorelowana jest z progresją nowotworu, podniesionym poziomem p53 oraz wzmoczoną fosforylacją kinazy białkowej Akt i wskazuje na złe rokowanie u chorych na raka endometrium o wysokim stopniu złośliwości [Akar i wsp., 2019]. U pacjentek cierpiących na nowotwór piersi poziom *NNMT* jest również

negatywnie skorelowany z przeżywalnością i koreluje z opornością na chemoterapię w wyniku stabilizacji białka sirtuiny 1 [Wang i wsp., 2019].

Ulanovskaya i wsp. [2013] wykazali, że wzrost poziomu NNMT w nowotworach pociąga za sobą obniżenie puli S-Adenozylo-metioniny. To zmniejsza metylację histonów oraz białek niehistonowych tym samym wpływając na profil ekspresji genów. Autorzy Ci obserwowali globalny spadek metylacji lizyny w pozycjach 9 oraz 27 w cząsteczce histonu 3, powiązanych z represją transkrypcji, a także wzrost poziomu niektórych białek będących onkogenami, natomiast wyciszenie genu *NNMT* dawało przeciwstawne skutki. Podobne efekty opisano dla fibroblastów związanych z nowotworem (CAF), dodatkowo ustalając, że NNMT jest niezbędnym i wystarczającym czynnikiem do ich różnicowania i progresji nowotworu, co czyni je potencjalnym celem terapii [Eckert i wsp., 2019]. Inni badacze wykazali, że aktywność NNMT zapobiega metylacji, a tym samym aktywacji PP2A (białkowej fosfatazy 2A) poprzez zmniejszenie puli SAM. Wyciszenie *NNMT* zwiększa metylację PP2A, co skutkuje zahamowaniem onkogennych kinaz serynowo/treoninowych [Kamalakkannan i wsp., 2016]. NNMT również może negatywnie regulować proces autofagii w komórkach nowotworowych poprzez pośredni wpływ na metylację PP2A i fosforylację ULK1 (kinaza aktywująca autofagię podobna do Unc-51 1) [Shin i wsp., 2018]. Powyższe wyniki wyraźnie wskazują na udział NNMT w procesie nowotworzenia oraz przeżywalności komórek, lecz mechanizmy zaangażowane w to zjawisko wciąż pozostają niejasne.

1.3.4. Rola NNMT w śródbłonku naczyń krwionośnych

Istnieje niewiele doniesień opisujących rolę NNMT w śródbłonku, jednak te, które można znaleźć szczególnie znaczenie przypisują produktowi katalizowanej reakcji (MNA) jako czynnikowi ochronnemu dla układu sercowo-naczyniowego. Dysfunkcja śródbłonka przyczynia się do rozwoju zagrażających życiu zaburzeń ze strony układu sercowo-naczyniowego w tym miażdżycy. Jednym z głównych powodów tego jest zaburzone wydzielanie tlenu azotu [Kaźmierczak i wsp., 2008]. U szczurów z farmakologicznie wywołaną cukrzycą suplementacja MNA obniżała peroksydację lipidów, karbonylację białek oraz zapobiegła za pośrednictwem tlenu azotu zależnemu od śródbłonka skurczowi aorty [Watała i wsp., 2009]. MNA może zwiększać stosunek tyrozyny do fenyloalaniny (Tyr/Phe) w śródbłonku myszy, będący naturalnym wskaźnikiem niedoboru kofaktora eNOS – BH4 (tetrahydrobiopteryna). Obniżona wartość tego stosunku może świadczyć o rozprzęganiu eNOS, a tym samym zmniejszonym wytwarzaniu NO, powstawaniu reaktywnych form tlenu

i dysfunkcji śródbłonna. Jest to więc jeden z potencjalnych mechanizmów, na drodze których N¹-metylonikotynoamid może wpływać na produkcję tlenku azotu [Ryguła i wsp., 2015].

Udowodniono również, że podawanie MNA stymuluje wytwarzanie prostacykliny 2 [Nejabat i wsp., 2017]. MNA hamuje zakrzepicę zależną od płytek krwi *in vivo* poprzez mechanizm obejmujący cyklooksygenazę 2 (COX-2) i prostacyklinę 2 [Chłopicki i wsp., 2007]. Na ścieżce zależnej od PGI₂, MNA także poprawia wydolność wysiłkową u myszy z cukrzycą zmniejszając leukocytozę [Przyborowski i wsp., 2015].

Zaskakujące wyniki dotyczące stosowania egzogenego N₁-metylonikotynamidu w leczeniu pacjentów z chorobami skóry takimi jak ostra krótkotrwała egzema oraz oparzeniami I stopnia uzyskali Gębicki i wsp [2003]. Nanoszenie MNA w postaci żelu na miejsca dotknięte chorobą okazało się być skuteczne w jej leczeniu. U wszystkich pacjentów z oparzeniami zaobserwowano pozytywne efekty terapeutyczne polegające na szybkim ustąpieniu objawów zapalenia w ciągu pierwszych dni leczenia. Znacznie przyspieszony proces gojenia ran wiązany jest z wpływem MNA na angiogenezę, a także zdolnością do zmniejszania adhezji komórek i cząsteczek prozapalnych do powierzchni śródbłonna naczyniowego.

MNA ma także swój udział w regulacji osi renina-angiotensyna oraz obniżeniu poziomu ADMA (asymetrycznej dimetyloargininy) – naturalnie występującego w krwiobiegu analogu L-argininy, powstającego wskutek degradacji białek metyloowanych, którego podniesiony poziom hamuje syntezę tlenku azotu [Najebati i wsp., 2017; Sibal i wsp., 2010]. Renina katalizuje przemianę angiotensynogenu do angiotensyny I (Ang I), a ta z kolei może być przemieniona do angiotensyny II (AngII) przez konwertazę angiotensyny (ACE). Hormon ten wywołuje silny skurcz mięśni gładkich drobnych naczyń krwionośnych, podnosząc tym samym ciśnienie krwi. Angiotensyna II może być przemieniona w angiotensynę 1-7 (Ang 1-7), mającą z kolei działanie relaksacyjne w naczyniach krwionośnych, a enzym, który pośredniczy temu to konwertaza angiotensyny 2 (ACE2) [Najebati i wsp., 2017]. U myszy z fenotypem miażdżycowym (ApoE/LDLR^{-/-}) wykazano, że suplementacja MNA znacząco obniża poziom angiotensyny II oraz zwiększa stosunek L-argininy do ADMA. MNA także aktywował ścieżkę ACE2/Ang(1-7) i hamował ACE/AngII, działając podobnie do znanego leku z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny – perindoprilu [Bar i wsp., 2017]. Zgodnie z doniesieniami Jianga i wsp. natomiast, sposób w który MNA kontroluje poziom ADMA może kryć się w zmianie stopnia metylacji dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAM), będącej enzymem metabolizującym ADMA [2016].

A zatem biologiczne efekty MNA są w znacznym stopniu poznane i udział NNMT w fizjologii naczyń krwionośnych jest niekwestionowany. Nie jest jednak jasne, czy w obecności

czynników prozapalnych i wywołujących stres komórkowy dochodzi do zwiększenia ilości/aktywności NNMT w komórkach śródbłonna, a jeżeli tak to czy zmiana ta jest skorelowana ze zmianami metabolicznymi komórek, w tym z metabolizmem energetycznym. W niniejszej rozprawie komórki aorty człowieka były traktowane LPS czynnikiem prozapalnym szeroko badanym w kontekście zaburzeń śródbłonkowych, ale nie wiązanych dotychczas z aktywnością NNMT. Badany był wpływ lipopolisacharydu na metabolizm energetyczny komórek śródbłonna i możliwość wpływania na potencjalne zmiany poprzez modyfikowanie poziomu NNMT.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Literatura naukowa dostarcza wielu informacji dotyczących wpływu LPS na funkcjonowanie śródbłonna naczyniowego szczególnie w kontekście rozwoju stanu zapalnego oraz zmian patologicznych będących jego konsekwencją. Natomiast zrozumienie podstaw biochemicznych odpowiedzi na LPS, zwłaszcza w obszarze metabolizmu energetycznego komórek wymaga dodatkowych wyjaśnień. Ponadto, wcześniejsze obserwacje opublikowane przez innych autorów [Kim i wsp., 2010; Santiyagu i wsp. 2011] oraz wstępne wyniki badań wykonanych w Pracowni Metabolizmu Komórki wskazują, że traktowanie komórek śródbłonna różnymi czynnikami stresogennymi [Dymkowska i wsp., 2020] prowadzi do zwiększenia ilości białka NNMT. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie hipotezy, że podobny efekt uzyska się w komórkach HAEC traktowanych LPS w sposób na tyle łagodny, że nie wpływający na ich przeżywalność, co może pozwolić na śledzenie procesów adaptacyjnych, niezaburzonych przez aktywację procesów prowadzących do śmierci komórek. W zaplanowanych badaniach uwaga została skupiona na wskazaniu zmian metabolizmu komórek traktowanych LPS, ze szczególnym, ale nie wyłącznym uwzględnieniem metabolizmu mitochondriów oraz przedstawieniu obserwowanych efektów na tle spodziewanych zmian ilości/aktywności NNMT w komórkach. W celu wykonania tego planu przeprowadzone badania były skoncentrowane wokół trzech zadań:

1. Opisanie skutków metabolicznych traktowania komórek HAEC lipopolisacharydem, optymalizacja warunków doświadczalnych oraz ustalenie jaki jest wpływ LPS na ilość białka NNMT w komórkach.
2. Ustalenie związku między obecnością białka NNMT a aktywnością metaboliczną komórek HAEC traktowanych LPS, ze szczególnym uwzględnieniem bioenergetyki komórki.
3. Zbadanie czy wyciszenie genu kodującego *NNMT* ma wpływ na inne procesy komórkowe niezwiązane bezpośrednio z metabolizmem energetycznym, a zatem ocenienie uniwersalności wcześniejszych obserwacji uzyskanych w czasie realizacji pkt.2.

3. METODOLOGIA

3.1. Hodowla komórek

Komórki pierwotne śródbłonna aorty człowieka HAEC (Lonza) pochodziły od trzech różnych dawców płci męskiej o podobnym wieku. Hodowlę prowadzono w pożywce EGM-2 zawierającej glukozę w stężeniu 1 g/l (Lonza) wzbogaconej: kwasem askorbinowym, hydrokortyzonem, 2% płodową surowicą bydlęcą, gentamycyną, czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), rekombinowanym ludzkim czynnikiem wzrostu naskórka (rh-FGF), rekombinowanym analogiem insulinopodobnego czynnika wzrostu (R3-IGF) oraz ludzkim czynnikiem wzrostu śródbłonna (hEGF).

Znajdujące się w probówkach zamrożone komórki rozmrażano w łaźni wodnej (37°C), a następnie przenoszono do probówek typu Falcon zawierających 19 ml pożywki hodowlanej, zawieszano i rozdzielano na dwie szalki o średnicy 10 cm. Po upływie 5 godzin, gdy komórki przywarły do podłoża, wymieniało się pożywkę na świeżą. Komórki hodowano w inkubatorze utrzymując temperaturę 37°C, 5% stężenie CO₂ oraz 95% wilgotności powietrza. Pasaże przeprowadzano przy 60% konfluencji. W tym celu usuwano z szalki pożywkę, przemywano ją 8 ml sterylnego PBS (wodny roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanem) bez jonów wapnia i magnezu, a po jego usunięciu podawano 2 ml roztworu 0,05% trypsyny w EDTA. Tak przygotowaną szalkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 minuty, po czym oglądano pod mikroskopem by sprawdzić stopień odklejenia się komórek. Następnie dodawano po 4 ml PBS z jonami wapnia i magnezu, uzupełnionego 5% FBS w celu inaktywacji trypsyny. Zawiesinę komórek przenoszono do próbek typu Falcon i wirowano przez 3 minuty przy 200 x g. Płyn nad osadu usuwano, a osad komórek zawieszano w porcji świeżej pożywki, po czym wysiewano równomiernie na szalki. Wszystkie odczynniki dodawane do komórek ogrzewano wcześniej do 37°C w łaźni wodnej.

Część komórek z pierwszego lub drugiego pasażu (licząc od rozmrożenia oryginalnej fiolki, otrzymanej od dostawcy) ponownie zamrażano jako zapas do wykorzystania w późniejszym czasie. W tym celu osad uzyskany po wirowaniu zawieszano w świeżej pożywce hodowlanej z dodatkiem 10% FBS (płodowa surowica bydlęca) i 10% DMSO, a następnie zawiesinę przenoszono do probówek przystosowanych do zamrażania, umieszczano w schłodzonym pojemniku i przenoszono do zamrażarki o temperaturze -80°C. Po pięciu dniach próbki z komórkami przenoszono do zbiornika z ciekłym azotem (-196°C).

3.2. Model doświadczalny

Komórki HAEC hodowano do uzyskania całkowitej konfluencji na szalkach, których wielkość dostosowana była do planowanego doświadczenia. Komórki traktowano LPS (bakteryjny lipopolisacharyd z *Escherichia coli* O111:B4, List Biological, #421) podawanym w stężeniu 100 ng/ml LPS przez 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 lub 24 godziny.

3.3. Wyciszanie genu *NNMT* metodą si-RNA (małe interferujące RNA)

W dniu poprzedzającym procedurę wyciszania komórki pasażowano i wysiewano w taki sposób, by następnego dnia monowarstwa osiągała 100% konfluencję. Następnego dnia przygotowywano mieszaninę zawierającą 4 µl odczynnika JetPrime (Polyplus), 200 µl buforowanego roztworu do wyciszania, 0,6 µl odpowiednie si-RNA – *scrambled* (Ambion, #4390847) lub specyficznego dla *NNMT* (Ambion, #4390826) oraz 1,8 ml pożywki hodowlanej i inkubowano ją przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Tak wzbogaconą pożywkę podawano do szalek z komórkami i umieszczano je na 24 godziny w inkubatorze. Następnie usuwano pożywkę zawierającą si-RNA, wymieniano na świeżą (już bez dodatku odczynników do wyciszania genu) i inkubowano przez następne 24 godziny. Tak przygotowane komórki były wykorzystywane do dalszych doświadczeń. Efektywność wyciszania genu kodującego *NNMT* oceniano przy pomocy metody Western Blot.

3.4. Wykrywanie białek metodą Western Blot

3.4.1. Otrzymywanie lizatów komórkowych

Do doświadczeń wykorzystywano komórki rosnące na szalkach o średnicy 6 cm. Po umieszczeniu szalek na lodzie usuwano pożywkę i monowarstwę komórek przemywano 2 ml PBS o temperaturze 4°C. Po usunięciu PBS do każdej szalki podawano 120 µl zimnego roztworu do lizy (Cell Signaling) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Roshe). Następnie komórki zeskrobywano i uzyskaną zawiesinę przenoszono do próbek typu Eppendorf umieszczonych w łaźni lodowej. Zawiesinę kilkakrotnie wciągano do końcówki pipety automatycznej na 1 ml a następnie dziesięciokrotnie przeciągano przez igłę do strzykawki tuberkulinowej. Próbkę pozostawiano na lodzie na 20 minut, a następnie wirowano w temperaturze 4°C, przez 20 minut przy 15000 x g. Supernatanty przenoszono do nowych zimnych próbek typu Eppendorf, a osad odrzucono. Małą porcję supernatantu pobierano w celu zmierzenia stężenia białka i przechowywano w -20°C, a do pozostałej części dodawano roztwór Laemmliego 4X (4% SDS

(dodecylosiarczan sodu); 10% 2-merkaptoetanol; 20% glicerol; 0,004% błękit bromofenolowy; 0,125 M Tris-HCl) po czym umieszczano na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 95°C. Po schłodzeniu próby przechowywano w -20°C.

3.4.2. Przygotowanie żeli poliakrylamidowych

W zależności od mas cząsteczkowych badanych białek (a zatem ich ruchliwości elektroforetycznej) przygotowywano żele poliakrylamidowe o odpowiednio dobranej zawartości akrylamidu: 10%; 12% lub 15%. oraz 5% żel zagęszczający. Dokładny skład żeli umieszczono w tabeli 1.1.

Tabela 3.1. Skład żelu rozdzielającego oraz zagęszczającego. Dane podane w ml na jedną porcję żelu

Składniki na 10ml żelu rozdzielającego	10%	12%	15%	Składniki na 3ml żelu zagęszczającego	5%
Woda	4,0	3,3	2,3	Woda	2,1
Akrylamid	3,3	4,0	5,0	Akrylamid	0,5
Tris 1,5M; pH 8,8	2,5	2,5	2,5	Tris 1M; pH 6,8	0,38
10% SDS	0,1	0,1	0,1	10% SDS	0,03
10% APS	0,1	0,1	0,1	10% APS	0,03
Temed	0,004	0,004	0,004	Temed	0,003

3.4.3. Elektroforeza SDS-PAGE

Przechowywane próbki rozmrażano i starannie wytrząsano. Na żel nakładano po 30 µg białka na każdą ścieżkę oraz w osobnych studzienkach po 5 µl barwnego wzorca mas. Do aparatu wlewano bufor do elektroforezy o składzie 25 mM Tris; 192 mM glicyna; 0,1% SDS; pH 8,3 doprowadzone za pomocą HCl, a następnie przeprowadzono elektroforezę przy stałym napięciu 120 V do momentu, aż obserwowano satysfakcjonujący rozdział wzorca mas.

3.4.4. Transfer białek na błonę z polifluorku winylidenu (PVDF)

Błonę (Amersham) przyciętą do odpowiednich rozmiarów, aktywowano przez 20 s w metanolu, a następnie zanurzono na 5 minut wraz z bibułą i gąbkami w buforze do transferu (25 mM Tris; 192 mM glicyna; 10% metanol). W kasecie do transferu umieszczono kolejno: gąbkę, bibułę, żel, błonę, bibułę, gąbkę. Tak przygotowaną kasetę umieszczono w aparacie do elektrotransferu, uzupełniano bufor do odpowiedniej objętości i przez 1,5 godziny prowadzono transfer przy stałym natężeniu 350 mA.

3.4.5. Wizualizacja białek na błonie

Błony blokowano przez 60 minut w 10 ml roztworu 5% odtłuszczonego mleka w TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; woda destylowana; Tween-20). Następnie płukano trzykrotnie po 5 minut w TBS-T i umieszczano w szklanych rurkach zawierających 2 ml roztworu odpowiedniego przeciwciała pierwszorzędowego rozpuszczonego w TBS-T z dodatkiem 5% albuminy lub 5% mleka. Lista przeciwciał pierwszorzędowych znajduje się w tabeli 1.2. Inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym trwała 24 godziny w 4°C przy stałym mieszaniu na rolkach. Po trzykrotnym przemyciu błon TBS-T (po 5 minut każde) błony umieszczano w 4 ml roztworu odpowiedniego przeciwciała drugorzędowego anty-mysz lub anty-królik firmy Abcam - sprzężonego z peroksydazą chrzanową, rozcieńczonego w stosunku 1:5000 w TBS-T z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka. W przypadku wykrywania beta-aktyny inkubacja z przeciwciałem drugorzędowym nie była konieczna, a zatem po odmyciu przeciwciała pierwszorzędowego błona była gotowa do skanowania.

Inkubację z przeciwciałami drugorzędowymi prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym błonę przemywano trzy razy po 5 minut TBS-T. Wszystkie powyższe czynności wykonywano na kołyszce laboratoryjnej.

Na tak przygotowane błony nanoszono światłoczuły odczynnik Luminata Clasic (Merck Milipore), a po upływie 5 minut skanowano w urządzeniu Fusion w celu wizualizacji prążków. Otrzymane obrazy opracowywano w programie Bio1D w celu analizy densytometrycznej prążków.

Tabela 3.2. Lista użytych przeciwciał pierwszorzędowych

Przeciwciało I-rzędowe	Nr katalogowy	Firma	Rozcieńczenie	Roztwór
ACC	3662	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
ACC p(Ser ⁷⁹)	3676	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
AMPK	2532	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
AMPK p(Thr ¹⁷²)	2531	Cell Signaling	1:2000	5% BSA
ATF4	10835-1-AP	Proteintech	1:1000	5% BSA
ATG3	3415	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
ATG16L	8089	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Beklina 1	3495	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Cox2	sc-19999	SantaCruz	1:200	5% BSA

Przeciwciało I-rzędowe	Nr katalogowy	Firma	Rozcieńczenie	Roztwór
Cu/Zn-SOD	sc-11407	SantaCruz	1:1000	5% BSA
eIF2 α	Sc-133132	SantaCruz	1:200	5% BSA
eIF2 α p(Ser ⁵¹)	3597	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
eNOS	9572	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
eNOS p(Ser ¹¹⁷⁷)	9571	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Fis	Sc-376447	SantaCruz	1:500	5% BSA
Grp78	Ab21685	Abcam	1:1000	5% BSA
Histone H3	14269	Cell Signaling	1:2000	5% BSA
Di/Tri-Methyl-Histone H3 (Lys ⁹)	5327	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
HO-1	Sc-136960	SantaCruz	1:200	5% BSA
ICAM-1	sc-8439	SantaCruz	1:500	5% BSA
MAP LC3-II α/β	Sc-398822	SantaCruz	1:500	5% BSA
Mfn1	14739	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
Mn-SOD	611581	BD Transd. Lab.	1:4000	5% BSA
NNMT	sc-376048	SantaCruz	1:500	5% BSA
Nrf2	Sc-365949	SantaCruz	1:200	5% BSA
Nrf2 p(Ser ⁴⁰)	ab75026	Abcam	1:5000	5% mleko
OPA1	80471	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
PP2A-C a/b	Sc-80665	SantaCruz	1:1000	5% BSA
PP2A-C a/b methyl(Leu ³⁰⁹)	MA5-18072	Thermo Fisher Scientific	1:1000	5% BSA
SQSTM/p62	5114	Cell Signaling	1:1000	5% BSA
VCAM-1	sc-13160	SantaCruz	1:500	5% mleko
β -aktyna	A3854	Sigma-Aldrich	1:50000	5% mleko

3.4.6. Usuwanie przeciwciał z błony PVDF („stripping”)

W celu usunięcia przeciwciał z błony i ponownego jej użycia do wizualizacji innych białek błony inkubowano przez 30 minut w 40 ml buforu do „strippingu” (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; beta-merkaptotanol; woda destylowana) w łaźni wodnej o temperaturze 55°C, z ciągłym mieszaniem. Następnie każdą błonę płukano przez 5 minut w 40 ml wody

dejonizowanej o temperaturze 55°C, po czym błony przenoszono na kołyskę laboratoryjną i płukano roztworem TBS-T sześć razy po 5 minut. W kolejnym kroku błony blokowano przez godzinę w 5% roztworze odłuszczonego mleka w TBS-T oraz przemywano trzykrotnie po 5 minut TBS-T. Tak przygotowane błony przechowywano w TBS-T w temperaturze 4°C.

3.5. Oznaczanie stężenia białka w próbach

3.5.1. Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda

Przygotowywano krzywą wzorcową do oznaczania stężenia białka. W tym celu do jednorazowych kuwet spektrofotometrycznych podawano po 0; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 5; 7,5 lub 10 µl roztworu albuminy o stężeniu 2 mg/ml i uzupełnioną wodą dejonizowaną do objętości 1,2 ml, a następnie dodano po 300 µl odczynnika Bradforda (Bio-Rad) (każdą próbę wykonywano w dwóch powtórzeniach). Po 10 minutach mierzono absorbancję prób wobec próby zero (300 µl odczynnika Bradforda, 1,2 ml wody) przy długości fali 595 nm. Obliczano średnie z dwóch prób dla danego stężenia i wykreślano krzywą zależności absorbancji od stężenia białka.

W celu oznaczenia zawartości białka w próbach, do jednorazowych kuwet spektrofotometrycznych odmierzano po 1197 µl wody destylowanej, 3 µl rozmrożonej i zwirowanej próby i 300 µl odczynnika Bradforda (każda w dwóch powtórzeniach). Po 10 minutach zmierzono absorbancję prób wobec próby zero (300 µl odczynnika Bradforda, 1,2 ml wody) przy długości fali 595 nm. Absorbancję dla dwóch powtórzeń uśredniano, a następnie odczytywano zawartość białka w próbce z posługując się krzywą wzorcową.

3.5.2. Oznaczanie stężenia białka metodą Lowry'ego

Pomiar przeprowadzano na płytce 96-dołkowej. Do każdego dołka pipetowano odpowiednią objętość badanej próby i uzupełniano wodą dejonizowaną do 40 µl. Następnie dodawano po 200 µl roztworu zawierającego roztwór I (2% winianu sodowo-potasowego) i roztwór II (1% roztwór CuSO₄, 2% Na₂C₀₃ w 0,1 M NaOH) w proporcji 98:2, wytrząsano przez 30 sekund i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po upływie tego czasu dodawano po 20 µl odczynnika Folina-Ciocalteu, ponownie wytrząsano przez 30 sekund i inkubowano w temperaturze pokojowej 30 minut. W tak przygotowanych próbach mierzono absorbancję przy długości fali 660 nm przy użyciu czytnika płytek Tekan Infinite M1000 Pro. Przy każdym pomiarze wykonywano krzywą wzorcową przy użyciu kolejnych rozcieńczeń

standardowego roztworu albuminy z surowicy bydlęcej o wyjściowym stężeniu 2 mg/ml. Zawartość białka w badanej próbce odczytywano z krzywej wzorcowej.

3.6. Pomiar masy mitochondrialnej

Komórki rosnące na płytce 24-dołkowej inkubowano z sondą Mitotracker Green (Molecular Probes) rozpuszczoną w pożywce hodowlanej w stosunku 1:10000 w 37°C przez 20 minut. Sonda ta emituje fluorescencję dopiero gdy znajdzie się w lipidowym środowisku mitochondriów, gdzie akumuluje się niezależnie od potencjału transbłonowego [Agnello i wsp., 2008]. Płytkę przemywano dwukrotnie medium oraz trzykrotnie PBS z jonami wapnia i magnezu w temperaturze 37°C. Pomiar prowadzono w takim samym PBS z dodatkiem 1 μ M pirogronianu i 5 μ M glukozy, ogrzany do temperatury 37°C. Mierzono fluorescencję sondy przy wzbudzeniu światłem o długości 490 nm i odczycie emisji o długości fali 530 nm posługując się czytnikiem Tecan Infinite M1000 Pro. Następnie po usunięciu cieczy i osuszeniu płytki do każdego dołka podawano 300 μ l 0,5 M NaOH w celu rozpuszczenia komórek do wyznaczenia ilości białka.

3.7. Wykrywanie reaktywnych form tlenu (RFT)

Wszystkie pomiary przeprowadzono na konfluentnych komórkach rosnących na 12-dołkowych płytkach przy użyciu czytnika płytek Tecan Infinite M1000 Pro. Po skończonych pomiarach płytkę osuszano i komórki rozpuszczano w 0,5 M NaOH, oznaczano białko i normalizowano wyniki pomiarów fluorescencji. W celu otrzymania pełnego obrazu, poziom RFT mierzono przy pomocy trzech sond, pozwalających wykryć reaktywne formy tlenu w różnych przedziałach komórkowych. Wszystkie pomiary prowadzono niezależnie.

W celu wykrycia anionorodnika ponadtlenkowego w cytosolu komórki inkubowano z sondą 5 μ M DHE (dihydroetydium, Molecular Probes) w podawaną w pożywce, przez 30 minut w 37°C. Utlenianie tej sondy w komórkach powoduje powstawanie etydydy, która po wbudowaniu się w DNA (interkalacja) i wzbudzeniu światłem o długości 535 nm, emituje falę o długości 610 nm po. Po zakończeniu inkubacji z sondą komórki trzykrotnie przemywano PBS z jonami wapnia i magnezu ogrzanym do 37°C oraz mierzono fluorescencję. Utlenianie DHE może następować z udziałem anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru a także różnorodnych procesów komórkowych z udziałem peroksydaz, oksydaz czy cytochromu C, co sprawia, że oznaczenie to nie jest specyficzne [Cho i Hwang, 2011].

Sonda DFF służy do wykrywania całkowitego poziomu reaktywnych form tlenu w komórce. Po dwukrotnym przemyciu PBS ogrzanym do temperatury 37°C, płytkę inkubowano z 10 µM roztworem sondy DFF (karboksy-2',7' -difluorodihydrofluoresceina, Invitrogen) w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ oraz 1 µM pirogronianem i 5 µM glukozą przez 30 minut w 37°C. Sonda ta jest połączona wiązaniem estrowym z resztą dwuoctanową, która umożliwia jej wejście do komórek. Wiązanie to jest hydrolizowane w środowisku wewnątrzkomórkowym przez niespecyficzne esterazy, a sonda pozostaje uwięziona w komórce, gdzie może ulec utlenieniu przez RFT. Zdolność do emisji światła ma jedynie forma utleniona sondy [Gomez i wsp., 2005]. Fluorescencję mierzono bez odpłukiwania sondy przy 520 nm po pobudzeniu światłem o długości 485 nm.

W celu zbadania poziomu RFT w mitochondriach komórki przemywano PBS z jonami wapnia i magnezu o temperaturze 37°C, a następnie inkubowano przez 10 minut w 37°C w obecności 5 µM sondy MitoSOX Red (2-hydroksymitoetydium, Invitrogen) rozpuszczonej w PBS z Ca²⁺ i Mg²⁺ z dodatkiem 1 µM pirogronianu i 5 µM glukozy. Sonda ta jest pochodną DHE, która dzięki dodatniemu ładunkowi nadawanemu przez kation trifenylofosfiny jest kierowana do mitochondriów. W macierzy mitochondrialnej jest utleniana i w tej formie emituje światło o długości fali 580 nm, po pobudzeniu falą o długości 510 nm [Kalyanaraman i wsp., 2012]. Pomiar przeprowadzano po trzykrotnym przepłukaniu komórek PBS bez jonów wapnia i magnezu ogrzanym do 37°C.

3.8. Pomiar potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej

Komórki hodowano na płytkach 24-dołkowych firmy Corning. Do kilku wybranych dołków dodano na 10 min. 5 µM CCCP (m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu) i walinomycynę 2 µg/ml i inkubowano w pożywce o temperaturze 37°C w obecności. Próby z 5 µM sondą JC-1 (5, 5', 6, 6' – tetrachloro-1, 1', 3, 3' – tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide, Molecular Probes) w pożywce hodowlanej. Związek ten występując w postaci monomerów, w reakcji na wzbudzenie falą o długości 488 nm emituje światło o długości fali 527 nm (zielone). Po nagromadzeniu się w mitochondriach JC-1 tworzy agregaty emitujące światło czerwone o długości fali 590 nm. Nagromadzanie się JC-1 w mitochondriach wymaga obecności potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej [Sivandzade i wsp., 2019]. Po zakończeniu inkubacji komórki przemywano dwukrotnie pożywką hodowlaną i trzykrotnie PBS ogrzanymi do 37°C, a następnie po podaniu pożywki przeprowadzano pomiar przy użyciu Laserowego Cytometru Skaningowego.

3.9. Oznaczanie metabolitów metodą HPLC i spektrometrii mas

Oznaczanie metabolitów, nukleotydów adeninowych oraz NAD^+ zostało przeprowadzone we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

3.9.1. Oznaczanie metabolitów oraz nukleotydów adeninowych metodą HPLC-MS

Komórki hodowane na szalkach o średnicy 6 cm przemywano 0,3 M roztworem zimnego mannitolu. Po jego usunięciu do szalek dodawano po 600 μl zimnej mieszaniny ekstrakcyjnej o składzie metanol:acetonitryl:woda w proporcji 2:2:1 i pozostawiono w lodzie na kołyszce laboratoryjnej przez 5 minut. Otrzymane ekstrakty zbierano znad warstwy komórek i wirowano przy 15000 x g w temperaturze 4°C. Supernatanty przechowywano w temperaturze -80°C. Pozostały na szalkach osad po osuszeniu rozpuszczano w 600 μl 0,5 M NaOH z 0,1% Tritonem, przenoszono ilościowo do probówek z których wcześniej pograno ekstrakty i przechowywano w celu zmierzenia ilości białka.

W celu pomiaru metabolitów do każdej próbki dodawano 140 pmoli winianu jako wzorca wewnętrznego i przeprowadzono pomiar z wykorzystaniem systemu chromatografii jonowymiennej (chromatograf Dionex ICS-3000, Thermo Fisher Scientific Inc.) sprzężonego ze spektrometrem mas Waters ZQ (Waters Corporation). Próby rozdzielano na wysokowydajnej kolumnie anionowymiennej AS11-HC elując roztworem KOH o zwiększającym się stężeniu od 1 do 80 mM. W celu określenia stężeń ATP, ADP i AMP zastosowano zintegrowany detektor UV z chromatografem Dionex (260 nm). Wszystkie próbki mierzono trzykrotnie, a wyniki oznaczano ilościowo zarówno w odniesieniu do wzorca odniesienia, jak i w stosunku do ilości białka. Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią z tych trzech pomiarów.

3.9.2. Oznaczanie NAD^+ metodą HPLC

Komórki przemywano zimnym PBS i dodawano do każdej szalki po 300 μl zimnego, 10% roztworu kwasu nadchlorowego. Następnie zdenaturowany materiał przenoszono do probówek Eppendorf, zawieszano stosując dziesięciokrotnie wciągnięcie przez igłę do strzykawki tuberkulinowej, intensywnie mieszano i inkubowano na lodzie przez 15 minut. Następnie, uzyskane zawiesiny wirowano przez 5 minut w 4°C z przyśpieszeniem 15000 x g a supernatanty (lizaty komórkowe) przenoszono do nowych probówek. Do każdej próbki dodawano po 80 μl 3 M węglanu potasu w celu neutralizacji kwasu i wytrącenia nadchloranu

potasu, próbki po zamieszaniu inkubowano na lodzie przez 10 minut. Po ponownym odwirowaniu przez 5 minut w 4°C z przyśpieszeniem 15000 x g supernatanty przenoszono do nowych probówek i przechowywano w -80°C. Pomiary ilości NAD⁺ wykonano zgodnie z metodą opisaną przez Yoshino i Imai [2013].

3.9.3. Oznaczanie nikotynamidu w pożywce hodowlanej

Z każdej szalki zebrano po 100 µl medium hodowlanego i zamrożono w -80°C. Dalsze oznaczenia zostały wykonane przez dr Łukasza Mateuszuka z Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków.

Do 50 µl odpowiednich rozcieńczeń pożywki dodawano po 5 µl wzorca wewnętrznego (deuterowane analogi związków) w stężeniu 25 µg/ml. Próbkę poddawano odbiałczaniu przy użyciu 100 µl acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwas mrówkowego następnie je intensywnie mieszano (vortex), schładzano do 4°C przez 15 min i wirowano (15000 x g, przez 15 min, przy 4°C). Supernatanty podawano na kolumnę do chromatografii cieczowej.

Analizę chromatograficzną przeprowadzono przy użyciu systemu UltiMate 3000 LC (Thermo Scientific Dionex, Sunnyvale, CA) składającego się z pompy (DGP 3600RS), przedziału kolumny (TCC 3000RS), autosamplera (WPS-3000TRS) i degazera SRD-3600. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie analitycznej Aquasil C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 mm; Thermo Scientific). Faza ruchoma składała się z acetonitrylu (A) i 5 mM mrówczanu amonu (B) w izokratycznej elucji (80:20 obj./obj.), Przy szybkości przepływu 0,8 ml/min. Detekcję przeprowadzono za pomocą spektrometru mas TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Gromadzenie i przetwarzanie danych odbywało się za pomocą oprogramowania Xcalibur 2.1.

3.10. Ocena pojemnościowego napływu wapnia

Komórki hodowano na szkiełkach prostokątnych pokrytych kolagenem i umieszczonych w szalkach o średnicy 3 cm. Szkiełka inkubowano z 2 µM roztworem sondy Fura-2 w pożywce hodowlanej w temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie pożywkę usuwano a szkiełka przemywano dwukrotnie buforowanym roztworem soli do oznaczeń wapnia BSS (osmotyczność buforu zbliżona do osmotyczności medium i wynosiła około 278 mOsm) z dodatkiem 1 µM pirogronianu, 5 µM glukozy i 100 µM CaCl₂. z 3 ml buforu BSS z dodatkiem 1 µM pirogronianu, 5 µM glukozy i 50 µM EGTA₂. Kuwetę umieszczano w fluorymetrze i prowadzono pomiar wzbudzając sondę naprzemiennie falą o długości 340 nm

(sonda związana z jonami wapnia) i 380 nm (sonda wolna bez Ca^{2+}), przy długości fali emisji 510 nm. Po stabilizacji pomiaru dodawano tapsygarginę (1 $\mu\text{l/ml}$) w celu opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej. Po upływie 10 minut dodawano roztwór CaCl_2 tak by końcowe stężenie Ca^{2+} było 2 mM. Po ustaleniu się stanu równowagi sygnał fluorescencyjny kalibrowano podając 4 μM jonomycynę, Po ustaleniu się nowego stanu równowagi dodawano 50 μl 0,5 M EGTA. Pomiar kończono w momencie ustanowienia się równowagi końcowej pomiędzy dwiema formami Fura-2 – związanej i niezwiązanej z jonami wapnia.

Stężenie jonów wapnia w cytosolu obliczano metodą opisaną przez Gryniewiczza i wsp. [1985]. Szybkość napływu jonów wapnia szacowano na podstawie nachylenia początkowego krzywej wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytosolu po podaniu CaCl_2 .

3.11. Immunocytochemia

Do wszystkich barwień użyto komórek rosnących na pokrytych kolagenem cielęcym szkiełkach o średnicy 12 mm (umieszczonych na płytce 24-dołkowej). Wszystkie płukania i inkubacje (jeśli nie zostało zaznaczone inaczej) przeprowadzano na kołyszce laboratoryjnej.

3.11.1. Barwienie mitochondriów

Komórki przez 20 min inkubowano z sondą MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) podaną w pożywce w stężeniu 100 nM, w temperaturze pokojowej stale mieszając na kołyszce laboratoryjnej. Następnie komórki przemywano trzykrotnie pożywką hodowlaną i dwa razy po 10 min 5% roztworem BSA (albumina surowicy bydłowej) w PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} . Komórki utrwalano inkubując przez 10 minut 4% PFA (paraformaldehyd), płukano dwukrotnie po 5 minut PBS bez jonów wapnia i magnezu i uprzepuszczalniano inkubując przez 5 minut z 0,1% Tritonem X100. Po dwóch 5 minutowych płukaniach przy pomocy PBS preparaty zostawiano na całonocne płukanie w PBS w 4°C. falloidyny 488 (Cytoskeleton) w celu wybarwienia cytoszkieletu aktynowego. Po trzykrotnym przemyciu PBS z 5% BSA komórki barwiono barwnikiem Hoechst 333302 (Thermo Fisher Scientific) 5 minut i ponownie trzykrotnie płukano PBS. Tak przygotowane preparaty umieszczano na odłuszczonych szkiełkach podstawowych w kropli odczynnika *VECTASHIELD Mounting Medium* (VECTOR Laboratories) i pozostawiano na dobę, po czym uszczelniano każde szkiełko lakierem i ponownie pozostawiano do wyschnięcia na kilka dni.

3.11.2. Barwienie lizosomów

Komórki inkubowano z LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific) w pożywce hodowlanej, przez 30 minut w 37°C. Następnie płukano je PBS bez jonów wapnia i magnezu, utrwalano 4% PFA mieszając przez 10 minut na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej i ponownie płukano trzykrotnie PBS. W kolejnym kroku komórki uprzepuszczalniano 0,1% Tritonem przez 5 minut, trzykrotnie płukano PBS i barwiono przez 5 minut odczynnikiem Hoechst. Po kolejnej serii płukań preparaty zamykano na szkiełkach podstawowych w kropli odczynnika *VECTASHIELD Mounting Medium*, a następnie uszczelniano lakierem i pozostawiano do wyschnięcia w 4°C, tak jak to opisano powyżej.

3.11.3. Barwienie metylowanej i acetylowanej lizyny 9 histonu 3

Komórki przemywano PBS i utrwalano 4% PFA przez 10 minut w temperaturze pokojowej stale mieszając. Następnie przemywano trzykrotnie PBS i uprzepuszczalniano 0,35% Tritonem przez 5 minut. Komórki ponownie przemywano trzykrotnie 1% roztworem BSA rozpuszczonym w PBS z dodatkiem 0,1% Tritonu (ten roztwór był używany do wszystkich dalszych płukań) oraz blokowano przez 1 godzinę w 5% BSA z 0,1% Tritonem. Następnie, preparaty trzykrotnie przemywano i podawano po 200 µl roztworu przeciwciał pierwszorzędowych przeciw H3K9me (1:100, Cell Signaling) rozpuszczonych w 5% BSA z 0,1% Tritonem i inkubowano w 4°C przez noc stale mieszając. Następnego dnia szkiełka ponownie przemywano trzykrotnie i podawano roztwór przeciwciał drugorzędowych (1:1000) Alexa fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) przeciwciał drugorzędowych rozpuszczonych w 5% BSA z 0,1% Tritonem. Inkubacje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Po upływie tego czasu i trzykrotnym przemywaniu preparaty inkubowano przez 5 minut w roztworze Hoechst, ponownie płukano, zamykano w kropli odczynnika *VECTASHIELD Mounting Medium* i uszczelniano bezbarwnym lakierem. Wszystkie preparaty przechowywano w temperaturze 4°C. Zdjęcia preparatów wykonywano na mikroskopie Zeiss Spinning Disc lub Zeiss LSM800 Airyscan, a następnie opracowywano w programie imageJ.

