

Vascular endothelium in inflammatory process *in vivo* and *in vitro*

Horvathova M, Jahnova E, Nyulassy S

Cievny endotel v zápalovom procese *in vivo* a *in vitro*

Abstract

Horvathova M, Jahnova E, Nyulassy S:
Vascular endothelium in inflammatory process *in vivo* and *in vitro*
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (7): 391–397

Endothelial injury occurs in atherosclerosis, infectious, rheumatic and vasculitic processes, leading to activation of transcription factors and endothelial expression of various cytokines and adhesion molecules. Endothelial cell cultures represent a valuable tool in research activities, with emphasis on the principal characteristics of angiogenesis, inflammatory response, transduction signals and endothelial functionality. In the laboratory of tissue cultures we prepared primary endothelial cultures by their isolation from the umbilical vein. This model system has been used to investigate the endothelial activation *in vitro*, adhesion alterations of immunocompetent cells to endothelium, adhesion molecule expression in the disease course monitoring and anti-inflammatory treatment. (Tab. 1, Fig. 5, Ref. 45.)
Key words: endothelium, inflammation, leukocyte adhesion.

V 19. storočí definoval Virchow cievny endotel ako „jednoduchú membránu, ktorá prechádza celým telom“. V cievnej fyziológii sa endotelovým bunkám spočiatku prisudzovala iba pasívna úloha. Dnes vieme, že cievny endotel je rozsiahly a veľmi výkonný endokrinný orgán, ktorý sa aktívne zúčastňuje na regulácii cievneho tonusu, permeability, adhézie a diapedézy leukocytov, koagulácie a rastu okolitých tkanív (1, 2).

Celkový povrch cievneho endotelu je približne 5000 m², ale tvorí iba 1 % celkovej hmotnosti organizmu. V ontogenetickom vývine je endotel prvou zložkou cirkulačného systému, z ktorého sa neskôr diferencujú artérie, arterioly, kapiláry, vény a lymfatické cievy. Schopnosť rozmnožovania a pohybu si endotelové bunky udržiavajú počas celého života. Sú schopné nahradiť poškodený endotel v cieve, ale aj vytvoriť nové krvné cievy v embryonálnych tkanivách. V normálnych tkanivách sa zúčastňujú na bežnej obnove, remode-

Abstrakt

Horváthová M., Jahnová E., Nyulassy Š.:
Cievny endotel v zápalovom procese *in vivo* a *in vitro*
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 7, s. 391–397

Poškodenie cievneho endotelu pri ateroskleróze, infekčných, reumatických a vaskulárnych procesoch má za následok aktiváciu transkripčných faktorov a expresiu rôznych cytokínov a adhezívnych molekúl. Kultúry endotelových buniek sú vhodným zdrojom pre výskum angiogenézy, zápalovej odpovede, transdukčných signálov a funkčnosti endotelu. V laboratóriu tkanivových kultúr pripravujeme primárne bunkové kultúry izoláciou endotelových buniek z pupočníkovej cievy. Využívame ich ako modelový systém na sledovanie aktivácie endotelu *in vitro*, zmien adhézie imunokompetentných buniek na endotel, štúdium expresie adhezívnych molekúl pri monitorovaní zápalových ochorení a účinnosti liečby. (Tab. 1, obr. 5, lit. 45.)

Kľúčové slová: endotel, zápal, adhézia leukocytov.

lování alebo rekonštrukcii a v poškodených tkanivách na procesoch ich hojenia, reparácie a pri raste nádorov (3–5).

