



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Bydgoszcz 2024 r.



**UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

mgr Klaudia Piekarska

**Charakterystyka, mechanizm powstawania i funkcje biologiczne
pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi zapalnej
ludzkiego śródbłónka naczyń tętnic wieńcowych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o
zdrowiu**

**Promotor:
Prof. dr hab. Alina Grzanka**

Bydgoszcz rok 2024

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”

Isaac Newton, 1675

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi, Pani Prof. dr hab. n. med. Alinie Grzanka za pomoc, wsparcie i umożliwienie mi realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dzięki cennym radom Pani Profesor, cierpliwości oraz motywacji miałam okazję rozwijać swoje zainteresowania naukowe i doskonalić warsztat badawczy, co w znaczący sposób przyczyniło się do mojego rozwoju osobistego i zawodowego.

W szczególny sposób chciałabym wyrazić głęboką wdzięczność dla Pana dr hab. n. med. i n. o zdr., prof. UMK - Macieja Gagata, za niezwykle wsparcie i inspirację. Pan Profesor była dla mnie nie tylko mentorem, ale także źródłem motywacji i wiedzy, co miało kluczowy wpływ na sukces niniejszej dysertacji.

Serdeczne podziękowania składam również współpracownikom Katedry Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy za cenne dyskusje oraz nieocenione wsparcie na każdym etapie realizacji pracy. Dziękuję za stworzenie inspirującego środowiska rozwoju.

Wyjątkowe podziękowania kieruję również dla rodziny i przyjaciół, którzy bezwarunkowo wspierali mnie na każdym etapie tej naukowej podróży.

Słowa kluczowe Rozprawy Doktorskiej:

- Komórki śródbłónka
- Hodowla pierwotna
- Zaburzenia homeostazy wewnątrzustrojowej
- Stan zapalny
- Cytokiny zapalne
- Angiogeneza
- Aktywacja śródbłónka
- Migracja komórek
- Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
- Mechanizmy sekrecji

Spis treści

1. Źródła finansowania	7
2. Wykaz skrótów	8
3. Wykaz publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.....	15
3.1. Publikacja nr 1.....	15
3.2. Publikacja nr 2.....	15
3.3. Publikacja nr 3.....	15
3.4. Publikacja nr 4	16
4. Aktywność naukowa osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora wraz z opisem dorobku naukowego	17
5. Przedmiot badań	25
5.1. Wprowadzenie	25
5.2. Założenia rozprawy	36
5.3. Cele publikacji naukowych w kontekście rozprawy doktorskiej	37
5.3.1. Cel 1 – Publikacja nr 1	37
5.3.2. Cel 2 - Publikacja nr 2	38
5.3.3. Cel 3 - Publikacja nr 3	38
5.3.4. Cel 4 - Publikacja nr 4	38
5.4. Komentarze do publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora	39
5.4.1. Publikacja nr 1	39
5.4.2. Publikacja nr 2	42
5.4.3. Publikacja nr 3	45
5.4.4. Publikacja nr 4	47
5.5. Wnioski	48
5.6. Piśmiennictwo	50
5.7. Streszczenie	67
5.8. Summary.....	70
6. Załączniki.....	72
6.1. Kopie prac stanowiących cykl publikacji	72
6.1.1. Publikacja nr 1	73

6.1.2.	Publikacja nr 2	98
6.1.3.	Publikacja nr 3	114
6.1.4.	Publikacja nr 4	124
6.2.	Pisemne oświadczenia współautorów prac tworzących cykl o wyrażeniu zgody na wykorzystanie publikacji dla potrzeb przeprowadzania przewodu doktorskiego	129
6.2.1.	Publikacja nr 1	130
6.2.2.	Publikacja nr 2	138
6.2.3.	Publikacja nr 3	147
6.2.4.	Publikacja nr 4	152
6.3.	Zgoda Komisji Bioetycznej	157

1. Źródła finansowania

Badania i analizy stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu SONATA 9 pt.: „Wykorzystanie możliwości systemu CRISPR/dCas9 oraz peptydów penetrujących komórkę w celu zapobiegania restenozie i zakrzepicy tętnic wieńcowych - badania *in vitro*” (2015/17/D/NZ7/00809), którego byłam wykonawcą. Realizacja rozprawy doktorskiej została również wsparta przez wewnętrzne finansowania badań naukowych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, w tym projektu pt.: „Ocena wpływu inhibitorów angiogenezy na zdolności migracyjne ludzkich pierwotnych komórek śródbłonna naczyń tętnicy wieńcowej w obecności czynników aktywujących odpowiedź zapalną – badania *in vitro*” (MN-9/WL/2020) realizowanego w ramach Grantu Młodych Naukowców na Wydziale Lekarskim. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej uzyskane zostały również w ramach realizacji następujących projektów: „Ocena wpływu aktywności kinaz tyrozynowych na potencjał sekrecyjny komórek śródbłonna naczyń tętnicy wieńcowej w warunkach odpowiedzi zapalnej - badania *in vitro*” (IND.WL.6.2021) oraz „Charakterystyka udziału czynników transkrypcyjnych związanych z kontrolą genomową w szlaku sygnałowym TGFβ-SMAD komórek śródbłonna i komórek mięśniówki gładkiej w warunkach odpowiedzi zapalnej” (2/IND/2022) finansowanych w ramach Grantów Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

2. Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie (j. polski)	Rozwinięcie (j. angielski)
AAA	tętniak aorty brzusznej	<i>abdominal aortic aneurysm</i>
AA	tętniaki aorty	<i>aortic aneurysms</i>
ADAM	dezintegryna i metaloproteinaza	<i>disintegrin and metalloproteinase</i>
AJs	połączenia przylegające	<i>adherens junctions</i>
Ang II	angiotensyna II	<i>angiotensin II</i>
Arp2/3	białko 2/3 związane z aktyną	<i>actin-related protein 2/3</i>
AsA	kwask askorbinowy	<i>ascorbic acid</i>
AT1	receptor angiotensyny II typu 1	<i>angiotensin II receptor type 1</i>
ATCC	amerykański bank komórek i tkanek	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	kwask biczynchinowy	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	surowicza albumina wołowa	<i>bovine serum albumin</i>
Cas9	białko 9 związane z CRISPR	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CCN4	czynnik sieci komunikacji komórkowej 4	<i>cellular communication network factor 4</i>
CDKN2A	inhibitor kinaz zależnych od cyklin 2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	komplementarne DNA	<i>complementary DNA</i>
CO	tlenek węgla	<i>carbon monoxide</i>
CHI-3L1	białko chitynazy-3- podobne do 1	<i>chitinase 3-like protein 1</i>
CPQ	karboksypeptydaza Q	<i>carboxypeptidase Q</i>
CRISPR	zgrupowane, regularnie oddzielone, krótkie powtórzenia palindromowe	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CT	tomografia komputerowa	<i>computed tomography</i>
CXR	zdjęcie rentgenowskie klatki piersiowej	<i>chest radiography</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DPBS	klasyczny fosforanowy bufor solny opracowany przez Vincenta Dulbecco	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>

ECs	komórki śródbłonna	<i>endothelial cells</i>
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	kwask wersenowy	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	epidermalny czynnik wzrostu	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	syntaza tlenku azotu śródbłonkowego	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK	kinazy regulowane sygnałem pozakomórkowym	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ET-1	endotelina-1	<i>endothelin-1</i>
EVs	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	<i>extracellular vesicles</i>
FBS	plodowa surowica bydlęca	<i>fetal bovine serum</i>
FGF	czynniki wzrostu fibroblastów	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	izotiocyanian fluoresceiny	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GAPDH	dehydrogenaza gliceraldehydu- 3 fosforanowego	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDP	guanozyna-5'-difosforan	<i>guanosine 5'-diphosphate</i>
GFP	białko zielonej fluorescencji	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	guanozyna-5'-trifosforan	<i>guanosine-5'-triphosphate</i>
HaCaT	nieśmiertelna linia komórkowa ludzkich keratynocytów opracowana w warunkach niskiego stężenia wapnia i niskiej temperatury	<i>human adult low calcium temperature</i>
hASMCs	ludzkie komórki mięśniówki gładkiej aorty	<i>human aortic smooth muscle cells</i>
hCMEC/D3	linia komórkowa ludzkich komórek śródbłonna mikrokrazenia mózgowego	<i>human cerebral microvascular endothelial cells/D3</i>
HCT116	ludzki guz okrężnicy-116	<i>human colorectal tumor-116</i>
HEK293	ludzka nerka embrionalna 293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
HMW	wysoka masa cząsteczkowa	<i>high molecular weight</i>

HRP	peroksydaza chrzanowa	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu 1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	immunoglobulina G	<i>immunoglobulin G</i>
IL	interleukina	<i>interleukin</i>
ILVs	pęcherzyki śródświatłowe	<i>intraluminal vesicles</i>
iPSC	pluripotentne komórki macierzyste	<i>pluripotent stem cells</i>
JAM	połączeniowa cząsteczka adhezji	<i>junctional adhesion molecule</i>
JNK	kinazy N-końcowe c-Jun	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LAMP1	białko błonowe 1 związane z lizosomami	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDL	lipoproteiny o małej gęstości	<i>low-density lipoproteins</i>
LMW	niska masa cząsteczkowa	<i>low molecular weight</i>
MAPK	kinazy aktywowane mitogenami	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP1	chemotaktyczne białko 1 monocytów	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDA-MB-231	linia komórkowa wyizolowana z ludzkiego nowotworu piersi	<i>MD Anderson Cancer Center-Metastatic Breast cancer</i>
MEFs	mysie embrionalne fibroblasty	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MGC803	linia komórkowa ludzkiego raka żołądka-803	<i>human gastric cancer-803</i>
MLCP	fosfataza łańcucha lekkiego miozyny	<i>myosin light chain phosphatase</i>
MMPs	metaloproteinazy	<i>metalloproteinases</i>
MOI	wielokrotność zakażenia	<i>multiplicity of infection</i>
MRI	obrazowanie rezonansem magnetycznym	<i>magnetic resonance imaging</i>
miRNA	mikroRNA	<i>microRNA</i>
mRNA	informacyjny kwas rybonukleinowy	<i>messenger ribonucleic acid</i>

MSCs	mezenchymalne komórki macierzyste	<i>mesenchyma stem cells</i>
MVB	ciałka wielopęcherzykowe	<i>multivesicular bodies</i>
MVs	mikropęcherzyki błonowe	<i>membrane microvesicles</i>
MYH	łańcuch ciężki miozyny	<i>myosin heavy chain</i>
N-cadherin	kadheryna neuronalna	<i>neural cadherin</i>
NF-κB	jądrowy czynnik wzmocnienia łańcucha lekkiego kappa w aktywowanych limfocytach B	<i>nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells</i>
NDST1	N-deacetylaza/N- sulfotransferaza 1	<i>N-deacetylase/N-sulfotransferase</i>
NIH3T3	linia komórkowa mysich fibroblastów opracowana w National Institutes of Health	<i>National Institutes of Health 3 day transfer</i>
NO	tlenek azotu	<i>nitric oxide</i>
NM	niemięśniowy	<i>non-muscle</i>
OX-LDLs	utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości	<i>oxidized low-density lipoproteins</i>
p16	białko 16	<i>protein 16</i>
p38	białko 38	<i>protein 38</i>
PAI-1	aktywator plazminogenu typu 1	<i>plasminogen activators type 1</i>
PBS	buforowany roztwór soli fosforanowych	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDGFR	receptory czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi	<i>platelet-derived growth factor receptors</i>
PECAM-1	cząsteczka adhezji komórek śródbłonna płytek krwi-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PET	politereftalan etylenu	<i>polyethylene terephthalate</i>
PFA	paraformaldehyd	<i>paraformaldehyde</i>
PG	proteoglikany	<i>proteoglycans</i>
PH	domena homologiczna do plekstryny	<i>pleckstrin homology domain</i>
pHCASMCs	pierwotne ludzkie komórki mięśni	<i>primary human coronary artery</i>

	gładkich tętnic wieńcowych	<i>smooth muscle cells</i>
PHCAECs	ludzkie pierwotne komórki śródbłonna tętnicy wieńcowej	<i>primary human coronary artery endothelial cells</i>
PIGK	biosynteza kotwicy glikozylfosfatydylinozytolowej, klasa K	<i>phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class K</i>
PLCs	struktury przypominające granat	<i>pomegranate-like structures</i>
P-SEL	p-selektyna	<i>p-selectin</i>
PTEN	ludzkie białko kodowane przez gen supresorowy PTEN zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
RECK	białko bogate w cysteinę indukujące rewersję z motywami Kazala	<i>reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs</i>
RFP	białko czerwonej fluorescencji	<i>red fluorescent protein</i>
rh	rekombinowane ludzkie	<i>recombinant human</i>
RhoA	rodzina homologów Ras A	<i>ras homolog family member A</i>
RIPA buffer	bufor do radioimmunoprecypitacji	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	kwasy rybonukleinowe	<i>ribonucleic acid</i>
ROCK	kinaza białkowa związana z Rho	<i>rho-associated protein kinase</i>
ROS	reaktywne formy tlenu	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI medium	pożywka opracowana w Roswell Park Memorial Institute	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	temperatura pokojowa	<i>room temperature</i>
SACC-LM	rak gruczołowo-torbielowaty ślinianek-przerzut do płuc	<i>salivary adenoid cystic carcinoma- lung metastasis</i>
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodecylsiarczanem sodu	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	małe interferujące RNA	<i>small interfering RNA (siRNA)</i>

SKOV-3	linia komórkowa pochodząca z ludzkiego raka jajnika	<i>Sloan-Kettering OVarian cancer cell line-3</i>
SMAD	supresor matek przeciwko białkom dekapentaplegicznym	<i>suppressor of mothers against decapentaplegic</i>
SMCs	komórki mięśni gładkich	<i>smooth muscle cells</i>
SW480	linia komórkowa ludzkiego gruczolaka jelita grubego <i>Stanford Weiss-480</i>	<i>Stanford Weiss-480 human colorectal adenocarcinoma cell line</i>
TAA	tętniak aorty piersiowej	<i>thoracic aortic aneurysm</i>
TEE	echokardiografia przezprzełykową	<i>transesophageal echocardiography</i>
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa	<i>transmission electron microscopy</i>
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu beta	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP3	tkankowy inhibitor metaloproteinazy 3	<i>tissue metalloproteinase inhibitor 3</i>
TJs	połączenia ściste	<i>tight junctions</i>
TKI	inhibitor kinazy tyrozynowej	<i>tyrosine kinase inhibitor</i>
TMB	tetrametylobenzydyna	<i>tetramethylbenzidine</i>
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu alfa	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TNFR2	receptor czynnika martwicy nowotworu 2	<i>tumor necrosis factor receptor 2</i>
TPM1	tropomiozyna 1	<i>tropomyosin 1</i>
TRAF2	czynnik 2 związany z receptorem TNF	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
TSPAN	tetraspanina	<i>tetraspanin</i>
TTE	echokardiografia przezklatkowa	<i>transthoracic echocardiography</i>
TXA2	tromboksan	<i>thromboxan</i>
VCAM-1	cząsteczka adhezji komórek naczyniowych 1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-Cadherin	kadheryna śródbłona naczyniowego	<i>vascular endothelial cadherin</i>

VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego	<i>vascular endothelial growth factor receptors</i>
VSMC	komórki mięśni gładkich naczyń	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WISP1	białko szlaku sygnałowego indukowanego przez WNT1	<i>WNT1-inducible signaling pathway protein 1</i>
ZO-1	Zonula Occludens-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

3. Wykaz publikacji, stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora

3.1. Publikacja nr 1

Maciej Gagat, Wioletta Zielińska†, **Klaudia Mikołajczyk†**, Jan Zabrzyński, Adrian Krajewski, Anna Klimaszewska-Wiśniewska , Dariusz Grzanka , Alina Grzanka

CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of TPM1 Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α

Frontiers in Cell and Developmental Biology doi:10.3389/fcell.2021.668032

IF: 4.6; Punkty MEiN: 100

3.2. Publikacja nr 2

Klaudia Mikołajczyk, Dominika Spyt, Wioletta Zielińska, Agnieszka Żuryń, Inaz Faisal, Murtaz Qamar, Piotr Świniarski, Alina Grzanka, Maciej Gagat

The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation

International Journal of Molecular Sciences doi:10.3390/ijms222313157

IF: 4.9; Punkty MEiN: 140

3.3. Publikacja nr 3

Klaudia Piekarska, Dominika Spyt, Klaudia Bonowicz, Dominika Jerka, Alina Grzanka, Maciej Gagat

Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells

Medical Research Journal DOI:10.5603/mrj.101643

Punkty MEiN: 100

3.4. Publikacja nr 4

Klaudia Piekarska, Dominika Spyt, Klaudia Bonowicz, Dominika Jerka, Alina Grzanka, Maciej Gagat

Antiangiogenic Effects in the Modulation of Inflammatory Pathways. A Comprehensive Analysis of Potential Therapeutic Substances

Medical Research Journal DOI:10.5603/mrj.101851

Punkty MEiN: 100

Podsumowanie:

Łączny współczynnik wpływu (IF): 9.5

Łączna liczba punktów MEiN: 440

4. Aktywność naukowa osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora wraz z opisem dorobku naukowego

Moje pierwsze doświadczenia w pracy naukowej sięgają 2014 roku, czyli czasów przygotowań pracy licencjackiej na kierunku Biotechnologia, noszącej tytuł „Rola entozy w komórkach nowotworowych” pod kierownictwem pani dr hab. Magdaleny Izdebskiej, prof. UMK, realizowanej w ówczesnej Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii (obecnie Katedra Histologii i Embriologii) na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy.

Obok wiedzy teoretycznej, zdobywanej dzięki przeglądowi aktualnej literatury, seminariom dyplomowym czy uczestnictwie w licznych dyskusjach naukowych, w tym czasie zaczęłam także nabywać pierwszych umiejętności laboratoryjnych. Ukończenie studiów licencjackich zbiegło się z podjęciem pracy w Katedrze Histologii i Embriologii, co wyznaczyło kierunek mojego dalszego rozwoju zawodowego w obszarze badań naukowych. Pracę magisterską kontynuowałam niezmiennie pod doświadczonym okiem pani dr hab. Magdaleny Izdebskiej, prof. UMK, realizując temat: „Wpływ cytostatyka na procesy życiowe komórek nowotworowych”. **Umiejętności jakie zdobyłam na początku mojej drogi zawodowej umożliwiły mi czynne uczestnictwo w projektach finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki: projekt SONATA 9 pt.: „Wykorzystanie możliwości systemu CRISPR/dCas9 oraz peptydów penetrujących komórkę w celu zapobiegania restenozie i zakrzepicy tętnic wieńcowych - badania in vitro” oraz projekt OPUS 11 pt.: “Importance of cyclin F-RRM2 axis in drug-resistance of melanoma cells with different degree of aggressiveness – in vitro studies”.** Realizacja pierwszego projektu jest bezpośrednio związana z zakresem tematycznym niniejszej rozprawy doktorskiej a jego wyniki będą opisane w dalszej części rozprawy. Natomiast realizacja drugiego projektu pozwoliła nam dowieść, że istnieje znacząca różnica w ekspresji cykliny F między liniami komórkowymi reprezentującymi ogniska pierwotne i wtórne czerniaka, natomiast obniżona ekspresja jednostki funkcjonalnej tego genu zmienia oporność komórek czerniaka na chemioterapię, co związane jest ze szlakiem RRM2. W przypadku nadekspresji CCNF obserwowaliśmy zwiększoną wrażliwość komórek czerniaka na promieniowanie UV oraz leki przeciwnowotworowe, takie jak cisplatyna i temozolomid, związane ze zmniejszeniem wydajności naprawy DNA.

Podczas realizacji projektu rozwinęłam szeroki wachlarz umiejętności laboratoryjnych, a ich dalsze doskonalenie umożliwił mi udział w licznych szkoleniach z zakresu cytometrii przepływowej (Flow Cytometry Basic, Bio-Rad Sp. z o.o.; Fluorescence and Flow Cytometry Principles, Bio-Rad Sp. z o.o.; Sample Preparation Essentials, Bio-Rad Sp. z o.o.; Strategie analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, Merck sp. z o.o.; Cytometria przepływowa- podstawowe narzędzie badawcze, Polish Society of Cytometry), analiz komórkowych (Szkolenie z zakresu metod immunochemicznych w praktyce laboratoryjnej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego; Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczych, Merck sp. z o.o.; Testy komórkowe – podstawy, zastosowania i praktyczne porady, Promega GmbH; Optimize your RNA workflow-hints and pitfalls, Promega GmbH), technik umożliwiających transfer modelu badań in vitro do badań in vivo (Przygotowanie praktyczne z zakresu planowania doświadczeń, wykonywania procedur i uśmiercania zwierząt, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PoLLASA) oraz metod oczyszczania próbek biologicznych (Ekstrakcja do fazy stałej w praktyce, Merck sp. z o.o.; Walidacja metod chromatograficznych HPLC, LC/MS, GC, GC/MS, LAB- EKSPERT; Wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC dla zaawansowanych, LAB-EKSPERT). Zdobyte umiejętności praktyczne oraz rozwój kompetencji miękkich, które doskonaliłam podczas cyklicznych szkoleń Nature Masterclasses, dotyczących przygotowywania publikacji, wniosków grantowych oraz komunikacji w środowisku naukowym, umożliwiły mi efektywny udział w pozyskiwaniu finansowań na projekty badawcze. **Miałam okazję pełnić rolę wsparcia merytorycznego i technicznego w projektach finansowanych z działalności statutowej Katedry Histologii i Embriologii oraz konkursów organizowanych przez władze Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera, w tym:**

- „Ekspresja wybranych białek cyklu komórkowego oraz białek szlaku Rho/ROCK w nowotworowych liniach komórkowych po indukcji śmierci komórki związkami o działaniu cytotoksycznym” (01.2017 – 12.2022),
- „Wpływ związków hamujących angiogenezę na aktywację zapalną ludzkiego śródbłónka naczyń” (01.2019 – 01.2020),

- „Ocena wpływu inhibitorów angiogenezy na zdolności migracyjne ludzkich pierwotnych komórek śródbłonka naczyń tętnicy wieńcowej w obecności czynników aktywujących odpowiedź zapalną-badania *in vitro*” (10.2019 – 01.2023),
- „Ocena wpływu kwercytiny na cytoszkielet oraz podstawowe procesy życiowe komórek czerniaka linii A375” (11.2019 – 12.2021),
- „Udział cytoszkieletu w progresji nowotworu” (11.2019 – 12.2022),
- „Ocena kombinacji oksymatryny oraz 5-fluorouracylu na podstawowe procesy życiowe komórek prawidłowych (HBEpC) oraz nowotworowych (A549) płuc” (01.2020 – 01.2021),
- „Wpływ deksametazonu na ograniczenie przejścia epitelialno mezenchymalnego indukowanego hipoksją w komórkach linii HepG2” (01.2020 – 01.2021),
- „Wpływ witaminy D na komórki raka piersi linii MCF-7” (01.2020 – 01.2021),
- „Metformina w leczeniu raka przejściowo-komórkowego pęcherza moczowego” (01.2020– 01.2021),
- „Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi zapalnej ludzkiego śródbłonka naczyń tętnic wieńcowych” (01.2020 – 12.2020),
- „Analiza korelacji metaloproteiny-9 i cytokeratyn w kontekście migracji komórek raka piersi o różnym stopniu inwazyjności” (04.2020 – 12.2020),
- „Ocena wpływu czynników angiogennych na zdolności migracyjne ludzkich pierwotnych komórek śródbłonka naczyń tętnicy wieńcowej” (04.2020 – 12.2021),
- „Ocena działania sangwinaryny na komórki czerniaka ludzkiego linii A375” (05.2020 – 12.2020),
- „Cyklina C jako potencjalny czynnik warunkujący agresywność czerniaka złośliwego – badania *in vitro*” (10.2020 – 07.2022),
- „Charakterystyka udziału czynników transkrypcyjnych związanych z kontrolą genomową w szlaku sygnałowym TGFβ–SMAD komórek śródbłonka i komórek mięśniówki gładkiej w warunkach odpowiedzi zapalnej” (04.2021 – 06.2024),
- „Zmiany cytoimmunologiczne w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage, BAL) po przebytych zakażeniu COVID-19” (04.2021 – 06.2024),

- „Rola cyklin w odpowiedzi komórek na traktowanie cytostatykami” (05.2021 - 12.2021),
- „Ocena wpływu 5-fluorouracylu (5-FU) i kwercytyny na potencjał migracyjny komórek nowotworowych linii MCF-7” (05.2021 – 12.2023),
- „Wpływ piperlonguminy na organizację cytoszkieletu komórek linii T24” (05.2021 – 12.2023),
- „Ocena roli cykliny C w modulacji agresywności niedrobnokomórkowego raka płuca” (04.2022 – 12.2022),
- „Ekspresja i znaczenie prognostyczne KIF20A w raku jasnokomórkowym nerki” (01.2022 – 12.2023),
- „Ocena wpływu ekspresji czynnika transkrypcyjnego KLF11 na odpowiedź zapalną komórek śródbłonna oraz komórek mięśni gładkich tętnic wieńcowych indukowanych TNF- α oraz zaburzeniem ścieżki TGF β /SMAD” (05.2022 – 06.2024),
- „Ocena wpływu aktywności inhibitorów kinaz tyrozynowych na potencjał sekrecyjny komórek śródbłonna naczyń tętnicy wieńcowej w warunkach odpowiedzi zapalnej – badania in vitro” (07.2022 – 12.2022),
- „Rola TNF- α w aktywacji kanału wapniowego TRPM2 w komórkach śródbłonna linii Ea.hy926” (12.2022 – 12.2023),
- „Ekspresja cykliny Y w wybranych liniach nowotworowych po indukcji śmierci komórki” (12.2022 – 12.2023).

Rezultatem prac projektowych było moje pierwsze autorstwo i współautorstwo w artykułach przeglądowych i oryginalnych, opublikowanych w uznanych, indeksowanych w bazie Journal Citation Report. **Łączny współczynnik wpływu (IF) publikacji jaki zgromadziłam wynosi 47,131, a ich całkowita punktacja według kryteriów ministerialnych to 1610 punktów. Według bazy Web of Science aktualna (na dzień 06.09.2024) liczba cytowani moich prac wynosi 78, natomiast aktualny indeks Hirscha to 5. Wśród opublikowanych artykułów naukowych znajdują się następujące pozycje literaturowe:**

- „Selected genetic factors increasing risk of neoplasia” Journal of Education, Health and Sport, vol. 9, nr 8, DOI:10.5281/zenodo.3370434,

- „The cytotoxic effect of oxymatrine on basic cellular processes of A549 non-small lung cancer cells” *Acta Histochemica*, vol. 121, nr 6, DOI:10.1016/j.acthis.2019.06.008,
- „Cyclin F downregulation affects epithelial mesenchymal transition increasing proliferation and migration of the A-375 melanoma cell line” *Cancer Management and Research*, vol.12, DOI:10.2147/CMAR.S279169,
- „Low effectiveness of the introduction of pmaxGFP into primary human coronary endothelial cells using cell penetrating peptides and nuclear-localization sequences in non-covalent interactions” *Applied Sciences-Basel*, vol. 11, nr 5, DOI:10.3390/app11051997,
- „Influence of dexamethasone and doxorubicin on inhibition of hypoxia-induced metastatic potential in HepG2 cell line” *Medical Research Journal*, vol. 6, nr 3, DOI:10.5603/mrj.a2021.0036,
- „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, DOI:10.3389/fcell.2021.668032,
- „Downregulation of MMP-9 enhances the anti-migratory effect of cyclophosphamide in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, nr 23, DOI:10.3390/ijms222312783,
- „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, nr 23, DOI:10.3390/ijms222313157,
- „Prognostic Significance of SATB1, SMAD3, Ezrin and β Catenin in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma” *Applied Sciences-Basel*, vol. 12, nr 1, DOI:10.3390/app12010306,
- „Synergistic effect of oxymatrine and 5-fluorouracil on the migratory potential in A549 non-small cell lung cancer cells” *Medical Research Journal*, vol. 7, nr 4, DOI:10.5603/mrj.a2022.0050,
- „Mechanism of extracellular vesicle secretion associated with TGF- β -dependent inflammatory response in the tumor microenvironment” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, nr 23, DOI:10.3390/ijms232315335,

- „The role of cyclin Y in normal and pathological cells” Cell Cycle, vol. 22, nr 8, DOI:10.1080/15384101.2022.2162668,
- „Melatonin and TGF- β -Mediated Release of Extracellular Vesicles” Metabolites, 2023, vol. 13, nr 4, DOI:10.3390/metabo13040575,
- „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells” Medical Research Journal, 2024, DOI:10.5603/mrj.101643,
- „Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances” Medical Research Journal, 2024, DOI:10.5603/mrj.101851,
- „Unraveling endothelial cell migration: insights into fundamental forces, inflammation, biomaterial applications, and tissue regeneration strategies” ACS Applied Bio Materials, 2024, vol. 7, nr 4 DOI:10.1021/acsabm.3c01227.

Miałam również możliwość uczestniczenia w tworzeniu monografii zatytułowanej: „Entoza jako typ śmierci komórki i jej znaczenie w nowotworzeniu: różnorodność entozy” wydanej przez Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (ISBN 978-83-231-4386-4). Ze względu na wysoką wartość merytoryczną i jakość publikowanych prac, **zostałam kilkakrotnie laureatką stypendium rektora za najwyżej punktowane publikacje na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy. Znaczący wkład w naukowo-badawczy dorobek Uczelni został także doceniony poprzez przyznanie stypendium rektora dla najlepszych studentów Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK na lata 2018 – 2019 oraz pracowników inżynieryjno-technicznych od 2019 do 2023 roku.**

Wyniki wykonywanych eksperymentów prezentowałam nie tylko w publikacjach naukowych ale również podczas czynnego uczestnictwa w konferencji krajowych i międzynarodowych, dzięki czemu **stałam się głównym autorem lub współautorem 70 doniesień konferencyjnych.**

Najważniejszym osiągnięciem naukowym z perspektywy rozprawy doktorskiej było wsparcie techniczne realizacji projektu pt. „Wykorzystanie możliwości systemu CRISPR/dCas9 oraz peptydów penetrujących komórkę w celu zapobiegania restenozie i zakrzepicy tętnic wieńcowych - badania *in vitro*”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach 9. edycji konkursu SONATA pod kierownictwem Pana dr hab. n. med. i n. o

zdr., prof. UMK - Macieja Gagata. Projekt skupiał się na potencjale peptydów penetrujących pierwotne komórki śródbłónka oraz mięśni gładkich naczyń wieńcowych do dostarczania sytemu zgrupowanych, regularnie oddzielonych, krótkich powtórzeń palindromowych i białka 9 związanego z CRISPR (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9*, CRISPR/dCas9) aktywującego ekspresję tropomiozyny-1 (ang. *tropomyosin 1*, TPM1) stabilizując tym samym cytoszkielet aktynowy komórek. Właściwe funkcję śródbłónka naczyń zapewniają interakcje kompleksów wiązań międzykomórkowych z cytoszkieletem aktynowym stąd wraz z Zespołem przyjęliśmy, że regulacja stopnia polimeryzacji F-aktyny może być kluczowa w utrzymaniu stabilności bariery endotelialnej, adhezji oraz potencjału migracyjnego komórek śródbłónka w warunkach prozapalnych, odpowiadając jednocześnie za zmiany profilu ekspresyjnego związane z aktywacją zapalną w obrębie śródbłónka naczyniowego. **Realizując główny cel projektu, który opierał się na ocenie biologicznego wpływu stabilizacji F-aktyny w eksponowanych na czynnik martwicy nowotworu-alfa (ang. *tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α) komórkach śródbłónka oraz mięśni gładkich naczyń wieńcowych zaobserwowano tworzenie się na tylnym brzegu migrujących komórek charakterystycznych włókien retrakcyjnych, na końcach których formowały się niewielkie struktury błonowe wydzielane do przestrzeni międzykomórkowej i pochłaniane przez sąsiadujące komórki. Zaobserwowane zjawisko zainicjowało rozważania nad tematem migrasomów, czyli populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które do tej pory nie zostały w pełni poznane i scharakteryzowane. Zatem, obserwacje dokonane w ramach realizacji badań własnych stanowiły istotny punkt wyjścia i podstawę do opracowania niniejszej rozprawy doktorskiej.**

Ze względu na głębokie zainteresowanie nauką oraz chęć współpracy ze środowiskiem naukowym, **jestem aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, gdzie pełnię rolę skarbnika Oddziału Bydgosko-Toruńskiego, a także należę do międzynarodowego Koła Naukowego Biologii Naczyniowej i Studenckiego Koła Naukowego Patomorfologii Klinicznej. Byłam również czynnym członkiem Cytoskeleton Research Group działającego w ramach Priorytetowych Zespołów Uczelni wspieranych w ramach ID-UB w latach 2020-2022.** Moja współpraca z środowiskiem naukowym nie ograniczała się wyłącznie do działań na poziomie krajowym. Uczestniczyłam w wymianie naukowej w ramach działalności IFMSA-Poland Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im.

Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, edukując anglojęzycznych studentów kierunków medycznych w zakresie metod laboratoryjnych i narzędzi naukowych, mających potencjał wykorzystania w ich codziennej, przyszłej pracy lekarza i naukowca. **Ponadto, we wrześniu 2022 roku odbyłam staż naukowy w Universitätsklinikum Münster - Hautklinik Molecular Dermatoendocrinology, który w istotny sposób wzbogacił moje umiejętności w zakresie technik laboratoryjnych związanych z analizami molekularnymi i przyczynił się do publikacji szeregu prac naukowych.**

Podsumowując, obszar mojego rozwoju naukowego był szeroki i różnorodny, poczynając od badania przebiegu karcynogenezy na poziomie komórkowym, poprzez szczegółową analizę białek uczestniczących w podstawowych procesach życiowych komórek, aż po szerokie analizy dotyczące stanu zapalnego i aktywacji komórek wyściełających naczynia krwionośne, kończąc na analizie struktur błonowych wydzielanych w odpowiedzi na potrzeby komunikacji między komórkami. Pomimo przedstawienia do recenzji niniejszej rozprawy doktorskiej, w dalszym ciągu planuję pogłębiać swoją wiedzę i umiejętności w zakresie analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na inicjację stanu zapalnego, ze względu na ogromny potencjał poruszanego tematu i szereg możliwości aplikacyjnych w nowoczesnych technikach diagnostycznych i terapeutycznych chorób o podłożu zapalnym.

5. Przedmiot badań

5.1. Wprowadzenie

Komunikacja międzykomórkowa to fundamentalny dla organizmów żywych proces, umożliwiający wzajemne współdziałanie różnych typów komórek i zapewniający utrzymanie homeostazy wewnątrzustrojowej [1-4]. Pojęcie „homeostaza” w biologii komórki po raz pierwszy pojawiło się na początku XX wieku. Na podstawie wcześniejszych rozważań dotyczących koncepcji stałości „środowiska wewnętrznego”, Walter Cannon opisał to pojęcie jako samoregulujący mechanizm, dzięki któremu systemy biologiczne utrzymują stabilność, dostosowując się jednocześnie do zmieniających się warunków [5-7]. Nieprzypadkowo pojęcie „homeostaza” powstało na podstawie słowa „homoios” (gr. ὁμοιος) oznaczającego podobny, a nie „homo” oznaczającego taki sam, aby wyrazić ideę, że warunki wewnętrzne mogą się zmieniać; to znaczy, że są podobne, ale nie identyczne, pozostając stabilne, ale w zakresie wartości, które dają organizmowi swobodę adaptacji [4]. Homeostaza jest zatem tendencją układu do utrzymywania wewnętrznej stabilności w wyniku skoordynowanej reakcji na bodźce, które zakłócają normalne funkcjonowanie organizmu, systemu, narządu, tkanki czy komórki [8-9]. Kluczową do zachowania homeostazy wewnątrzustrojowej jest komunikacja międzykomórkowa, dzięki której, systemy biologiczne mogą zachować stabilność wewnętrzną, niezbędną do prawidłowego funkcjonowania organizmu [4, 10-11].

Badania nad komunikacją komórkową skupiają się na mechanizmach modulacji przekaźnictwa i odbioru informacji z otoczenia komórek i pomiędzy nimi [12-13]. Nie jest niczym nadzwyczajnym, że komórki nie funkcjonują w wzajemnej izolacji, lecz w zintegrowanych układach. Ich przetrwanie zależy od otrzymywania i przetwarzania informacji ze środowiska zewnętrznego, niezależnie od tego, czy informacje te dotyczą dostępności składników odżywczych, zmian temperatury czy wahań poziomu światła. W organizmach wielokomórkowych sygnalizacja komórkowa umożliwia specjalizację grup komórek łączących się w tkanki i pełniące szereg niezbędnych dla funkcjonowania organizmu funkcji. W organizmach jednokomórkowych komunikacja umożliwia wzajemną koordynację populacji komórek, które poprzez pracę zespołową dążą do określonego celu i nie mogłyby tego osiągnąć samodzielnie [14-15]. Zaburzenia komunikacji międzykomórkowej mogą prowadzić do szeregu patologicznych zmian w układzie sercowo-naczyniowym, wpływając na funkcję

serca, strukturę naczyń krwionośnych oraz procesy zapalne i regeneracyjne [16-17]. Dysfunkcje układu krążenia są główną przyczyną zgonów na świecie. Dane epidemiologiczne wskazują, że zachorowalność i umieralność z powodu tych chorób są ściśle związane z czynnikami ryzyka miażdżycy. Wśród nich najważniejsze to: dyslipidemia, palenie tytoniu, cukrzyca, nadciśnienie, otyłość, wiek, płeć, niska aktywność fizyczna i czynniki psychospołeczne [18-20]. Czynniki ryzyka dzieli się na modyfikowalne i niemodyfikowalne [21-22]. Pierwsze z nich są związane ze stylem życia oraz cechami biochemicznymi i fizjologicznymi, które można zmienić. Drugie to cechy, na które nie można wpłynąć, ale które pozwalają zidentyfikować osoby o wysokim ryzyku rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego [23-25]. Z epidemiologicznego punktu widzenia czynnik ryzyka to cecha jednostki lub populacji, która pojawia się we wczesnych etapach życia i jest związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby w przyszłości [26-27]. Ze względu na ogromną skalę tego problemu, a także jego społeczne i ekonomiczne konsekwencje, dysfunkcje sercowo-naczyniowe stanowią największe wyzwanie dla szeroko pojętej promocji zdrowia [28-29].

Jedną z najczęściej opisywanych chorób sercowo-naczyniowych jest miażdżycyca [30]. Utożsamiana jest z przewlekłym procesem zapalnym, polegającym na gromadzeniu się w przestrzeni między śródbłonkiem a błoną mięśniową dużych tętnic (łac. *tunica intima*) złogów składających się z lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low-density lipoproteins*, LDLs), makrofagów, komórek piankowatych i zewnątrzkomórkowych skupisk cholesterolu [31]. W ten sposób na wewnętrznej powierzchni naczyń tworzą się smugi tłuszczowe, które są najwcześniejszą i jednocześnie najbardziej charakterystyczną formą zmian miażdżycowych [32-33]. W miarę trwania stanu zapalnego zaczynają pojawiać się włókniste elementy tkanki łącznej, które narastają i otaczają pierwotne ognisko zapalne, oddzielając je od reszty naczyń. Powstała w pełni rozwinięta zmiana miażdżycowa nazywana jest „blaszką miażdżycową” [34-35]. Może, ale nie musi, wystawać do światła naczyń i zwężać je, ograniczając w ten sposób przepływ krwi w obszarze za zwężeniem, lub może ulec pęknięciu pod wpływem sił fizycznych związanych z przepływem krwi. W takim przypadku krew wchodzi w kontakt z trombogennymi składnikami blaszki, co może spowodować wykrzepianie wewnątrznaczyniowe, zamknięcie światła naczyń i nagłe całkowite zatrzymanie przepływu krwi [35-36]. Skutkiem tych zjawisk jest ogniskowa martwica mięśnia sercowego i mózgu,

które składają się na kliniczny zespół znany jako zawał mięśnia sercowego i udar mózgu [37-38].

Podsumowując, dysfunkcja śródbłónka związana z procesem miażdżycowym rozpoczyna się od zwiększenia przepuszczalności naczyń dla składników lipidowych, głównie frakcji LDL [39]. Cząsteczki utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *oxidized low-density lipoproteins*, ox-LDLs) są wchłaniane przez makrofagi, które wnikają do śródbłónka naczyń wieńcowych, przekształcając się w komórki piankowe [40-41]. W wyniku tych zmian patofizjologicznych wewnętrzna błona naczyń staje się grubsza, co jest szczególnie widoczne na rozwidleniach tętnic [42-44]. Konsekwencją akumulacji i wzmożonej aktywności komórek odpornościowych oraz odkładania lipidów jest rozwój blaszki miażdżycowej, otoczonej przez komórki mięśni gładkich i macierz bogatą w kolagen. To prowadzi do zwężenia światła tętnic wieńcowych [45-46]. W ostatnich latach ważną rolę w przebiegu miażdżycy przypisuje się również mechanizmom komunikacji międzykomórkowej, spowodowanym poprzez nadmierną produkcję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki naczyń krwionośnych i układu odpornościowego. Wydzielane pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wpływają na mikrośrodowisko tkankowe, ale także działają systemowo, przyczyniając się do powstawania przewlekłego stanu zapalnego [47-50].

Pomimo wielu lat badań nad diagnostyką i leczeniem miażdżycy oraz innych schorzeń sercowo-naczyniowych, nadal poszukujemy sposobu na eliminację przewlekłego stanu zapalnego. Przyczyną badań w tym zakresie jest fakt, iż konsekwencją przewlekłego zapalenia jest dysfunkcja śródbłónka, którą można zdefiniować jako zintegrowany marker uszkodzenia ścian tętnic przez klasyczne czynniki ryzyka [51]. Stan ten jest bezpośrednio związany ze zmianami w sygnalizacji komórkowej, spowodowanymi stresem oksydacyjnym i obejmuje co najmniej dwa różne systemy komórkowe oraz ich interakcje: komórki śródbłónka (ang. *endothelial cells*, ECs) i komórki mięśni gładkich naczyń (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMCs) [52-53]. Dzięki interakcji kompleksów połączeń międzykomórkowych z cytoszkieletem, regulacja stopnia polimeryzacji F-aktyny może być kluczowa w utrzymaniu bariery śródbłonkowej, potencjału adhezji i migracji komórek śródbłónka, a także wpływać na ich profil ekspresji [54-56]. Nadmierna migracja komórek immunologicznych, ściśle związana z inicjacją zapalenia, jest związana z depolimeryzacją F-aktyny [57]. Zrozumienie mechanizmów hamujących ten proces wydaje się obiecującym celem terapeutycznym. Jak

pokazują wyniki opublikowanego badania wprowadzającego do niniejszej rozprawy doktorskiej, nadekspresja *TPM1* jest jednym z czynników stabilizujących strukturę cytoszkieletu aktynowego [58]. Dzięki interakcji kompleksów połączeń międzykomórkowych z cytoszkieletem, regulacja polimeryzacji F-aktyny może być kluczowym czynnikiem w utrzymaniu funkcji bariery śródbłonkowej, prawidłowego potencjału adhezji i migracji komórek śródbłonka, a także wpływać na ich profil ekspresji. Ponadto stabilizacja F-aktyny najprawdopodobniej wpływa na odpowiedź komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych [58]. Dlatego ocena migracji i proliferacji tych komórek może być niezwykle istotna do diagnozowania i zapobiegania przebudowie tętnic po uszkodzeniach mechanicznych. Badania pokazują, że wynik reakcji zapalnej jest związany z silną adhezją komórek wraz ze zwiększoną migracją, co prowadzi do powstawania długich ogonów za komórkami zwanych włóknami retrakcyjnymi, które czasami pękają, uwalniając pęcherzyki mogące uczestniczyć w kontakcie międzykomórkowym. Ze względu na naturę procesu tworzenia opisanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, są one nazywane migrasomami. Ze względu na wysokie tempo migracji komórek w odpowiedzi na dysfunkcję śródbłonka, potencjalnym rozwiązaniem wydaje się być użycie pęcherzyków wydzielanych podczas ruchu komórek jako specyficznych markerów inicjacji odpowiedzi zapalnej [58].

Aktualne doniesienia literaturowe wskazują zatem, że to właśnie dysfunkcja śródbłonka naczyniowego leży u podstaw rozwoju wielu chorób sercowo-naczyniowych. Śródbłonek to heterogennej warstwa komórek pochodzenia mezodermalnego, pokrywający wewnętrzną powierzchnię naczyń krwionośnych [59]. Oddziela elementy morfotyczne krwi od tkanki łącznej i mięśniowej ścian naczyń [60]. Wśród głównych funkcji wymienić można: kontrolę przepływu krwi, i czynników regulujących proces krzepnięcia krwi, produkcję składników międzykomórkowych, regulację transportu substancji przez ścianę naczyń krwionośnych i migracji leukocytów do miejsca zapalenia [62-63]. Śródbłonek bierze również udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych i ich przebudowie [64-65]. Komórki śródbłonka charakteryzują się intensywną aktywnością metaboliczną dzięki zdolności do produkcji głównych składników błony podstawnej, takich jak fibronektyna, kolagen typu IV i V, laminina oraz proteoglikany (ang. *proteoglycans*, PGs) [66-68].