3.12. Pomiar szybkości zużycia tlenu

3.12.1. Pomiar przy pomocy urządzenia Oroboros-2k

Komórki hodowano na szalkach o średnicy 10 cm. W dniu doświadczenia szalki przemywano ogrzanym do 37°C PBS bez jonów wapnia i magnezu, a następnie dodawano po

2 ml trypsyny i inkubowano przez 2 minuty w 37°C. Odklejone komórki Przemycano 4 ml PBS zawierającym Ca^{2+} , Mg^{2+} i 5% FBS, przenoszono do próbek typu Falcon i wirowano 3 minuty z przyśpieszeniem 200 x g. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 2,5 ml pożywki, po czym 2,3 ml zawiesiny przenoszono do wcześniej skalibrowanej komory oksygrafu OROBOROS-2k. Urządzenie to pozwala na pomiar szybkości zużycia tlenu przez komórki metodą polarograficzną [Assegid i wsp., 2005], mierząc stężenie tlenu w komorze (nmol/ml) i wyznaczając szybkość jego zużycia ($\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} / \text{ml}$). Po ustabilizowaniu się stężenia tlenu w komorze dodawano oligomycynę w stężeniu 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. w celu wyznaczenia szybkości zużycia tlenu przez komórki w warunkach zahamowania fosforylacji ADP. Po ustaleniu się stanu równowagi (stabilizacji odczytu) do komory podawano w kilku porcjach CCCP (m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu), w celu uzyskania maksymalnej szybkości pobierania tlenu w warunkach rozprzęgnięcia oksydacyjnej fosforylacji.

Po zakończonym pomiarze komórki zbierano do próbki i wirowano. Osad zawieszano w 2 ml zimnego PBS z jonami wapnia i magnezu i wirowano ponownie w celu usunięcia pożywki. Uzyskany w ten sposób osad komórek zawieszano w 0,5 ml PBS i 0,5 ml 0,5 M NaOH. Po rozpuszczeniu w uzyskanym roztworze oznaczano białko. Odczytane przy pomiarze wartości podstawowej, minimalnej oraz maksymalnej konsumpcji tlenu przeliczano na miligram białka komórkowego.

3.12.2. Pomiar przy pomocy Seahorse XFe96 Analyzer

Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych firmy Agilent odpowiednich dla urządzenia Seahorse XFe96, które wcześniej poddawano hydratacji w sterylnym PBS. Skrajne dołki przeznaczone na próbę kontrolną pozostawiano bez komórek, jedynie z pożywką hodowlaną w celu kontroli tła. W dniu poprzedzającym pomiar przygotowywano także płytkę kalibracyjną poprzez dodanie 200 μl sterylnej wody do każdego dołka, umieszczenie w dołkach sensorów i przeniesienie płytki na noc do inkubatora, o temp. 37°C niewzbogacanego w CO_2 . W takich samych warunkach umieszczano odpowiednią porcję roztworu do kalibracji (Agilent).

W dniu doświadczenia usuwano pożywkę hodowlaną a następnie dwukrotnie przemycano komórki wcześniej przygotowanym roztworem pomiarowym (XF DMEM pH 7.4 bez dodatku czerwieni fenolowej i wodorowęglanu sodu, zawierającym 1 mM pirogronian, 10 mM glukozę i 2 mM glutaminian). Po każdym płukaniu usuwano po 180 μl z każdego dołka tak, by ok. 20 μl medium wciąż pokrywało warstwę komórek i nie miały one kontaktu z powietrzem. Po drugim płukaniu do każdego dołka dodawano po 160 μl roztworu

pomiarowego, a zatem objętość końcowa wynosiła 180 μ l i umieszczano płytkę na 1 godzinę w inkubatorze niewzbogacającym CO₂, o temp. 37°C.

Płytkę kalibracyjną osuszano i do każdego dołka dodawano po 200 μ l roztworu do kalibracji ogrzewanego przez noc, a następnie ponownie umieszczano w niej wkład z sensorami (ang. *cartridge*) i przenoszono na godzinę do inkubatora niewzbogaconego CO₂, o temperaturze 37°C. Po upływie godziny płytkę wyjmowano a do dołków do iniekcji znajdujących się we wkładzie podawano odpowiednio oligomycynę A (1,5 μ M), FCCP (1 μ M) (4-(trifluorometoksy)fenylohydrazon cyjanku karbonylu) oraz antymycynę A/rotenon (0,5 μ M) rozcieńczonymi w pożywce pomiarowej XF DMEM.

Przygotowany wkład z sensorami umieszczano w płytce pomiarowej zawierającej komórki i przeprowadzano pomiar przy pomocy analizatora Seahorse XFe96. Wyniki analizowano przy użyciu programu Agilent Seahorse Analytics.

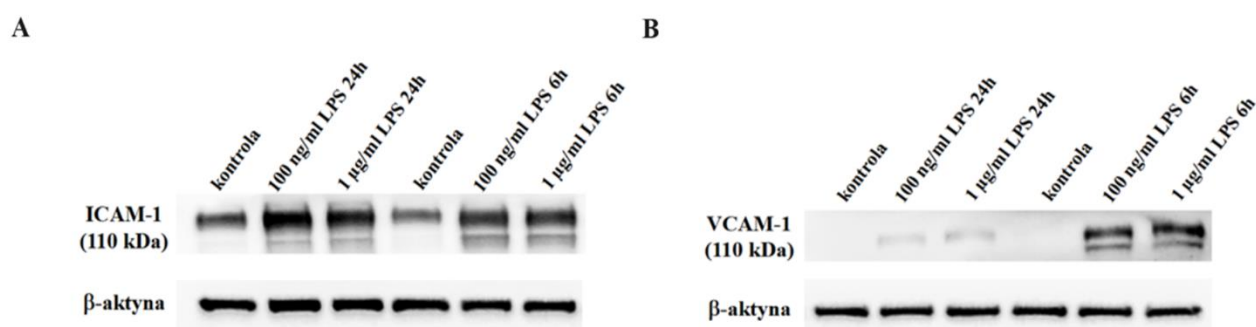
3.13. Analiza wyników

Dane analizowano przy pomocy programu statystycznego Statistica. Wyniki przedstawiono jako procent odpowiedniej kontroli \pm SD. Istotność statystyczna ($p < 0,05$) obliczano przy pomocy testu ANOVA jednoczynnikowej analizy wariancji. Zdjęcia z mikroskopu obrobiono przy użyciu programu ImageJ. Wykresy wykonano w GraphPad Prism 10.

4. WYNIKI

4.1. Ustalenie warunków doświadczalnych i ogólna charakterystyka komórek HAEC traktowanych LPS, ze szczególnym uwzględnieniem mitochondriów

Dostępne dane piśmiennictwa wskazują, że wpływ lipopolisacharydu na różne komórki jest niejednakowy i zależy od czasu inkubacji oraz zastosowanego stężenia LPS. W niniejszej pracy jako kryterium skuteczności działania LPS przyjęto indukcję odpowiedzi prozapalnej komórek wyrażonej zwiększeniem poziomu białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1, ale bez objawów zmniejszonej przeżywalności komórek. LPS podawane było w najmniejszym możliwym stężeniu wystarczającym do spełnienia tego kryterium.



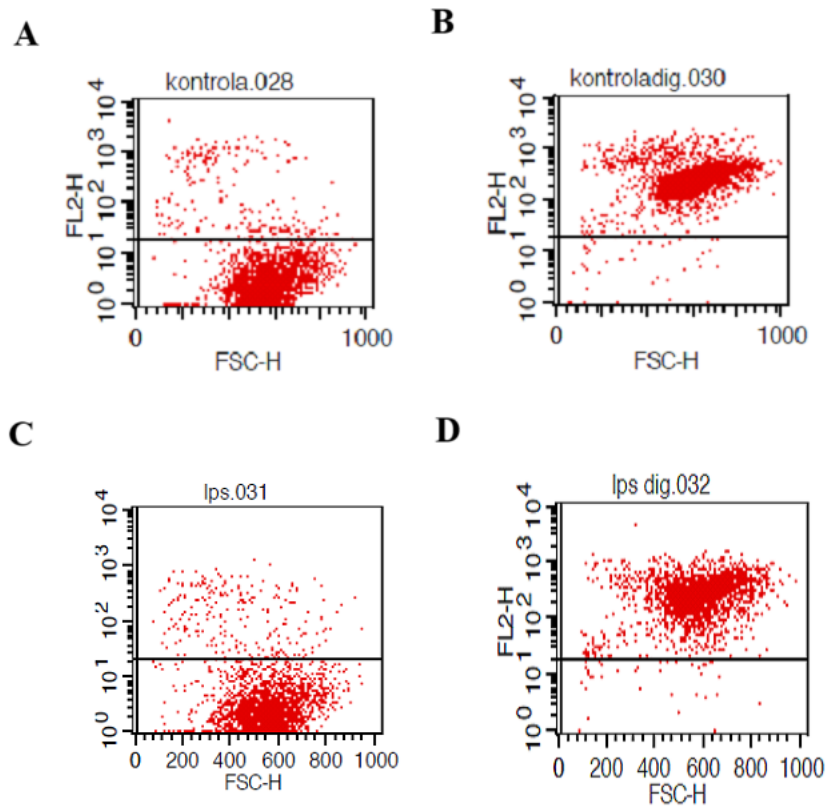
Rys. 4.1. Wpływ LPS na poziom białek ICAM-1 i VCAM-1 w komórkach HAEC

Obraz przedstawia wynik analizy Western Blot dla białek ICAM-1 (A) oraz VCAM-1 (B). Komórki HAEC były traktowane LPS w stężeniu 100 ng/ml oraz 1 μ g/ml przez 6 oraz 24 godziny. Przedstawiony wynik pochodzi z jednego doświadczenia

Przetestowano wpływ LPS podanego w stężeniach 100 ng/ml oraz 1 μ g/ml. W obu przypadkach obserwowano istotny i podobny wzrost poziomu białek ICAM-1 (Ryc. 4.1 A) i VCAM-1 (Ryc. 4.1 B). Dlatego w dalszych doświadczeniach końcowe stężenie LPS wynosiło zawsze w 100 ng/ml.

Przyżyciowy pomiar cytometryczny z wykorzystaniem jodku propidyny nie wykazał zwiększonego udziału komórek nekrotycznych (Ryc. 4.2) w hodowli traktowanej LPS. Dodatkowo, analiza kształtu jąder komórkowych pokazanych na obrazach mikroskopowych przedstawionych w dalszej części pracy nie wskazuje na zmiany charakterystyczne dla apoptozy (Ryc. 4.5).

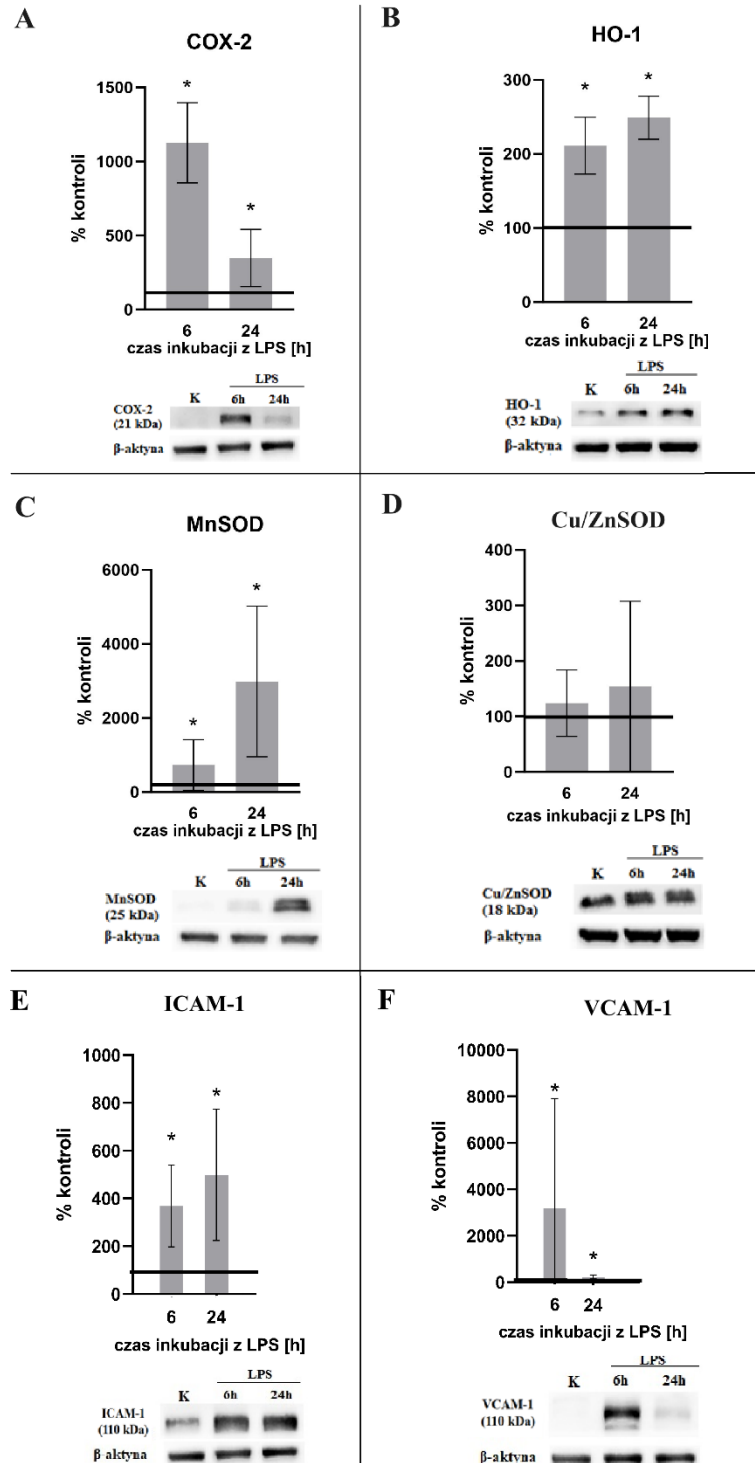
Przeżywalność komórek



Rys. 4.2. Wpływ LPS na przeżywalności komórek HAEC

Przeżywalność była oceniana przy pomocy laserowego cytometru przepływowego z użyciem jodku propidyny. (A) Komórki kontrolne (B) komórki kontrolne traktowane digitoniną (kontrola pozytywna), (C) komórki HAEC traktowane 100 ng/ml LPS przez 24 godz., (D) komórki HAEC traktowane 100 ng/ml LPS przez 24 godz. z dodatkiem digitoniny (druga kontrola pozytywna). Wynik reprezentatywnego doświadczenia.

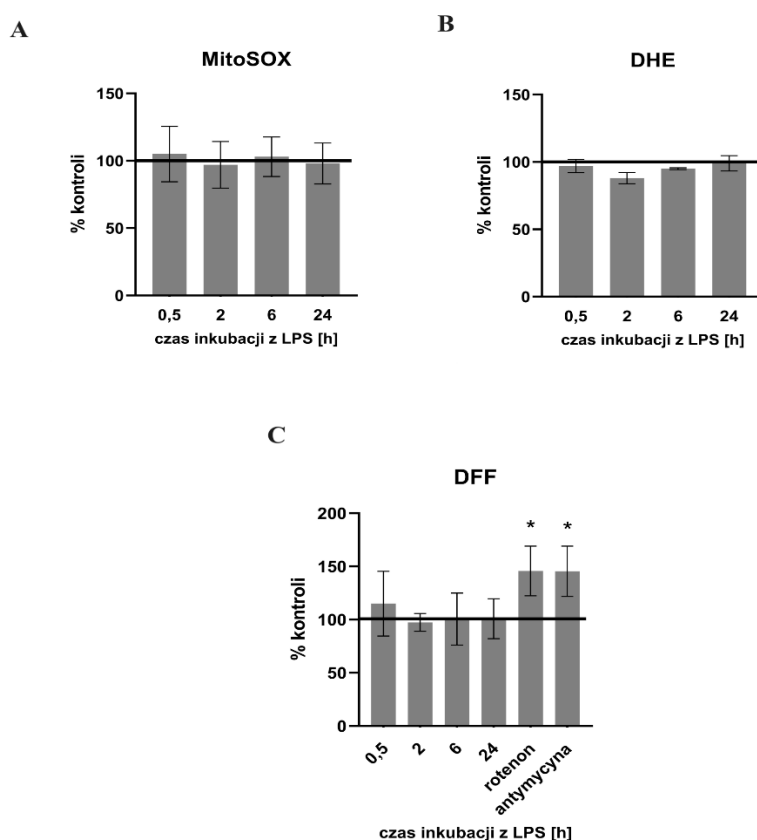
Komórki HAEC traktowane LPS wykazują zmiany świadczące o odpowiedzi na stres, w tym zwiększoną zawartość białek charakterystycznych dla odpowiedzi na stres oksydacyjny. Należą do nich COX, HO-1 (Ryc. 4.3 A, B) oraz manganowa dysmutaza ponadtlenkowa (Ryc. 4.3 C). Oprócz zwiększonej względnej zawartości tych białek w komórkach, uwagę zwraca niejednakowy rozkład tych zmian w czasie. W przeciwieństwie do Mn-SOD (Ryc. 4.3 C), poziom Cu/ZnSOD nie zwiększa się w sposób istotny, a jedynie wykazuje tendencję wzrostową (Ryc. 4.3 D). Poziom cząsteczek adhezyjnych związanych z indukcją stanu zapalnego także jest podniesiony. Podobnie jak w doświadczeniu pilotażowym (Ryc. 4.1) mamy do czynienia z istotnym wzrostem poziomu ICAM-1 (Ryc. 4.3 E) oraz VCAM-1 (Ryc. 4.3 F).



Rys. 4.3. Wpływ LPS na poziom białek związanych ze stresem oksydacyjnym oraz indukcją stanu zapalnego w komórkach HAEC

Przedstawiono zmiany względnego poziomu białek (A) COX-2, (B) HO-1, (C) MnSOD, (D) Cu/ZnSOD, (E) ICAM-1 oraz (F) VCAM-1 w komórkach HAEC – kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 6 godz. i 24 godz. wraz z przykładowym wynikiem testu Western Blot. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawione jako procent kontrolni. * - $p < 0,05$ dla $n=5$

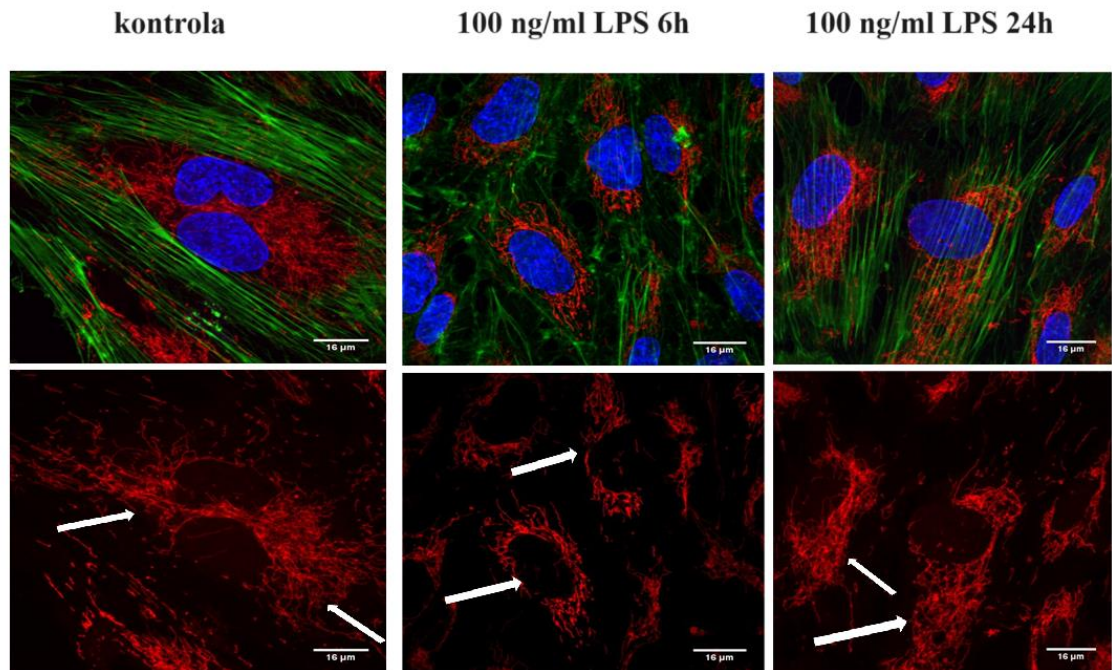
Dotychczas przedstawione wyniki opisują zmiany spowodowane podaniem LPS w dwóch punktach czasowych. Ze względu na niejednakową dynamikę odpowiedzi komórek w czasie, pomiary RFT oraz niektórych innych parametrów przedstawionych poniżej doświadczeń wykonano z większą rozdzielczością, czyli uwzględnieniem większej liczby punktów czasowych. W celu sprawdzenia, czy inkubacja komórek z LPS wpływa na poziom RFT zastosowano trzy specyficzne sondy: MitoSOX wykrywającą mitochondrialne RFT, DFF do oceny względnych zmian ilości RFT w całej komórce oraz DHE wykrywającą specyficznie anionorodnik ponadtlenkowy. Nie wykazano żadnych zmian ilości RFT bez względu na stosowaną sondę (Ryc. 4.4). Zwiększenie ilości anionodnika ponadtlenkowego po dodaniu do komórek rotenonu lub antymycyny potwierdza poprawność zastosowanej metody. Brak zmian zawartości RFT w komórkach traktowanych LPS przy jednocześnie wyraźnym zwiększeniu ilości białek antyoksydacyjnych może wskazywać na wysoką skuteczność systemów ochronnych w tych warunkach.



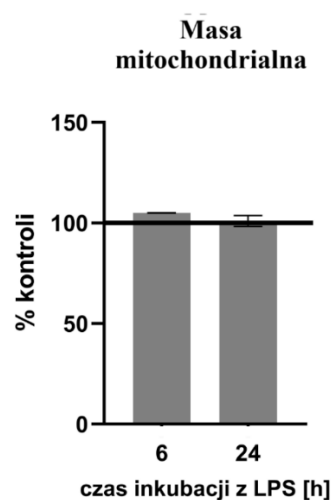
Rys. 4.4. Wpływ LPS na zawartość RFT w komórkach HAEC

Względny poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HAEC traktowanych LPS 100ng/ml LPS mitochondrialne RFT (A); anionorodnik ponadtlenkowy (B); całkowite RFT (C). Poziom kontrolny (RFT w komórkach nietraktowanych LPS) jest traktowany jako 100%, i przedstawiony graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawione jako procent kontroli. * - $p < 0,05$ dla $n=4$

Wstępna ocena morfologii komórek HAEC traktowanych LPS wskazuje, że dochodzi do przejściowej, widocznej po 6 godzinach i cofniętej niemal do stanu wyjściowego po 24 godz., reorganizacji sieci mitochondrialnej polegającej na jej fragmentacji i przyjęciu lokalizacji okołojądrowej (Ryc. 4.5).



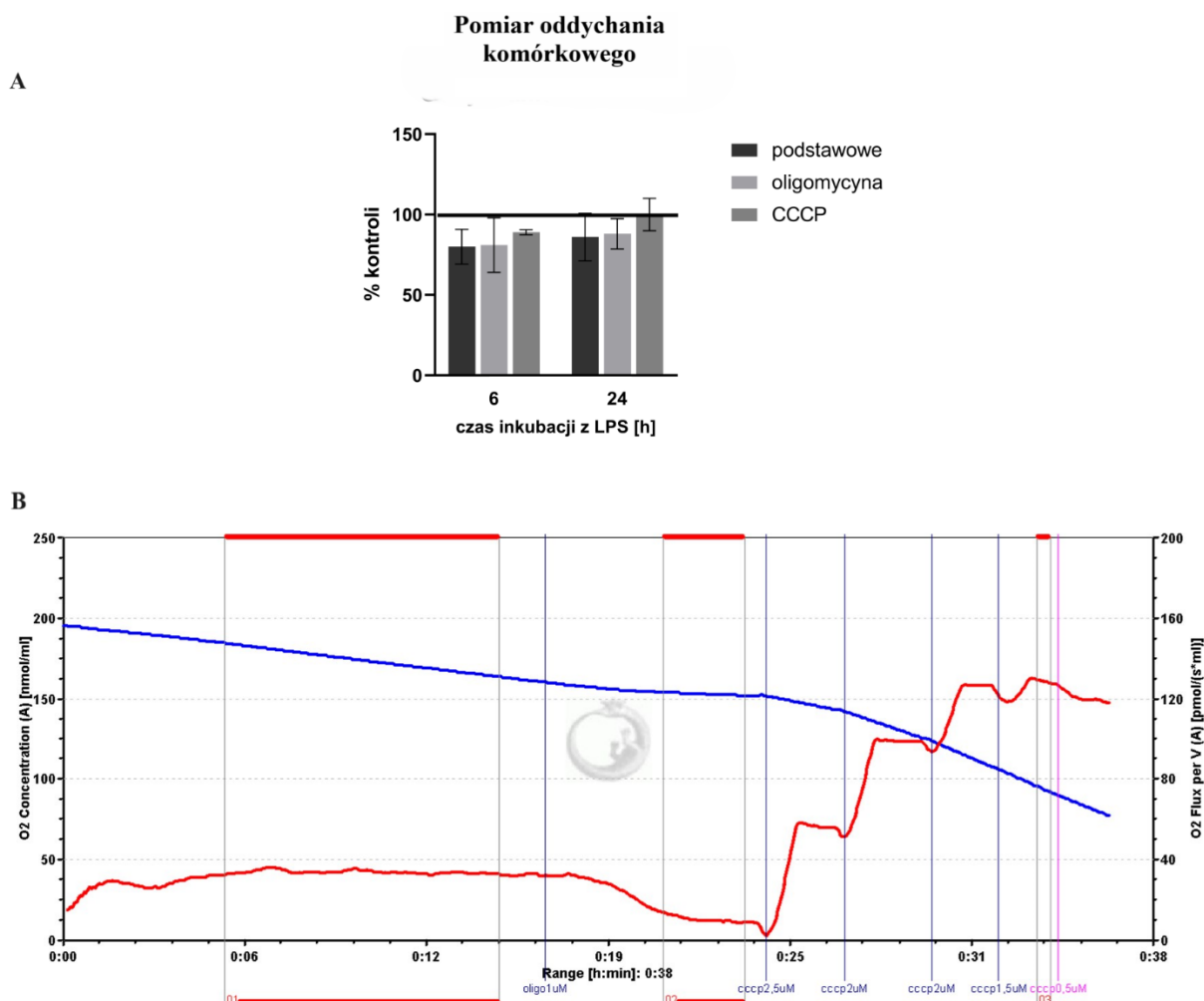
Rys. 4.5. Wpływ LPS na reorganizację sieci mitochondrialnej w komórkach HAEC
 Komórki HAEC – kontrolne oraz traktowane 100 ng/ml LPS przez 6 godz. oraz 24 godz., wybarwione MitoTrackerRed CMXRos (mitochondria), Hoechst 33342 (jądra komórkowe), 488 Phalloidin (szkielet aktynowy)



Rys. 4.6. Wpływ LPS na masę mitochondriów w komórkach HAEC
 Masa mitochondrialna mierzona przy pomocy sondy fluorescencyjnej MitoGreen w komórkach HAEC – kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 6 godz. i 24 godz. Kontrola bez LPS jest traktowana jako 100%, i przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawione jako procent kontroli (n=4)

Tym zmianom nie towarzyszyła zmiana całkowitej masy mitochondriów (Ryc.4.6).

4.1.1. Metabolizm energetyczny komórek HAEC



Rys. 4.7. Wpływ LPS na szybkość zużycia tlenu przez komórki HAEC

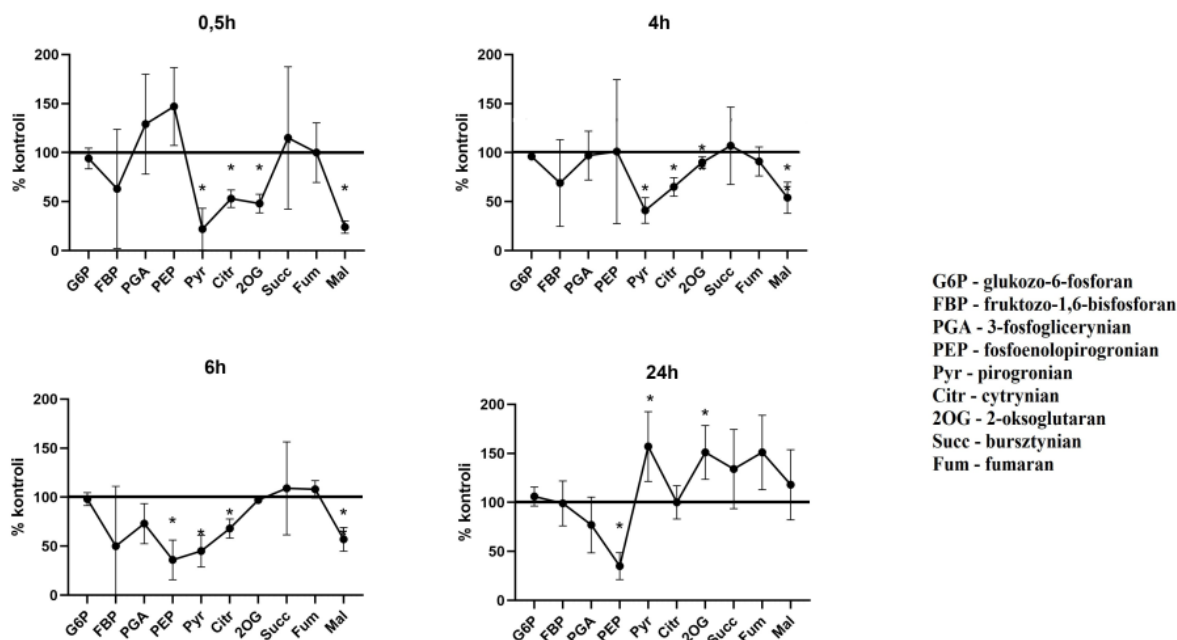
Pomiar oddychania komórkowego (oddychanie podstawowe; minimalna wartość obserwowana po dodaniu oligomycyny; maksymalna wartość obserwowana po dodaniu CCCP) w komórkach HAEC - kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 6 godz. i 24 godz. Kontrola (komórki nie traktowane LPS) uznana jest jako 100% i przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie (A). Zmiany spowodowane podaniem LPS są przedstawione jako procent kontroli dla $n=4$. (B) Przykładowy pomiar oddychania komórkowego na urządzeniu Oroboros wraz z zaznaczonymi punktami dodania oligomycyny oraz CCCP. Linia niebieska oznacza stężenie tlenu w komorze pomiarowej [nmol/ml], linia czerwona natomiast przedstawia zużycie tlenu w jednostce czasu w komorze pomiarowej

Jak przedstawiono na Ryc. 4.7 inkubacja komórek HAEC z LPS powodowała widoczne, ale statystycznie nieistotne obniżenie szybkości zużycia tlenu. Niemniej tendencja ta wydaje się być nieco większa po 6 niż po 24 godzinach traktowania lipopolisacharydem i dotyczy zarówno oddychania podstawowego jak i w obecności oligomycyny, oraz po rozprężnięciu

oksydacyjnej fosforylacji. Można oczekiwać, że taka zmiana odzwierciedla wpływ LPS na profil metaboliczny komórek.

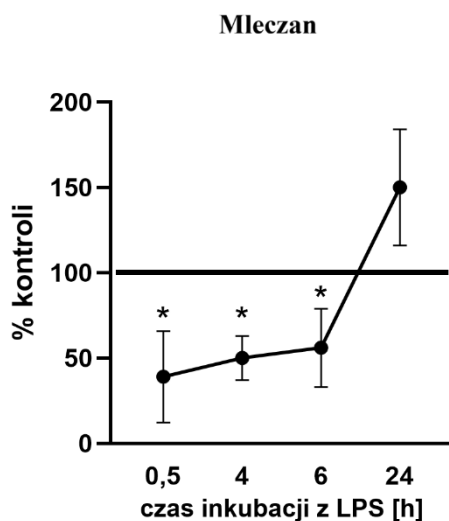
Przedstawione dotychczas wyniki doświadczeń wykonywanych po 6 i 24 godzinach traktowania LPS chociaż dostarczają istotnych informacji, różnią się znacznie od opisywanych w piśmiennictwie odpowiedzi różnych komórek na LPS, które są zazwyczaj dużo szybsze i zmieniające się w czasie [Kurte i wsp., 2020]. Dlatego przedstawiona poniżej ograniczona (celowana) analiza metabolomiczna uwzględnia ten aspekt i jest przeprowadzona z większą rozdzielczością czasową. Jej celem było ustalenie potencjalnych zmian metabolizmu energetycznego komórek HAEC traktowanych LPS. Uzyskane wyniki przedstawiano w postaci tradycyjnych przebiegów *cross-over*.

Obserwowane zmiany wskazują, że odpowiedź na LPS jest szybka i już po 30 min licząc od podania lipopolisacharydu obserwuje się istotne zmiany w profilu metabolicznym [Ryc. 4.8]. Przede wszystkim dochodzi do spowolnienia reakcji katalizowanej przez kinazę pirogronianową. Efekt ten ulega całkowitemu odwróceniu (przyspieszenie tej reakcji w stosunku do kontroli bez LPS) po 24 godzinach. Być może z tą zmianą jest związane przejściowe zahamowanie glikolizy wyrażone zmniejszoną zawartością mleczanu w komórkach [Ryc. 4.9] oraz zmianą proporcji fosforanów nukleozydów adeninowych, w tym zwiększenie się poziomu AMP po 24 godzinach traktowania komórek LPS [Ryc. 4.10]. Jednocześnie zawartość ATP i ADP w komórkach nie zmienia się w znaczącym stopniu. W tym miejscu należy jednak dodać, że przedstawiane wyniki dotyczące zawartości mleczanu chociaż z pewnością wiarygodnie wskazują kierunek zmiany nie odzwierciedlają rzeczywistej szybkości glikolizy. Wynika to z faktu, że mleczan oznaczany był wraz z pozostałymi metabolitami metodą spektroskopii mas w specjalnie przygotowanych lizatach komórkowych, a zatem był to mleczan zawarty w komórkach. W przeciwieństwie do pozostałych metabolitów mleczan z łatwością jest uwalniany z komórek, a zatem ustalenie rzeczywistej szybkości glikolizy wymagałoby oznaczenia całości wytwarzanego mleczanu w tym znajdującego się w środowisku pozakomórkowym.



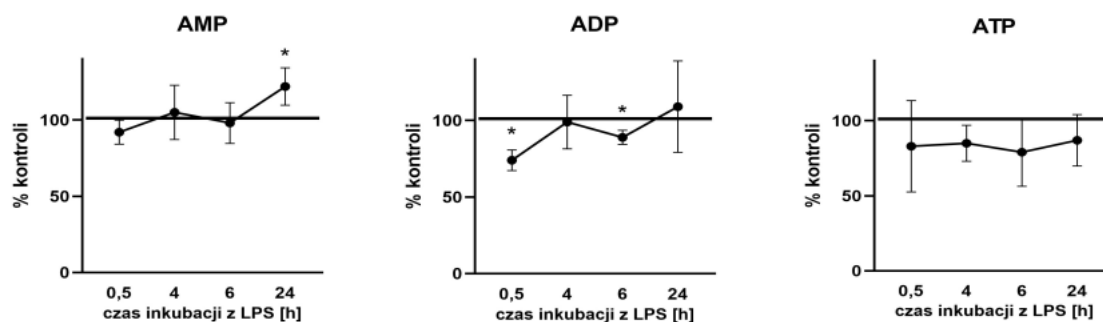
Rys. 4.8. Wpływ LPS na zawartość metabolitów glikolizy i cyklu kwasów trikarboksyłowych (TCA) w komórkach HAEC

Poziom metabolitów glikolizy oraz cyklu Krebsa mierzony przy pomocy HPLC-MS w komórkach HAEC - kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 0,5 godz.; 4 godz.; 6 godz. oraz 24 godz. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * $p < 0,05$, $n=3$



Rys. 4.9. Wpływ LPS na wewnątrzkomórkową zawartość mleczanu w komórkach HAEC

Mleczan oznaczano metodą HPLC-MS w komórkach HAEC - kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 0,5 godz.; 4 godz.; 6 godz. oraz 24 godz. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$, $n=3$



Rys. 4.10. Wpływ LPS na względną ilość nukleotydów adeninowych w komórkach HAEC

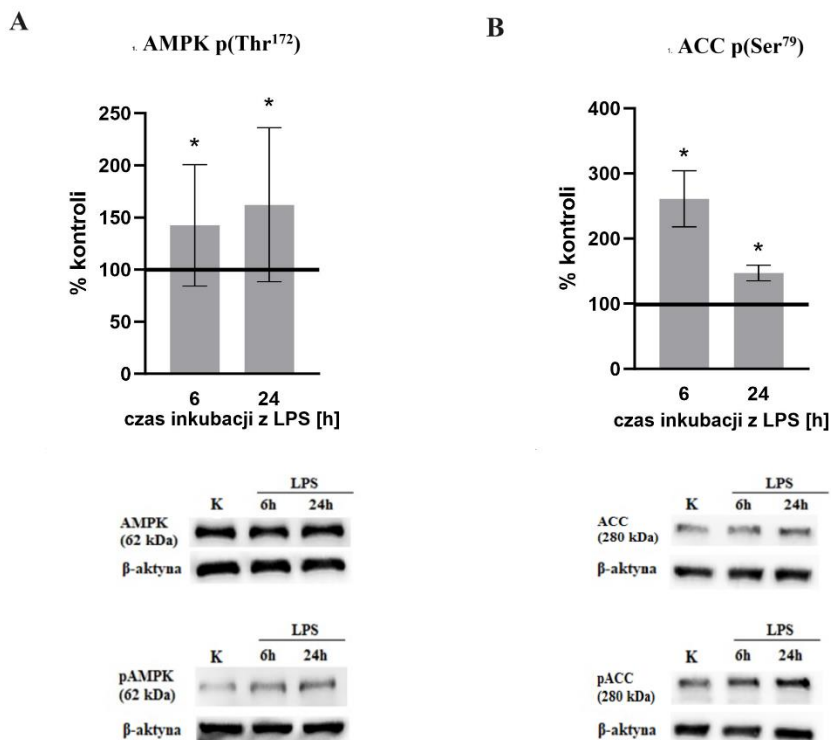
Poziom AMP, ADP oraz ATP mierzony przy pomocy detektora UV-VIS w komórkach HAEC - kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 0,5 godz.; 4 godz.; 6 godz. oraz 24 godz. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$, $n = 3$

Obserwowanym różnicom towarzyszą zmiany aktywności enzymów, którym przypisuje się kluczowe znaczenie regulacyjne w metabolizmie energetycznym. Enzymami tymi są często opisywana w piśmiennictwie AMPK [Garcia i Shaw, 2017] i nieco mniej dyskutowana w tym kontekście NNMT.

Jak pokazano na Ryc. 4.11, w wyniku inkubacji komórek HAEC z LPS dochodzi do zwiększenia stopnia ufosforylowania AMPK w pozycji Thr 172. Zmiana ta obserwowana jest zarówno w po 6 jak i 24 godzinach traktowania lipopolisacharydem i wskazuje na zwiększenie aktywności AMPK, a zatem zapewne aktywację procesów katabolicznych i hamowanie anabolizmu. Miarą wzrostu tej aktywności jest zwiększenie stopnia ufosforylowania karboksylazy acetylo-CoA (ACC).

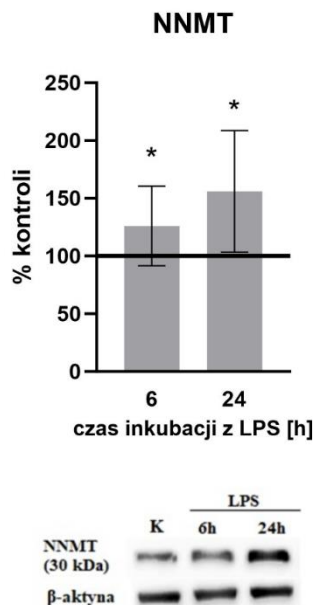
O ile udział AMPK w szlaku sygnałowym indukowanym przez LPS, chociaż nadal niejednoznaczny, był opisywany wcześniej [Fan i wsp., 2018], o tyle na temat udziału NNMT w odpowiedzi komórek na LPS nie znajduje się w piśmiennictwie żadnej wzmianki. To jeden z powodów, dla którego zajęliśmy się ustalaniem roli tego enzymu w metabolizmie komórek śródbłonna.

Wynik przedstawiony na Ryc. 4.12 potwierdza główną hipotezę niniejszej rozprawy wskazując na to, że jednym z elementów odpowiedzi komórek śródbłonna na LPS jest zwiększenie ilości białka NNMT. Jednakże samo potwierdzenie faktu nie oznacza ustalenia jego znaczenia. W celu poznania roli NNMT w kontekście zmian metabolicznych spowodowanych LPS wykonano szereg testów z wykorzystaniem komórek HAEC po wyciszeniu ekspresji genu kodującego NNMT.