Už viac ako jednu dekádu sme svedkami explózie záujmu o cievny endotel ako vitálnu a dynamickú medzivrstvu. Súčasné štúdie poukazujú na významnú úlohu endotelových buniek pri zápalovom procese. Vďaka svojej strategickej polohe sú schopné interakcie s inými bunkami krvného riečiska a cievnej steny. Neporušené a pokojové endotelové bunky nedovoľujú cirkulujúcim leukocytom pevnejšie adherovať na svoj povrch. Endogénne zápalové mediátory a exogénne produkty mikroorganizmov, či iných replikujúcich sa agensov, môžu aktivovať cirkulujúce leukocyty, ako aj endotelové bunky, a tým zosilniť adhezívne interakcie medzi nimi. Takáto adhézia je jednou z najzákladnejších podmienok na spustenie zápalovej reakcie v okolitom tkanive, či už za obranným alebo poškodzujúcim účelom. Výsledkom je extravazácia, čiže prestup leukocytov

Department of Clinical Immunology, Institute of Preventive and Clinical medicine, Bratislava. bl@fmed.uniba.sk

Address for correspondence: M. Horvathova, RND, Dpt of Clinical Immunology UPKM, Limbova 14, SK-833 01 Bratislava 37, Slovakia.
Phone: Fax:

Oddelenie klinickej imunológie Ústavu preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave

Adresa: RNDr. M. Horváthová, Oddelenie klinickej imunológie ÚPKM, Limbová 14, 833 01 Bratislava 37.

Tab. 1. Adhesion molecules involved in interactions of leukocytes and endothelium.

Adhesion molecule	Distribution	Ligand	Function
<i>Selectin family</i>			
L-selectin (CD62L)	leukocytes	P-selectin, E-selectin, GlyCAM, MAdCAM, CD34	rolling
P-selectin (CD62P)	endothelium, platelets	L-selectin, PSGL-1, Lewis ^x (CD15)	rolling
E-selectin (CD62E)	endothelium	L-selectin, CLA, Sialyl-Lewis ^x (a)	rolling
<i>Integrin family</i>			
α L β 2 (LFA-1, CD11a/CD18)	leukocytes	ICAM-1, ICAM-2	adhesion, migration
α M β 2 (CR3, CD11b/CD18)	granulocytes, monocytes	ICAM-1	adhesion, migration
α X β 2 (CR4, CD11c/CD18)	granulocytes, monocytes	?	?
α 1 β 1 (VLA-1, CD49a/CD29)	lymfocytes	ECMM	?
α 2 β 1 (VLA-2, CD49b/CD29)	lymfocytes	ECMM	?
α 4 β 1 (VLA-4, CD49d/CD29)	lymfocytes, monocytes, eosinophils, basophils	VCAM-1, ECMM	adhesion
α 4 β 7	lymfocytes	MAdCAM-1, VCAM-1	adhesion
<i>Immunoglobulin superfamily</i>			
ICAM-1 (CD54)	endothelium, monocytes	LFA-1, CR3, CD34	adhesion, migration
ICAM-2 (CD102)	endothelium	LFA-1	adhesion,
VCAM-1 (CD106)	endothelium	α 4 β 1, α 4 β 7	adhesion
PECAM-1 (CD31)	endothelium, leukocytes, platelets	PECAM-1 (homophilic)	adhesion, diapedesis
MAdCAM-1	mucosal endothelium	L-selectin, α 4 β 7	adhesion, migration

GlyCAM - Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule, MAdCAM - Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule, PSGL - P-selectin glycoprotein ligand, CLA - cutaneous lymphocyte antigen, LFA - leukocyte function associated antigen, ICAM - Intercellular Adhesion Molecule, VCAM - Vascular Cell Adhesion Molecule, VLA - Very Late Antigen, ECMM - Extracellular Matrix Molecules, PECAM - Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, Sialyl-Lewis^x (a) - sialylovaný Lewisov antigen X (A)

osobitne z postkapilárnych venúl do miesta zápalu. Tento dej má zásadný význam pre obranu hostiteľa proti invadujúcim patogénom, opravu tkanivového poškodenia, patogenézu zápalových, hypersenzitívnych a autoimunitných stavov (6, 7).