W śródbłonku zachodzi także synteza i sekrecja biologicznie aktywnych substancji, które regulują funkcje naczyń krwionośnych, takich jak czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

(ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β* , TGF- β) i insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) [69-71]. Substancje produkowane przez śródbłonek naczyń działają autokrynnie na komórki śródbłonka, a także parakrynnie na komórki mięśni gładkich naczyń i komórki krwi w świetle naczynia [72-74]. Lokalizacja komórek śródbłonka pozwala na szybkie reagowanie na bodźce chemiczne i fizyczne poprzez zmianę syntezy cząsteczek adhezyjnych lub sekrecję czynników regulujących zachowanie komórek mięśni gładkich naczyń, ich proliferację i migrację oraz napięcie ścian naczyń [75-76]. Śródbłonek pośredniczy również w hiperpolaryzacji komórek mięśni gładkich naczyń poprzez niezależną od tlenu azotu (ang. *nitric oxide*, NO) drogę, która zwiększa przewodnictwo jonów K⁺ i w konsekwencji propaguje depolaryzację komórek mięśni gładkich naczyń, utrzymując napięcie ścian naczyń poprzez produkcję śródbłonkowych czynników hiperpolaryzacyjnych [77-78]. W obrębie śródbłonka dochodzi również do ekspresji czynników zwężających naczynia, w tym: endotelina-1 (ang. *endothelin*, ET-1), angiotensyna II (ang. *angiotensin II*, Ang II), tromboksan A₂ (ang. *thromboxane A₂*, TXA₂) oraz reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) [79- 82]. Śródbłonek przyczynia się także do mitogenezy, angiogenezy, przepuszczalności naczyń, równowagi płynów i utrzymania hemostazy, obejmując uwalnianie aktywatora plazminogenu, inhibitora czynnika tkankowego, czynnika von Willebranda, NO, prostaglandyn, TXA₂, inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (ang. *plasminogen activators type 1*, PAI-1) i fibrynogenu [83-90]. W wyniku działania czynników patologicznych równowaga funkcjonalna komórek śródbłonka zostaje zaburzona, co prowadzi do zapalenia i dysfunkcji śródbłonka poprzez przebudowę naczyń krwionośnych [91]. Zapalenie jest złożonym procesem, który rozpoczyna się, gdy antygeny dostają się do organizmu i wykazują specyficzne wzorce molekularne na swojej powierzchni, określane jako wzorce molekularne związane z patogenami na drobnoustrojach zakaźnych (ang. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMPS) [92]. Antygeny te wiążą się następnie z określonymi receptorami na powierzchni neutrofili, komórek dendrytycznych lub makrofagów, co skutkuje uwolnieniem prozapalnych cytokin, często nazywanych "immunotransmiterami", wśród których wyróżnia się TNF- α [93]. TNF- α odgrywa kluczową rolę w inicjacji obwodowej fazy ostrej odpowiedzi zapalnej, aktywując kolejne komórki układu odpornościowego [94]. Jest homotrimerem produkowanym między innymi przez makrofagi, monocyty, limfocyty T i B, fibroblasty oraz neutrofile [95]. Z kolei w aktywowanych komórkach śródbłonka obserwuje się ekspresję

cząsteczek adhezyjnych, takich jak cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), cząsteczka adhezji komórek naczyńiowych 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) i E-selektyna [96-97].

Zmiany wzajemnej komunikacji w następstwie oddziaływania na bodźce pochodzące z otoczenia, są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów różnicowania, wzrostu komórek oraz utrzymania równowagi wewnątrzustrojowej, co jest konieczne dla prawidłowego funkcjonowania i formowania organizmów [98]. Komunikacja międzykomórkowa może odbywać się poprzez sekrecję aktywnych substancji o charakterze cząsteczek sygnalizacyjnych, takich jak aminokwasy, peptydy, białka, nukleotydy, retinoidy, steroidy oraz pochodne kwasów tłuszczowych występujące w postaci czynników wzrostu, neuroprzekaźników lub cytokin [99-100]. Cząsteczki sygnalizacyjne obejmują również gazy niskocząsteczkowe, które przenikają przez błony biologiczne, takie jak NO i tlenek węgla (ang. *carbon monoxide*, CO) [101]. Taki rodzaj sygnalizacji międzykomórkowej może mieć charakter lokalny lub układowy. W pierwszym przypadku cząsteczki sygnałowe przemieszczają się poprzez dyfuzję, penetrując macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM), co skutkuje szybką, ale krótkotrwałą odpowiedzią sąsiednich komórek. Opisany mechanizm nie obejmuje krwioobiegu i jest określany jako droga parakrynną [102]. Drugi mechanizm, zwany oddziaływaniem endokrynnym, polega na transporcie cząsteczek sygnałowych za pomocą płynów ustrojowych i ich interakcji z odległymi komórkami. Jest to możliwe dzięki ekspresji specyficznych receptorów komórkowych, które po rozpoznaniu substratu inicjują reakcje fizjologiczne, biochemiczne i morfologiczne [103]. Ponadto, w literaturze opisywane są interakcje wewnątrzkomórkowe (intrakrynną) i autokrynną, podczas których cząsteczka sygnałowa wywiera swoje biologiczne efekty w obrębie komórki w której została wyprodukowana [104]. Przedstawione typy komunikacji komórkowej opierają się na obecności zewnątrzkomórkowych przekaźników i stanowią rodzaj sekrecji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej.

Również sygnalizacja za pomocą białek powierzchniowych wyróżnia się poprzez łączenie ich w różnych typach komórek. Tworzy się wówczas kompleks białka sygnałowego, prezentowanego na powierzchni jednej komórki, oraz komplementarnego białka efektorowego na powierzchni drugiej komórki, co determinuje transdukcję sygnału i indukcję ścieżki komunikacji międzykomórkowej [105]. Białka efektorowe mogą obejmować enzymy, czynniki

transkrypcyjne, kanały jonowe oraz białka cytoszkieletu [106]. Większość cząsteczek sygnałowych jest określana jako molekularne przełączniki, co oznacza, że zarówno ich aktywacja, jak i dezaktywacja są indukowane przez sygnał, który może wynikać z fosforylacji lub obecności transporterów energii w postaci guanozyno- 5'-trifosforanu (ang. *guanosine-5'-triphosphate*, GTP) lub guanozyno-5'-difosforanu (ang. *guanosine 5'-diphosphate*, GDP) [107-108]. Zarówno siła wysyłanego sygnału, jak i wrażliwość komórek są zmiennymi wartościami i zależą przede wszystkim od mechanizmów adaptacyjnych. W przypadku drugiego parametru istnieje silna zależność od liczby i powinowactwa receptorów, dlatego mechanizm wzmacniania sygnalizacji międzykomórkowej jest tutaj niezwykle ważny [109-111].

Rzeczony badań w dziedzinie etiologii i konsekwencji interakcji międzykomórkowych pozwolił na identyfikację specyficznych cząsteczek nazywanych pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (ang. *extracellular vesicles*, EVs) [112]. Erwin Chargaff i Randolph West jako pierwsi zainteresowali się nimi w 1946 roku i opisali je jako "cząsteczki prokoagulacyjne pochodzące z płytek krwi". W latach 70. Peter Wolf wzbogacił wiedzę o mikrokomórkach o nowe fakty [113]. Opisał je jako małe struktury przypominające "pył z płytek krwi" (ang. *platelet dust*), a wyniki kolejnych badań potwierdziły różnorodność tych cząsteczek oraz ich obecność we krwi, moczu, ślinie, nasieniu i płynie owodniowym [54]. EVs są heterogennymi populacjami pęcherzyków błonowych uwalnianych przez organizmy prokariotyczne i eukariotyczne, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [114]. Wielkość pęcherzyków jest zróżnicowana i wynosi od 30 nm do 5 µm. Chociaż EVs mają podobną strukturę, istnieją znaczne różnice dotyczące mechanizmu ich powstawania, właściwości fizykochemicznych i rozmiaru [115-116].

Oprócz gęstości, metod izolacji czy obecności specyficznych markerów, wymienione parametry są najczęstszymi kryteriami klasyfikacji EVs. Według tych kryteriów, mikroskopijne struktury błonowe można podzielić na: egzozosomy, pęcherzyki egzosomalne, ektosomy i ciała apoptotyczne [117-118]. EVs odgrywają niezwykle ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej dzięki zdolności do przenoszenia informacji między różnymi komórkami bez konieczności bezpośredniego kontaktu. Jest to możliwe dzięki ich zawartości, która obejmuje białka, informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) i mikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA) [119-120]. Ze względu na wewnętrzny skład EVs oraz ich udział w komunikacji międzykomórkowej, stały się atrakcyjnym celem badań dla wielu naukowców. Pozwoliło to podkreślić ważną rolę opisywanych cząsteczek sygnalizacyjnych nie

tylko w procesach fizjologicznych, ale także w stanach towarzyszących zaburzeniom wewnętrznej homeostazy zarówno pojedynczych komórek, jak i całych organizmów. Stało się to podstawą do wniosku, że EVs można wykorzystać jako markery molekularne w diagnostyce poważnych chorób we wczesnych stadiach ich rozwoju [121-122].

Ze względu na znaczenie komunikacji międzykomórkowej w ontogenezie, organogenezie i patofizjologii, dalsze badania doprowadziły do identyfikacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych nazywanych migrasomami [123]. Ich biogeneza i sekrecja są bezpośrednio zależne od migracji i polimeryzacji aktyny, stąd zjawisko to nazwano migracytozą. Ten nowo zidentyfikowany proces sekrecyjny może odgrywać ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej zarówno podczas procesów fizjologicznych, jak i patofizjologicznych [124-125]. Mechanizm inicjacji i przebieg migracji zależy od wielu złożonych procesów, spośród których migracja jest najważniejsza. Odgrywa kluczową rolę w rozwoju embrionalnym, ale jest także odpowiedzialna za ruch komórek odpornościowych, gojenie ran i regenerację tkanek [126].

Znajomość mechanizmów odpowiedzialnych za ruch komórek jest bardzo ważna dla współczesnej medycyny, ponieważ może być wykorzystana do badania etiologii różnych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych [127-128]. Istotą migracji jest aktywny ruch komórek, regulowany przez szlaki sygnalizacyjne związane z cząsteczkami informacyjnymi, białkowymi przekaźnikami sygnału lub jonami wapnia. Początkowo badania w dziedzinie migracji komórek prowadzono na jednokomórkowych organizmach ameboidalnych z gatunku *Dictyostelium Discoideum*. Identyfikacja podobnych zestawów markerów białkowych pozwoliła jednak na rozszerzenie badań na organizmy wyższych klas taksonomicznych. Dało to podstawę do poznania mechanizmów interakcji międzykomórkowych związanych z procesem migracji [129-130].

Rodzaje ruchu komórek są definiowane na podstawie takich parametrów jak adhezja komórkowa, aktywność proteaz, siła interakcji międzykomórkowych oraz polaryzacja i organizacja cytoszkieletu komórki [54]. Ze względu na liczbę migrujących komórek można wyróżnić migrację indywidualną i zbiorową. Migracja komórek jest procesem wieloetapowym, składającym się z polaryzacji, adhezji, tworzenia projekcji komórkowych oraz ruchu kierunkowego [131-133]. Polaryzacja jest wynikiem tworzenia funkcjonalnie i morfologicznie

zróznicowanych biegunów komórki, tj. w strefie przedniej i tylnej, w wyniku różnicy potencjałów między zewnętrzną a wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej [134]. Rezultatem tego jest gradientowe rozmieszczenie białek sygnalizacyjnych i regulacyjnych odpowiedzialnych za procesy wewnątrzkomórkowe związane z przebudową cytoszkieletu [135-136]. Konsekwencją polaryzacji jest wydłużenie strefy czołowej komórki, po czym obserwuje się zjawisko adhezji i proteolizy ECM [137]. To indukuje reorganizację cytoszkieletu, m.in. poprzez działanie kofliny, gelsoliny i białka związanego z aktyną 2/3 (ang. *actin-related protein 2/3*, Arp2/3) [138-140]. Efektem tych procesów jest kurczenie się tylnej strefy komórki i zerwanie jej kontaktu z powierzchnią, co prowadzi do przemieszczenia kierunkowego. Wszystkie zjawiska związane ze zmianą architektury filamentów aktynowych, w tym polimeryzacja, depolimeryzacja, kurczenie się sieci mikrofilamentów z udziałem białek motorowych oraz ruch warstwy kurczliwej, określa się mianem dynamiki cytoszkieletu, która jest bezpośrednio związana z tworzeniem migrasomów [141-142].

Podstawą do identyfikacji migrasomów jest obecność struktur o średnicy 0,5-3 μm , ściśle przymocowanych do końców lub miejsc przecięcia włókien retrakcyjnych aktyny. Efektem migracytozy jest odłączanie się struktur błonowych od włókien retrakcyjnych i ich uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub bezpośrednio wchłanianie przez sąsiadujące komórki [143-144]. Opisane pęcherzyki zawierają wewnątrz od mniej niż 10 do 300 mniejszych struktur pęcherzykowych o średnicy 50-100nm, dlatego często są nazywane struktury przypominające granat (ang. *pomegranate-like structures*, PLS) [143-145]. Przypuszcza się, że migrasomy odzwierciedlają skład komórek, z których są wydzielane, ze względu na aktywny transport zawartości cytosolu z komórki macierzystej do pęcherzyków. Podczas tego procesu zawartość komórki macierzystej przenosi się do migrasomu, po czym tempo tworzenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych maleje [146]. Migrasomy, ze względu na swoją budowę, są strukturami podobnymi do ciała wielopęcherzykowe (ang. *multivesicular bodies*, MVB), które poprzez fuzję z błoną komórki macierzystej przyczyniają się do tworzenia egzosomów [147]. Ważną cechą, która upodabnia migrasomy do MVB, a w szczególności do wewnątrzluminalnych pęcherzyków (ang. *intraluminal vesicles*, ILV), które je budują, jest ekspresja powierzchniowych jednostek wykonawczych genów, takich jak tetraspanina-4 i tetraspanina-7 (ang. *tetraspanin-4,7*, *TSPAN4*, *TSPAN7*) [148-149]. Podobieństwo tych dwóch typów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może wskazywać na ich wspólne pochodzenie, co

stało się podstawą do wniosku, że migrasomy powstają w wyniku migracji MVB do włókien retrakcyjnych. Według tej hipotezy migrasomy powinny mieć dwuwarstwową błonę komórkową, której warstwa zewnętrzna pochodzi z włókien retrakcyjnych, podczas gdy wewnętrzna z MVB, i zawierać markery powierzchniowe charakterystyczne dla MVB, takie jak białko błony lizosomalnej związane z lizosomami 1 (ang. *lysosomal-associated membrane protein 1*, LAMP1) [54,149]. Wyniki badań naukowych wskazują jednak na znaczące rozbieżności w opisanych zagadnieniach, które obejmują między innymi obecność jednowarstwowej błony komórkowej lub brak ekspresji LAMP1, co sprawia, że hipoteza o MVB jako prekursorach migrasomów jest kontrowersyjna [150-149]. Ponadto, inne badania wykazały duże różnice między sekrecją pęcherzyków zewnątrzkomórkowych poprzez egzocytozę a migracytozę, które dotyczą głównie sposobu ich wydzielania [54, 150-151]. W procesie egzocytozy egzosomy są uwalniane z komórek przez fuzję MVB z błoną plazmatyczną, natomiast w migracytozie dochodzi do translokacji materiału cytoplazmatycznego do pęcherzyków znajdujących się na końcach włókien retrakcyjnych, co skutkuje uwolnieniem migrasomów. Migracytoza i egzocytoza różnią się nie tylko przebiegiem, ale również różnorodnością markerów przypisanych cząsteczkom sygnałowym wydzielanym podczas tych procesów [152]. W przypadku migrasomów grupę tę reprezentują białka takie jak: dwufunkcyjna heparanosiarczanowa N-deacetylaza/N-sulfotransferaza 1 (ang. *N-deacetylase/N-sulfotransferase*, *NDST1*), biosynteza kotwicy glikanowej fosfatydyloinozytolu, klasa K (ang. *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class K*, *PIGK*) i karboksypeptydaza Q (ang. *carboxypeptidase Q*, *CPQ*), które nie są ekspresjonowane przez inne typy cząsteczek sygnałowych. Jedną z najważniejszych funkcji tych białek jest udział w reakcji zapalnej. Na powierzchni migrasomów zaobserwowano również obecność białek receptorów transbłonowych, które łączą komórki z ECM, tj. integryna $\alpha 5$ i $\beta 1b$ [153-155]. Stanowią one grupę związków odpowiedzialnych za adhezję migrasomów do miejsca ich powstawania, przy czym nadekspresję tych białek obserwuje się w punkcie kontaktowym między migrasomem a włóknem retrakcyjnym. Struktura integryn obecnych na powierzchni pęcherzyków charakteryzuje się obecnością domeny homologicznej do plekstryny (ang. *pleckstrine homology domain*, ang. *PH*). Fosforylacja tych domen wpływa między innymi na zwiększoną sekrecję cytokin zapalnych. Związek migrasomów z odpowiedzią zapalną jest również widoczny w wysokim powinowactwie tych pęcherzyków do białek prozapalnych, wśród których wyróżnia się fibryonektynę [156-157]. Jednocześnie migrasomy można uznać

za nowy typ organelli komórkowych. Wykonują one specyficzne funkcje i są otoczone błoną komórkową złożoną głównie z cholesterolu, co pozwala na ich zdefiniowanie jako wyspecjalizowane podjednostki komórkowe. Na podstawie zebranych informacji można określić migrasomy jako szczególnie atrakcyjny typ pęcherzyków sygnałowych w kontekście chorób inicjowanych przez odpowiedź zapalną śródbłonna, ze względu na wysokie tempo migracji komórek odpornościowych podczas indukcji miażdżycy. Możliwym jest, że identyfikacja profilu białkowego opisanych EVs, analiza ich biosyntezy oraz szersze zrozumienie mechanizmu powstawania migrasomów mogą przyczynić się do poprawy diagnostyki i terapii chorób sercowo- naczyniowych [54, 152].

5.2. Założenia rozprawy

Badania prowadzone w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowały analizę odpowiedzi komórek śródbłonna naczyń tętnicy wieńcowej na działanie cytokiny TNF- α . Kluczowym założeniem badania było przeanalizowanie zarówno zmian strukturalnych, jak i funkcjonalnych komórek śródbłonna w warunkach fizjologicznych oraz pod wpływem czynników zapalnych. Szczególną uwagę poświęcono ocenie potencjału migracyjnego i towarzyszącemu temu formowaniu i uwalnianiu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w warunkach wzmożonego stresu komórkowego. Jednym z głównych założeń pracy była analiza zmian organizacji cytoskieletu aktynowego, co koreluje z potencjałem migracyjnym komórek śródbłonna oraz w zakresie interakcji pomiędzy dwiema sąsiadującymi komórkami i komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową.

Przyjęto hipotezę, że wysoka ekspresja cytokin zapalnych, takich jak TNF- α , w mikrośrodowisku komórkowym może zwiększać potencjał migracyjny komórek śródbłonna, prowadząc do reorganizacji cytoskieletu. Zmiany te mogą z kolei sprzyjać wzmożonej sekrecji pęcherzyków, a te być wskaźnikiem inicjacji i progresji odpowiedzi zapalnej. Przedstawione wyniki badań mają na celu pogłębienie wiedzy na temat roli cytokin zapalnych w modulacji funkcji śródbłonna, szczególnie w kontekście jego odpowiedzi na czynniki stresowe oraz potencjalnego znaczenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako biomarkerów stanu zapalnego w mikrośrodowisku komórek tworzących naczynia krwionośne. Ze względu na udział komórek śródbłonna w procesie angiogenezy, niniejsze badania miały również zweryfikować hipotezy dotyczące istnienia powiązania pomiędzy działaniem inhibitorów angiogenezy a wzmożonym albo zmniejszonym potencjałem do zależnego od migracji komórek formowania się pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Założono, że zgromadzone wyniki pozwolą ocenić mechanizm biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w środowisku wielu zmiennych oraz funkcję tych struktur błonowych w odpowiedzi na aktywację zapalną. Ze względu na silne powiązanie angiogenezy nie tylko z komórkami śródbłonna, ale również z mikrośrodowiskiem guza, jednym z założeń badania było skonfrontowanie wyników uzyskanych na ludzkich pierwotnych komórkach naczyń tętnicy wieńcowej z modelem komórkowym stanowiącym hybrydę komórek śródbłonna wyizolowanych z żyły pępowinowej z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuca linii A549, szczególnie w zakresie oceny ich odpowiedzi na czynniki hamujące angiogenezę.

5.3. Cele publikacji naukowych w kontekście rozprawy doktorskiej

Nadrzędne cele pracy doktorskiej stanowiły ocenę zdolności do formowania się pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia śródbłonkowego w warunkach prozapalnych, wyjaśnienie mechanizmu ich powstawania, a także próbę określenia funkcji biologicznych powyższych struktur błonowych w kontekście formowania nowych naczyń krwionośnych, bądź przebudowy już istniejących.

5.3.1. Cel 1 – Publikacja nr 1

Celem publikacji była ocena, czy aktywacja ekspresji endogennej *TPM1* za pomocą technologii CRISPR/Cas9 może hamować odpowiedź zapalną wywołaną przez TNF- α w środowisku pierwotnych komórek śródbłonka i mięśni gładkich ludzkich tętnic wieńcowych.

Ze względu na ilość wyników oraz złożoność przeprowadzonych analiz, niniejsza publikacja prezentuje także podrzędne cele opierające się na:

1. Analizie wpływu rekombinowanego ludzkiego TNF- α na reorganizację cytoszkieletu aktynowego w pierwotnych ludzkich komórkach śródbłonka tętnic wieńcowych (ang. *primary human coronary artery endothelial cells*, pHCAEC) oraz jego roli w promowaniu ukierunkowanej i skoordynowanej migracji tych komórek.
2. Ocenie korelacji pomiędzy formowaniem i sekrecją migrasomów a zwiększoną adhezją komórek śródbłonka do macierzy zewnątrzkomórkowej oraz siłą i funkcją interakcji włókien retrakcyjnych z sąsiednimi komórkami potencjalnie oddziałujących na ukierunkowaną migrację komórek.
3. Zbadaniu wpływu stabilizacji F-aktyny poprzez aktywację endogennej ekspresji *TPM1* na inhibicję odpowiedzi zapalnej w środowisku komórek pHCAEC, z uwzględnieniem wpływu *TPM1* na tworzenie ciągłych połączeń komórkowych oraz hamowanie proliferacji i migracji pierwotnych ludzkich komórek mięśni gładkich tętnic wieńcowych (ang. *primary human coronary artery smooth muscle cells*, pHCAEASC).

5.3.2. Cel 2 - Publikacja nr 2

Celem publikacji był przegląd danych literaturowych w obrębie dysfunkcji śródbłónka i współtowarzyszącego formowania się pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych do krwioobiegu w odpowiedzi na inicjację i rozwój odpowiedzi zapalnej. Ze względu na dane literaturowe świadczące o istotnej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w mechanizmie destabilizacji i przebudowy ściany naczyń krwionośnych, publikacja pogładowa stanowi swego rodzaju wstęp do analiz dotyczących dysfunkcji naczyniowych związanych z patofizjologią komórek śródbłónka.

5.3.3. Cel 3 - Publikacja nr 3

Celem pracy była ocena stanu zapalnego oraz komórek śródbłónka naczyniowego, które stanowiły główny obiekt badań niniejszej rozprawy doktorskiej. Aktywacja zapalna przyczynia się do inicjacji procesu formowania naczyń, określanego mianem angiogenezy, a z kolei nowo powstałe naczynia mogą podtrzymywać i nasilać proces zapalny, wskazując na wzajemną stymulację opisywanych mechanizmów. Jak wskazują dane literaturowe, z jednej strony mediatory stanu zapalnego, takie jak cytokiny czy czynniki wzrostu, inicjują i promują formowanie naczyń, podczas gdy powstałe struktury dostarczają tlen i składniki odżywcze do obszaru zapalenia.

Metodologiczny cel publikacji skupiał się na ocenie wpływu czynników hamujących angiogenezę na mechanizmy promujące destabilizację ściany naczyń i komunikację międzykomórkową związaną z wydzielaniem struktur błonowych w warunkach odpowiedzi zapalnej. Publikacja miała również na celu ocenę poziomu fluorescencji markerów naczyniowych w kontekście inicjacji i rozwoju odpowiedzi stresowej komórek śródbłónka naczyniowego indukowanej TNF- α .

5.3.4. Cel 4 - Publikacja nr 4

Celem publikacji było obrazowe przedstawienie odpowiedzi komórek EA.hy926 na działanie czynników zapalnych i substancji antyangiogennych w kontekście zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz lokalizacji i poziomu fluorescencji białek zaangażowanych w tworzenie połączeń międzykomórkowych. Ponadto, celem uzupełniającym pracy była ocena przydatności komórek linii EA.hy926 do badań nad mechanizmami angiogenezy.

5.4. Komentarze do publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora

Cykl publikacji naukowych stanowiący podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawia wyniki przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz obecny stan wiedzy w zakresie charakterystyki, mechanizmu powstawania i funkcji biologicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi zapalnej ludzkiego śródbłónka naczyń. W niniejszej rozprawie zostaną zaprezentowane najnowsze odkrycia dotyczące pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w kontekście inicjacji i progresji stanu zapalnego, uwzględniając wyniki badań własnych podkreślających znaczenie przebudowy cytoszkieletu komórek śródbłónka naczyniowego i migracji w procesie formowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich funkcji w komunikacji międzykomórkowej. Każda z publikacji koncentruje się na odrębnym aspekcie tego złożonego zagadnienia, pozwalając na poszerzenie wiedzy, jaką odgrywają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe formowane w warunkach odpowiedzi zapalnej.

5.4.1. Publikacja nr 1

Pierwsza publikacja wchodząca w skład cyklu jest pracą badawczą, która przedstawia wyniki badań *in vitro* z zakresu inicjacji endogennej ekspresji *TPM1* wykorzystującej system CRISPR/Cas9 do inhibicji zależnej od TNF- α odpowiedzi zapalnej w środowisku pierwotnych komórek śródbłónka tętnicy wieńcowej i mięśni gładkich.

Literatura wskazuje, że TNF- α jest jedną z kluczowych cytokin prozapalnych, która odgrywa istotną rolę w procesach związanych ze wzrostem, proliferacją oraz odpowiedzią komórek śródbłónka, mięśni gładkich i układu odpornościowego na bodźce zewnętrzne. Te dane stanowiły podstawę do oceny wpływu rekombinowanego ludzkiego TNF- α , wytwarzanego w komórkach HEK293, na komórki pHCAEC, szczególnie w kontekście zmian organizacji F-aktyny oraz procesów oddziaływania komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, tj. ruch i adhezja komórek. Oceniano także możliwość wykorzystania systemu CRISPR/Cas9 do hamowania śródbłonkowej odpowiedzi zapalnej przez regulację ekspresji genu *TPM1*. Otrzymane wyniki pracy wskazały na związek przebudowy cytoszkieletu aktynowego w równolegle ułożone włókna stresowe biegnące wzdłuż dłuższej osi komórek pHCAEC. Powstałe struktury umożliwiły ukierunkowany i równoległy ruch komórek indukując ukierunkowaną migrację. Ta

zmiana w organizacji F-aktyny promowała silne lecz nieciągłe kontakty na poziomie komórka-komórka, które prawdopodobnie zaangażowane były w sygnalizację pomiędzy migrującymi komórkami. Powstające formy połączeń międzykomórkowych wraz z lokalnie zwiększoną adhezją wydają się być związane z tworzeniem migrasomów określane również migracytozą. Stabilizacja cytoszkieletu aktynowego poprzez aktywację endogennej ekspresji *TPM1* oparta o system CRISPR skutkowała zahamowaniem odpowiedzi zapalnej komórek pHCAEC w skutek aktywności TNF- α i stabilizacją ciągłych połączeń międzykomórkowych.

W ramach realizacji projektu doktorskiego zwrócono uwagę, że TNF- α indukuje istotne zmiany w morfologii i organizacji cytoszkieletu aktynowego komórek śródbłonka. Zastosowanie TNF- α prowadziło do reorganizacji F-aktyny, przekształcając ją z gwiaździstych struktur w liniowe włókna stresowe, co sprzyjało formowaniu wrzecionowatej morfologii komórek. Ta reorganizacja umożliwiała ukierunkowaną i skoordynowaną migrację komórek, a także promowała powstawanie silnych, ale nieciągłych połączeń międzykomórkowych, które były kluczowe dla sygnalizacji między migrującymi komórkami. Dalsze analizy wykazały, że ekspresja kadheryny śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial cadherin*, VE-cadherin), α -kateniny i β -kateniny była znacząco zwiększona w miejscach tych połączeń, co sugeruje, że TNF- α sprzyja tworzeniu nowych punktów adhezji międzykomórkowej oraz reorganizacji połączeń międzykomórkowych, co jest istotne dla utrzymania integralności śródbłonka. Zauważono również, że ekspozycja komórek na TNF- α prowadziła do zmniejszenia migracji grupowej, co sugeruje, że TNF- α przekształca wzorzec migracji komórek z kooperatywnego na skoordynowany, gdzie komórki poruszają się w jednolitym kierunku.

Zastosowanie technologii CRISPR do aktywacji genu *TPM1* przyniosło znaczące wyniki w hamowaniu odpowiedzi zapalnej. Aktywacja *TPM1* prowadziła do stabilizacji cytoszkieletu aktynowego, co skutkowało zmniejszeniem rozszczepienia VE-kadheryny oraz utrzymaniem stabilnych poziomów α - i β -kateniny. W efekcie stabilizowane były połączenia międzykomórkowe, co zmniejszało przepuszczalność naczyń i chroniło przed nadmiernym napływem komórek układu odpornościowego do miejsc zapalnych.

Ponadto, badania wykazały, że TNF- α zwiększa zdolność komórek śródbłonka do tworzenia tubularnych struktur na powierzchni imitującej macierz zewnątrzkomórkową, co wskazuje na proangiogeny wpływ TNF- α w warunkach *in vitro*. Komórki aktywowane przez TNF- α

wykazywały także wzmożoną migrację oraz tworzenie migrasomów, które odgrywały kluczową rolę w sygnalizacji między migrującymi komórkami. Ta aktywacja migracji była szczególnie widoczna podczas testów migracji na otwarte pole, gdzie komórki wykazywały wyraźną tendencję do poruszania się w określonym kierunku z większą prędkością.

Wykorzystanie ekspresji *TPM1* do stabilizacji cytoszkieletu prowadziło do zmniejszenia proliferacji i migracji komórek mięśni gładkich tętnic wieńcowych, co sugeruje, że TPM1 może być potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu stanów zapalnych naczyń.

W niniejszej publikacji szczególną uwagę zwrócono na proces formowania migrasomów w kontekście odpowiedzi zapalnej indukowanej przez TNF- α w komórkach pHCAEC. Wykazano, że TNF- α indukuje reorganizację cytoszkieletu aktynowego, co prowadzi do powstawania włókien stresowych, które układają się równolegle wzdłuż dłuższej osi komórek śródbłonna. Ta reorganizacja jest istotna dla umożliwienia ukierunkowanej i skoordynowanej migracji komórek. Proces ten jest ściśle związany z tworzeniem migrasomów, które odgrywają istotną rolę w sygnalizacji między migrującymi komórkami.

Migrasomy są dynamicznymi strukturami, które formują się na tylnej krawędzi migrujących komórek i są związane z procesem migracytozy, czyli specyficzną formą wydzielania związaną z migracją komórek. W wyniku działania TNF- α zaobserwowano zwiększenie lokalnej adhezji komórek, co sprzyja formowaniu migrasomów. W szczególności, migrasomy uczestniczą w przekazywaniu sygnałów między komórkami, co jest kluczowe dla koordynacji ruchu komórek oraz utrzymania ciągłości warstwy śródbłonna.

W badaniach wykazano również, że stabilizacja cytoszkieletu aktynowego poprzez aktywację endogennej ekspresji genu *TPM1* za pomocą technologii CRISPR prowadzi do zahamowania odpowiedzi zapalnej, co skutkuje zmniejszeniem liczby migrasomów i stabilizacją połączeń międzykomórkowych. Tym samym, produkty genu *TPM1* mogą mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w leczeniu chorób naczyń, poprzez modulację procesu formowania migrasomów i stabilizację struktury śródbłonna.

Podsumowując, badania te dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wpływ TNF- α na komórki śródbłonna oraz wskazują na możliwe zastosowania terapeutyczne związane z regulacją ekspresji *TPM1*, co może przyczynić

się do opracowania nowych strategii leczenia chorób układu sercowo-naczyniowego. Warto wspomnieć, że była to pierwsza praca w literaturze badawczej pokazująca mechanizm formowania migrasomów w wyniku aktywacji zapalnej śródbłonna.

5.4.2. Publikacja nr 2

Kolejną publikacją wchodzącą w skład cyklu jest praca przeglądowa, która przedstawia najnowsze dane literaturowe dotyczące charakterystyki procesu zapalnego w środowisku komórek śródbłonna naczyniowego. W pracy tej opisano istotę procesu zapalnego prowadzącego do przebudowy ściany naczyń, stanowiącego podstawę nieprawidłowego rozszerzania ścian tętnic, spowodowanego osłabieniem struktury ściany naczyń.

Informacje zawarte w tej publikacji mają szczególne znaczenie, ponieważ wiążą się bezpośrednio z głównym tematem badawczym, który koncentruje się na aktywacji zapalnej komórek śródbłonna naczyń tętnicy wieńcowej. Ta aktywacja indukuje z kolei wydzielanie struktur błonowych związanych ze wzmożoną migracją komórek.

W niniejszej pracy skoncentrowano się na roli śródbłonna i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w mechanizmach komórkowych prowadzących do powstawania tętniaków aorty. Śródbłonek, który wyścieła naczynia krwionośne, odgrywa kluczową rolę w homeostazie naczyniowej, regulacji przepływu krwi, a także w reakcjach zapalnych i formowaniu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Proces zapalny, będący odpowiedzią na zaburzenie równowagi wewnątrzkomórkowej, aktywuje komórki śródbłonna (ang. *endothelial cells*, ECs) do ekspresji cząsteczek adhezyjnych, takich jak ICAM-1 i VCAM-1, które selektywnie rekrutują leukocyty do miejsca zapalenia. Ponadto, ECs mogą produkować prozapalne cytokiny, takie jak TNF- α , które promują wydzielanie innych cytokin, na przykład interleukin (ang. *interleukin*, IL): IL-1 i IL-6. Nadmierna ekspresja tych cząsteczek może prowadzić do przebudowy ściany naczyń tętniczego, zwiększenia przepuszczalności śródbłonna i akumulacji LDL w błonie wewnętrznej, co sprzyja powstawaniu blaszki miażdżycowej. Opisany proces jest także związany z rozwojem tętniaków, które są wynikiem patologicznego poszerzenia ściany naczyń.

Jak potwierdzono we wcześniejszych badaniach własnych, prezentowanych w publikacji pt. „*CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of TPM1 Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α* ”, TNF- α indukuje reorganizację cytoszkieletu aktynowego, co prowadzi do powstawania włókien stresowych F-aktyny i zwiększonej przepuszczalności śródbłónka poprzez zmniejszenie liczby i integralności połączeń międzykomórkowych. Proces ten sprzyja także migracji komórek śródbłónka, co jest niezbędne do utrzymania bariery śródbłonkowej. W literaturze opisano, że stabilizacja F-aktyny poprzez aktywację ekspresji *TPM1* może skutecznie zmniejszyć odpowiedź zapalną komórek śródbłónka, a tym samym również wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest kluczowym mechanizmem komunikacji międzykomórkowej, pozwalającym na przenoszenie sygnałów pomiędzy różnymi typami komórek bez potrzeby bezpośredniego kontaktu. Pęcherzyki te mogą zawierać białka, mRNA, miRNA oraz inne cząsteczki bioaktywne, które wpływają na funkcje komórek docelowych. EVs są różnorodną populacją pęcherzyków błonowych, które mogą mieć wielkość od 30 nm do 5 μ m. Klasyfikacja tych pęcherzyków opiera się na ich wielkości i mechanizmie powstawania, obejmując egzosomy, ektosomy i ciała apoptotyczne.

W kontekście zapalenia, EV odgrywają istotną rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz w procesach przebudowy naczyń. Wykazano, że pod wpływem TNF- α , komórki śródbłónka wydzielają EV zawierające prozapalne cytokiny oraz cząsteczki adhezyjne, które mogą przyczyniać się do wzmożonej rekrutacji leukocytów do miejsca zapalenia i nasilenia odpowiedzi zapalnej. EV mogą również przenosić miRNA, które regulują ekspresję genów w komórkach docelowych, wpływając na procesy takie jak proliferacja, migracja i apoptoza komórek. Profil białkowy EV wydzielanych przez komórki śródbłónka w odpowiedzi na TNF- α jest różnorodny i zależy od stanu fizjologicznego lub patologicznego komórek. W badaniach wykazano, że EV zawierają specyficzne białka, takie jak integryny, które są zaangażowane w procesy adhezji i migracji komórek. Wydzielanie EV może być również modulowane przez różne szlaki sygnałowe, w tym szlaki zależne od kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK/ERK) oraz rodziny homologów Ras A (ang. *ras homolog family member A*, RhoA), które regulują dynamikę cytoszkieletu i przepuszczalność naczyń.

Migrasomy, będące nowo odkrytym typem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, są związane z procesem migracytocytozy, w którym zawartość cytoplazmy komórki macierzystej jest transportowana do pęcherzyków zlokalizowanych na końcach włókien retrakcyjnych. Migrasomy zawierają mniejsze struktury przypominające granat, które mogą przenosić bioaktywne cząsteczki między komórkami. Ze względu na swoją strukturę i funkcję, migrasomy są uważane za ważny element komunikacji międzykomórkowej podczas procesów takich jak migracja komórek, gojenie ran i reakcje zapalne. W kontekście tętniaków aorty, proces zapalny prowadzi do destrukcji ECM oraz degradacji włókien kolagenowych i elastynowych przez enzymy takie jak metaloproteinazy macierzy (ang. *metalloproteinases*, MMP) i katepsyny. Wydzielanie EV przez komórki śródbłónka w odpowiedzi na sygnały zapalne, takie jak TNF- α , może odgrywać kluczową rolę w progresji tętniaków poprzez modulację lokalnych reakcji zapalnych i remodelingu naczyniowego. Profil białkowy i zawartość EV mogą również służyć jako biomarkery diagnostyczne oraz cele terapeutyczne w leczeniu chorób naczyniowych.

Podsumowując, publikacja pt.: „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation” dostarcza szczegółowych informacji na temat roli śródbłónka i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w procesach zapalnych i przebudowy naczyń. Zrozumienie mechanizmów regulujących wydzielanie i funkcję EV w kontekście zapalenia i chorób naczyniowych może przyczynić się do rozwoju nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych, poprawiających profilaktykę i leczenie tych schorzeń. Szereg doniesień zaprezentowanych w niniejszej pracy przeglądowej, jak także publikacji nr 1 ujętej w niniejszej rozprawie doktorskiej, podkreśla znaczenie interakcji międzykomórkowych i komunikacji pęcherzykowej w patogenezie tętniaków aorty oraz innych chorób układu sercowo-naczyniowego.

5.4.3. Publikacja nr 3

Kolejna praca wchodząca w skład cyklu publikacji dotyczy wpływu inhibitorów angiogenezy na aktywację zapalną w ludzkich komórkach śródbłónka naczyniowego. Inicjacja i postęp stanu zapalnego mogą zwiększać wydzielanie aktywatorów angiogenezy, które wiążą się z receptorami na powierzchniach komórek śródbłónka, stymulując w ten sposób proliferację komórek oraz zwiększając ich migrację, co stało się istotnym czynnikiem ryzyka miażdżycy, w kontekście głównego tematu pracy.

Aby zbadać skuteczność inhibitorów angiogenezy na zmiany w procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych i związanym z tym procesem formowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w badaniu wykorzystano leki przeciwingiogenne: Bewacizumab, Pazopanib i KRN-633. Model naczyniowy obejmował linię komórkową pHCAEC, pozostając w obszarze rozważań niniejszej rozprawy doktorskiej. Nadrzędnym celem publikacji była indukcja stanu zapalnego w środowisku komórek wyścielających wewnętrzną warstwę ściany naczyń tętniczych aktywowanych ekspresją cytokiny TNF- α , a następnie obserwacja efektów morfologicznych i strukturalnych w porównaniu z aktywowanymi zapalnie komórkami potraktowanymi dodatkowo wymienionymi powyżej trzema inhibitorami angiogenezy.

Bewacizumab, jako przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko VEGF, hamuje angiogenezę poprzez blokowanie receptorów VEGF na powierzchni komórek śródbłónka. W badaniach wykazano, że traktowanie komórek śródbłónka Bewacizumabem prowadziło do obrzęku komórek i całkowitej degradacji cytoszkieletu aktynowego, co było widoczne w postaci struktur pęcherzykowych na powierzchni obrzmiałych komórek. W kombinacji z TNF- α , Bewacizumab powodował jednocześnie obrzęki i kurczenie się komórek, co było związane z niemal całkowitą degradacją cytoszkieletu aktynowego i utratą ciągłości warstwy śródbłónka.

Druga substancja – Pazopanib, jako inhibitor kinaz tyrozynowych, działa na receptory VEGF, PDGF i c-Kit. Badania wykazały, że Pazopanib znacząco wpływał na wydzielanie EVs przez komórki śródbłónka traktowane TNF- α , silnie przytwierdzone do włókien retrakcyjnych oraz rozmieszczonych wolno w przestrzeni międzykomórkowej. W przypadku kombinacji TNF- α i Pazopanibu, zaobserwowano całkowitą redukcję intensywności fluorescencji VE-kadheryny, co wskazuje na głębokie zmiany w strukturze cytoszkieletu i interakcjach międzykomórkowych.

KRN-633, inhibitor receptorów VEGF, wykazywał podobne efekty do Pazopanibu, zmieniając profil EV wydzielanych przez komórki śródbłónka pod wpływem TNF- α . EV te zawierały zmniejszoną ilość czynników proangiogennych oraz białek adhezyjnych, co mogło ograniczać migrację i proliferację komórek śródbłónka w warunkach zapalnych. Traktowanie komórek KRN-633 prowadziło do całkowitej dezintegracji cytoszkieletu zarówno w obecności samego inhibitora, jak i w kombinacji z TNF- α , co wskazuje na silne działanie przeciwingiogenne tego związku.

Podsumowując, wpływ związków antyangiogennych, w połączeniu z działaniem cytokin prozapalnych na komórki pHCAEC wywoływał zmiany strukturalne w cytoszkiecie aktynowym, wykazując dodatkowo obecność entozy, określanej kanibalizmem komórek oraz struktur przypominających pęcherzyki apoptotyczne. Ponadto, stan zapalny w linii komórek pHCAEC nasilał działanie zastosowanych w badaniu związków, prowadząc do zwiększonego rozpadu cytoszkieletu komórek śródbłónka.

Pazopanib w połączeniu z TNF- α powodował powstawanie struktur pęcherzykowych wzdłuż przebiegu włókien retrakcyjnych F-aktyny w migrujących komórkach pHCAEC. Natomiast KRN-633 w połączeniu z TNF- α skutkował translokacją VE-kadheryny do jądra komórkowego, co wskazuje na zmiany w mechanizmach adhezji międzykomórkowej.

Wyniki badania sugerują, że inhibitory angiogenezy, mogą stanowić nowatorskie podejście terapeutyczne do regulacji funkcji układu sercowo-naczyniowego oraz leczenia zaburzeń związanych z przebudową naczyń, zwłaszcza w warunkach zapalnych.

5.4.4. Publikacja nr 4

Ostatnia publikacja cyklu jest również pracą badawczą, w której dokonano oceny wpływu inhibitorów angiogenezy na aktywność zapalną w komórkach linii EA.hy926, ze szczególnym uwzględnieniem potencjału formowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich profilu funkcjonalnego w odpowiedzi na działanie TNF- α . Nieprzypadkowy stał się zarówno model komórkowy wykorzystany w niniejszym badaniu, który stanowi hybrydę komórek naczyniowych wyizolowanych ze sznura pępowinowego (ang. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) z komórkami niedrobnokomórkowego raka płuc, jak i wybór związków wykorzystanych do realizacji eksperymentów w ramach przedłożonej publikacji.

Głównym celem tego badania, stanowiącym jednocześnie ostatni cel niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena przydatności komórek linii EA.hy926 do badań nad mechanizmami angiogenezy ze względu na bilateralny charakter tych komórek. Zaimplementowanie warunków identycznych do metodologii badawczej w publikacji pt. „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells” było także zamierzonym działaniem, ze względu na poszukiwanie odpowiedzi na pytanie czy komórki śródbłonna reagują na czynniki aktywacji zapalnej i inhibitory angiogenezy w podobny sposób do komórek hybrydowych EA.hy926.

Wykazano, że inhibitory angiogenezy modulują wydzielanie EVs przez komórki EA.hy926 oraz wpływają na ich skład i funkcję, co może mieć znaczące implikacje dla rozwoju nowych terapii ukierunkowanych na zmniejszenie odpowiedzi zapalnej oraz zahamowanie angiogenezy. Ostatecznie, zrozumienie roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w kontekście zapalnej aktywacji przez TNF- α oraz wpływu inhibitorów angiogenezy na te procesy, może otworzyć nowe perspektywy terapeutyczne nie tylko w leczeniu chorób naczyniowych, ale również chorób nowotworowych. Dzięki dalszym badaniom, rozwijającym nasze wcześniejsze doniesienia możliwe będzie lepsze zrozumienie mechanizmów działania EVs oraz ich potencjalnych zastosowań klinicznych, co może przyczynić się do opracowania skutecznych strategii leczenia.