Rys. 4.11. Wpływ LPS na aktywację AMPK w komórkach HAEC

Względny poziom ufosforylowania (A) AMPK oraz (B) ACC w przeliczeniu na całkowite białko w komórkach HAEC – kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 6 godz. i 24 godz. wraz z przykładowym wynikiem analizy metodą Western Blot. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawione jako procent kontroli. * - $p < 0,05$, $n = 9$

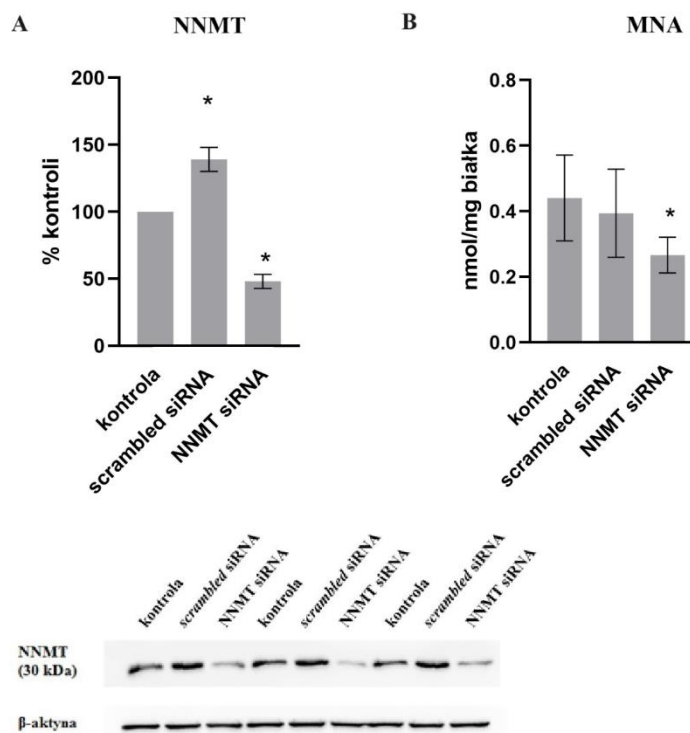


Rys. 4.12. Wpływ LPS na zawartość NNMT w komórkach HAEC

Względny poziom NNMT w komórkach HAEC – kontrolnych oraz traktowanych 100 ng/ml LPS przez 6 godz. i 24 godz. wraz z reprezentatywnym wynikiem analizy metodą Western Blot. Kontrola traktowana jako 100%, przedstawiona graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Wyniki przedstawione jako procent kontroli. * - $p < 0,05$, ($n = 9$)

4.2. Wpływ wyciszania ekspresji genu kodującego *NNMT* na wybrane aspekty odpowiedzi komórek HAEC na LPS

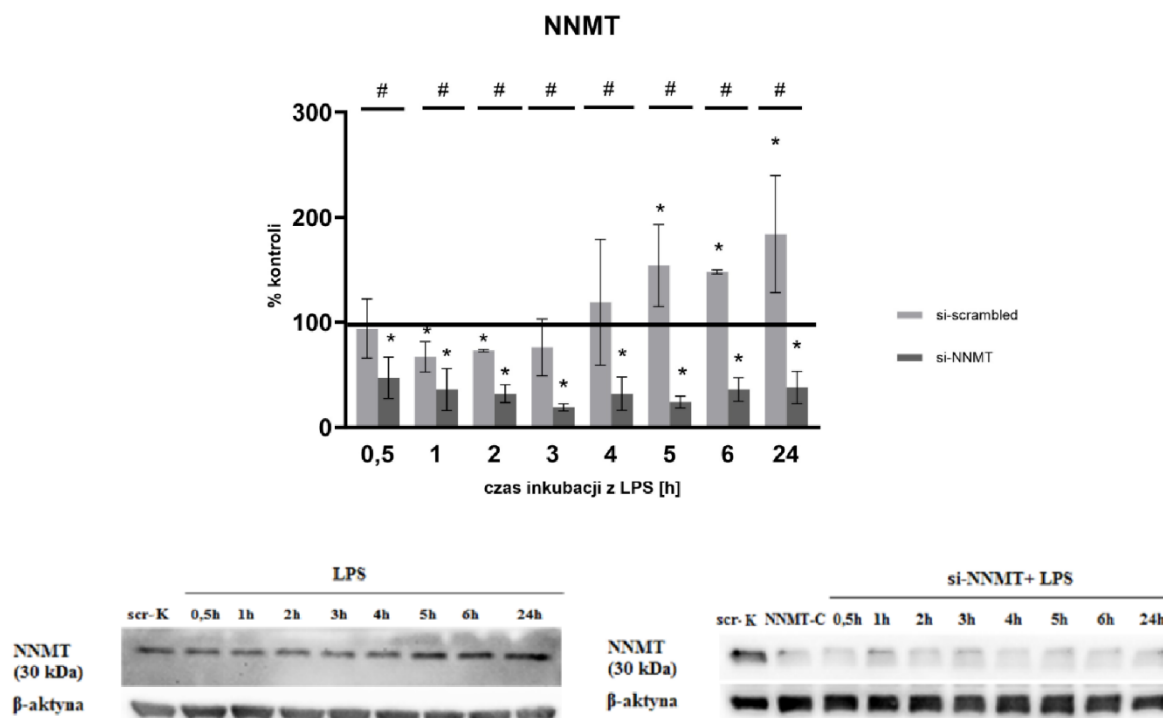
Ryc. 4.13 przedstawia wstępne wyniki dotyczące skuteczności wyciszania genu *NNMT* z wykorzystaniem siRNA. Nieoczekiwane zwiększenie poziomu *NNMT* na skutek podania *scrambled* RNA może odzwierciedlać odpowiedź komórek na stres spowodowany samą procedurą wyciszania. Ten wzrost nie znajduje potwierdzenia w zmianie (potencjalnym zwiększeniu) aktywności enzymu wyrażonej ilością MNA wydzielonego do środowiska. Natomiast aktywność enzymatyczna *NNMT* jest znacznie obniżona w przypadku komórek ze zmniejszoną zawartością białka *NNMT* na skutek wyciszenia genu kodującego ten enzym. Skuteczność wyciszania była potwierdzana w każdym doświadczeniu techniką Western blot. W dalszej części pracy odpowiedź na LPS komórek z wyciszonym genem *NNMT* porównywano do odpowiedzi komórek traktowanych *scrambled* siRNA (zamiennie nazywanych komórkami kontrolnymi) w takich samych warunkach doświadczalnych.



Rys. 4.13. Efektywność wyciszenie genu kodującego *NNMT* oceniana na podstawie ilości i aktywności tego białka w komórkach HAEC

(A) Względny poziom białka *NNMT* w komórkach HAEC traktowanych *scrambled* siRNA, siRNA specyficznym dla *NNMT* oraz niczym nietraktowanych. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli (komórki nietraktowane). Reprezentatywny obraz testu Western Blot. (B) Względny poziom MNA w przeliczeniu na mg białka w komórkach HAEC traktowanych *scrambled* siRNA, siRNA specyficznym dla *NNMT* oraz niczym nietraktowanych. * - $p < 0,05$, $n = 5$

Ryciny 4.14 i 4.15 przedstawiają zmiany zawartości białka NNMT w komórkach traktowanych *scrambled* RNA oraz z siRNA specyficznym dla NNMT, a także aktywność katalityczną tego enzymu po podaniu LPS do środowiska hodowlanego.



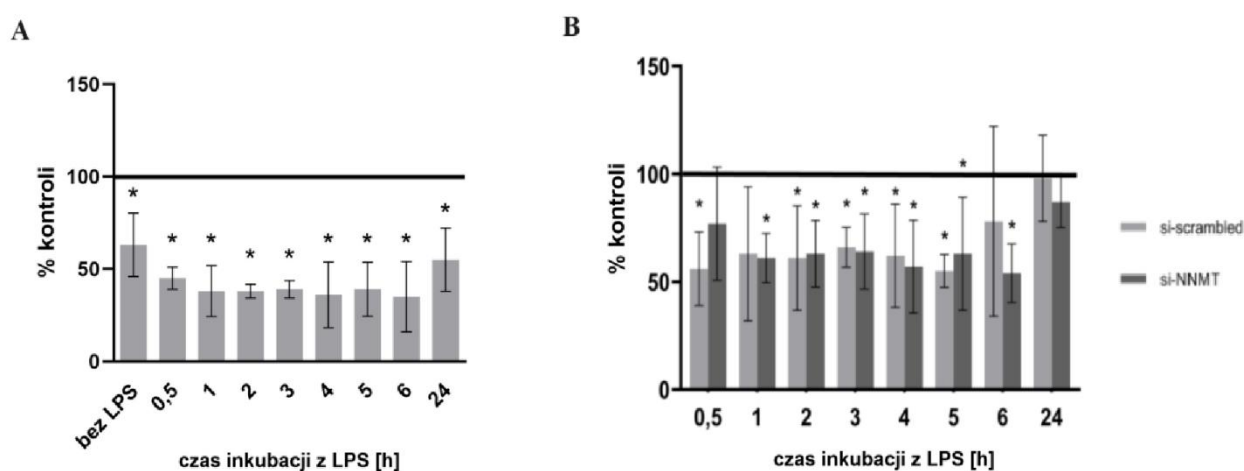
Rys. 4.14. Wpływ LPS na zawartość białka NNMT w komórkach HAEC z wyciszonym genem kodującym ten enzym oraz komórkach kontrolnych

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do kontroli (komórki traktowane *scrambled* RNA bez LPS) dla której przyjęto wartość 100% (n=10) i którą przedstawiono graficznie w postaci linii poziomej na wykresie. Poniżej przedstawiono reprezentatywny obraz analizy Western Blot. * - $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli *si-scrambled*; # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji

W komórkach traktowanych *scrambled* RNA LPS powoduje przejściowe (widoczne po 1-3 godzinach) zmniejszenie, a następnie (od 5-tej godziny inkubacji) zwiększenie ilości białka NNMT (Ryc. 4.14). W tych samych komórkach w obecności LPS dochodzi do głębszego obniżenia wytwarzania MNA aż do 5 godziny inkubacji, po 6 godzinach inkubacji pojawia się tendencja wzrostowa, choć wciąż nie jest osiągnięty stan wyjściowy (Ryc. 4.15 B). Taka kinetyka zmiany ilości MNA sugeruje, że LPS nieoczekiwanie zmniejsza aktywność enzymatyczną NNMT maskując potencjalny skutek zwiększenia ilości samego białka NNMT. W komórkach z wyciszonym genem *NNMT* istotny spadek wydzielanego do medium MNA w odpowiedzi na inkubację z LPS we wszystkich badanych punktach czasowych odzwierciedla zarówno spadek ilości enzymu jak i jego aktywności pod wpływem LPS (Ryc. 4.14; 4.15A). W stosowanym układzie doświadczalnym zmiany aktywności NNMT, mimo wykorzystywania nikotynamidu

jako substratu dla tego enzymu, nie powinny wpływać na jego dostępność dla syntezy NAD^+ , ponieważ nikotynamid był obecny w pożywce hodowlanej (dokładna wartość jego stężenia jest zastrzeżona przez producenta pożywki i dlatego nie mogła być podana w tym miejscu, ale jest wystarczająco wysoka). Z drugiej jednak strony nie można wykluczyć, że sam LPS powoduje obniżenie ilości tego dinukleotydu w komórce [Al-Shabany i wsp., 2016; Komatsu i wsp., 2018] dlatego oznaczono jego zawartość komórkową we wszystkich badanych układach doświadczalnych (Ryc. 4.16).

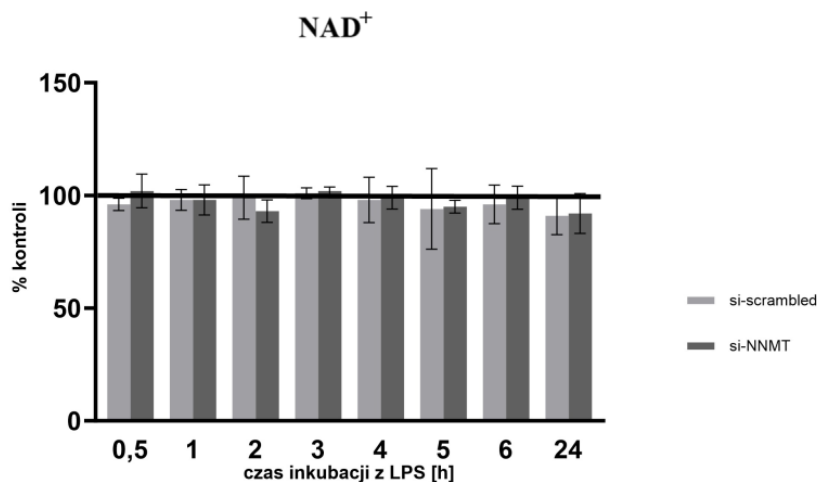
MNA



Rys. 4.15. Wpływ LPS na ilość MNA wydzielanego przez komórki HAEC z wyciszonym genem kodującym NNMT oraz komórki kontrolne

Stężenie MNA oznaczono w pożywce hodowlanej komórek traktowanych *scrambled* siRNA oraz siRNA specyficznym dla NNMT (pomiar ilości MNA uzyskany we współpracy z dr Łukaszem Mateuszukiem z Jagiellońskiego Centrum Innowacji). (A) Ilość wydzielanego MNA przez komórki traktowane siRNA specyficznym dla NNMT przeliczona w stosunku do komórek traktowanych *scrambled* siRNA. Kontrola (komórki traktowane jedynie *scrambled* siRNA) przyjęta jako 100% i przedstawiona graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. (B) Ilość wydzielanego MNA przez komórki traktowane *scrambled* siRNA lub siRNA specyficznym dla NNMT w odpowiedzi na LPS. Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę (100%) dla komórek traktowanych zarówno si-*scrambled* jak i LPS stanowiły komórki kontrolne, czyli traktowane jedynie si-*scrambled* natomiast kontrolę (100%) dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$, $n=3$

Wykazano, że niezależnie od poziomu białka NNMT i jego aktywności mierzonej wytwarzaniem MNA, zawartość NAD^+ w komórkach jest stała. A zatem, niedobór NAD^+ nie może być brany pod uwagę przy ustalaniu mechanizmu działania LPS oraz konsekwencji wyciszania genu *NNMT* w komórkach.

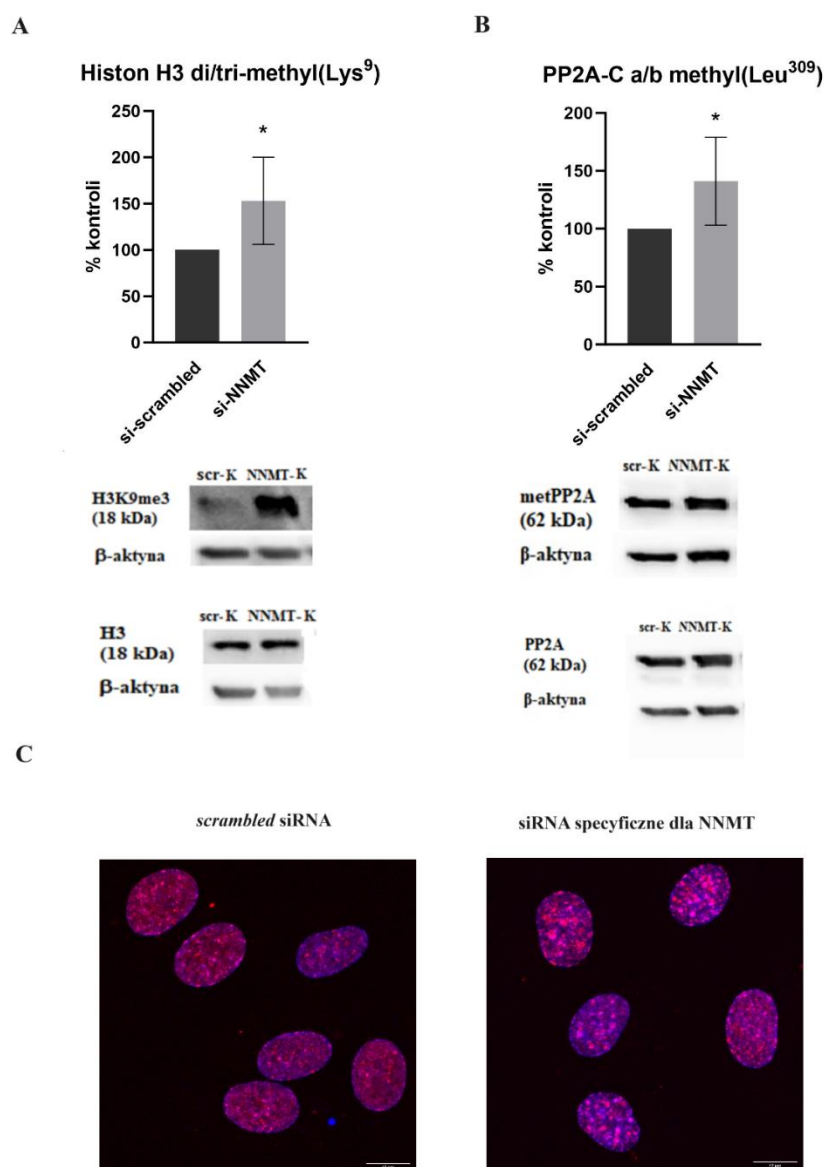


Rys. 4.16. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na zawartość NAD⁺ w komórkach HAEC
 Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (n=3)

Drugim oczekiwanym efektem metabolicznym związanym z aktywacją NNMT jest obniżenie, a zatem w przypadku wyciszenia *NNMT* zwiększenie, dostępności S-adenozylometioniny (SAM). SAM jest uniwersalnym donorem reszty metylowej w reakcji metylacji zarówno związków drobno- jak i wielkocząsteczkowych, a zatem zmiana jego stężenia w komórce mogłaby przejawiać się jako zmiana profilu metylacji różnych cząsteczek. Ryc. 4.17 pokazuje na wybranych przykładach, że samo wyciszenie *NNMT* powoduje zwiększenie puli metylowanego histonu H3, a także fosfatazy PP2A, co jest zgodne z oczekiwaniem. Dodatkowo, barwienie ukazuje, jak się wydaje zwiększone skupiska metylowanego histonu H3 w komórkach HAEC z wyciszonym genem *NNMT* (Ryc. 4.17C) ale ilościowa analiza tego obrazu wymagałaby większej liczby powtórzeń

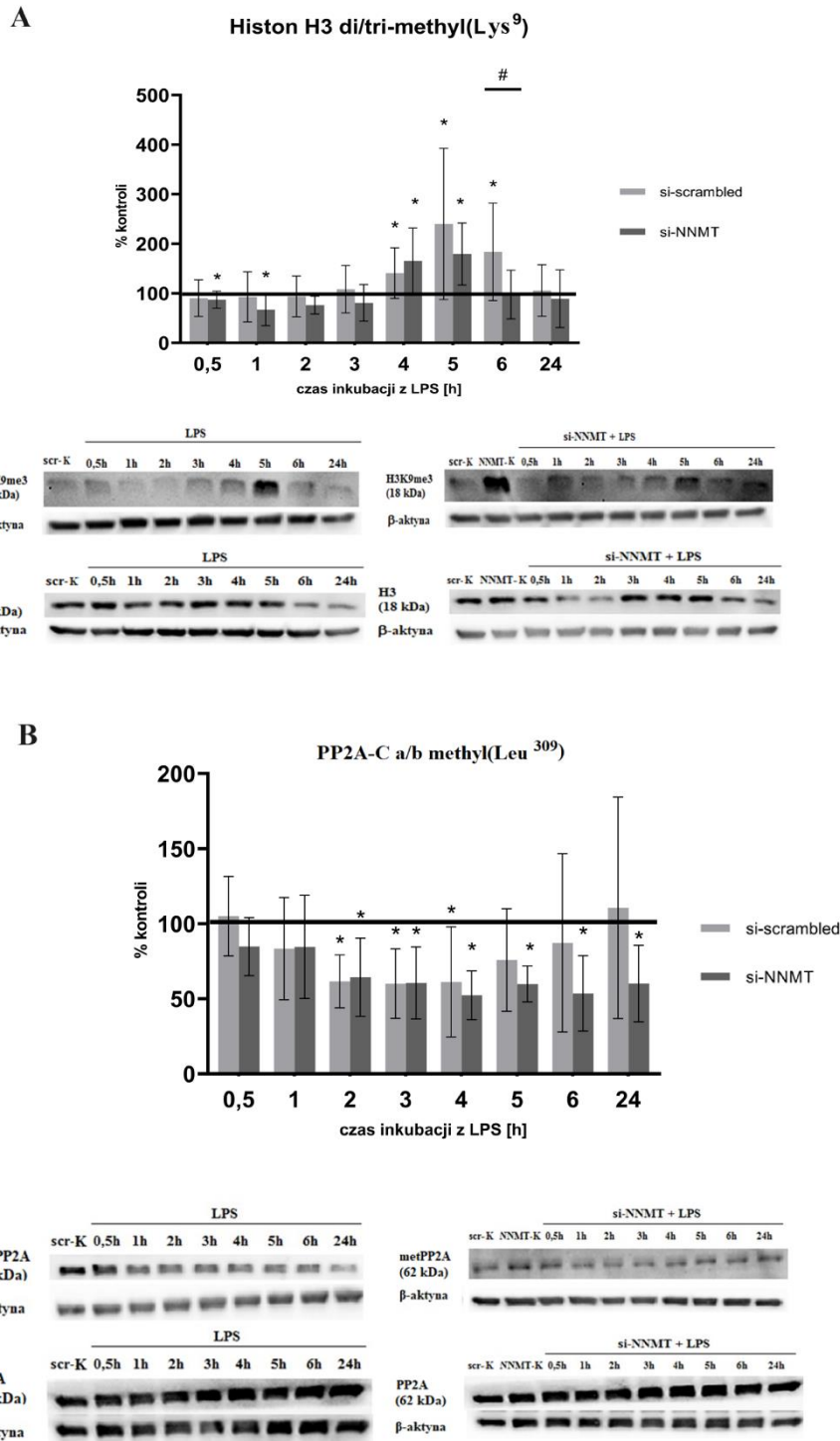
W obecności LPS zwiększenie stopnia metylacji H3 ma charakter przejściowy i jest zauważalne w 5 i 6 godzinie traktowania lipopolisacharydem ale ze względu na fakt, że efekt ten obserwowany jest także w komórkach traktowanych *scrambled* RNA, udział NNMT w tym przypadku wydaje się wątpliwy (Ryc. 4.18A). Ponadto w obecności LPS dochodzi do zmniejszenia stopnia metylacji PP2A niezależnie od tego czy gen kodujący NNMT był wyciszony czy też nie, co sugeruje, że dodatkowe działanie LPS maskuje potencjalne efekty aktywacji NNMT (Ryc. 4.18B).

Oczekiwany brak wpływu wyciszenia *NNMT* i/lub traktowania komórek lipopolisacharydem na zawartość NAD^+ w komórkach oraz niespodziewany spadek metylacji białek w komórkach traktowanych LPS nie pozwalają na wytłumaczenie skutków wyciszenia *NNMT* w odpowiedzi komórek na lipopolisacharyd w oparciu o postulowane mechanizmy: regulację dostępu MNA do syntezy NAD^+ oraz zwiększenie stopnia metylacji wybranych białek.



Rys. 4.17. Wpływ wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom metylacji wybranych białek w komórkach HAEC

Metylacja reszty lizyny 9 histonu H3 (A) oraz metylacja fosfatazy PP2A-C (B) wraz z reprezentatywnymi wynikami testu Western Blot w komórkach HAEC. Komórki traktowane *scrambled* siRNA przyjęto jako 100%. (C) Barwienie przedstawiające względny poziom metylacji lizyny 9 histonu H3 w komórkach HAEC traktowanych siRNA specyficznym dla NNMT lub siRNA *scrambled*. Komórki wybarwione Hoechst 33342 (jądra komórkowe) oraz przeciwciałem anti-H3K9me3 wraz z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z Alexa Fluor 555 - $p < 0,05$, $n = 5$



Rys. 4.18. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na stopień metylacji reszty lizyny 9 histonu H3 (A) oraz fosfatazy PP2A-C (B) w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych si-scrambled oraz si-NNMT w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresami wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Z drugiej strony, przedstawione wyniki nie pozwalają na całkowite odrzucenie takiej możliwości natomiast skłaniają do zadania pytania, czy wcześniej zidentyfikowane skutki podawania LPS w komórkach HAEC są w jakiś sposób powiązane z jednoczesnymi zmianami poziomu NNMT lub czy wydarzenia te są ze sobą niezwiązane funkcjonalnie. Poniżej przedstawione wyniki doświadczeń naświetlają ten problem.

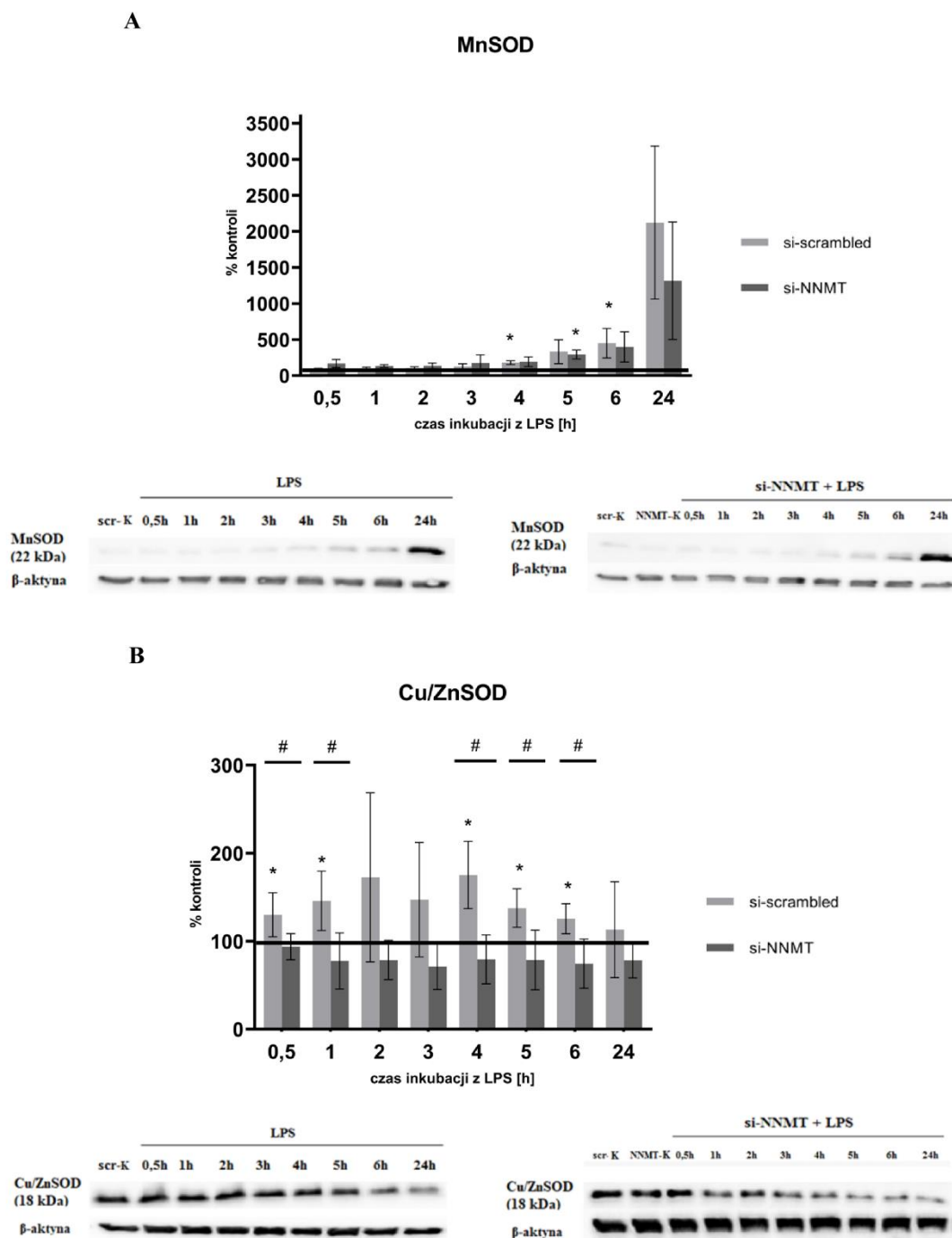
4.2.1. Białka stresu oksydacyjnego i prozapalne cząsteczki adhezyjne

Podobnie jak i w przypadku wcześniej uzyskanych wyników, inkubacja z LPS prowadziła do zwiększenia ilości manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) zarówno w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* jak o komórkach traktowanych *scrambled* RNA. Wzrost ten był zauważalny po 5 godz. i osiągał szczyt po 24 godz. od rozpoczęcia inkubacji. (Ryc. 4.19 A).

Natomiast wyciszenie genu *NNMT* zapobiegało zwiększeniu ilości Cu/ZnSOD w komórkach traktowanych LPS. W komórkach traktowanych *scrambled* RNA inkubacja z LPS powodowała wzrost zawartości tej dysmutazy (Ryc. 4.19 B). Ten wynik sugeruje istnienie zależności między wytwarzaniem NNMT i Cu/ZnSOD.

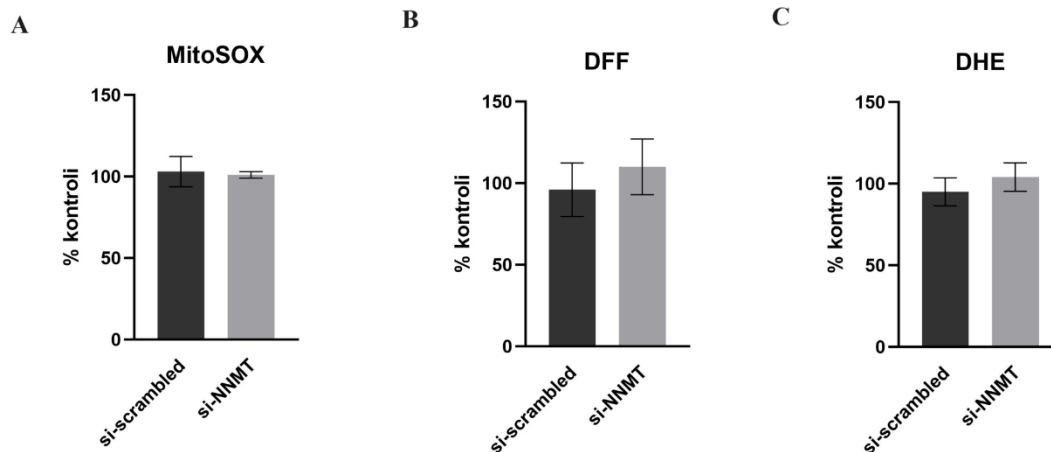
Podobnie jak wcześniej traktowanie komórek LPS nie wpływało na poziom reaktywnych form tlenu niezależnie od ekspresji genu kodującego *NNMT* (Ryc. 4.20).

W przeciwieństwie do zmian dotyczących dysmutazy ponadtlenkowej w warunkach obniżonej ekspresji *NNMT*, wyciszenie genu kodującego *NNMT* nie ma istotnego wpływu na odpowiedź komórek na LPS wyrażoną zmianami zawartości białek adhezji komórkowej (Ryc. 4.22). Uwagę zwraca fakt niezwykle dużej w przypadku tych białek i trudnej do wytłumaczenia niepowtarzalności oznaczeń Western blot pomiędzy niezależnymi doświadczeniami. Być może w przypadku ICAM-1 zwiększenie pod wpływem LPS ilości tego białka w komórkach z wyciszonym genem NNMT jest czymś więcej niż tylko tendencją.



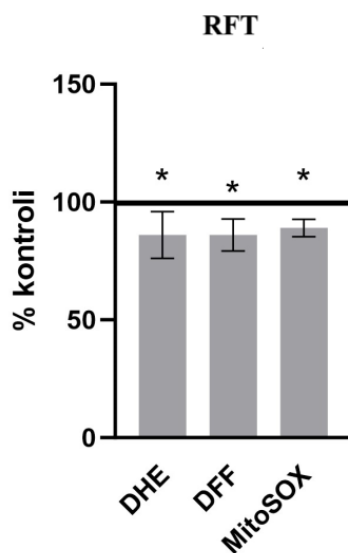
Rys. 4.19. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białek MnSOD (A) oraz Cu/ZnSOD (B) w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych si-scrambled oraz si-NNMT w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresami wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń



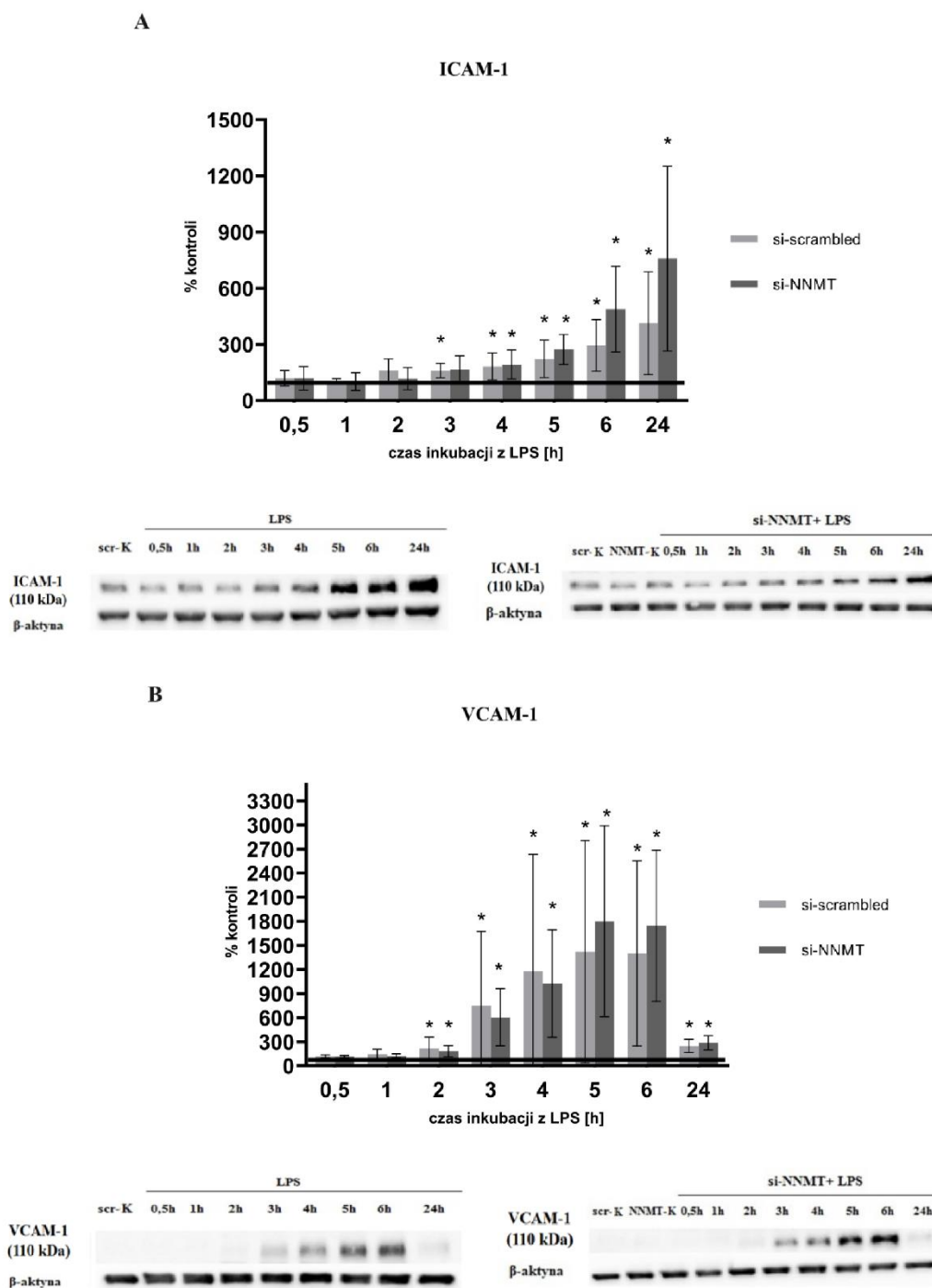
Rys. 4.20. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na wytwarzanie reaktywnych form tlenu w komórkach HAEC

Wykresy przedstawiają wynik pomiaru mitochondrialnych (A), całkowitych RFT (B) oraz anionorodnika ponadtlenkowego (C) (n=4) w komórkach z wyciszonym genem kodującym NNMT oraz komórkach kontrolnych po 0,5 godz. inkubacji z LPS (LPS podawane razem z odpowiednią sondą). Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS dla której przyjęto wartość 100%. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*



Rys. 4.21. Wpływ wyciszenia genu kodującego NNMT na wytwarzanie reaktywnych form tlenu w komórkach HAEC

Wykres przedstawia wynik pomiaru mitochondrialnych, całkowitych RFT oraz anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach HAEC z wyciszonym genem kodującym NNMT. Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do kontroli traktowanej *si-scrambled* dla której przyjęto wartość 100%. * - $p < 0,05$, n=4



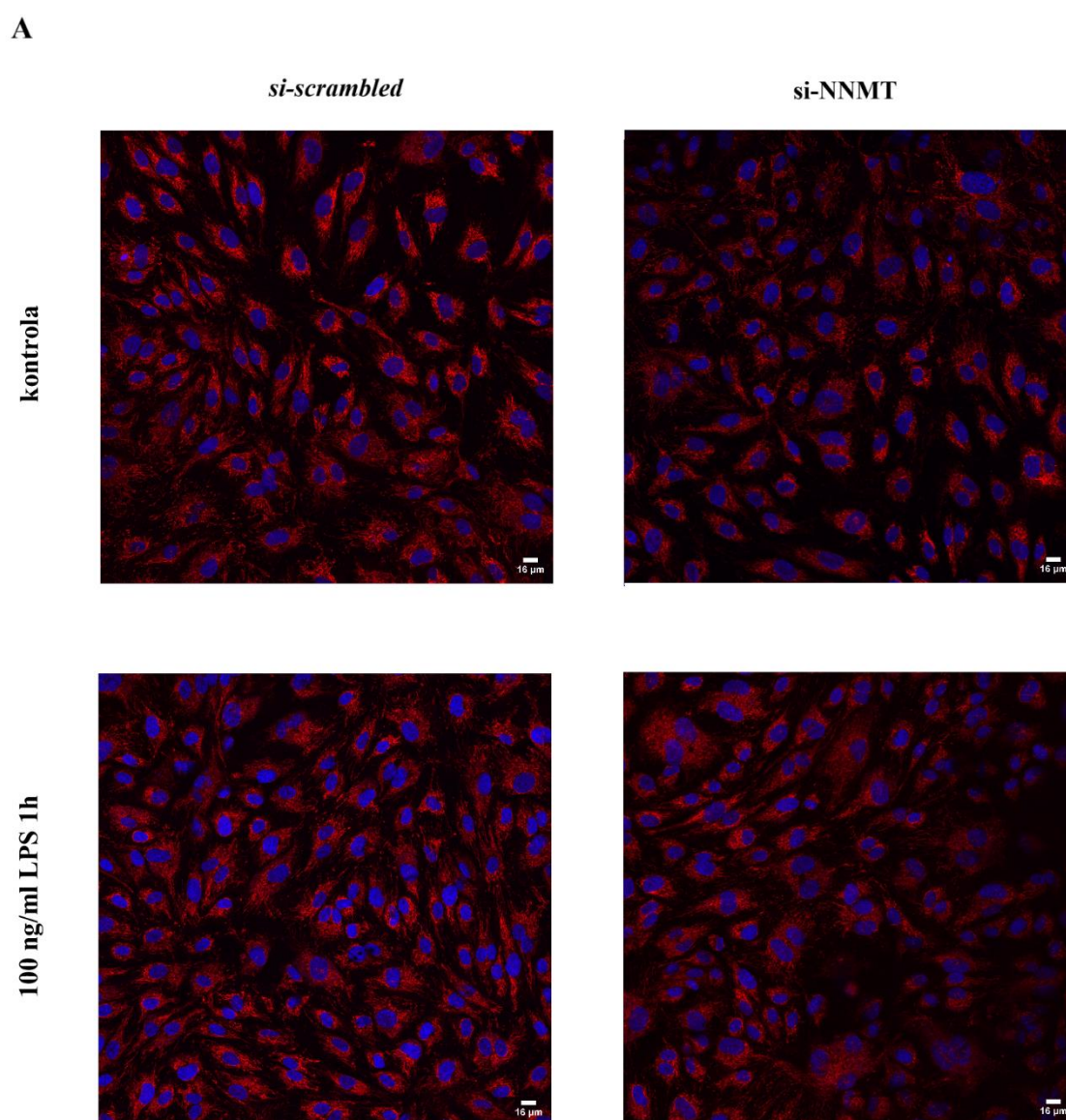
Rys. 4.22. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom molekuł adhezyjnych ICAM-1 (A) oraz VCAM-1 (B) w komórkach HAEC

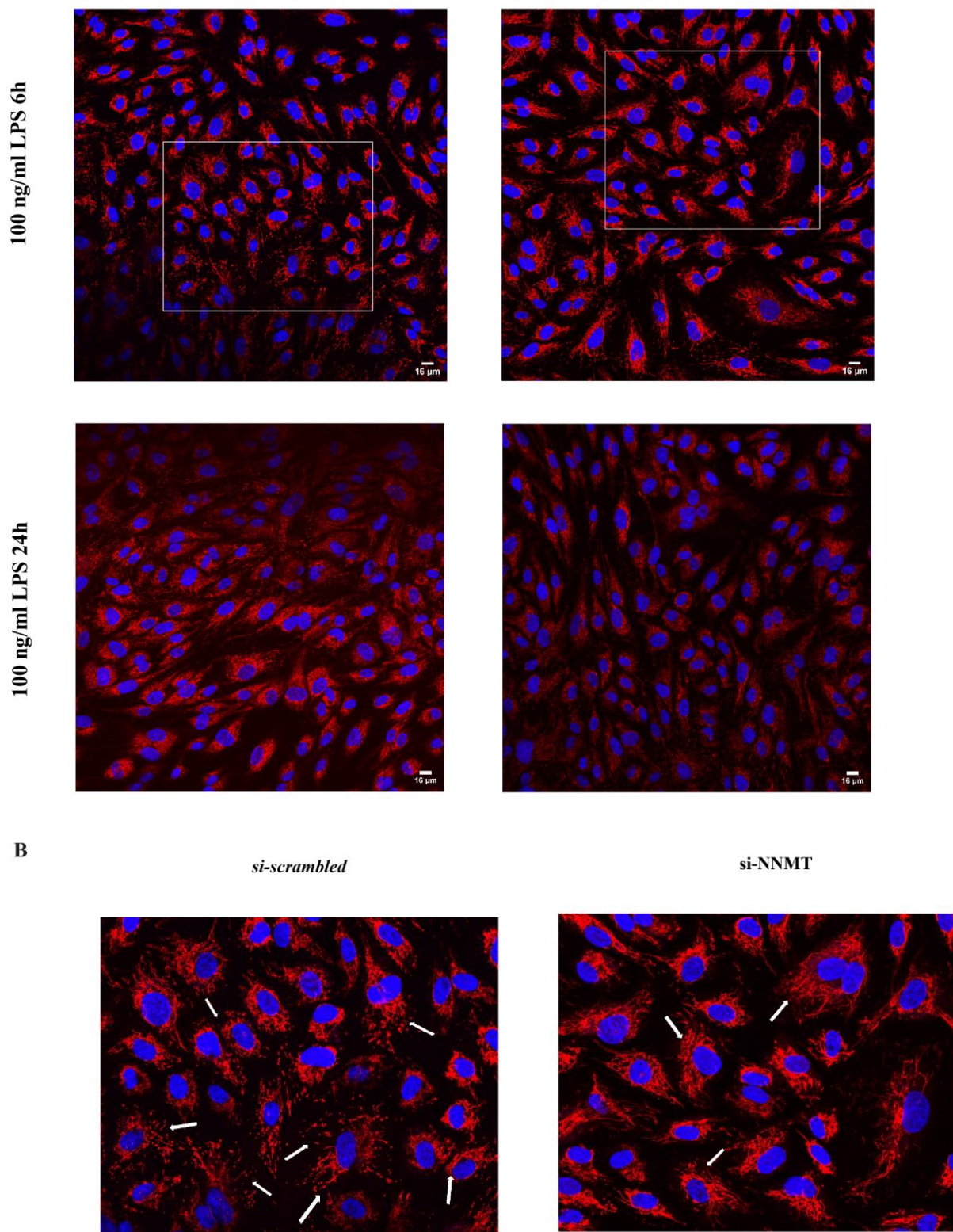
Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresami wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

4.2.2. Mitochondria i metabolizm energetyczny komórek HAEC

4.2.2.1. Organizacja sieci mitochondrialnej w komórkach (architektura mitochondriów)

Ryc. 4.23 przedstawia wynik uzyskany po barwieniu sieci mitochondrialnej w komórkach z wyciszonym i niewyciszonym (po podaniu *scrambled* RNA) genem kodującym NNMT, traktowanych LPS przez 1,6 i 24 godziny, oraz komórek, którym nie podawano LPS.