Interakcia leukocytov a endotelu

Leukocyty cirkulujú v sieti krvných ciev, dohliadajú na tkanivá a ochraňujú ich od antigénových a mikróbných patogénov. Rôzne faktory, ako sú napr. cytokíny (interleukín (IL)-1, interferón (IFN)- γ , faktor nekrotizujúci nádory (TNF)- α), endotoxín, hypoxia, vírusová infekcia, lipidové produkty, šmykové napätie indukujú nové adhezívne vlastnosti endotelových buniek, ktoré umožňujú rýchlu akumuláciu leukocytov v mieste infekcie a poškodenia tkaniva. Na povrchu aktivovaného endotelu sa exprimujú adhezívne molekuly rodiny selektínov (P-selektín a E-selektín) a imunoglobulínovej veľkorodiny (ICAM (intercellular adhesion molecule)-1, ICAM-2 a VCAM (vascular cell adhesion molecule)-1), ktoré sa viažu na protireceptory leukocytov. Adhezívne molekuly, ktoré sa zúčastňujú na interakciách medzi leukocytmi a endotelom, sú v tabuľke 1 (8–10). Adhézia leukocytov môže byť iniciovaná aktiváciou endotelových buniek alebo leukocytov ako odpoveď na zápalové mediátory pochádzajúce z okolitých tkanív. Cievny endotel je nielen terčom, ale zároveň aj zdrojom zápalových cytokínov (napr.

Tab. 1. Adhezívne molekuly zúčastňujúce sa na interakcii leukocytov a cievneho endotelu.

Adhezívna molekula	Distribúcia	Ligand	Funkcia
<i>Rodina selektínov</i>			
L-selektín (CD62L)	leukocyty	P-selektín, E-selektín, GlyCAM, MAdCAM, CD34	kotúľanie
P-selektín (CD62P)	endotel, trombocyty	L-selektín, PSGL-1, Lewis ^x (CD15)	kotúľanie
E-selektín (CD62E)	endotel	L-selektín, CLA, Sialyl-Lewis ^x (a)	kotúľanie
<i>Rodina integrínov</i>			
α L β 2 (LFA-1, CD11a/CD18)	leukocyty	ICAM-1, ICAM-2	adhézia, migrácia
α M β 2 (CR3, CD11b/CD18)	granulocyty, monocyty	ICAM-1	adhézia, migrácia
α X β 2 (CR4, CD11c/CD18)	granulocyty, monocyty	?	?
α 1 β 1 (VLA-1, CD49a, CD29)	lymfocyty	ECMM	?
α 2 β 1 (VLA-2, CD49b/CD29)	lymfocyty	ECMM	?
α 4 β 1 (VLA-4, CD49d/CD29)	lymfocyty, monocyty, eozinofily, bazofily	VCAM-1, ECMM	adhézia
α 4 β 7	lymfocyty	MAdCAM-1, VCAM-1	adhézia
<i>Imunoglobulínová veľkorodina</i>			
ICAM-1 (CD54)	endotel, monocyty	LFA-1, CR3, CD34	adhézia, migrácia
ICAM-2 (CD102)	endotel	LFA-1	adhézia, migrácia
VCAM-1 (CD106)	endotel	α 4 β 1, α 4 β 7	adhézia
PECAM-1 (CD31)	endotel, leukocyty, trombocyty	PECAM-1 (homofilný)	adhézia, diapedéza
MAdCAM-1	mukózný endotel	L-selektín, α 4 β 7	adhézia, migrácia

GlyCAM (Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule) - bunkovo adhezívna molekula závislá od glykozylácie, MAdCAM (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule) - slizničná adresínová bunkovo adhezívna molekula, PSGL (P-selectin glycoprotein ligand) - glykoproteínový ligand P-selektínu, CLA (cutaneous lymphocyte antigen) - kožný lymfocytový antigén, LFA (leukocyte function associated antigen) - leukocytový funkčný antigén, ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) - medzibunková adhezívna molekula, VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) - cievna bunkovo adhezívna molekula, VLA (Very Late Antigen) - veľmi neskorý antigén, ECMM (Extracellular Matrix Molecules) - molekuly medzibunkovej hmoty, PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) - trombocytovo-endotelová bunková adhezívna molekula, Sialyl-Lewis^x (a) - sialylovaný Lewisov antigen X (A)

IL-1, IL-5, IL-6, IL-11, IL-15), chemokínov (napr. MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), proteín GRO- α (growth-related oncogene- α), IL-8), niektorých hematopoetických cytokínov (rastové faktory stimulujúce kolónie granulocytov, makrofágov alebo granulocytov a makrofágov) a iných cytokínov (napr. trombocytový rastový faktor) (11–13).