5.5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań ujętych w publikacjach naukowych stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej można wnioskować, że:

1. Aktywacja endogennej ekspresji *TPM1* z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 skutecznie hamuje odpowiedź zapalną indukowaną przez TNF- α w środowisku naczyniowym, na modelowym przykładzie pierwotnych komórek śródbłonna i mięśni gładkich tętnic wieńcowych. Endogenna ekspresja *TPM1* stabilizuje włókna F-aktyny, co zmniejsza potencjał do migracji i proliferacji komórek wyścielających ściany naczyń krwionośnych. Może mieć to kluczowe znaczenie w kontekście prewencji chorób, u podłoża których leży nadmierna odpowiedź zapalna i remodeling kompensacyjny w obszarze układu krążenia (Publikacja nr 1).
2. Obecność cytokiny zapalnej TNF- α w środowisku pierwotnych komórek śródbłonna i mięśni gładkich tętnic wieńcowych wpływa na reorganizację cytoszkieletu aktynowego, oddziałując tym samym na dynamikę adhezji komórek wyściółki naczyń krwionośnych do ECM. Opisany mechanizm odgrywa istotną rolę w formowaniu i sekrecji migrasomów – pęcherzyków zewnątrzkomórkowych powstających i wydzielanych w odpowiedzi na wzmożony ruch komórek (Publikacja nr 1).
3. Proces formowania i uwalniania migrasomów jest ściśle związany ze wzrostem wytrzymałości połączeń włókien retrakcyjnych z sąsiadującymi komórkami. Migrasomy są szczególnie istotne w świetle komunikacji międzykomórkowej, promując tym samym ukierunkowaną migrację regulowaną aktywnością cytokin zapalnych w środowisku pierwotnych komórek śródbłonna i mięśni gładkich tętnic wieńcowych (Publikacja nr 1).
4. Na podstawie dostępnych danych literaturowych potwierdzono, że proces formowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na aktywację zapalną komórek śródbłonna naczyniowego odgrywa istotną rolę w mechanizmie inicjacji i progresji dysfunkcji śródbłonna. To z kolei wzmacnia proces zapalny oraz wpływa na zmiany strukturalne w obrębie ściany naczyń krwionośnych, co przyspiesza progresję chorób naczyniowych. Z drugiej strony, ze względu na transportowany ładunek oraz eksponowane na błonie zewnętrznej białka powierzchniowe, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą pełnić rolę swoistego markera stanu zapalnego wyściółki naczyń krwionośnych (Publikacja nr 2).

5. Istnieje wzajemna korelacja pomiędzy angiogenezą a aktywacją zapalną komórek śródbłónka. Cytokiny i czynniki wzrostu indukują powstawanie nowych naczyń, które wspierają proces zapalny poprzez dostarczanie tlenu i składników odżywczych do miejsc zapalenia. Wykorzystywane w terapii antyangiogennej substancje (Bevacizumab, Pazopanib, KRN-633) potęgują efekt dezintegracji cytoszkieletu komórek śródbłónka, prowadząc do obrzmienia, zaburzeń interakcji międzykomórkowych, a także formowania pęcherzyków, których sekrecja nasila się wraz ze wzrostem stężenia cytokin prozapalnych w środowisku naczyniowym, co podkreśla znaczącą rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, zwłaszcza tych zależnych od migracji, w komunikacji międzykomórkowej i mechanizmach sygnalizacyjnych (Publikacja nr 3).

6. Wyniki badań obrazowych potwierdziły użyteczność komórek linii EA.hy926 w badaniach nad angiogenezą i odpowiedzią zapalną ze względu na tożsamość z komórkami śródbłónka naczyń tętnicy wieńcowej odpowiedzią na aktywność zapalną cytokiny TNF- α i związków antyangiogennych (Publikacja nr 4).

5.6. Piśmiennictwo

- [1] Buddingh' BC, Elzinga J, van Hest JCM. Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal. *Nat Commun.* 2020 Apr 3;11(1):1652. doi: 10.1038/s41467-020-15482-8.
- [2] Ahmed KA, Xiang J. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *J Cell Mol Med.* 2011 Jul;15(7):1458-73. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01008.x.
- [3] Berumen Sánchez G, Bunn KE, Pua HH, Rafat M. Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. *Cell Commun Signal.* 2021 Oct 16;19(1):104. doi: 10.1186/s12964-021-00787-y.
- [4] Billman GE. Homeostasis: The Underappreciated and Far Too Often Ignored Central Organizing Principle of Physiology. *Front Physiol.* 2020 Mar 10;11:200. doi: 10.3389/fphys.2020.00200.
- [5] Cooper SJ. From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. *Appetite.* 2008 Nov;51(3):419-27. doi: 10.1016/j.appet.2008.06.005.
- [6] Torday JS. Homeostasis as the Mechanism of Evolution. *Biology (Basel).* 2015 Sep 15;4(3):573-90. doi: 10.3390/biology4030573.
- [7] Ramsay DS, Woods SC. Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychol Rev.* 2014 Apr;121(2):225-47. doi: 10.1037/a0035942.
- [8] Wang S, Qin L. Homeostatic medicine: a strategy for exploring health and disease. *Curr Med (Cham).* 2022;1(1):16. doi: 10.1007/s44194-022-00016-9.
- [9] Goldstein DS. How does homeostasis happen? Integrative physiological, systems biological, and evolutionary perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019 Apr 1;316(4):R301- R317. doi: 10.1152/ajpregu.00396.2018.
- [10] Valls PO, Esposito A. Signalling dynamics, cell decisions, and homeostatic control in health and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2022 Apr;75:102066. doi:10.1016/j.ceb.2022.01.011.

- [11] Su J, Song Y, Zhu Z, Huang X, Fan J, Qiao J, Mao F. Cell-cell communication: new insights and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Aug 7;9(1):196. doi: 10.1038/s41392-024-01888-z.
- [12] Di X, Gao X, Peng L, Ai J, Jin X, Qi S, Li H, Wang K, Luo D. Cellular mechanotransduction in health and diseases: from molecular mechanism to therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Jul 31;8(1):282. doi: 10.1038/s41392-023-01501-9.
- [13] Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:275-302. doi: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140040.
- [14] Laub MT. Keeping Signals Straight: How Cells Process Information and Make Decisions. *PLoS Biol*. 2016 Jul 18;14(7):e1002519. doi: 10.1371/journal.pbio.
- [15] Combarous Y, Nguyen TMD. Cell Communications among Microorganisms, Plants, and Animals: Origin, Evolution, and Interplays. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 28;21(21):8052. doi: 10.3390/ijms21218052.
- [16] Favier AL, Nikovics K. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation and Tissue Regeneration. *Biomedicines*. 2023 May 10;11(5):1416. doi: 10.3390/biomedicines11051416.
- [17] Avalos PN, Forsthoefel DJ. An Emerging Frontier in Intercellular Communication: Extracellular Vesicles in Regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 11;10:849905. doi: 10.3389/fcell.2022.849905.
- [18] Di Cesare M, Perel P, Taylor S, Kabudula C, Bixby H, Gaziano TA, McGhie DV, Mwangi J, Pervan B, Narula J, Pineiro D, Pinto FJ. The Heart of the World. *Glob Heart*. 2024 Jan 25;19(1):11. doi: 10.5334/gh.1288.
- [19] Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views*. 2017 Jul-Sep;18(3):109-114. doi: 10.4103/HEARTVIEWS.HEARTVIEWS_106_17.
- [20] Kreamsoulas C, Anand SS. The impact of social determinants on cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2010 Aug-Sep;26 Suppl C(Suppl C):8C-13C. doi: 10.1016/s0828-282x(10)71075-8.

- [21] Das P, Saha S, Das T, Das P, Roy TB. Assessing the modifiable and non-modifiable risk factors associated with multimorbidity in reproductive aged women in India. *BMC Public Health*. 2024 Mar 4;24(1):676. doi: 10.1186/s12889-024-18186-6.
- [22] Johansson A, Drake I, Engström G, Acosta S. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors for Atherothrombotic Ischemic Stroke among Subjects in the Malmö Diet and Cancer Study. *Nutrients*. 2021 Jun 6;13(6):1952. doi: 10.3390/nu13061952.
- [23] Brown JC, Gerhardt TE, Kwon E. Risk Factors for Coronary Artery Disease. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554410/>
- [24] Johnson NB, Hayes LD, Brown K, Hoo EC, Ethier KA., Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC National Health Report: leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors--United States, 2005-2013. *MMWR Suppl*. 2014 Oct 31;63(4):3-27.
- [25] Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*. 2014 Mar 15;383(9921):999-1008. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61752-3.
- [26] Institute of Medicine (US) Committee on Assuring the Health of the Public in the 21st Century. The Future of the Public's Health in the 21st Century. Washington (DC): National Academies Press (US); 2002. 2, Understanding Population Health and Its Determinants. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK221225/>
- [27] Dovjak M, Kušec A. Creating Healthy and Sustainable Buildings: An Assessment of Health Risk Factors [Internet]. Cham (CH): Springer; 2019. Chapter 3, Identification of Health Risk Factors and Their Parameters. 2019 May 29. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553923/>
- [28] Gooding HC, Gidding SS, Moran AE, Redmond N, Allen NB, Bacha F, Burns TL, Catov JM, Grandner MA, Harris KM, Johnson HM, Kiernan M, Lewis TT, Matthews KA, Monaghan M, Robinson JG, Tate D, Bibbins-Domingo K, Spring B. Challenges and Opportunities for the

Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease Among Young Adults: Report From a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group. *J Am Heart Assoc.* 2020 Oct 20;9(19):e016115. doi: 10.1161/JAHA.120.016115.

[29] Ullah A, Kumar M, Sayyar M, Sapna F, John C, Memon S, Qureshi K, Agbo EC, Ariri HI, Chukwu EJ, Varrassi G, Khatri M, Kumar S, Elder NM, Mohamad T. Revolutionizing Cardiac Care: A Comprehensive Narrative Review of Cardiac Rehabilitation and the Evolution of Cardiovascular Medicine. *Cureus.* 2023 Oct 4;15(10):e46469. doi: 10.7759/cureus.46469.

[30] Frostegård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* 2013 May 1;11:117. doi: 10.1186/1741-7015-11-117.

[31] Milutinović A, Šuput D, Zorc-Plesković R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020 Feb 5;20(1):21-30. doi: 10.17305/bjbms.2019.4320.

[32] Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen MR, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozoglu L, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020 Jun 21;41(24):2313-2330. doi: 10.1093/eurheartj/ehz962.

[33] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994 May;89(5):2462-78. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2462.

[34] Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jul 1;2019:8563845. doi: 10.1155/2019/8563845.

- [35] Insull W Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* 2009 Jan;122(1Suppl):S3-S14. doi:10.1016/j.amjmed.2008.10.013.
- [36] Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014 Jun 6;114(12):1852-66. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.
- [37] Scheitz JF, Sposato LA, Schulz-Menger J, Nolte CH, Backs J, Endres M. Stroke-Heart Syndrome: Recent Advances and Challenges. *J Am Heart Assoc.* 2022 Sep 6;11(17):e026528. doi: 10.1161/JAHA.122.026528.
- [38] Młynarska E, Czarnik W, Fularski P, Hajdys J, Majchrowicz G, Stabrawa M, Rysz J, Franczyk B. From Atherosclerotic Plaque to Myocardial Infarction-The Leading Cause of Coronary Artery Occlusion. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 2;25(13):7295. doi: 10.3390/ijms25137295.
- [39] Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, De Caterina R. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors-a review. *Cardiovasc Res.* 2018 Jan 1;114(1):35-52. doi: 10.1093/cvr/cvx226.
- [40] Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Sep 15;2020:5245308. doi: 10.1155/2020/5245308.
- [41] Chen C, Khismatullin DB. Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells. *PLoS One.* 2015 Mar 26;10(3):e0123088. doi: 10.1371/journal.pone.0123088.
- [42] Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- [43] Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014 Aug;5(8):927-46.
- [44] Arjmandi-Tash O, Razavi SE, Zambouri R. Possibility of atherosclerosis in an arterial bifurcation model. *Bioimpacts.* 2011;1(4):225-8. doi: 10.5681/bi.2011.032.

- [45] Maurice P, Blaise S, Gayral S, Debelle L, Laffargue M, Hornebeck W, Duca L. Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept. *Trends Cardiovasc Med*. 2013 Aug;23(6):211-21. doi: 10.1016/j.tcm.2012.12.004.
- [46] Soehnlein O, Drechsler M, Hristov M, Weber C. Functional alterations of myeloid cell subsets in hyperlipidaemia: relevance for atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2009 Nov-Dec;13(11-12):4293-303. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00965.x.
- [47] Georgescu A, Simionescu M. Extracellular Vesicles: Versatile Nanomediators, Potential Biomarkers and Therapeutic Agents in Atherosclerosis and COVID-19-Related Thrombosis. *Int J Mol Sci*. 2021 May 31;22(11):5967. doi: 10.3390/ijms22115967.
- [48] Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Apr 22;7(1):131. doi: 10.1038/s41392-022-00955-7.
- [49] Olejars W, Sadowski K, Radoszkiewicz K. Extracellular Vesicles in Atherosclerosis: State of the Art. *Int J Mol Sci*. 2023 Dec 27;25(1):388. doi: 10.3390/ijms25010388.
- [50] Patel S, Guo MK, Abdul Samad M, Howe KL. Extracellular vesicles as biomarkers and modulators of atherosclerosis pathogenesis. *Front Cardiovasc Med*. 2023 May 26;10:1202187. doi: 10.3389/fcvm.2023.1202187.
- [51] Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 26;24(9):7910. doi: 10.3390/ijms24097910.
- [52] Henein MY, Vancheri S, Longo G, Vancheri F. The Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 26;23(21):12906. doi: 10.3390/ijms232112906.
- [53] Li M, Qian M, Kyler K, Xu J. Endothelial-Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2018 Oct 23;5:151. doi: 10.3389/fcvm.2018.00151.
- [54] Mikołajczyk K, Spyt D, Zielińska W, Żuryń A, Faisal I, Qamar M, Świniarski P, Grzanka A, Gagat M. The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 6;22(23):13157. doi: 10.3390/ijms222313157.

- [55] Dugina VB, Shagieva GS, Shakhov AS, Alieva IB. The Cytoplasmic Actins in the Regulation of Endothelial Cell Function. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 22;22(15):7836. doi: 10.3390/ijms22157836.
- [56] Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Mar;288(3):H1296-305. doi: 10.1152/ajpheart.00687.2004.
- [57] Guak H, Krawczyk CM. Implications of cellular metabolism for immune cell migration. *Immunology.* 2020 Nov;161(3):200-208. doi: 10.1111/imm.13260.
- [58] Gagat M, Zielińska W, Mikołajczyk K, Zabrzyński J, Krajewski A, Klimaszewska-Wiśniewska A, Grzanka D, Grzanka A. CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of TPM1 Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α . *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 17;9:668032. doi: 10.3389/fcell.2021.668032.
- [59] Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed Res Int.* 2014;2014:801896. doi: 10.1155/2014/801896.
- [60] Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004 Jul;93(1):105-13. doi: 10.1093/bja/ae163.
- [61] Stanek A, Fazeli B, Bartuś S, Sutkowska E. The Role of Endothelium in Physiological and Pathological States: New Data. *Biomed Res Int.* 2018 Nov 18;2018:1098039. doi: 10.1155/2018/1098039.
- [62] Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 8;22(8):3850. doi: 10.3390/ijms22083850.
- [63] Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013 Nov 9;9(10):1057-69. doi: 10.7150/ijbs.7502.

- [64] Campinho P, Vilfan A, Vermot J. Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior. *Front Physiol.* 2020 Jun 5;11:552. doi: 10.3389/fphys.2020.00552.
- [65] Ouarné M, Pena A, Franco CA. From remodeling to quiescence: The transformation of the vascular network. *Cells Dev.* 2021 Dec;168:203735. doi: 10.1016/j.cdev.2021.203735.
- [66] Luo X, Jian W. Different roles of endothelial cell-derived fibronectin and plasma fibronectin in endothelial dysfunction. *Turk J Med Sci.* 2023 Oct 25;53(6):1667-1677. doi: 10.55730/1300-0144.5735.
- [67] Mutgan AC, Jandl K, Kwapiszewska G. Endothelial Basement Membrane Components and Their Products, Matrikines: Active Drivers of Pulmonary Hypertension? *Cells.* 2020 Sep 3;9(9):2029. doi: 10.3390/cells9092029.
- [68] Khramova A, Boi R, Fridén V, Granqvist AB, Nilsson U, Tenstad O, Oveland E, Haraldsson B, Ebefors K, Nyström J. Proteoglycans contribute to the functional integrity of the glomerular endothelial cell surface layer and are regulated in diabetic kidney disease. *Sci Rep.* 2021 Apr 19;11(1):8487. doi: 10.1038/s41598-021-87753-3.
- [69] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Oct;17(10):611-25. doi: 10.1038/nrm.2016.87.
- [70] Viñals F, Pouyssegur J. Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol.* 2001 Nov;21(21):7218-30. doi: 10.1128/MCB.21.21.7218-7230.2001.
- [71] Bach LA. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol.* 2015 Feb;54(1):R1-13. doi: 10.1530/JME-14-0215.
- [72] Méndez-Barbero N, Gutiérrez-Muñoz C, Blanco-Colio LM. Cellular Crosstalk between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Vascular Wall Remodeling. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 6;22(14):7284. doi: 10.3390/ijms22147284.

- [73] Luk C, Haywood NJ, Bridge KI, Kearney MT. Paracrine Role of the Endothelium in Metabolic Homeostasis in Health and Nutrient Excess. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Apr 26;9:882923. doi: 10.3389/fcvm.2022.882923.
- [74] Lu Y, Yang Y, Xiao L, Li S, Liao X, Liu H. Autocrine and Paracrine Effects of Vascular Endothelial Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *Biomed Res Int*. 2021 Apr 10;2021:6695663. doi: 10.1155/2021/6695663.
- [75] Reiterer M, Branco CM. Endothelial cells and organ function: applications and implications of understanding unique and reciprocal remodelling. *FEBS J*. 2020 Mar;287(6):1088-1100. doi: 10.1111/febs.15143.
- [76] Katoh K. Effects of Mechanical Stress on Endothelial Cells In Situ and tpm. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 20;24(22):16518. doi: 10.3390/ijms242216518.
- [77] Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol*. 2004 Mar;141(6):881-903. doi: 10.1038/sj.bjp.0705698.
- [78] Kang KT. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicol Res*. 2014 Sep;30(3):141-8. doi: 10.5487/TR.2014.30.3.141.
- [79] Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem*. 2006;13(14):1655-65. doi: 10.2174/092986706777441968.
- [80] Shatanawi A, Romero MJ, Iddings JA, Chandra S, Umapathy NS, Verin AD, Caldwell RB, Caldwell RW. Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 May;300(5):C1181-92. doi: 10.1152/ajpcell.00328.2010.
- [81] Ashton AW, Ware JA. Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ Res*. 2004 Aug 20;95(4):372-9. doi: 10.1161/01.RES.0000138300.41642.15.
- [82] Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018 Jan;100:1-19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.

- [83] Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(2):119-29. doi: 10.2147/vhrm.1.2.119.64083.
- [84] Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation.* 2002 Oct 29;106(18):2372-8. doi: 10.1161/01.cir.0000033972.90653.af.
- [85] Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2006 Jun;4(6):1186-93. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01949.x.
- [86] Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012 Jan;10(1):4-18. doi: 10.2174/157016112798829760.
- [87] Xu H, Fang B, Du S, Wang S, Li Q, Jia X, Bao C, Ye L, Sui X, Qian L, Luan Z, Yang G, Zheng F, Wang N, Chen L, Zhang X, Guan Y. Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis. *JCI Insight.* 2020 Jul 9;5(13):e138505. doi: 10.1172/jci.insight.138505.
- [88] Chen H. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018 Jan;134:32-37. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2017.11.004.
- [89] Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, Martial JA, DeClerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell.* 2008 Oct 7;14(4):324-34. doi: 10.1016/j.ccr.2008.08.012.
- [90] Tyagi N, Roberts AM, Dean WL, Tyagi SC, Lominadze D. Fibrinogen induces endothelial cell permeability. *Mol Cell Biochem.* 2008 Jan;307(1-2):13-22. doi: 10.1007/s11010-007-9579-2.
- [91] Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis C, Tousoulis D. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines.* 2021 Jul 6;9(7):781. doi: 10.3390/biomedicines9070781.

- [92] Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Apr;22(2):240-73, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00046-08.
- [93] Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.
- [94] Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i2.10.
- [95] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jul;49(7):1215-28. doi: 10.1093/rheumatology/keq031.
- [96] Kaur R, Singh V, Kumari P, Singh R, Chopra H, Emran TB. Novel insights on the role of VCAM-1 and ICAM-1: Potential biomarkers for cardiovascular diseases. *Ann Med Surg (Lond).* 2022 Oct 31;84:104802. doi: 10.1016/j.amsu.2022.104802.
- [97] Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, Dobrina A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol.* 1998 Sep 7;142(5):1381-91. doi: 10.1083/jcb.142.5.1381.
- [98] Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Apr 18;13(5):328-35. doi: 10.1038/nrm3335.
- [99] Altan-Bonnet G, Mukherjee R. Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nat Rev Immunol.* 2019 Apr;19(4):205-217. doi: 10.1038/s41577-019-0131-x.
- [100] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Signaling Molecules and Their Receptors. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9924/>
- [101] Kolluru GK, Shen X, Yuan S, Kevil CG. Gasotransmitter Heterocellular Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Jun 1;26(16):936-960. doi: 10.1089/ars.2016.6909.

- [102] Bertani F, Di Francesco D, Corrado MD, Talmon M, Fresu LG, Boccafroschi F. Paracrine Shear- Stress-Dependent Signaling from Endothelial Cells Affects Downstream Endothelial Function and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 10;22(24):13300. doi: 10.3390/ijms222413300.
- [103] Mattes B, Scholpp S. Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochem Cell Biol.* 2018 Nov;150(5):431-442.
- [104] Rubinow KB. An intracrine view of sex steroids, immunity, and metabolic regulation. *Mol Metab.* 2018 Sep;15:92-103. doi: 10.1016/j.molmet.2018.03.001.
- [105] Miller EJ, Lappin SL. Physiology, Cellular Receptor. [Updated 2022 Sep 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554403/>
- [106] Li X, Yang S, Zhang M, Yang Y, Peng L. Identification of Pathogenicity-Related Effector Proteins and the Role of Piwsc1 in the Virulence of *Penicillium italicum* on Citrus Fruits. *J Fungi (Basel).* 2022 Jun 20;8(6):646. doi: 10.3390/jof8060646.
- [107] Ghusinga KR, Jones RD, Jones AM, Elston TC. Molecular switch architecture determines response properties of signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Mar 16;118(11):e2013401118. doi: 10.1073/pnas.2013401118.
- [108] Mosaddeghzadeh N, Ahmadian MR. The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells.* 2021 Jul 20;10(7):1831. doi: 10.3390/cells10071831.
- [109] Sarria I, Pahlberg J, Cao Y, Kolesnikov AV, Kefalov VJ, Sampath AP, Martemyanov KA. Sensitivity and kinetics of signal transmission at the first visual synapse differentially impact visually-guided behavior. *Elife.* 2015 Apr 16;4:e06358. doi: 10.7554/eLife.06358.
- [110] Uhl LFK, Gérard A. Modes of Communication between T Cells and Relevance for Immune Responses. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 11;21(8):2674. doi: 10.3390/ijms21082674.
- [111] Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):279-367. doi: 10.1152/physrev.00012.2005.

- [112] Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L. Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1139-43. doi: 10.1172/JCI87316.
- [113] Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ*. 2013 Apr;3(2):329-40. doi: 10.4103/2045-8932.114760.
- [114] De Sousa KP, Rossi I, Abdullahi M, Ramirez MI, Stratton D, Inal JM. Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2023 Jan;15(1):e1835. doi: 10.1002/wnan.1835.
- [115] Antich-Rosselló M, Forteza-Genestra MA, Calvo J, Gayà A, Monjo M, Ramis JM. Customizing the extracellular vesicles release and effect by strategizing surface functionalization of titanium. *Sci Rep*. 2022 May 5;12(1):7399. doi: 10.1038/s41598-022-11475-3.
- [116] Fyfe J, Dye D, Razak NBA, Metharom P, Falasca M. Immune evasion on the nanoscale: Small extracellular vesicles in pancreatic ductal adenocarcinoma immunity. *Semin Cancer Biol*. 2023 Nov;96:36-47. doi: 10.1016/j.semcancer.2023.09.004.
- [117] Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019 Jul 15;8(7):727. doi: 10.3390/cells8070727.
- [118] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- [119] Prieto-Vila M, Yoshioka Y, Ochiya T. Biological Functions Driven by mRNAs Carried by Extracellular Vesicles in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Aug 30;9:620498. doi: 10.3389/fcell.2021.620498.
- [120] Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol*. 2017 Mar;27(3):172-188. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.003.

- [121] Petroni D, Fabbri C, Babboni S, Menichetti L, Basta G, Del Turco S. Extracellular Vesicles and Intercellular Communication: Challenges for In Vivo Molecular Imaging and Tracking. *Pharmaceutics*. 2023 Jun 1;15(6):1639. doi: 10.3390/pharmaceutics15061639.
- [122] Zanirati G, Dos Santos PG, Alcará AM, Bruzzo F, Ghilardi IM, Wietholter V, Xavier FAC, Gonçalves JIB, Marinowic D, Shetty AK, da Costa JC. Extracellular Vesicles: The Next Generation of Biomarkers and Treatment for Central Nervous System Diseases. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 5;25(13):7371. doi: 10.3390/ijms25137371.
- [123] Jiang Y, Liu X, Ye J, Ma Y, Mao J, Feng D, Wang X. Migrasomes, a new mode of intercellular communication. *Cell Commun Signal*. 2023 May 8;21(1):105. doi: 10.1186/s12964-023-01121-4.
- [124] Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res*. 2015 Jan;25(1):24-38. doi: 10.1038/cr.2014.135.
- [125] Zhang Y, Guo W, Bi M, Liu W, Zhou L, Liu H, Yan F, Guan L, Zhang J, Xu J. Migrasomes: From Biogenesis, Release, Uptake, Rupture to Homeostasis and Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Apr 14;2022:4525778. doi: 10.1155/2022/4525778.
- [126] Kurosaka S, Kashina A. Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008 Jun;84(2):102-22. doi: 10.1002/bdrc.20125.
- [127] Ayres JS. The Biology of Physiological Health. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):250-269. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.036.
- [128] Neufer PD, Bamman MM, Muoio DM, Bouchard C, Cooper DM, Goodpaster BH, Booth FW, Kohrt WM, Gerszten RE, Mattson MP, Hepple RT, Kraus WE, Reid MB, Bodine SC, Jakicic JM, Fleg JL, Williams JP, Joseph L, Evans M, Maruvada P, Rodgers M, Roary M, Boyce AT, Drugan JK, Koenig JI, Ingraham RH, Krotoski D, Garcia-Cazarin M, McGowan JA, Laughlin MR. Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms of Physical Activity-Induced Health Benefits. *Cell Metab*. 2015 Jul 7;22(1):4-11. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.011.

- [129] Schaap P. Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. Development. 2011 Feb;138(3):387-96. doi: 10.1242/dev.048934.
- [130] Williams RSB, Chubb JR, Insall R, King JS, Pears CJ, Thompson E, Weijer CJ. Moving the Research Forward: The Best of British Biology Using the Tractable Model System Dictyostelium discoideum. Cells. 2021 Nov 5;10(11):3036. doi: 10.3390/cells10113036.
- [131] Spatarelu CP, Zhang H, Trung Nguyen D, Han X, Liu R, Guo Q, Notbohm J, Fan J, Liu L, Chen Z. Biomechanics of Collective Cell Migration in Cancer Progression: Experimental and Computational Methods. ACS Biomater Sci Eng. 2019;5(8):3766-3787. doi: 10.1021/acsbiomaterials.8b01428.
- [132] Inaki M, Vishnu S, Cliffe A, Rørth P. Effective guidance of collective migration based on differences in cell states. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 7;109(6):2027-32. doi: 10.1073/pnas.1115260109.
- [133] Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. J Biomech Eng. 2017 Feb 1;139(2):0210051–9. doi: 10.1115/1.4035121.
- [134] Soares H, Carmona B, Nolasco S, Viseu Melo L. Polarity in Ciliate Models: From Cilia to Cell Architecture. Front Cell Dev Biol. 2019 Oct 18;7:240. doi: 10.3389/fcell.2019.00240.
- [135] Babich A, Burkhardt JK. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. Immunol Rev. 2013 Nov;256(1):80-94. doi: 10.1111/imr.12123.
- [136] Cheng Y, Felix B, Othmer HG. The Roles of Signaling in Cytoskeletal Changes, Random Movement, Direction-Sensing and Polarization of Eukaryotic Cells. Cells. 2020 Jun 10;9(6):1437. doi: 10.3390/cells9061437.
- [137] Pandya P, Orgaz JL, Sanz-Moreno V. Actomyosin contractility and collective migration: may the force be with you. Curr Opin Cell Biol. 2017 Oct;48:87-96. doi: 10.1016/j.cecb.2017.06.006.

- [138] Campellone KG, Lebek NM, King VL. Branching out in different directions: Emerging cellular functions for the Arp2/3 complex and WASP-family actin nucleation factors. *Eur J Cell Biol.* 2023 Jun;102(2):151301. doi: 10.1016/j.ejcb.2023.151301.
- [139] Tang DD, Gerlach BD. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res.* 2017 Apr 8;18(1):54. doi: 10.1186/s12931-017-0544-7.
- [140] Yahara I, Aizawa H, Moriyama K, Iida K, Yonezawa N, Nishida E, Hatanaka H, Inagaki F. A role of cofilin/destrin in reorganization of actin cytoskeleton in response to stresses and cell stimuli. *Cell Struct Funct.* 1996 Oct;21(5):421-4. doi: 10.1247/csf.21.421.
- [141] Mullins RD. Cytoskeletal mechanisms for breaking cellular symmetry. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a003392. doi: 10.1101/cshperspect.a003392.
- [142] Yu S, Yu L. Migrasome biogenesis and functions. *FEBS J.* 2022 Nov;289(22):7246-7254. doi: 10.1111/febs.16183.
- [143] Zhang Y, Zhang M, Xie Z, Ding Y, Huang J, Yao J, Lv Y, Zuo J. Research Progress and Direction of Novel Organelle-Migrasomes. *Cancers (Basel).* 2022 Dec 26;15(1):134. doi: 10.3390/cancers15010134.
- [144] Fan C, Shi X, Zhao K, Wang L, Shi K, Liu YJ, Li H, Ji B, Jiu Y. Cell migration orchestrates migrasome formation by shaping retraction fibers. *J Cell Biol.* 2022 Apr 4;221(4):e202109168. doi: 10.1083/jcb.202109168.
- [145] Jiang D, He J, Yu L. The migrasome, an organelle for cell-cell communication. *Trends Cell Biol.* 2024 Jun 11:S0962-8924(24)00099-0. doi: 10.1016/j.tcb.2024.05.003.
- [146] Zhang F, Liu W, Mao Y, Yang Y, Ling C, Liu Y, Yao F, Zhen Y, Wang X, Zou M. Migrasome, a migration-dependent organelle. *Front Cell Dev Biol.* 2024 Jun 6;12:1417242. doi: 10.3389/fcell.2024.1417242.
- [147] Tan X, He S, Wang F, Li L, Wang W. Migrasome, a novel organelle, differs from exosomes. *Biochem Biophys Rep.* 2023 Jun 9;35:101500. doi: 10.1016/j.bbrep.2023.101500.

- [148] Rani S, Lai A, Nair S, Sharma S, Handberg A, Carrion F, Möller A, Salomon C. Extracellular vesicles as mediators of cell-cell communication in ovarian cancer and beyond - A lipids focus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2023 Oct;73:52-68. doi: 10.1016/j.cytogfr.2023.06.004.
- [149] Dharan R, Huang Y, Cheppali SK, Goren S, Shendrik P, Wang W, Qiao J, Kozlov MM, Yu L, Sorkin R. Tetraspanin 4 stabilizes membrane swellings and facilitates their maturation into migrasomes. *Nat Commun.* 2023 Feb 23;14(1):1037. doi: 10.1038/s41467-023-36596-9.
- [150] Zhai Z, Liu B, Yu L. The roles of migrasome in development. *Cell Insight.* 2023 Nov 28;3(1):100142. doi: 10.1016/j.cellin.2023.100142.
- [151] Wang L, Chen J, Song J, Xiang Y, Yang M, Xia L, Yang J, Hou X, Chen L, Wang L. Activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway enhances exosome production by hucMSCs and improves their capability to promote diabetic wound healing. *J Nanobiotechnology.* 2024 Jun 26;22(1):373. doi: 10.1186/s12951-024-02650-x.
- [152] Xu X, Wu T, Lin R, Zhu S, Ji J, Jin D, Huang M, Zheng W, Ni W, Jiang F, Xuan S, Xiao M. Differences between migrasome, a 'new organelle', and exosome. *J Cell Mol Med.* 2023 Dec;27(23):3672-3680. doi: 10.1111/jcmm.
- [153] Zhao X, Lei Y, Zheng J, Peng J, Li Y, Yu L, Chen Y. Identification of markers for migrasome detection. *Cell Discov.* 2019 May 21;5:27. doi: 10.1038/s41421-019-0093-y. Erratum in: *Cell Discov.* 2022 Apr 6;8(1):32. doi: 10.1038/s41421-022-00404-3.
- [154] Deng S, Wu Y, Huang S, Yang X. Novel insights into the roles of migrasome in cancer. *Discov Oncol.* 2024 May 15;15(1):166. doi: 10.1007/s12672-024-00942-0.
- [155] Wu D, Xu Y, Ding T, Zu Y, Yang C, Yu L. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation. *Cell Res.* 2017 Nov;27(11):1397-1400. doi: 10.1038/cr.2017.108.
- [156] Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Mar 1;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994.
- [157] Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, Vakonakis I, Bate N, Critchley DR, Ginsberg MH, Campbell ID. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J.* 2009 Nov 18;28(22):3623-32. doi: 10.1038/emboj.2009.287.

5.7. Streszczenie

Schorzenia układu krążenia, wśród których wymienia się przede wszystkim chorobę niedokrwienną serca, stanowią najczęstszą przyczynę ogólnej zachorowalności i śmiertelności w krajach cywilizacji zachodniej. Ich rozwój może prowadzić do takich jednostek chorobowych jak zawał serca czy udar mózgu, których przebieg leży u podstaw procesu miażdżycowego rozwijającego się w obrębie aorty i tętnic obwodowych. Wspomniane zjawisko wiąże się ze zmianami sygnalizacji komórkowej promując odpowiedź zapalną i obejmuje co najmniej dwa różne systemy, na które składają się komórki śródbłonna i mięśniówki gładkiej naczyń oraz ich wzajemne oddziaływanie. Inicjacja konstytutywnego stanu zapalnego związana jest z dysfunkcją śródbłonna. Cząsteczki adhezyjne znajdujące się na jego powierzchni, w wyniku przewlekłej odpowiedzi zapalnej łączą się z domenami ligandów integrynowych reprezentujących monocyty. W wyniku opisywanego procesu obserwuje się sekrecję cytokin prozapalnych przez komórki śródbłonna, co promuje akumulację komórek układu odpornościowego w obrębie zmian miażdżycowych i skutkuje ich destabilizacją. Zaobserwowano, że w wyniku aktywacji reakcji zapalnej zachodzącej w obrębie śródbłonna naczyniowego tętnic dochodzi również do wytwarzania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych. Przypuszcza się, że jest to zjawisko bezpośrednio związane z wysokim potencjałem migracyjnym komórek aktywowanych stanem zapalnym oraz przebudową ich cytoszkieletu aktynowego.

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej była ocena zdolności do formowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzenia śródbłonkowego w warunkach prozapalnych. Badano mechanizmy ich powstawania oraz próbowano określić ich funkcje biologiczne, zwłaszcza w kontekście tworzenia nowych naczyń krwionośnych i przebudowy istniejących struktur naczyniowych. Przyjęto hipotezę, że wysoka ekspresja cytokin zapalnych, takich jak TNF- α , w mikrośrodowisku komórkowym może zwiększać potencjał migracyjny komórek śródbłonna, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego. Te zmiany mogą sprzyjać intensyfikacji mechanizmów formowania i wydzielania pęcherzyków, które mogą pełnić rolę wskaźników inicjacji i progresji odpowiedzi zapalnej. TNF- α zatem zwiększa inwazyjność pierwotnych komórek śródbłonna w środowisku naczyń tętnic wieńcowych.

Szczególnie istotne, z perspektywy przeprowadzonych eksperymentów okazały się migrasomy, czyli pęcherzyki zewnątrzkomórkowe formowane w odpowiedzi na wzmożoną migrację pierwotnych komórek śródbłonka, powstające na końcach i przecięciach włókien retrakcyjnych stanowiących tylni brzeg komórek, zapewniające wsparcie strukturalne komórce i ułatwiające dynamiczne zmiany kształtu i ruchu komórki. Obserwacje zebrane podczas przeprowadzanych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej eksperymentów wskazują, że uwalniane podczas ruchu komórek do przestrzeni międzykomórkowych pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są wychwytywane przez otaczające komórki, co może świadczyć o udziale migrasomów w mechanizmach sygnalizacji komórkowej. Liczebność populacji formowanych struktur błonowych jest silnie związana z zaawansowaniem stanu zapalnego indukowanego ekspresją cytokiny TNF- α . Co więcej, na podstawie otrzymanych wyników, potencjał do formowania migrasomów wzrastał wraz ze spadkiem ekspresji białek połączeniowych, co wiąże się z rearanżacją cytoszkieletu aktynowego i rozluźnieniem połączeń międzykomórkowych, w afekcie prowadząc do zwiększenia przepuszczalności naczyń.

Istotny związek ze wzmożonym ruchem komórek w odpowiedzi na ekspresję aktywatorów zapalnych wykazuje proces formowania nowych naczyń krwionośnych, określany mianem angiogenezy. W odpowiedzi na czynniki wzrostu, takie jak VEGF, w obrębie komórek śródbłonka dochodzi do reorganizacji białek cytoszkieletu aktynowego, co koreluje z przemieszczaniem się komórek śródbłonka w miejsca wymagające wsparcia tlenowego i odżywczego, w konsekwencji tworząc złożone siatki naczyń krwionośnych. Opisywany proces jest kluczowy w świetle patogenezy chorób o podłożu zapalnym, stając się podstawą do opracowania nowoczesnych metod terapeutycznych. Z punktu widzenia głównego tematu pracy, wzmożona migracja prowadząca do tworzenia nowych naczyń, wiąże się z wydzielanych migrasomów przez komórki śródbłonka, co może świadczyć o silnym zaangażowaniu migrasomów w komunikację międzykomórkową.

Zrozumienie roli komórek śródbłonka w kontekście migracji komórek zapalnych oraz aktywacji zapalnej komórek wyścielających ściany naczyń i wydzielanych w konsekwencji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych ma istotne znaczenie dla opracowywania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych. Inhibitory szlaków sygnalizacyjnych, regulujących ruch komórek zapalnych oraz funkcje komórek śródbłonka, mogą mieć potencjał w leczeniu chorób

zapalnych i nowotworowych, w których nadmierna lub nieprawidłowa odpowiedź zapalna odgrywa kluczową rolę.

5.8. Summary

Cardiovascular disorders, particularly coronary artery disease, are the leading causes of morbidity and mortality in Western countries. Their progression can lead to serious conditions such as myocardial infarction and stroke, which are fundamentally linked to atherosclerotic processes occurring within the aorta and peripheral arteries. This phenomenon is associated with alterations in cellular signaling that promote inflammatory responses and involves at least two distinct systems: endothelial cells and smooth muscle cells, along with their interactions. The initiation of a constitutive inflammatory state is associated with endothelial dysfunction. Adhesion molecules on the endothelial surface, due to chronic inflammatory responses, bind with integrin ligand domains representing monocytes. This process results in the secretion of pro-inflammatory cytokines by endothelial cells, promoting the accumulation of immune cells within atherosclerotic lesions and leading to their destabilization. It has been observed that the activation of the inflammatory response within the endothelial lining of arteries also leads to the production of extracellular membrane vesicles. This phenomenon is believed to be directly related to the high migratory potential of inflammation-activated cells and the remodeling of their actin cytoskeleton.

The research presented in this doctoral dissertation aimed to assess the capacity for forming endothelial-origin extracellular vesicles under pro-inflammatory conditions. Mechanisms of their formation were studied, and their biological functions were evaluated, particularly concerning the formation of new blood vessels and the remodeling of existing vascular structures. It was hypothesized that high expression of inflammatory cytokines, such as TNF- α , within the cellular microenvironment could enhance the migratory potential of endothelial cells, leading to actin cytoskeleton reorganization. These changes might contribute to increased mechanisms of vesicle formation and secretion, which could serve as indicators of the initiation and progression of inflammatory responses. Therefore, TNF- α increases the invasiveness of primary endothelial cells in the coronary vascular environment.

Particularly relevant to the experiments conducted in this dissertation were migrasomes, which are extracellular vesicles formed in response to enhanced migration of primary endothelial cells. These vesicles form at the ends and intersections of retraction fibers at the cell's trailing edge, providing structural support and facilitating dynamic shape changes and movement of the cell.

Observations from the experiments conducted during this doctoral research indicate that extracellular vesicles released during cell movement into intercellular spaces are captured by surrounding cells, suggesting a role of migrasomes in cellular signaling mechanisms. The abundance of these membrane structures is strongly correlated with the progression of inflammation induced by TNF- α cytokine expression. Moreover, the results indicate that the potential for migrasome formation increased with decreased expression of adhesion proteins, which is associated with actin cytoskeleton rearrangement and loosening of intercellular connections, ultimately leading to increased vascular permeability.

The process of forming new blood vessels, known as angiogenesis, is particularly related to the increased movement of cells in response to inflammatory activators. In response to growth factors such as VEGF, endothelial cells undergo reorganization of actin cytoskeleton proteins, correlating with their migration to areas requiring oxygen and nutrient support, ultimately forming complex vascular networks. This process is critical in the pathogenesis of inflammatory diseases and forms the basis for developing modern therapeutic strategies. From the perspective of the primary focus of this study, increased migration leading to new vessel formation is associated with the secretion of migrasomes by endothelial cells, suggesting a significant role of migrasomes in intercellular communication.

Understanding the role of endothelial cells in the context of inflammatory cell migration and the inflammatory activation of vascular wall-lining cells, along with the extracellular vesicles released as a result, is crucial for developing new diagnostic and therapeutic strategies. Inhibitors of signaling pathways regulating the movement of inflammatory cells and endothelial cell functions may have potential in treating inflammatory and cancerous diseases where excessive or aberrant inflammatory responses play a critical role.

6. Załączniki

6.1. Kopie prac stanowiących cykl publikacji

6.1.1. Publikacja nr 1



OPEN ACCESS

Edited by:

Guo-Ping Shi,
Brigham and Women's Hospital
and Harvard Medical School,
United States

Reviewed by:

Peter William Gunning,
University of New South Wales,
Australia

Zhaojie Meng,
Brigham and Women's Hospital
and Harvard Medical School,
United States

*Correspondence:

Maciej Gagat
mgagat@cm.umk.pl

[†]These authors have contributed
equally to this work

[‡]These authors share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Signaling,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 15 February 2021

Accepted: 25 August 2021

Published: 17 September 2021

Citation:

Gagat M, Zielińska W,
Mikołajczyk K, Zabrzyski J,
Krajewski A,
Klimaszewska-Wisniewska A,
Grzanka D and Grzanka A (2021)
CRISPR-Based Activation
of Endogenous Expression of *TPM1*
Inhibits Inflammatory Response
of Primary Human Coronary Artery
Endothelial and Smooth Muscle Cells
Induced by Recombinant Human
Tumor Necrosis Factor α .
Front. Cell Dev. Biol. 9:668032.
doi: 10.3389/fcell.2021.668032

CRISPR-Based Activation of Endogenous Expression of *TPM1* Inhibits Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial and Smooth Muscle Cells Induced by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor α

Maciej Gagat^{1*}, Wioletta Zielińska^{1†}, Klaudia Mikołajczyk^{1†}, Jan Zabrzyski^{2,3},
Adrian Krajewski¹, Anna Klimaszewska-Wisniewska², Dariusz Grzanka^{2‡} and
Alina Grzanka^{1‡}

¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland, ² Department of Clinical Pathomorphology, Faculty of Medicine, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Bydgoszcz, Poland, ³ Department of General Orthopaedics, Musculoskeletal Oncology and Trauma Surgery, University of Medical Sciences, Poznań, Poland

Tumor necrosis factor α (TNF α) is one of the most important proinflammatory cytokines, which affects many processes associated with the growth and characteristics of endothelial, smooth muscle, and immune system cells. However, there is no correlation between most *in vivo* and *in vitro* studies on its role in endothelial cell proliferation and migration. In this study, we examined the effect of recombinant human (rh) TNF α produced in HEK293 cells on primary human coronary artery endothelial cells (pHCAECs) in the context of F-actin organization and such processes as migration and adhesion. Furthermore, we evaluated the possibility of the inhibition of the endothelial inflammatory response by the CRISPR-based regulation of *TPM1* gene expression. We showed that TNF α -induced activation of pHCAECs was related to the reorganization of the actin cytoskeleton into parallel-arranged stress fibers running along the longer axis of pHCAECs. It allowed for the directed and parallel motion of the cells during coordinated migration. This change in F-actin organization promoted strong but discontinuous cell-cell contacts involved in signalization between migrating cells. Moreover, this form of intercellular connections together with locally increased adhesion was related to the formation of migrasomes and further migracytosis. Stabilization of the actin cytoskeleton through the CRISPR-based activation of endogenous expression of *TPM1* resulted in the inhibition of the inflammatory response of pHCAECs following treatment with rh TNF α and stabilization of cell-cell junctions through reduced cleavage of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and maintenance of the stable levels of

α - and β -catenins. We also showed that CRISPR-based activation of *TPM1* reduced inflammatory activation, proliferation, and migration of primary human coronary artery smooth muscle cells. Therefore, products of the *TPM1* gene may be a potential therapeutic target for the treatment of proinflammatory vascular disorders.

Keywords: *TNF α* , endothelial cells, angiogenesis, F-actin, cell-cell junctions, cell adhesion, migrasomes, inflammation

INTRODUCTION

The endothelial barrier plays a pivotal role in the regulation of the functioning of the entire circulatory system (Godo and Shimokawa, 2017). For this reason, any disturbances in the endothelial structure are associated with unfavorable health effects. Endothelial dysfunction manifests into abnormalities in the anticoagulant and anti-inflammatory properties of cells as well as alterations in vascular growth and vascular remodeling. It is associated with phenomena like hypertension and atherosclerosis (Chistiakov et al., 2015; Gimbrone and García-Cardena, 2016). Endothelium produces nitric oxide, which is responsible for the relaxation of the underlying vascular smooth muscle. Reduced activity of endothelial nitric oxide synthase is observed in diabetes and hypertension. It also promotes vasoconstriction, thrombosis, and infiltration of the immune system cells (Matsushita et al., 2001). In turn, it is associated with the increased production of proinflammatory factors that induce the excessive proliferation of vascular smooth muscle cells. Proinflammatory cytokines also cause further accumulation of immune cells at the site of endothelial layer disruption. The increased production of endothelium-derived contracting factors leads to even greater deregulation of vessel wall functioning (Virdis et al., 2010).