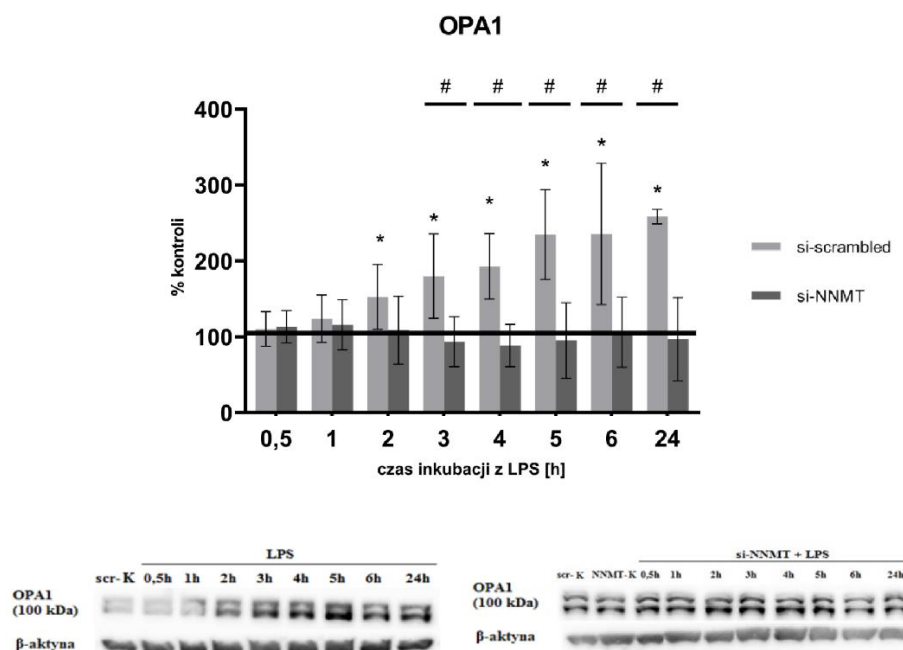




Rys. 4.23. Organizacja sieci mitochondrialnej w komórkach HAEC z wyciszonym genem *NNMT* oraz komórkach kontrolnych traktowanych LPS

Zdjęcia przedstawiają komórki poddane procedurze wyciszania genu kodującego *NNMT* bądź też potraktowane *scrambled* siRNA +/- LPS przez 1 godz., 6 godz. lub 24 godz. a następnie wybarwione Mito tracker Red CMXRos (mitochondria) oraz Hoechst 33342 (jądra komórkowe) (A). Powiększenie zaznaczonego pola dla komórek traktowanych LPS przez 6 godz. (B)

Wydaje się, że mimo pewnych różnic w organizacji sieci mitochondrialnej między komórkami kontrolnymi (*scrambled*-RNA) a komórkami z wyciszonym genem *NNMT* przed podaniem LPS, uderzającym faktem jest to, że po 6 godzinach z LPS komórki obu grup w kontekście przebudowy sieci mitochondrialnej wyraźnie się różnią. Zaobserwowano fragmentację sieci mitochondrialnej w komórkach kontrolnych podczas gdy w komórkach z wyciszonym *NNMT* efekt ten jest mniej zauważalny. Po 24 godz. natomiast w obu badanych grupach nie obserwuje się znaczącej ilości komórek ze zmienioną strukturą mitochondriów. Oprócz porównywania efektów LPS między liniami w tym samym punkcie czasowym (porównanie “poziome”) należy też porównać “pionowo” analizując efekt LPS w odniesieniu do właściwej kontroli (*scrambled* siRNA lub siRNA specyficzne dla *NNMT*). Taka analiza pokazuje, że sieć mitochondrialna w komórkach z wyciszonym genem kodującym *NNMT* w przeciwieństwie do sieci mitochondrialnej w komórkach kontrolnych zachowywała strukturę zbliżoną do komórek nietraktowanych LPS we wszystkich badanych punktach czasowych. Taki sposób porównywania jest spójny ze stosowanym na wszystkich dalszych rycinach, co ułatwia interpretację.

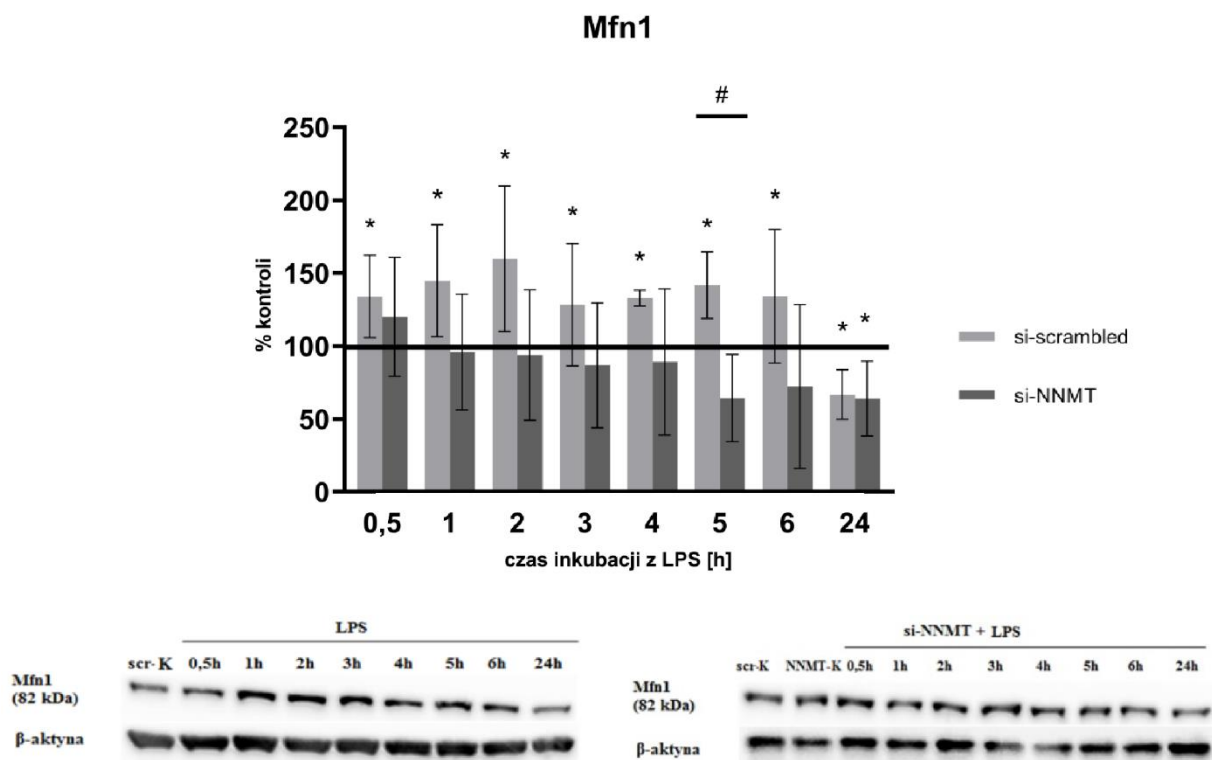


Rys. 4.24. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego *NNMT* na poziom białka *OPA1* w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji (n=5). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Różnica w architekturze sieci mitochondrialnej komórek z wyciszonym i niewyciszonym genem *NNMT* poddanych działaniu LPS może sugerować, że dochodzi do względnych zmian ilości białek zaangażowanych w procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów. W rzeczywistości wykazano wzrost poziomu białek OPA1 (Ryc. 4.24) i mitofuzyny 1 (Ryc. 4.25) w komórkach z niezmienną ekspresją genu *NNMT*, traktowanych LPS.

Natomiast w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* nie wykazano istotnych różnic w poziomie białka OPA1, a w przypadku Mfn1 obserwowano spadek zawartości tego białka po 24 godz. traktowania LPS. A zatem wyciszenie genu *NNMT* wydaje się zapobiegać zmianom spowodowanym podaniem LPS które dotyczą ilości testowanych białek związanych z fuzją mitochondriów.

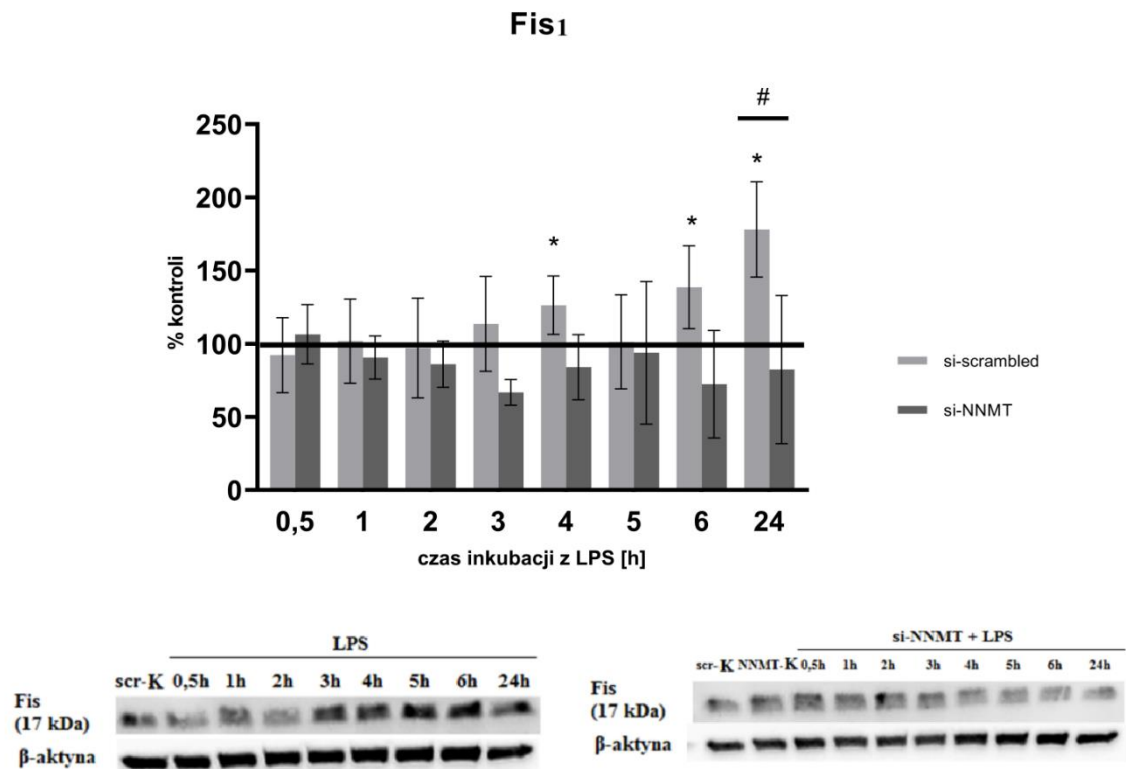


Rys. 4.25. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białka Mfn1 w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Wykazano także istotny wzrost ilości białka Fis1 (Ryc. 4.26) związanego z fragmentacją sieci mitochondrialnej po dłuższych czasach inkubacji z LPS (5 godz.-24 godz.) w komórkach kontrolnych. W komórkach z wyciszonym genem kodującym NNMT nie obserwowano takich zmian.

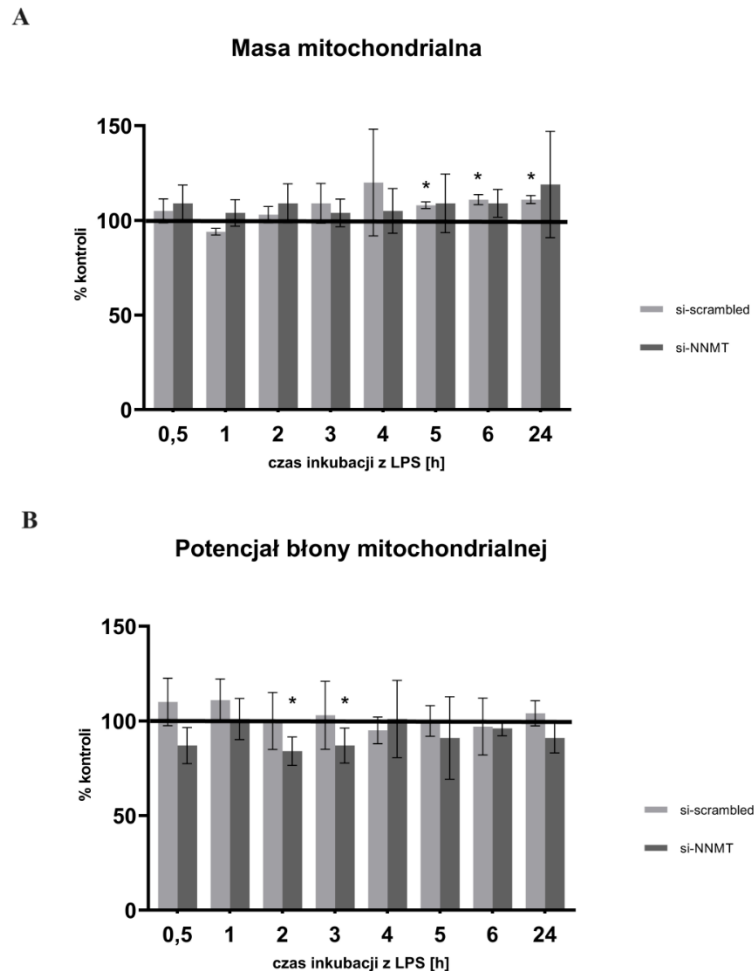
A zatem, inkubacja komórek z LPS doprowadza do zachwiania proporcji między białkami sprzyjającymi fragmentacji a białkami związanymi w fuzję mitochondriów, co daje wypadkowy efekt zmiany architektury sieci mitochondrialnej. Wyciszenie *NNMT* łagodzi skutki działania LPS w tym kontekście.



Rys. 4.26. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białka Fis1 w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Tym istotnym zmianom towarzyszy jedynie nieznaczna zmiana całkowitej masy mitochondrialnej (Ryc. 4.27 A) oraz potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej (Ryc. 4.27 B).



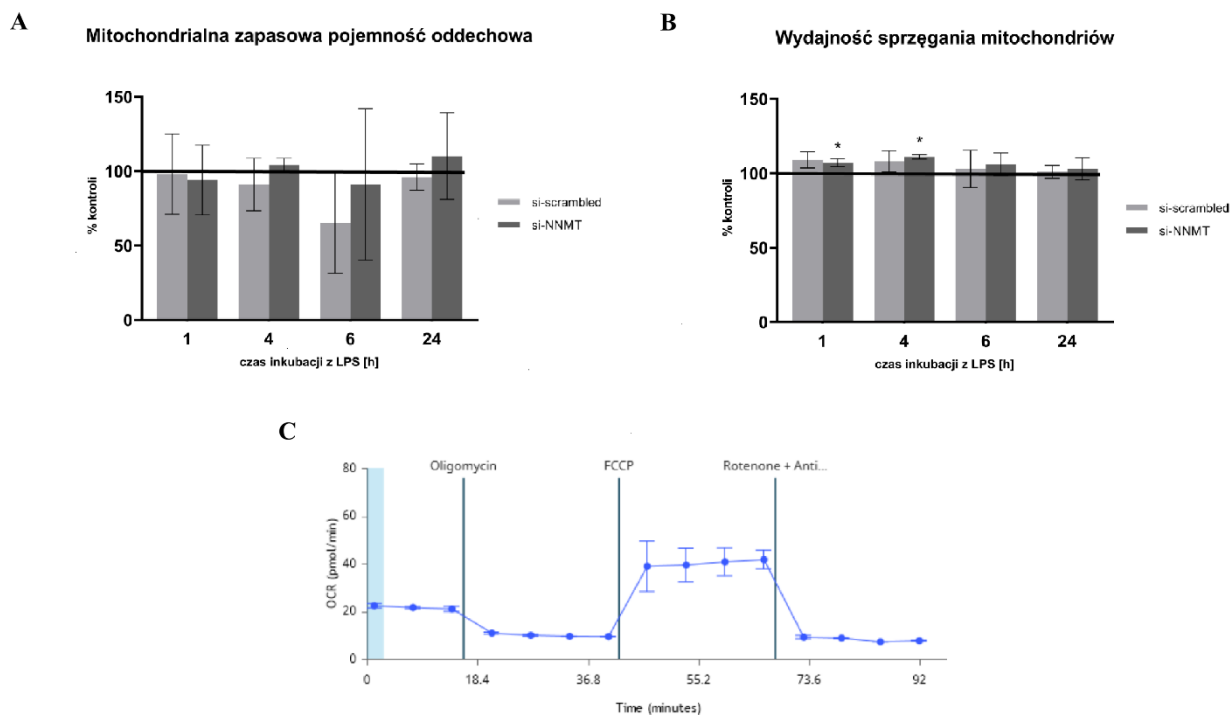
Rys. 4.27. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu NNMT na masę mitochondrialną (A) oraz potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej (B) w komórkach HAEC

Masę mitochondriów oceniano z wykorzystaniem sondy fluorescencyjnej Mitotracker Green a potencjał błony mitochondrialnej z wykorzystaniem sondy JC-1. Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli –*si-scrambled* lub *si-NNMT*) (n=4)

Niewielkie zmiany potencjału błony mitochondrialnej zdają się wskazywać, że wydolność energetyczna mitochondriów w komórkach traktowanych LPS nie jest naruszona w sposób istotny.

Zmianom struktury mitochondriów towarzyszą niewielkie zmiany wybranych parametrów funkcjonalnych określających wydajność oddychania komórkowego. W obecności

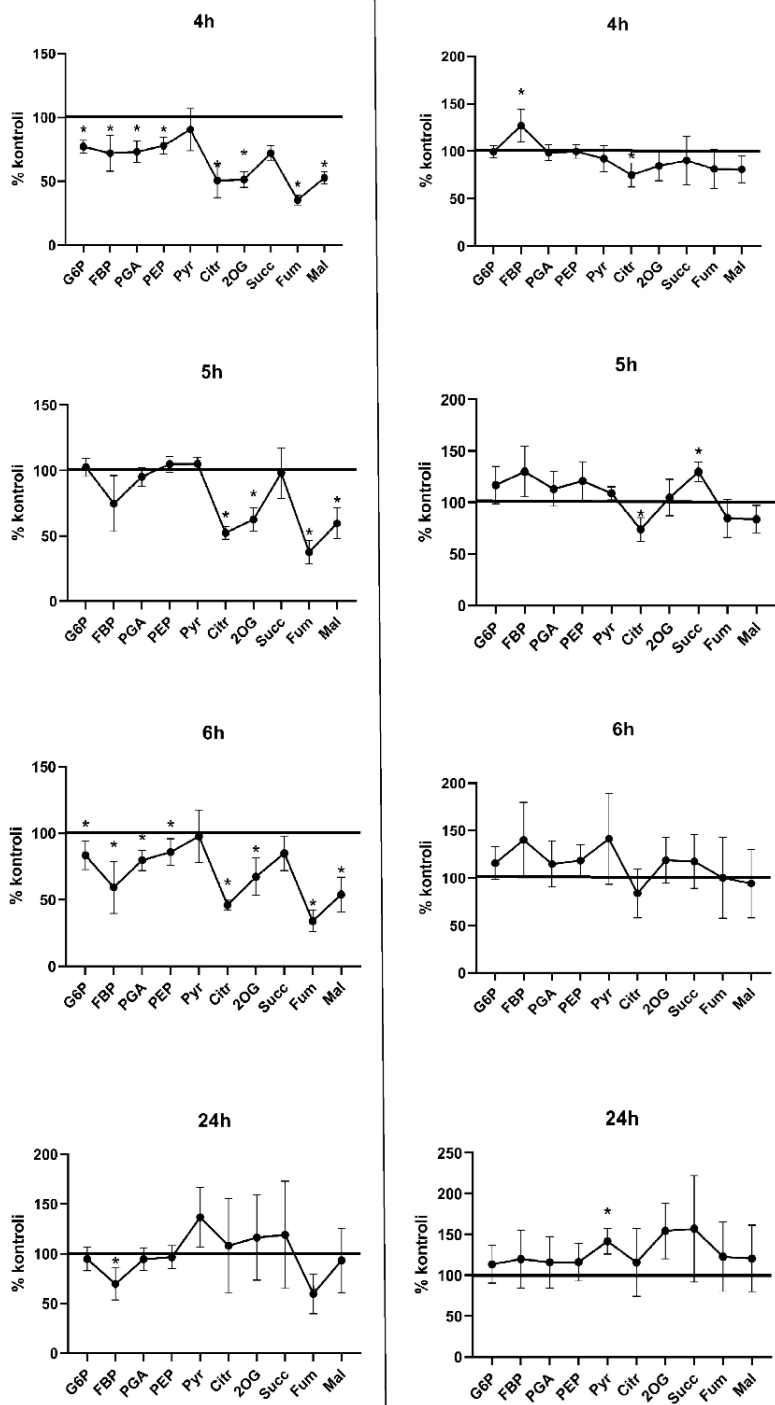
LPS w komórkach z niezmienioną ekspresją *NNMT* obserwowano tendencję spadkową zapasowej pojemności oddechowej (ang. *spare respiratory capacity*), liczonej jako różnica pomiędzy wynikiem maksymalnym oddychania a wynikiem podstawowym. Efektu takiego nie obserwowano w komórkach z wyciszeniem genu *NNMT* (Ryc. 4.28 A). Tendencja ta była szczególnie wyraźna po 6 godzinach inkubacji, ale nie uzyskała ona istotności statystycznej.



Rys. 4.28. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na mitochondrialną zapasową pojemność oddechową oraz wydajność sprzęgania mitochondriów w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. (C) Przykładowy pomiar na urządzeniu Seahorse. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT) ($n=3$)

Podobnie, wydajność oksydacyjnej fosforylacji (ang. *mitochondrial coupling efficiency*), która jest wyrażona jako stosunek różnicy między szybkością oddychania po zahamowaniu ATP-azy oligomycyną do szybkości zużywania tlenu w stanie podstawowym wyrażony w procentach jest tylko nieznacznie zmieniona pod wpływem LPS. Chociaż uzyskano istotność statystyczną efektu LPS w komórkach z wyciszoną ekspresją *NNMT* to efekt ten nie przekracza kilku procent. Uzyskane wyniki mogą sugerować nieznacznie lepszą wydajność energetyczną komórek z wyciszonym genem *NNMT* niż komórek kontrolnych po podaniu LPS może na skutek ich mniejszej wrażliwości na LPS (Ryc. 4.28 B) ale nie jest oczywiste czy tak małe różnice mają znaczenie biologiczne.



Rys. 4.29. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom metabolitów glikolizy oraz cyklu Krebsa w komórkach HAEC

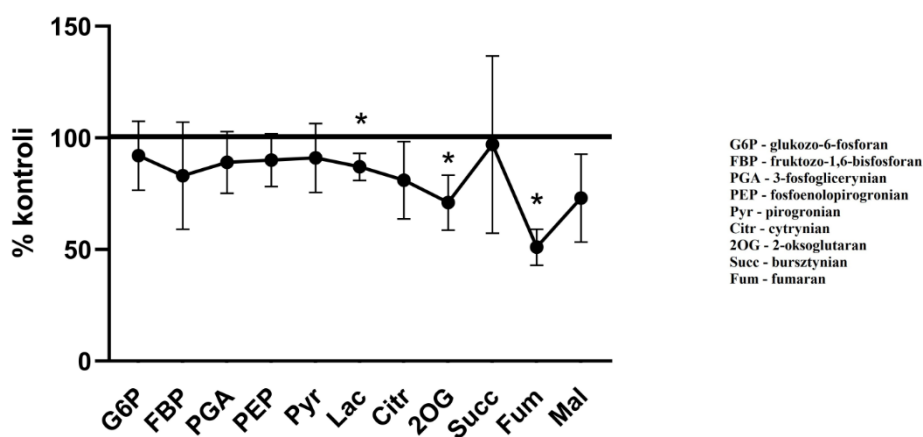
Wykresy typu „cross-over” przedstawiają względne zmiany ilości wybranych metabolitów w danym punkcie czasowym w stosunku do przyjętej kontroli. Poziom metabolitów oceniano metodą HPLC-MS. Każdy punkt oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT) dla $n=3$

W komórkach traktowanych *scrambled* RNA inkubacja z LPS powodowała drastyczny spadek zawartości wszystkich metabolitów cyklu Krebsa oraz pośredników glikolizy już po 0,5 godz. inkubacji z LPS. Zmiany te, z niewielkimi wahaniami utrzymywały się co najmniej do 6-tej godziny doświadczenia natomiast po 24 godz. profil metabolitów ulegał odwróceniu i w znacznej mierze normalizacji (Ryc.4.29).

W komórkach z wyciszonym *NNMT* podobne tendencja spadkowa utrzymywała się do czwartej godziny traktowania LPS po czym następował stopniowy powrót do stanu zbliżonego do wyjściowego (Ryc. 4.29).

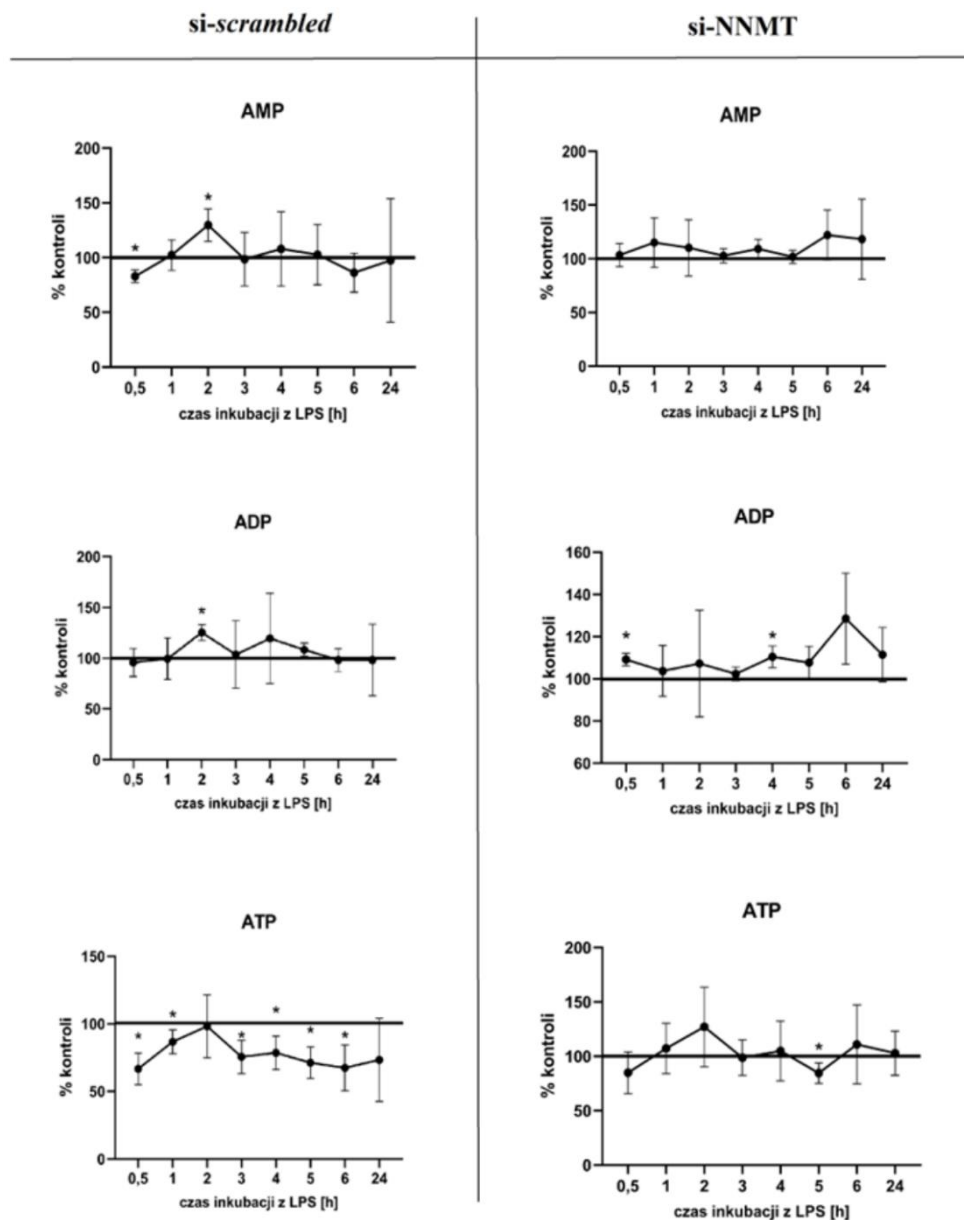
Mimo faktu, że sama procedura wyciszania (czyli podawania komórkom oligonukleotydów *scrambled* RNA) ma wpływ na profil zmiany zawartości metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa w odpowiedzi na LPS, uzyskany obraz potwierdza, że powrót do stanu wyjściowego w obecności LPS jest szybszy w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* niż w komórkach kontrolnych (*scrambled* RNA).

Fakt, że samo wyciszanie genu *NNMT* (bez traktowania komórek LPS) powoduje obniżenie poziomu niektórych metabolitów szczególnie będących pośrednikami w cyklu Krebsa (Ryc. 4.30) dodatkowo utrudnia interpretację pozostałych wyników przedstawionych w rycinie 4.29.



Rys. 4.30. Wpływ wyciszenia *NNMT* na poziom metabolitów glikolizy oraz cyklu Krebsa w komórkach HAEC

Metabolity oznaczano metodą HPLC-MS. Każdy punkt oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do kontroli (komórki traktowane *si-scrambled*), dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$, $n = 3$



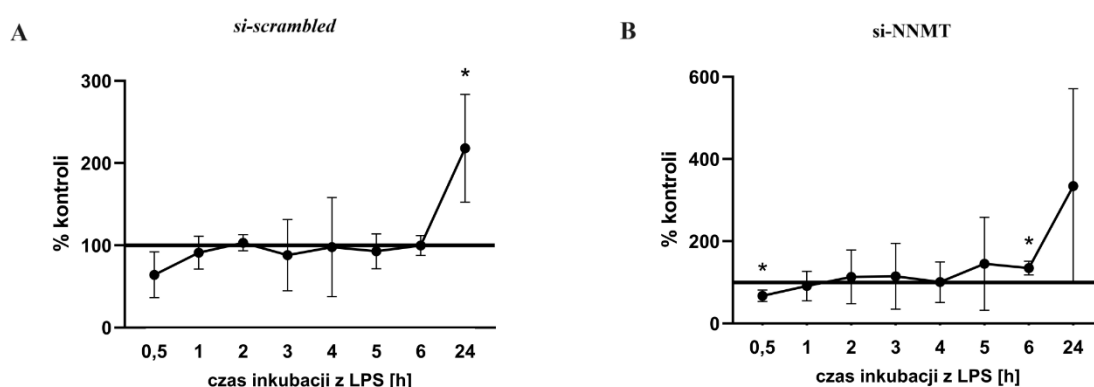
Rys. 4.31. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom AMP, ADP oraz ATP w komórkach HAEC

Stężenie nukleotydów wyznaczano przy pomocy detektora UV-VIS. Każdy punkt oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT) dla $n=3$

Ocena względnych zmian zawartości nukleotydów adeninowych pod wpływem LPS wskazuje jedynie na nieznaczne istotne różnice zarówno w komórkach traktowanych scrambled RNA jak i ze specyficznym wyciszeniem NNMT. Tylko w przypadku ATP jego

poziom był zauważalnie obniżony w komórkach kontrolnych (*scrambled* RNA) poddanych działaniu LPS (Ryc. 4.31).

Wyciszenie *NNMT* wydaje się sprzyjać przestawieniu się komórek na metabolizm beztlenowy, na co wskazuje podwyższony poziom metabolitów pośrednich (ryc. 4.29) oraz nieco większa zawartość mleczanu po 24 godzinach inkubacji z LPS (Rys.4.32). Jak już wspomniano wcześniej, oznaczanie stężenia mleczanu jedynie wewnątrz komórek, bez uwzględnienia frakcji pozakomórkowej pozwala jedynie na przybliżoną ocenę obserwowanych różnic.

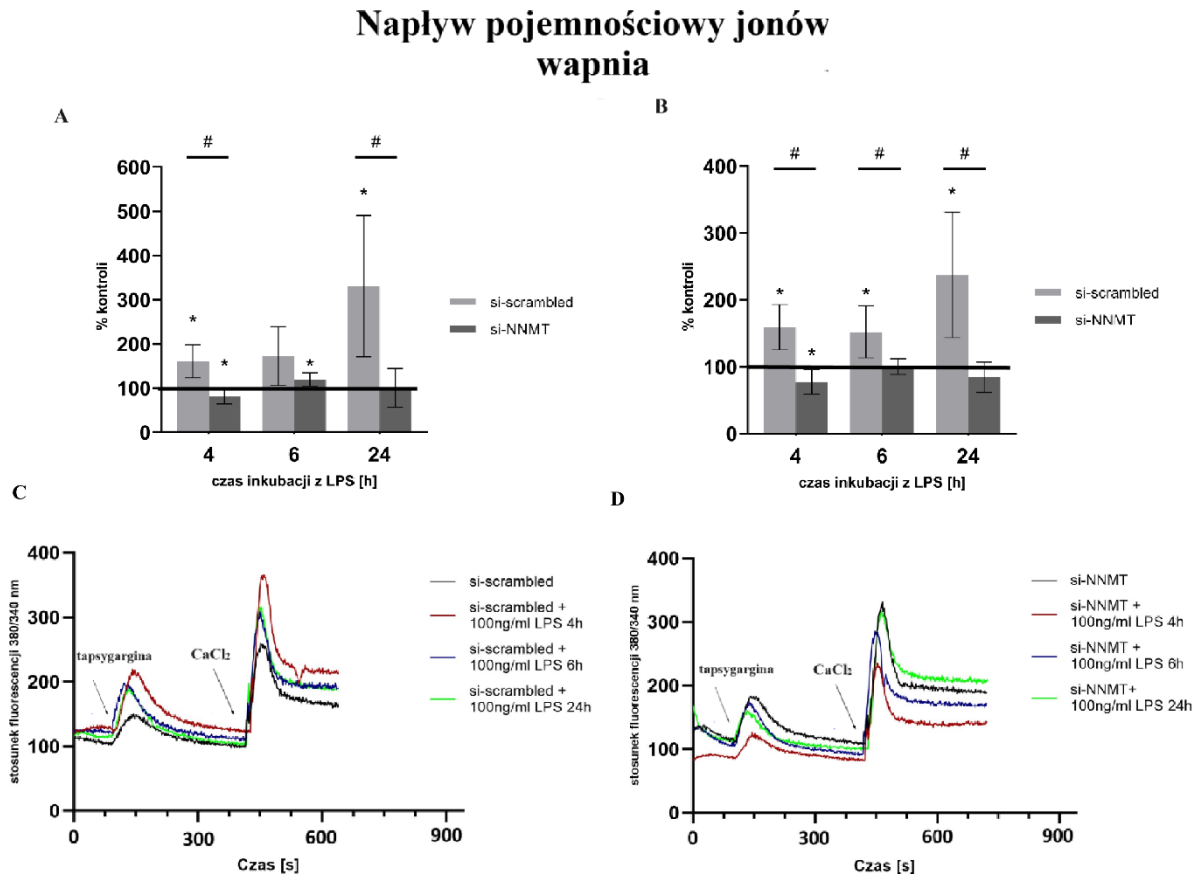


Rys. 4.32. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom mleczanu w komórkach HAEC Stężenie mleczanu oznaczono przy pomocy techniki HPLC-MS w komórkach traktowanych *si-scrambled* (A) oraz komórkach poddanych wyciszeniu genu kodującego NNMT (B). Każdy punkt oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. Wyniki uzyskano we współpracy z dr. Adamem Jagielskim z Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*) dla $n=3$

4.2.3. Pomiar napływu pojemnościowego wapnia w komórkach HAEC

Regulacja sygnalizacji wapniowej jest obok wytwarzania ATP jednym z najważniejszych zadań mitochondriów, wymagającym zdolności mitochondriów to tworzenie odpowiedniego potencjału protonowego na błonie wewnętrznej. Natomiast pojemnościowy napływ jonów Ca^{2+} (SOCE) jest złożonym procesem wymagającym spójnego działania siateczki śródplazmatycznej, błony plazmatycznej komórek oraz mitochondriów. Dlatego w świetle wcześniej uzyskanych wyników dotyczących przede wszystkim zmiany organizacji sieci mitochondrialnej, ale też zwiększenia udziału glikolizy w komórkach traktowanych LPS (por. Ryc. 4.9) w niniejszej pracy sprawdzono czy LPS zmienia szybkość SOCE, a jeżeli tak, to czy wyciszenie genu kodującego NNMT ma wpływ na ten efekt (Ryc. 4.33).

. W komórkach kontrolnych zaobserwowano znacznie mocniejszy i szybszy napływ pojemnościowy jonów wapnia po inkubacji z LPS we wszystkich punktach czasowych. Natomiast w komórkach z wyciszonym *NNMT* skutek podawania LPS był nieznaczny i wykazujący raczej tendencję zmniejszającą odpowiedź wapniowa komórek. Wyniki pokazane na Ryc. 4.33 potwierdzają oba przypuszczenia, natomiast nie wyjaśniają mechanizmu tego działania.

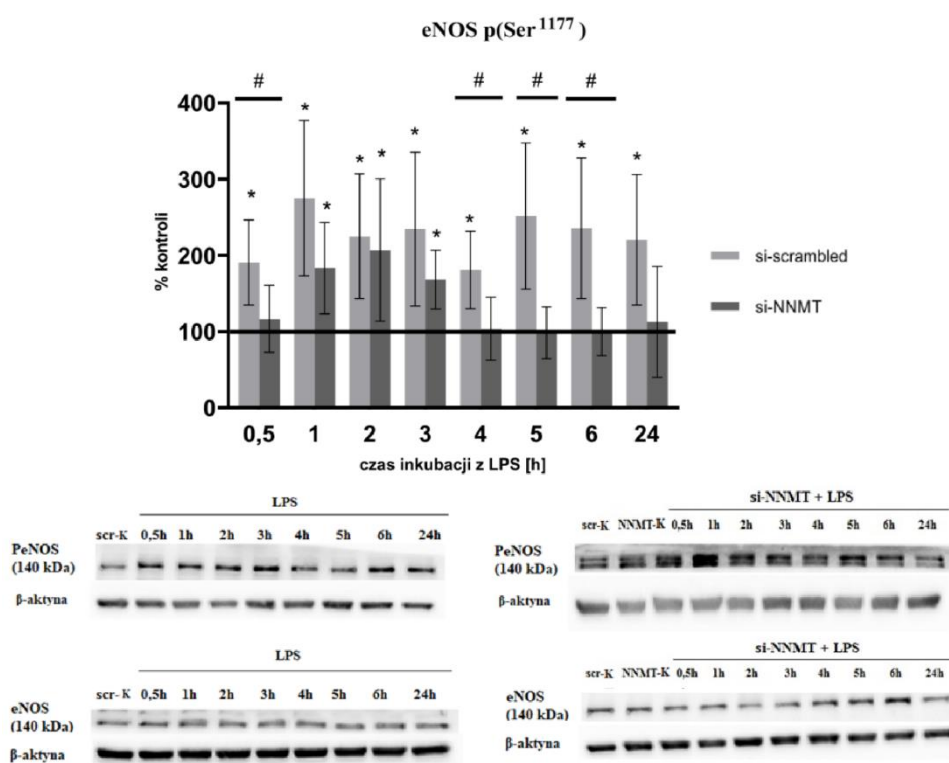


Rys. 4.33. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na napływ pojemnościowy jonów wapnia w komórkach HAEC

Stężenie jonów wapnia w komórkach oznaczano przy pomocy sondy FURA-2. (A) Szybkość napływu pojemnościowego jonów wapnia, (B) maksymalne stężenie jonów wapnia w cytosolu. Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. Przykładowy przebieg pomiaru napływu pojemnościowego wapnia w komórkach traktowanych *scrambled* siRNA (C) oraz siRNA specyficznym dla NNMT (D). * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=3$)

4.2.3.1. Aktywacja śródbłonkowej syntazy tlenku azotu

Produkcja i wydzielanie tlenku azotu jest jedną z podstawowych funkcji komórek śródbłonka związanych ze stanem energetycznym komórek oraz homeostazą jonów wapnia. Ryc. 4.34 pokazuje wzrost fosforylacji reszty seryny 1177 eNOS, zwiększającej aktywność tego enzymu. Stan ten utrzymywał się w komórkach kontrolnych we wszystkich punktach czasowych. W komórkach z wyciszonym NNMT wzrost fosforylacji eNOS wystąpił jedynie w początkowej fazie inkubacji z LPS



Rys. 4.34. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na ufosforylowanie eNOS w komórkach HAEC

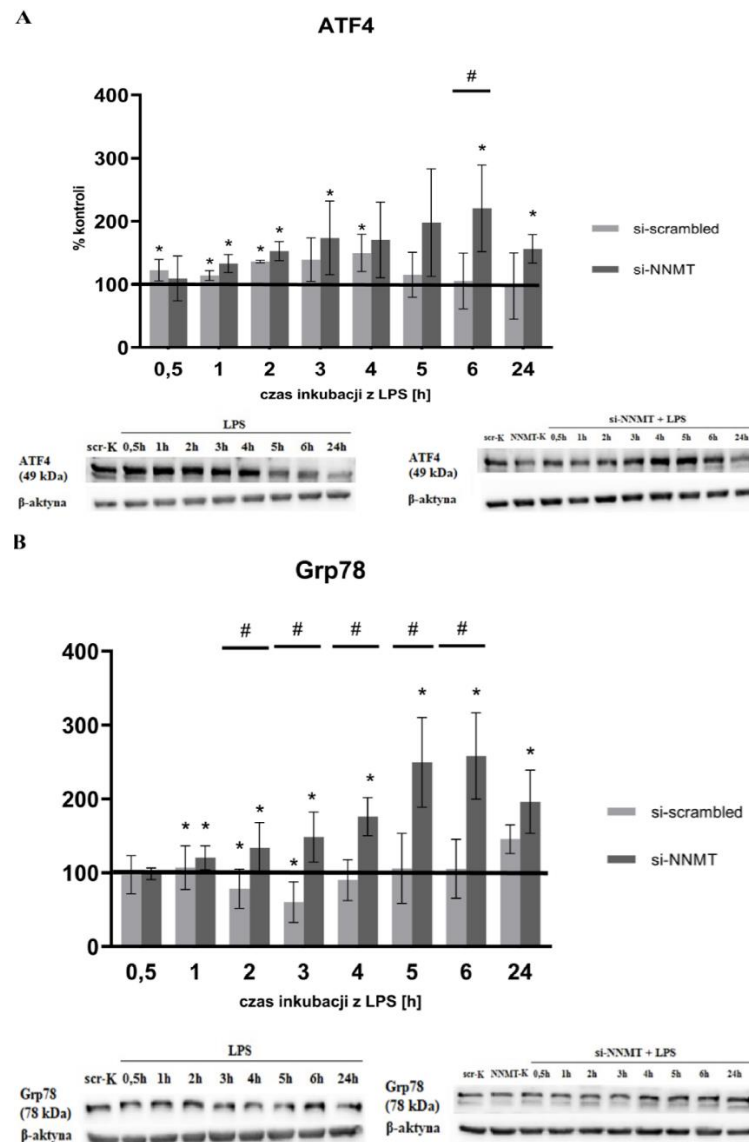
Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

4.2.4. Wpływ wyciszenia genu kodującego NNMT na markery odpowiedzi na LPS niezwiązane bezpośrednio z metabolizmem energetycznym

Celem przedstawienia poniższych wyników jest pokazanie, że obecność NNMT w komórkach może mieć kluczowe znaczenie dla wielu procesów, niekoniecznie bezpośrednio ze

sobą związanych, zatem enzym ten stanowi jedno z centrów regulacyjnych w prawidłowych komórkach śródbłonka. Jak pokazano, niektóre z efektów traktowania komórek LPS są mniej a inne bardziej wyraźne w komórkach z wyciszonym genem *NNMT*.

4.2.4.1. *NNMT* a markery autofagii i stresu siateczki śródplazmatycznej

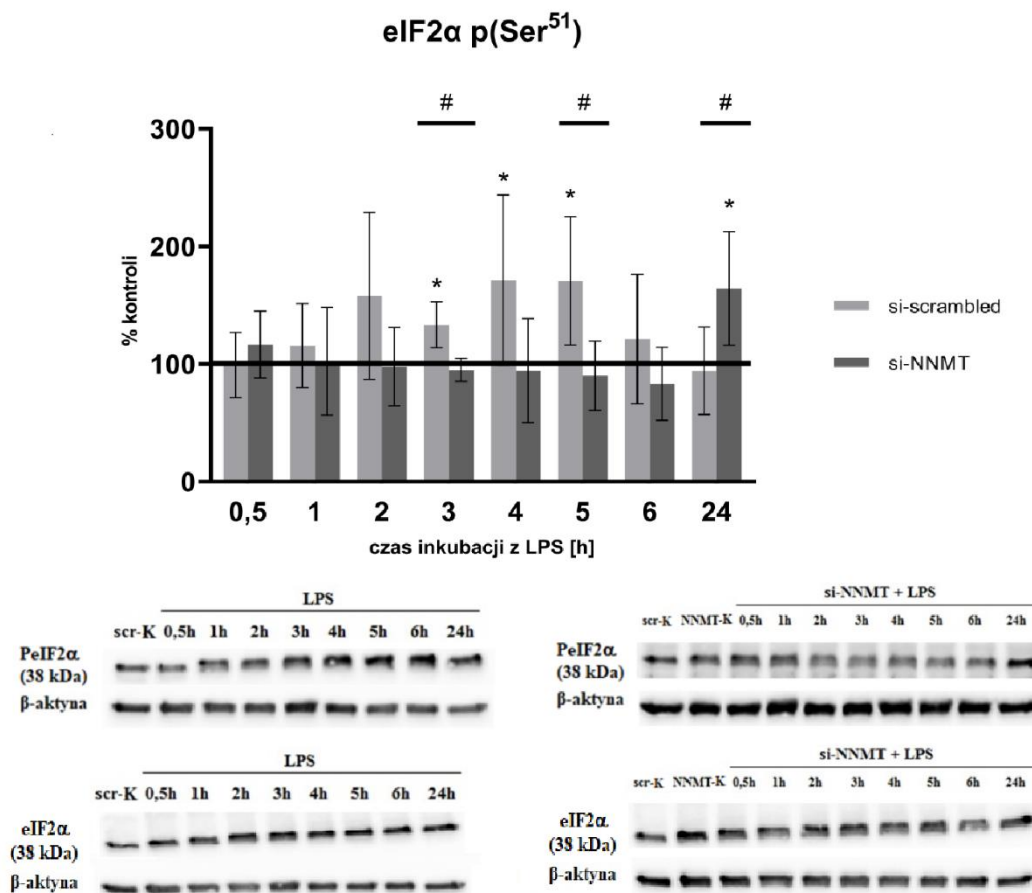


Rys. 4.35. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białek (A) ATF4 oraz (B) Grp78 w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=4$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

ATF4 (aktywujący czynnik transkrypcyjny 4) uczestniczy w zmniejszeniu stanu zapalnego wywołanego przez LPS [Li i wsp., 2021]. A zatem zwiększenie jego stężenia w komórkach z wyciszonym *NNMT* i traktowanych LPS (Ryc. 4.35) może sugerować udział *NNMT* w przeciwzapalnej odpowiedzi komórek śródbłónka. Podobne znaczenie może mieć zmiana zawartości Grp78 (białko regulowane glukozą o masie 78kDa).

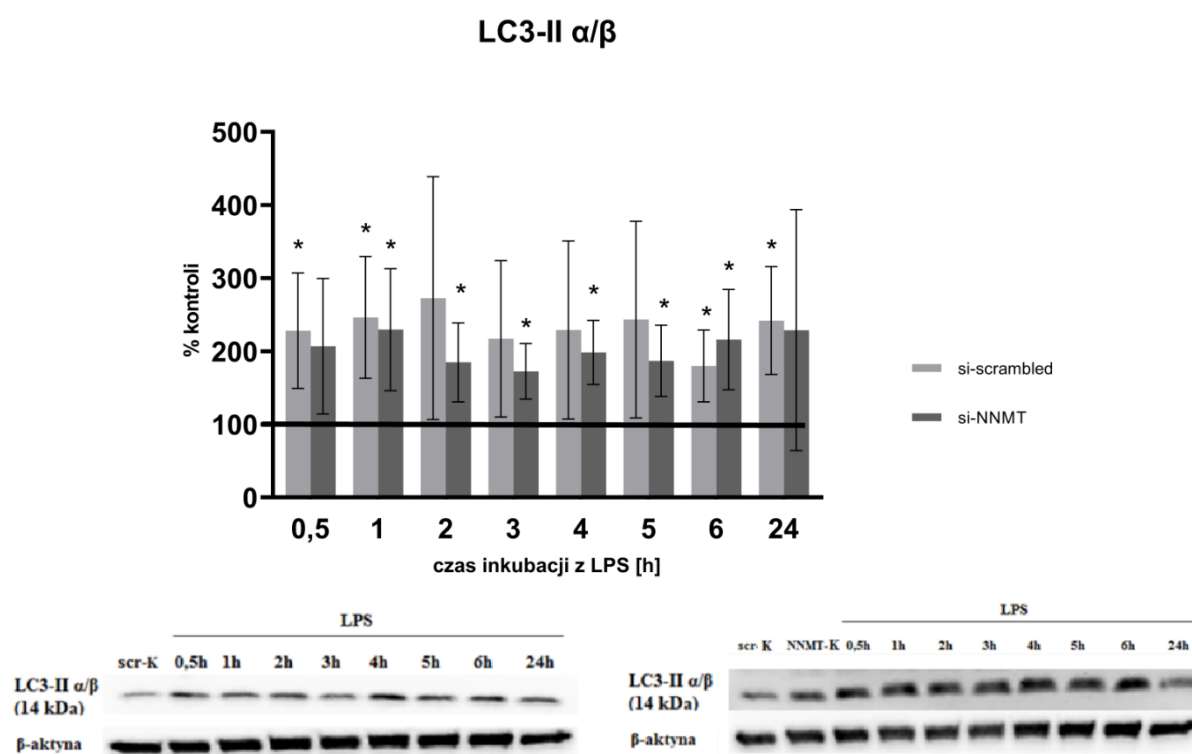
W przypadku białka eIF2α (eukariotyczny czynnik inicjacji translacji alfa) traktowanie komórek LPS powodowało zwiększenie stopnia fosforylacji reszty seryny 51 między 3 a 5 godziną inkubacji w kontroli (*scrambled* RNA) i dopiero po 24 godz. w komórkach z wyciszonym genem kodującym *NNMT*.



Rys. 4.36. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego *NNMT* na ufosforylowanie eIF2α w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

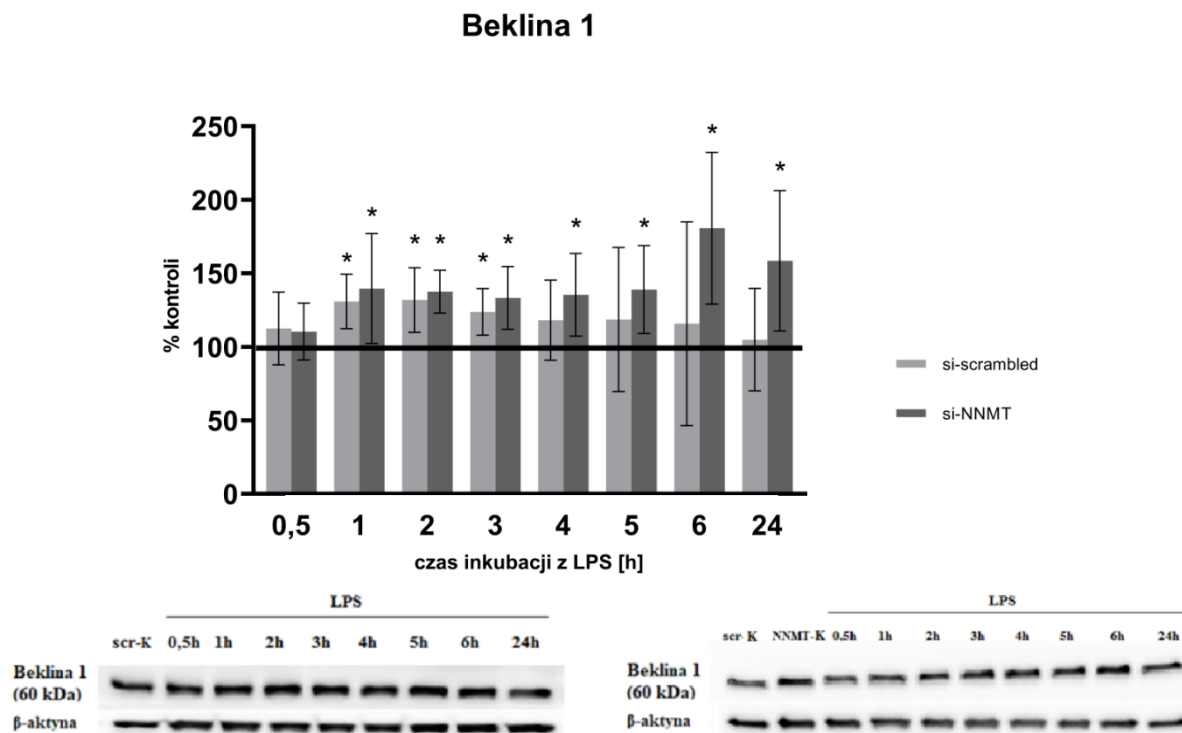
Zarówno w komórkach kontrolnych jak i wyciszonych zaobserwowano wzrost poziomu białka LC3 α/β (ubikwitynopodobne białko związane z mikrotubulami alfa/beta), będącego markerem autofagii, w odpowiedzi na inkubację z LPS 0,5 godz.-24 godz. (Ryc. 4.37). Wynik ten jest zgodny z doniesieniami literaturowymi, które wskazują na możliwość aktywacji przez LPS nie tylko ścieżki prowadzącej do apoptozy ale i autofagii, będącej procesem prożyciowym. W proces autofagii zaangażowany jest szereg białek na czele z bekliną 1, p62 oraz rodziną białek ATG.



Rys. 4.37. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białka LC3-II α/β w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT) ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

LPS wpływał na zmieniające się w czasie zwiększenie poziomu bekliny 1 odpowiadającej za inicjację powstawania autofagosomu, w obydwu badanych modelach (Ryc. 4.38).

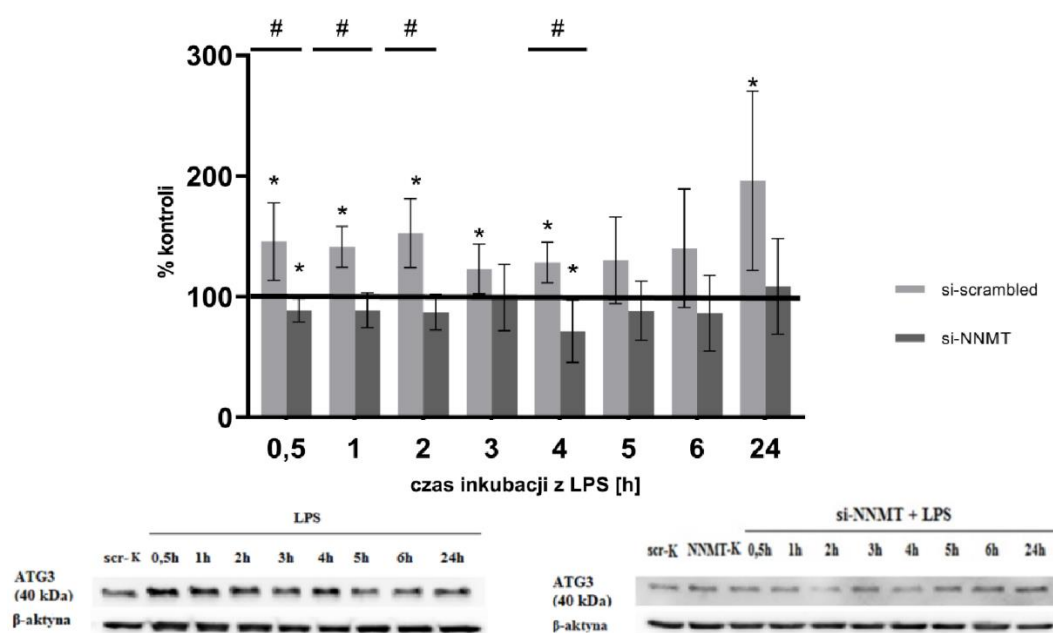


Rys. 4.38. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom bekliny 1 w komórkach HAEC Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Wyciszenie genu *NNMT* wpłynęło także na wzorec ilości związanych z autofagią białek ATG3 (Ryc. 4.39A) oraz ATG16L (Ryc. 4.39B) w odpowiedzi na LPS. Dodatkowo wykazano znaczne nagromadzenie się białka wiążącego ubikwitynę p62 w komórkach z niezaburzoną ekspresją *NNMT* (Ryc. 4.40). Ta obserwacja wskazuje na potencjalną rolę *NNMT* w kontroli przeżywalności komórek. Zależność zmian poziomu czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (Ryc. 4.41), w komórkach traktowanych LPS od poziomu ekspresji genu *NNMT* zdaje się potwierdzać tę sugestię.

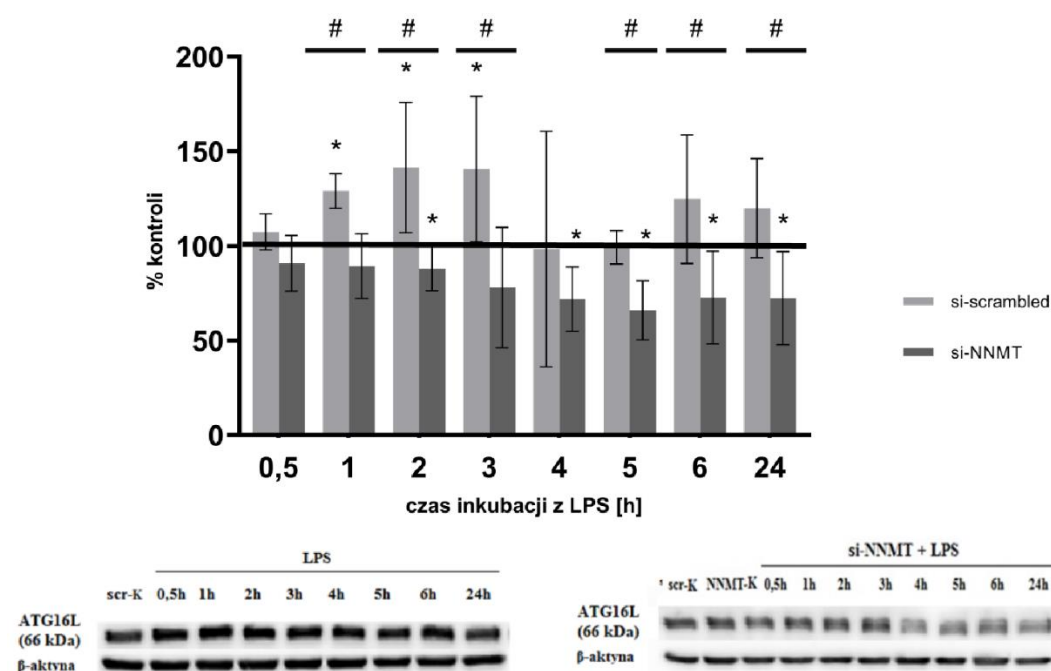
A

ATG3



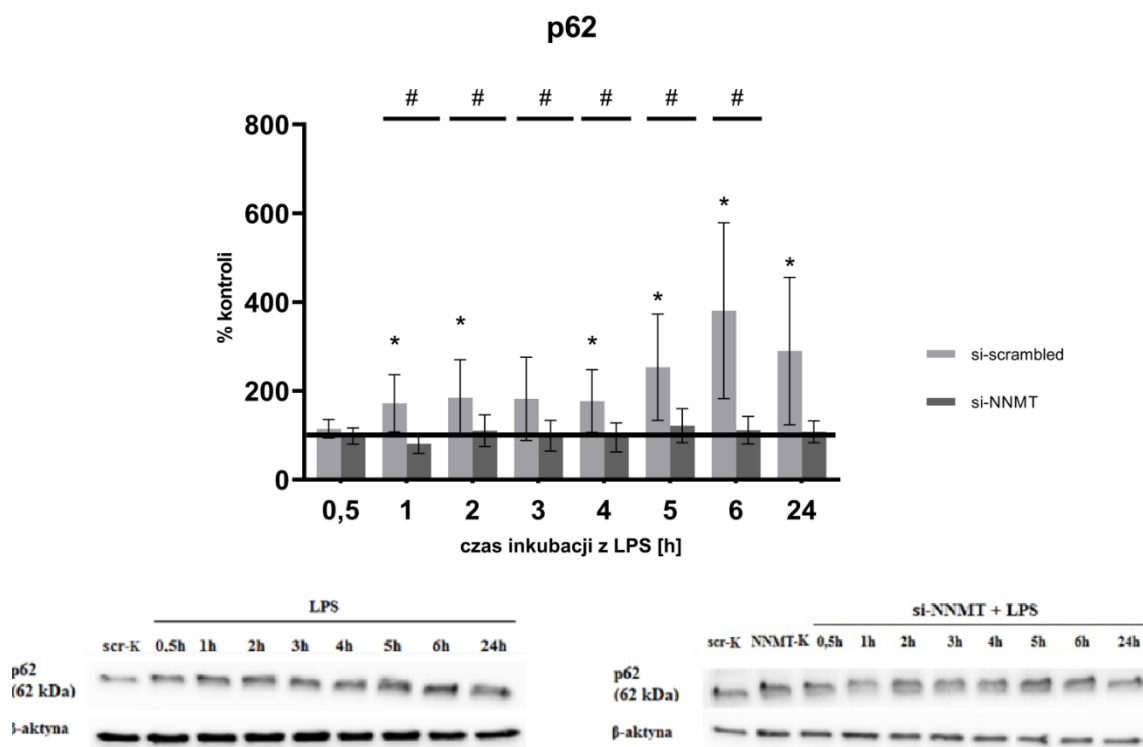
B

ATG16L



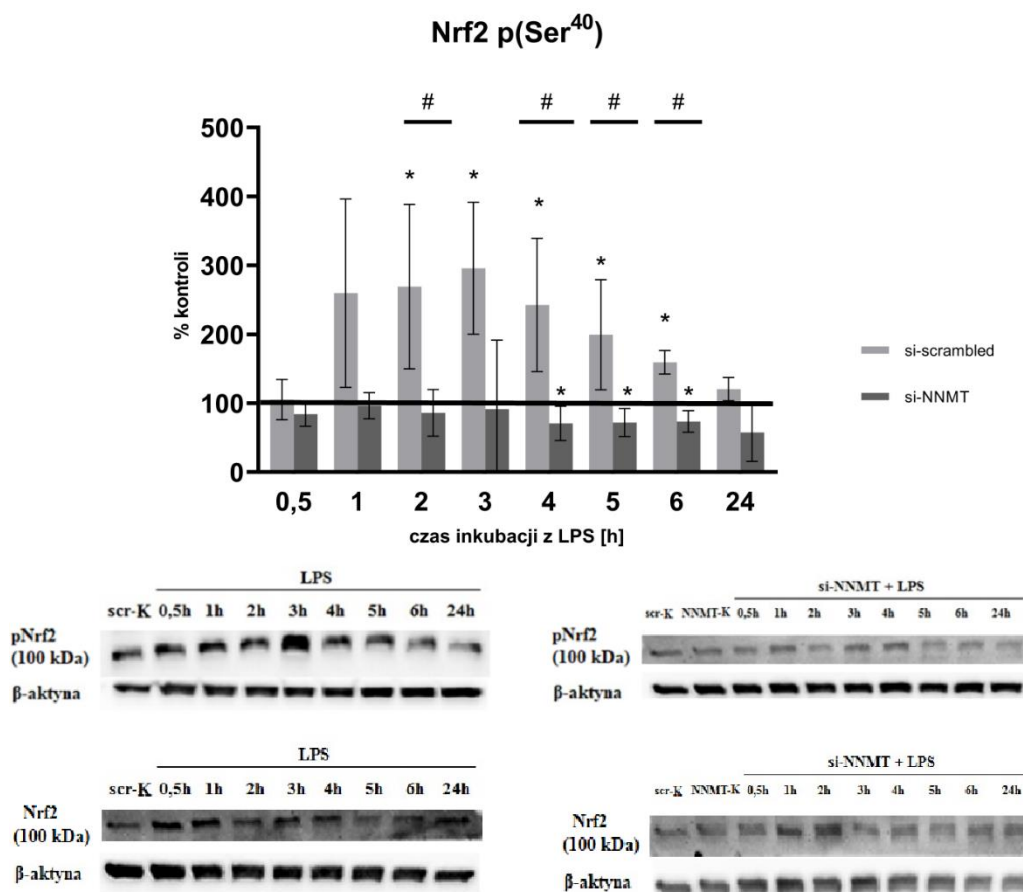
Rys. 4.39. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom (A) ATG3 oraz (B) ATG16L w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-scrambled jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-scrambled, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-scrambled lub si-NNMT); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych si-scrambled oraz si-NNMT w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń



Rys. 4.40. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na poziom białka p62 w komórkach HAEC
 Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno *si-scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych *si-NNMT* oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie *si-NNMT*. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – *si-scrambled* lub *si-NNMT*); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych *si-scrambled* oraz *si-NNMT* w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

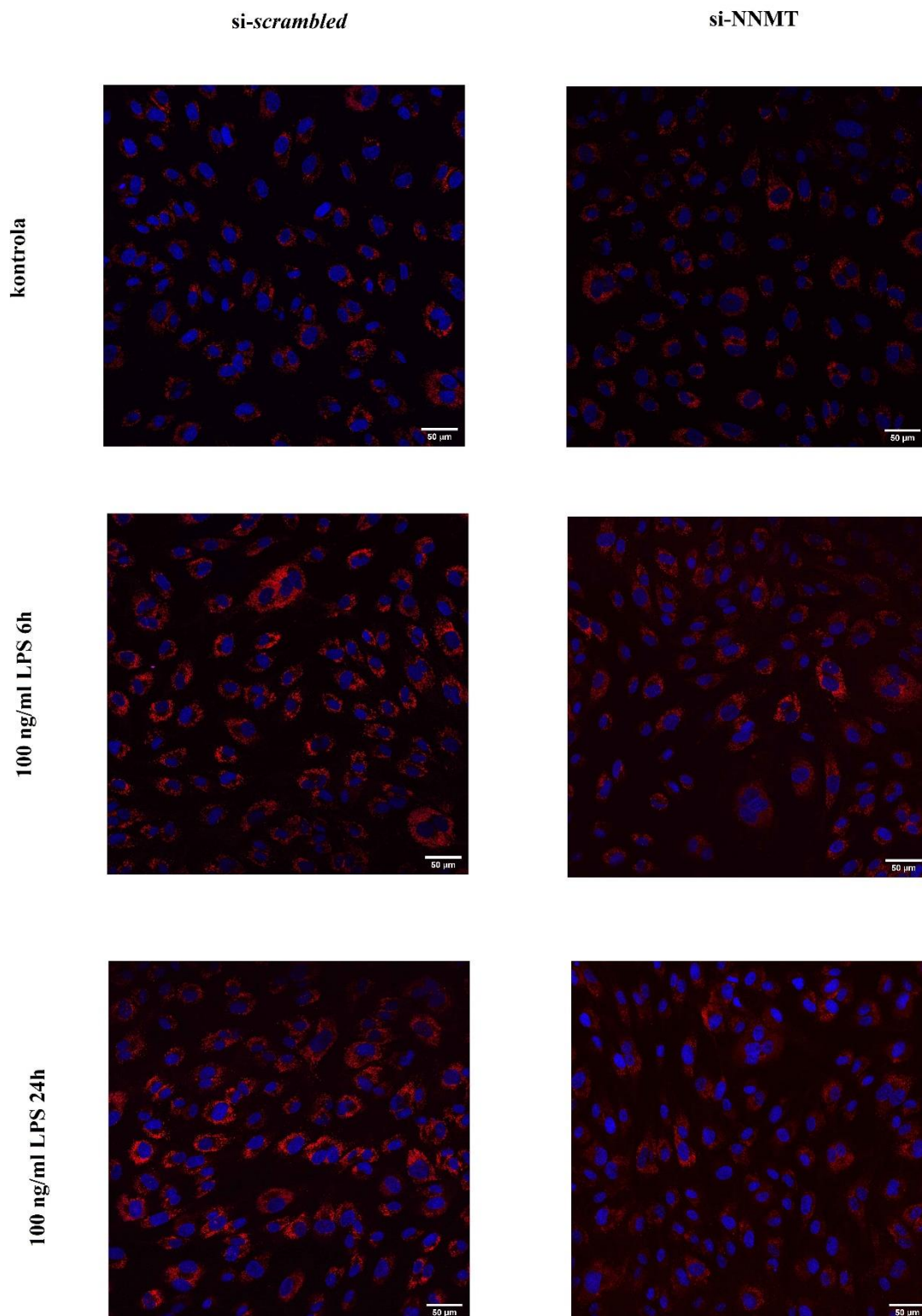
Dodatkowo w komórkach z obniżonym poziomem NNMT traktowanych LPS wykazano zmniejszone nagromadzenie się struktur komórkowych o odczynie kwasowym (takich jak lizosomy czy autolizosomy). (Ryc. 4.42).



Rys. 4.41. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na ufosforylowanie czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w komórkach HAEC

Każdy słupek oznacza wartość średnią \pm SD dla względnej zmiany w stosunku do odpowiedniej kontroli nie traktowanej LPS, dla której przyjęto wartość 100% i przedstawiono graficznie na wykresie w postaci linii poziomej. Kontrolę dla komórek traktowanych zarówno si-*scrambled* jak i LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-*scrambled*, natomiast kontrolę dla komórek traktowanych si-NNMT oraz LPS stanowiły komórki traktowane jedynie si-NNMT. * - $p < 0,05$ (w stosunku do odpowiedniej kontroli – si-*scrambled* lub si-NNMT); # - $p < 0,05$ dla wyniku porównania odpowiedzi na LPS komórek traktowanych si-*scrambled* oraz si-NNMT w danym punkcie czasowym inkubacji ($n=5$). Umieszczone pod wykresem wyniki testu Western blot dotyczą pojedynczych reprezentatywnych doświadczeń

Biochemiczne podstawy tych zmian są trudne do wyjaśnienia, ale wskazują na istotną rolę NNMT w odpowiedzi komórek na LPS szczególnie w kontekście aktywacji szlaków związanych z przeżywaniami lub śmiercią komórek. pozwalają na szerokie przedyskutowanie znaczenia tego enzymu na tle piśmiennictwa.



Rys. 4.42. Wpływ LPS oraz wyciszenia genu kodującego NNMT na tworzenie się struktur komórkowych o odczynie kwasowym w komórkach HAEC
 Komórki HAEC traktowane siRNA specyficznym dla NNMT lub *scrambled* siRNA – kontrolne oraz dodatkowo inkubowane z 100 ng/ml LPS przez 6 godz. lub 24 godz., wybarwione LysoTracker Deep Red (lizosomy) oraz Hoechst 33342 (jądra komórkowe)

5. DYSKUSJA

Sepsa jest złożonym zespołem zapalnym, będącym ostrą odpowiedzią organizmu na zakażenie. Mimo znacznego postępu w zrozumieniu patogenezы i rozwoju metod terapeutycznych sepsy stan ten nadal stwarza poważne zagrożenie życia. Badania nad sepsą skupiają się na identyfikacji biomarkerów, rozwoju terapii ukierunkowanych na mechanizmy zapalne, optymalizacji gospodarki elektrolitowej i wspieraniu układu odpornościowego [Angus i van der Poll, 2013]. Badania podstawowe prowadzone w warunkach *in vitro* przyczyniły się znacznie do postępu w rozumieniu mechanizmów sepsy niemniej wiele pytań dotyczących tego stanu jest bez odpowiedzi.

W badaniach prowadzonych na komórkach śródbłónka często wykorzystuje się lipopolisacharydy (LPS) jako narzędzie do wywołania odpowiedzi zapalnej i reakcji układu odpornościowego. Dobór odpowiedniego stężenia LPS w doświadczeniach *in vitro* ma kluczowe znaczenie dla odzwierciedlania warunków zbliżonych do sytuacji *in vivo*. W literaturze istnieją liczne doniesienia koncentrujące się na ustalaniu optymalnych stężeń LPS, z uwzględnieniem różnych typów komórek oraz celów badawczych i oczekiwanej odpowiedzi komórkowej [Schildberger i wsp., 2013; Yang i wsp., 2020].

Wpływ LPS na komórki HAEC z niezmienną ekspresją genu *NNMT*

Odpowiedź na stres

Typowe stężenie LPS używanego w badaniach na komórkach śródbłónka mieści się w zakresie od 1 ng/ml do 1 µg/ml [Dayang i wsp., 2019; Zheng i wsp., 2018; Zyrianova i wsp., 2021]. LPS podawany w zbyt wysokim stężeniu może być toksyczny dla komórek, indukować apoptozę lub inny rodzaj śmierci komórkowej. W celu badania adaptacyjnej odpowiedzi komórek pozwalającej na ich przeżycie właściwe jest stosowanie LPS w niskich stężeniach. W niniejszej pracy testowano wpływ LPS w stężeniu 100 ng/ml oraz 1 µg/ml i w obu przypadkach obserwowano podobną stymulację wytwarzania białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 będącymi markerami odpowiedzi prozapalnej, natomiast nie obserwowano istotnego wpływu na przeżywalność komórek. Dlatego w dalszych badaniach stosowano LPS w stężeniu 100 ng/ml, przyjmując jako zasadę traktowanie komórek najslabszym bodźcem wywołującym pożądany efekt. Takie podejście pozwala na zminimalizowanie dodatkowych niepożądanych efektów.

Badania wykonane przez inne zespoły wykazały, że w komórkach śródbłonka traktowanych LPS zachodzi zwiększona ekspresja genu kodującego *COX-2*, co jest związane odpowiedzią zapalną. *COX-2* jest enzymem odpowiedzialnym za przemianę kwasu arachidonowego w prostaglandyny, które pełnią ważne funkcje w procesach zapalnych. W jednym z badań przeprowadzonym na bydłęczych komórkach śródbłonka aorty (BAEC) stwierdzono, że ekspresja *COX-2* została zwiększona po podaniu LPS, co prowadziło do zwiększonego wytwarzania prostaglandyn i wzmożonej proliferacji komórek [Akarasereenont i wsp., 1995]. Inne badanie wykazało, że inhibitory *COX-2* mogą hamować proliferację indukowaną przez LPS [Jasiak i wsp., 2017]. W niniejszej pracy również obserwowano istotny wzrost poziomu *COX-2* w odpowiedzi na traktowanie LPS, przy czym szczytowy efekt był widoczny po 6 godzinach ze znacznym spadkiem, lecz wciąż nie do poziomu wyjściowego w 24-tej godzinie doświadczenia. Wynik ten wraz z poprzednimi dotyczącymi *ICAM-1* i *VCAM-1* potwierdza indukcję stanu zapalnego w komórkach HAEC traktowanych LPS, w sposób nie wpływający na ich przeżywalność. W badaniach opisywanych w niniejszej dysertacji komórki były wykorzystywane po uzyskaniu 100% konfluencji, co utrudniało badanie wpływu LPS na ich proliferację.

Szeroko opisywane w literaturze jest także towarzyszące stanom zapalnym zjawisko stresu oksydacyjnego w komórkach, w szczególności obserwowane w odpowiedzi na LPS [Zheng i wsp., 2022]. Stres oksydacyjny jest wynikiem nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu w stosunku do aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych. Głównymi źródłami RFT w komórkach są enzymy oksydoredukcyjne takie jak oksydaza NADPH, cyklooksigenaza i syntazy tlenu azotu (NOS), a także kompleksy enzymatyczne łańcucha oddechowego [Joffre i Hellman, 2021]. Mechanizmy obronne komórek w tym komórek śródbłonka zapobiegające stresowi oksydacyjnemu obejmują enzymy antyoksydacyjne oraz niskocząsteczkowe przeciwutleniacze zwane wymiataczami wolnych rodników. Oksygenaza hemowa (HO) katalizuje przemianę hemu w bilirubinę, tlenek węgla (CO) i żelazo. Wykazano, że w komórkach śródbłonka LPS może indukować ekspresję genu jednej z izoform HO (HO-1), która wykazuje działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne [Chen i wsp., 2015]. Znany jest także pozytywny wpływ LPS na aktywność dysmutaz ponadtlennokowych, zarówno manganowej (MnSOD) [Tang i wsp., 2013] jak i miedziowo-cynkowej (Cu/ZnSOD) [Kong i Fanburg, 1992] w komórkach, polegający na stymulacji wytwarzania tych enzymów. W przypadku Cu/ZnSOD efekt ten był widoczny tylko w komórkach proliferujących [Kong i Fanburg, 1992], co może tłumaczyć fakt, że w niniejszej pracy obserwowano jedynie nieznaczną tendencję wzrostową ilości tego enzymu. Stwierdzono natomiast istotny, zależny od czasu inkubacji wzrost poziomu

zarówno HO-1 jak i MnSOD, co jest zgodne z doniesieniami cytowanych autorów. Ponadto badania Shih i Yang [2010] wykonane z wykorzystaniem komórek śródbłonka mózgu myszy sugerują, że oksygenaza hemowa 1 może hamować ekspresję COX-2 stymulowaną przez LPS, co może być jednym z potencjalnych mechanizmów wyjaśniających spadek poziomu COX-2 po 24 godzinach inkubacji komórek z lipopolisacharydem (por. Ryc. 4.3).

Ocena względnego poziomu reaktywnych form tlenu trzema różnymi metodami nie wykazała jednak żadnych istotnych różnic, także w sytuacji, gdy LPS był podawany do komórek jednocześnie z sondą na pół godziny przed pomiarem, co wykonano w celu uchwycenia ewentualnej natychmiastowej odpowiedzi. Jest to prawdopodobnie związane z dużą aktywnością systemów antyoksydacyjnych w badanych komórkach, utrzymujących niezmienny poziom RFT nawet w warunkach umiarkowanego (nie wpływającego na przeżywalność komórek) stresu wywołanego LPS. Ponadto, w komórkach śródbłonka naczyniowego głównym sposobem przekształcania energii i wytwarzania ATP jest glikoliza [De Bock i wsp., 2013]. Dzięki temu, śródbłonek mający dużą dostępność do tlenu transportowanego przez krew nie zużywa go, a stosunkowo niewielka intensywność metabolizmu tlenowego ogranicza wytwarzanie reaktywnych form tlenu [Wilson i wsp., 2022]. Oksydacyjna fosforylacja jest ważną i ale nie jedyną funkcją mitochondriów we wszystkich typach komórek, w tym także śródbłonkowych. Badania ostatnich lat dowodzą znaczącej roli tych organelli w takich procesach blisko związanych ze śródbłonkiem jak gojenie się ran [Schiffmann i wsp., 2020], transport kwasów tłuszczowych przez ścianę naczyń [Ibrahim i wsp., 2020], angiogeneza [Diebold i wsp., 2019] czy rozkurcz mięśni gładkich tętnic [Wilson i wsp., 2022].

Mitochondria

Jak wspomniano we Wstępie do tej dysertacji, mitochondria są organellami charakteryzującymi się znaczną dynamiką nie tylko w znaczeniu metabolicznym, ale też dotyczącą zmian organizacji przestrzennej w komórce. Ponadto mogą ulegać degradacji na drodze mitofagii lub powstawać *de novo*. Zmiany te zachodzą w warunkach normy, a ich natężenie zmienia się w cyklu komórkowych, a także w odpowiedzi na stan metaboliczny komórki. Co ważne, ekspozycja komórek na czynniki stresujące i toksyczne ma często wpływ na te procesy. Wśród nich opisywany był wpływ LPS na strukturę i funkcję mitochondriów poprzez zaburzenie procesów fuzji/fragmentacji [Forrester i wsp., 2020], oddychania komórkowego [Vuda i wsp., 2011] czy fosforylacji ADP [Han i wsp., 2023]. Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i przedstawionych na rycinie

4.5 wskazują na przejściowo zwiększoną tendencję do fragmentacji oraz perinuklearnej lokalizacji mitochondriów po 6 godzinach inkubacji komórek z LPS. Efekt ten zanikał po 24 godzinach traktowania lipopolisacharydem. To może sugerować aktywację procesów adaptacyjnych komórek HAEC po wczesnej ostrej odpowiedzi na LPS, prowadzących do normalizacji procesu fuzji/fragmentacji mitochondriów. Wyniki badań opisane przez Forrester i wsp. [2020] wskazują na to, że fragmentacja mitochondriów może mieć wpływ na indukcję stanu zapalnego poprzez aktywację VCAM-1 na ścieżce zależnej od NF- κ B. Wyniki przedstawione na rycinie 4.3 F wskazują, że istotne zwiększenie poziomu VCAM-1 obserwowane w 6 godzinie inkubacji z LPS, ulega znacznemu zmniejszeniu po 24 godzinach, co pokrywa się w czasie ze zmianami struktury mitochondriów. Jednak w przypadku ICAM-1 takiej zmiany w czasie nie obserwowano (Ryc. 4.3 E).

Zmianom struktury mitochondriów nie towarzyszyła zmiana ich masy w komórce (patrz Ryc. 4.6). Sugerowałoby to, że procesy biogenezy i degradacji mitochondriów również pozostają w równowadze pomimo zmian architektury sieci mitochondrialnej. Doniesienia literaturowe dotyczące tego zagadnienia różnią się znacznie w zależności od użytego modelu doświadczalnego. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na makrofagach obserwowano wzrost masy mitochondrialnej w odpowiedzi na LPS [Ji i wsp., 2021; Yu i wsp., 2020]. Odmienne wyniki uzyskano natomiast w badaniach bioptatów pochodzących od pacjentów z ostrym uszkodzeniem nerek spowodowanych sepsą, w których stwierdzono istotne obniżenie masy mitochondrialnej [van der Slikke i wsp., 2021]. Z kolei Widdrington i wsp. [2018] nie wykryli żadnych różnic dotyczących masy mitochondriów w monocytach człowieka traktowanych LPS. A zatem wydaje się, że zmiana masy mitochondrialnej pod wpływem stresu jest cechą specyficzną dla określonego typu komórek i zapewne nie jest typowa dla śródbłónka. Frisard i wsp. [2015] opisali wyraźny hamujący wpływ LPS podawanego w bardzo niskim stężeniu (50 pg/ml) na oddychanie mitochondrialne w komórkach mioblastów C2C12 oraz pierwotnych ludzkich miotubach. Efektowi temu towarzyszyło zwiększenie ilości białek antyoksydacyjnych w tym dysmutazy nadmanganowej. Obserwowane zmiany były zapewne skutkiem zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu, gdyż po podaniu antyoksydantów obserwowany efekt ulegał zmniejszeniu. Również w badaniu na komórkach śródbłónka (HUVEC) wykazano niewielki hamujący wpływ LPS podawanego w stężeniu 1 μ g/ml (a więc wyższym niż w niniejszej rozpraw) na szybkość pobierania tlenu. [Frisard i wsp., 2015]. W niniejszej pracy obserwowano jedynie tendencję spadkową wszystkich wyznaczanych parametrów oddychania mitochondrialnego (bazowe, maksymalne, minimalne), jednak bez uzyskania istotności statystycznej. Co ciekawe, wyniki badań opublikowane przez

Karan i wsp. [2020] sugerują, że aktywność kompleksów oddechowych mitochondriów może aktywnie regulować odpowiedź prozapalną komórki na LPS, a nie jedynie ulegać zaburzeniom funkcji w obecności lipopolisacharydu. Sugeruje to interesujący mechanizm sprzężenia zwrotnego, w kompleksowej odpowiedzi komórek na stres.