Disbalance between the vasodilators and vasoconstrictors is not the only phenomenon leading to disruption of the endothelial barrier. From a biological perspective, endothelial dysfunction begins much earlier and manifests by intense changes in the structure, level, and function of membrane and intracellular proteins (Gimbrone and García-Cardena, 2016). They are associated particularly with abnormalities at the level of junctional proteins, which can be observed as alterations in the pattern of intercellular connections. The types of cell contacts that guarantee the continuity of the endothelial layer are adherens junctions (AJs) and tight junctions (TJs). The main proteins involved in those types of connections in vascular endothelium are vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and claudin-5. However, proinflammatory conditions lead to a loosening of the junctional network, which manifests in the discontinuity at the cell-cell border and the appearance of spaces between cells (Cerutti and Ridley, 2017). These spaces allow, for example, massive infiltration of monocytes to the vessel wall, observed during the development and exacerbation of atherosclerosis. Other effects of proinflammatory conditions are enhanced cell adhesion and increased migration (Kaczmarek et al., 2005; Perna et al., 2013). In our work, we suggest that increased intracellular tensions result in the mechanistic disruption of intercellular junctions, which leads to the loss of the endothelial barrier continuity.

Endothelial injury, as well as angiogenesis, propels the migration of endothelial cells, which aims to restore the continuity of the endothelial monolayer or formation of new vessels (Michaelis, 2014). The cells can migrate both individually and in a coordinated manner depending on the intercellular signals and environmental factors. Collective migration is defined as the migration of cells that remain functionally and physically connected through stable intercellular connections. At the same time, such cells are characterized by multicellular polarity and the organization of the cytoskeleton that allows them to generate traction forces. In this type of migration, cell movement is coordinated locally and as a result, tightly connected cells move in the same direction (Canver et al., 2016).

All these changes, however, would not be possible without alterations at the actin cytoskeleton level. Changes in the organization of F-actin are involved in such processes as migration, proliferation, and cell adhesion. Moreover, the interaction of the actin cytoskeleton with junctional proteins allows the transfer of tensions from the relatively weak intercellular junctions to the more resistant cytoskeleton (van Geemen et al., 2014). In the case of non-activated endothelium, F-actin is organized into characteristic star-like structures that guarantee an appropriate distribution of intracellular tensions and enable a quick response to external factors, for example, through the ability of multidirectional migration. However, cell activation in response to proinflammatory cytokines involves the remodeling of the actin network into thick bundles of highly polymerized and parallel stress fibers. The changes in the organization of the actin cytoskeleton are possible only due to the activity of actin-binding proteins, which include tropomyosins (Gunning et al., 2015).

We have shown that tropomyosin-1 inhibits both polymerization and depolymerization of the actin filaments induced by L-homocysteine and cigarette smoke extract and impacts the integrity of EA.hy926 endothelial cells (Gagat et al., 2013, 2014). However, whether and how the expression of tropomyosin-1 and stabilization of actin cytoskeleton affect the inflammatory response of endothelial cells remain unknown. Therefore, the main goal of this study is to show that CRISPR-based activation of *TPM1* expression can maintain the proper organization of coronary artery endothelial cell monolayer and inhibit proliferation of smooth muscle cells in inflammatory conditions mimicked by the use of human recombinant (rh) tumor necrosis factor α (TNF α). In the present study, we characterized the effect of rh TNF α on primary human coronary artery endothelial cells (pHCAECs) in the context of F-actin organization and modulation of F-actin-dependent processes, including cell migration, adhesion, and migracytosis. The obtained results are important not

only from the mechanistic point of view but also have the potential to be translated into clinical research and adapted during the design and development of new coronary stent devices.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Treatment

Primary human coronary artery endothelial cells and primary human coronary artery smooth muscle cells (pHCASMCs) were obtained from a healthy 23-year-old white male or 53-year-old white male, respectively (cause of death: head trauma secondary to blunt injury). The cells were provided by the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained according to supplier recommendations. Briefly, the endothelial cells were cultured in a vascular cell basal medium (ATCC) supplemented with an endothelial cell growth kit (ATCC) containing 5 ng/ml recombinant human (rh) VEGF, 5 ng/ml rh EGF, 5 ng/ml rh FGF basic, 15 ng/ml rh IGF-1, 10 mM L-glutamine, 0.75 units/ml heparin sulfate, 1 µg/ml hydrocortisone hemisuccinate, 2% fetal bovine serum (FBS), 50 µg/ml ascorbic acid, and antibiotics (10 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, and 25 µg/ml amphotericin B). The smooth muscle cells were cultured in a vascular cell basal medium (ATCC) supplemented with a vascular smooth muscle cell growth kit (ATCC) containing 5 ng/ml rh FGF-basic, 5 µg/ml rh insulin, 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mM L-glutamine, 5 ng/ml rh EGF, 5% fetal bovine serum, and antibiotics (10 units/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, and 25 µg/ml amphotericin B). The cells were initially seeded at a density of 5,000 viable cells/cm² and cultured in T-25 cm² flasks (Corning) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. After reaching confluence, the cells were treated with complete vascular growth medium containing rh TNFα (Sigma-Aldrich), expressed in HEK293 cells, at a concentration of 100 ng/ml for 24 h (or 36 h for time-dependent analysis of migration directiveness). The control cells were grown under the same condition without rh TNFα treatment. Only cells within three to four passages were used for all the experiments.

Detection of Functional Expression of Adhesion Molecules

The detection of functional expression of E-selectin and VCAM-1 was performed using antibody-coated magnetic beads. The immobilization of Dynabeads M-280 Sheep Anti-Mouse IgG (Thermo Fisher Scientific) was done according to manufacturer instructions. Briefly, 2 µg of mouse anti-E-selectin (clone: CL2/6) or mouse anti-VCAM-1 (clone: 1.G11B1) monoclonal antibodies (both from Thermo Fisher Scientific) was added to 50 µl of pre-washed beads and resuspended in 1 ml of Ca²⁺- and Mg²⁺-free phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) and 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich), and incubated with gentle tilting and rotation for 18 h at 4°C. The beads were then washed four times using a washing buffer and resuspended in 1 ml of complete and pre-warmed vascular growth medium. Five hundred microliters of resuspended beads was added to 100 ng/ml TNFα-treated or

control pHCAsECs grown in 24-well glass-bottom cell imaging plates (Eppendorf) and incubated in standard cell culture conditions for 30 min. After washing with Dulbecco's PBS (DPBS, ATCC), the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min (Sigma-Aldrich) and stained for F-actin using Alexa Fluor 594 phalloidin (Thermo Fisher Scientific) for 20 min. The cells were then counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) for 10 min. All steps were performed at room temperature (RT). Images were acquired on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss), using an EC Plan-Neofluar × 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). Parallel bright-field and fluorescence images were recorded at the same location.

Co-culture of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells With Jurkat T Cells

Jurkat T cells (clone E6-1, ATCC) were maintained according to supplier recommendations. Briefly, the cells were initially seeded at a density of 1×10^5 viable cells/ml and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamycin (all from Lonza) in T-25 cm² flasks (Corning) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. After the desired density is reached, the cells were stimulated with 100 ng/ml rh TNFα for 2 h. The nuclei of cells were stained using the NucBlue Live Cell Stain ReadyProbes Reagent (Hoechst 33342 dye, Thermo Fisher Scientific) for 30 min. Around 2×10^5 counterstained Jurkat T cells were then washed with DPBS, resuspended in 500 µl of complete and pre-warmed vascular growth medium and added to TNFα-activated or control pHCAsECs grown in 12-well plates (Corning). Jurkat T cells were co-cultured with pHCAsECs in standard cell culture conditions for 30 min in the presence or absence of rh TNFα. Before co-culture, pHCAsECs were cultured in the presence or absence of rh TNFα for 24 h. Time-lapse images were acquired, at 3.33-s intervals over 2 min, in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using an EC Plan-Neofluar × 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). Parallel contrast phase and fluorescence images were recorded at the same location. The number of adherent Jurkat T cells was counted after washing cells three times with DPBS in three randomly chosen microscopic fields using ImageJ (NIH).

Confluent Cell Migration

Confluent cell migration assay was performed using six-well plates (Corning). After confluence is reached, the cells were cultured in complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNFα. Time-lapse images were acquired, at 10-min intervals over 36 h in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using an EC Plan-Neofluar × 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from

Zeiss). Phase contrast images were recorded at a location of the migration gap and sites of open-field migration. Cell movement was analyzed using the Manual Tracking plugin for ImageJ (NIH). To quantify the dynamics of cell migration, such as velocity or Euclidean distance and accumulated distance, the migration trajectories were then assessed with Chemotaxis and Migration Tool 2.0 (Ibidi).

Wound Healing and Open-Field Migration

Wound healing and open-field migration assays were performed using a two-well culture insert (Ibidi). pHCAECs were resuspended in 70 μ l of complete vascular growth medium and plated at a density of 1,100 cells per well into each reservoir of a culture insert (Ibidi) that adhered to the bottom of a six-well plate (Corning) and grown in standard cell culture conditions. After confluence is reached, the insert was removed using forceps, and the plate was rinsed with DPBS to remove cell debris. Migrating cells were cultured in complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α . Time-lapse images were acquired, at 10-min intervals over 24 h, in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using an EC Plan-Neofluar $\times$ 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). Phase contrast images were recorded at a location of the migration gap and sites of open-field migration. Cell movement was analyzed using the Manual Tracking plugin for ImageJ (NIH). To quantify the dynamics of cell migration, such as velocity or Euclidean distance and accumulated distance, the migration trajectories were then assessed with Chemotaxis and Migration Tool 2.0 (Ibidi).

Modified Boyden Chamber Assay

Modified Boyden chamber assay was done using uncoated Transwell inserts with microporous polyethylene terephthalate (PET) membranes (3- μ m pore size) placed in 24-well plates (both from Corning). pHCAECs were resuspended at a density of 1,650 cells per well in complete vascular growth medium and plated in the upper chamber of the Transwell inserts. The lower chamber of the wells contained 600 μ l of complete vascular growth medium. After confluence is reached, the media in the upper Transwell chamber were replaced with complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α . The media in the wells of the 24-well plate were the same and additionally supplemented with 20% FBS. After 24 h, the Transwell inserts were fixed with 4% formaldehyde for 15 min (Sigma-Aldrich) and washed three times with PBS, and the cells were stained with toluidine blue. All steps were performed at RT. The cells on the upper side of the membrane were removed with cotton swabs, and the inserts were left to air-dry. Bright-field images of the lower side of the membranes were captured by an Eclipse E800 microscope (Nikon) using a Plan Fluor $\times$ 10/0.30 air objective, DS-5Mc-U1 camera, and NIS-Elements 3.30 (all from Nikon). The number of migrated cells was counted in randomly chosen microscopic fields using ImageJ (NIH).

In vitro Tube Formation Assay

Endothelial tube formation assay was performed in μ -Slide Angiogenesis (Ibidi) according to the manufacturer's guidelines. Briefly, inner wells were filled with 10 μ l of ice-cold, growth factor-reduced, and phenol-red-free Matrigel Basement Membrane Matrix (Corning) and set at 37°C. pHCAECs were resuspended in 50 μ l of complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α and plated at a density of 10,000 cells per well into the upper well and cultured in standard conditions. Time-lapse images were acquired, at 10-min intervals over 24 h, in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using a Zeiss EC Plan-Neofluar $\times$ 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). Contrast phase images were recorded at the same location. Additionally, tube formation was monitored using a bright-field microscope at 3, 6, 12, and 24 h after seeding. The cells were fixed with 4% formaldehyde for 15 min (Sigma-Aldrich), washed three times with PBS, and stained with crystal violet. All steps were performed at RT. Bright-field images were captured by an Eclipse E800 microscope (Nikon) using a Plan UW $\times$ 2/0.06 air objective, DS-5Mc-U1 camera, and NIS-Elements 3.30 (all from Nikon). The number of tubes was counted using ImageJ (NIH).

Wash Assay

Wash assay was performed using six-well plates (Corning). The cells were initially seeded at a density of 5,000 viable cells/cm² in complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. At 0, 0.5, 2, and 4 h after seeding, the cells were washed three times with complete vascular growth medium to remove non-adherent cells. Contrast phase images were captured in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using a Zeiss EC Plan-Neofluar $\times$ 10/0.30 Ph1 air objective, AxioCam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). The number of adherent cells was counted using ImageJ (NIH).

Temporal Analysis of Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Sites

For temporal analysis of TNF α -induced changes in the organization of actin cytoskeleton and actin-mediated focal adhesion, pHCAECs were transiently transduced using a baculovirus system to express the green fluorescent protein (GFP)-fused human actin and the red fluorescent protein (RFP) fused to the c-terminus of human talin. The cells were transiently transduced with CellLight Reagents BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, pHCAECs were grown in 24-well cell imaging plates (Eppendorf) and cultured in standard conditions. After 70% confluence is reached, the cells were infected with CellLight actin-GFP and CellLight Talin-RFP BacMam 2.0 baculoviruses at a multiplicity of infection (MOI) of 30. After 16 h, the medium containing the baculoviruses was replaced with complete vascular

growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α , and the cells were cultured in standard conditions. Time-lapse images were acquired, at 10-min intervals over 24 h, in standard cell culture conditions on an Axio Observer Z1 inverted motorized microscope (Zeiss) equipped with an incubation system for live-cell imaging (PeCon), using a Zeiss EC Plan-Neofluar $\times 10/0.30$ Ph1 air objective, Axiocam 503 mono camera, and ZEN 2 software (all from Zeiss). Fluorescence images were recorded at the same location. Furthermore, correlation between 3D morphology and localization of actin-GFP and talin-RFP in rh TNF-activated pHCAECs was imaged using an HT-2 correlative holotomographic and fluorescence microscope (Tomocube). For live-cell correlative holotomographic and fluorescence imaging, the cells were grown in 50-mm imaging dishes with 1.5H glass coverslip bottom (TomoDish, Tomocube) and covered before imaging with a square coverslip glass. For prevention against contamination and drying of the medium, the side of the dish was sealed by mineral oil (Sigma). Additionally, expression of actin-GFP and talin-RFP was examined by confocal microscopy. The cells were fixed with 4% formaldehyde for 15 min (Sigma-Aldrich), washed three times with PBS, and counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min. All steps were performed at RT. Images were captured by a C1 laser scanning confocal microscope (Nikon) using a Plan VC Apo $\times 60/1.4$ oil objective and Nikon EZ-C1 3.80 software (both from Nikon). The lasers used for DAPI, GFP, and RFP excitations were diode 408 nm with emission filter 450/35, diode 488 nm with emission filter 515/30, and He-Ne 543 nm with emission filter 650LP, respectively. All confocal images of triple-labeled cells were acquired and displayed with identical settings, including laser power, pixel dwell speed, and gain.

Coating With Extracellular Matrix Proteins

For the analysis of the possible effect of extracellular matrix (ECM) on different rearrangements of F-actin in TNF α -activated pHCAECs, the sterile glass coverslips ($\varnothing$ 18 mm, Thermo Fisher Scientific) were covered by 5 g/cm² fibronectin (source: human plasma), laminin (source: Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor), collagen I (source: rat tail tendon), and collagen IV (source: Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor; all from Corning) according to the manufacturer's instruction. The cells were grown on the coated glass coverslips in 12-well plates (Corning) and cultured in standard conditions. After confluence is reached, the cells were cultured for an additional period of 24 h in complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α . The cells were then fixed with 4% formaldehyde for 15 min (Sigma-Aldrich), permeabilized for 10 min with 0.25% Triton X-100 (Serva), blocked with 3% BSA for 45 min (Sigma-Aldrich), and stained for F-actin using phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40) and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; both from Thermo Fisher Scientific). The cells were then counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min. All of the fluorescence reaction steps were performed at RT. The slides were mounted in Aqua-Poly/Mount (Polysciences) and examined by confocal microscopy. Images were captured by a

C1 laser scanning confocal microscope (Nikon) using a Plan VC Apo $\times 60/1.4$ oil objective and Nikon EZ-C1 3.80 software (both from Nikon).

Transfection by Nucleofection

Endogenous expression of *TPM1* gene was regulated using CRISPR *TPM1* activation or knockout systems (both from Santa Cruz). The CRISPR activation system is a synergistic activation mediator transcription activation system designed to specifically upregulate *TPM1* and consists of three plasmids at a 1:1:1 mass ratio: a plasmid encoding the deactivated Cas9 nuclease (D10A and N863A) fused to the transactivation domain VP64, a plasmid encoding the MS2-p65-HSF1 fusion protein, and a plasmid encoding a *TPM1*-specific 20-nt guide RNA. The CRISPR *TPM1*-knockout system consists of a pool of three plasmids each encoding the Cas9 nuclease and a *TPM1*-specific 20-nt guide RNA. As a CRISPR control, we used the CRISPR control plasmid encoding the Cas9 nuclease and a non-specific 20-nt guide RNA. Components of the above-mentioned CRISPR systems were delivered into the cells by nucleofection technology according to the manufacturer's instruction using the P5 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L and 4D-Nucleofector X unit (both from Lonza). Briefly, 4×10^5 cells were resuspended in 100 Nucleofector nucleofection solution and 2 μ g of each CRISPR system was electroporated using the DY138 program at RT. The cells were then immediately transferred into pre-warmed complete vascular growth medium and cultured until confluency is reached for further procedures.

Fluorescence Localization of Proteins

For the fluorescence localization of proteins, the pHCAECs were grown on sterile glass coverslips ($\varnothing$ 18 mm, Thermo Fisher Scientific) in 12-well plates (Corning) and cultured in standard conditions. After confluence is reached, the cells were cultured for an additional period of 24 h in complete vascular growth medium supplemented or not with 100 ng/ml rh TNF α . The cells were then fixed with 4% formaldehyde for 15 min (Sigma-Aldrich), permeabilized for 10 min with 0.25% Triton X-100 (Serva), and blocked with 3% BSA for 45 min (Sigma-Aldrich). Next, the cells were double stained using antibodies and phalloidin conjugates in the following arrangement: (i) mouse anti-talin (clone: 8D4) monoclonal antibody (1:500, Sigma-Aldrich), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200, Thermo Fisher Scientific), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40, Thermo Fisher Scientific); (ii) rabbit anti-VE-cadherin polyclonal antibody (1:200), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (iii) mouse anti- α -catenin (clone: 7A4) monoclonal antibody (1:250), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (iv) mouse anti- β -catenin (clone: 5H10) monoclonal antibody (1:250), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (v) mouse anti-ZO-1 (clone: 1A12) monoclonal antibody (1:200), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594

(1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (vi) mouse anti-claudin-5 (clone: 4C3C2) monoclonal antibody (1:300), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (vii) rabbit anti-non-muscle myosin IIa (MYH9) polyclonal antibody (1:100), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (viii) rabbit anti-non-muscle myosin IIb (MYH10) polyclonal antibody (1:100), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (ix) rabbit anti-Arp 2/3 subunit 1B (ARPC1B) polyclonal antibody (1:100), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200, Thermo Fisher Scientific), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40, Thermo Fisher Scientific); (x) rabbit anti-ROCK-1 polyclonal antibody (1:100), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (xi) rabbit anti-ROCK-2 polyclonal antibody (1:100), donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 488 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); (xii) mouse anti-E-selectin (clone: CL2/6) monoclonal antibody (1:100), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific); and (xiii) mouse anti-VCAM-1 (clone: 1.G11B1) monoclonal antibody (1:200), goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200), and phalloidin-Alexa Fluor 594 (1:40; all from Thermo Fisher Scientific). The pHCASMCs were grown in similar conditions and stained using (i) mouse anti-ICAM-1 (clone: 1A29) monoclonal antibody (1:250) and goat anti-mouse-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200; both from Thermo Fisher Scientific); (ii) mouse anti-VCAM-1 (clone: 1.G11B1) monoclonal antibody (1:200) and goat anti-mouse-Alexa Fluor 488 secondary antibody (1:200; both from Thermo Fisher Scientific); (iii) rabbit anti-CDKN2A/p16INK4a (clone: EPR1473) monoclonal antibody (1:100, Abcam) and donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200, Thermo Fisher Scientific); (iv) rabbit anti-NFκB p65 polyclonal antibody (1:200) and donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200; both from Thermo Fisher Scientific); and (v) rabbit CCN4/WISP1 polyclonal antibody (1:500) and donkey anti-rabbit-Alexa Fluor 594 secondary antibody (1:200; both from Thermo Fisher Scientific). All incubations with antibodies and/or phalloidin conjugates were carried out, respectively, for 1 h or 20 min, followed by three washes in PBS. The cells were then counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich) for 10 min. All steps were performed at RT. The slides were mounted in Aqua-Poly/Mount (Polysciences) and examined by confocal microscopy. Images were captured by a C1 laser scanning confocal microscope (Nikon) using a Plan VC Apo × 60/1.4 oil objective and Nikon EZ-C1 3.80 software (both from Nikon). The lasers used for DAPI, Alexa Fluor 488, and Alexa Fluor 594 excitations were diode 408 nm with emission filter 450/35, diode 488 nm with emission filter 515/30, and He-Ne 543 nm with emission filter 650LP, respectively. All confocal images of triple-labeled cells were acquired and displayed with identical settings, including laser power, pixel dwell speed, and gain. The

gain was set up for optimal visibility of specific proteins. In the case of the lack of possibility to show triple-labeled cells, the gain of the channel for F-actin was downregulated. The fluorescence intensity of selected proteins was quantified using ImageJ (NIH) and EZ-C1 (Nikon).

Immunoblot

Control pHCACs and those treated with 100 ng/ml TNFα were lysed with RIPA buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). After clarification of lysates (8,000 × g for 10 min at 4°C) and normalization of protein concentration by a BCA protein assay kit, 10 μg of total protein per lane was separated by SDS-PAGE at 225 V with Novex WedgeWell 10%–20% Tris-glycine gel and Mini Gel Tank (all from Thermo Fisher Scientific). The transfer onto a nitrocellulose membrane was performed by iBlot Dry Western Blotting System (Life Technologies). The membrane was then blocked for 10 min in a SuperSignal Western Blot Enhancer (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 2.5 h or overnight in an iBind Flex Solution (Thermo Fisher Scientific) with (i) mouse anti-claudin-5 (clone: 4C3C2) monoclonal antibody (1:500) and goat anti-mouse-horseradish peroxidase secondary antibody (HRP, 1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (ii) mouse anti-GAPDH (clone: ZG003) monoclonal antibody (1:500) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (iii) mouse anti-α-tropomyosin (clone: F-6) monoclonal antibody (1:100, Santa Cruz) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000, Thermo Fisher Scientific); (iv) mouse anti-E-selectin (clone: CL2/6) monoclonal antibody (1:100) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (v) mouse anti-talin (clone: 8D4) monoclonal antibody (1:100, Sigma-Aldrich) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000, Thermo Fisher Scientific); (vi) mouse anti-vinculin (clone: J144) monoclonal antibody (1:1,000) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (vii) mouse anti-α-catenin (clone: 7A4) monoclonal antibody (1:250) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (viii) mouse anti-β-catenin (clone: 5H10) monoclonal antibody (1:250) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific); (iv) rabbit anti-VE-cadherin polyclonal antibody (1:500) and goat anti-mouse-HRP secondary antibody (1:2,000; both from Thermo Fisher Scientific) using the iBind Flex Western System (Thermo Fisher Scientific). Protein bands were visualized using the 1-Step Ultra TMB-Blotting Solution (Thermo Fisher Scientific). All steps were performed at RT. All western blot assays were performed at least three times. Images were captured by the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Intensity of bands was quantified using ImageJ (NIH).

Statistical Analysis

The significant differences between two groups were calculated using an unpaired *t*-test or one-way ANOVA and Kruskal-Wallis test with Dunn's correction for multiple comparisons. Relations between cell migration parameters were assessed using

Pearson's correlation coefficient analysis. Statistical analyses were performed by using Prism 7 software (GraphPad). The Rayleigh test was used to determine cell movement homogeneity using Chemotaxis and Migration Tool 2.0 (Ibidi). A p -value < 0.05 was considered to be statistically significant and labeled on figures as * or \$, $p < 0.05$; ** or \$\$, $p < 0.01$; *** or \$\$\$, $p < 0.001$; **** or \$\$\$\$, $p < 0.0001$; and NS, non-significant. Results were expressed as means $\pm$ SD.

RESULTS

Tumor Necrosis Factor α Induces Inflammatory Activation of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells

Given that the use of *Escherichia coli* as an expression platform for recombinant proteins has several drawbacks (Rosano and Ceccarelli, 2014), we first examined whether rh TNF α expressed in HEK293 cells was able to activate coronary artery endothelial cells. To this end, pHCAECs were cultured to 100% confluence and then treated for 24 h with 100 ng/ml rh TNF α . We showed rh TNF α -induced surface and intracellular expressions of functional E-selectin (Figure 1A and Supplementary Figure S1) and VCAM-1 (Supplementary Figures S2A,B). We then examined the interactions between rh TNF α -activated pHCAECs and Jurkat T cells (Figure 1B and Supplementary Video S1). We observed a statistically significant increase in the number of Jurkat T cells adherent to pHCAECs (from 128.6 ± 47.00 per view in the control to 645 ± 81.01 in TNF α -activated cells, $p < 0.0001$) after 30 min of their co-culture (Figure 1C and Supplementary Figure S2C). Furthermore, we showed a statistically significant increase in the velocity of motile Jurkat T cells on pHCAECs (from 0.1641 ± 0.04247 to 0.4120 ± 0.07306 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.0001$, respectively, for control and TNF α -activated pHCAECs; Figure 1D).

In summary, these data suggest that rh TNF α effectively activates pHCAECs and augments flattening, firm adhesion, and further migration of T cells on the endothelial monolayer.

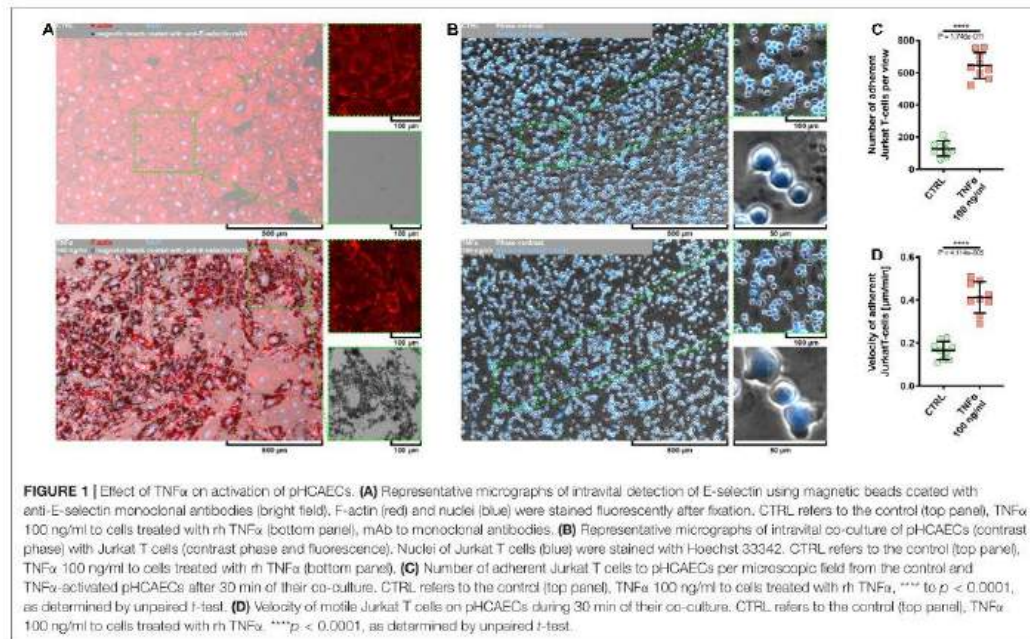
Tumor Necrosis Factor α Augments the Invasive Potential of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells

Evidence from *in vitro* and *in vivo* data has demonstrated a dual role of TNF α in the angiogenic response of endothelial cells. It has been shown that TNF α generally exerts a proangiogenic effect *in vivo* and antiangiogenic *in vitro* (Fräter-Schröder et al., 1987; Sainson et al., 2008). However, it seems to function as a stimulatory or inhibitory agent dependent on the model used and experimental condition. As depicted in Supplementary Figures S1, S2B, the exposure of pHCAECs to 100 ng/ml rh TNF α resulted in remarkable changes in the cell morphology, whereby cells appeared enlarged and elongated. We next examined whether these morphological changes were accompanied by enhanced migration capacity of pHCAECs and ability to form tubules on the Matrigel. We first investigated the migration pattern of pHCAECs cultured in the confluence. As shown on rose plots in Figure 2A, during 24 h

of incubation with 100 ng/ml rh TNF α , pHCAECs moved in a more persistent manner, with decreased changes in direction, whereas control cells exhibited a more random migration pattern, suggesting that TNF α promoted directional migration of pHCAECs. This finding was further supported by a high significance of the Rayleigh test (from $p = 2.74694 \times 10^{-3}$ to $p = 4.90393 \times 10^{-5}$, respectively, for control and TNF α -activated cells). As cultured in 100% confluence for 24 h, there was no effect of rh TNF α on Euclidean distance of migrating cells (Figure 2B). However, the accumulated distance traveled by rh TNF α -activated pHCAECs was significantly shorter compared to the control cells (from 808.8 ± 146.2 to 573.5 ± 124.0 μm , $p < 0.0001$; Figure 2C). Furthermore, we showed a statistically significant decrease in the velocity of these cells (from 0.5656 ± 0.1023 to 0.4035 ± 0.09019 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.0001$, respectively, for control and TNF α -activated cells; Figure 2D). The extended tracking time of migrating cells for up to 36 h allowed us to demonstrate that longer rh TNF α treatment also promoted the migration of pHCAECs in a more directional manner (Rayleigh test: $p = 2.96697 \times 10^{-2}$ vs. $p = 4.24461 \times 10^{-5}$; Supplementary Figure S3A) without the effect on Euclidean distance (Supplementary Figure S3B). Longer exposition of pHCAECs to rh TNF α also revealed shorter accumulated distance of migrating cells (1215.0 ± 194.4 vs. 816.7 ± 194.6 , $p < 0.0001$; Supplementary Figure S3C) related with their decreased velocity (0.5626 ± 0.09002 vs. 0.3781 ± 0.09008 $\mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.0001$; Supplementary Figure S3D), when compared to untreated pHCAECs. Furthermore, there was a negative correlation between time of treatment and Euclidean distance ($r = -0.5166$, $p = 0.0013$), accumulated distance ($r = -0.4916$, $p = 0.0023$), and velocity ($r = -0.4837$, $p = 0.0028$; Supplementary Figures S3E–G). Additional analysis revealed that Euclidean distance ($r = 0.6206$, $p < 0.0001$), accumulated distance ($r = 0.3723$, $p = 0.0253$), and velocity ($r = 0.3790$, $p = 0.0226$), but not time of treatment, were correlated with the directness of rh TNF α -activated pHCAECs (Supplementary Figure S3I), giving further support for the conclusion that pHCAECs undergo directed migration upon rh TNF α treatment. In control cells, we only observed the correlation between directness of cells and Euclidean distance ($r = 0.7929$, $p < 0.0001$; Supplementary Figure S3H).

Differently, wound healing (Figure 2E and Supplementary Video S2) and open-field migration (Figure 2F and Supplementary Video S3) assays showed faster migration of rh TNF α -activated pHCAECs as compared to the control, especially from the third hour of wound healing experiment or the 12th hour of open migration test.

We further analyzed the protrusion tips during rh TNF α -activated cell migration. As shown in Supplementary Figures S3J,K as well as in Supplementary Videos S2, S3, examination of the leading edge of migrating cells revealed rh TNF α -dependent formation of spindle-shaped leader cells with an aggressive phenotype oriented toward the direction of the movement. Analysis of trajectories of leader cells during the migration of TNF α -activated pHCAECs into the open field showed a statistically significant increase in Euclidean distance (from 374.4 ± 89.41 to 477.1 ± 120.4 μm , $p = 0.0004$,



respectively, for control and TNF α -activated cells; **Figure 2G**), accumulated distances (from 554.1 ± 94.78 to $785.1 \pm 138.2 \mu\text{m}$, $p < 0.0001$, respectively, for control and TNF α -activated cells; **Figure 2H**), and velocity (from 0.3946 ± 0.07763 to $0.5703 \pm 0.07103 \mu\text{m}/\text{min}$, $p < 0.0001$, respectively, for control and TNF α -activated cells; **Figure 2I**), as compared to the control. TNF α -induced increase in the migratory potential of pHCAECs was also confirmed by their migration toward the chemo-attractant environment through 3- μm pores (**Figure 2J**). As shown in **Supplementary Figure S3L**, we observed a three-times-higher number of migrating pHCAECs after treatment with 100 ng/ml rh TNF α , when compared to the control (6.667 ± 3.240 vs. 22.89 ± 5.183 , $p < 0.0001$). We further investigated if rh TNF α had any effect on pHCAEC formation of tube-like structures on Matrigel (**Figure 2K** and **Supplementary Video S4**). We observed a statistically significant increase in the number of tubules formed by rh TNF α -treated pHCAECs during the experiment (from 97.78 ± 10.33 to 141.3 ± 14.75 after 3 h, $p < 0.0001$; from 86.56 ± 5.833 to 100.2 ± 5.403 after 6 h, $p < 0.0001$; and from 45.22 ± 2.386 to 54.22 ± 1.856 after 6 h, $p < 0.0001$, respectively, for control and TNF α -activated cells; **Supplementary Figure S3M**).

In summary, these data suggest that in contrast to cooperative migration of control pHCAECs, rh TNF α activates the potential of pHCAECs to collective and coordinated invasion into a new environment through the acquisition of an aggressive phenotype characterized by spindle-like morphology oriented toward the direction of the movement. This ability was remarkably reduced

due to contact inhibition between cells when pHCAECs were cultured at a high density in the closed system. The way of migration pattern of control pHCAECs was cooperative.

Tumor Necrosis Factor α Induces Reorganization of the F-Actin Pattern in Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells, Leading to the Formation of Aggressive Phenotypes and Reorganization of Cell-Cell Junctions

Due to remarkable changes in the morphology of rh TNF α -activated pHCAECs and different patterns of their movement, we analyzed the organization of F-actin, distribution of focal adhesion sites, and cell-cell junction proteins. As shown in confocal micrographs in **Figures 3A–G**, exposition of pHCAECs to 100 ng/ml rh TNF α induced changes in the organizational pattern of F-actin. We observed the transformation of F-actin from the star-like configuration in control pHCAECs into linear stress fibers in rh TNF-activated cells, as well as changes in the organization of focal adhesion sites (**Figures 3A,B** and **Supplementary Video S5**). Analyses of the localization of actin-GFP and talin-RFP, as well as fluorescently labeled F-actin and talin, revealed that developed prominent stress fibers in rh TNF α -activated pHCAECs were preceded by the formation of tension forces between star-like arranged F-actin bundles within individual cells, which seems to determine the

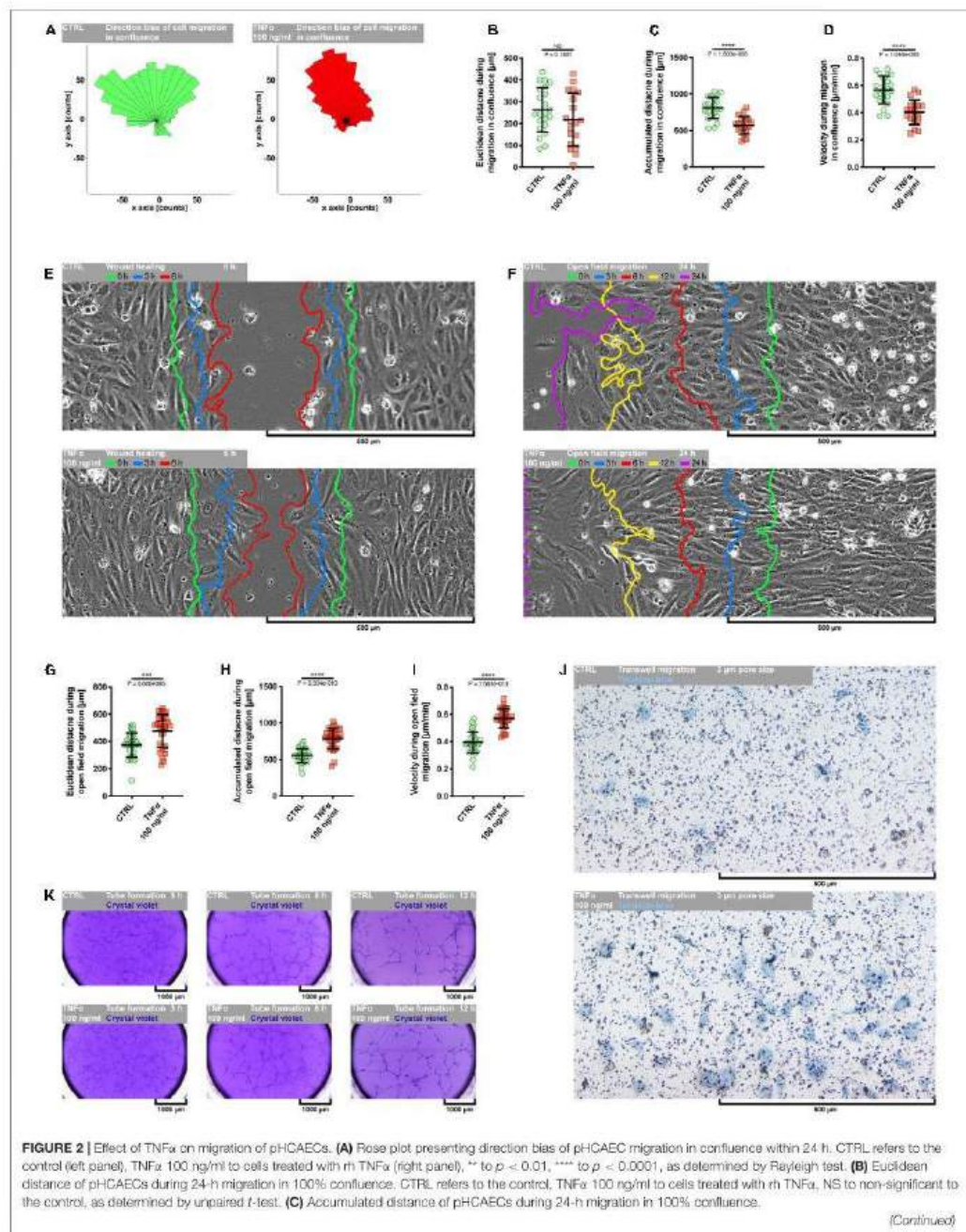


FIGURE 2 | Effect of TNF α on migration of pHCAECs. **(A)** Rose plot presenting direction bias of pHCAEC migration in confluence within 24 h. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel), ** to $p < 0.01$, **** to $p < 0.0001$, as determined by Rayleigh test. **(B)** Euclidean distance of pHCAECs during 24-h migration in 100% confluence. CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , NS to non-significant to the control, as determined by unpaired *t*-test. **(C)** Accumulated distance of pHCAECs during 24-h migration in 100% confluence.

(Continued)

FIGURE 2 | (Continued)

CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , **** to $p < 0.0001$, as determined by unpaired *t*-test. **(D)** Velocity of pHCAECs during 24-h migration in 100% confluence. CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , **** to $p < 0.0001$, as determined by unpaired *t*-test. **(E)** Representative contrast phase micrographs presenting pHCAEC migration to the wound site. Curves indicate area without cells in 0 h (green), 3 h (blue), and 6 h (red) of the wound healing assay. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel). **(F)** Representative contrast phase micrographs presenting pHCAEC migration to the open field. Curves indicate area without cells in 0 h (green), 3 h (blue), 6 h (red), 12 h (yellow), and 24 h (purple) of the open-field migration assay. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel). **(G)** Euclidean distance of pHCAECs during 24-h open-field migration. CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , *** to $p < 0.001$, as determined by unpaired *t*-test. **(H)** Accumulated distance of pHCAECs during 24-h open-field migration. CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , **** to $p < 0.0001$, as determined by unpaired *t*-test. **(I)** Velocity of pHCAECs during 24-h open-field migration. CTRL refers to the control, TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α , **** to $p < 0.0001$, as determined by unpaired *t*-test. **(J)** Representative bright-field micrographs presenting migration of pHCAECs through 3- μ m pores. The cells were stained with toluidine blue. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel). **(K)** Representative bright-field micrographs presenting tube formation by pHCAECs cultured on Matrigel. The tubular structures were stained with crystal violet after 3 h (left panel), 8 h (middle panel), and 12 h (right panel) from seeding. CTRL refers to the control (upper panels), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panels).

aggressive phenotype of pHCAECs. As shown in **Figures 3A,B** and **Supplementary Video S5**, this was related with increased cell-ECM adhesion, whereby adhesion sites were localized along newly formed and parallel-organized F-actin stress fibers (**Figures 3A,B**). The increased adhesion of rh TNF α -activated pHCAECs was confirmed in a wash assay (**Supplementary Figures S4A,B**). We found a statistically significant increase in the relative number of adherent cells per view after 1 h (from 1.033 ± 0.2395 to 1.153 ± 0.2252 , $p = 0.0052$, respectively, for control and TNF α -activated cells), 2 h (from 0.9978 ± 0.2185 to 1.134 ± 0.3150 , $p = 0.0378$), and 4 h (from 1.033 ± 0.2504 to 1.163 ± 0.3138 , $p = 0.0225$) after seeding in complete vascular growth medium supplemented with rh TNF α (**Supplementary Figures S4C–F**).

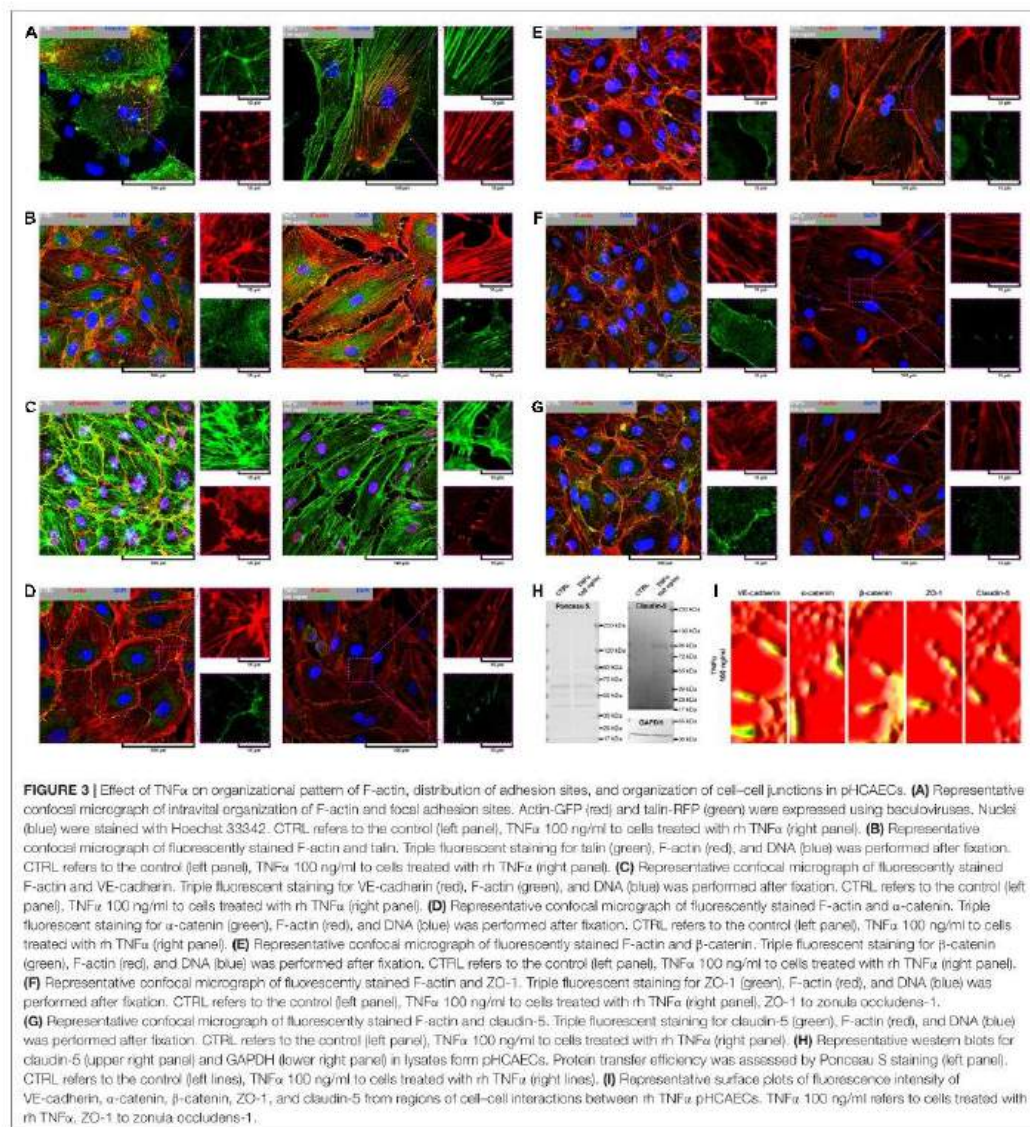
Furthermore, we sought to determine whether seeding pHCAECs on different ECM proteins could affect the alignment pattern of stress fibers in response to rh TNF α . Stress fiber organization did not differ depending on ECM protein coatings and was the same as in pHCAECs cultured with rh TNF α on an uncoated surface. Indeed, actin stress fibers were parallel to each other, running along the longer axis of rh TNF α -activated pHCAECs regardless of whether they were cultured on fibronectin (**Supplementary Figures S5A,B**), laminin (**Supplementary Figures S5C,D**), collagen I (**Supplementary Figures S5E,F**), and collagen IV (**Supplementary Figures S5G,H**). It was also noticed that the formation of F-actin stress fibers was associated with increased membrane ruffling (**Supplementary Video S5**) and formation of punctae cell-cell junctions (**Figures 3C–G**). Furthermore, the discontinuous cell-cell contact areas in rh TNF α -activated pHCAECs were characterized by bright fluorescence of AJ proteins, such as VE-cadherin, α -catenin, and β -catenin (**Figures 3C–E**), and TJ proteins, namely, zonula occludens-1 (ZO-1) and claudin-5 (**Figures 3F,G**). Although we noticed posttranslational downregulation of claudin-5 after exposition of cells to rh TNF α , we also showed a strong 95-kDa reactive band, suggesting the oligomerization of claudin-5 (**Figure 3H**) and its different tethering of scaffold protein and F-actin due to different mechanical coupling of adjacent cells and their coordinated movement. Direct participation of AJ and TJ proteins in signalization between rh TNF α -activated cells is presented in the form of surface plots in **Figure 3I**.