Metabolity glikolizy i cyklu kwasów trikarboksylowych

Uproszczona (celowana) analiza profilu metabolitów glikolizy i cyklu kwasów trikarboksylowych wskazuje, że traktowanie komórek HAEC LPS powoduje daleko posunięte zmiany wskazujące na początkowe spowolnienie procesów metabolicznych poprzedzających oksydacyjną fosforylację, a następnie przywrócenie ich aktywności (por. ryc. 4.8).

Zmiany te były stosunkowo szybkie, ponieważ istotne obniżenie poziomu większości metabolitów można było zaobserwować już po 0,5 godzinie inkubacji z LPS po czym następował stopniowy powrót do stanu zbliżonego do wyjściowego, co było osiągnięte po ok. 24 godz. Dynamika zmian zawartości mleczanu w komórkach wskazuje na początkowe spowolnienie glikolizy, które stopniowo ustępowało i po 24 godzinach inkubacji z LPS aktywność glikolityczna komórek była większa niż wyjściowa.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki dotyczące metabolizmu energetycznego komórek HAEC traktowanych LPS nie są w pełni zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy obserwowali jednoznaczny wzrost poziomu metabolitów glikolizy i jej nasilenie w odpowiedzi na LPS w komórkach nowotworowych [Zhang i wsp., 2018], monocytach [Lee i wsp., 2019] czy makrofagach [Van den Bossche i wsp., 2015]. Szybka stymulacja glikolizy była także obserwowana w odpowiedzi komórek mikrogleju na LPS [Cheng i wsp., 2021]. Różnice te mogą wynikać zarówno ze specyfiki używanego modelu doświadczalnego jak i stężeń LPS użytych do badania, ponieważ odpowiedzi komórek obserwowane przez Zhang i wsp. [2018] były szczególnie widoczne po zastosowaniu wysokiego stężenia LPS (6 µg/ml). Nieco inne niż przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki były opublikowane przez McGarrity i wsp. [2018], którzy zauważyli jedynie nieznaczny wpływ LPS na metabolity glikolizy w komórkach śródbłonna HUVEC, możliwy do zaobserwowania tylko przy relatywnie wysokim stężeniu LPS (1 µg/ml) albo po wcześniejszej preinkubacji komórek z interferonem. Podobnie w komórkach śródbłonna tętnicy płucnej (PAEC), 24-godzinna inkubacja z LPS prowadziła do wzrostu poziomu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa jednak w cytowanym badaniu nie brano pod uwagę krótszych czasów inkubacji, a zatem potencjalne wcześniejsze zmiany nie mogły być uwidocznione [Xiao i wsp., 2021].

Zmieniający się w czasie profil ilości mleczanu (por. Ryc. 4.9) w komórkach jest zbliżony do zmiany stosunku PEP/pirogronian potwierdzając początkowe wyhamowanie, a następnie stymulację glikolizy. Zmniejszenie aktywności glikolitycznej komórek pod wpływem kilkugodzinnej ekspozycji na LPS jest obserwacją zaskakującą na tle dostępnego piśmiennictwa. Natomiast stymulacja tego szlaku oceniona po 24 godzinach traktowania LPS znajduje potwierdzenie w pracach wielu autorów. Co więcej, kinetyka tej zmiany pokazana w rozprawie, pokrywa się z danymi przedstawionymi przez Lee i wsp. [2019], chociaż nie można wykluczyć, że zbieżność ta jest przypadkowa ze względu na inny rodzaj komórek oraz inne warunki doświadczenia.

Wydaje się, że kluczowym etapem kontrolującym „przepływ” przez szlak glikolizy i w efekcie wpływającym na kinetykę cyklu Krebsa w obecności LPS jest reakcja katalizowana przez kinazę pirogronianową, której izoforma PKM2 jest dominująca w komórkach śródbłoka [Stone i wsp., 2018]. Enzym ten katalizuje ostatnią regulatorową reakcję glikolizy, a jego aktywność jest modyfikowana przez szereg drobnocząsteczkowych aktywatorów i inhibitorów w tym ATP czy acetylo-CoA. Na podstawie uzyskanych wyników można mówić o zmianie aktywności tego enzymu, natomiast nie upoważniają one do dyskusowania ekspresji jego genu czy to na poziomie transkrypty czy białka. Nie jest też jasne jaki mechanizm jest odpowiedzialny za spadek jego aktywności szczególnie w świetle doniesień wskazujących na pro-glikolityczne działanie LPS w różnych rodzajach komórek [Sanginetto i wsp., 2024; Yi i wsp., 2023].

Biorąc pod uwagę dość dużą skalę czasową, wydaje się prawdopodobne, że w komórkach HAEC podobnie jak w makrofagach [Palsson-McDermott i wsp., 2015] LPS powoduje ostatecznie zwiększenie ekspresji genu kinazy pirogronianowej, a w konsekwencji ilości tego enzymu. Oprócz funkcji enzymatycznej w szlaku glikolizy, kinaza pirogronianowa uczestniczy w przeprogramowaniu metabolizmu komórki a także regulacji transkrypcji genów oraz cyklu komórkowego [Yang W. i Lu Z., 2015]. Tę aktywność przypisuje się dimerom kinazy, które po przedostaniu się do jądra komórki regulują aktywność wielu genów, w tym genów związanych ze stanem zapalnym (w makrofagach i mikrogleju) [Alves-Filho i wsp., 2016].

Co więcej, zmieniający się w czasie profil zawartości metabolitów cyklu kwasów trikarboksylowych w komórkach traktowanych LPS, pokrywający się ze zmianami aktywności kinazy pirogronianowej znajduje wsparcie w stwierdzeniu, że deficyt PKM2 zmienia metabolizm mitochondriów i jest związany z deregulacją wielu szlaków, które dostarczają metabolitów dla cyklu TCA, w efekcie wpływając na procesy komórkowe [Stone i wsp., 2018].

Nie jest wykluczone, że względne zmiany (zwiększenie) zawartości metabolitów cyklu Krebsa w komórkach obserwowane w trakcie przedłużonej inkubacji z LPS są konsekwencją reaktywacji kinazy pirogronianowej i przyspieszenia dostarczania pirogronianu dla dehydrogenazy pirogronianowej i dalszych przemian mitochondrialnych. Mitochondrialny metabolizm oksydacyjny pirogronianu jest współregulowany z redukcją tego metabolitu do mleczanu, zachodząca w cytosolu. Ci sami autorzy wskazują na dodatkowe funkcje PKM2, w tym związane z regulacją poziomu S-adenozylometioniny, co może wpływać na metylację różnych substratów w tym składników chromatyny i wpływać na profil ekspresji szeregu genów [Stone i wsp., 2018]. Ten wątek będzie poruszony nieco później.

Badania na makrofagach dowodzą, że metabolity cyklu Krebsa takie jak cytrynian [Ashbrook i wsp., 2015] czy bursztynian [Mills i wsp., 2016] odgrywają kluczową rolę w indukcji stanu zapalnego związanego z odpowiedzią na LPS, a dzieje się tak prawdopodobnie z udziałem kompleksów łańcucha oddechowego i reaktywnych form tlenu. Obniżenie szybkości oddychania komórek HAEC inkubowanych w obecności LPS (por. Ryc. 4.7) przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości metabolitów cyklu Krebsa i utrzymaniu poziomu ATP wynikać może z faktu, że w komórkach śródbłonna oddychanie mitochondrialne i w efekcie tworzenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej są wykorzystywane raczej w innych procesach komórkowych np. sygnalizacji wapniowej i związanej z reaktywnymi formami tlenu, a tylko w małym stopniu na dostarczaniu ATP, które powstaje głównie w czasie glikolizy.

Enzymem ściśle powiązany z regulacją metabolizmu energetycznego komórek jest AMPK. Fan i wsp. [2018] sugerowali, że LPS może obniżać fosforylację w pozycji Thr 172, a tym samym też aktywność AMPK u myszy. Również w badaniu na komórkach śródbłonna EA.hy926 zaobserwowano spadek stopnia ufosforylowania tej kinazy w odpowiedzi na LPS [Sun i wsp., 2017]. Ci sami autorzy wykazali, że aktywacja AMPK poprzez podanie naturalnego flawonoidu hypaforyny (ang. *vaccariae hypaphorine*) powoduje zahamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych w odpowiedzi komórek na LPS. Inni autorzy dowodzą pozytywnego wpływu aktywacji AMPK z użyciem egzogennych aktywatorów w modelu badającym wpływ LPS na śródbłonek, a wśród nich: utrzymanie ciągłości bariery śródbłonkowej [Ange i wsp., 2020; Zhao i wsp., 2014], ograniczenie stanu zapalnego [Tian i wsp., 2019], zapobieganie stresowi siateczki śródplazmatycznej i wytwarzaniu RFT [Hwang i wsp., 2017], obniżenie/normalizację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i fragmentację mitochondriów [Cui i wsp., 2018].

Traktowanie komórek HAEC lipopolisacharydem spowodowało wzrost aktywności AMPK (co potwierdzają także przedstawione wyniki fosforylacji ACC) zarówno po 6 jak i 24

godzinach doświadczenia. Wynik ten może sugerować uruchomienie szlaków prożyciowych w komórkach w odpowiedzi na LPS [Liang i wsp., 2023]. Jako że większość doniesień opisuje hamujący wpływ LPS na AMPK uzyskany wynik stoi w sprzeczności z danymi piśmiennictwa. Nie można jednak wykluczyć, że zbadanie odpowiedzi komórek HAEC na LPS po czasach krótszych niż 6 godzin dałoby pełniejszy obraz zachodzących zmian. Nie bez znaczenia może być też fakt stosowania stosunkowo niskiego stężenia LPS w niniejszych badaniach.

Nieco rzadziej dyskutowanym w kontekście regulacji metabolizmu, lecz przez to szczególnie interesującym białkiem aktywowanym w szeregu zaburzeń z towarzyszącym stanem zapalnym jest NNMT. Wzrost poziomu NNMT opisywany jest przede wszystkim w chorobach nowotworowych, POChP, chorobach wątroby, nadciśnieniu tętniczym i innych [Pissios, 2017]. Aktywacja NNMT związana ze stanem zapalnym wydaje się być zatem niespecyficzna tkankowo, lecz istotna dla przebiegu odpowiedzi komórek na stres. W komórkach HAEC również obserwowano znaczny wzrost poziomu NNMT po podaniu LPS, co pokazuje, że enzym ten uczestniczy w szlakach związanych z odpowiedzią śródbłonna na ten lipopolisacharyd (patrz Ryc. 4.12).

Wpływ LPS na komórki HAEC z wyciszonym genem kodującym NNMT

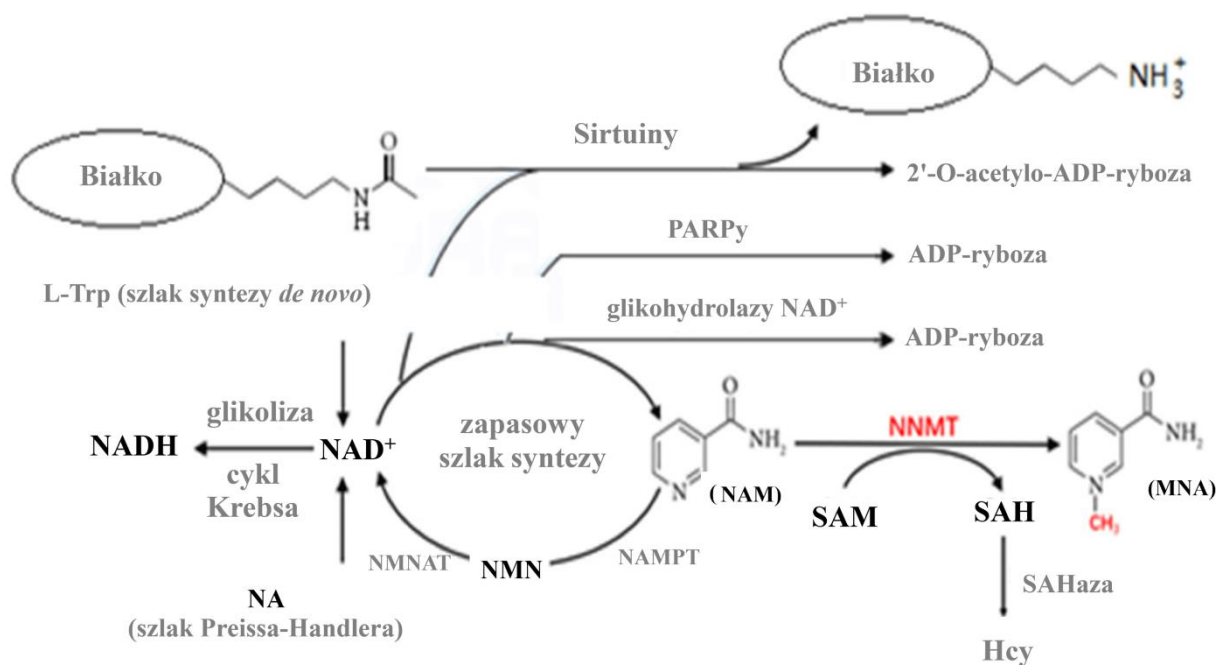
Znaczenie NNMT w śródbłonku podkreślają wyniki badań, w których obniżano ekspresję genu kodującego to białko uzyskując zmniejszenie jego zawartości w komórkach o około 70%. Wyciszanie tego genu było wykorzystywane dotychczas przez innych autorów [Campagna i wsp., 2021]. Alternatywną metodą obniżania aktywności enzymu może być stosowanie inhibitorów tego enzymu [Kannt i wsp., 2021]. Każda z tych metod oprócz zalet ma też swoje wady. Metody polegające na trwałym unieczynnieniu (*knock-down*) genu wymagają dłuższego czasu, a zatem zwiększają możliwość indukcji procesów adaptacyjnych lub nawet selekcję klonów komórek, co może utrudniać interpretację wyników. Natomiast skuteczność, a przede wszystkim specyficzność inhibitorów hamujących aktywność NNMT nie jest wystarczająco dobrze poznana, a wstępne doświadczenia z tymi substancjami przeprowadzone w naszej Pracowni wskazały na ich toksyczność w stosunku do HAEC. Z tego powodu nie stosowano ich w tej pracy. Jako metodę wyciszania ekspresji *NNMT* obrano polegającą na podawaniu odpowiednio dobranego siRNA. Metoda ta jest stosunkowo szybka i łagodna dla komórek, a wybrany odczynnik do transfekcji zawierający *scrambled* siRNA nie miał wpływu na przeżywalność komórek i nie zmieniał znacząco poziomu badanych białek. Natomiast w przypadku badania zawartości wpływu LPS na metabolity metabolitów różnica między odpowiedzią komórek z wyciszonym *NNMT* oraz traktowanych *scrambled* RNA jego wpływ

nie mogła być całkiem pominięta, na co wskazuje porównanie rycin.4.8 i 4.30 (lewa kolumna). Skuteczność wyciszania genu *NNMT* została dodatkowo potwierdzona w badaniu aktywności NNMT. Uzyskany wynik wskazuje, że resztkowa ilość białka NNMT pozostała mimo wyciszania genu nie jest wystarczająca do utrzymania odpowiedniej aktywności enzymu w skali komórki, co w efekcie prowadzi do zmniejszenia wytwarzania nikotynamidu.

Badanie zmian ilości NNMT w rozszerzonej skali czasowej pokazało, że po krótszych czasach inkubacji z LPS (1 godz. i 2 godz.) następuje przejściowe obniżenie poziomu tego białka i po czym odwrócenie takiego trendu i wyraźne zwiększenie ilości NNMT od piątej godziny inkubacji. Profil zmian ilości MNA wydzielonego do pożywki nie jest zgodny ze zmianami ilości białka NNMT w komórkach. Istotny spadek poziomu tego metabolitu widać już po 30 minutach inkubacji i trend ten utrzymuje się aż do piątej godziny włącznie. W szóstej godzinie inkubacji z LPS zanika istotność statystyczna obserwowanej różnicy a po 24 godzinach różnica zanika, a zatem przywracany jest pozornie stan wyjściowy (por. Ryc. 4.15 A i B). Nie można jednak nie zauważyć, że zmiany te są bardzo podobne w komórkach traktowanych siRNA specyficznym dla NNMT jak i *scrambled* RNA. Ta obserwacja, w połączeniu z faktem, że LPS powoduje dodatkowe obniżenie ilości MNA powstającego w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* (por. Ryc. 4.15) wskazuje na to, że LPS prawdopodobnie zmniejsza aktywność tego enzymu mimo zwiększenia ilości białka enzymatycznego. Komórki z wyciszonym genem kodującym NNMT utrzymują niski poziom tego enzymu we wszystkich badanych czasach inkubacji z LPS co pokazuje, że LPS nie wpływa istotnie na wydajność wyciszania genu.

NNMT katalizuje reakcję metylacji NAM, z wytworzeniem MNA. Ta reakcja zmniejsza dostępność NAM dla innych szlaków metabolicznych w tym do resyntezy NAD^+ . W konsekwencji, aktywność NNMT może prowadzić do zmniejszenia ilości NAD^+ w komórce, co może ograniczać metabolizm mitochondriów, zwiększać podatność na stres oksydacyjny, powodować zaburzenia metaboliczne oraz zaburzenia starzenia komórkowego na drodze zależnej od sirtuin [Takahashi i wsp., 2022]. Zdaniem Bockwoldta i wsp. [2019] interakcja pomiędzy NNMT a fosforybozylotransferazą nikotynoamidową (NAMPT) – kluczowym enzymem szlaku syntezy NAD^+ jest odzwierciedleniem “wspólnoty” ewolucyjnej obu białek. Interakcja ta miałaby polegać na usuwaniu nadmiaru nikotynoamidu przez NNMT, co zapobiegałoby akumulacji tego metabolitu i w konsekwencji prowadziłoby do zmniejszenia wytwarzania NAD^+ i w efekcie hamowania szlaków zależnych od tego koenzymu (Rys. 5.1). W niniejszej pracy oszacowano poziom NAD^+ we wszystkich układach doświadczalnych, nie obserwując jednak żadnych różnic w jego poziomie. Jak wspomniano wcześniej, późniejsza

korespondencja z producentem pożywki stosowanej w hodowli komórek HAEC ujawniła, że zawiera ono relatywnie wysokie stężenie nikotynamidu, co nie jest uwzględnione w objętym klauzulą tajności składzie. A zatem, niedobór nikotynamidu jako potencjalnej przyczyny obserwowanych zmian nie może być brany pod uwagę.



Rys. 5.1. Szlak przemian metabolicznych NAD⁺ [w/g Li i wsp., 2024 zmienione]

PARPy – poli-ADP-polimerazy; L-Trp – L-tryptofan; Hcy – homocysteina; SAHaza – hydrolaza S-adenozylu-l-homocysteiny; NMNAT – adenylotransferaza mononukleotydu adeninonikotynowego

W reakcji katalizowanej przez NNMT drugim substratem jest S-adenozylometionina jako donor grup metylowych. Chociaż wpływ NNMT na obniżanie poziomu SAM zależy może od rodzaju komórek jak również i od czynników zewnętrznych, takich jak dieta czy stan metaboliczny komórek, to wielu autorów wskazuje na wyczerpywanie się puli SAM poprzez zwiększenie poziomu/aktywności NNMT [Hong i wsp., 2018; Wang i wsp., 2022; Yang i wsp., 2022]. Ponadto, Hong i wsp. [2018] postulują, że NNMT może wpływać na poziom SAM niezależnie od swojej aktywności enzymatycznej, gdyż nawet wzrost poziomu nieaktywnego enzymu modulował stosunek SAM/SAH w hepatocytach. Autorzy postulują model, w którym NNMT działa jak „rusztowanie”, rekrutując S-metylotransferazę betainowo-homocysteinową (BHMT) oraz adenylotransferazę metioninową 1A (Mat1A). To właśnie zbliżenie się do siebie tych enzymów miałyby być odpowiedzialne za wzmożone przekształcanie SAM do SAH w hepatocytach.

SAM jest uniwersalnym donorem grup metylowych w komórce, co oznacza, że uczestniczy w różnych szlakach metabolicznych, a zatem zmiany jego dostępności mogą mieć przełożenie też na zmiany wzorca metylacji różnych substancji zarówno drobno jak i wielkocząsteczkowych. Udowodniono, że zahamowanie NNMT w komórkach nowotworowych prowadziło do wzrostu stopnia metylacji fosfatazy PP2A [Palanichamy i wsp., 2017], a nadekspresja genu kodującego ten enzym wiązała się z obniżeniem poziomu wspomnianej metylacji [Wang i wsp., 2022], modulując tym samym aktywność PP2A. Biorąc pod uwagę fakt, że PP2A jest nieselektywną fosfatazą, zmiany jej aktywności mogą mieć szeroki wpływ na funkcjonowanie komórek, w tym na ich odpowiedź na czynniki stresogenne [Avelar i wsp., 2024; Elgenaidi i Spiers, 2019]. Zgodnie z oczekiwaniami, wyciszenie *NNMT* w komórkach HAEC powodowało zwiększenia metylacji PP2A (por. Ryc. 4.17B). Jednakże podanie LPS niwelowało ten wpływ, powodując spadek poziomu metylacji PP2A zarówno w komórkach kontrolnych jak i z wyciszonym *NNMT* sugerując, że takie działanie LPS jest dominujące i maskujące w stosunku do wpływu obniżenia poziomu *NNMT* na metylację PP2A (por. Ryc. 4.18B). Podobny efekt opisany była przez He i wsp. [2019] którzy obserwowali zmniejszenie metylacji PP2A w makrofagach traktowanych LPS, co może potwierdzać poprawność przedstawianych w niniejszej pracy wyników chociaż z drugiej strony efekt LPS na metylację PP2A w różnych typach komórek nie jest jednakowy, co pokazują badania różnych autorów [Chuang i wsp., 2015; Elsayed i wsp., 2020; Sun i wsp., 2015]. A zatem, obserwowany w pracy efekt LPS na komórki HAEC nie może być tłumaczony prostym wpływem na aktywność PP2A poprzez zwiększanie poziomu/aktywności NNMT i jak można przypuszczać zmniejszenie dostępności SAM.

Zwiększenie poziomu/aktywności NNMT powodowało także obniżenie stopnia metylacji histonów pociągając za sobą zmiany w ekspresji różnych genów w fibroblastach związanych z nowotworem (o fenotypie CAF) [Eckert i wsp., 2019] a także w nienowotworowych komórkach nabłonka [Li i wsp., 2017]. Podobne efekty uzyskano dla adipocytów gdzie *knock-out NNMT* powodował wzrost metylacji w obrębie histonów 3 i 4 [Kraus i wsp., 2014]. W niniejszej pracy, podobnie jak i w przypadku PP2A, zaobserwowano wzrost poziomu metylacji lizyny 9 histonu 3 po samym wyciszeniu *NNMT*. W tym wypadku jednak, inkubacja z LPS powodowała wzmożenie tej metylacji, a jej wzór był podobny dla komórek kontrolnych i z wyciszonym genem kodującym NNMT, osiągając szczyt po 5 godzinach. Co zaskakujące, w komórkach z wyciszonym *NNMT* odnotowano też nieznaczny spadek poziomu metylacji H3K9 w punktach czasowych 0,5 godz. i 1 godz., który powracał do poziomu wyjściowego, a następnie rósł w czwartej godzinie inkubacji. Wyniki dotyczące

wpływu wyciszenia *NNMT* na globalną metylację białek histonowych i niehistonowych w komórkach HAEC są zatem dość jednoznaczne – obniżenie poziomu tego enzymu prowadzi do zwiększenia metylacji różnych akceptorów grupy metylowej. Efekt ten jest jednak przysłaniany przez wpływ LPS, co sugeruje, że to nie zmiana dostępności donora grup metylowych stoi za udziałem *NNMT* w odpowiedzi komórek na stres związany z LPS, a przynajmniej nie w stopniu zauważalnym i mogącym być uznany za kluczowy.

Oczekiwany brak wpływu wyciszenia genu kodującego *NNMT* i/lub traktowania komórek lipopolisacharydem na zawartość NAD^+ w komórkach oraz niespodziewany spadek metylacji białek w komórkach traktowanych LPS nie pozwalają na proste wytłumaczenie pozytywnych skutków wyciszenia *NNMT* w oparciu o postulowane mechanizmy: regulację dostępu NAD^+ do syntezy NAD^+ oraz zwiększenie stopnia metylacji wybranych białek.

Z drugiej strony, przedstawione wyniki nie pozwalają na całkowite odrzucenie takiej możliwości natomiast skłaniają do zadania pytania, czy wcześniej zidentyfikowane w komórkach skutki podawania LPS są w jakiś sposób powiązane ze zmianami poziomu *NNMT*, czy wydarzenia te są ze sobą niezwiązane funkcjonalnie. Poniżej przedstawione wyniki doświadczeń naświetlają ten problem.

Jak opisano wcześniej, indukcja stanu zapalnego jest jednym z podstawowych markerów działania LPS. Wzrost poziomu ICAM-1 rozpoczynał się już w trzeciej godzinie inkubacji dla komórek kontrolnych, a w czwartej dla komórek z wyciszonym *NNMT* i stopniowo narastał w czasie, osiągając niemal pięciokrotność poziomu wyjściowego po 24 godzinach. W większości badanych punktów czasowych wyraźnie widać tendencję świadczącą o zwiększonej ekspresji ICAM-1 w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* w stosunku do komórek kontrolnych (*scrambled RNA*), jednak ze względu na duże odchylenia standardowe różnice te nie osiągają istotności statystycznej. W komórkach nowotworowych o zwiększonej ekspresji *NNMT* obserwuje się na ogół także zwiększony poziom białek adhezyjnych [Wen i wsp., 2021], w tym ICAM-1 [Rudloff i wsp., 2020]. W kontekście tych badań, uzyskane wyniki wydają się nie do końca spójne, gdyż z jednej strony wraz ze wzrostem poziomu *NNMT* w komórkach kontrolnych dochodziło do wzrostu poziomu ICAM-1, a z drugiej wyciszenie *NNMT* nie niwelowało tego wzrostu, a wręcz wydaje się, że go nasilało. To wskazuje, że związek między zmianą poziomu *NNMT* a pojawianiem się białek adhezyjnych w komórkach HAEC nie jest oczywisty. Być może także w tym przypadku pojawia się efekt maskowania skutków wyciszenia *NNMT* przez globalne działanie LPS. Dodatkowo wydaje się, że w komórkach śródbłonna *NNMT* nie jest czynnikiem bezwzględnie koniecznym do rozwoju stanu zapalnego, choć nie można całkiem wykluczyć jego znaczenia w tym kontekście.

Wzór ekspresji VCAM-1 w odpowiedzi na LPS różni się nieco od obserwowanego dla ICAM-1. Wzrost poziomu tej cząsteczki można zaobserwować już od drugiej godziny inkubacji z LPS zarówno w komórkach kontrolnych jak i z wyciszonym genem *NNMT*. Natężenie tego zjawiska rośnie w czasie, osiągając wartości szczytowe w piątej i szóstej godzinie inkubacji, a następnie spada znacząco po 24 godzinach, nadal jednak przekraczając wyjściowy poziom danego białka. A zatem nie zauważa się wyraźnego trendu, który mógłby różnić odpowiedź na LPS komórek kontrolnych od komórek z wyciszonym genem kodującym *NNMT*.

Zgodnie z oczekiwaniami LPS doprowadził do istotnego wzrostu ilości białka MnSOD zarówno w komórkach kontrolnych (od czwartej godziny) jak i z wyciszonym *NNMT* (od piątej godziny). Największy efekt obserwowano po 24 godzinach inkubacji dla obydwu grup. Ponownie obserwowano tendencję mogącą różnić badane grupy, a mianowicie wzrost poziomu MnSOD w przypadku komórek z wyciszonym *NNMT* wydawał się być wolniejszy i mniej drastyczny niż w przypadku komórek kontrolnych. Zmiany te nie są jednak istotne statystycznie, co podobnie jak i w przypadku ICAM-1 może być spowodowane dużymi odchyleniami standardowymi wynikającymi z charakteru ekspresji danego genu. Prążek dla kontroli jest nikły a zatem trudny do detekcji, podczas gdy inkubacja komórek z LPS powoduje dramatyczne zwiększenie ilości tego białka w komórkach a to sprawia, że ocena względnych zmian jest mało precyzyjna. Wpływ LPS na poziom ICAM, VCAM oraz MnSOD został już wcześniej przedyskutowany w kontekście doniesień literaturowych. Brak jest natomiast dostępnych danych pozwalających przedstawić je tutaj dla porównania znaczenia *NNMT* w aktywacji tych białek.

Odmienne wyniki otrzymano w przypadku profilu ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn-SOD w komórkach traktowanych LPS. Poziom tego enzymu znacząco różnił się w komórkach z wyciszonym genem kodującym *NNMT* w porównaniu z odpowiedzią komórek kontrolnych. W komórkach kontrolnych traktowanych LPS istotny wzrost poziomu Cu/Zn-SOD następował niemal natychmiast (0,5 godz. inkubacji) i utrzymywał się co najmniej do szóstej godziny traktowania LPS po czym powracał do stanu wyjściowego, co oceniano po 24 godzinach. Efekt taki nie występował w komórkach z wyciszonym *NNMT*, a różnice między grupami były istotne statystycznie. Głównym pytaniem odnośnie tych wyników pozostaje jednak czy brak aktywacji Cu/Zn-SOD po wyciszeniu *NNMT* można traktować jako oznakę zmniejszonego stresu oksydacyjnego w tych komórkach czy też ich osłabionego potencjału obronnego.

Pewne przypuszczenia odnośnie tego, które z powyższych stwierdzeń jest prawdziwe pozwala wysnuwać obserwacja pokazująca, że w komórkach z wyciszonym *NNMT* poziom

mitochondrialnych i całkowitych RFT, a także anionorodnika ponadtlenkowego były zdecydowanie obniżone. Co ciekawe, w przypadku traktowania komórek LPS (przez 0,5 godz. inkubacji jednocześnie z sondą) nie obserwowano różnic między grupami ani żadnych innych istotnych zmian poziomu badanych RFT. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że wyciszenie *NNMT* obniża wyjściowy poziom reaktywnych form tlenu w komórkach HAEC, dzięki czemu ewentualne przyspieszenie ich wytwarzania pod wpływem LPS nie powoduje drastycznego zwiększania ich poziomu, a zatem nie wymaga istotnej aktywacji mechanizmów obronnych w postaci enzymów oksydoredukcyjnych jak w przypadku komórek z niezmiennym poziomem *NNMT*. Oznaczałoby to, że wpływ *NNMT* na wytwarzanie reaktywnych form tlenu jest inny w komórkach śródbłonna niż w komórkach nowotworowych, gdzie nadekspresja *NNMT* prowadziła do obniżenia wytwarzania RFT, wspomagając tym samym przeżywalność komórek [Yu i wsp., 2020; Zhang i wsp., 2014].

Mitochondria – organizacja sieci

W pierwszej części podrozdziału Wyniki pokazano, że LPS powodował reorganizację sieci mitochondrialnej zwiększając stopień fragmentacji i udział mitochondriów o lokalizacji okołojądrowej.

Wyraźna różnica w organizacji sieci mitochondrialnej w komórkach kontrolnych (*scrambled* RNA) i z wyciszonym genem *NNMT* jaka pojawia się w trakcie inkubacji z LPS wskazuje na istotną rolę *NNMT* w organizowaniu architektury mitochondriów.

Chociaż organizacja sieci mitochondrialnej w komórkach kontrolnych (*scrambled* RNA) różni się od pokazanej na ryc. 4.5 (komórki wyjściowe nie poddawane procedurze wyciszenia genu), co sugeruje, że sama procedura stwarza sytuację stresową, to w warunkach zmniejszonej ekspresji genu *NNMT* (siRNA) architektura sieci mitochondrialnej w obecności LPS jest wyraźnie inna niż w komórkach traktowanych *scrambled*-RNA. Chociaż powstała rozbieżność komplikuje interpretację uzyskanego obrazu to istota przedstawionego doświadczenia i sedno wyniku pozostają zachowane. Wyciszenie genu *NNMT* zmienia wrażliwość sieci mitochondrialnej na LPS.

Ważną obserwacją jest to, że zmiany organizacji sieci mitochondrialnej współistniały ze zmianami poziomu białek zaangażowanych w procesy fuzji/fragmentacji tych organelli. To potwierdza spójność wyników doświadczeń. Wykazano istotny, nasilający się w czasie i mający swój początek w drugiej godzinie inkubacji z LPS wzrost poziomu białka OPA1 w komórkach kontrolnych, podczas gdy w komórkach z wyciszonym *NNMT* zmian takich nie było, a różnice pomiędzy grupami cechowała istotność statystyczna. Wcześniej Sánchez-

Rodríguez i wsp. [2023] wykazali, że obniżenie poziomu/aktywności NNMT w makrofagach zaburza metabolizm energetyczny komórek i doprowadza do nagromadzenia się metabolitów cyklu kwasów trikarboksylowych. W badaniu Jian i wsp. [2023] LPS znacząco obniżał poziom białka OPA1 w komórkach nabłonka kanalików nerkowych HK-2, co nie znajduje potwierdzenia w niniejszej pracy (por. Ryc. 4.24). Jednakże, cytowani autorzy traktowali komórki LPS w stężeniu 10 µg/ml, co stanowi stulkrotność stężenia używanego tutaj i jak wspomniano wcześniej, może powodować znaczące różnice w odpowiedzi komórek na ten czynnik, aktywując inne szlaki także związane z przeżywalnością komórek.

Zbliżony do opisanego dla OPA1 wzór obecności w komórkach ma też mitofuzyna 1, również będąca GTPazą zaangażowaną w proces fuzji mitochondriów, jednakże zakotwiczona w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [Gao i Hu, 2020]. W przypadku tego białka opisywany był wcześniej negatywny wpływ LPS na jego poziom [Verma i wsp., 2023; Yu i wsp., 2016]. W przeciwieństwie do tych obserwacji w komórkach HAEC obserwowano istotny wzrost poziomu mitofuzyny 1 już po 0,5 godziny inkubacji z LPS, który utrzymywał się aż do 6 godzin włącznie, istotnie obniżając się po 24 godzinach (por. Ryc. 4.25). W komórkach z wyciszonym NNMT nie dochodziło do wzrostu poziomu mitofuzyny1 pod wpływem LPS natomiast zawartość tego białka po 24 godzinach inkubacji ulegała obniżeniu i była porównywalna do obserwowanej w komórkach traktowanych LPS z niewyciszonym NNMT. A zatem efekt wyciszenia genu NNMT po 24-godzinnej inkubacji komórek z LPS był w tym przypadku niedostrzegalny.

Wydaje się, że zwiększanie się w czasie ilości białek OPA1 i mitofuzyny 1 może mieć znaczenie kompensacyjne w stosunku do szybkiej zmiany sieci mitochondrialnej po podaniu LPS, umożliwiające komórkom HAEC przywrócenie wyjściowej architektury sieci mitochondrialnej. W przypadku komórek z wyciszonym NNMT nie dochodzi do uruchamiania takich mechanizmów, a architektura sieci mitochondrialnej pozostaje mniej podatna na zmiany wywołane LPS. Dodatkowo, poziom białka Fis1 pozostaje niezmienny w komórkach z wyciszonym NNMT (obserwowano jedynie nieistotny statystycznie trend spadkowy jego poziomu). Zgodnie z doniesieniami Yu i wsp. [2019], Fis1 indukuje fragmentację mitochondriów poprzez zablokowanie ich fuzji. W komórkach kontrolnych obserwowano jednak podniesiony poziom tego białka po 4, 6 i 24 godzinach inkubacji z LPS. Zważając na to, że 6 godzin jest czasem, w którym zmiany struktury mitochondrialnej spowodowane LPS wydają się największe podniesiony poziom Fis1 w tym punkcie czasowym może nie być przypadkiem. Po 24 godzinach, obserwowano powrót sieci mitochondrialnej (bardziej widoczny w komórkach z wyciszonym genem NNMT) do stanu sprzed inkubacji, co mogłoby

sugerować przywrócenie równowagi między mechanizmami fuzji/fragmentacji być może z przesunięciem tendencji w stronę fuzji. Badano także wpływ LPS i wyciszenia *NNMT* na inne białka związane z przebudową sieci mitochondrialnej, takie jak Drp1, mitofuzyna 2 czy MFF, lecz nie obserwowano żadnych zmian i dlatego nie umieszczono tych wyników w niniejszej rozprawie. Zbliżony efekt działania LPS na mitochondria był opisany wcześniej w makrofagach. Co więcej, był on obserwowany również po 6 godzinach inkubacji z LPS w stężeniu 100 ng/ml, a zatem takim samym jak w przypadku doświadczeń na komórkach HAEC [Kapetanovic i wsp., 2020]. Autorzy ci wykazali, że LPS aktywował ścieżkę sygnalizacyjną prowadzącą do wzmożonego wytwarzania białka Drp1, ściśle związanego z fragmentacją sieci mitochondrialnej. Mimo faktu, że struktura architektura sieci mitochondrialnej komórek wyjściowych oraz komórek kontrolnych (*scrambled*-RNA) nie jest identyczna (Ryc. 4.5 i 4.23) jak również samo wyciszenie genu *NNMT* nie jest bez wpływu na sieć mitochondrialną, nie zmienia to faktu, że w warunkach wyciszenia tego genu odpowiedź na LPS jest “spłaszczona”. Trzymając się zaproponowanej interpretacji nie można jednak nie zastanowić się nad tym co jest efektem pierwotnym: czy w nieobecności *NNMT* wpływ LPS na architekturę mitochondriów jest z jakiegoś powodu niewielki na tyle, że nie dochodzi do zmian ilości białek odpowiedzialnych za fragmentację i fuzję tych organelli, czy też przeciwnie to brak *NNMT* uniemożliwia właściwą odpowiedź (wzrost poziomu/aktywności) tych białek na LPS i dlatego nie obserwuje się zmian architektury a zatem czy wyciszenie daje efekt “korzystny” czy niekorzystny” dla komórki w tym kontekście. Rozwiązanie tej kwestii wymagałoby dodatkowych badań.

Mimo przebudowy mitochondriów, w niniejszej pracy zauważono stosunkowo niewielki wpływ LPS na całkowitą masę mitochondrialną w komórkach HAEC. Około 10% wzrost w 5, 6 i 24-tej godzinach inkubacji w komórkach kontrolnych oraz podobna tendencja wzrostowa, lecz nieosiągająca istotności statystycznej w komórkach z wyciszonym *NNMT*. Wyniki te są do pewnego stopnia zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy obserwują wzrost masy mitochondrialnej w odpowiedzi na LPS, powodowanej wzmożoną biogenezą mitochondriów w różnych modelach komórkowych [Vanasco i wsp., 2014; Yu i wsp., 2020]. Wydaje się jednak, że efekt wyciszenia genu *NNMT* jest w tym kontekście niezauważalny. O dobrej kondycji metabolicznej mitochondriów komórek HAEC traktowanych LPS może świadczyć brak zmian potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Jedynie w komórkach z wyciszonym *NNMT*, w drugiej i trzeciej godzinach inkubacji z LPS można było zaobserwować niewielkie, lecz istotne obniżenie tego parametru. Biorąc pod uwagę fakt, że zależność między szybkością oddychania a potencjałem mitochondrialnym nie jest liniowa

(“nieohmowość”) [Nobes i wsp., 1990] zmiany tej nie można całkowicie zlekceważyć. Dane piśmiennictwa dotyczące wpływu LPS na potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej są sprzeczne – możemy odnaleźć zarówno prace obserwujące wyraźny wpływ [Mills i wsp., 2016] jak i nie wykazujące żadnego efektu [Widdrington i wsp., 2018]. W pracy Mistry i wsp. [2020] pokazano wprawdzie też związek nadekspresji *NNMT* z rozprzęganiem mitochondriów, ale praca ta dotyczy komórek, w których *NNMT* nie jest wytwarzana w warunkach kontrolnych, a zatem wyniki te należy interpretować z rezerwą.

Przedstawione wcześniej wyniki wskazywały, że komórki traktowane LPS mają obniżoną i zmieniającą się w czasie wydolność fosforylacji ATP (mitochondrialna zapasowa pojemność oddechowa). Zmiany te współistnieją z nasileniem reorganizacji sieci mitochondrialnej, ale rzeczywista zależność skutkowo-przyczynowa tych zmian, chociaż prawdopodobna, nie jest oczywista. Natomiast w przypadku komórek z wyciszonym *NNMT* takiej tendencji nie obserwowano, miały one nieznacznie, lecz istotnie podniesiony parametr określający wydajność sprzęgania mitochondriów po 1 i 4 godzinach inkubacji z LPS. Komórki kontrolne (z niezmienną ekspresją *NNMT*) wykazały podobną tendencję, lecz bez istotności statystycznej. W kontekście niniejszej rozprawy interesujące jest to, że nadekspresja genu *NNMT* w komórkach, które nie mają endogennego mRNA dla tego białka, prowadzi do zwiększenia aktywności kompleksu I łańcucha oddechowego i efekt ten jest związany z aktywacją ekspresji genu *Sirtuiny3* [Liu i wsp., 2015]. Wydaje się zatem, że obniżenie, a każdym razie brak stymulacji oddychania mimo zwiększonego poziomu *NNMT* w komórkach kontrolnych traktowanych LPS wskazuje na znaczenie dodatkowych mechanizmów działania LPS, które maskują wpływ *NNMT* na inne procesy.