Due to a fundamental role of non-muscle (NM) myosin II, actin-related protein (ARP) 2/3, and rho-associated coiled-coil containing protein kinases 1 and 2 (ROCK-1 and ROCK-2) in processes that require cellular reshaping and movement (Bhadiraju et al., 2007; Vicente-Manzanares et al., 2009; Smith et al., 2013) and our observations of the effect of rh TNF α on F-actin rearrangement, we analyzed the localization of these proteins in both star-like-shaped F-actin bundles and rh TNF α -induced cortical F-actin stress fibers or sites of punctae cell-cell junctions. As shown in the left panel of **Figures 4A–E**, NM myosin IIb, ARP 2/3 1B, and ROCK-1 were localized in star-like-shaped F-actin structures, indicating their role in the cooperative transmission of tensions between adjacent cells. Interestingly, TNF α -activated cells expressed NM myosin IIa, ARP 2/3 1B, and ROCK-1 in the regions of punctae cell-cell junctions (right panel in **Figures 4A–E**). These observations were confirmed by the analysis of the colocalization with F-actin (**Figure 4F**) and determined the tensional character of discontinuous junctions between rh TNF α -activated pHCAECs.

In summary, these data, at least partially, explain the change in the migration pattern of pHCAECs in response to rh TNF α (from cooperative in the control into coordinated in rh TNF α -activated cells). We suggest that the star-like-shaped organization of F-actin bundles determines the propensity of pHCAECs to cooperative migration, important in effective contribution of 'seal the gaps' function, whereas rh TNF α -induced formation of prominent, parallel stress fibers and subsequent organization of punctae, but strong cell-cell junctions, allows for the directed and parallel motion of the cells during coordinated migration.

Tumor Necrosis Factor α Induces Formation of Migrasomes Involved in Cell-Cell Signalization Between Migrating Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells

Directional cell migration requires the series of changes in the structure and function of the cell at its different regions. These cover the formation of membrane-bounded cellular extensions at the leading edge and consequent retraction of the rear edge of the cell. It is widely accepted that tail retraction precedes and induces changes in migration direction and serves to maintain



directionality of the force-generating leading edge of the cell (Xue et al., 2010; Theisen et al., 2012). During rh TNF α -induced coordinated migration of pHCAECs, we observed intensified formation of retraction fibers behind cells (Figures 5A–D). As shown Figures 5A–E and Supplementary Video S5, these long and tubular structures were rich in F-actin, and their formation resulted in increased adhesion and interactions between cells at

the rear of migrating cells. We demonstrated that the tips of retraction fibers were continuously or discontinuously connected to the neighboring cells and were characterized by augmented adhesion, suggesting their role in transmission of P-actin-based mechanical forces for proper polarization of adjacent cells and coordination of their migration. These forces were generated by rapid contraction of retraction fibers toward the direction

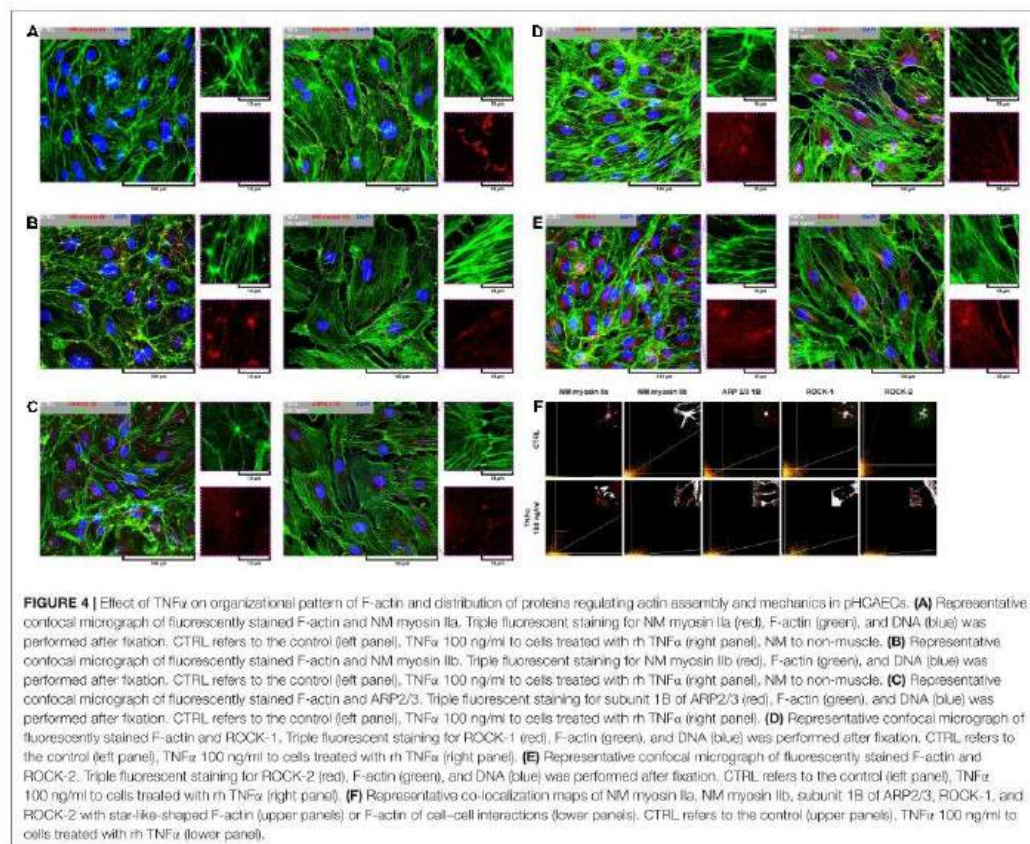


FIGURE 4 | Effect of TNF α on organizational pattern of F-actin and distribution of proteins regulating actin assembly and mechanics in pHCAECs. **(A)** Representative confocal micrograph of fluorescently stained F-actin and NM myosin IIa. Triple fluorescent staining for NM myosin IIa (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel), NM to non-muscle. **(B)** Representative confocal micrograph of fluorescently stained F-actin and NM myosin IIb. Triple fluorescent staining for NM myosin IIb (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel), NM to non-muscle. **(C)** Representative confocal micrograph of fluorescently stained F-actin and ARP2/3. Triple fluorescent staining for subunit 1B of ARP2/3 (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel). **(D)** Representative confocal micrograph of fluorescently stained F-actin and ROCK-1. Triple fluorescent staining for ROCK-1 (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel). **(E)** Representative confocal micrograph of fluorescently stained F-actin and ROCK-2. Triple fluorescent staining for ROCK-2 (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation. CTRL refers to the control (left panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (right panel). **(F)** Representative co-localization maps of NM myosin IIa, NM myosin IIb, subunit 1B of ARP2/3, ROCK-1, and ROCK-2 with star-like-shaped F-actin (upper panels) or F-actin of cell-cell interactions (lower panels). CTRL refers to the control (upper panels), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panels).

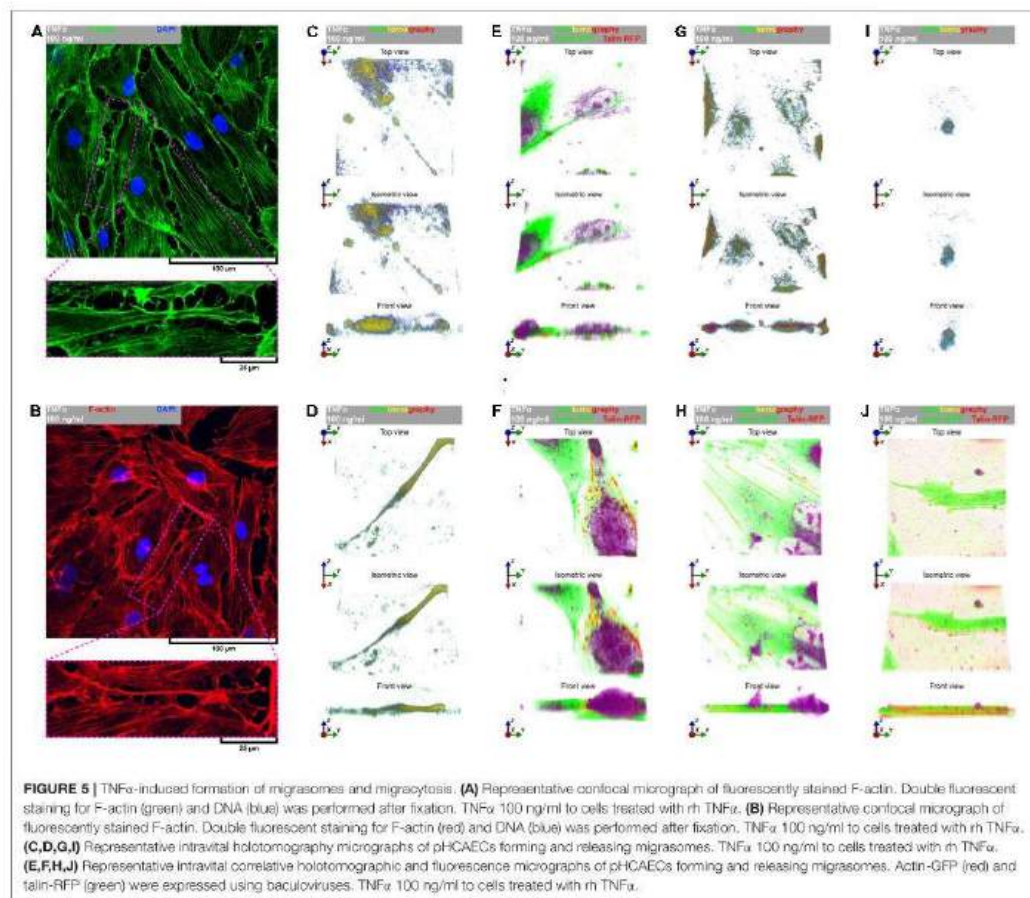
of cell movement (Figure 5F and Supplementary Video S5). We also frequently observed formation of migrasomes at tips or the course of retraction fibers and their release by breaking the retraction fibers (Supplementary Video S5). Moreover, as shown in Figures 5G–J, the released migrasomes tended to occur at points of cell–cell and cell–ECM contact. We also noticed that during retraction fiber breakage, some migrasomes may be released to the cell culture medium, where they seem to play a role in intercellular signaling promoting directed cell migration (Supplementary Video S6).

In summary, these data show possible ways of signaling between TNF α -activated pHCAECs during their migration. The first concerns the generation of mechanical forces during contraction of retraction fibers, and the other one is related to migracytosis. We suggest here that the formation and release of migrasomes are highly related to increased adhesion and strength of punctae or continuous intercellular junctions at the tips of retraction fibers. Moreover, our observations allow us to assume that migrasomes released by

TNF α -activated pHCAECs are involved in signaling between migrating pHCAECs.

Activation of Endogenous Expression of *TPM1* Inhibits Tumor Necrosis Factor α -Induced Inflammatory Response of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells and Force-Dependent Opening of Their Cell–Cell Junctions

It was shown by Tremblay et al. (2006) and in Figure 1 or Supplementary Figure S1 that E-selectin is the trigger of transendothelial migration but also accumulates quickly at punctae cell–cell junctions of activated endothelial cells, where it co-localizes with F-actin (Tremblay et al., 2006). We have previously shown that stabilization of F-actin by overexpression of α -tropomyosin protects endothelial integrity against L-homocysteine and cigarette smoke extract in EA.hy926 (Gagat et al., 2013, 2014). Similarly, our further studies revealed that



overexpression of α -tropomyosin preserves transformed alveolar epithelial cell-cell junctions against disintegration induced by cigarette smoke extract (Gagat et al., 2016). Here, we investigated the effect of CRISPR-based regulation of endogenous *TPM1* expression on the activation and posttranslational expression of cell-cell and cell-ECM adhesion proteins. First, we activated or deactivated endogenous expression of *TPM1* using CRISPR *TPM1* activation or knockout systems introduced to the cells by the nucleofection technique (Figures 6A,B). As shown in Figure 6C, the CRISPR systems worked effectively on modulating α -tropomyosin expression in pHCAECs (from 0.888 ± 0.0578 to 1.093 ± 0.0781 , $p = 0.0044$ and to 0.305 ± 0.0122 , $p < 0.0001$, respectively, for CRISPR *TPM1* activation and knockout systems). Furthermore, we showed that activation of endogenous expression of *TPM1* itself downregulated posttranslational expression of E-selectin (from 0.308 ± 0.0515 , $p = 0.0112$, and 0.584 ± 0.0753 , $p = 0.0002$, to 0.138 ± 0.0409 ,

respectively, as compared to the cells transfected with CRISPR control and knockout systems and inhibited rh TNF α -induced activation of pHCAECs (Figure 6D). Next, we investigated the effect of endogenous expression of *TPM1* on posttranslational expression of talin. Due to its essential role in mediating cell adhesion, most of the studies regarding talin have focused mainly on talin-1. However, talin-2 is required for the generation of traction force and formation of invadopodia (Qi et al., 2016). We observed that activation of endogenous *TPM1* expression itself downregulated posttranslational expression of talin-2 (from 0.840 ± 0.0421 to 0.274 ± 0.0066 , $p < 0.0001$), whereas *TPM1* knockdown led to a downregulation of both talin-1 (from 1.169 ± 0.0417 to 0.146 ± 0.0082 , $p < 0.0001$) and talin-2 (0.840 ± 0.0421 to 0.516 ± 0.0293 , $p < 0.0001$). After rh TNF α treatment, we also noticed decreased expression of talin-2 (from 0.274 ± 0.0066 to 0.188 ± 0.0239 , $p = 0.0037$) in *TPM1* upregulated cells and its increase in *TPM1*-knockdown

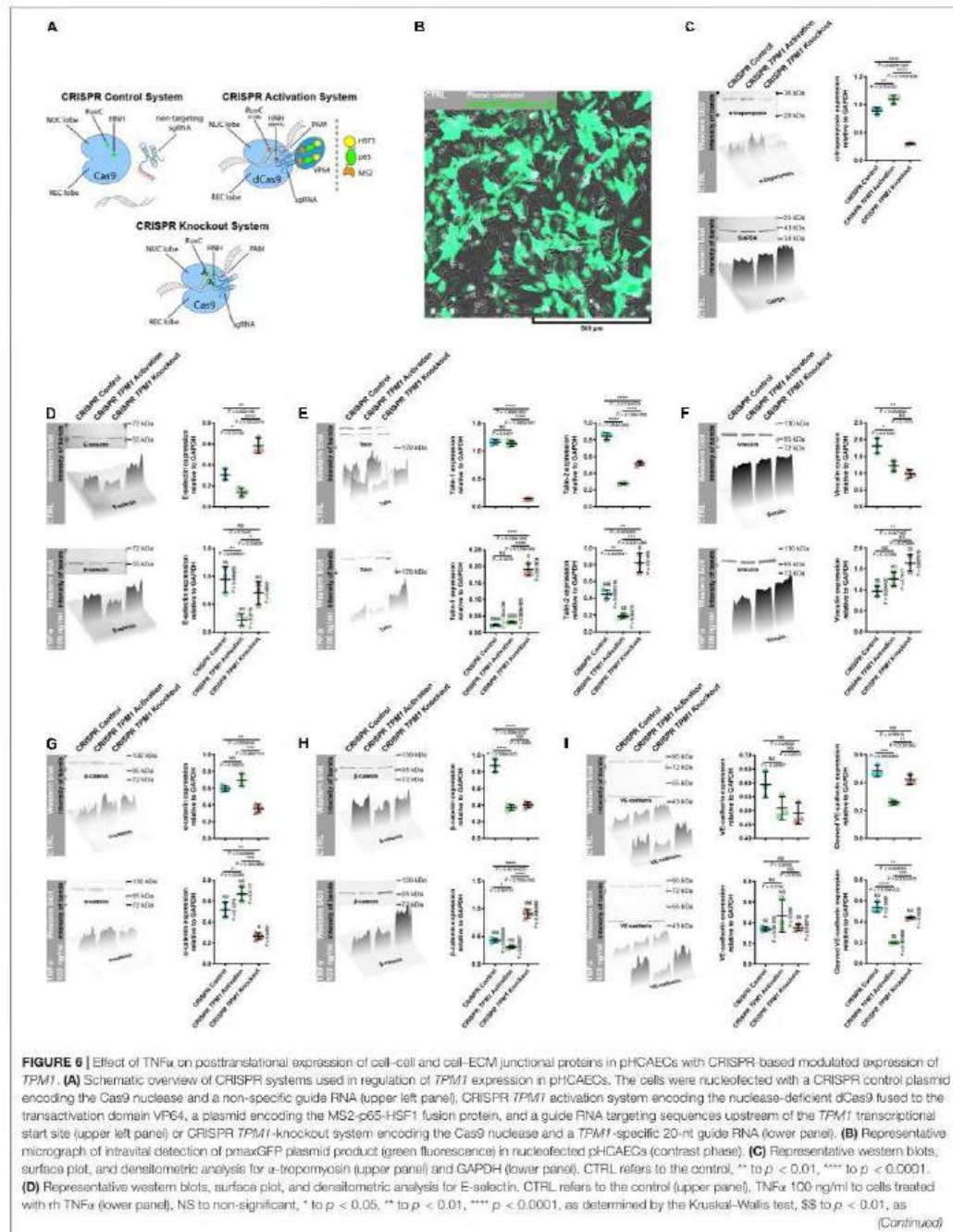


FIGURE 6 | (Continued)

determined by unpaired *t*-test. **(E)** Representative western blots, surface plot, and densitometric analysis for talin. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel), NS to non-significant, ** to $p < 0.01$, *** to $p < 0.001$, **** to $p < 0.0001$, as determined by the Kruskal–Wallis test, \$\$ to $p < 0.01$, \$\$\$ to $p < 0.001$, \$\$\$\$ to $p < 0.0001$, as determined by unpaired *t*-test. **(F)** Representative western blots, surface plot, and densitometric analysis for vinculin. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel), NS to non-significant, * to $p < 0.05$, ** to $p < 0.01$, as determined by the Kruskal–Wallis test, \$ to $p < 0.05$, as determined by unpaired *t*-test. **(G)** Representative western blots, surface plot, and densitometric analysis for α -catenin. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel), NS to non-significant, * to $p < 0.05$, ** to $p < 0.01$, *** to $p < 0.001$, as determined by the Kruskal–Wallis test, \$ to $p < 0.05$, as determined by unpaired *t*-test. **(H)** Representative western blots, surface plot, and densitometric analysis for β -catenin. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel), NS to non-significant, * to $p < 0.05$, **** to $p < 0.0001$, as determined by the Kruskal–Wallis test, \$\$\$ to $p < 0.001$, as determined by unpaired *t*-test. **(I)** Representative western blots, surface plot, and densitometric analysis for VE-cadherin. CTRL refers to the control (upper panel), TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α (lower panel), NS to non-significant, ** to $p < 0.01$, *** to $p < 0.001$, **** to $p < 0.0001$, as determined by the Kruskal–Wallis test, \$ to $p < 0.05$, as determined by unpaired *t*-test.

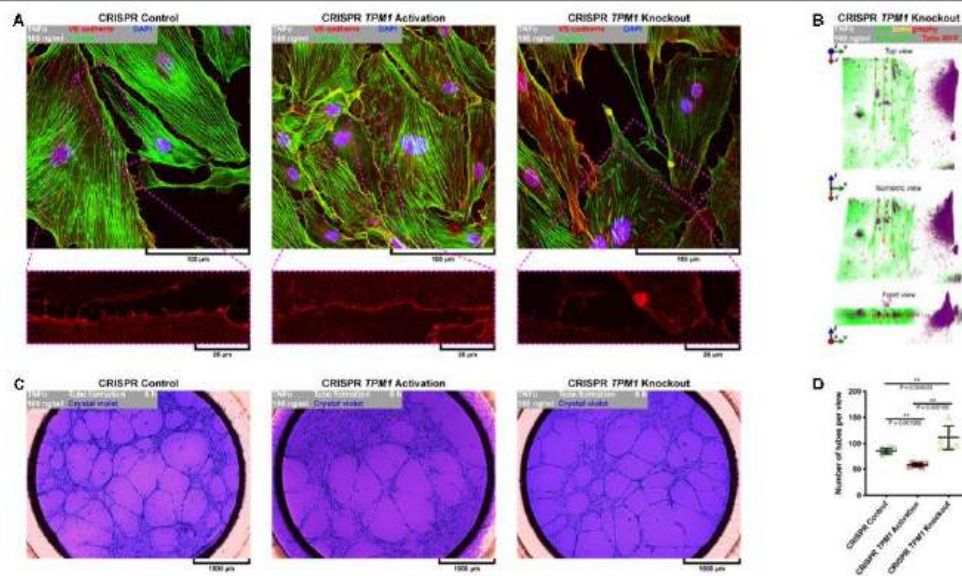
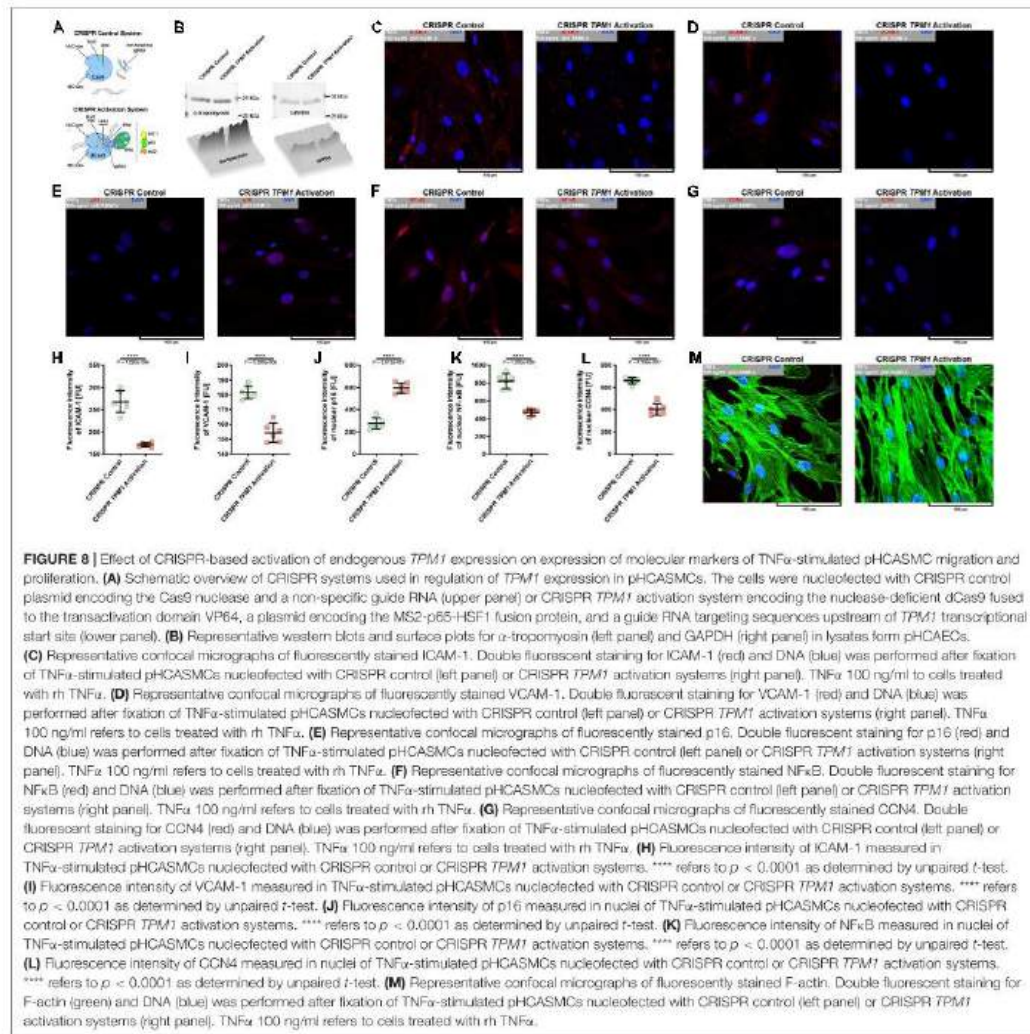


FIGURE 7 | Effect of CRISPR-based regulated expression of *TPM1* on F-actin organization, continuity of cell-cell junctions, and proangiogenic properties of TNF α -activated pHCAECs. **(A)** Representative confocal micrographs of fluorescently stained F-actin and VE-cadherin. Triple fluorescent staining for VE-cadherin (red), F-actin (green), and DNA (blue) was performed after fixation of pHCAECs nucleofected with CRISPR control (left panel), CRISPR *TPM1* activation (middle panel), or CRISPR *TPM1*-knockout systems (right panel). TNF α 100 ng/ml refers to cells treated with rh TNF α (right panel). **(B)** Representative intravital correlation holotomographic and fluorescence micrographs of pHCAECs nucleofected with the CRISPR *TPM1*-knockout system. Actin-GFP (red) and talin-RFP (green) were expressed using baculoviruses. TNF α 100 ng/ml to cells treated with rh TNF α . **(C)** Representative bright-field micrographs presenting tube formation by pHCAECs nucleofected with CRISPR control (left panel), CRISPR *TPM1* activation (middle panel), and CRISPR *TPM1*-knockout systems cultured on Matrigel. The tubular structures were stained with crystal violet after 6 h from seeding. TNF α 100 ng/ml refers to cells treated with rh TNF α . **(D)** Number of tubes per microscopic field formed by TNF α -activated pHCAECs with CRISPR-based regulated expression of *TPM1*. ** refers to $p < 0.01$, as determined by the Kruskal–Wallis test.

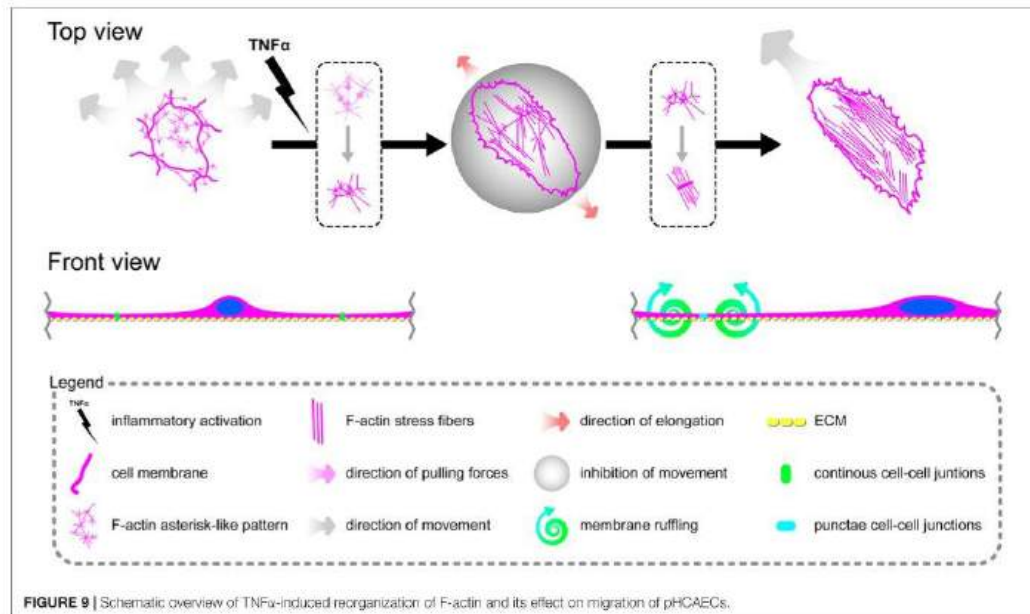
pHCAECs (from 0.516 ± 0.0293 to 0.824 ± 0.1143 , $p = 0.0106$). We did not observe expression of talin-1 in rh TNF α -activated pHCAECs transfected with CRISPR control and *TPM1* activation systems (Figure 6E). Talin-2 has been shown to be able to recruit vinculin in the absence of mechanical force (Austen et al., 2015). It has also been suggested that vinculin coordinates polarized cell motility and plays a central role in the regulation of endothelial barrier function via dynamic balance between centripetal forces generated by contraction of stress fibers attached to focal

adhesion sites and tethering forces applied by intracellular complexes (Birukova et al., 2016). Interestingly, here, we showed similar, and independent of rh TNF α treatment, posttranslational levels of vinculin in pHCAECs with activated *TPM1* expression. Differently, we noticed rh TNF α -induced upregulation of vinculin in cells transfected with the CRISPR *TPM1*-knockout system (from 0.973 ± 0.1228 to 1.637 ± 0.1992 , $p = 0.0080$; Figure 6F). Both α -catenin and vinculin cooperatively support the strength of intercellular adhesion via a mechanoresponsive



link between the cadherin- β -catenin complexes and F-actin (Thomas et al., 2013). Vinculin also protects VE-cadherin-containing AJs from opening during their force-induced remodeling (Huyeneers et al., 2012). The rh TNF α -independent and stable levels of vinculin in pHCAECs with activated *TPM1* expression were supported by the lack of rh TNF α -induced changes in α -catenin and β -catenin levels (Figures 6G,H). Furthermore, this was related with the rh TNF α -independent expression of VE-cadherin and decreased level of cleaved VE-cadherin (from 0.257 ± 0.0163 to 0.200 ± 0.0031 , $p = 0.0039$) (Figure 6I), suggesting that activation of endogenous expression

of *TPM1* leads to stabilization of AJs. Our further experiments showed that pHCAECs with activated transcription of *TPM1* were able to form continuous AJs in the presence of 100 ng/ml rh TNF α . In contrast, rh TNF α induced punctae appearance of AJs between the cells transfected with both CRISPR control and *TPM1*-knockout systems (Figure 7A). We also observed massive migracytosis after inflammatory activation of *TPM1*-knockdown pHCAECs with 100 ng/ml rh TNF α (Figures 7A,B). As shown in Figure 7C, force-dependent disorganization of cell-cell junctions was accompanied by the ability to form tubules on Matrigel. We observed a statistically significant



increase in the number of tubules formed by rh TNF α -activated pHCAs with normal and downregulated expressions of *TPM1*, as compared to the cells with activated expression of *TPM1* (from 58.50 ± 3.391 to 85.17 ± 5.076 , $p = 0.0011$, and 111.0 ± 22.70 , $p = 0.0022$, respectively, for the cells transfected with CRISPR *TPM1* activation, control, and *TPM1*-knockdown systems; **Figure 7D**).

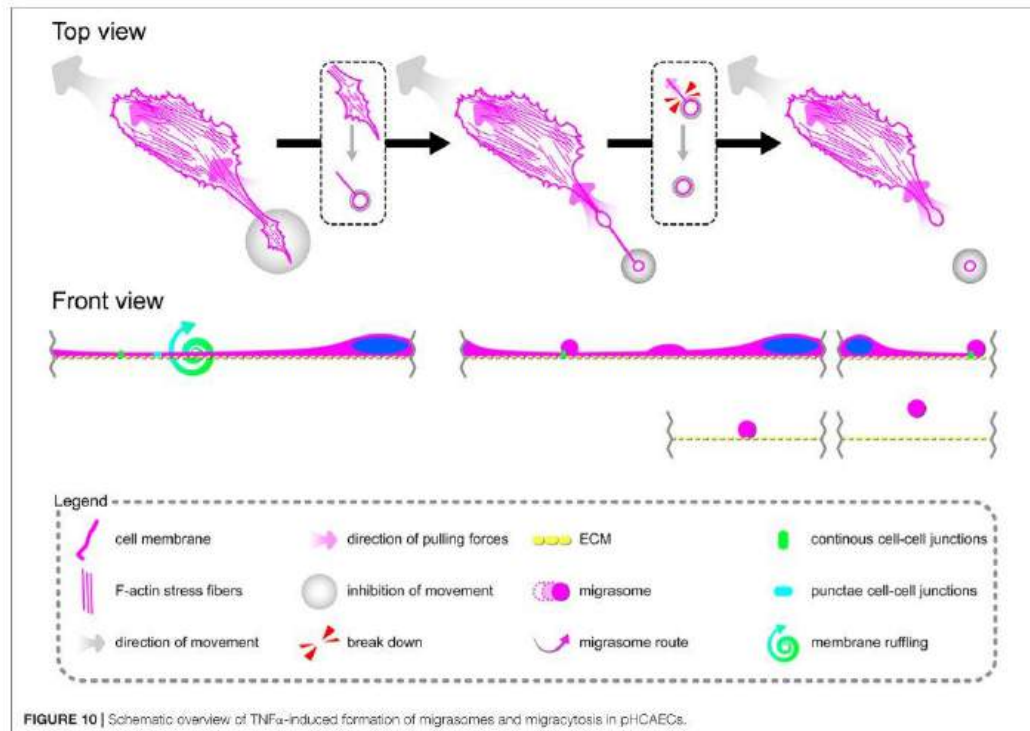
In summary, these data suggest that activation of endogenous expression of *TPM1* inhibits inflammatory response of pHCAs and downstream leads to the stabilization of cell-cell junctions through reducing the cleavage of VE-cadherin and maintaining stable levels of α - and β -catenins. Differently, CRISPR-based knockout of *TPM1* leads to increased migratory capacity in rh TNF α -activated pHCAs, which was confirmed by the increased angiogenic capacity of these cells in parallel with the formation of aggressive phenotypes. The migratory potential was also confirmed by the TNF α -dependent increase in posttranslational expression of talin-2, vinculin, and β -catenin.

Activation of Endogenous Expression of *TPM1* Inhibits Tumor Necrosis Factor α -Induced Activation, Proliferation, and Migration of Primary Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells

Because CRISPR-based activation of *TPM1* expression resulted in the stabilization of interactions between pHCAs treated with 100 ng/ml rh TNF α , we decided to evaluate whether the elevated level of α -tropomyosin was able to affect pHCAs

response to rh TNF α . As shown in **Figures 8A,B**, transfection of pHCAs with CRISPR *TPM1* activation system effectively upregulated expression of α -tropomyosin in these cells. It has been shown that expression of both ICAM-1 and VCAM-1 on intimal and medial SMCs is prominent in fibrous plaques and advanced atherosclerotic lesions and that expression of VCAM-1 correlates with intimal neovessels and mononuclear cell infiltration (Kasper et al., 1996; O'Brien et al., 1996). Here, we observed that CRISPR-based activation of *TPM1* inhibited the inflammatory response of pHCAs to 100 ng/ml rh TNF α , as evidenced by reduced fluorescence of ICAM-1 and VCAM-1 (both $p < 0.0001$; **Figures 8C,D,H,I**). Furthermore, we investigated the effect of rh TNF α on functional nuclear markers of proliferation and migration of SMCs. We observed increased levels of nuclear fluorescence for p16 ($p < 0.0001$; **Figures 8E,J**) and reduced fluorescence for nuclear NF κ B and CCN4 (both $p < 0.0001$) in TNF α -activated pHCAs with upregulated expression of α -tropomyosin, as compared to TNF α -activated cells transfected with the CRISPR control system (**Figures 8F,G,K,L**). These observations were confirmed by the analysis of F-actin organization. As shown in **Figure 8M**, TNF α promoted migratory distribution of the F-actin pattern in cells with normal expression of *TPM1*, whereas in pHCAs with CRISPR-based activation, expression of *TPM1* supported a typical smooth muscle 'hill and valley' morphology.

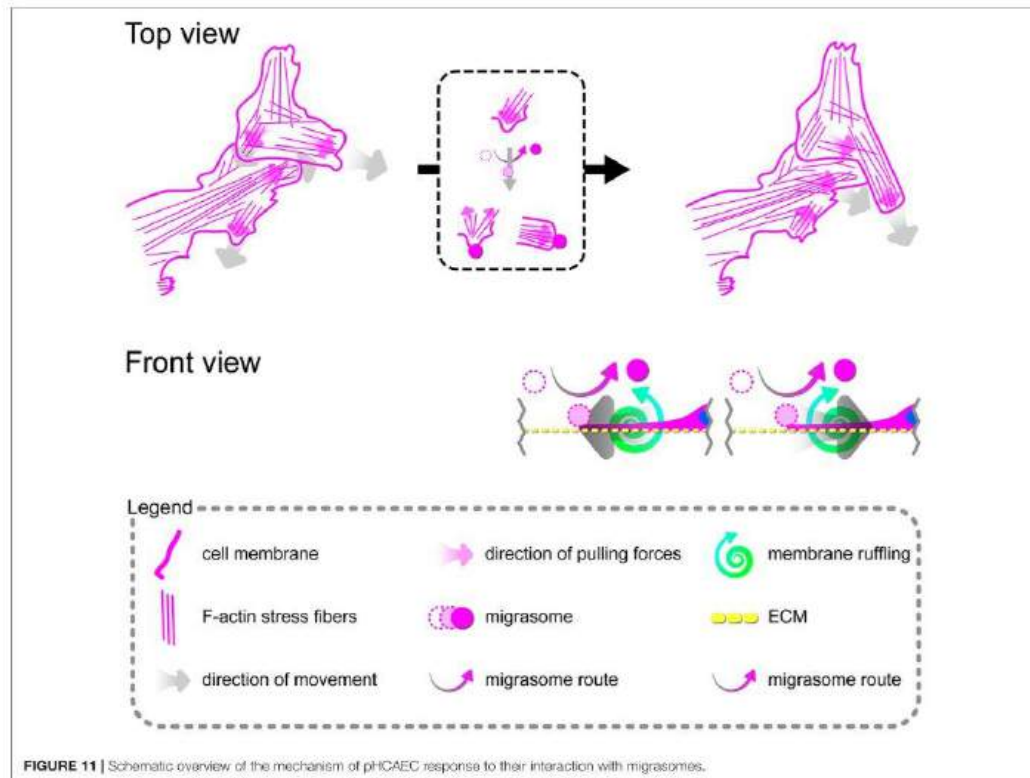
In summary, these data suggest that activation of the endogenous expression of *TPM1* inhibits inflammatory response of pHCAs and leads to the inhibition of their proliferation and migration.



DISCUSSION

The basis of inflammation is the changes in blood vessels allowing the recruitment of leukocytes to the site of damage. It results in vessel dilatation and an increase in their permeability (Libby, 2002). Inflammation is also an essential factor accompanying both the angiogenic and atherogenic pathways (Silvestre et al., 2008). The entire inflammatory process is mediated through cytokines. TNF α is one of the representatives of proinflammatory cytokines produced mainly by monocytes or monocyte-derived macrophages and affects many processes associated with the growth and characteristics of endothelial, smooth muscle, or immune system cells (Heller and Krönke, 1994; Peppel et al., 2005). A dual role of TNF α has been shown in the angiogenic response of endothelial cells: a proangiogenic effect *in vivo* and an antiangiogenic *in vitro* (Fräter-Schröder et al., 1987; Sainson et al., 2008). It has been also suggested that TNF α inhibits endothelial cell proliferation *in vitro* (Fräter-Schröder et al., 1987). The TNF α apoptotic response of human umbilical vein and aortic and coronary artery endothelial cells when cultured *in vitro* was also shown (Fräter-Schröder et al., 1987; Chen et al., 2004; Rastogi et al., 2012; Jiang et al., 2016). The reason for that can be a host organism used for the production of recombinant TNF α . *Escherichia coli* is one of

the organisms of choice for the production of recombinant proteins, such as TNF α , commonly used in vascular biology studies. However, protein expression in this system leads to many problems such as inclusion body formation related to incorrect disulfide bond formation, improper folding, or reduction in biological activity due to incomplete folding or mutations in cDNA (Rosano and Ceccarelli, 2014; Tavallaei et al., 2015). In the present study, we used rh TNF α produced in HEK293 cells, which effectively activated functional expression of E-selectin and VCAM-1 in pHCAECs. Although classical endothelial cell activation is defined by a shift in the expression of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 (Gimbrone et al., 1997), we observed only a weak induction of functional expression of ICAM-1 (data not shown). Wu et al. (2004) indicated the heterogeneity of pHCAECs' response to TNF α stimulation, e.g., due to pathologic conditions of human coronary artery donors (Wu et al., 2004). However, it has been shown that soluble markers of endothelial injury are not uniformly increased in patients with documented coronary artery disease and that the plasma level of ICAM-1 did not allow identification of endothelial injury in such patients (Semaan et al., 2000). It was also suggested that the deficiency of VCAM-1 either alone or in combination with the deficiency of ICAM-1 did not alter nascent lesion formation, indicating the importance of VCAM-1 in the initiation of atherosclerosis



(Cybulsky et al., 2001). As the activation of endothelium is associated with enhanced interactions with leukocytes (Woodfin et al., 2009), we confirmed the flattening, firm adhesion, and further migration of Jurkat T cells on the surface of the rh TNF α -activated pHCAECs. These data are consistent with the results received by Jaczevska et al. (2014) who demonstrated increased interactions between Jurkat T cells and HUVECs following treatment with INF- γ or TNF α . In the course of the inflammatory process, the capture of leukocytes on the surface of the endothelium is possible due to the interaction of very late antigen-4 integrin on the leukocyte with selectins and VCAM-1 in endothelial cell walls (Abdala-Valencia et al., 2011). Similarly, the observed phenomenon of stronger adhesion of lymphocytes to endothelial monolayer was associated with increased expression of E-selectin and VCAM-1 cell adhesion molecules, which was also confirmed by Lu et al. (2016) and Munro et al. (1989). It was also suggested that the activation of endothelium includes not only changes in levels of adhesion molecules expression but also their redistribution from cell junctions to non-junctional membranes (JAM-A, JAM-C, and PECAM-1) or internalization from the plasma membrane (VE-cadherin) (Reglero-Real et al., 2016). Additionally, the effect of

TNF α on TEM seems to depend on stimulation time. Within shorter stimulation times, leukocytes bind preferentially to the junctional regions of endothelial cells, whereas within longer periods, receptors in the junctional region are no longer easily available and TEM is intensified by cytoskeletal rearrangement and increased endothelial permeability (Jaczevska et al., 2014). Our observations seem to confirm this assumption since cytoskeletal rearrangement leading to the formation of discontinuous cell-cell junctions and intercellular gaps was finished at about 12–16 h from rh TNF α treatment.

Activation of pHCAECs following rh TNF α treatment led to morphological changes. One of the most obvious was a transformation of the shape of the cells into a spindle-like one and oriented toward the direction of cell migration. Similar to that found in our study, TNF α -induced spindle-shaped, narrowed, and elongated morphology was observed in HUVECs and hCMEC/D3 cells and correlated with the increased paracellular permeability (Miyazaki et al., 2017; Ni et al., 2017). Here, we showed that rh TNF α -induced change of the pHCAEC shape was related to the coordinated rearrangement of actin cytoskeleton from the star-like-shaped F-actin bundles into prominent, parallel-organized stress fibers. This perfectly

explains the transition of polygonal cobblestone-like pHCAECs to a uniformly spindle-shaped and aligned monolayer. Aster- or star-like-shaped structures were described by Fritzsche et al. (2017) as self-organized F-actin patterns, achieved by polarity sorting of actin filaments. In the *in silico* analysis, they showed two main nucleation pathways of this actin patterning. In the first scenario, Arp2/3 complexes bind to preexisting F-actin and nucleate new filaments from their pointed ends (–), leaving the barbed ends (+) pointing outward. In the second one, myosin II crosslinks with F-actin at their barbed ends (+) at the pattern centers, resulting in the point ends (–) pointing outward (Fritzsche et al., 2017). In our study, the core of star-like-shaped F-actin structures co-localized with Arp2/3, whereas radiating bundles co-localized with NM myosin IIB and ROCK-1. Furthermore, the analysis of the trajectories of cells showed that the star-like-shaped organization of F-actin bundles determines the propensity of pHCAECs to cooperative migration in any direction, important in the effective contribution of barrier function. Differently, parallel-organized stress fibers in activated pHCAECs promoted directed and parallel motion during the coordinated migration (Figure 9). These results suggest that rh TNF α induces the formation of the aggressive angiogenic phenotype of pHCAECs, which was confirmed in various migratory experiments.

The transformation of the F-actin pattern induced by rh TNF α was closely related to abnormalities in junctional regions and the distribution of focal adhesion sites. We proved that rh TNF α promotes discontinuous cell–cell contact, preceded by membrane ruffling during polarization of pHCAECs to achieve a spindle-like shape promoting their migration. Interestingly, TNF α -activated cells expressed NM myosin IIa, ARP 2/3 1B, and ROCK-1 in the regions of punctae cell–cell junctions. It was shown that NM myosin IIa controls cadherin clustering at AJs in a Rho-dependent manner, allowing proper adhesion of epithelial cells (de Beco et al., 2012). Smutny et al. (2010) showed that NM myosin IIa promotes the accumulation of E-cadherin in the AJs while NM myosin IIB stabilizes the associated perijunctional actin ring, increasing cell–cell adhesion and preventing them from disruptive forces. However, Efimova and Svitkina (2018) showed an association of NM myosin IIa with contractile actin bundle running parallel to linear AJs in endothelial cells. In our study, the NM myosin IIa correlated with a bright fluorescence of AJ and TJ proteins in the regions of punctae cell–cell junctions. Furthermore, we showed oligomerization of claudin-5 in activated pHCAECs. Claudin-5 preferentially forms hexamers, which make cell contacts much stronger than in the case of the monomeric form (Krause et al., 2008). Considering the above, this suggests that rh TNF α -induced punctae intercellular junctions are strong and play an important role in directed cell migration of pHCAECs, allowing follower cells to trail the leaders (Ozawa et al., 2020).