Metabolity glikolizy i cyklu Krebsa oraz sygnalizacja wapniowa

Interesującym, ale trudno wytłumaczalną obserwacją jest też zdecydowanie złagodzone działanie LPS w komórkach HAEC, w których wyciszono *NNMT*. Trudność interpretacyjna wynika z dwóch faktów. Po pierwsze w komórkach traktowanych *scrambled* RNA odpowiedź na LPS była zmieniona w stosunku do odpowiedzi komórek nie traktowanych żadnymi oligonukleotydami. Po drugie samo wyciszenie genu *NNMT* powodowało zmiany w zawartości metabolitów cyklu Krebsa, ale nie glikolizy (zob. ryc. 4.30). Niemniej obserwowane w kontekście metabolizmu energetycznego efekty wyciszenia genu *NNMT* w połączeniu z odpowiedzią na LPS wpisują się w ogólny obraz wskazujący na to, że obniżenie ekspresji tego genu istotnie zmienia i jak się wydaje osłabia odpowiedź komórek HAEC na LPS.

Nieznaczące wahania w poziomie AMP i ADP w odpowiedzi na LPS nie wydają się być związane z funkcjonalną obecnością NNMT i prawdopodobnie są losowe. Zróżnicowanie w poziomie ATP dla badanych układów doświadczalnych może być natomiast skorelowane z reorganizacją sieci mitochondrialnej [Bernard i wsp., 2007].

Z metabolizmem energetycznym komórek ściśle wiąże się regulacja i dynamika zmian stężenia Ca^{2+} w cytosolu, a także jego zawartość w mitochondriach, siateczce śródplazmatycznej oraz w mniejszym stopniu w innych organellach. Dla komórek kontrolnych napływ pojemnościowy jonów wapnia był istotnie szybszy i bardziej intensywny (stężenie Ca^{2+} w cytosolu osiągało większą wartość maksymalną) w odpowiedzi na LPS, osiągając największe wartości po 24 godzinach. Jest to wynik oczekiwany i będący w zgodzie z aktualnymi danymi piśmiennictwa, gdzie inni autorzy dowodzą, że LPS może aktywować napływ pojemnościowy wapnia w komórkach [Wong i wsp., 2017; Yang i wsp., 2012]. Uważa się, że zaburzenia pojemnościowego napływu wapnia w śródbłonku są związane z indukcją apoptozy powiązaną ze wzmożonym wytwarzaniem nadtlenu wodoru [Tamarelle i wsp., 2006], powstaniem hiperprzepuszczalności bariery śródbłonkowej [Zou i wsp., 2015], zaburzeniem proliferacji komórek [Abdullaev i wsp., 2008] czy nieprawidłową aktywnością kluczowych enzymów takich jak syntaza tlenu azotu [Goligorsky, 2017]. A zatem zaburzenie homeostazy wapniowej w komórkach śródbłonka może mieć kluczowy wpływ na funkcjonowanie zarówno tego narządu jak i całego układu sercowo naczyniowego. W komórkach z wyciszonym NNMT zmiany spowodowane podaniem LPS były zdecydowanie złagodzone. Szybkość napływu pojemnościowego była nieznacznie większa po 6 godzinach inkubacji z LPS, jego intensywność zaś była niższa po 4 godzinach inkubacji. Sugeruje to, że wyciszenie NNMT chroni przed hiperaktywacją napływu pojemnościowego wapnia w komórkach HAEC, co może mieć związek z jego ochronną funkcją na strukturę i funkcjonowanie mitochondriów w tych komórkach. Mechanizm leżący u podłoża tych zmian nie jest znany, ale wpisują się one w ogólny obraz łagodzenia skutków działania LPS przez wyciszenie NNMT.

Procesy komórkowe nie związane bezpośrednio z metabolizmem energetycznym komórek

W dysertacji wskazano na szereg różnych, pozornie niepowiązanych ze sobą procesów komórkowych, których przebieg był zmieniony na skutek traktowania komórek LPS, a efekt tego czynnika był przynajmniej częściowo zmodyfikowany wskutek wyciszenia genu kodującego NNMT. Wśród nich dwu-, a nawet trzykrotny wzrost stopnia ufosforylowania reszty seryny 1177 w cząsteczce eNOS, sugerujący aktywację tego enzymu pod wpływem LPS.

Zrównoważone, czyli zachodzące z prawidłową intensywnością wytwarzanie tlenu azotu jest jednym z głównych zadań śródbłonna natomiast jego nadprodukcja prowadzi do powstawania toksycznych dla komórek reaktywnych form azotu, nadmiernego rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych i zwiększonej przepuszczalności bariery śródbłonna [Cyr i wsp., 2022]. A zatem, normalizacja napływu pojemnościowego jonów wapnia i wytwarzania tlenu azotu może być istotnym mechanizmem obronnym dla komórek HAEC w odpowiedzi na LPS. Podobnie jak i w przypadku napływu pojemnościowego wapnia oraz wielu innych ukazanych w tej pracy efektów, wyciszenie *NNMT* złagodziło wpływ LPS także na fosforylację eNOS. W komórkach tych fosforylacja Ser 1177 jest nasiloną jedynie w ciągu kilku pierwszych godzin inkubacji, ulegając następnie pełnej normalizacji. A zatem, normalizacja napływu pojemnościowego jonów wapnia oraz wytwarzania tlenu azotu może podsuwać koncepcję wykorzystania *NNMT* jako miejsca uchwytu w łagodzeniu odpowiedzi komórek na LPS. Wielorakie wspomniane powyżej konsekwencje zaburzonej sygnalizacji wapniowej w stanie sepsy zostały opisane gdzie indziej, natomiast jedną z konsekwencji nadmiernego wytwarzania NO może być zahamowanie aktywności kompleksu IV łańcucha oddechowego (oksydazy cytochromowej), co prowadzi do zwiększonego wytwarzania RFT [Tengan i Moraes, 2018]. Chociaż w niniejszej pracy nie wskazano dowodu wprost, być może zmniejszenie szybkości oddychania i zwiększenie poziomu metabolitów cyklu TCA w komórkach traktowanych LPS z niezmienną ekspresją *NNMT* jest w jakimś stopniu konsekwencją aktywacji eNOS.

W różnych stanach patologicznych (również w warunkach zaburzonej homeostazy wapniowej) może dochodzić do upośledzania mechanizmów ERAD (ang. endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) lub też ich niewydolności - w takich sytuacjach można mówić o stresie retikulum oraz UPR (ang. unfolded protein response), których głównym markerem jest białko opiekuńcze Grp78 [Wang i wsp., 2009]. Istnieją doniesienia wskazujące, że w warunkach sepsy dochodzi do aktywacji UPR oraz zwiększenia poziomu Grp78 [Li i wsp., 2022]. Wbrew temu, w komórkach kontrolnych HAEC traktowanych LPS zaobserwowano spadek poziomu Grp78 w czasach 2 godz. i 3 godz., a pewna tendencja wzrostowa była zauważalna dopiero po 24 godz. inkubacji. Natomiast komórki z wyciszonym genem *NNMT* zareagowały istotnym statystycznie wzrostem poziomu tego białka już od pierwszej godziny, szczególnie nasilonym jednak po dłuższych czasach inkubacji z LPS (4 godz.-24 godz.). A zatem można pokusić się o stwierdzenie, że wyciszenie genu *NNMT* prowadzi do wzmożonej aktywacji szlaku UPR w odpowiedzi na LPS, co może być przykładem pozytywnego wpływu tego enzymu na komórki HAEC.

Podobny wzór ekspresji w komórkach z wyciszonym *NNMT* zauważono w przypadku białka ATF4, należącego do jednej ze ścieżek sygnałowych pośrednio aktywowanych przez Grp78. Poziom ATF4 wzrastał już po 1 godzinie inkubacji z LPS i utrzymywał się do 24 godz. W komórkach kontrolnych istotny wzrost odnotowano jedynie w początkowych godzinach inkubacji i był on wyraźnie słabszy w porównaniu do komórek z wyciszonym *NNMT*, co świadczy na korzyść postawionej powyżej koncepcji. Aktywacja ATF4 może prowadzić z kolei do aktywacji kolejnych ścieżek pozwalających komórkom na radzenie sobie ze stresem, takich jak autofagia.

Do aktywacji ATF4 konieczne jest ufosforylowane białko eIF2 α , które ma zdolność globalnego ograniczania translacji, a przez to ograniczania powstawania i nagromadzanie się nieprawidłowo sfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej. Jednakże, w tym przypadku otrzymano wynik, który wydaje się niespójny z wcześniejszymi, ponieważ wzrost ufosforylowania eIF2 α obserwowano w komórkach kontrolnych po traktowaniu LPS przez 2 godz.-5 godz., natomiast w komórkach z wyciszonym *NNMT* wystąpił on jedynie po 24 godz. inkubacji. Może to również świadczyć o upośledzeniu możliwości aktywacji ATF4 w komórkach kontrolnych, a tym samym o mniej wydajnym „radzeniu sobie” tych komórek ze stresem. Ponadto, aktywacja szlaku UPR jest procesem wieloetapowym a ostateczny rezultat jest wypadkową zmian cząstkowych, które nie zawsze muszą następować synchronicznie „w tym samym kierunku”.

Nieprawidłowo przebiegający mechanizm UPR prowadzi do wzmożonego powstawania reaktywnych form tlenu i w ostateczności do śmierci komórki na drodze apoptozy. Ratunkiem może być w tej sytuacji jądrowy czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2 - Nrf2, który aktywuje procesy obniżające stres oksydacyjny spowodowany RFT [Park i wsp., 2016]. Aktywację Nrf2 zaobserwowano w komórkach kontrolnych już po 1 godzinie inkubacji z LPS i zwiększała się w czasie by następnie osiągnąć poziom wyjściowy po 24 godzinach inkubacji. W komórkach z wyciszonym genem *NNMT* nie obserwowano tendencji wzrostowej poziomu tego białka, a jedynie jego niewielkie przejściowe obniżenie w okresie 4 godz. - 6 godz.

Park i wsp. [2016] wykazali także, że aktywacji Nrf2 w odpowiedzi na zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu spowodowane upośledzonym mechanizmem usuwania nieprawidłowo sfałdowanych białek pośredniczy białko p62. Profil pojawiania się tego białka przedstawiony w niniejszej rozprawie był niemal identyczny jak dla Nrf2 – istotny wzrost w przedziale 1 godz.-24 godz. dla komórek kontrolnych i brak obserwowanych efektów w komórkach wyciszonych, co pozwala postawić hipotezę o jego zaangażowaniu w wyżej

wymieniony proces. Ustalenie związku przyczynowo-skutkowego w tym wypadku może być jednak zatrudnione, gdyż zgodnie z doniesieniami innych autorów, Nrf2 również może wpływać pozytywnie na ekspresję p62 [Wu i wsp., 2020], prawdopodobny jest więc tu mechanizm wzajemnego dodatniego wpływu na siebie obydwu białek na zasadzie sprzężenia zwrotnego.

Akumulacja p62 może także świadczyć o upośledzeniu przebiegu autofagii [Kumar i wsp., 2022]. W komórkach HAEC zaobserwowano podobną odpowiedź na LPS dotyczącą białek LC3-II a/b oraz bekliny 1 zarówno w modelu z wyciszonym genem *NNMT* jak i w komórkach z niezmienną jego ekspresją. Wzrost poziomu obu białek świadczy o prawidłowej indukcji procesu autofagii w odpowiedzi na LPS. Natomiast zwiększenie poziomu ATG3 i ATG16L pod wpływem LPS obserwowano jedynie w komórkach z niezmienną ekspresją *NNMT* podczas gdy w komórkach z wyciszonym *NNMT* zawartość obu białek wykazywała tendencję spadkową. Obserwacje te mogą być istotne w kontekście publikacji, w której pokazano, że nadekspresja genu kodującego *ATG16L* i zwiększenie poziomu tego białka może hamować powstawanie autofagosomu [Fujita i wsp., 2008], natomiast nadmiar ATG3 uwrażliwia komórki na apoptozę oraz śmierć na drodze autofagii [Wang i wsp., 2015; Zhuang i wsp., 2016; Yoo i wsp., 2015]. Zawartość pozostałych białek związanych z autofagią testowanych w niniejszej rozprawie wydaje się niezmienną wskutek podania komórkom LPS bez względu na ekspresję genu *NNMT* lub jego wyciszenie, dlatego też nie pokazano tych wyników.

Upośledzenie autofagii w komórkach traktowanych LPS z niezmienną ekspresją genu *NNMT* znajduje dodatkowe potwierdzenie w obserwacji wskazującej na szczególne nagromadzenie się organelli, o odczynie kwasowym takich jak lizosomy oraz autolizosomy (ryc. 4.42). Efekt ten był szczególnie widoczny po 6 i 24 godzinach. W komórkach z wyciszonym genem *NNMT* zmiana taka wydaje się znacznie mniej zauważalna, ale ostateczne rozstrzygnięcie tej kwestii wymaga większej liczby doświadczeń i odpowiedniej analizy ilościowej. Zgodnie z doniesieniami innych autorów akumulacja autofagosomów może leżeć u podstaw niektórych chorób neurodegeneracyjnych, a badania *in vitro* wykazały jej toksyczność dla komórek wraz z obniżeniem ich przeżywalności [Button i wsp., 2017].

Zgromadzone w rozprawie wyniki wskazują na to, że traktowanie komórek HAEC lipopolisacharydem zmienia cały szereg mniej lub bardziej powiązanych ze sobą procesów komórkowych. Obserwacje te często mają swoje potwierdzenie we wcześniejszych publikacjach a ich nowatorstwo wynika z faktu wskazania nie opisywanych wcześniej nowych aspektów działania LPS znanych śródbłonku. Natomiast zwiększenie wytwarzania *NNMT* w

takich warunkach przez komórki śródbłonna nie ma swojego piśmiennictwa. Jeszcze bardziej nieoczekiwane i nigdy wcześniej nieopisane było wykazanie, że wyciszenie genu *NNMT* w komórkach HAEC zdecydowanie wpływa na odpowiedź na LPS, a najczęściej ją zmniejsza. Znaczenie jakie przypisuje się *NNMT* w komórkach w kontekście ich metabolizmu polega na regulacji wytwarzania NAD^+ , co może mieć istotne znaczenie dla przebiegu procesów energetycznych w komórkach oraz regulacji dostępu SAM, co może mieć znaczenie na każdym poziomie funkcjonowania komórek poprzez kontrolowanie przebiegu wielu reakcji metylacji. W niniejszej rozprawie pierwszy mechanizm nie był brany pod uwagę ze względu na nieograniczony dostęp nikotynamidu dla komórek, a nieznaczne zwiększenie poziomu NAD^+ w komórkach z wyciszonym genem *NNMT* nie jest istotne przynajmniej statystycznie. Natomiast drugi mechanizm został potwierdzony. Wyciszenie *NNMT* sprzyjało metylacji wybranych białek. Jednakże, nakładający się na ten efekt nieznany co do specyficzności wpływ samego LPS uniemożliwił wiarygodną interpretację uzyskanego wyniku. Dlatego dostarczone w pracy obserwacje nie mają satysfakcjonującego wyjaśnienia mechanistycznego. Uzyskanie takiego wyjaśnienia może być trudne biorąc pod uwagę bardzo rozbudowany interaktom *NNMT*, a w konsekwencji możliwość wpływania tego enzymu na bardzo wiele pozornie niezwiązanych ze sobą procesów [Roberti i wsp., 2021; Wang i wsp., 2022]. W skrajnej sytuacji nie można wykluczyć, że wyciszenie genu *NNMT* zmniejsza aktywność receptora lub ścieżki sygnałowej dla LPS, tłumacząc wieloaspektowe osłabienie działania LPS. Z drugiej jednak strony wzrost poziomu ATF4 i Grp78 w komórkach z wyciszonym *NNMT* traktowanych LPS nie potwierdzają tej hipotezy. To sprawia, że wyniki zgromadzone w dysertacji raczej zachęcają do dalszych poszukiwań niż zaspokajają ciekawość.

6. PODSUMOWANIE

Badając wpływ lipopolisacharydu na ludzkie komórki śródbłonna aorty (HAEC) i koncentrując się głównie, ale nie wyłącznie na parametrach związanych z mitochondriami i metabolizmem energetycznym i wykazano, że:

1. Inkubacja komórek HAEC z LPS podanym w stężeniu 100 ng/ml indukowała odpowiedź prozapalną, ale nie miała wpływu na przeżywalność.

2. LPS nie powodował zwiększenia ilości RFT w komórkach, co nie wyklucza ich szybszego wytwarzania i bardziej efektywnej neutralizacji przy udziale dysmutaz ponadtlenkowych, których zawartość w komórkach była w tych warunkach podwyższona.

3. Sześciogodzinna inkubacja HAEC z LPS prowadziła do fragmentacji sieci mitochondrialnej oraz okołojądrowej lokalizacji mitochondriów, nie wpływając istotnie na masę mitochondrialną. Efekty te ulegały spontanicznemu cofnięciu po wydłużeniu czasu traktowania LPS.

4. LPS wywoływał przejściowe zmiany w metabolizmie energetycznym komórek HAEC w tym:

- a) Obniżenie niektórych parametrów oddychania mitochondrialnego
- b) Zmniejszenie zawartości metabolitów glikolizy i mleczanu w komórkach
- c) Spadek zawartości metabolitów cyklu kwasów trikarboksylowych

Różnice te malały bądź zanikały całkowicie po 24 godz. inkubacji.

5. LPS powodował wzmożoną aktywację AMPK oraz zwiększenie ilości białka NNMT w komórkach HAEC. Oba enzymy mają istotny wpływ na metabolizm komórek.

NNMT katalizuje reakcję, która leży na styku regulacji procesów metabolicznych oraz modulacji ekspresji genów, a zatem jej udział w regulacji metabolizmu i funkcji komórek jest szczególnie istotny. Co więcej, metabolity związane przetwarzaniem nukleotydów nikotynoamidoadeninowych, których stężenie może zależeć od dostępności nikotynamidu mają szczególne znaczenie śródbłonkowe. I wreszcie współwystępowanie zwiększonego poziomu NNMT oraz zmian metabolizmu komórek śródbłonna w obecności LPS sprawiają, że w drugiej części niniejszej pracy skupiono się na badaniu potencjalnego udziału NNMT w odpowiedzi metabolicznej komórek HAEC na LPS.

Wykazano, że:

1. Wyciszenie genu *NNMT* w sposób istotny powodowało obniżenie wyjściowego poziomu RFT w komórkach HAEC w stosunku do komórek kontrolnych (*scrambled RNA*).

2. W komórkach z wyciszonym genem *NNMT* stwierdzono:

a) Różnice w dynamice zmian architektury sieci mitochondrialnej komórek traktowanych LPS stosunku do obserwowanej w komórkach kontrolnych (*scrambled RNA*)

b) Zasadnicze zmniejszenie stymulującego efektu LPS na zawartość niektórych białek związanych z dynamiką mitochondriów

c) Wyraźne zmniejszenie stymulującego efektu LPS na zawartość dysmutazy miedziowo/cynkowej

d) Zmniejszenie negatywnego wpływu LPS na wielkość zapasowej pojemności oddechowej

e) Przyspieszenie powrotu do stanu początkowego profilu metabolitów glikolizy i cyklu Krebsa zmienionych pod wpływem LPS oraz zapobieżenie nadmiernemu obniżeniu poziomu ATP

f) Ograniczenie pojemnościowego napływu jonów wapnia, przyspieszenie powrotu do stanu wyjściowego stopnia fosforylacji eNOS

g) Modyfikację profilu białek związanych z autofagią i UPR, zmienionego pod wpływem LPS oraz ograniczenie tworzenia się organelli o odczynie kwaśnym w komórkach traktowanych LPS

7. WNIOSKI

1. Zmiany zachodzące w komórkach śródbłonka (HAEC) traktowanych lipopolisacharydem podawanym w stosunkowo niskim stężeniu, nie wystarczającym do zmniejszenia przeżywalności, są w dużym stopniu odwracalne, co sugeruje aktywację procesów adaptacyjnych
2. Zwiększenie ilości NNMT w komórkach HUVEC inkubowanych z LPS oraz złagodzenie odpowiedzi metabolicznej na lipopolisacharyd w komórkach ze zmniejszoną ekspresją genu *NNMT* wskazuje, że NNMT jest istotnym elementem złożonej reakcji badanych komórek na ten czynnik, przynajmniej w kontekście metabolizmu energetycznego komórek.
3. Choć wyciszenie genu *NNMT* zwiększa stopień metylacji białek uznanych tutaj za markerowe, to rzeczywisty sposób działania *NNMT* w komórkach traktowanych LPS jest trudny do ustalenia ze względu na jego maskowanie działaniem lipopolisacharydu.
4. Uzyskane wyniki sugerują, że farmakologiczna modulacja (zmniejszenie) aktywności *NNMT* mogłaby mieć znaczenie w złagodzeniu (niektórych) zmian metabolizmu komórek śródbłonka związanych z sepsą. Warunkiem jest stworzenie odpowiednio specyficznych substancji (inhibitorów) niemających właściwości toksycznych.

8. PIŚMIENICTWO

1. A Avelar, R., Gupta, R., Carvette, G., da Veiga Leprevost, F., Jasti, M., Colina, J., Teitel, J., Nesvizhskii, A. I., O'Connor, C. M., Hatzoglou, M., Shenolikar, S., Arvan, P., Narla, G., & DiFeo, A. (2024). Integrated stress response plasticity governs normal cell adaptation to chronic stress via the PP2A-TFE3-ATF4 pathway. *Cell death and differentiation*, 10.1038/s41418-024-01378-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41418-024-01378-3>
2. Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., & Trebak, M. (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circulation research*, 103(11), 1289–1299. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000338496.95579.56>
3. Agnello, M., Morici, G., & Rinaldi, A. M. (2008). A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*, 56(3), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9143-2>
4. Ai, L., Rouhanizadeh, M., Wu, J. C., Takabe, W., Yu, H., Alavi, M., Li, R., Chu, Y., Miller, J., Heistad, D. D., & Hsiai, T. K. (2008). Shear stress influences spatial variations in vascular Mn-SOD expression: implication for LDL nitration. *American journal of physiology. Cell physiology*, 294(6), C1576–C1585. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00518.2007>
5. Akar, S., Harmankaya, İ., Uğraş, S., & Çelik, Ç. (2019). Nicotinamide N-methyltransferase expression and its association with phospho-Akt, p53 expression, and survival in high-grade endometrial cancer. *Turkish journal of medical sciences*, 49(5), 1547–1554. <https://doi.org/10.3906/sag-1907-166>
6. Akarasereenont, P., Bakhle, Y. S., Thiemermann, C., & Vane, J. R. (1995). Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. *British journal of pharmacology*, 115(3), 401–408. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb16347.x>
7. Aksoy, S., Szumlanski, C. L., & Weinshilboum, R. M. (1994). Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *The Journal of biological chemistry*, 269(20), 14835–14840.

8. Allingham, M. J., van Buul, J. D., & Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(6), 4053–4064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4053>
9. Al-Shabany, A. J., Moody, A. J., Foey, A. D., & Billington, R. A. (2016). Intracellular NAD⁺ levels are associated with LPS-induced TNF- α release in pro-inflammatory macrophages. *Bioscience reports*, 36(1), e00301. <https://doi.org/10.1042/BSR20150247>
10. Alston, T. A., & Abeles, R. H. (1988). Substrate specificity of nicotinamide methyltransferase isolated from porcine liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 260(2), 601–608. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90487-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90487-0)
11. Alves-Filho, J. C., & Pålsson-McDermott, E. M. (2016). Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. *Frontiers in immunology*, 7, 145. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00145>
12. An W. (2007). Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation. *Sub-cellular biochemistry*, 41, 351–369.
13. Angé, M., Castanares-Zapatero, D., De Poortere, J., Dufey, C., Courtoy, G. E., Bouzin, C., Quarek, R., Bertrand, L., Beauloye, C., & Horman, S. (2020). α 1AMP-Activated Protein Kinase Protects against Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Barrier Disruption via Junctional Reinforcement and Activation of the p38 MAPK/HSP27 Pathway. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5581. <https://doi.org/10.3390/ijms21155581>
14. Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*, 369(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
15. Ashbrook, M. J., McDonough, K. L., Pituch, J. J., Christopherson, P. L., Cornell, T. T., Selewski, D. T., Shanley, T. P., & Blatt, N. B. (2015). Citrate modulates lipopolysaccharide-induced monocyte inflammatory responses. *Clinical and experimental immunology*, 180(3), 520–530. <https://doi.org/10.1111/cei.12591>
16. Bacon, C. R., Cary, N. R., & Davenport, A. P. (1995). Distribution of endothelin receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 26 Suppl 3, S439–S441.

17. Bar, A., Olkowicz, M., Tyrankiewicz, U., Kus, E., Jasinski, K., Smolenski, R. T., Skorka, T., & Chlopicki, S. (2017). Functional and Biochemical Endothelial Profiling *In Vivo* in a Murine Model of Endothelial Dysfunction; Comparison of Effects of 1-Methylnicotinamide and Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor. *Frontiers in pharmacology*, 8, 183. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00183>
18. Bardin M. (2022). Lipid mediators of the resolution of inflammation in vascular ageing. *Human health and pathology, Université de Lorraine, 2022*
19. Bartuś, M., Łomnicka, M., Kostogryś, R. B., Kaźmierczak, P., Watała, C., Słominska, E. M., Smoleński, R. T., Pisulewski, P. M., Adamus, J., Gebicki, J., & Chlopicki, S. (2008). 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacological reports: PR*, 60(1), 127–138.
20. Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., & Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science*, 120(Pt 5), 838–848. <https://doi.org/10.1242/jcs.03381>
21. Bunting, S., Moncada, S., & Vane, J. R. (1983). The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *British medical bulletin*, 39(3), 271–276. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071832>
22. Button, R. W., Roberts, S. L., Willis, T. L., Hanemann, C. O., & Luo, S. (2017). Accumulation of autophagosomes confers cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 292(33), 13599–13614. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782276>
23. Caja, S., & Enríquez, J. A. (2017). Mitochondria in endothelial cells: Sensors and integrators of environmental cues. *Redox biology*, 12, 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.021>
24. Campagna, R., Salvolini, E., Pompei, V., Pozzi, V., Salvucci, A., Molinelli, E., Brisigotti, V., Sartini, D., Campanati, A., Offidani, A., & Emanuelli, M. (2021). Nicotinamide N-methyltransferase gene silencing enhances chemosensitivity of melanoma cell lines. *Pigment cell & melanoma research*, 34(6), 1039–1048. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12993>
25. Cantoni G. L. (1951). Methylation of nicotinamide with soluble enzyme system from rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 189(1), 203–216.
26. Cantoni G.L. (1952). The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosine triphosphate 1,2. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 2942–2943.

27. Chang, X., Zhang, T., Liu, D., Meng, Q., Yan, P., Luo, D., Wang, X., & Zhou, X. (2021). Puerarin Attenuates LPS-Induced Inflammatory Responses and Oxidative Stress Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells through Mitochondrial Quality Control. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 6659240. <https://doi.org/10.1155/2021/6659240>
28. Chappell, D., Westphal, M., & Jacob, M. (2009). The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Current opinion in anaesthesiology*, 22(2), 155–162. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e328328d1b6>
29. Chapter 7 - Fluorescence-Based Detection and Quantification of Features of Cellular Senescence Sohee Cho, Eun SeongHwang *Methods in Cell Biology* Volume 103, 2011, Pages 149-188
30. Chelazzi, C., Villa, G., Mancinelli, P., De Gaudio, A. R., & Adembri, C. (2015). Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. *Critical care (London, England)*, 19(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0741-z>
31. Chen, H., Xie, K., Han, H., Li, Y., Liu, L., Yang, T., & Yu, Y. (2015). Molecular hydrogen protects mice against polymicrobial sepsis by ameliorating endothelial dysfunction via an Nrf2/HO-1 signaling pathway. *International immunopharmacology*, 28(1), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.034>
32. Chlopicki, S., Swies, J., Mogielnicki, A., Buczko, W., Bartus, M., Lomnicka, M., Adamus, J., & Gebicki, J. (2007). 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. *British journal of pharmacology*, 152(2), 230–239. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707383>
33. Chuang, Y. F., Chen, M. C., Huang, S. W., Hsu, Y. F., Ou, G., Tsai, Y. J., & Hsu, M. J. (2015). Protein Phosphatase 2A in Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Murine Lymphatic Endothelial Cells. *PloS one*, 10(8), e0137177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137177>
34. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., & Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10), 3527–3561.

35. Craige, S. M., Kant, S., & Keaney, J. F., Jr (2015). Reactive oxygen species in endothelial function - from disease to adaptation - *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, 79(6), 1145–1155. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0464>
36. Cui, J., Li, Z., Zhuang, S., Qi, S., Li, L., Zhou, J., Zhang, W., & Zhao, Y. (2018). Melatonin alleviates inflammation-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via suppression of Ca²⁺-XO-ROS-Drp1-mitochondrial fission axis by activation of AMPK/SERCA2a pathway. *Cell stress & chaperones*, 23(2), 281–293. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0841-6>
37. Cui, Y., Zhang, L., Wang, W., Ma, S., Liu, H., Zang, X., Zhang, Y., & Guan, F. (2019). Downregulation of nicotinamide N-methyltransferase inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma via Wnt/ β -catenin pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 460(1-2), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03573-0>
38. Culic, O., Gruwel, M. L., & Schrader, J. (1997). Energy turnover of vascular endothelial cells. *The American journal of physiology*, 273(1 Pt 1), C205–C213. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.1.C205>
39. Cuomo, R., Dattilo, M., Pumpo, R., Capuano, G., Boselli, L., & Budillon, G. (1994). Nicotinamide methylation in patients with cirrhosis. *Journal of hepatology*, 20(1), 138–142. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(05\)80480-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(05)80480-5)
40. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical care clinics*, 36(2), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>
41. Dang W. (2014). The controversial world of sirtuins. *Drug discovery today. Technologies*, 12, e9–e17. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.003>
42. Dayang, E. Z., Plantinga, J., Ter Ellen, B., van Meurs, M., Molema, G., & Moser, J. (2019). Identification of LPS-Activated Endothelial Subpopulations With Distinct Inflammatory Phenotypes and Regulatory Signaling Mechanisms. *Frontiers in immunology*, 10, 1169. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01169>
43. De Bock, K., Georgiadou, M., & Carmeliet, P. (2013). Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell metabolism*, 18(5), 634–647. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.001>

44. De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L. K., Betz, I., Tembuysen, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., Decimo, I., ... Carmeliet, P. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154(3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.037>
45. de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., & Vane, J. R. (1988). Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9797–9800. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9797>
46. Debigaré, R., Maltais, F., Côté, C. H., Michaud, A., Caron, M. A., Mofarrahi, M., Leblanc, P., & Hussain, S. N. (2008). Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1080/15412550801940457>
47. Desler, C., Hansen, T. L., Frederiksen, J. B., Marcker, M. L., Singh, K. K., & Juel Rasmussen, L. (2012). Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging?. *Journal of aging research*, 2012, 192503. <https://doi.org/10.1155/2012/192503>
48. Dickson, K., & Lehmann, C. (2019). Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4341. <https://doi.org/10.3390/ijms20184341>
49. Diebold, L. P., Gil, H. J., Gao, P., Martinez, C. A., Weinberg, S. E., & Chandel, N. S. (2019). Mitochondrial complex III is necessary for endothelial cell proliferation during angiogenesis. *Nature metabolism*, 1(1), 158–171. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0011-x>
50. Doerflinger, M., Reljic, B., Menassa, J., Nedeva, C., Jose, I., Faou, P., Mackiewicz, L., Mansell, A., Pellegrini, M., Hotchkiss, R., & Puthalakath, H. (2021). Circulating BiP/Grp78 is a novel prognostic marker for sepsis-mediated immune cell death. *The FEBS journal*, 288(6), 1809–1821. <https://doi.org/10.1111/febs.15552>
51. Dolmatova, E. V., Wang, K., Mandavilli, R., & Griendling, K. K. (2020). The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. *Cardiovascular research*, cvaa070. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa070>

52. Dranka, B. P., Hill, B. G., & Darley-USmar, V. M. (2010). Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*, 48(7), 905–914. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.015>
53. Durand, M. J., & Gutterman, D. D. (2013). Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 20(3), 239–247. <https://doi.org/10.1111/micc.12040>
54. Eckert, M. A., Coscia, F., Chryplewicz, A., Chang, J. W., Hernandez, K. M., Pan, S., Tienda, S. M., Nahotko, D. A., Li, G., Blaženović, I., Lastra, R. R., Curtis, M., Yamada, S. D., Perets, R., McGregor, S. M., Andrade, J., Fiehn, O., Moellering, R. E., Mann, M., & Lengyel, E. (2019). Proteomics reveals NNMT as a master metabolic regulator of cancer-associated fibroblasts. *Nature*, 569(7758), 723–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1173-8>
55. Elgenaidi, I. S., & Spiers, J. P. (2019). Regulation of the phosphoprotein phosphatase 2A system and its modulation during oxidative stress: A potential therapeutic target?. *Pharmacology & therapeutics*, 198, 68–89. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.011>
56. Fan, K., Lin, L., Ai, Q., Wan, J., Dai, J., Liu, G., Tang, L., Yang, Y., Ge, P., Jiang, R., & Zhang, L. (2018). Lipopolysaccharide-Induced Dephosphorylation of AMPK-Activated Protein Kinase Potentiates Inflammatory Injury via Repression of ULK1-Dependent Autophagy. *Frontiers in immunology*, 9, 1464. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01464>
57. FitzGerald G. A. (1991). Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American journal of cardiology*, 68(7), 11B–15B. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(91\)90379-y](https://doi.org/10.1016/0002-9149(91)90379-y)
58. Fleming, I., & Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 284(1), R1–R12. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2002>
59. Fleming, I., Bauersachs, J., & Busse, R. (1996). Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Molecular and cellular biochemistry*, 157(1-2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/BF00227892>

60. Forrester, S. J., Preston, K. J., Cooper, H. A., Boyer, M. J., Escoto, K. M., Poltronetti, A. J., Elliott, K. J., Kuroda, R., Miyao, M., Sesaki, H., Akiyama, T., Kimura, Y., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2020). Mitochondrial Fission Mediates Endothelial Inflammation. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 76(1), 267–276. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686>
61. Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
62. Frisard, M. I., Wu, Y., McMillan, R. P., Voelker, K. A., Wahlberg, K. A., Anderson, A. S., Boutagy, N., Resendes, K., Ravussin, E., & Hulver, M. W. (2015). Low levels of lipopolysaccharide modulate mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(3), 416–427. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.11.007>
63. Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, 19(5), 2092–2100. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1257>
64. Ganji, S. H., Kukes, G. D., Lambrecht, N., Kashyap, M. L., & Kamanna, V. S. (2014). Therapeutic role of niacin in the prevention and regression of hepatic steatosis in rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(4), G320–G327. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00181.2013>
65. Gao, S., & Hu, J. (2021). Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. *Trends in cell biology*, 31(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.008>
66. Garcia, D., & Shaw, R. J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Molecular cell*, 66(6), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.032>
67. García-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., & Sessa, W. C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392(6678), 821–824. <https://doi.org/10.1038/33934>
68. Garedew A., Hütter E., Haffner B., Gradl P., Gradl L., Jansen-Dürr P. & Gnaiger E. (2005). High-resolution Respirometry for the Study of Mitochondrial Function in Health and Disease. The OROBOROS Oxygraph-2k. *11th Congress of the European-Shock-Society* Volume: 23

69. Gebicki, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Adamus, J., Woźniacka, A., Rybak, M., & Zielonka, J. (2003). 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Polish journal of pharmacology*, 55(1), 109–112.
70. Giorgi, C., Marchi, S., & Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(11), 713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
71. Gnaiger, E., Boushel, R., Søndergaard, H., Munch-Andersen, T., Damsgaard, R., Hagen, C., Díez-Sánchez, C., Ara, I., Wright-Paradis, C., Schrauwen, P., Hesselink, M., Calbet, J. A., Christiansen, M., Helge, J. W., & Saltin, B. (2015). Mitochondrial coupling and capacity of oxidative phosphorylation in skeletal muscle of Inuit and Caucasians in the arctic winter. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 25 Suppl 4, 126–134. <https://doi.org/10.1111/sms.12612>
72. Goligorsky M. S. (2017). Vascular endothelium in diabetes. *American journal of physiology. Renal physiology*, 312(2), F266–F275. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00473.2016>
73. Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 65(2-3), 45–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
74. Gratton, J. P., Fontana, J., O'Connor, D. S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T. J., & Sessa, W. C. (2000). Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 22268–22272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001644200>
75. Green, S., Buttrum, S., Molloy, H., Steventon, G., Sturman, S., Waring, R., Pall, H. & Williams, A. (1991). N-methylation of pyridines in Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 338(8759), 120–121. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90113-4](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90113-4)
76. Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260(6), 3440–3450.
77. Gül, F., Arslantaş, M. K., Cinel, İ., & Kumar, A. (2017). Changing Definitions of Sepsis. *Turkish journal of anaesthesiology and reanimation*, 45(3), 129–138. <https://doi.org/10.5152/TJAR.2017.93753>

78. Gyawali, B., Ramakrishna, K., & Dhamoon, A. S. (2019). Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE open medicine*, 7, 2050312119835043. <https://doi.org/10.1177/2050312119835043>
79. Hack, C. E., & Zeerleder, S. (2001). The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Critical care medicine*, 29(7 Suppl), S21–S27. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107001-00011>
80. Hampton, R. Y., Gardner, R. G., & Rine, J. (1996). Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Molecular biology of the cell*, 7(12), 2029–2044. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.12.2029>
81. Han, W. M., Hao, X. B., Hong, Y. X., Zhao, S. S., Chen, X. C., Wang, R., Wang, Y., & Li, G. (2023). NMDARs antagonist MK801 suppresses LPS-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction by regulating subunits of NMDARs via the CaM/CaMKII/ERK pathway. *Cell death discovery*, 9(1), 59. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01362-9>
82. He, Z., Du, L., Ke, Y., Wen, C., & Zhang, Y. (2019). PP2A α of Alveolar Macrophages Is a Novel Protective Factor for LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Inflammation*, 42(3), 1004–1014. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00962-x>
83. Heiss, C., Schanz, A., Amabile, N., Jahn, S., Chen, Q., Wong, M. L., Rassaf, T., Heinen, Y., Cortese-Krott, M., Grossman, W., Yeghiazarians, Y., & Springer, M. L. (2010). Nitric oxide synthase expression and functional response to nitric oxide are both important modulators of circulating angiogenic cell response to angiogenic stimuli. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(11), 2212–2218. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.211581>
84. Hemmens, B., & Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 100, 1–32. <https://doi.org/10.1385/1-59259-749-1:1>
85. Hong, S., Moreno-Navarrete, J. M., Wei, X., Kikukawa, Y., Tzamelis, I., Prasad, D., Lee, Y., Asara, J. M., Fernandez-Real, J. M., Maratos-Flier, E., & Pissios, P. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nature medicine*, 21(8), 887–894. <https://doi.org/10.1038/nm.3882>
86. Hong, S., Zhai, B., & Pissios, P. (2018). Nicotinamide N-Methyltransferase Interacts with Enzymes of the Methionine Cycle and Regulates Methyl Donor Metabolism. *Biochemistry*, 57(40), 5775–5779. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00561>

87. Hwang, H. J., Jung, T. W., Choi, J. H., Lee, H. J., Chung, H. S., Seo, J. A., Kim, S. G., Kim, N. H., Choi, K. M., Choi, D. S., Baik, S. H., & Yoo, H. J. (2017). Knockdown of sestrin2 increases pro-inflammatory reactions and ER stress in the endothelium via an AMPK dependent mechanism. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(6), 1436–1444. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.018>
88. Iba, T., Levy, J. H., Raj, A., & Warkentin, T. E. (2019). Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation. *Journal of clinical medicine*, 8(5), 728. <https://doi.org/10.3390/jcm8050728>
89. Ibrahim, A., Yucel, N., Kim, B., & Arany, Z. (2020). Local Mitochondrial ATP Production Regulates Endothelial Fatty Acid Uptake and Transport. *Cell metabolism*, 32(2), 309–319.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.05.018>
90. Jakubowski, A., Sternak, M., Jablonski, K., Ciszek-Lenda, M., Marcinkiewicz, J., & Chlopicki, S. (2016). 1-Methylnicotinamide protects against liver injury induced by concanavalin A via a prostacyclin-dependent mechanism: A possible involvement of IL-4 and TNF- α . *International immunopharmacology*, 31, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.032>
91. Jasiak, Ł., Kowalczyk, M., Mazan, P., Kowalczyk, E., Sienkiewicz, M., Józwiak-Bębenista, M., Wiktorowska-Owczarek, A. (2017). The influence of selective COX-2 inhibitor on phase of healing surgical wounds: proliferation and secretion of bFGF by
92. Ji, S. Y., Cha, H. J., Molagoda, I. M. N., Kim, M. Y., Kim, S. Y., Hwangbo, H., Lee, H., Kim, G. Y., Kim, D. H., Hyun, J. W., Kim, H. S., Kim, S., Jin, C. Y., & Choi, Y. H. (2021). Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory and Oxidative Response by 5-Aminolevulinic Acid in RAW 264.7 Macrophages and Zebrafish Larvae. *Biomolecules & therapeutics*, 29(6), 685–696. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.030>
93. Jian, Y., Yang, Y., Cheng, L., Yang, X., Liu, H., Li, W., Wan, Y., & Yang, D. (2023). Sirt3 mitigates LPS-induced mitochondrial damage in renal tubular epithelial cells by deacetylating YME1L1. *Cell proliferation*, 56(2), e13362. <https://doi.org/10.1111/cpr.13362>
94. Jiang, N., Wang, M., Song, J., Liu, Y., Chen, H., Mu, D., & Xia, M. (2016). N-methylnicotinamide protects against endothelial dysfunction and attenuates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular nutrition & food research*, 60(7), 1625–1636. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201501019>