Ma et al. (2015) identified and described extracellular membrane-bounded vesicular structures that are characteristically generated along retraction fibers in migrating cells. They named these pomegranate-like structures as migrasomes and showed their formation in various cell lines, including MEF (mouse embryonic fibroblast), NIH3T3 (mouse

embryonic fibroblast), HaCaT (human keratinocyte), MDA-MB-231 (human breast cancer), HCT116 (human colon cancer), SW480 (human adenocarcinoma), MGC803 (human gastric carcinoma), SKOV-3 (human ovarian adenocarcinoma), and B16 (mouse melanoma), and organs, such as the eye, lung, and intestine. These structures have been also observed in the lumen of blood vessels or pulmonary alveoli (Ma et al., 2015). However, the mechanism of their formation and biological or clinical importance is still unknown. Huang et al. (2019) proposed the mechanism of migrasome growing as an assembly of tetraspanin- and cholesterol-enriched membrane microdomains into micron-scale macrodomains. It has been also shown that tetraspanins are localized at digitation junctions, which reflect the transition processes before the establishment or after the disassembly of stable cell–cell junctions (Huang et al., 2018). Here, we showed intensified formation of migrasomes in TNF α -stimulated pHCAECs and that their formation is highly dependent on cell–cell and cell–ECM interaction, suggesting their role in the transmission of F-actin-based mechanical forces for proper polarization of adjacent cells and coordination of the cell migration direction. Furthermore, we frequently observed their release by breaking the retraction fibers, which resulted in their stay at points of cell–cell and/or cell–ECM contact as well as their release to the cell culture medium (Figure 10). Finally, we showed that floating migrasomes exert local cytoskeletal rearrangement and motility response (Figure 11), suggesting their involvement in intercellular signaling promoting directed migration of activated pHCAECs.

The data presented here showed that rh TNF α induces F-actin reorganization resulting in mechanical disruption of cell–cell junction continuity through the promotion of directed migration of pHCAECs. In this case, methods for regulation of the actin cytoskeleton structure might be clinically potent. One of such targets may be α -tropomyosin, which belongs to a family of actin-binding proteins. Tropomyosins are coiled-coil parallel dimers that form a head-to-tail polymer along the length of actin filaments regulating their access of other actin-binding proteins (Gunning et al., 2015). In mammals, over 40 tropomyosin isoforms are produced by alternative promoter selection, alternative splicing and/or 3' end processing of four different genes: *TPM1*, *TPM2*, *TPM3*, and *TPM4* (Denz et al., 2004). Tropomyosin variants are classified into two major groups: high molecular weight (HMW; ~284 amino acids and molecular weight between 33 and 40 kDa) and low molecular weight (LMW; ~247 amino acids and molecular weight between 28 and 34 kDa) (Schevzov et al., 2011). In muscle cells, all actin filaments are saturated with tropomyosins and regulate muscle contraction in a calcium-dependent manner, while in non-muscle cells, saturation of actin vary from 30% to 90%, depending on the cell type and tropomyosins stabilize the actin cytoskeleton and participate in many cellular processes, including motility, cell–cell adhesion, and cell–extracellular interactions (Perry, 2001; Humayun-Zakaria et al., 2019; Janco et al., 2019). Our previous studies have shown that increased expression of α -tropomyosin protects endothelial integrity against L-homocysteine and cigarette smoke extract in EA.hy926 (Gagat et al., 2013, 2014) and preserves transformed alveolar epithelial

cell–cell junctions against disintegration induced by cigarette smoke extract (Gagat et al., 2016). α -Tropomyosin was also indicated to function as a tumor suppressor primarily by inhibiting cell proliferation, angiogenesis, and metastasis in renal cell carcinoma (Wang et al., 2019). Here, we showed that CRISPR-based activation of the endogenous expression of *TPM1* inhibits the inflammatory response of pHCAECs to TNF α and leads to the stabilization of cell–cell junctions through reduced cleavage of VE-cadherin and the maintenance of the stable levels of α - and β -catenins. We also showed that CRISPR-based knockout of *TPM1* leads to an increased angiogenic capacity of rh TNF α -activated pHCAECs and augments the formation of migrasomes and migracytosis in these cells. These findings pushed us to question how pHCAECs with the activated expression of *TPM1* will respond to rh TNF α . Wang et al. (2011) showed that *TPM1* is a validated target of microRNA-21, which negatively regulates its posttranslational expression and leads to arteriosclerosis obliterans. They also showed that overexpression of *TPM1* decreased proliferation and migration of hASMCs, whereas its silencing significantly attenuated the antiproliferative and anti-migratory roles of the miR-21 inhibitor (Wang et al., 2011). Our results indicate that CRISPR-based activation of *TPM1* expression results in inhibition of the inflammatory response of pHCAECs and exerts antiproliferative and anti-migratory activity.

Our study has several limitations. First of all, the study was performed in static conditions. However, the effect of rh TNF α is similar to that in *in vivo* studies, showing the proangiogenic action of TNF α . Also, due to the study design, we did not perform migratory tests on different ECM proteins, but we showed a lack of differences in the organization of F-actin in rh TNF α -activated pHCAECs when cultured on fibronectin, laminin, collagen I, and collagen IV coatings. Proliferation and migration of TNF α -activated pHCAECs were also assessed based on the nuclear localization and fluorescence intensity of p16, NF κ B, and CCN4. Furthermore, our study is based on morphological and semiquantitative analyses, but it allows for fast and easy translation of the findings into applied clinical studies. Finally, we used commercially available pHCAECs and pHCAECs. Although we know the cause of the death of cell donors, we cannot unequivocally exclude that there was no generalized shock reaction of unknown duration that could affect the studied cells. In order to exclude this possible and reversible effect, only cells within three to four passages were used for all the experiments. It is also worth remembering that *TPM1* gene products occur in at least 29 isoforms (Cooley and Bergtrom, 2001). Unfortunately, in our study, we were unable to identify the isoform targeted by the applied CRISPR systems. Identification of the specific isoform, the expression of which determines the observed effect, is extremely important in the context of subsequent studies and their clinical application. However, in our study, tropomyosin was detected using the F-6 antibody (Santa Cruz) specific for an epitope mapping between amino acids 123 and 161. Furthermore, the molecular weight of the detected isoform of tropomyosin was in the range 33–35 kDa in pHCAECs and 33–34 kDa in pHCAECs.

In conclusion, the present investigations demonstrated that rh TNF α -induced activation of pHCAECs results in actin cytoskeleton reorganization, promoting their directed and coordinated migration. We also proposed that the formation and release of migrasomes are highly related to increased adhesion and junctional strength of tips of retraction fibers with adjacent cells and that they play a role in intercellular signalization promoting directed cell migration. Furthermore, we showed that stabilization of F-actin through the activation of endogenous expression of *TPM1* inhibits inflammatory response of pHCAECs, allowing formation of continuous cell–cell junctions, and exerts antiproliferative and anti-migratory effects in pHCAECs. Additional *in vivo* studies are needed to gain a better understanding of the role of α -tropomyosin in atherosclerosis and angiogenesis, as well as to examine the potential of *TPM1* as a candidate therapy target for proinflammatory vascular disorders. However, our findings may be adapted during the design and development of new coronary stent devices.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG and AG conceptualized the project and designed the experiments. MG, WZ, KM, and AK performed the experiments. MG and DG interpreted the results. MG, KM, and WZ performed image analysis. MG and WZ performed statistical analysis. MG and WZ drafted the manuscript. KM and DG edited the manuscript. AK-W and JZ critically reviewed the manuscript. MG gained funding for the study. AG provided supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by grant no. 2015/17/D/NZ7/00809 to MG from National Science Centre, Poland.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Magdalena Izdebska and Marta Hałas-Wiśniewska for sharing technical expertise.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.668032/full#supplementary-material>

Supplementary Video S6 | TNF α -induced formation of migrasomes and migracytosis. Actin-GFP (red) and talin-RFP (green) were expressed using baculoviruses. TNF α 100 ng/ml refers to cells treated with rh TNF α . Time-lapse images were acquired for 6.5 h at 10-min intervals after 15 h from treatment. Frame rate, 3 frames/s.

Supplementary Video S7 | Interactions of pHCAECs with migrasome released to cell culture medium. Actin-GFP (green) and talin-RFP (red) were expressed using baculovirus system. TNF α 100 ng/ml refers to cells treated with rh TNF α . Time-lapse images were acquired for 1.25 h at 5-min intervals after 18 h from treatment. Frame rate, 3 frames/s.

REFERENCES

- Abdala-Valencia, H., Berdnikovs, S., and Cook-Mills, J. M. (2011). Mechanisms for vascular cell adhesion molecule-1 activation of ERK1/2 during leukocyte transendothelial migration. *PLoS One* 6:e26706. doi: 10.1371/journal.pone.0026706
- Austen, K., Ringer, P., Mehlich, A., Chrostek-Grashoff, A., Kluger, C., Klingner, C., et al. (2015). Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages. *Nat. Cell Biol.* 17, 1597–1606. doi: 10.1038/ncb3268
- Bhadriraju, K., Yang, M., Alom Ruiz, S., Pirone, D., Tan, J., and Chen, C. S. (2007). Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Exp. Cell Res.* 313, 3616–3623. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.002
- Birukova, A. A., Shah, A. S., Tian, Y., Moldobaeva, N., and Birukov, K. G. (2016). Dual role of vinculin in barrier-disruptive and barrier-enhancing endothelial cell responses. *Cell Signal.* 28, 541–551. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.02.015
- Canver, A. C., Ngo, O., Lowmes Urbano, R., and Morris Clynedoi, A. (2016). Endothelial directed collective migration depends on substrate stiffness via localized myosin contractility and cell-matrix interactions. *J. Biomech.* 49, 1369–1380. doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.12.037
- Cerutti, C., and Ridley, A. J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* 358, 31–38. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.06.003
- Chen, J., Li, D., Zhang, X., and Mehta, J. L. (2004). Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells: modulation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand pioglitazone. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 9, 35–41. doi: 10.1177/107424840400900106
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., and Bobryshev, Y. V. (2015). Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Front. Physiol.* 6:365. doi: 10.3389/fphys.2015.00365
- Coolley, B. C., and Bergtrom, G. (2001). Multiple combinations of alternatively spliced exons in rat tropomyosin- α gene mRNA: evidence for 20 new isoforms in adult tissues and cultured cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 71–77. doi: 10.1006/abbi.2001.2347
- Cybulsky, M. I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., et al. (2001). A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107, 1255–1262. doi: 10.1172/JCI11871
- de Beco, S., Amblard, F., and Coscoy, S. (2012). New insights into the regulation of E-cadherin distribution by endocytosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 295, 63–108. doi: 10.1016/B978-0-12-394306-4.00008-3
- Denz, C. R., Narshi, A., Zujdel, R. W., and Dube, D. K. (2004). Expression of a novel cardiac-specific tropomyosin isoform in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1291–1297. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.06.084
- Efimova, N., and Svitekina, T. M. (2018). Branched actin networks push against each other at adherens junctions to maintain cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 217, 1827–1845. doi: 10.1083/jcb.201708103
- Fräter-Schröder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Böhlen, P. (1987). Tumor necrosis factor type α , a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5277–5281. doi: 10.1073/pnas.84.15.5277
- Fritzsche, M., Li, D., Colin-York, H., Chang, V. T., Moendarbary, E., Felce, J. H., et al. (2017). Self-organizing actin patterns shape membrane architecture but not cell mechanics. *Nat. Commun.* 8:14347. doi: 10.1038/ncomms14347
- Gagat, M., Grzanka, D., Izdebska, M., and Grzanka, A. (2013). Effect of L-homocysteine on endothelial cell-cell junctions following F-actin stabilization through tropomyosin-1 overexpression. *Int. J. Mol. Med.* 32, 115–129. doi: 10.3892/ijmm.2013.1357
- Gagat, M., Grzanka, D., Izdebska, M., Sroka, W. D., Halas-Wisniewska, M., and Grzanka, A. (2016). Tropomyosin-1 protects transformed alveolar epithelial cells against cigarette smoke extract through the stabilization of F-actin-dependent cell-cell junctions. *Acta Histochem.* 118, 225–235. doi: 10.1016/j.acthis.2016.01.003
- Gagat, M., Grzanka, D., Izdebska, M., Sroka, W. D., Marszał, M. P., and Grzanka, A. (2014). Tropomyosin-1 protects endothelial cell-cell junctions against cigarette smoke extract through F-actin stabilization in EA.hy926 cell line. *Acta Histochem.* 116, 606–618. doi: 10.1016/j.acthis.2013.11.013
- Gimbrone, M. A. Jr., and García-Cardena, G. (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 620–636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
- Gimbrone, M. A. Jr., Resnick, N., Nagel, T., Khachigian, L. M., Collins, T., and Topper, J. N. (1997). Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 811, 1–10. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb51983.x
- Godo, S., and Shimokawa, H. (2017). Endothelial functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e108–e114. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309813
- Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P., and Mulvihill, D. P. (2015). Tropomyosin – master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 128, 2965–2974. doi: 10.1242/jcs.172502
- Heller, R. A., and Krönke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* 126, 5–9. doi: 10.1083/jcb.126.1.5
- Huang, C., Fu, C., Wren, J. D., Wang, X., Zhang, F., Zhang, Y. H., et al. (2018). Tetraspanin-enriched microdomains regulate digitization junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3423–3439. doi: 10.1007/s00018-018-2803-2
- Huang, Y., Zucker, B., Zhang, S., Elias, S., Zhu, Y., and Chen, H. (2019). Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains. *Nat. Cell Biol.* 21, 991–1002. doi: 10.1038/s41556-019-0367-5
- Humayun-Zakaria, N., Arnold, R., Goel, A., Ward, D., Savill, S., and Bryan, R. T. (2019). Tropomyosins: potential biomarkers for urothelial bladder cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1102. doi: 10.3390/ijms20051102
- Huveneers, S., Oldenburg, J., Spanjaard, E., van der Krogt, G., Grigoriev, I., Akhmanova, A., et al. (2012). Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J. Cell Biol.* 196, 641–652. doi: 10.1083/jcb.201108120
- Jaczewska, J., Abdulreda, M. H., Yau, C. Y., Schmitt, M. M., Schubert, I., Berggren, P. O., et al. (2014). TNF- α and IFN- γ promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration. *J. Leukoc. Biol.* 95, 265–274. doi: 10.1189/jlb.0412205
- Janco, M., Rynkiewicz, M. J., Li, L., Hook, J., Effe, E., Ghosh, A., et al. (2019). Molecular integration of the anti-tropomyosin compound ATM-3507 into the coiled coil overlap region of the cancer-associated Tpm3.1. *Sci. Rep.* 9:11262. doi: 10.1038/s41598-019-47592-9
- Jiang, C., Fang, X., Jiang, Y., Shen, F., Hu, Z., Li, X., et al. (2016). TNF- α induces vascular endothelial cells apoptosis through overexpressing pregnancy induced noncoding RNA in Kawasaki disease model. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 72, 118–124. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.011
- Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., et al. (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb. Haemost.* 93, 735–742. doi: 10.1160/TH04-09-0576
- Kasper, H. U., Schmidt, A., and Roessner, A. (1996). Expression of the adhesion molecules ICAM, VCAM, and ELAM in the arteriosclerotic plaque. *Gen. Diagn. Pathol.* 141, 289–294.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J., and Blasig, I. E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 631–645. doi: 10.1016/j.bbamem.2007
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874. doi: 10.1038/nature01323
- Lu, Z. Y., Chen, W. C., Li, Y. H., Li, L., Zhang, H., Pang, Y., et al. (2016). TNF- α enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via the NF- κ B, ERK and JNK signaling pathways. *Mol. Med. Rep.* 14, 643–648. doi: 10.3892/mmr.2016.5314

- Ma, L., Li, Y., Peng, J., Wu, D., Zhao, X., Cui, Y., et al. (2015). Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res.* 25, 24–38. doi: 10.1038/cr.2014.135
- Matsushita, H., Chang, E., Glassford, A. J., Cooke, J. P., Chiu, C. P., and Tsao, P. S. (2001). eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization. *Circ. Res.* 89, 793–798. doi: 10.1161/hh2101.098443
- Michaelis, U. R. (2014). Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 4131–4148. doi: 10.1007/s00018-014-1678
- Miyazaki, K., Hashimoto, K., Sato, M., Watanabe, M., Tomikawa, N., Kanno, S., et al. (2017). Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatr. Res.* 81, 942–947. doi: 10.1038/pr.2017.28
- Munro, J. M., Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1989). Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am. J. Pathol.* 135, 121–133.
- Ni, Y., Teng, T., Li, R., Simonyi, A., Sun, G. Y., and Lee, J. C. (2017). TNF α alters occludin and cerebral endothelial permeability: role of p38MAPK. *PLoS One* 12:e0170346. doi: 10.1371/journal.pone.0170346
- O'Brien, K. D., McDonald, T. O., Chait, A., Allen, M. D., and Alpers, C. E. (1996). Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 93, 672–682. doi: 10.1161/01.cir.93.4.672
- Ozawa, M., Hiver, S., Yamamoto, T., Shibata, T., Upadhyayula, S., Mimori-Kiyosue, Y., et al. (2020). Adherens junction regulates cryptic lamellipodia formation for epithelial cell migration. *J. Cell Biol.* 219:e202006196. doi: 10.1083/jcb.202006196
- Peppel, K., Zhang, L., Orman, E. S., Hagen, P. O., Amalfitano, A., Brian, L., et al. (2005). Activation of vascular smooth muscle cells by TNF and PDGF: overlapping and complementary signal transduction mechanisms. *Cardiovasc. Res.* 65, 674–682. doi: 10.1016/j.cardiores.2004
- Perna, A. F., Sepe, I., Lanza, D., Capasso, R., Zappavigna, S., Capasso, G., et al. (2013). Hydrogen sulfide reduces cell adhesion and relevant inflammatory triggering by preventing ADAM17-dependent TNF- α activation. *J. Cell Biochem.* 114, 1536–1548. doi: 10.1002/jcb.24495
- Perry, S. V. (2001). Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 5–49. doi: 10.1023/a:1010303732441
- Qi, L., Jafari, N., Li, X., Chen, Z., Li, L., Hytönen, V. P., et al. (2016). Talin2-mediated traction force drives matrix degradation and cell invasion. *J. Cell Sci.* 129, 3661–3674. doi: 10.1242/jcs.185959
- Rastogi, S., Rizwani, W., Joshi, B., Kunigal, S., and Chellappan, S. P. (2012). TNF- α response of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells involve differential utilization of ASK1 kinase and p73. *Cell Death Differ.* 19, 274–283. doi: 10.1038/cdd.2011.93
- Reglero-Real, N., Colom, R., Bodkin, J. V., and Nourshargh, S. (2016). Endothelial cell junctional adhesion molecules: role and regulation of expression in inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 2048–2057. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307610
- Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- Sainson, R. C., Johnston, D. A., Chu, H. C., Holderfield, M. T., Nakatsu, M. N., Crampton, S. P., et al. (2008). TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood* 111, 4997–5007. doi: 10.1182/blood-2007-08-108597
- Schevzov, G., Whittaker, S. P., Fath, T., Lin, J. J., and Gunning, P. W. (2011). Tropomyosin isoforms and reagents. *Bioarchitecture* 1, 135–164.
- Semaan, H. B., Gurbel, P. A., Anderson, J. L., Muhlestein, J. B., Carlquist, J. F., Horne, B. D., et al. (2000). Soluble VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1 discriminate endothelial injury in patients with documented coronary artery disease. *Cardiology* 93, 7–10. doi: 10.1159/00006995
- Silvestre, J. S., Mallat, Z., Tedgui, A., and Lévy, B. I. (2008). Post-ischaemic neovascularization and inflammation. *Cardiovasc. Res.* 78, 242–249. doi: 10.1093/cvr/cvn027
- Smith, B. A., Daugherty-Clarke, K., Goode, B. L., and Gelles, J. (2013). Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1285–1290. doi: 10.1073/pnas.1211164110
- Smutny, M., Cox, H. L., Leerberg, J. M., Kovacs, E. M., Conti, M. A., Ferguson, C., et al. (2010). Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. *Nat. Cell Biol.* 12, 696–702. doi: 10.1038/ncb2072
- Tavallaee, O., Bandehpour, M., Nafissi-Varcheh, N., and Kazemi, B. (2015). Periplasmic expression of TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in *E. coli*. *Iran. J. Pharm. Res.* 14, 617–626.
- Theisen, U., Straube, E., and Straube, A. (2012). Directional persistence of migrating cells requires Kif1C-mediated stabilization of trailing adhesions. *Dev. Cell* 23, 1153–1166. doi: 10.1016/j.devcel.2012.11.005
- Thomas, W. A., Boscher, C., Chu, Y. S., Cuvelier, D., Martinez-Rico, C., Seddiki, R., et al. (2013). α -Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength. *J. Biol. Chem.* 288, 4957–4969. doi: 10.1074/jbc.M112.403774
- Tremblay, P. L., Auger, F. A., and Huot, J. (2006). Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene* 25, 6563–6573. doi: 10.1038/sj.onc.1209664
- van Geemen, D., Smeets, M., van Stalborch, A.-M., Woerdeman, L., Daemen, M., Hordijk, P., et al. (2014). F-actin-anchored focal adhesions distinguish endothelial phenotypes of human arteries and veins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2059–2067. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304180
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S., and Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790. doi: 10.1038/nrm2786
- Viridis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2010). Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflügers Arch.* 459, 1015–1023. doi: 10.1007/s00424-009-0783-7
- Wang, J., Tang, C., Yang, C., Zheng, Q., and Hou, Y. (2019). Tropomyosin-1 functions as a tumor suppressor with respect to cell proliferation, angiogenesis and metastasis in renal cell carcinoma. *J. Cancer* 10, 2220–2228. doi: 10.7150/jca.28261
- Wang, M., Li, W., Chang, G. Q., Ye, C. S., Ou, J. S., Li, X. X., et al. (2011). MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2044–2053. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.229559
- Woodfin, A., Voisin, M. B., Imhof, B. A., Dejana, E., Engelhardt, B., and Nourshargh, S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood* 113, 6246–6257. doi: 10.1182/blood-2008-11-188375
- Wu, H., Yao, Q., Lumsden, A., and Chen, C. (2004). Characterization of two populations of human coronary artery endothelial cells. *J. Surg. Res.* 118, 38–44. doi: 10.1016/j.jss.2004.01.009
- Xue, F., Janzen, D. M., and Knecht, D. A. (2010). Contribution of filopodia to cell migration: a mechanical link between protrusion and contraction. *Int. J. Cell Biol.* 2010:507821. doi: 10.1155/2010/507821

Conflict of Interest: MG, DG, and AG are the authors on a patent disclosing the intravascular stent, especially for coronary vessels which inner covering comprises monoclonal anti-VE-cadherin antibodies and a system of induction of tropomyosin-1 expression.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Gagat, Zielinska, Mikołajczyk, Zabrzynski, Krajewski, Klimaszewska-Wiśniewska, Grzanka and Grzanka. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6.1.2. Publikacja nr 2



Review

The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation

Klaudia Mikołajczyk ¹, Dominika Spyt ¹, Wioletta Zielińska ¹ , Agnieszka Żuryń ¹ , Inaz Faisal ¹,
Murtaz Qamar ¹, Piotr Świniarski ², Alina Grzanka ¹ and Maciej Gagat ^{1,*}

¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland; klaudia.mikolajczyk@cm.umk.pl (K.M.); dominika.spyt@cm.umk.pl (D.S.); w.zielinska@cm.umk.pl (W.Z.); azury@cm.umk.pl (A.Z.); inazfaisal.1009@gmail.com (I.F.); murtaz.qamar@gmail.com (M.Q.); agrzanka@cm.umk.pl (A.G.)
² Department of Urology and Andrology, Faculty of Medicine, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, 85-092 Bydgoszcz, Poland; piotr.swiniarski@hotmail.com
* Correspondence: mgagat@cm.umk.pl



Citation: Mikołajczyk, K.; Spyt, D.; Zielińska, W.; Żuryń, A.; Faisal, I.; Qamar, M.; Świniarski, P.; Grzanka, A.; Gagat, M. The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13157. <https://doi.org/10.3390/ijms222313157>

Academic Editor: Béatrice Charreau

Received: 24 November 2021

Accepted: 29 November 2021

Published: 6 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Homeostasis is a fundamental property of biological systems consisting of the ability to maintain a dynamic balance of the environment of biochemical processes. The action of endogenous and exogenous factors can lead to internal balance disorder, which results in the activation of the immune system and the development of inflammatory response. Inflammation determines the disturbances in the structure of the vessel wall, connected with the change in their diameter. These disorders consist of accumulation in the space between the endothelium and the muscle cells of low-density lipoproteins (LDL), resulting in the formation of fatty streaks narrowing the lumen and restricting the blood flow in the area behind the structure. The effect of inflammation may also be pathological dilatation of the vessel wall associated with the development of aneurysms. Described disease entities strongly correlate with the increased migration of immune cells. Recent scientific research indicates the secretion of specific vesicular structures during migration activated by the inflammation. The review focuses on the link between endothelial dysfunction and the inflammatory response and the impact of these processes on the development of disease entities potentially related to the secretion of extracellular vesicles (EVs).

Keywords: inflammation; aneurysm; atherosclerosis; cell migration; extracellular vesicles

1. Introduction

The inflammatory process is a part of the cellular response for severe imbalance in tissue homeostasis. Endothelial cells (ECs) play a crucial role in the activation and course of an inflammatory process [1,2]. The expression of the endothelial adhesion molecules is responsible for the selective recruitment of subpopulations of circulating leukocytes to the inflammation site [3]. Additionally, ECs can produce proinflammatory cytokines, i.e., tumor necrosis factor α (TNF- α), which promotes the secretion of other cytokines, e.g., interleukins 1 and 6 (IL-1, 6). Overexpression of these molecules can result in artery wall remodeling connected with an increase in endothelial permeability, particularly for the circulating LDL in the bloodstream and their accumulation in the inner membrane. Moreover, ECs are characterized by the presence of numerous integrin receptors on their surface, which determines their high affinity for extracellular matrix (ECM) proteins [4–6]. Interactions of intercellular binding complexes with the actin cytoskeleton of cells ensure the proper function of vascular endothelium. Based on the studies, it was proposed that regulating the degree of the F-actin protein polymerization could be crucial for maintaining endothelial barrier stability, surface molecules adhesion, and migration potential [7,8]. Further, F-actin cytoskeleton depolymerization and reorganization promotes the changes in ECs proteins expression profile and formation of F-actin stress fibers. It is associated with

the loss of coordinated EC migration, which is necessary to maintain the endothelial barrier. The described cause and effect sequence leads to endothelial dysfunction [9–11]. The literature data analysis concerning the pathogenesis of the artery vessel diseases has allowed observing secretion of specific vesicle structures in response to point contact between ECs and the surface of the endothelial and extracellular matrix (ECM), which could be related to cell signaling [12]. In addition, different manipulations within ECs involving the activation of expression of regulatory proteins of actin filaments, i.e., tropomyosin 1 (TPM1), indicate the maintenance of connections between ECs under both depolymerization and excessive polymerization of F-actin located in the cortical layer of the cytoplasm [13]. Based on literature data, it can be concluded that the stabilization of F-actin through TPM1 effectively reduces the inflammatory response of human ECs, and thus also the secretion of extracellular vesicles [14,15].

Extensive research on the pathogenesis of cardiovascular diseases at the molecular level gave the basis for a review of literature data on the relationship between aneurysm formation, the development of atherosclerotic lesions, and the secretion of extracellular vesicles accompanying these processes. In the course of the research, secretion of endothelial extracellular vesicles probably could be an attractive therapeutic target in inflammatory cardiovascular diseases. Protein profiling of endothelial extracellular vesicles, assessment at the ultrastructural level, and analysis of fundamental life processes should answer the questions regarding the biological significance of extracellular endothelial vesicles and their possible use as a diagnostic marker or therapeutic molecule in the diagnosis and treatment of the cardiovascular pathologies [16,17].

2. The Biology of Aortic Aneurysms

Aneurysms develop within arteries, and their classification is strongly related to their location. The primary function of the arteries is the pulsatile circulation of blood from the heart to the capillaries by rhythmic contractions of cardiac muscles [18,19]. The contraction and relaxation of the heart chambers induce changes in the diameter of the arteries, allowing oxygenated blood to flow to various organs and tissues [20]. The artery wall consists of three layers: the innermost layer known as tunica intima, the middle layer named tunica media, and the outermost layer described as the tunica adventitia (Figure 1) [21]

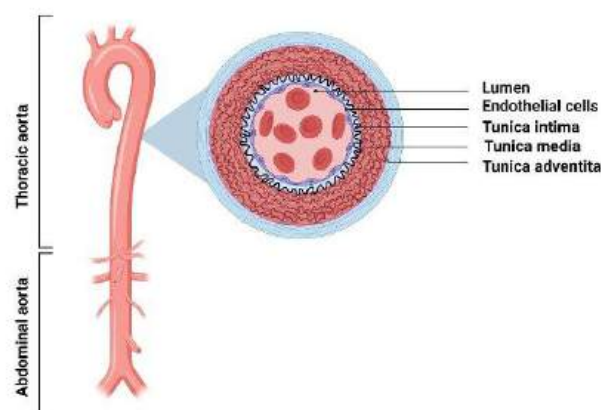


Figure 1. Structure of the layered wall of the human arterial vessel [21–26].

Tunica intima contains flattened ECs located on a lamina rich in collagen and elastin fibers. The subendothelial layer is part of the supporting tissue composed of myoid cells involved in synthesizing ECM components, i.e., proteoglycans, glycoproteins, and microfibrils. Myoid cell layers store lipid substances, which causes thickening of the artery

inner layer with age. Due to the accumulation of lipid deposits in the arterial wall, the described process promotes atherosclerotic plaque formation. The other two arterial wall layers consist of elastin, collagen, and smooth muscle cells (SMCs) compounds in the fibers, together with the vasa vasorum present in the tunica adventitia. The elastic fibers present in the structure of the walls of arteries give elasticity to the vessels. In turn, collagen fibers are responsible for maintaining the structural integrity of the vessel wall and resistance to stretching. Replacement elastin fibers by SMCs and inelastic collagen fibers weaken the arterial walls and promote an aneurysm-like structure [22–26].

Aortic aneurysms (AA) take the form of fusiform or circular abnormal bumps in the aortic wall. AA is the most commonly defined as a pathological dilatation of the aortic segment by $\geq 50\%$ of the initial vessel diameter [27]. The aortic aneurysms may develop in the thoracic (TAA) and the abdominal aorta (AAA), which are also the most common type of aneurysm [28]. Aneurysms can also be classified according to the De Bakey and Stanford standardization based on the level of their dissection. AA is characterized by an asymptomatic disease course, leading to aortic dissection or rupture, which may be lethal. It is estimated that TAA and AAA account for 1–2% of all deaths in Western countries. The leading cause of death, i.e., aneurysm rupture, correlates with an increase in the diameter of a blood vessel. Additionally, calcifications, intra-lumen thrombus, wall stiffness, oxidative stress, and inflammation are other possible causes of aortic aneurysm rupture. According to statistics data, the prevalence of AAAs is within the range of 4–7% in men and 1–2% in women [29,30]. Hereditary occurrence of AAA is in the range of 12–19%. In turn, mortality in the case of AAA is 65–85%. In contrast to the occurrence of AAAs aneurysms, TAAs prevalence ranges from 5 to 10/100,000 people per year. The genetic background accounts for 20% of all TAA aneurysms. The impact of gender on TAAs occurrence indicates that men are more likely to develop this type of aneurysm than women. On the other hand, women are more likely to develop aortic dissection and aneurysm rupture [31]. Despite the rarer incidence, TAA occurrence is associated with poor prognosis. Moreover, the risk of death is 2–3 times higher compared with AAA [31–33]. Furthermore, the epidemiology of aneurysms depends on the age of society. In young patients, aneurysms are observed in those who develop simultaneously genetic diseases such as Marfan syndrome or Loeys–Dietz syndrome. On the other hand, in older patients, aneurysms development is associated with arterial hypertension or atherosclerosis [34,35]. It is worth noting that there are differences in the pathophysiology of aneurysms resulting from their location in the aorta [36]. However, studies show common features such as inflammation of the aortic wall, loss of elastin and collagen fibers, and glycosaminoglycans, promoting aneurysms formation.

The level of high technology available allows the selection of methods for imaging aneurysms, such as transesophageal echocardiography (TEE), magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), transthoracic echocardiography (TTE), and chest radiograph (CXR). Furthermore, increasing progress has been made in the treatment of aneurysms. In addition to standard pharmacological and surgical therapy, biomarkers and stem cells are also widely used. It is noteworthy that it is possible to apply genome editing technology based on CRISPR/Cas9 in the targeted therapy, which seems to be a promising future for treating aortic aneurysms [37–44].

3. Pathophysiology of Aneurysms

The aorta undergoes constant reconstruction changes resulting from mechanical properties related to the blood vessel structure and its stiffness, as well as from hemodynamic shear stress and peripheral stretching of the vessel, which is the effect of pulsating blood flow in the vessel lumen [45]. In the context of the role of the blood vessel wall in the aneurysm, the artery vessel wall consists of many components such as fibroblasts, EC, SMC, and ECM, which both represent a significant component of the vascular wall. It is a dynamic structure that undergoes continuous physiological remodeling through the degradation and synthesis of new proteins [33,46]. Proteases are involved in this process,

mainly metalloproteinases (MMP) family proteins, granzymes, and cathepsins [47]. It has been shown that the hydrolysis of the peptide bonds by cathepsins affects the degradation of ECM, and destruction of collagen and elastin fibers [48]. MMP is one of the most significant families of ECM proteins [49]. An important function of these protein families is the ability to remodel and degrade ECM components. Their action is connected with the formation of reactive oxygen species' (ROS) products and proinflammatory cytokines. MMPs are involved in cell proliferation, differentiation, and migration, but also cell apoptosis, angiogenesis, and tissue repair. Moreover, the action of MMPs has also been observed in many pathological conditions, including inflammatory processes and consequences of this condition, such as degenerative diseases or neoplasms [50,51].

The activity of the chosen biologically active compounds is compatible with the remodeling of the arterial wall. The consequence of this property is that aortic wall cells contribute to maintaining homeostasis by sensing the local chemical-mechanical environment. In this process, mechanical stimuli are transformed into a biochemical response. This mechanism involves signaling pathways that, depending on the stimulus, influence different cellular responses. As a result, gene expression modulation, migration, proliferation, cell differentiation, and protein synthesis are possible. It is worth drawing attention to the many factors involved in the pathogenesis of aortic aneurysms that regulate the complexity of related signaling pathways and influence the biological function of cells (Figure 2) [52,53].

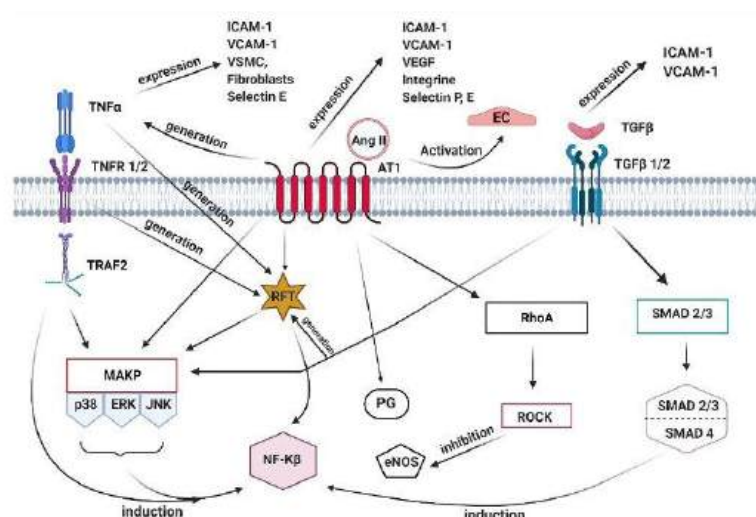


Figure 2. The molecular pathways of the aneurysms formation. One of the inducers of inflammation is angiotensin II (Ang II). It is a peptide hormone, which promotes a proinflammatory, profibrotic, and proliferative effect. This activates EC and induces expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), selectins, and integrins. Studies have shown that Ang II, by stimulating the synthesis of prostaglandin (PG) and ROS, modulates microvascular permeability. Consequently, Ang II is involved in the vasodilation mechanism and thus plays an important role in blood pressure regulation. RhoA pathway activation is responsible for barrier dysfunction in the vascular EC (Yao et al., 2010). Moreover, it has been shown that it is involved in the inhibition of the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Interestingly, the binding of AngII to its AT1 receptor in arteries and arterioles induces the production and release of TNF α .

One pathway that induces aneurysm formation is based on the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) activity. The mentioned pathway is an intracellular signal transduction pathway that allows signal reception from the receptor, alteration of gene expression, and results in the cellular response. Additionally, it controls the processes related to survival, mobility, differentiation, and apoptosis of cells [54]. Another protein involved in aneurysms progression is p38. This molecule is responsible for producing proinflammatory cytokines and can regulate their expression by modulating transcription factors; therefore, it is involved primarily in immunological and inflammatory processes. Additionally, p38 allows the induction of the expression of adhesion molecules and inducible enzymes [55,56]. One of the factors associated with endothelial dysfunction leading to aneurysm development is ras homolog family member A (RhoA) pathway activation. RhoA is involved in the inhibition of the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Therefore, this pathway is responsible for regulating the tone of blood vessels. In addition, it plays a key role in regulating the contractile phenotype and the cytoskeleton dynamics by affecting SMC, regulation of myosin light chain phosphatase (MLCP), and pericytes. RhoA pathway acts as a mediator of actin reorganization, influencing the process of generating stress F-actin fibers. Moreover, RhoA activation is involved in the monocyte adhesion and transmigration process; therefore, it is defined as the key pathway involved in the regulatory processes related to the permeability of blood vessels. Research has proven that the RhoA pathway regulates the focal adhesion sites and regulates collect actin stress fibers, and it stimulates migration, cell proliferation, and cell division [57–62].

The essential and integral part of the aneurysms formation mechanism is transforming growth factor β (TGF- β), responsible for regulating various cellular processes. Cells such as EC, pericytes, and immune cells express the TGF- β receptors. It has been shown that TGF- β induces proliferation, adhesion, migration, production of ECM compounds, and apoptosis but also affects the organization of the cell cytoskeleton, mobility, and invasion. Interestingly, studies carried out in many cell systems have confirmed that TGF- β has a bifunctional effect. Regarding EC, this cytokine shows either a promoting or an inhibitory effect on angiogenesis. Moreover, by inducing growth factors, TGF- β stimulates the proliferation of SMCs. On the other hand, the proliferative effect of SMCs is inhibited at high concentrations of TGF- β . The research results show that the activation of TGF- β in endothelial signaling is involved in the induction of vascular wall inflammation and the atherosclerotic process. Additionally, it induces cytokines, chemokines, receptors, and adhesion molecules on the EC, such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), proving that TGF- β has proinflammatory activity in the EC [63–66].

4. Extracellular Vesicles Secretion Accompanying the Endothelium Destruction Processes

The ability of intercellular communication, i.e., the reaction to signals from the external environment, is necessary for the proper course of the processes of differentiation, cell growth, and maintaining intra-body balance. It can occur through the secretion of active substances in signaling molecules, amino acids, peptides, proteins, nucleotides, retinoids, steroids, and fatty acid derivatives in the form of growth factors and neurotransmitters or cytokines. Signaling molecules are also low-molecular gases that penetrate biological membranes, i.e., nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) [67,68]. This intercellular signaling may have either local or far-reaching character. In the first case, the signaling molecules move by diffusion, penetrating through the ECM, which results in a fast, but short response from the neighboring cells. The described mechanism does not involve the bloodstream and is referred to as the paracrine route [69–71]. The second is called endocrine influence and involves the transport of signal molecules using body fluids and their interaction with distant cells. This is possible due to the expression of specific cell receptors, which initiate physiological, biochemical, and morphological reactions after recognition of the substrate. Intracrine and autocrine interactions are based on the signaling

molecules that exert their biological effects inside the cell in which they were produced. The presented types of intercellular communication are based on the presence of extracellular transmitters and constitute a kind of intra- and extracellular secretion [72,73].

Moreover, signaling via surface proteins is distinguished by combining them within different types of cells. A complex of surface protein presented on the surface of one cell, called a signal protein, and complementary effector protein on the surface of the other cell is formed, which determines signal transduction and induction of the intercellular communication pathway [74,75]. Effector proteins may include enzymes, transcription factors, ion channels, as well as cytoskeleton proteins. Most signal molecules are referred to as molecular switches, which means that both their activation and inactivation are induced by a signal that may result from phosphorylation or the presence of energy transporters in the form of Guanosine-5'-triphosphate (GTP) or Guanosine 5'-diphosphate (GDP). Both the strength of the signal sent, and the sensitivity of the cells is a variable value and depends primarily on adaptive mechanisms. In the case of the second parameter, there is a strong dependence on the number and affinity of receptors, which is why the mechanism of strengthening intercellular signaling is extremely important here [76].

The development of research in etiology and the consequences of interactions between cells has allowed the identification of specific molecules called extracellular vesicles (EVs). Erwin Chargaff and Randolph West were first interested in them in 1946 and described them as "procoagulant particles derived from platelets." In the 1970s, Peter Wolf enriched the knowledge of 'microcells' in new facts. He described them as small structures resembling "platelet dust," and the results of subsequent studies confirmed the diversity of these molecules and their presence in blood, urine, saliva, semen, and amniotic fluid [77–79]. EVs are a heterogeneous population of membrane vesicles released by prokaryotic and eukaryotic organisms, both in vivo and in vitro. The vesicles size is varied and ranges from 30 nm to 5 µm. Although EVs have a similar structure, there are major differences regarding the mechanism of their formation and physicochemical properties [80–83]. Apart from the density, isolation methods, or the presence of specific markers, the size and diameter of the vesicles are the most common EVs classification criteria. According to them, membrane microstructures can be divided into exosomes, exosome-like vesicles, ectosomes, and apoptotic bodies. The secretion of these molecules occurs due to membrane budding during processes such as exocytosis or apoptosis. EVs have an extremely important role in intercellular communication due to the ability to transfer information between different cells without requiring direct contact [84–86]. It is possible due to their content, including proteins, messenger ribonucleic acid (mRNA), and microRNA (miRNA) [87]. Due to the internal composition of EVs and their participation in intercellular communication, they have become an attractive research target for many scientists. This allowed us to observe the important role of the described signaling molecules in physiological processes and conditions accompanied by a disturbance of internal homeostasis of both individual cells and whole organisms [87,88]. It allowed concluding that EVs may act as molecular markers, which may be helpful in the diagnosis of serious diseases at the early stages of their development. Due to the importance of intercellular communication in ontogenesis, organogenesis, and pathophysiology, extensive research in the field of cellular communication led to the identification of extracellular vesicles called microsomes. Their biogenesis and secretion are directly dependent on the migration and polymerization of actin; hence the phenomenon was called microcytosis. This newly identified secretory process can play an important role in intercellular communication during physiological and pathophysiological processes. The mechanism of initiation and the course of migration depends on many complex processes, among which migration is the most important. It plays a key role in embryonic development but is also responsible for the movement of immune cells, wound healing, and tissue regeneration [80–86]. Cell movement is also a pivotal factor during the formation of tumor metastases and in the course of inflammation. The ability to migrate is determined by the type of tissue from which the cells originate. In these cases, cell movement is necessary during the formation of germ layers and the

development of organs. Nervous crest cells, i.e., multipotent neuroectodermal cells, move long distances in the embryo, settle in different places, creating, among others, nerve ganglia or ciliary body. A similar situation is observed among cells, i.e., leukocytes, for which movement is an essential element of functioning.

Knowledge of the mechanisms responsible for cell movement is particularly important for modern medicine because it can be used to study the etiology of various physiological and pathophysiological processes. The essence of migration is the active movement of cells, regulated by signaling pathways associated with information molecules, protein signal transducers, or calcium ions [87–89]. Initially, research in the field of cell migration was conducted on unicellular amoeboid organisms of the *Dictyostelium Discoedium* species [90]. However, the identification of similar sets of protein markers allowed to expand research on organisms of higher taxonomic classes. It has become extremely important primarily due to the opportunity to learn about the mechanisms of the processes dependent on each other and the interaction between cells of various types depending on the phenomenon of migration. Types of cell movement are defined based on such parameters as cell adhesion, protease activity, the strength of intercellular interactions, and the polarity and organization of the cell cytoskeleton. Due to the number of migrating cells, individual and collective migration may be distinguished [91–94].

Cell migration is a multi-stage process consisting of polarization, adhesion, the formation of cellular projections, and directional movement [95]. The first one is the effect of creating functionally and morphologically differentiated poles of the cell, i.e., in the front and posterior surface because of the potential difference between the outer and inner surface of the cell membrane. This results in a gradient distribution of signal and regulatory proteins responsible for intracellular processes associated with cytoskeleton remodeling. The consequence of the polarization is extension of the frontal zone of the cell, after which the phenomenon of adhesion and proteolysis of the ECM is observed [96]. This induces rearrangement of the cytoskeleton by, among others, the action of cofilin, gelsolin, and the Actin-related protein 2/3 (Arp2/3) protein complex [97–100]. The effect of these processes is the shrinkage of the posterior zone of the cell and break of contact with the surface, which leads to directional displacement. All phenomena associated with the change in the architecture of actin filaments, including polymerization, depolymerization, shrinkage of microfilament networks with the participation of motor proteins, or the movement of the contractile layer, are referred to as cytoskeleton dynamics, which is directly related to the formation of migrasomes.

The basis for identifying migrasomes in the presence of structures with a diameter of 0.5–3 μm tightly fixed at the ends or cuts of actin retraction fibers is through their secretion which occurs during a process called migracytosis. The microstructures detach from the retraction fibers and are released into the extracellular space or directly taken up by surrounding cells. The described vesicles contain inside from less than 10 to 300 smaller follicular structures with a diameter of 50–100 nm, which is why they are often referred to as pomegranate-like structures (PLCs) [101]. It is supposed that migrasomes reflect the composition of the cells from which they are secreted due to the active transport of cytosolic content from the parent cell to the vesicles. During their duration, the content of the parent cells translocates to the migrasome, after which the extracellular vesicle formation rate decreases. Migrasomes, due to their structure, are multivesicular bodies (MVB) like structures, which through fusion with the membrane of the parent cell, contribute to the formation of exosomes. An important feature that makes migrasomes like the MVBs and intraluminal vesicles (ILVs) that build them, is the expression of surface proteins, which in this case are tetraspanin-4 and tetraspanin-7. The similarity of these two types of extracellular vesicles may indicate their common origin, which has become the basis for the conclusion that migrasomes arise because of MVBs migration to retraction fibers. According to this hypothesis, migrasomes should have a bilayer cell membrane, in which the outer layer comes from retraction fibers, while the inner one from MVBs contains surface markers characteristic for MVBs, i.e., LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1). The results of

scientific research indicate, however, strong discrepancies in the described issues, which include, among others, the presence of a single-layer cell membrane or the lack of LAMP1 expression, which made the hypothesis of MVBs as precursors of migrasomes contradictory. Furthermore, other research has shown large differences between extracellular follicular secretion through exocytosis and migracytosis, which mainly concern how they are secreted. In exocytosis, exosomes are released from the cells by MVB fusion to the plasma membrane. At the same time, migracytosis involves the translocation of the cytoplasmic material into vesicles located at the ends of the retraction fibers, resulting in the release of migrasomes [101,102]. Migracytosis and exocytosis are different processes because of their course and the diversity within the markers assigned to the signal molecules secreted during these processes. In the case of migrasomes, this group is represented by proteins such as N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST1), phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class K (PIGK), and carboxypeptidase Q (CPQ) that are not expressed by other types of signaling molecules. One of the most important functions of these proteins is participation in the inflammatory reaction. On the surface of migrasomes, the presence of transmembrane receptor proteins that connect cells with the ECM, i.e., integrin $\alpha 5$ and $\beta 1b$, was also noted. They constitute a group of compounds responsible for the adhesion of migrasomes to the place where they arise, whereby the overexpression of these proteins is observed at the contact point between migrasome and retraction fiber [103,104]. The structure of integrins present on the surface of vesicles is characterized by the presence of the pleckstrin homology (PH) domain. The phosphorylation of these domains affects, among others, increased secretion of inflammatory cytokines. The association of migrasomes with the inflammatory response is also seen in the high affinity of these vesicles to proinflammatory proteins, among which fibronectin can be distinguished. Simultaneously, migrasomes can be assigned as a new type of cell organelles.

They perform specific functions and are surrounded by a cell membrane composed mainly of cholesterol, which allows them to be defined as specialized cell subunits. Based on the collected information, it is possible to determine migrasomes as a particularly attractive type of signaling vesicles in the context of diseases initiated by the endothelial inflammatory response due to the high rate of migration of immune cells during the induction of atherosclerosis. Identifying the protein profile of the described EVs, analysis of their biosynthesis, and a broader understanding of the mechanism of microsome formation may contribute to improving the profile of diagnostics and therapy of cardiovascular diseases [101–106]. However, the most frequently described extracellular vesicles are exosomes. This type of extracellular vesicles plays a pivotal role in vascular remodeling which could be an interesting biomarker in the clinic. They can be widely used due to their low toxicity and immunogenicity, biocompatibility, and biological barrier permeability. Enrichment of the content of exosomes in order to use them for targeted therapies can be achieved through co-transfection into the donor cells with plasmid or virus encoding the precursor miRNAs or small interfering RNA (siRNA), electroporation of synthetic miRNAs or siRNAs and also transient transfection of miRNAs using commercial transfection reagents. EVs play an important role in cell-to-cell communication within the disease microenvironment. As some profiling studies have shown, miRNAs encapsulated in secreted EVs have been identified in the extracellular space. The rich content of miRNAs is extremely important in terms of intercellular communication. EVs can serve as valuable biomarkers of various diseases due to the miRNA content. miRNA is a single-stranded RNA molecule on average containing 22 nucleotides [107,108]. miRNA is responsible for regulating gene expression at the post-transcriptional level. The mechanism of action of miRNA is based on interfering with transcription or inhibiting translation. miRNAs are involved in various biological processes, such as differentiation, proliferation, metabolism, and cell death. The loading of miRNAs into the extracellular vesicles protects miRNA from acting of the enzymatic factors such as RNase, but also physics conditions, for example, extreme temperatures or changing pH values. Due to the different molecular mechanisms of the aneurysm formation, growth, and rupture, various types of miRNA patterns are

observed. Recent studies indicate that miR-320b, miR-133a, miR-223, and miR-143/145 included in the plasma circulated exosomes could be significant predictors and diagnostic markers of vascular inflammation and atherosclerosis. miR-133a act an important role as a diagnostic marker of myocardial infarction. miR-133a is connected with altered aortic fibroblast phenotype which is observed during aneurysm progression, which weakness the artery wall [109]. The described phenomenon is particularly observed in the TAA course which is a result of dysregulated remodeling of the extracellular matrix on the vascular level and may be connected with altered resident cellular phenotype. miRNA-133a is commonly reduced in TAA clinical specimens and plays an inhibitory role in the pathological phenotypic regulation of switch of vascular cells. Accordingly, it is believed that miR-133a replacement attenuates the development of TAA. These results suggest that stable alterations in aortic fibroblasts may be connected with pathological extracellular matrix remodeling, and regulation by miR-133a may lead to the novel therapeutic strategy [110,111]. Moreover, the growing number of studies show that EV secreted by different types of stem cells transfer their bioactive content to other, more mature cells and thus participate in tissue repair, including the ischemic heart muscle. Due to the fact that different fractions of stem cells secrete vesicles with different molecular compositions, the conducted research is focusing on understanding the biological and regenerative activity of such fractions, including EVs secreted by induced pluripotent stem cells (iPSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) which constitute the fraction of stem cells isolated from mature tissues including bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord. Research shows that vesicles secreted by iPSCs (iPSC-EVs), as well as MSCs (MSC-EVs), carry a range of bioactive molecules reflecting the molecular composition of the cells that secrete them, including proteins, mRNA molecules, and small regulatory RNA molecules—the so-called miRNAs which play an important role in regulating a number of genes in cells. Interestingly, the molecular content of the vesicles can be transferred to the cells of the heart and vessels, and thus affect their functions in vitro and after transplantation in vivo. Despite the fact that both iPSCs-EVs and MSC-EVs fractions of EVs have been observed to show proregenerative activity in the heart tissue, they carry a different molecular content, including whole groups of miRNAs, which may differently regulate the functions of different types of cells [112–114].

Alteration of the miRNA profile contributing to atherogenesis could serve as an early biomarker in cardiovascular diseases. Recent studies have shown that among smokers, increased level of the circulating leukocyte-derived PMVs (IPMV) and miR-29b is observed. This suggests that a high level of the miR-29b can lead to oxidative stress and induction of inflammatory response. It is connected with the increased production of membrane microvesicles (MVs) by the cigarette smoke-exposed neutrophils. The secreting mechanisms of the microvesicles and the presence of the miR-29b expression is connected with enzymatically active transmembrane ADAM proteases. The high level of the ADAM10 and ADAM17 accompanying to microvesicles secreted mechanism by the neutrophils on exposure to cigarette smoke indicates the molecular mechanism underlying the dramatically elevated risk of abdominal aortic aneurysm. According to the current reports, among the miRNA connected with the aneurysm development, miR-29a, miR-29b, and miR-29c also have been distinguished. The increased level of the miR-29a family is connected with the reduction of the expression of genes encoding extracellular matrix proteins such as fibrillin 1, elastin, and collagen types I and III. Elevated miR-29 expression in the aortic tissue is connected with ECM degradation, contributing to the weakened aortic wall. It makes the aortic wall more susceptible to the aneurysm development. Research proves that the use of the miR-29 inhibitor likewise prevents aneurysm development by reducing the synthesis of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3). This glycoprotein binds to the catalytic domain of MMPs and hydrolyzes the ECM components. Expression of the miR-205 inhibits the level of the reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) synthesis which inhibits metalloproteinases activity. Research also indicates another significant type of miRNA involved in the progression of aneurysm. It is miR-24, the low level of which can be seen in samples obtained from patients with developed

changes in the structure of the arterial wall. Expression of miR-24 is associated with the downregulation of the synthesis of chitinase 3-like protein 1 (CHI3L1). The low miR-24 level has been connected with proinflammatory interleukin-6 (IL-6) overexpression, which results in an increase in CHI3L1 expression. The CHI3L1 and IL-6 cooperation mechanism contribute to the increase in the production of proinflammatory factors such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), vascular cell adhesion molecule (VCAM1), and P-selectin (P-SELP) by the endothelial cells. The secretion of mentioned molecules leads to the binding of leukocytes to the surface of the endothelium. Expression of the CHI3L1 and IL-6 is also connected with the secretion of the interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1). This phenomenon also contributes to the increased migration of smooth myocytes. Another marker of aneurysm development is miR-29c-3p. Current reports indicate a correlation between miR-29c-3p and the size of the aneurysm that has been observed. Among the genes regulated by miR-29c-3p, there are genes encoding vascular endothelial growth factor-A (VEGF A), collagen type IV, phosphatase, and tensin homolog (PTEN), which contribute to aneurysm formation and could inhibit endothelial cells proliferation. The current reports implicated that elevated miR-29c-3p is a significant biomarker for aneurysm as the downregulation of the gene encoding vascular wall matrix components leads to greater susceptibility to cardiovascular diseases [115–119].

Aneurysms are characterized by the remodeling of the extracellular matrix and inflammatory response. One of the inflammatory protein families capable of degrading extracellular matrix proteins in arteries is the disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin 1 motifs (ADAMTS1). The ADAMTS family of proteins comprises 20 members, where ADAMTS-1 and ADAMTS-4 are particularly well studied. ADAMTS-1 and ADAMTS-4 cause tissue destruction and have been connected with vascular diseases, such as atherosclerosis. Research indicates that an increased expression of the majority of the investigated ADAMTS, especially ADAMTS-1 and ADAMTS-4 members on mRNA level, has a large share in the development of aneurysms associated with the infiltration of inflammatory cells and the destruction of the aortic walls. ADAMTS-4 promotes ECM turnover by digesting proteoglycans including biglycan, aggrecan, and decorin or glycoproteins such as fibronectin. Moreover, studies have shown that ADAMTS-1 inhibits cell proliferation by binding and sequestering growth factors, among which vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor stand out. On the other hand, ADAMTS-1 functions in ECM remodeling by digesting versican and tissue factor pathway inhibitor-2. Versican is a chondroitin sulfate proteoglycan. This is the key ingredient of the ECM. It plays the pivotal role in intercellular signaling and in connecting cells with the extracellular matrix. This suggests that the elevated ADAMTS-1 and ADAMTS-4 protein levels could be partially responsible for the increased versican degradation. Additionally, versican can be cleaved by matrix metalloproteinases, so the degradation products in the destructed aortas may have been the collective result of cleavage by ADAMTS proteins, matrix metalloproteinases, and other extracellular proteases. Moreover, recent studies showed that ADAMTS-4 can also break down matrilin-3, alpha-2-macroglobulin, cartilage oligomeric matrix protein, and fibromodulin. Thus, ADAMTS proteins may promote tissue destruction and disease formation through different mechanisms. The increased level of the ADAMTS protein is revealed by profound destruction of the elastic lamellae, rich macrophage accumulation in the adventitia, increased neutrophil values in peripheral blood, and significantly increased expression of inflammatory factors in the early level of aneurysm. This directly indicates that high ADAMTS proteins expression in the progression of inflammation can contribute to the development of pathological changes in the arterial vessels. The importance of ADAMTS proteins in the development and progression of aneurysms is also confirmed by reports indicating that ADAMTS1 deficiency reduces the formation and rupture of aneurysms. Low ADAMTS1 expression inhibits neutrophil and macrophage infiltration by inhibiting the level of proinflammatory cytokines and macrophage migration in the early stage of aneurysm formation, indicating ADAMTS proteins regulation of the inflammatory response, which may be a new therapeutic target in the treatment of aneurysms [120,121].

5. Conclusions

Current literature reports implicate that vascular endothelial dysfunction underlies the development of many cardiovascular diseases. Inflammation is distinguished among the main causes of endothelial dysfunction and is accompanied by the secretion of extracellular vesicles into the bloodstream. Numerous studies highlight the role of extracellular vesicles in intercellular communication in vascular remodeling. Recent studies indicate that the content of extracellular vesicles is potentially significant to therapeutic use due to their content. As an alternative carrier, extracellular vesicles internalize cargo based on the pathological and physiological status, inducing various content-depending effects, subsequently. Due to the presence of specific proteins on the surface of extracellular vesicles, they can act as a biomarker of inflammation, and thus also of endothelial dysfunction and the development of cardiovascular diseases. Extracellular vesicles, due to their transport role, can be used for various manipulations due to the transported content. However, there have been few attempts to increase the cargo or modify it for personalized therapies. Despite recent advances, there are still many issues to be resolved regarding the mechanisms of extracellular vesicles biology, such as formation, release, internalization, and their connection with the inflammatory response. Moreover, despite being an alternative for the prognostic and therapeutic approaches in vascular diseases, extracellular vesicle-based therapies are remained to be elucidated and require further studies before clinical applications.

Author Contributions: Conceptualization, M.G.; writing, K.M., D.S., A.Ž. and M.G.; figuration and formatting, D.S.; editing W.Z., P.Š., I.F., M.Q., A.G. and M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 1057–1069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Chovatiya, R.; Medzhitov, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol. Cell* **2014**, *54*, 281–288. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Langer, H.F.; Chavakis, T. Leukocyte-Endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 1211–1220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Zhang, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* **2008**, *103*, 398–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Didion, S.P. Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2563. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Mongiat, M.; Andreuzzi, E.; Tarticchio, G.; Paulitti, A. Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1822. [\[CrossRef\]](#)
7. Prasain, N.; Stevens, T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* **2009**, *77*, 53–63. [\[CrossRef\]](#)
8. Shen, Q.; Wu, M.H.; Yuan, S.Y. Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability. *Cell Health Cytoskeleton*. **2009**, *1*, 43–50.
9. Campos, S.B.; Ashworth, S.L.; Wean, S.; Hosford, M.; Sandoval, R.M.; Hallett, M.A.; Atkinson, S.J.; Molitoris, B.A. Cytokine-induced F-Actin reorganization in endothelial cells involves RhoA activation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2009**, *296*, F487–F495. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Kato, K.; Kano, Y.; Ookawara, S. Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-Signal transduction in endothelial cells in situ. *Vasc. Health Risk Manag.* **2008**, *4*, 1273–1282. [\[CrossRef\]](#)
11. Gimbrone, M.A., Jr.; Garcia-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 620–636. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Simeone, P.; Bologna, G.; Lanuti, P.; Pierdomenico, L.; Guagnano, M.T.; Pieragostino, D.; Del Boccio, P.; Vergara, D.; Marchisio, M.; Miscia, S.; et al. Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2514. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Gagat, M.; Grzanka, D.; Izdebska, M.; Sroka, W.D.; Halas-Wisniewska, M.; Grzanka, A. Tropomyosin-1 protects transformed alveolar epithelial cells against cigarette smoke extract through the stabilization of F-Actin-Dependent cell-Cell junctions. *Acta Histochem.* **2016**, *118*, 225–235. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Gagat, M.; Grzanka, D.; Izdebska, M.; Grzanka, A. Effect of L-Homocysteine on endothelial cell-Cell junctions following F-Actin stabilization through tropomyosin-1 overexpression. *Int. J. Mol. Med.* **2013**, *32*, 115–129. [\[CrossRef\]](#)
15. Chistiakov, D.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 63. [\[CrossRef\]](#)
16. Wiklander, O.; Brennan, M.Á.; Lötvall, J.; Breakefield, X.O.; El Andaloussi, S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaav8521. [\[CrossRef\]](#)
17. Rogers, R.G.; Ciullo, A.; Marbán, E.; Ibrahim, A.G. Extracellular Vesicles as Therapeutic Agents for Cardiac Fibrosis. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Abou Sherif, S.; Ozden Tok, O.; Taşköylü, Ö.; Goktekin, O.; Kilic, I.D. Coronary Artery Aneurysms: A Review of the Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Front. Cardiovasc. Med.* **2017**, *4*, 24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Sheikh, A.S.; Hailan, A.; Kinnaird, T.; Choudhury, A.; Smith, D. Coronary Artery Aneurysm: Evaluation, Prognosis, and Proposed Treatment Strategies. *Heart Views.* **2019**, *20*, 101–108. [\[CrossRef\]](#)
20. Goodwill, A.G.; Dick, G.M.; Kiel, A.M.; Tune, J.D. Regulation of Coronary Blood Flow. *Compr. Physiol.* **2017**, *7*, 321–382. [\[PubMed\]](#)
21. Milutinović, A.; Šuput, D.; Zorc-Plesković, R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2020**, *20*, 21–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Pugsley, M.K.; Tabrizchi, R. The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 333–340. [\[CrossRef\]](#)
23. Komutrattananont, P.; Palee, P.; Prasitwattanaseree, S.; Mahakkanukrauh, P. The estimation of age from elastic fibers in the tunica media of the aortic wall in a Thai population: A preliminary study using aorta image analysis. *Anat. Cell Biol.* **2020**, *53*, 284–291. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Mazurek, R.; Dave, J.M.; Chandran, R.R.; Misra, A.; Sheikh, A.Q.; Greif, D.M. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv. Pharmacol.* **2017**, *78*, 323–350.
25. Hill, M.A.; Meininger, G.A. Arteriolar vascular smooth muscle cells: Mechanotransducers in a complex environment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1505–1510. [\[CrossRef\]](#)
26. Lacolley, P.; Regnault, V.; Nicoletti, A.; Li, Z.; Michel, J.B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *95*, 194–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Saw, S.T.; Leong, B.; Abdul Aziz, D.A. Early Detection of Undiagnosed Abdominal Aortic Aneurysm and Sub-Aneurysmal Aortic Dilatations in Patients with High-Risk Coronary Artery Disease: The Value of Targeted Screening Programme. *Vasc. Health Risk Manag.* **2020**, *16*, 215–229. [\[CrossRef\]](#)
28. Guo, D.C.; Papke, C.L.; He, R.; Milewicz, D.M. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1085*, 339–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Isselbacher, E.M. Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* **2005**, *111*, 816–828. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Davis, F.M.; Daugherty, A.; Lu, H.S. Updates of Recent Aortic Aneurysm Research. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, e83–e90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Ehrman, J.K.; Fernandez, A.B.; Myers, J.; Oh, P.; Thompson, P.D.; Keteyian, S.J. Aortic Aneurysm: DIAGNOSIS, MANAGEMENT, EXERCISE TESTING, AND TRAINING. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* **2020**, *40*, 215–223. [\[CrossRef\]](#)
32. Mangum, K.D.; Farber, M.A. Genetic and epigenetic regulation of abdominal aortic aneurysms. *Clin. Genet.* **2020**, *97*, 815–826. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jana, S.; Hu, M.; Shen, M.; Kassiri, Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Chen, P.Y.; Qin, L.; Li, G.; Malagon-Lopez, J.; Wang, Z.; Bergaya, S.; Gujja, S.; Caulk, A.W.; Murtada, S.I.; Zhang, X.; et al. Smooth Muscle Cell Reprogramming in Aortic Aneurysms. *Cell Stem. Cell* **2020**, *26*, 542–557. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Quintana, R.A.; Taylor, W.R. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 607–618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wagenseil, J.E. Bio-Chemo-Mechanics of thoracic aortic aneurysms. *Curr. Opin. Biomed. Eng.* **2018**, *5*, 50–57. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Fukui, T. Management of acute aortic dissection and thoracic aortic rupture. *J. Intensive Care* **2018**, *6*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Sakalihasan, N.; Michel, J.B.; Katsargyris, A.; Kuivaniemi, H.; Defraigne, J.O.; Nchimi, A.; Powell, J.T.; Yoshimura, K.; Hultgren, R. Abdominal aortic aneurysms. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2018**, *4*, 34. [\[CrossRef\]](#)
39. Clift, P.F.; Cervi, E. A review of thoracic aortic aneurysm disease. *Echo Res. Pract.* **2019**, *7*, R1–R10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Sherifova, S.; Holzapfel, G.A. Biomechanics of aortic wall failure with a focus on dissection and aneurysm: A review. *Acta Biomater.* **2019**, *99*, 1–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Torres-Fonseca, M.; Galan, M.; Martinez-Lopez, D.; Cañes, L.; Roldan-Montero, R.; Alonso, J.; Reyero-Postigo, T.; Orriols, M.; Mendez-Barbero, N.; Sirvent, M.; et al. Pathophysiology of abdominal aortic aneurysm: Biomarkers and novel therapeutic targets. *Clin. Investig. Arterioscler.* **2019**, *31*, 166–177. [\[PubMed\]](#)
42. Davis, J.P.; Salmon, M.; Pope, N.H.; Lu, G.; Su, G.; Sharma, A.K.; Ailawadi, G.; Upchurch, G.R., Jr. Attenuation of aortic aneurysms with stem cells from different genders. *J. Surg. Res.* **2015**, *199*, 249–258. [\[CrossRef\]](#)

43. Zhang, X.; Xu, C.; Gao, S.; Li, P.; Kong, Y.; Li, T.; Li, Y.; Xu, F.-J.; Du, J. CRISPR/Cas9 Delivery Mediated with Hydroxyl-Rich Nanosystems for Gene Editing in Aorta. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1900386. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Wipper, S.; Kölbl, T.; Sandhu, H.K.; Manzoni, D.; Duprée, A.; Estrera, A.L.; Safi, H.; Miller, C.C.; Tsilimparis, N.; Debus, E.S. Impact of hybrid thoracoabdominal aortic repair on visceral and spinal cord perfusion: The new and improved SPIDER-Graft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2019**, *158*, 692–701. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Kassab, G.S. Biomechanics of the cardiovascular system: The aorta as an illustrative example. *J. R. Soc. Interface* **2006**, *3*, 719–740. [\[CrossRef\]](#)
46. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 957–989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Hua, Y.; Nair, S. Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1852*, 195–208. [\[CrossRef\]](#)
48. Vidak, E.; Javoršek, U.; Vizovišek, M.; Turk, B. Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells* **2019**, *8*, 264. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V.M.; Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a005058. [\[CrossRef\]](#)
50. Cabral-Pacheco, G.A.; Garza-Veloz, I.; Castruita-De la Rosa, C.; Ramirez-Acuña, J.M.; Perez-Romero, B.A.; Guerrero-Rodriguez, J.F.; Martinez-Avila, N.; Martinez-Fierro, M.L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* **2010**, *141*, 52–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Raffetto, J.D.; Khalil, R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 346–359. [\[CrossRef\]](#)
53. Wang, M.; Kim, S.H.; Monticone, R.E.; Lakatta, E.G. Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension* **2015**, *65*, 698–703. [\[CrossRef\]](#)
54. Ghosh, A.; DiMusto, P.D.; Ehrlichman, L.K.; Sadiq, O.; McEvoy, B.; Futchko, J.S.; Henke, P.K.; Eliason, J.L.; Upchurch, G.R., Jr. The role of extracellular signal-related kinase during abdominal aortic aneurysm formation. *J. Am. Coll. Surg.* **2013**, *215*, 668–680.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Pei, H.; Zhang, H.; Tian, C.; Sun, X.; Qian, X.; Meng, Y.; Guo, X.; Chang, Q. Proliferative Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Extracellular Matrix Production via Osteopontin/p38 MAPK Signaling Pathway. *Cardiology* **2021**, *146*, 646–655. [\[CrossRef\]](#)
56. Kim, E.K.; Choi, E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 867–882. [\[CrossRef\]](#)
57. Yao, L.; Romero, M.J.; Toque, H.A.; Yang, G.; Caldwell, R.B.; Caldwell, R.W. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **2010**, *1*, 165–170. [\[PubMed\]](#)
58. Calò, L.A.; Pessina, A.C. RhoA/Rho-Kinase pathway: Much more than just a modulation of vascular tone. Evidence from studies in humans. *J. Hypertens.* **2007**, *25*, 259–264. [\[CrossRef\]](#)
59. Shimokawa, H.; Sunamura, S.; Satoh, K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 352–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Durham, J.T.; Surks, H.K.; Dulmovits, B.M.; Herman, I.M. Pericyte contractility controls endothelial cell cycle progression and sprouting: Insights into angiogenic switch mechanics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *307*, C878–C892. [\[CrossRef\]](#)
61. Honing, H.; van den Berg, T.K.; van der Pol, S.M.; Dijkstra, C.D.; van der Kammen, R.A.; Collard, J.G.; de Vries, H.E. RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *75*, 523–528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Pronk, M.C.A.; van Bezu, J.S.M.; van Nieuw Amerongen, G.P.; van Hinsbergh, V.W.M.; Hordijk, P.L. RhoA, RhoB and RhoC differentially regulate endothelial barrier function. *Small GTPases*. **2019**, *10*, 466–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Goumans, M.J.; Ten Dijke, P. TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, 466–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Yoshimatsu, Y.; Kimuro, S.; Pauty, J.; Takagaki, K.; Nomiyama, S.; Inagawa, A.; Maeda, K.; Podyma-Inoue, K.A.; Kajiyama, K.; Matsunaga, Y.T.; et al. TGF- β and TNF- α cooperatively induce mesenchymal transition of lymphatic endothelial cells via activation of Activin signals. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Neuzillet, C.; Tijeras-Raballand, A.; Cohen, R.; Cros, J.; Faivre, S.; Raymond, E.; de Gramont, A. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *147*, 22–231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Chen, P.Y.; Qin, L.; Li, G.; Wang, Z.; Dahlman, J.E.; Malagon-Lopez, J.; Gujja, S.; Cilfone, N.A.; Kauffman, K.J.; Sun, L.; et al. Endothelial TGF- β signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 912–926. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. García-Mata, C.; Lamattina, L. Gasotransmitters are emerging as new guard cell signaling molecules and regulators of leaf gas exchange. *Plant Sci.* **2013**, *201*–202, 66–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Betsholtz, C. Cell-Cell signaling in blood vessel development and function. *EMBO Mol. Med.* **2018**, *10*, e8610. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Roy, S.; Kornberg, T.B. Paracrine signaling mediated at cell-cell contacts. *Bioessays* **2015**, *37*, 25–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Bruno, S.; Kholia, S.; Deregibus, M.C.; Camussi, G. The Role of Extracellular Vesicles as Paracrine Effectors in Stem Cell-Based Therapies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1201*, 175–193. [\[PubMed\]](#)

71. Chappell, J.C.; Wiley, D.M.; Bautch, V.L. How blood vessel networks are made and measured. *Cells Tissues Organs*. **2012**, *195*, 94–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Lee, S.; Chen, T.T.; Barber, C.L.; Jordan, M.C.; Murdock, J.; Desai, S.; Ferrara, N.; Nagy, A.; Roos, K.P.; Iruela-Arispe, M.L. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* **2007**, *130*, 691–703. [\[CrossRef\]](#)
73. Camussi, G.; Deregibus, M.C.; Bruno, S.; Cantaluppi, V.; Biancone, L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-To-Cell communication. *Kidney Int.* **2010**, *78*, 838–848. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Ahmed, K.A.; Xiang, J. Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer. *J. Cell Mol. Med.* **2011**, *15*, 1458–1473. [\[CrossRef\]](#)
75. Davis, D.M. Intercellular transfer of cell-Surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 238–243. [\[CrossRef\]](#)
76. Tuteja, N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav.* **2009**, *4*, 942–947. [\[CrossRef\]](#)
77. Hargett, L.A.; Bauer, N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* **2013**, *3*, 329–340. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Paolicelli, R.C.; Bergamini, G.; Rajendran, L. Cell-To-Cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience* **2020**, *446*, 323–334. [\[CrossRef\]](#)
79. Wójtowicz, A.; Baj-Krzyworzeka, M.; Baran, J. Characterization and biological role of extracellular vesicles. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2014**, *68*, 1421–1432. [\[CrossRef\]](#)
80. Willms, E.; Cabañas, C.; Mäger, I.; Wood, M.J.A.; Vader, P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Allelein, S.; Medina-Perez, P.; Lopes, A.L.H.; Rau, S.; Hause, G.; Kölsch, A.; Kuhlmeier, D. Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11585. [\[CrossRef\]](#)
82. Choi, D.; Lee, T.H.; Spinelli, C.; Chennakrishnaiah, S.; D’Asti, E.; Rak, J. Extracellular vesicle communication pathways as regulatory targets of oncogenic transformation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *67*, 11–22. [\[CrossRef\]](#)
83. Doyle, L.M.; Wang, M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **2019**, *8*, 727. [\[CrossRef\]](#)
84. Kalra, H.; Drummen, G.P.; Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Menard, J.A.; Cerezo-Magaña, M.; Belting, M. Functional role of extracellular vesicles and lipoproteins in the tumour microenvironment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160480. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. O’Loughlin, A. Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160488. [\[CrossRef\]](#)
87. Taylor, J.; Azimi, I.; Monteith, G.; Bebawy, M. Ca²⁺ mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1734326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Teng, F.; Fussenegger, M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv. Sci.* **2020**, *8*, 2003505. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Abels, E.R.; Breakefield, X.O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol. Neurobiol.* **2016**, *36*, 301–312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Tatischeff, I. Dictyostelium: A Model for Studying the Extracellular Vesicle Messengers Involved in Human Health and Disease. *Cells* **2019**, *8*, 225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Sung, B.H.; Weaver, A.M. Directed migration: Cells navigate by extracellular vesicles. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 2613–2614. [\[CrossRef\]](#)
92. Sung, B.H.; Parent, C.A.; Weaver, A.M. Extracellular vesicles: Critical players during cell migration. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 1861–1874. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Zhou, X.; Xie, F.; Wang, L.; Zhang, L.; Zhang, S.; Fang, M.; Zhou, F. The function and clinical application of extracellular vesicles in innate immune regulation. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *17*, 323–334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Kriebel, P.W.; Majumdar, R.; Jenkins, L.M.; Senoo, H.; Wang, W.; Ammu, S.; Chen, S.; Narayan, K.; Iijima, M.; Parent, C.A. Extracellular vesicles direct migration by synthesizing and releasing chemotactic signals. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 2891–2910. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Treppe, X.; Chen, Z.; Jacobson, K. Cell migration. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 2369–2392.
96. Michaelis, U.R. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 4131–4148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Svitkina, T.M.; Borisy, G.G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* **1999**, *145*, 1009–1026. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Swaney, K.E.; Li, R. Function and regulation of the Arp2/3 complex during cell migration in diverse environments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *42*, 63–72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Pérez-González, R.; Gauthier, S.A.; Kumar, A.; Saito, M.; Saito, M.; Levy, E. A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1545*, 139–151. [\[PubMed\]](#)
100. György, B.; Szabó, T.G.; Pásztói, M.; Pál, Z.; Misják, P.; Aradi, B.; László, V.; Pállinger, E.; Pap, E.; Kittel, A.; et al. Membrane vesicles, current state-Of-The-Art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2667–2688. [\[CrossRef\]](#)
101. Ma, L.; Li, Y.; Peng, J.; Wu, D.; Zhao, X.; Cui, Y.; Chen, L.; Yan, X.; Du, Y.; Yu, L. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res.* **2015**, *25*, 24–38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

102. Jiang, D.; Jiang, Z.; Lu, D.; Wang, X.; Liang, H.; Zhang, J.; Meng, Y.; Li, Y.; Wu, D.; Huang, Y.; et al. Migrasomes provide regional cues for organ morphogenesis during zebrafish gastrulation. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 966–977. [\[CrossRef\]](#)
103. Zhao, X.; Lei, Y.; Zheng, J.; Peng, J.; Li, Y.; Yu, L.; Chen, Y. Identification of markers for migrasome detection. *Cell Discov.* **2019**, *5*, 27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Zhang, Y.; Wang, J.; Ding, Y.; Zhang, J.; Xu, Y.; Xu, J.; Zheng, S.; Yang, H. Migrasome and Tetraspanins in Vascular Homeostasis: Concept, Present, and Future. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 438. [\[CrossRef\]](#)
105. Huang, Y.; Zucker, B.; Zhang, S.; Elias, S.; Zhu, Y.; Chen, H.; Ding, T.; Li, Y.; Sun, Y.; Lou, J.; et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-Scale tetraspanin macrodomains. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 991–1002. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Schmidt-Pogoda, A.; Strecker, J.K.; Liebmann, M.; Massoth, C.; Beuker, C.; Hansen, U.; König, S.; Albrecht, S.; Bock, S.; Breuer, J.; et al. Dietary salt promotes ischemic brain injury and is associated with parenchymal migrasome formation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209871. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Dilsiz, N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Sci. OA* **2020**, *6*, FSO465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Ramshani, Z.; Zhang, C.; Richards, K.; Chen, L.; Xu, G.; Stiles, B.L.; Hill, R.; Senapati, S.; Go, D.B.; Chang, H.C. Extracellular vesicle microRNA quantification from plasma using an integrated microfluidic device. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 189. [\[CrossRef\]](#)
109. Charla, E.; Mercer, J.; Maffia, P.; Nicklin, S.A. Extracellular vesicle signalling in atherosclerosis. *Cell Signal.* **2020**, *75*, 109751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Liao, B.; Zhou, M.X.; Zhou, F.K. Exosome-Derived miRNAs as Biomarkers of the Development and Progression of Intracranial Aneurysms. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, *27*, 545–610. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. Spinosa, M.; Lu, G.; Su, G.; Bontha, S.V.; Gehrau, R.; Salmon, M.D.; Smith, J.R.; Weiss, M.L.; Mas, V.R.; Upchurch, G.R., Jr.; et al. Human mesenchymal stromal cell-Derived extracellular vesicles attenuate aortic aneurysm formation and macrophage activation via microRNA-147. *FASEB J.* **2018**, *32*, fj201701138RR. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Meng, W.; He, C.; Hao, Y.; Wang, L.; Li, L.; Zhu, G. Prospects and challenges of extracellular vesicle-Based drug delivery system: Considering cell source. *Drug Deliv.* **2020**, *27*, 585–598. [\[CrossRef\]](#)
113. Samanta, S.; Rajasingh, S.; Drosos, N.; Zhou, Z.; Dawn, B.; Rajasingh, J. Exosomes: New molecular targets of diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 501–513. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Su, S.A.; Xie, Y.; Fu, Z.; Wang, Y.; Wang, J.A.; Xiang, M. Emerging role of exosome-Mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 25700–25712. [\[CrossRef\]](#)
115. Ryu, A.R.; Kim, D.H.; Kim, E.; Lee, M.Y. The Potential Roles of Extracellular Vesicles in Cigarette Smoke-Associated Diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2018*, 4692081. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
116. Folkesson, M.; Li, C.; Frebelius, S.; Swedenborg, J.; Wågsäter, D.; Williams, K.J.; Eriksson, P.; Roy, J.; Liu, M.L. Proteolytically active ADAM10 and ADAM17 carried on membrane microvesicles in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb. Haemost.* **2015**, *114*, 1165–1174. [\[PubMed\]](#)
117. Pan, Y.; Liang, H.; Chen, W. microRNA-200b and microRNA-200c promote colorectal cancer cell proliferation via targeting the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 276–289. [\[CrossRef\]](#)
118. Zhao, T.; Su, Z.; Li, Y.; Zhang, X.; You, Q. Chitinase-3 like-Protein-1 function and its role in diseases. *Signal Transduct. Target Ther.* **2020**, *5*, 201. [\[CrossRef\]](#)
119. Zhang, J.; Alcaide, P.; Liu, L.; Sun, J.; He, A.; Lusinskas, F.W.; Shi, G.P. Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e14525. [\[CrossRef\]](#)
120. Fava, M.; Barallobre-Barreiro, J.; Mayr, U.; Lu, R.; Didangelos, A.; Baig, E.; Lynch, M.; Catibog, N.; Joshi, A.; Barwari, T.; et al. Role of ADAMTS-5 in Aortic Dilatation and Extracellular Matrix Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 1537–1548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
121. Ren, P.; Hughes, M.; Krishnamoorthy, S.; Zou, S.; Zhang, L.; Wu, D.; Zhang, C.; Curci, J.A.; Coselli, J.S.; Milewicz, D.M.; et al. Critical Role of ADAMTS-4 in the Development of Sporadic Aortic Aneurysm and Dissection in Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12351. [\[CrossRef\]](#)

6.1.3. Publikacja nr 3

Klaudia Piekarska¹, Dominika Spyt¹, Klaudia Bonowicz^{1,2}, Dominika Jerka¹, Alina Grzanka¹, Maciej Gagat^{1,2}

¹Department of Histology and Embryology, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń

²Faculty of Medicine, Collegium Medicum, Mazovian Academy

Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells

Corresponding author:

Klaudia Piekarska Department of Histology and Embryology, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń ul. Jagiellońska 13–15 85-067 Bydgoszcz, Poland e-mail: klaudia.mikolajczyk.piekarska@gmail.com

Medical Research Journal 2024;
DOI: 10.5603/mrj.101643
Copyright © 2024 Via Medica
ISSN 2451-2591
e-ISSN 2451-4101

ABSTRACT

Background: The initiation and progression of inflammation can elevate the secretion of angiogenesis activators, which bind to receptors on endothelial surfaces, thereby stimulating cell proliferation and enhancing migration which has emerged as a significant risk factor for atherosclerosis.

Material and methods: To investigate the effectiveness of angiogenesis inhibitors on changes in blood vessels, the study utilized the anti-angiogenic drugs bevacizumab, pazopanib, and KRN-633. In the study, the vascular model comprised primary human coronary artery endothelial cells (pHCAECs). Moreover, the inflammatory response was induced by the pro-inflammatory cytokine tumour necrosis factor- α (TNF- α).

Results: The compounds' effect on pHCAECs induced structural changes within the actin cytoskeleton, demonstrating the presence of entosis and apoptotic vesicle-like structures. Additionally, inflammation in the pHCAEC line exacerbated the effects of the compounds used in the study, leading to heightened disintegration of cellular cytoskeletons. Conversely, pazopanib in combination with TNF- α induced the formation of vesicular structures along the course of F-actin retraction fibres in migrating pHCAECs. Furthermore, KRN-633 combined with TNF- α resulted in the translocation of VE-cadherin to the cell nucleus in these cells.

Conclusions: It is noteworthy that current treatments for cardiovascular diseases are not entirely effective. The utilization of functional pharmacological compounds such as angiogenesis inhibitors may provide an effective approach to treating disorders and regulating cardiovascular function.

Keywords: endothelium, inflammation, angiogenesis, TNF- α , bevacizumab, pazopanib, KRN-633

Med Res J 2024

Introduction

Chronic inflammation is a significant element in the pathogenesis of cardiovascular diseases, which can be caused by endothelial dysfunction. During inflammation, the endothelium experiences dysfunction due to an elevated production of reactive oxygen species (ROS), pro-inflammatory cytokines, matrix metalloproteinases (MMPs), adhesion molecules, and disturbances in vascular tone [1–3].

Because of the local production of chemokine, leukocyte recruitment is one of the most characteristic hallmarks of inflammation [4]. Leukocyte recruitment involves a complex cascade of sequential signalling and adhesion steps, which lead to leukocyte migration through endothelial cells (ECs) [5]. This process

necessitates swift and irreversible modifications in the functional expression of adhesion molecules, reorganization of cytoskeletal elements, and coordinated movements of cell and vesicular membranes [6, 7]. Leukocyte migration from blood vessels occurs via one of two routes. The first one is the intercellular (paracellular) route which takes place between ECs. It involves adhesion molecules, which facilitate connections between ECs [8]. The second type is transcellular, occurring through the endothelial cell body while maintaining connections intact [9, 10]. Notably, conditions that activate endothelial actin stress fibres reduce transcellular migration, thereby promoting increased intercellular migration. However, inhibiting the formation of stress fibres induces the creation of transitional pores in the endothelium, facilitating the transcellular extravasation

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

www.journals.viamedica.pl/medical_research_journal

1

of leukocytes [11, 12]. Inflammation has the potential to stimulate angiogenesis, and the development of novel vessels may enhance tissue inflammation [13]. In response to angiogenic stimuli, ECs transform the quiescent phenotype into an active one, characterized by an enhanced capacity to migrate, matrix proteolysis, and a high mitotic index [14]. Moreover, activated ECs change the dynamics of closing and short-circuiting connections that exist between perivascular cells and neighbouring ECs and involve proteins such as claudins, vascular endothelial cadherin (VE-cadherin), neural cadherin (N-cadherin), occludin, and junctional adhesion molecule (JAMs) [15, 16].

Angiogenesis is the formation and maintenance of blood vessel structures conducted by vascular endothelial growth factor (VEGF), which is an additive responsible for vascular permeability and cell migration [17]. The mechanism based on the difference in VEGF gradient is termed sprouting angiogenesis, whereas, in its absence, it is known as invagination or division angiogenesis. In the intussusceptive angiogenesis model, intraluminal tissue pillars form through contact between ECs from opposing capillary walls or via fusion of interstitial protrusions [18].

Optimal antiangiogenic therapy strategies are becoming extremely important in effectively and successfully introducing them into the treatment of cardiovascular diseases. These are therapies based on substances that recognize and inhibit the activity of VEGF factors, such as bevacizumab, pazopanib, and KRN-633 [19, 20]. Bevacizumab is a chimeric monoclonal antibody containing the muMAb A4.6.1 monoclonal antibody with IgG1 immunoglobulin. It has been observed that inhibiting the activity of VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in ECs, significantly enhances ECs proliferation and angiogenesis ultimately inhibiting the proliferation of ECs and angiogenesis [21]. Pazopanib is a small-molecule tyrosine kinase inhibitor (TKI) focused on platelet-derived growth factor receptors α and β (PDGFR- α , - β), VEGFR-1, -2 and -3, fibroblast growth factor receptor-1, -2 (FGFR-1 and -2) and the c-Kit matrix factor receptor [22]. Therefore, it effectively inhibits numerous pathways affecting cell proliferation and angiogenesis [23]. KRN633, a quinazoline-urea derivative, effectively and selectively inhibits intracellular VEGF signalling, VEGFR-1, -2, and -3 tyrosine kinases, as well as PDGFR and c-Kit. It has been demonstrated that the primary mechanism of action of KRN633 involves inhibiting VEGFR-2 phosphorylation, thereby blocking the response of ECs and angiogenesis *in vitro* [24, 25].

Materials and Methods

Cell culture

To assess the correlation between the effects of anti-angiogenic substances and inflammatory activation of human vascular endothelium, primary and immortalized endothelial model cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) cell bank were used in this study. In the study, the Human Coronary Artery Endothelial Cells (PHCAEC) cell line was used. The cells used in the study were obtained from a young Caucasian individual whose death was not due to a cardiovascular event. The cells that comprise the research material in this study were cultivated in sterile culture vessels designed for adherent cells with a surface area of 25 cm² (Eppendorf, Falcon), by the recommendations of the ATCC cell bank. The basic medium for PHCAEC cell line was the liquid growth medium supplemented with a growth kit, which, due to the specification of the research, consisted of recombinant human vascular endothelial growth factor (rhVEGF), recombinant human epidermal growth factor (rhEGF), recombinant human fibroblast growth factor (rhFGF), recombinant human insulin-like growth factor 1 (rhIGF-1), L-glutamine, heparan sulphate, hydrocortisone, ascorbic acid and 2% foetal bovine serum (FBS) (ATCC). In order to prevent bacterial contamination, the culture medium was enriched with a mixture of penicillin, streptomycin, and amphotericin B. Cells were cultivated under constant humidity, at a temperature of 37°C and in an atmosphere of 5% CO₂.

Cell treatment

To initiate the inflammatory reaction, PHCAECs were treated with recombinant human tumour necrosis factor α (TNF- α) (Sigma-Aldrich). Based on literature data, the concentration of rhTNF- α that induces an inflammatory reaction in endothelial cell lines is 100 ng/ml. Therefore, this concentration was adopted as the working concentration for the compound. Cell populations treated with rhTNF- α were incubated for 24 hours under conditions of constant humidity, 37°C temperature, and 5% CO₂. To observe the inhibition of the angiogenesis mechanism by biologically and chemically active compounds, PHCAEC were experimentally treated with selected concentrations of bevacizumab, pazopanib, and KRN-633 (TargetMol). These concentrations were based on literature data describing clinically used doses and the

IC50 values of each compound. All mentioned compounds, at the same concentrations, were also used in a 1:1 combination with rhTNF- α . Cells were incubated with these compounds for 24 hours. Simultaneously, an untreated population of cells was cultured and supplemented with a complete nutrient medium to serve as the control sample for the study. After the designated incubation period, both control and treated cells were analysed using qualitative methods to assess changes in the expression of selected proteins. This assessment was conducted to observe the effects of anti-angiogenic substances under physiological conditions and the influence of an inflammation activator.

Immunofluorescence

For the immunofluorescence assessment of protein localization, pHCAEC cells were seeded on sterile coverslips (18 mm) and placed in a 12-well plate (Corning) under standard conditions (37°C, 5%CO₂) until the cells reached a state close to the confluence. Human endothelial cells underwent treatment in the subsequent arrangement: rhTNF- α , bevacizumab, pazopanib, KRN-633, and the combination: rhTNF- α + bevacizumab, rhTNF- α + pazopanib, rhTNF- α + KRN-633 and incubated for 24 h. At the same time, each set of treated cells had control-containing cells cultured without the presence of stress factors. After completing the 24-hour incubation, the cells were fixed with a 1% paraformaldehyde PFA solution (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at room temperature (RT). To permeabilize the membrane, 1 mL of 0.25% Triton X-100 solution was added to the cells and left for 10 minutes. The next step was to block the non-specific background reaction using 1% (pHCAEC cell line) BSA (20 min, RT). Immediately after the background blocking procedure, double labelling for junctional proteins (ThermoFisher Scientific) was performed using a primary mouse anti-VE-cadherin antibody (1:100, Invitrogen) and a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 594 nm (1:200, Invitrogen). Both mentioned antibodies were incubated for 1 h (RT, dark), respectively. After the designated time, F-actin filaments were labelled using fluorescent phalloidin conjugated with FITC (1:40, Invitrogen) for 20 minutes (RT, dark). Cell nuclei were stained with DAPI counterstain (1:20,000) for 10 min. (RT, dark). All mentioned procedures above were preceded by rinsing with phosphate-buffered saline (PBS) solution for ongoing removal of residues after subsequent stages of the immunofluorescence reaction.

The stained slides were mounted with Aqua Poly/Mount medium and evaluated using a C1 laser scanning confocal microscope and an oil objective VC plan Apo 60 $\times$ /1.4 and Nikon EZ-C1 software 3.80 (Nikon).