95. Joffe, J., & Hellman, J. (2021). Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Sepsis and Acute Inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, 35(15), 1291–1307. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0027>
96. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., 2nd, & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
97. Kannt, A., Pfenninger, A., Teichert, L., Tönjes, A., Dietrich, A., Schön, M. R., Klötting, N., & Blüher, M. (2015). Association of nicotinamide-N-methyltransferase mRNA expression in human adipose tissue and the plasma concentration of its product, 1-methylnicotinamide, with insulin resistance. *Diabetologia*, 58(4), 799–808. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3490-7>
98. Kannt, A., Rajagopal, S., Hallur, M. S., Swamy, I., Kristam, R., Dhakshinamoorthy, S., Czech, J., Zech, G., Schreuder, H., & Ruf, S. (2021). Novel Inhibitors of Nicotinamide-N-Methyltransferase for the Treatment of Metabolic Disorders. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 991. <https://doi.org/10.3390/molecules26040991>
99. Kapetanovic, R., Afroz, S. F., Ramnath, D., Lawrence, G. M., Okada, T., Curson, J. E., de Bruin, J., Fairlie, D. P., Schroder, K., St John, J. C., Blumenthal, A., & Sweet, M. J. (2020). Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages. *Immunology and cell biology*, 98(7), 528–539. <https://doi.org/10.1111/imcb.12363>
100. Karan, K. R., Trumpff, C., McGill, M. A., Thomas, J. E., Sturm, G., Lauriola, V., Sloan, R. P., Rohleder, N., Kaufman, B. A., Marsland, A. L., & Picard, M. (2020). Mitochondrial respiratory capacity modulates LPS-induced inflammatory signatures in human blood. *Brain, behavior, & immunity - health*, 5, 100080. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100080>
101. Kaukonen, K. M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D., & Bellomo, R. (2014). Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*, 311(13), 1308–1316. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.2637>
102. Kerr, H., & Richards, A. (2012). Complement-mediated injury and protection of endothelium: lessons from atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology*, 217(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.028>

103. Kim, H. C., Mofarrahi, M., Vassilakopoulos, T., Maltais, F., Sigala, I., Debigare, R., Bellenis, I., & Hussain, S. N. (2010). Expression and functional significance of nicotinamide N-methyl transferase in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *181*(8), 797–805. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0936OC>
104. Kim, J., Hong, S. J., Lim, E. K., Yu, Y. S., Kim, S. W., Roh, J. H., Do, I. G., Joh, J. W., & Kim, D. S. (2009). Expression of nicotinamide N-methyltransferase in hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, *28*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-20>
105. Kluge, M. A., Fetterman, J. L., & Vita, J. A. (2013). Mitochondria and endothelial function. *Circulation research*, *112*(8), 1171–1188. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESA.HA.111.300233>
106. Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., & Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical chemistry*, *70*(13), 2446–2453. <https://doi.org/10.1021/ac9801723>
107. Komatsu, M., Kanda, T., Urai, H., Kurokochi, A., Kitahama, R., Shigaki, S., Ono, T., Yukioka, H., Hasegawa, K., Tokuyama, H., Kawabe, H., Wakino, S., & Itoh, H. (2018). NNMT activation can contribute to the development of fatty liver disease by modulating the NAD⁺ metabolism. *Scientific reports*, *8*(1), 8637. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26882-8>
108. Kong, X. J., & Fanburg, B. L. (1992). Regulation of Cu,Zn-superoxide dismutase in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, *153*(3), 491–497. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041530308>
109. Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A. S., Zhang, L., Rodgers, J. T., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T. C., Gong, F., Wang, Y. C., Cen, Y., Sauve, A. A., Asara, J. M., Peroni, O. D., Monia, B. P., Bhanot, S., Alhonen, L., Puigserver, P., & Kahn, B. B. (2014). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature*, *508*(7495), 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature13198>
110. Kraus, D., Yang, Q., Kong, D., Banks, A. S., Zhang, L., Rodgers, J. T., Pirinen, E., Pulinilkunnil, T. C., Gong, F., Wang, Y. C., Cen, Y., Sauve, A. A., Asara, J. M., Peroni, O. D., Monia, B. P., Bhanot, S., Alhonen, L., Puigserver, P., & Kahn, B. B. (2014). Nicotinamide N-methyltransferase knockdown protects against diet-induced obesity. *Nature*, *508*(7495), 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature13198>

111. Kumar, A. V., Mills, J., & Lapierre, L. R. (2022). Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10, 793328. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>
112. Kurte, M., Vega-Letter, A. M., Luz-Crawford, P., Djouad, F., Noël, D., Khoury, M., & Carrión, F. (2020). Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 416. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01840-2>
113. Lee, H., Smith, S. B., Sheu, S. S., & Yoon, Y. (2020). The short variant of optic atrophy 1 (OPA1) improves cell survival under oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 295(19), 6543–6560. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010983>
114. Lee, M. J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellin, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R. I., & Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 99(3), 301–312. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81661-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81661-x)
115. Lee, M. K. S., Al-Sharea, A., Shihata, W. A., Bertuzzo Veiga, C., Cooney, O. D., Fleetwood, A. J., Flynn, M. C., Claeson, E., Palmer, C. S., Lancaster, G. I., Henstridge, D. C., Hamilton, J. A., & Murphy, A. J. (2019). Glycolysis Is Required for LPS-Induced Activation and Adhesion of Human CD14+CD16- Monocytes. *Frontiers in immunology*, 10, 2054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02054>
116. Lepper, P. M., Held, T. K., Schneider, E. M., Bölke, E., Gerlach, H., & Trautmann, M. (2002). Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive care medicine*, 28(7), 824–833. <https://doi.org/10.1007/s00134-002-1330-6>
117. Li, F., Lin, Q., Shen, L., Zhang, Z., Wang, P., Zhang, S., Xing, Q., Xia, Z., Zhao, Z., Zhang, Y., & Zhu, B. (2022). The diagnostic value of endoplasmic reticulum stress-related specific proteins GRP78 and CHOP in patients with sepsis: a diagnostic cohort study. *Annals of translational medicine*, 10(8), 470. <https://doi.org/10.21037/atm-22-1445>
118. Li, J. J., Sun, W. D., Zhu, X. J., Mei, Y. Z., Li, W. S., & Li, J. H. (2024). Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT): A New Hope for Treating Aging and Age-Related Conditions. *Metabolites*, 14(6), 343. <https://doi.org/10.3390/metabo14060343>

119. Li, Q., He, M. D., Mao, L., Wang, X., Jiang, Y. L., Li, M., Lu, Y. H., Yu, Z. P., & Zhou, Z. (2017). Nicotinamide N-Methyltransferase Suppression Participates in Nickel-Induced Histone H3 Lysine9 Dimethylation in BEAS-2B Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 41(5), 2016–2026. <https://doi.org/10.1159/000475432>
120. Liang, H., Liu, G., Fan, Q., Nie, Z., Xie, S., & Zhang, R. (2023). Limonin, a novel AMPK activator, protects against LPS-induced acute lung injury. *International immunopharmacology*, 122, 110678. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110678>
121. Liu, K. Y., Mistry, R. J., Aguirre, C. A., Fasouli, E. S., Thomas, M. G., Klamt, F., Ramsden, D. B., & Parsons, R. B. (2015). Nicotinamide N-methyltransferase increases complex I activity in SH-SY5Y cells via sirtuin 3. *Biochemical and biophysical research communications*, 467(3), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.023>
122. Liu, M., Li, L., Chu, J., Zhu, B., Zhang, Q., Yin, X., Jiang, W., Dai, G., Ju, W., Wang, Z., Yang, Q., & Fang, Z. (2015). Serum N(1)-Methylnicotinamide Is Associated With Obesity and Diabetes in Chinese. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 100(8), 3112–3117. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1732>
123. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
124. Lugus, J. J., Ngoh, G. A., Bachschmid, M. M., & Walsh, K. (2011). Mitofusins are required for angiogenic function and modulate different signaling pathways in cultured endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51(6), 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.023>
125. Luksha, L., Luksha, N., Kublickas, M., Nisell, H., & Kublickiene, K. (2010). Diverse mechanisms of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilatation in small myometrial arteries in normal human pregnancy and preeclampsia. *Biology of reproduction*, 83(5), 728–735. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084426>
126. Markert, J. M., Fuller, C. M., Gillespie, G. Y., Bubien, J. K., McLean, L. A., Hong, R. L., Lee, K., Gullans, S. R., Mapstone, T. B., & Benos, D. J. (2001). Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiological genomics*, 5(1), 21–33. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2001.5.1.21>
127. Martinez-Mier, G., Toledo-Pereyra, L. H., & Ward, P. A. (2000). Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. *The Journal of surgical research*, 94(2), 185–194. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.6006>

128. Mateuszuk, Ł., Khomich, T. I., Słomińska, E., Gajda, M., Wójcik, L., Łomnicka, M., Gwóźdź, P., & Chłopicki, S. (2009). Activation of nicotinamide N-methyltransferase and increased formation of 1-methylnicotinamide (MNA) in atherosclerosis. *Pharmacological reports: PR*, 61(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(09\)70009-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70009-x)
129. Mato, J. M., Martínez-Chantar, M. L., & Lu, S. C. (2008). Methionine metabolism and liver disease. *Annual review of nutrition*, 28, 273–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155438>
130. McGarrity, S., Anuforo, Ó., Halldórsson, H., Bergmann, A., Halldórsson, S., Pálsson, S., Henriksen, H. H., Johansson, P. I., & Rólfsson, Ó. (2018). Metabolic systems analysis of LPS induced endothelial dysfunction applied to sepsis patient stratification. *Scientific reports*, 8(1), 6811. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25015-5>
131. Mertens, S., Noll, T., Spahr, R., Krützfeldt, A., & Piper, H. M. (1990). Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *The American journal of physiology*, 258 (3 Pt 2), H689–H694. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.3.H689>
132. Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., Tourlomousis, P., Däbritz, J. H. M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S. C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H. T., Szibor, M., Xavier, R. J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M. P., & O'Neill, L. A. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167(2), 457–470.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>
133. Mistry, R. J., Klamt, F., Ramsden, D. B., & Parsons, R. B. (2020). Nicotinamide N-methyltransferase expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells decreases oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 34(3), e22439. <https://doi.org/10.1002/jbt.22439>
134. Moreland, J. G., Bailey, G., Nauseef, W. M., & Weiss, J. P. (2004). Organism-specific neutrophil-endothelial cell interactions in response to *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(1), 426–432. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.426>
135. Mudd, S. H., Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., Jacobs, R. L., Stabler, S. P., Allen, R. H., Vance, D. E., & Wagner, C. (2007). Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 85(1), 19–25. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.19>

136. Neelakantan, H., Brightwell, C. R., Graber, T. G., Maroto, R., Wang, H. L., McHardy, S. F., Papaconstantinou, J., Fry, C. S., & Watowich, S. J. (2019). Small molecule nicotinamide N-methyltransferase inhibitor activates senescent muscle stem cells and improves regenerative capacity of aged skeletal muscle. *Biochemical pharmacology*, *163*, 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.008>
137. Nejabati, H. R., Mihanfar, A., Pezeshkian, M., Fattahi, A., Latifi, Z., Safaie, N., Valiloo, M., Jodati, A. R., & Nouri, M. (2018). N1-methylnicotinamide (MNA) as a guardian of cardiovascular system. *Journal of cellular physiology*, *233*(10), 6386–6394. <https://doi.org/10.1002/jcp.26636>
138. Nemmara, V. V., Tilvawala, R., Salinger, A. J., Miller, L., Nguyen, S. H., Weerapana, E., & Thompson, P. R. (2018). Citrullination Inactivates Nicotinamide- N-methyltransferase. *ACS chemical biology*, *13*(9), 2663–2672. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00578>
139. Nobes, C. D., Brown, G. C., Olive, P. N., & Brand, M. D. (1990). Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, *265*(22), 12903–12909.
140. Oldendorf, W. H., Cornford, M. E., & Brown, W. J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of neurology*, *1*(5), 409–417. <https://doi.org/10.1002/ana.410010502>
141. Palanichamy, K., Kanji, S., Gordon, N., Thirumoorthy, K., Jacob, J. R., Litzenberg, K. T., Patel, D., & Chakravarti, A. (2017). NNMT Silencing Activates Tumor Suppressor PP2A, Inactivates Oncogenic STKs, and Inhibits Tumor Forming Ability. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(9), 2325–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1323>
142. Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G., Jiang, J. K., Israelsen, W. J., Keane, J., Thomas, C., Clish, C., Vander Heiden, M., Xavier, R. J., & O'Neill, L. A. (2015). Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell metabolism*, *21*(1), 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>
143. Pangare, M., & Makino, A. (2012). Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*, *48*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1540/jsmr.48.1>

144. Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, *458*(7242), 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
145. Park, J. S., Oh, S. Y., Lee, D. H., Lee, Y. S., Sung, S. H., Ji, H. W., Lee, M. J., Lee, Y. H., Rhee, S. G., & Bae, S. H. (2016). p62/SQSTM1 is required for the protection against endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death. *Free radical research*, *50*(12), 1408–1421. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1253073>
146. Parsons, R. B., Aravindan, S., Kadampeswaran, A., Evans, E. A., Sandhu, K. K., Levy, E. R., Thomas, M. G., Austen, B. M., & Ramsden, D. B. (2011). The expression of nicotinamide N-methyltransferase increases ATP synthesis and protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against the toxicity of Complex I inhibitors. *The Biochemical journal*, *436*(1), 145–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20101685>
147. Parsons, R. B., Smith, M. L., Williams, A. C., Waring, R. H., & Ramsden, D. B. (2002). Expression of nicotinamide N-methyltransferase (E.C. 2.1.1.1) in the Parkinsonian brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *61*(2), 111–124. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.2.111>
148. Parsons, R. B., Smith, S. W., Waring, R. H., Williams, A. C., & Ramsden, D. B. (2003). High expression of nicotinamide N-methyltransferase in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, *342*(1-2), 13–16. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(03\)00218-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00218-0)
149. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:9793–9798.
150. Pissios P. (2017). Nicotinamide N-Methyltransferase: More Than a Vitamin B3 Clearance Enzyme. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *28*(5), 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.02.004>
151. Ponugoti, B., Kim, D. H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Veenstra, T. D., & Kemper, J. K. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry*, *285*(44), 33959–33970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122978>

152. Pozzi, V., Sartini, D., Morganti, S., Giuliante, R., Di Ruscio, G., Santarelli, A., Rocchetti, R., Rubini, C., Tomasetti, M., Giannatempo, G., Orlando, F., Provinciali, M., Lo Muzio, L., & Emanuelli, M. (2013). RNA-mediated gene silencing of nicotinamide N-methyltransferase is associated with decreased tumorigenicity in human oral carcinoma cells. *PloS one*, *8*(8), e71272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071272>
153. Przyborowski, K., Wojewoda, M., Sitek, B., Zakrzewska, A., Kij, A., Wandzel, K., Zoladz, J. A., & Chlopicki, S. (2015). Effects of 1-Methylnicotinamide (MNA) on Exercise Capacity and Endothelial Response in Diabetic Mice. *PloS one*, *10*(6), e0130908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130908>
154. Pumpo, R., Sarnelli, G., Spinella, A., Budillon, G., & Cuomo, R. (2001). The metabolism of nicotinamide in human liver cirrhosis: a study on N-methylnicotinamide and 2-pyridone-5-carboxamide production. *The American journal of gastroenterology*, *96*(4), 1183–1187. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03698.x>
155. Qadri, M., ElSayed, S., & Elsaid, K. A. (2021). Fingolimod Phosphate (FTY720-P) Activates Protein Phosphatase 2A in Human Monocytes and Inhibits Monosodium Urate Crystal-Induced Interleukin-1 β Production. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *376*(2), 222–230. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000321>
156. Radeva, M. Y., & Waschke, J. (2018). Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier. *Acta physiologica (Oxford, England)*, *222*(1), 10.1111/apha.12860. <https://doi.org/10.1111/apha.12860>
157. Rahman, S., & Islam, R. (2011). Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell communication and signaling: CCS*, *9*, 11. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-11>
158. Revollo, J. R., Grimm, A. A., & Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, *279*(49), 50754–50763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200>
159. Rini, J., Szumlanski, C., Guerciolini, R., & Weinshilboum, R. M. (1990). Human liver nicotinamide N-methyltransferase: ion-pairing radiochemical assay, biochemical properties and individual variation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *186*(3), 359–374. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90322-j](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90322-j)
160. Roberti, A., Fernández, A. F., & Fraga, M. F. (2021). Nicotinamide N-methyltransferase: At the crossroads between cellular metabolism and epigenetic regulation. *Molecular metabolism*, *45*, 101165. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101165>

161. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, *434*(7029), 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature03354>
162. Rogers, C. D., Fukushima, N., Sato, N., Shi, C., Prasad, N., Hustinx, S. R., Matsubayashi, H., Canto, M., Eshleman, J. R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2006). Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs. *Cancer biology & therapy*, *5*(10), 1383–1389. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.10.3323>
163. Rudloff, I., Jardé, T., Bachmann, M., Elgass, K. D., Kerr, G., Engel, R., Richards, E., Oliva, K., Wilkins, S., McMurrick, P. J., Abud, H. E., Mühl, H., & Nold, M. F. (2020). Molecular signature of interleukin-22 in colon carcinoma cells and organoid models. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, *216*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.10.004>
164. Rutkowski P. (2008). Are so-called uremic toxins always toxic?. *Journal of renal nutrition: the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, *18*(1), 7–11. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2007.10.004>
165. Rygula, A., Pacia, M. Z., Mateuszuk, L., Kaczor, A., Kostogrys, R. B., Chlopicki, S., & Baranska, M. (2015). Identification of a biochemical marker for endothelial dysfunction using Raman spectroscopy. *The Analyst*, *140*(7), 2185–2189. <https://doi.org/10.1039/c4an01998a>
166. Saito, S., Iida, A., Sekine, A., Miura, Y., Sakamoto, T., Ogawa, C., Kawauchi, S., Higuchi, S., & Nakamura, Y. (2001). Identification of 197 genetic variations in six human methyltransferase genes in the Japanese population. *Journal of human genetics*, *46*(9), 529–537. <https://doi.org/10.1007/s100380170035>
167. Sánchez-Rodríguez, R., Tezze, C., Agnellini, A. H. R., Angioni, R., Venegas, F. C., Cioccarelli, C., Munari, F., Bertoldi, N., Canton, M., Desbats, M. A., Salviati, L., Gissi, R., Castegna, A., Soriano, M. E., Sandri, M., Scorrano, L., Viola, A., & Molon, B. (2023). OPA1 drives macrophage metabolism and functional commitment via p65 signaling. *Cell death and differentiation*, *30*(3), 742–752. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01076-y>
168. Sandoo, A., van Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The open cardiovascular medicine journal*, *4*, 302–312. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>

169. Sangineto, M., Ciarnelli, M., Moola, A., Naik Bukke, V., Cassano, T., Villani, R., Romano, A. D., Di Gioia, G., Avolio, C., & Serviddio, G. (2024). Krebs cycle derivatives, dimethyl fumarate and itaconate, control metabolic reprogramming in inflammatory human microglia cell line. *Mitochondrion*, 79, 101966. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2024.101966>
170. Sartini, D., Santarelli, A., Rossi, V., Goteri, G., Rubini, C., Ciavarella, D., Lo Muzio, L., & Emanuelli, M. (2007). Nicotinamide N-methyltransferase upregulation inversely correlates with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 13(7-8), 415–421. <https://doi.org/10.2119/2007-00035>.
Sartini
171. Savarimuthu Francis, S. M., Larsen, J. E., Pavey, S. J., Duhig, E. E., Clarke, B. E., Bowman, R. V., Hayward, N. K., Fong, K. M., & Yang, I. A. (2011). Genes and gene ontologies common to airflow obstruction and emphysema in the lungs of patients with COPD. *PloS one*, 6(3), e17442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017442>
172. Scheitlin, C. G., Nair, D. M., Crestanello, J. A., Zweier, J. L., & Alevriadou, B. R. (2014). Fluid Mechanical Forces and Endothelial Mitochondria: A Bioengineering Perspective. *Cellular and molecular bioengineering*, 7(4), 483–496. <https://doi.org/10.1007/s12195-014-0357-4>
173. Schiffmann, L. M., Werthenbach, J. P., Heintges-Kleinhofer, F., Seeger, J. M., Fritsch, M., Günther, S. D., Willenborg, S., Brodesser, S., Lucas, C., Jüngst, C., Albert, M. C., Schorn, F., Witt, A., Moraes, C. T., Bruns, C. J., Pasparakis, M., Krönke, M., Eming, S. A., Coutelle, O., & Kashkar, H. (2020). Mitochondrial respiration controls neoangiogenesis during wound healing and tumour growth. *Nature communications*, 11(1), 3653. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17472-2>
174. Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., & Weber, V. (2013). Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators of inflammation*, 2013, 697972. <https://doi.org/10.1155/2013/697972>
175. Schmeisser, K., Mansfeld, J., Kuhlow, D., Weimer, S., Priebe, S., Heiland, I., Birringer, M., Groth, M., Segref, A., Kanfi, Y., Price, N. L., Schmeisser, S., Schuster, S., Pfeiffer, A. F., Guthke, R., Platzer, M., Hoppe, T., Cohen, H. Y., Zarse, K., Sinclair, D. A., Ristow, M. (2013). Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nature chemical biology*, 9(11), 693–700. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1352>

176. Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., & Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, 404(6779), 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
177. Shen, T., Wang, N., Yu, X., Shi, J., Li, Q., Zhang, C., Fu, L., Wang, S., Xing, Y., Zheng, X., Yu, L., & Zhu, D. (2015). The Critical Role of Dynamin-Related Protein 1 in Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Angiogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, 116(9), 1993–2007. <https://doi.org/10.1002/jcb.25154>
178. Shih, R. H., & Yang, C. M. (2010). Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse brain endothelial cells. *Journal of neuroinflammation*, 7, 86. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-86>
179. Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine*, 189(11), 1777–1782. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777>
180. Shin, J. H., Park, C. W., Yoon, G., Hong, S. M., & Choi, K. Y. (2018). NNMT depletion contributes to liver cancer cell survival by enhancing autophagy under nutrient starvation. *Oncogenesis*, 7(8), 58. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0064-4>
181. Sibal, L., Agarwal, S. C., Home, P. D., & Boger, R. H. (2010). The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Current cardiology reviews*, 6(2), 82–90. <https://doi.org/10.2174/157340310791162659>
182. Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*, 9(1), e3128. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3128>
183. Smith, M. L., Burnett, D., Bennett, P., Waring, R. H., Brown, H. M., Williams, A. C., & Ramsden, D. B. (1998). A direct correlation between nicotinamide N-methyltransferase activity and protein levels in human liver cytosol. *Biochimica et biophysica acta*, 1442(2-3), 238–244. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00177-8)
184. Song, Q., Chen, Y., Wang, J., Hao, L., Huang, C., Griffiths, A., Sun, Z., Zhou, Z., & Song, Z. (2020). ER stress-induced upregulation of NNMT contributes to alcohol-related fatty liver development. *Journal of hepatology*, S0168-8278(20)30284-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.038>

185. Sorescu, G. P., Song, H., Tressel, S. L., Hwang, J., Dikalov, S., Smith, D. A., Boyd, N. L., Platt, M. O., Lassègue, B., Griendling, K. K., & Jo, H. (2004). Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circulation research*, 95(8), 773–779. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000145728.22878.45>
186. Sternak, M., Khomich, T. I., Jakubowski, A., Szafarz, M., Szczepański, W., Białas, M., Stojak, M., Szymura-Oleksiak, J., & Chłopicki, S. (2010). Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) and 1-methylnicotinamide (MNA) in experimental hepatitis induced by concanavalin A in the mouse. *Pharmacological reports: PR*, 62(3), 483–493. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(10\)70304-2](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(10)70304-2)
187. Stone, O. A., El-Brolosy, M., Wilhelm, K., Liu, X., Romão, A. M., Grillo, E., Lai, J. K. H., Günther, S., Jeratsch, S., Kuenne, C., Lee, I. C., Braun, T., Santoro, M. M., Locasale, J. W., Potente, M., & Stainier, D. Y. R. (2018). Loss of pyruvate kinase M2 limits growth and triggers innate immune signaling in endothelial cells. *Nature communications*, 9(1), 4077. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06406-8>
188. Studt, J. D., Kremer Hovinga, J. A., Antoine, G., Hermann, M., Rieger, M., Scheiflinger, F., & Lämmle, B. (2005). Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*, 105(2), 542–544. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2096>
189. Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development*, 22(12), 1577–1590. <https://doi.org/10.1101/gad.1658508>
190. Sun, H., Zhu, X., Lin, W., Zhou, Y., Cai, W., & Qiu, L. (2017). Interactions of TLR4 and PPAR γ , Dependent on AMPK Signalling Pathway Contribute to Anti-Inflammatory Effects of Vaccariae Hypaphorine in Endothelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 42(3), 1227–1239. <https://doi.org/10.1159/000478920>
191. Sun, L., Ii, A. L., Pham, T. T., & Shanley, T. P. (2015). Study of Protein Phosphatase 2A (PP2A) Activity in LPS-Induced Tolerance Using Fluorescence-Based and Immunoprecipitation-Aided Methodology. *Biomolecules*, 5(3), 1284–1301. <https://doi.org/10.3390/biom5031284>

192. Szakács, G., Annereau, J. P., Lababidi, S., Shankavaram, U., Arciello, A., Bussey, K. J., Reinhold, W., Guo, Y., Kruh, G. D., Reimers, M., Weinstein, J. N., & Gottesman, M. M. (2004). Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer cell*, 6(2), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>
193. Takahashi, R., Kanda, T., Komatsu, M., Itoh, T., Minakuchi, H., Urai, H., Kuroita, T., Shigaki, S., Tsukamoto, T., Higuchi, N., Ikeda, M., Yamanaka, R., Yoshimura, N., Ono, T., Yukioka, H., Hasegawa, K., Tokuyama, H., Wakino, S., & Itoh, H. (2022). The significance of NAD⁺ metabolites and nicotinamide N-methyltransferase in chronic kidney disease. *Scientific reports*, 12(1), 6398. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10476-6>
194. Tamarelle, S., Mignen, O., Capiod, T., Rücker-Martin, C., & Feuvray, D. (2006). High glucose-induced apoptosis through store-operated calcium entry and calcineurin in human umbilical vein endothelial cells. *Cell calcium*, 39(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.09.008>
195. Tang, J. R., Michaelis, K. A., Nozik-Grayck, E., Seedorf, G. J., Hartman-Filson, M., Abman, S. H., & Wright, C. J. (2013). The NF- κ B inhibitory proteins I κ B α and I κ B β mediate disparate responses to inflammation in fetal pulmonary endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(6), 2913–2923. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202670>
196. Tang, S. W., Yang, T. C., Lin, W. C., Chang, W. H., Wang, C. C., Lai, M. K., & Lin, J. Y. (2011). Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 32(2), 138–145. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq225>
197. Tengan, C. H., & Moraes, C. T. (2017). NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1858(8), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.02.009>
198. Tesouro, M., & Cardillo, C. (2011). Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 203(1), 279–286. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02290.x>
199. Thomas, M. G., Sartini, D., Emanuelli, M., van Haren, M. J., Martin, N. I., Mountford, D. M., Barlow, D. J., Klamt, F., Ramsden, D. B., Reza, M., & Parsons, R. B. (2016). Nicotinamide N-methyltransferase catalyses the N-methylation of the endogenous β -carboline norharman: evidence for a novel detoxification pathway. *The Biochemical journal*, 473(19), 3253–3267. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160219>

200. Tian, R., Li, R., Liu, Y., Liu, J., Pan, T., Zhang, R., Liu, B., Chen, E., Tang, Y., & Qu, H. (2019). Metformin ameliorates endotoxemia-induced endothelial pro-inflammatory responses via AMPK-dependent mediation of HDAC5 and KLF2. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(6), 1701–1712. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.009>
201. Tomida, M., Mikami, I., Takeuchi, S., Nishimura, H., & Akiyama, H. (2009). Serum levels of nicotinamide N-methyltransferase in patients with lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(9), 1223–1229. <https://doi.org/10.1007/s00432-009-0563-y>
202. Ulanovskaya, O. A., Zuhl, A. M., & Cravatt, B. F. (2013). NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nature chemical biology*, 9(5), 300–306. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1204>
203. Usatyuk, P. V., Vepa, S., Watkins, T., He, D., Parinandi, N. L., & Natarajan, V. (2003). Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling*, 5(6), 723–730. <https://doi.org/10.1089/152308603770380025>
204. Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., & Monsalve, M. (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*, 66(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>
205. Van den Bossche, J., Baardman, J., & de Winther, M. P. (2015). Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (105), 53424. <https://doi.org/10.3791/53424>
206. van der Slikke, E. C., Star, B. S., van Meurs, M., Henning, R. H., Moser, J., & Bouma, H. R. (2021). Sepsis is associated with mitochondrial DNA damage and a reduced mitochondrial mass in the kidney of patients with sepsis-AKI. *Critical care (London, England)*, 25(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03424-1>
207. Vanasco, V., Saez, T., Magnani, N. D., Pereyra, L., Marchini, T., Corach, A., Vaccaro, M. I., Corach, D., Evelson, P., & Alvarez, S. (2014). Cardiac mitochondrial biogenesis in endotoxemia is not accompanied by mitochondrial function recovery. *Free radical biology & medicine*, 77, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.009>

208. Varela-Rey, M., Martínez-López, N., Fernández-Ramos, D., Embade, N., Calvisi, D. F., Woodhoo, A., Rodríguez, J., Fraga, M. F., Julve, J., Rodríguez-Millán, E., Frades, I., Torres, L., Luka, Z., Wagner, C., Esteller, M., Lu, S. C., Martínez-Chantar, M. L., & Mato, J. M. (2010). Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *52*(1), 105–114. <https://doi.org/10.1002/hep.23639>
209. Verma, A., Azhar, G., Zhang, X., Patyal, P., Kc, G., Sharma, S., Che, Y., & Wei, J. Y. (2023). P. gingivalis-LPS Induces Mitochondrial Dysfunction Mediated by Neuroinflammation through Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences*, *24*(2), 950. <https://doi.org/10.3390/ijms24020950>
210. Vieillard-Baron A. (2011). Septic cardiomyopathy. *Annals of intensive care*, *1*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-6>
211. Vuda, M., Chiusa, M., Jakob, S. M., Takala, J., Zuppinger, C., & Djafarzadeh, S. (2011). Lipopolysaccharide induces mitochondrial dysfunction in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Critical Care*, *15*(Suppl 1), P245. <https://doi.org/10.1186/cc9665>
212. Wang, L., Song, J., Zhang, J. et al. Lentiviral vector-mediate ATG3 overexpression inhibits growth and promotes apoptosis of human SKM-1 cells. *Mol Biol Rep* *41*, 2093–2099 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3058-0>
213. Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S. (2009). Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(9), 2307–2316. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2485>
214. Wang, W., Yang, C., Wang, T., & Deng, H. (2022). Complex roles of nicotinamide N-methyltransferase in cancer progression. *Cell death & disease*, *13*(3), 267. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04713-z>
215. Wang, Y., Zeng, J., Wu, W., Xie, S., Yu, H., Li, G., Zhu, T., Li, F., Lu, J., Wang, G. Y., Xie, X., & Zhang, J. (2019). Nicotinamide N-methyltransferase enhances chemoresistance in breast cancer through SIRT1 protein stabilization. *Breast cancer research: BCR*, *21*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1150-z>
216. Wang, Y., Zhou, X., Lei, Y., Chu, Y., Yu, X., Tong, Q., Zhu, T., Yu, H., Fang, S., Li, G., Wang, L., Wang, G. Y., Xie, X., & Zhang, J. (2022). NNMT contributes to high metastasis of triple negative breast cancer by enhancing PP2A/MEK/ERK/c-Jun/ABCA1 pathway mediated membrane fluidity. *Cancer letters*, *547*, 215884. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215884>

217. Watała, C., Kaźmierczak, P., Dobaczewski, M., Przygodzki, T., Bartuś, M., Łomnicka, M., Słomińska, E. M., Durackova, Z., & Chłopicki, S. (2009). Anti-diabetic effects of 1-methylnicotinamide (MNA) in streptozocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological reports: PR*, 61(1), 86–98. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(09\)70010-6](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70010-6)
218. Wellen, K. E., & Thompson, C. B. (2012). A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 270–276. <https://doi.org/10.1038/nrm3305>
219. Wen, Z., Liang, W., Zhong, Y., Sun, F., & Zhang, Q. (2021). Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University, 41(6), 828–838. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2021.06.04>
220. Widdrington, J. D., Gomez-Duran, A., Pyle, A., Ruchaud-Sparagano, M. H., Scott, J., Baudouin, S. V., Rostron, A. J., Lovat, P. E., Chinnery, P. F., & Simpson, A. J. (2018). Exposure of Monocytic Cells to Lipopolysaccharide Induces Coordinated Endotoxin Tolerance, Mitochondrial Biogenesis, Mitophagy, and Antioxidant Defenses. *Frontiers in immunology*, 9, 2217. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02217>
221. Widlansky, M. E., & Gutterman, D. D. (2011). Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), 1517–1530. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3642>
222. Wilson, C., Lee, M. D., Buckley, C., Zhang, X., & McCarron, J. G. (2022). Mitochondrial ATP Production is Required for Endothelial Cell Control of Vascular Tone. *Function (Oxford, England)*, 4(2), zqac063. <https://doi.org/10.1093/function/zqac063>
223. Wilson, S. H., & Lerman, A. (2001). Function of vascular endothelium. In *Heart physiology and pathophysiology* (pp. 473-480). Academic Press.
224. Wong, J. H., Ho, K. H., Nam, S., Hsu, W. L., Lin, C. H., Chang, C. M., Wang, J. Y., & Chang, W. C. (2017). Store-operated Ca²⁺ Entry Facilitates the Lipopolysaccharide-induced Cyclooxygenase-2 Expression in Gastric Cancer Cells. *Scientific reports*, 7(1), 12813. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12648-1>
225. Wright, G. L., Maroulakou, I. G., Eldridge, J., Liby, T. L., Sridharan, V., Tsihchlis, P. N., & Muise-Helmericks, R. C. (2008). VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(9), 3264–3275. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106468>

226. Wu, Y., Jin, Y., Sun, T., Zhu, P., Li, J., Zhang, Q., Wang, X., Jiang, J., Chen, G., & Zhao, X. (2020). p62/SQSTM1 accumulation due to degradation inhibition and transcriptional activation plays a critical role in silica nanoparticle-induced airway inflammation via NF- κ B activation. *Journal of nanobiotechnology*, 18(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00634-1>
227. Wu, Y., Siadaty, M. S., Berens, M. E., Hampton, G. M., & Theodorescu, D. (2008). Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration. *Oncogene*, 27(52), 6679–6689. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.264>
228. Xiao, W., Oldham, W. M., Priolo, C., Pandey, A. K., & Loscalzo, J. (2021). Immunometabolic Endothelial Phenotypes: Integrating Inflammation and Glucose Metabolism. *Circulation research*, 129(1), 9–29. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318805>
229. Xiao, Z., Zhang, Z., Ranjan, V., & Diamond, S. L. (1997). Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *Journal of cellular physiology*, 171(2), 205–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199705\)171:2<205::AID-JCP11>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199705)171:2<205::AID-JCP11>3.0.CO;2-C)
230. Xu, J., Moatamed, F., Caldwell, J. S., Walker, J. R., Kraiem, Z., Taki, K., Brent, G. A., & Hershman, J. M. (2003). Enhanced expression of nicotinamide N-methyltransferase in human papillary thyroid carcinoma cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(10), 4990–4996. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021843>
231. Yan, L., Otterness, D. M., & Weinshilboum, R. M. (1999). Human nicotinamide N-methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence analysis and promoter characterization. *Pharmacogenetics*, 9(3), 307–316. <https://doi.org/10.1097/00008571-199906000-00005>
232. Yang, C. C., Lin, C. C., Hsiao, L. D., Kuo, J. M., Tseng, H. C., & Yang, C. M. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression Associated with Cell Migration in Rat Brain Astrocytes. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 259. <https://doi.org/10.3390/ijms21010259>

233. Yang, C., Mo, X., Lv, J., Liu, X., Yuan, M., Dong, M., Li, L., Luo, X., Fan, X., Jin, Z., Liu, Z., & Liu, J. (2012). Lipopolysaccharide enhances FcεRI-mediated mast cell degranulation by increasing Ca²⁺ entry through store-operated Ca²⁺ channels: implications for lipopolysaccharide exacerbating allergic asthma. *Experimental physiology*, 97(12), 1315–1327. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.065854>
234. Yang, C., Wang, T., Zhu, S., Zong, Z., Luo, C., Zhao, Y., Liu, J., Li, T., Liu, X., Liu, C., & Deng, H. (2022). Nicotinamide N-Methyltransferase Remodeled Cell Metabolism and Aggravated Proinflammatory Responses by Activating STAT3/IL1β/PGE2 Pathway. *ACS omega*, 7(42), 37509–37519. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04286>
235. Yang, W., & Lu, Z. (2015). Pyruvate kinase M2 at a glance. *Journal of cell science*, 128(9), 1655–1660. <https://doi.org/10.1242/jcs.166629>
236. Yi, X., Chang, M. L., Zhou, Z. D., Yi, L., Yuan, H., Qi, J., Yi, L., Huan, J. N., & Huang, X. Q. (2023). LPS induces SGPP2 to participate metabolic reprogramming in endothelial cells. *Free radical biology & medicine*, 208, 780–793. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.007>
237. Yoo, B. H., Zagryazhskaya, A., Li, Y., Koomson, A., Khan, I. A., Sasazuki, T., Shirasawa, S., & Rosen, K. V. (2015). Upregulation of ATG3 contributes to autophagy induced by the detachment of intestinal epithelial cells from the extracellular matrix, but promotes autophagy-independent apoptosis of the attached cells. *Autophagy*, 11(8), 1230–1246. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1056968>
238. Yoshino, J., & Imai, S. (2013). Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) with high-performance liquid chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1077, 203–215. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_14
239. Yu, H., Zhou, X., Wang, Y., Huang, X., Yang, J., Zeng, J., Li, G., Xie, X., & Zhang, J. (2020). Nicotinamide N-methyltransferase inhibits autophagy induced by oxidative stress through suppressing the AMPK pathway in breast cancer cells. *Cancer cell international*, 20, 191. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01279-8>
240. Yu, J., Wang, Y., Li, Z., Dong, S., Wang, D., Gong, L., Shi, J., Zhang, Y., Liu, D., & Mu, R. (2016). Effect of Heme Oxygenase-1 on Mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats. *Scientific reports*, 6, 36530. <https://doi.org/10.1038/srep36530>
241. Yu, R., Jin, S. B., Lendahl, U., Nistér, M., & Zhao, J. (2019). Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *The EMBO journal*, 38(8), e99748. <https://doi.org/10.15252/embj.201899748>

242. Yu, W., Wang, X., Zhao, J., Liu, R., Liu, J., Wang, Z., Peng, J., Wu, H., Zhang, X., Long, Z., Kong, D., Li, W., & Hai, C. (2020). Stat2-Drp1 mediated mitochondrial mass increase is necessary for pro-inflammatory differentiation of macrophages. *Redox biology*, 37, 101761. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101761>
243. Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, 147(4), 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051>
244. Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., D'Amico, D., Ropelle, E. R., Lutolf, M. P., Aebersold, R., Schoonjans, K., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1436–1443. <https://doi.org/10.1126/science.aaf2693>
245. Zhang, J., Chen, Y., Liu, C., Li, L., & Li, P. (2020). N¹-Methylnicotinamide Improves Hepatic Insulin Sensitivity via Activation of SIRT1 and Inhibition of FOXO1 Acetylation. *Journal of diabetes research*, 2020, 1080152. <https://doi.org/10.1155/2020/1080152>
246. Zhang, J., Wang, Y., Li, G., Yu, H., & Xie, X. (2014). Down-regulation of nicotinamide N-methyltransferase induces apoptosis in human breast cancer cells via the mitochondria-mediated pathway. *PloS one*, 9(2), e89202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089202>
247. Zhang, R., Ji, J., Blaženović, I., Pi, F., Wang, T., Zhang, Y., & Sun, X. (2018). Investigation into Cellular Glycolysis for the Mechanism Study of Energy Metabolism Disorder Triggered by Lipopolysaccharide. *Toxins*, 10(11), 441. <https://doi.org/10.3390/toxins10110441>
248. Zhao, Z., Hu, J., Gao, X., Liang, H., & Liu, Z. (2014). Activation of AMPK attenuates lipopolysaccharide-impaired integrity and function of blood-brain barrier in human brain microvascular endothelial cells. *Experimental and molecular pathology*, 97(3), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.006>
249. Zheng, D., Liu, J., Piao, H., Zhu, Z., Wei, R., & Liu, K. (2022). ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Frontiers in immunology*, 13, 1039241. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039241>
250. Zheng, X., Zhang, W., & Hu, X. (2018). Different concentrations of lipopolysaccharide regulate barrier function through the PI3K/Akt signalling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Scientific reports*, 8(1), 9963. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28089-3>

251. Zhuang, L., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, J., Zhu, C., Zhang, L., & Xu, X. (2016). Atg3 Overexpression Enhances Bortezomib-Induced Cell Death in SKM-1 Cell. *PloS one*, 11(7), e0158761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158761>
252. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>
253. Zou, M., Dong, H., Meng, X., Cai, C., Li, C., Cai, S., & Xue, Y. (2015). Store-operated Ca²⁺ entry plays a role in HMGB1-induced vascular endothelial cell hyperpermeability. *PloS one*, 10(4), e0123432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123432>
254. Zyrianova, T., Lopez, B., Liao, A., Gu, C., Wong, L., Ottolia, M., Olcese, R., & Schwingshackl, A. (2021). BK Channels Regulate LPS-induced CCL-2 Release from Human Pulmonary Endothelial Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 64(2), 224–234. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0228OC>