The lasers used for DAPI excitation, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594, are a 408 nm diode with a 450/35 emission filter, a 488 nm diode with a 515/30 emission filter, and a 543 nm He-Ne with a 650LP emission filter, respectively. Triple-labelling images were generated using the same parameters, including laser power, pixel exposure time, channel gain, and resolution.

Results

Fluorescence techniques and a confocal microscope were utilized to evaluate the organization and localization of F-actin and VE-cadherin in primary pHCAEC cells. The visualization of fluorescently stained structures allowed for the assessment of organizational changes in F-actin and localization of VE-cadherin in examined cells cultured under the influence of individual drugs and TNF- α . Control cells were characterized by an organized F-actin network, which encouraged mutual interactions between neighbouring cells and cooperation in mechanical signal transduction. Nonetheless, VE-cadherin was predominantly located within the sites of intercellular interaction in pHCAECs (Fig. 1a).

After 24 hours of incubation of pHCAECs with TNF- α , the organization of F-actin changed. Under the influence of TNF- α , F-actin stress fibres were rebuilt into parallel bundles of stress fibres, which resulted in the manifestation of a spindle-shaped or swollen cell shape. Due to the change in the organization of F-actin, intercellular spaces were highlighted, which indicates a limited barrier function of the examined cells. However, the junctional contact between cells assessed using fluorescently labelled VE-cadherin was limited to point interactions (Fig. 1b).

Treatment of pHCAEC cells with bevacizumab for 24 hours led to a significant expansion of the actin cytoskeleton, which resulted in cell swelling and the appearance of a continuous-discontinuous nature of intercellular interactions (Fig. 2a). Additionally, in places with continuous intercellular connections, a tendency to the phenomenon of entosis was observed. Cells were also observed about the typical stress organization of F-actin and the complete lack of interaction with neighbouring cells. The occurrence of cells with actin

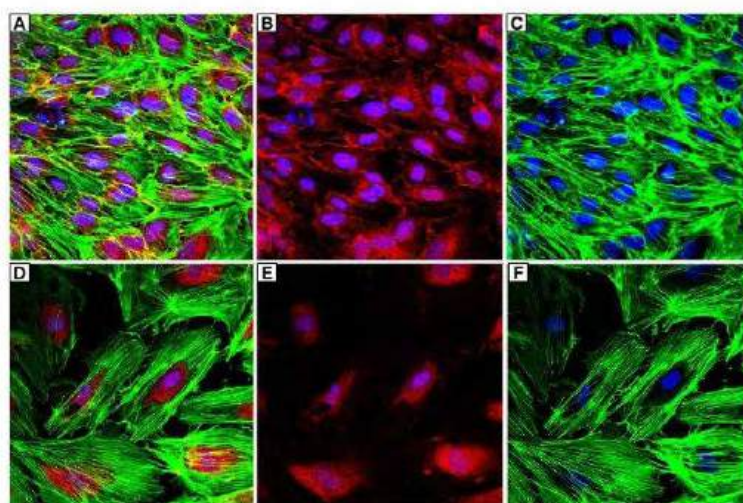


Figure 1A. Representative confocal image showing F-actin (green) and VE-cadherin (red) fluorescence in control pHCAECs. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A1. Overlay; B1. DAPI + VE-cadherin; C1. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$.

Figure 1B. Representative confocal image showing F-actin (green) and VE-cadherin (red) fluorescence in pHCAECs treated with $100\text{ ng/ml TNF-}\alpha$. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A2. Overlay; B2. DAPI + VE-cadherin; C2. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$.

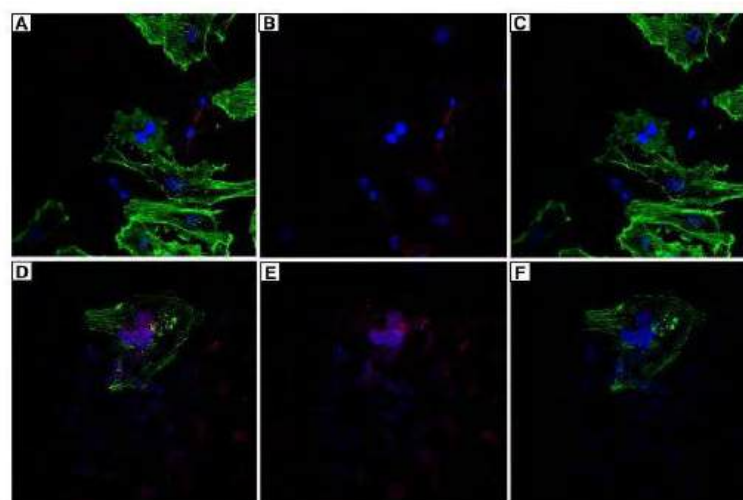


Figure 2A. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs treated with bevacizumab $6.7 \times 10^{-6}\text{ nmol}$. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A1. Overlay; B1. DAPI + VE-cadherin; C1. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$.

Figure 2B. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs treated with $100\text{ ng/ml TNF-}\alpha$ and bevacizumab $6.7 \times 10^{-6}\text{ nmol}$. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A2. Overlay; B2. DAPI + VE-cadherin; C2. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$.

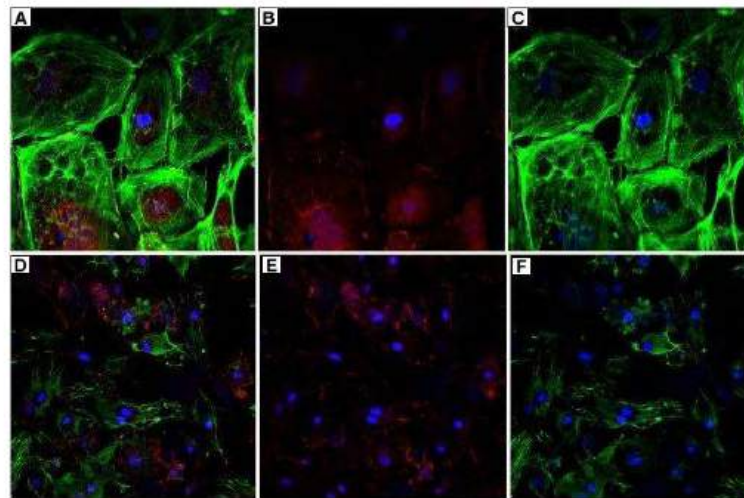


Figure 3A. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs treated with pazopanib 1×10^{-5} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A1. Overlay; B1. DAPI + VE-cadherin; C1. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$

Figure 3B. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs treated with 100 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ and pazopanib 1×10^{-5} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A2. Overlay; B2. DAPI + VE-cadherin; C2. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$

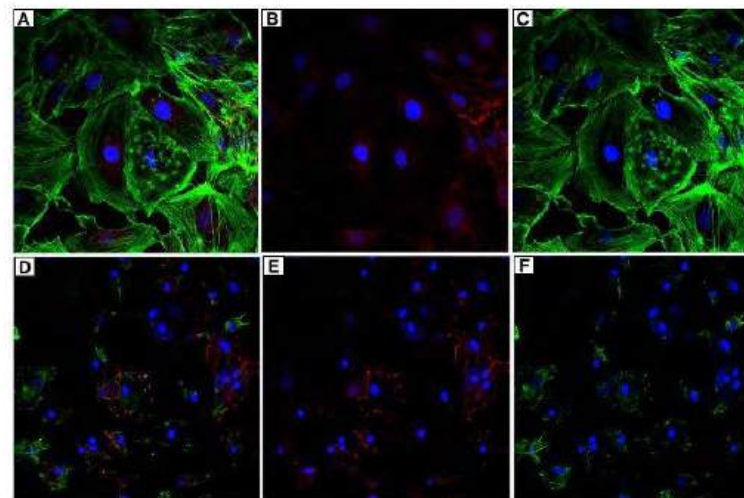


Figure 4A. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs treated with KRN-633 1.7×10^{-4} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A1. Overlay; B1. DAPI + VE-cadherin; C1. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$

Figure 4B. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in pHCAECs with 100 ng/ml $\text{TNF-}\alpha$ and KRN-633 1.7×10^{-4} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A2. Overlay; B2. DAPI + VE-cadherin; C2. DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100\mu\text{m}$

within their membranes' vesicular structures resembling apoptotic buds has also been reported.

Fluorescence assessment of the examined structures in pHCAECs treated with both bevacizumab and TNF- α showed swelling or bundle shrinkage of the cells. However, both of these changes were accompanied by almost complete degradation of the actin cytoskeleton and loss of continuity of the endothelial layer (Fig. 2b).

In the case of the 24-hour action of pazopanib in pHCAEC cells, a significant expansion of F-actin was observed, which resulted in cell swelling and led to the continuous-discontinuous nature of intercellular interactions. Moreover, cells freshly after cytokinesis showed the characteristics of cells undergoing the phenomenon of entosis into swollen cells. Shrunken cells were also observed with vesicular structures resembling apoptotic buds (Fig. 3a). In the case of combined treatment of cells with pHCAECs pazopanib and TNF- α degradation of the cell cytoskeleton was observed. In addition, vesicle structures were observed in parts of migrating cells along the course of actin retraction fibres (Fig. 3b).

Treatment of cells with pHCAECs KRN633 for a period of 24 hours led to cell swelling and a continuously discontinuous nature of intercellular connections (Fig. 4a). pHCAEC cells treated with both KRN-633 and TNF- α led to cell swelling and the formation of a cell migration phenotype, which conditioned the point nature of intercellular connections. Moreover, translocation was observed in VE-cadherin into the cell nucleus (Fig. 4b).

Discussion

It is believed that cardiovascular diseases (CVDs) and other lifestyle-related diseases may be initiated by common factors, posing a challenge in designing effective therapeutic regimens [26, 27]. This need prompted the experimental approach of using bevacizumab, pazopanib, and KRN-633 in antiangiogenic tests on human endothelial cell lines suitable for arteries (pHCAECs). Due to the diverse phenotypes of ECs in the vascular tree, which vary based on their function and may have a significant impact on specific susceptibility to pathological conditions, this study placed special emphasis on the morphology of pHCAECs. This study highlighted a significant reduction in the number of live cells treated with bevacizumab, which correlated with decreased VE-cadherin expression in the pHCAEC cell line. Studies on VE-cadherin-deficient mouse models showed embryonic stage mortality due to severe vascular defects. Flemming et al. (2015) showed that TNF- α

significantly inhibits the expression of VE-cadherin and time-dependently affects the formation of spaces between ECs [28, 29]. Similar results were obtained in this study. Cells incubated with TNF- α exhibited a reduction in membrane VE-cadherin expression, which correlated with the loss of continuous fluorescent signals at the cell edges. This change was associated with a shift in the nature of intercellular interactions from continuous to punctate. Similarly to the studies discussed in this work, the authors also observed changes in cell morphology and the appearance of intercellular spaces. Additionally, it has been shown that TNF- α induces the expression of MMP9, which can break the homophilic interaction of VE-cadherins located on the surface of two neighbouring cells [30]. As shown, TNF- α enhances blood vessel remodelling by influencing the activation of ECs and promoting pericyte recruitment. In turn, chronic inflammation affects, through the induction of Angiotensin 2 (Ang-2) in ECs, destabilization and increased vascular permeability [31]. The Ang-1/Tie-2 system is crucial in maintaining blood vessel stability. Ang-1 acts as an antagonist to Ang-2, which is released from Weibel-Palade bodies in response to various stimuli. As a consequence, the ratio of Ang-1 to Ang-2 is reduced, thereby contributing to the destabilization of the endothelial monolayer and the formation of new blood vessels [32]. It is worth noting that Ang-2 also affects the phosphorylation of VE-cadherin, simultaneously regulating the activity of this protein. Studies confirm that phosphorylated VE-cadherin induces blood vessel permeability and destabilization of intercellular connections [33]. Wang et al. (2019) performed a fluorescence analysis of VE-cadherin protein, showing its increased expression in SACC-LM cells stimulated with VEGF-A. However, incubation of cells with bevacizumab contributed to the reduction of VE-cadherin expression and disruption of the formation of vascular-like structures, which confirms the anti-angiogenic nature of the drug [34].

The cytoskeleton is integral to several crucial biological functions at the cellular level. Among these, it plays key roles in cell movement, intracellular organization, endocytosis, cytokinesis, and even apoptosis. The actin cytoskeleton is composed mainly of actin. This protein actively adapts to the changing intra- and extracellular environment by polymerizing actin into the form of F-actin filaments or depolymerizing them. Destabilization of F-actin induces features in cells that define the image of apoptotic cells [35]. These cells are characterized by the condensation and fragmentation of genetic material, fragmentation of the cell nucleus, swelling and shrinking of cells, and the formation of small

vesicles. Moreover, during the early phase of apoptosis, cells undergo shrinkage, and their intracellular contents become compacted. The late phase is characterized by fragmentation of the cell nucleus and the formation of vesicular structures of the plasma membrane [36]. In this study, the morphological picture was observed indicating the induction of this form of cell death. It was demonstrated that cells from both tested cell lines developed surface-like actin structures resembling apoptotic vesicles. These structures were observed in pHCAEC cells following treatment with bevacizumab and pazopanib. Interestingly, the study presented in this paper demonstrated the ability to induce entosis in pHCAEC cells incubated with bevacizumab and pazopanib. Entosis is a fascinating phenomenon where a living cell is engulfed completely by a neighbouring cell. Moreover, cells engulfed by entosis primarily die, suggesting that this process serves as a mechanism for cell survival and supports proliferation under conditions of limited nutrient availability. However, studies have also demonstrated that cells can divide inside the host cell or escape from it, subsequently continuing their cell cycle [37]. These findings suggest that cells may utilize entosis as a survival mechanism under conditions unfavourable for growth.

Fluorescence analysis of cells treated with both bevacizumab and TNF- α in pHCAECs shows a significant decrease in the intensity of F-actin and VE-cadherin, which was associated with almost complete degradation of the actin cytoskeleton and loss of continuity of the endothelial layer. Carneiro et al. (2009) demonstrated the antiangiogenic activity of bevacizumab on VEGF-treated HUVECs. This drug has been shown to dose-dependently reduce the number of proliferating cells. This study also showed that blocking VEGF induces apoptosis, limits migration to the damaged area and reduces vessel formation in vitro [38]. Zhang et al. (2020) demonstrated the inconclusive anti-angiogenic effect of bevacizumab. They found that the migration of HUVEC cells under hypoxic conditions, treated with bevacizumab, was actually enhanced. Additionally, an in vitro vessel formation assay showed that this drug accelerates cell angiogenesis [39]. Therefore, it can be suggested that bevacizumab may exhibit both pro- and anti-angiogenic characteristics depending on the microenvironmental conditions (normoxia or hypoxia) of the cells.

The second drug used in the research on which this work was based was pazopanib. Subsequent detailed fluorescence analysis of F-actin in pHCAEC cells incubated with pazopanib and TNF- α revealed structures resembling the originally described migrasomes. Ma

et al. (2015) demonstrated that migrating cells leave behind retraction fibres where membrane-covered vesicles are located. However, subsequent studies have established that actin polymerization is essential for the formation of migrasomes. The process by which cells form migrasomes and secrete them into the extracellular space may play a crucial role in cell communication [40]. However, considering the above, it should be expected that this image is an expression of cell death during dynamic processes, such as division or migration.

In the present study on the pHCAECs cell model, it was noted that the induction of KRN-633 and KRN-633 combined with TNF- α induced both cell apoptosis and cell swelling, which was characterized by a specific arrangement of F-actin filaments, but also complete disintegration of F-actin. The observed swelling correlated with the parallel arrangement of F-actin stress fibres and led to the spindle shape of the cells. This image of pHCAEC cells is characterized by their increased migration potential. It is worth noting that incubation with KRN-633 contributed to a reduction in the intensity of membrane VE-cadherin. It is intriguing that in cells treated simultaneously with KRN-633 and TNF- α , VE-cadherin was predominantly localized in the nucleus and cytoplasm around the perinuclear region. Research conducted by Liu et al. (2017) shows that thrombin induces phosphorylation of VE-cadherin while contributing to increased vascular permeability. Fluorescence analysis reveals that incubation of endothelial cells with thrombin leads to increased expression of VE-cadherin in the perinuclear area and cytosol, accompanied by decreased expression of this protein on the cell membrane. It has been suggested that the effect of such an event may be to protect the protein from degradation [41]. Similarly, in the present findings, VE-cadherin translocation may serve as a mechanism to protect the protein against factors influencing cell degradation, although current studies do not definitively confirm this hypothesis. However, one can suggest that the inflammatory induction of pHCAECs inhibits the antiangiogenic effect of KRN-633.

Conclusions

Based on the conducted research, it can be concluded that TNF- α induces an inflammatory response in pHCAECs, characterized by remodelling of the actin cytoskeleton into parallel-arranged F-actin stress fibres. This alteration changes the nature of cell-cell interactions, leading to increased permeability of the cell monolayer

through discontinuous intercellular connections and the formation of gaps between cells.

Antiangiogenic compounds induce structural changes in the actin cytoskeleton of pHCAECs, leading to cell swelling, disruption of intercellular interactions, entosis occurring within strong cell-cell interactions, and the appearance of vesicular structures resembling apoptotic vesicles.

Additionally, endothelial inflammatory activation by TNF- α treatment of cells enhances the disintegrative cytoskeletal effect of bevacizumab, pazopanib, and KR-633 in pHCAECs. In the presence of TNF- α , pazopanib induces the formation of vesicular structures along the F-actin retraction fibres of migrating pHCAECs. This finding may contribute to reevaluating the mechanism proposed by the Chinese team from Tsinghua University led by Li Yu regarding "migrasome" formation, particularly in the context of cell death during dynamic processes such as cell migration or cytokinesis.

Article information

Data availability statement: *The data are available at the Department of Histology and Embryology CM UMK in Bydgoszcz.*

Ethics statement: *None.*

Author contributions: *Conceptualization; KP, DS, MG, AG; Data curation; KP; Formal analysis KP, Funding acquisition KP, MG; Investigation and Methodology; KP, DS, DJ, KB; Supervision: MG, AG; Visualization KP, DS; Roles/Writing — original draft KP, DS, MG; Writing — review & editing KP, DS, KB, DJ.*

Funding: *The project was financed by research grants awarded by the authorities of the Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz Nicolaus Copernicus University in Toruń.*

Acknowledgements: *None.*

Conflict of interest: *None.*

Supplementary material: *None declared.*

References

- Castellon X, Bogdanova V. Chronic inflammatory diseases and endothelial dysfunction. *Aging Dis.* 2016; 7(1): 81–89, doi: 10.14336/AD.2015.0803, indexed in Pubmed: 26815098.
- Pacinella G, Ciaccio AM, Tuttolomondo A. Endothelial dysfunction and chronic inflammation: the cornerstones of vascular alterations in age-related diseases. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(24). doi: 10.3390/ijms232415722, indexed in Pubmed: 36555364.
- Dri E, Lampas E, Lazaros G, et al. Inflammatory mediators of endothelial dysfunction. *Life (Basel).* 2023; 13(6). doi: 10.3390/life13061420, indexed in Pubmed: 37574202.
- Go Yeh, Shetty S, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis.* 2010; 28(1): 31–44, doi: 10.1159/000282062, indexed in Pubmed: 20460888.
- Mitroulis I, Alazaki VI, Kourtellos I, et al. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2015; 147: 123–135, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.008, indexed in Pubmed: 25448040.
- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(9): 633–643, doi: 10.1038/nrm2957, indexed in Pubmed: 20729930.
- Ménasché G, Longé C, Bratt M, et al. Cytoskeletal transport, reorganization, and fusion regulation in mast cell-stimulus secretion coupling. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 652077, doi: 10.3389/fcell.2021.652077, indexed in Pubmed: 33796537.
- Mauersberger C, Hinterdobler J, Schunkert H, et al. Where the action is—leukocyte recruitment in atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 813984, doi: 10.3389/fcvm.2021.813984, indexed in Pubmed: 35087886.
- Muller WA. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 323–344, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130224, indexed in Pubmed: 21073340.
- Carman CV, Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(5): 533–540, doi: 10.1016/j.cob.2008.05.007, indexed in Pubmed: 18595683.
- Escribano J, Chen MB, Moenderbarry E, et al. Balance of mechanical forces drives endothelial gap formation and may facilitate cancer and immune-cell extravasation. *PLoS Comput Biol.* 2019; 15(5): e1006395, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006395, indexed in Pubmed: 31048903.
- Salminen AT, Alahyari Z, Gholizadeh S, et al. Studies of transendothelial migration for biological and drug discovery. *Front Med Technol.* 2020; 2: 600816, doi: 10.3389/fmed.2020.600816, indexed in Pubmed: 35047883.
- Walsh DA, Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res.* 2001; 3(3): 147–153, doi: 10.1186/ar292, indexed in Pubmed: 11299055.
- Piardi C, Jeyaram A, Liu Yi, et al. 3D printed HUVECs/MSCs cocultures impact cellular interactions and angiogenesis depending on cell-cell distance. *Biomaterials.* 2019; 222: 119423, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119423, indexed in Pubmed: 31442885.
- Chaulagain B, Gothwel A, Lamptey RN, et al. Experimental models of in vitro blood-brain barrier for CNS drug delivery: an evolutionary perspective. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(3). doi: 10.3390/ijms24032710, indexed in Pubmed: 36769032.
- Sluiter TJ, van Buul JD, Huveneers S, et al. Endothelial barrier function and leukocyte transmigration in atherosclerosis. *Biomaterials.* 2021; 9(4). doi: 10.3390/biomaterials9040328, indexed in Pubmed: 33804952.
- Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014; 3(10): 647–661, doi: 10.1089/wound.2013.0617, indexed in Pubmed: 25302139.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MPR, et al. Intussusceptive angiogenesis and peg-socket junctions between endothelial cells and smooth muscle cells in early arterial intimal thickening. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(21). doi: 10.3390/ijms21218049, indexed in Pubmed: 33126763.
- Lopes-Coelho F, Martins F, Pereira SA, et al. Anti-angiogenic therapy: current challenges and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(7). doi: 10.3390/ijms22073765, indexed in Pubmed: 33916438.
- Meadows KL, Hurwitz HI. Anti-VEGF therapies in the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012; 2(10). doi: 10.1101/cshperspect.a006577, indexed in Pubmed: 23026128.
- Kanat O, Ertaş H. Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. *World J Clin Oncol.* 2019; 10(2): 52–61, doi: 10.5306/wjco.v10.i2.52, indexed in Pubmed: 30815371.
- Tullerians BME, Nagy M, Sabirkhany S, et al. Tyrosine kinase inhibitor pazopanib inhibits platelet procoagulant activity in renal cell carcinoma patients. *Front Cardiovasc Med.* 2018; 5: 142, doi: 10.3389/fcvm.2018.00142, indexed in Pubmed: 30460241.
- Wilding CP, Elms ML, Judson I, et al. The landscape of tyrosine kinase inhibitors in sarcomas: looking beyond pazopanib. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2019; 19(11): 971–991, doi: 10.1080/14737140.2019.1686979, indexed in Pubmed: 31665941.
- Loganathan S, Kantei R, Siddiqui SS, et al. Role of protein kinase C β and vascular endothelial growth factor receptor in malignant pleural mesothelioma: Therapeutic implications and the usefulness of *Caenorhabditis elegans* model organism. *J Carcinog.* 2011; 10: 4, doi: 10.4103/1477-3163.77274, indexed in Pubmed: 21383961.

25. Wada Y, Ozaki H, Abe N, et al. Effects of KRN633, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase, on vascular development of placenta and fetus of mid-pregnancy in mice. *J Pharmacol Sci*. 2010; 112(3): 290–298. doi: 10.1254/jphs.09299fp. indexed in Pubmed: 20197639.
26. Masoudkabar F, Mohammadifard N, Mani A, et al. Shared life-style-related risk factors of cardiovascular disease and cancer: evidence for joint prevention. *ScientificWorldJournal*. 2023; 2023: 2404806. doi: 10.1155/2023/2404806. indexed in Pubmed: 37520944.
27. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 76(25): 2982–3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010. indexed in Pubmed: 33309175.
28. Flemming S, Burkard N, Renschler M, et al. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res*. 2015; 107(1): 32–44. doi: 10.1093/cvr/cvv144. indexed in Pubmed: 25875259.
29. Flemming S, Burkard N, Renschler M, et al. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res*. 2015; 107(1): 32–44. doi: 10.1093/cvr/cvv144. indexed in Pubmed: 25875259.
30. Romaschenko VP, Zinovkin RA, Galkin II, et al. Low concentrations of uncouplers of oxidative phosphorylation prevent inflammatory activation of endothelial cells by tumor necrosis factor. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80(5): 610–619. doi: 10.1134/S0006297915050144. indexed in Pubmed: 26071781.
31. Jeong JH, Kim K, Lim D, et al. Microvasculature remodeling in the mouse lower gut during inflamming. *Sci Rep*. 2017; 7: 39848. doi: 10.1038/srep39848. indexed in Pubmed: 28045067.
32. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett*. 2013; 328(1): 18–26. doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.018. indexed in Pubmed: 22922303.
33. Akwili RG, Sajid MdS, Zahra FT, et al. Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology. *Cells*. 2019; 8(5). doi: 10.3390/cells8050471. indexed in Pubmed: 31108880.
34. Wang HF, Wang SS, Zheng M, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by vascular endothelial growth factor A mediating epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cell Prolif*. 2019; 52(3): e12600. doi: 10.1111/cpr.12600. indexed in Pubmed: 30945361.
35. Desouza M, Gunning FW, Stehn JR. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*. 2012; 2(3): 75–87. doi: 10.4161/bioa.20975. indexed in Pubmed: 22890146.
36. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019; 39(1). doi: 10.1042/BSR20180992. indexed in Pubmed: 30530866.
37. Krishna S, Overholzer M. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(11–12): 2379–2386. doi: 10.1007/s00018-016-2207-0. indexed in Pubmed: 27048820.
38. Carneiro A, Falcão M, Azevedo I, et al. Multiple effects of bevacizumab in angiogenesis: implications for its use in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2009; 87(5): 517–523. doi: 10.1111/j.1755-3768.2008.01257.x. indexed in Pubmed: 18717653.
39. Zhang X, Zhang Y, Jia Y, et al. Bevacizumab promotes active biological behaviors of human umbilical vein endothelial cells by activating TGFβ1 pathways off-VEGF signaling. *Cancer Biol Med*. 2020; 17(2): 418–432. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0216. indexed in Pubmed: 32587778.
40. Ma L, Li Y, Peng J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res*. 2015; 25(1): 24–38. doi: 10.1038/cr.2014.135. indexed in Pubmed: 25342562.
41. Liu Y, Chen XL, Wang L, et al. Insulin antagonizes thrombin-induced microvessel leakage. *J Vasc Res*. 2017; 54(3): 143–155. doi: 10.1159/000470844. indexed in Pubmed: 28478449.

6.1.4. Publikacja nr 4

Klaudia Piekarska¹, Dominika Spyt¹, Klaudia Bonowicz^{1,2}, Dominika Jerka¹, Alina Grzanka¹, Maciej Gagat^{1,2}

¹Department of Histology and Embryology, Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń

²Faculty of Medicine, Collegium Medicum, Mazovian Academy

Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances

Corresponding author:

Klaudia Piekarska
Department of Histology and Embryology,
Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz,
Nicolaus Copernicus University in Toruń
ul. Jagiellońska 13-15
85-067 Bydgoszcz, Poland
e-mail:
klaudia.mikolajczyk.piekarska@gmail.com
Medical Research Journal 2024;
DOI: 10.5603/mrj.101851
Copyright © 2024 Via Medica
ISSN 2451-2591
e-ISSN 2451-4101

ABSTRACT

Based on current knowledge antiangiogenic compounds are utilized in the treatment of inflammatory-dependent diseases such as cancer. It has been shown that these compounds can simultaneously block several signalling pathways regulating angiogenesis. The visualization of fluorescently labelled F-actin and VE-cadherin was allowed to demonstrate that the reorganization of the cell cytoskeleton disrupts cellular processes and consequently inhibits angiogenesis.

Keywords: cell communication, inflammation, antiangiogenesis

Med Res J 2024

The study aims to assess the effect of compounds that inhibit angiogenesis on the inflammatory response of endothelial cells. The study used EA.hy926 model cells which were treated with tumour necrosis factor- α (TNF- α) — a pro-inflammatory cytokine, which is the main modulator of the inflammatory process, and compounds that inhibit angiogenesis [1, 2]. The experiments focused on assessing the effect of Bevacizumab, Pazopanib and KRN-633 on the organization of F-actin and the localization of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) using fluorescence immunostaining and confocal microscopy.

The control cells were distinguished by an organized F-actin network that promoted mutual interactions among adjacent cells and cooperation in mechanical signal transduction. In contrast, VE-cadherin did not show the same continuous membrane expression, although it was strongly expressed at cell-cell interactions and along the F-actin core of filopodia initiating adherence junctions (AJs) (Fig. 1).

After 24 hours of incubation with TNF- α , the organization of F-actin changed. Due to the changed organization of F-actin, intercellular spaces were highlighted, which indicates that the studied cells have a limited barrier function. Moreover, the junctional contact between cells assessed using fluorescently labelled VE-cadherin was restricted to point interactions (Fig. 2).

The EA.hy926 cell line incubated with Bevacizumab for 24 hours promoted actin cytoskeleton swelling and complete degradation, which was visible only within vesicular structures on the surface of swollen cells. There were no observed sites of intercellular contact (Fig. 3).

In the case of the combination of TNF- α and Bevacizumab, simultaneous swelling and shrinking cells were observed. However, both of these changes were accompanied by a complete degradation of the actin cytoskeleton and a loss of endothelial layer continuity (Fig. 4).

Treatment of cells with a second antiangiogenic compound - Pazopanib - also revealed swollen cell

This article is available in open access under Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

www.journals.viamedica.pl/medical_research_journal

1

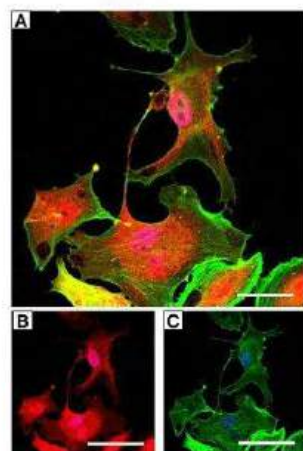


Figure 1. Representative confocal image showing F-actin (green) and VE-cadherin (red) fluorescence in control EA.hy926. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A. Overlay. B. DAPI + VE-cadherin. C. DAPI + F-actin. (Magnification x100) Bar = 100µm

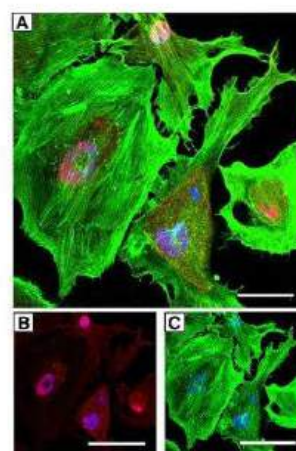


Figure 2. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with 100 ng/ml TNF-α. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A. Overlay. B. DAPI + VE-cadherin. C. DAPI + F-actin (Magnification x 100) Bar = 100 µm

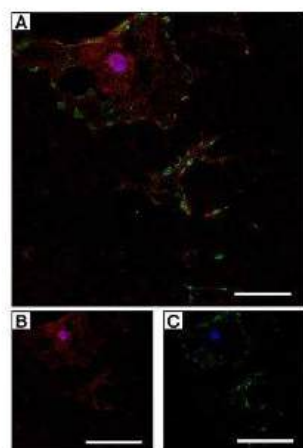


Figure 3. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with Bevacizumab 6.7×10^{-6} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A. Overlay. B. DAPI + VE-cadherin. C. DAPI + F-actin. (Magnification x 100) Bar = 100 µm

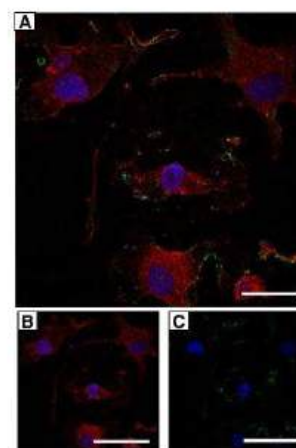


Figure 4. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with 100 ng/ml TNF-α and Bevacizumab 6.7×10^{-6} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). A. Overlay. B. DAPI + VE-cadherin. C. DAPI + F-actin. (Magnification x 100) Bar = 100 µm

structures, which were accompanied by significant degradation of the actin cytoskeleton and lack of inter-cellular interactions (Fig. 5).

The same effect was observed after further incubation of cells with the pro-inflammatory cytokine TNF-α. Nonetheless, the inflammation activity coupled with

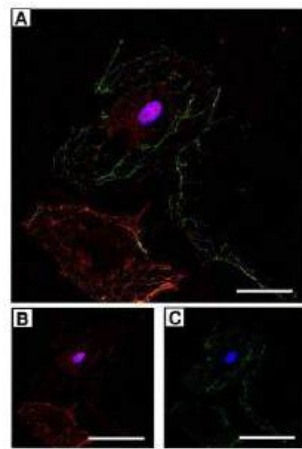


Figure 5. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with Pazopanib 1×10^{-5} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). **A.** Overlay. **B.** DAPI + VE-cadherin. **C.** DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100 \mu\text{m}$

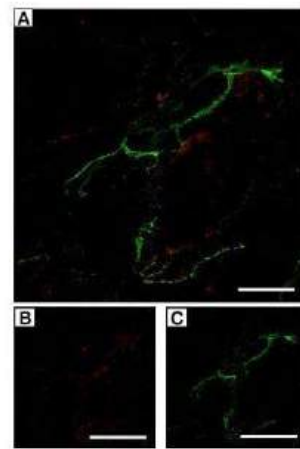


Figure 6. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with 100 ng/ml TNF- α and Pazopanib 1×10^{-5} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). **A.** Overlay. **B.** DAPI + VE-cadherin. **C.** DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100 \mu\text{m}$

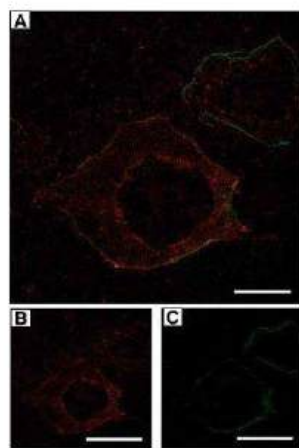


Figure 7. Representative confocal image showing fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with KRN-633 1.7×10^{-4} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). **A.** Overlay. **B.** DAPI + VE-cadherin. **C.** DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100 \mu\text{m}$

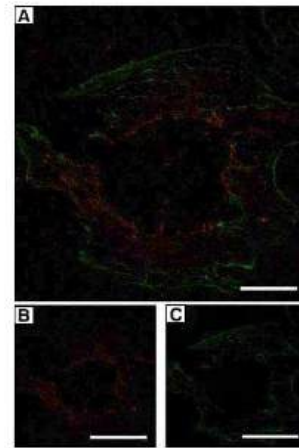


Figure 8. Representative confocal image showing the fluorescence of F-actin (green) and VE-cadherin (red) in EA.hy926 treated with 100 ng/ml TNF- α and KRN-633 1.7×10^{-4} nmol. Cell nuclei were labelled with DAPI (blue). **A.** Overlay. **B.** DAPI + VE-cadherin. **C.** DAPI + F-actin. (Magnification $\times 100$) Bar = $100 \mu\text{m}$

the antiangiogenic properties of Pazopanib resulted in a complete reduction in the fluorescence intensity of VE-cadherin (Fig. 6).

Finally, the complete disintegration of the cytoskeleton was caused by the application of KRN-633 cells. Incubation for 24 hours both in only

compound presence and in combination with TNF- α showed a visible decrease in the level of fluorescence of actin filaments and intercellular junctions (Fig.7, Fig. 8).

The findings presented in this paper indicate that the drugs employed in the study to inhibit angiogenesis predominantly exert antiproliferative effects, triggering cell survival processes, and also exerting a lethal effect on EA.hy926 cells.

KB; Supervision: MG, AG; Visualization KP, DS; Roles/Writing — original draft KP, DS, MG; Writing — review & editing KP, DS, KB, DJ.

Funding: *The project was financed by research grants awarded by the authorities of the Ludwik Rydygier Collegium Medicum in Bydgoszcz Nicolaus Copernicus University in Toruń.*

Conflict of interest: *None.*

Supplementary material: *None.*

Article information

Acknowledgements: *None.*

Ethics statement: *None.*

Author contributions: *Author contributions: Conceptualization; KP, DS, MG, AG; Data curation: KP; Formal analysis KP; Funding acquisition KP, MG; Investigation and Methodology; KP, DS, DJ,*

References

1. Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(5), doi: [10.3390/ijms22052719](https://doi.org/10.3390/ijms22052719), indexed in Pubmed: [33800290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33800290/).
2. Bigda J, Okrdj M. The role of tumor necrosis factor (TNF) in angiogenesis. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia.* 2002; 6(2): 57–59.

6.2. Pisemne oświadczenia współautorów prac tworzących cykl o wyrażeniu zgody na wykorzystanie publikacji dla potrzeb przeprowadzania przewodu doktorskiego

6.2.1. Publikacja nr 1

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr hab. Maciej Gagat, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24

mój udział polegał na:

- Opracowaniu koncepcji projektu i zaprojektowaniu eksperymentów,
- Udziale w przeprowadzaniu eksperymentów,
- Interpretacji wyników,
- Analizie otrzymanych obrazów,
- Przeprowadzeniu analizy statystycznej,
- Przygotowaniu szkicu manuskryptu,
- Uzyskaniu finansowania na badanie.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr n. med. Wioletta Arendt
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24 mój udział polegał na:

- Przeprowadzaniu eksperymentów,
- Analizie otrzymanych obrazów,
- Przeprowadzeniu analizy statystycznej,
- Przygotowaniu szkicu manuskryptu.

Arendt... Wioletta
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

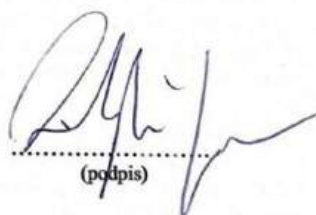
Dr hab. n. med. Jan Zabrzyński, prof. UMK
Katedra Ortopedii, Traumatologii i Chirurgii
Plastycznej
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24
mój udział polegał na:

- Krytycznej recenzji manuskryptu.



(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

prof. dr hab. Dariusz Grzanka
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24 mój udział polegał na:

- Interpretacji otrzymanych wyników,
- Zredagowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr n. med. Adrian Krajewski
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24
mój udział polegał na:

- Przeprowadzeniu eksperymentów w ramach realizacji tematu pracy.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr n. med. Anna Klimaszewska-Wisniewska
Katedra Patomorfologii Klinicznej
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24
mój udział polegał na:

- Korekcie ostatecznej wersji manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

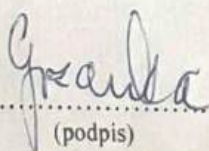
prof. dr hab. n. med. Alina
Grzanka
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „CRISPR-based activation of endogenous expression of TPM1 inhibits inflammatory response of primary human coronary artery endothelial and smooth muscle cells induced by recombinant human tumor necrosis factor α ”, Gagat Maciej, Zielińska Wioletta, Mikołajczyk Klaudia [i in.], *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, vol. 9, s.1-24 mój udział polegał na:

- Opracowaniu koncepcji projektu,
- Zaprojektowaniu eksperymentów,
- Zapewnieniu nadzoru nad realizacją eksperymentów i przygotowywaniu manuskryptu.


(podpis)

6.2.2. Publikacja nr 2

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr n. med. Wioletta Arendt
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- Ocenie merytorycznej i językowej przygotowywanego manuskryptu.

Arendt Wioletta
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 17.09.2024

mgr Dominika Spyt

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s. 1-15, mój udział polegał na:

- pomocy w przygotowywaniu manuskryptu,
- udziale w przygotowywaniu figur wykorzystanych w publikacji,
- formatowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Spyt Dominika
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

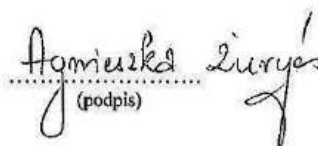
dr hab. Agnieszka Żuryń, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- przygotowywaniu manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

Piotr Szwarc
(podpis)

1316710 dr n. med. Piotr Paweł ŚWINIARSKI
specjalista urolog FEBU
androlog kliniczny EAA
lekarz medycyny seksualnej FECSM

Bydgoszcz, dnia 17.09.2024

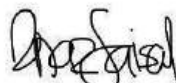
Inaz Faisal

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- edycji językowej ostatecznej wersji manuskryptu.


.....
(podpis)

Bydgoszcz, dnia 17.09.2024

Murtaz Qamar

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- edycji językowej ostatecznej wersji manuskryptu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

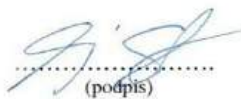
dr hab. Maciej Gagat, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- udziale w opracowywaniu koncepcji pracy,
- przygotowywaniu manuskryptu,
- ostatecznej ocenie merytorycznej pracy.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „The Important Role of Endothelium and Extracellular Vesicles in the Cellular Mechanism of Aortic Aneurysm Formation”, Mikołajczyk Klaudia, Spyt Dominika, Zielińska Wioletta [i in.], International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 23, s.1-15, mój udział polegał na:

- ostatecznej edycji merytorycznej pracy.

.....
(podpis)

6.2.3. Publikacja nr 3

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

mgr Dominika Spyt

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s. 1-9, mój udział polegał na:

- udziale w procesie tworzenia koncepcji pracy,
- wykonywaniu wybranych analiz i przygotowywaniu ich opisu w rozdziale Materiały i Metody,
- udziale we wstępnej wizualizacji komórek z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej,
- przygotowywaniu manuskryptu wraz z edycją językową tekstu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

mgr Dominika Jerka
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-9, mój udział polegał na:

- wykonywaniu eksperymentów badawczych w ramach realizacji celów naukowych publikacji,
- udziale w przygotowywaniu metodologii wykonywanych eksperymentów,
- ostatecznej edycji pracy w obszarze cytowanej literatury.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

mgr Klaudia Bonowicz
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia *[i in.]*, Medical Research Journal, 2024, s.1-9, mój udział polegał na:

- wykonywaniu eksperymentów badawczych w ramach realizacji celów naukowych publikacji,
- udziale w przygotowywaniu metodologii wykonywanych eksperymentów,
- ostatecznej edycji pracy pod kątem poprawności językowej.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr hab. Maciej Gagat, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Impact of angiogenesis inhibitors on inflammatory activation in human vascular endothelial cells”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-9, mój udział polegał na:

- pozyskiwaniu środków na realizację badań zawartych w pracy,
- udziale w opracowywaniu koncepcji manuskryptu,
- wsparciu w analizie otrzymanych wyników w postaci obrazów mikroskopii konfokalnej.


(podpis)

6.2.4. Publikacja nr 4

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

mgr Dominika Spyt

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-13 mój udział polegał na:

- udziale w procesie tworzenia koncepcji pracy,
- wykonywaniu wybranych analiz i przygotowywaniu ich opisu w rozdziale Materiały i Metody,
- udziale we wstępnej wizualizacji komórek z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej,
- przygotowywaniu manuskryptu wraz z edycją językową tekstu.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

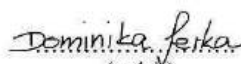
mgr Dominika Jerka
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-13 mój udział polegał na:

- wykonywaniu eksperymentów badawczych w ramach realizacji celów naukowych publikacji,
- udziale w przygotowywaniu metodologii wykonywanych eksperymentów,
- ostatecznej edycji pracy w obszarze cytowanej literatury.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

mgr Klaudia Bonowicz
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-13 mój udział polegał na:

- wykonywaniu eksperymentów badawczych w ramach realizacji celów naukowych publikacji,
- udziale w przygotowywaniu metodologii wykonywanych eksperymentów,
- ostatecznej edycji pracy pod kątem poprawności językowej.


(podpis)

Bydgoszcz, dnia 16.09.2024

dr hab. Maciej Gagat, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Rada Dyscypliny NAUKI MEDYCZNE
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy „Antiangiogenic effects in the modulation of inflammatory pathways. A comprehensive analysis of potential therapeutic substances”, Piekarska Klaudia, Spyt Dominika, Bonowicz Klaudia [i in.], Medical Research Journal, 2024, s.1-13, mój udział polegał na:

- pozyskiwaniu środków na realizację badań zawartych w pracy,
- udziale w opracowywaniu koncepcji manuskryptu,
- wsparciu w przygotowywaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



(podpis)

6.3. Zgoda Komisji Bioetycznej

6.

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

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

KB 10/2020

Bydgoszcz, 28.01.2020 r.

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

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **28.01.2020 r.** przeanalizowała wniosek, który złożył kierownik badania:

dr n. med. Maciej Gagat
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

- prof. dr hab. n. med. Alina Grzanka, dr n. med. Maciej Gagat, dr n. med. Magdalena Izdebska, prof. UMK, mgr Marta Halas-Wiśniewska, mgr Adrian Krajewski, mgr Wioletta Zielińska, mgr Klaudia Mikołajczyk, mgr Karolina Buchholz, dr n. med. Anna Klimaszewska-Wiśniewska, dr hab. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT, dr inż. Adam Lepczyński, dr inż. Agnieszka Hirosimeczyk,

w sprawie badania:

„Wyjaśnienie mechanizmu powstawania i znaczenia biologicznego śródbłonkowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych towarzyszących aktywacji zapalnej ludzkiego śródbłonka naczyń tętnic wieńcowych - badania *in vitro*.”

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

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań w zakresie określonym we wniosku

Zgoda obowiązuje od daty posiedzenia (28.01.2020 r.) do końca 2023 r.

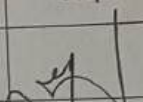
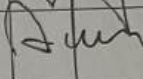
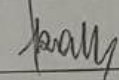
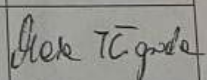
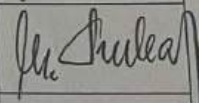
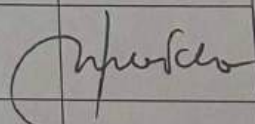
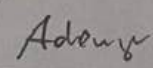
Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii.

Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:
dr n. med. Maciej Gagat
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 28.01.2020 r.

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