Heterotypové adhézie medzi α L β 2/LFA (leukocyte function associated antigen)-1 a ICAM-1, α 4 β 1/VLA-4 a VCAM-1 tvoria základ migračného procesu leukocytov. PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) sa zúčastňuje na homotypovej interakcii. Pri adhézii leukocytov na endotel dochádza aj k ďalším spojeniam bunkových receptorov a ich ligandov (L) (CD40-CD40L a IL-8-IL-8 receptor). Niektoré štúdie dokazujú, že spúšťacím signálom tvorby prozápalových chemokínov a expresie endotelových adhezívnych molekúl sú mediátory na aktivovaných trombocytoch (napr. CD40L a membránový IL-1) (14). Nedávno objavili na cievnom endoteli expresiu molekuly FasL, ktorá je negatívnym regulátorom extravazácie leukocytov a indukuje apoptózu v mnohých typoch buniek, včítanie leukocytov, ktoré nesú receptor Fas, známy aj ako CD95 a APO-1. Expresia FasL na cievnom endoteli funguje ako prevencia infiltrácie leukocytov a jej zníženie je základom extravazácie leukocytov počas zápalovej odpovede. Endotelové bunky exprimujú

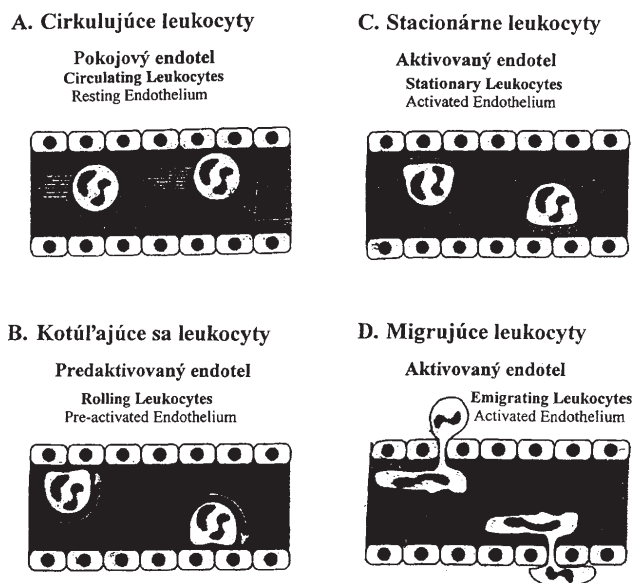


Fig. 1. Steps of adhesion cascade. (A) In the absence of the antiinflammatory stimuli, leukocytes are flowing in the blood stream with no adhesive interactions with venular endothelium. (B) The low affinity interaction between leukocytes and endothelium is mediated by selectins and manifested as rolling. (C) Activation of leukocytes and/or endothelial cells can result in stationary adhesion of leukocytes. (D) Firmly adherent leukocytes can migrate from venules (especially from postcapillary venules) into the adjacent compartment, usually along the chemotactic gradient.

Obr. 1. Jednotlivé kroky adhezívnej kaskády. (A) Pri absencii zápalových stimulov cirkulujú leukocyty v krvnom riečisku bez adhezívnych interakcií s cievnym endotelom. (B) Nízkoafinitnú interakciu medzi leukocytmi a endotelom sprostredkujú selektíny a prejavuje sa ako kotúľanie. (C) Aktivácia leukocytov a/alebo endotelových buniek má za následok pevnú adhéziu leukocytov. (D) Pevne adherované leukocyty migrujú z krvného riečiska (osobitne z postkapilárnych venúl) do okolitého tkaniva, zvyčajne po prúde chemotaktického gradientu (Panés, 1999).

aj Fas rovnako ako FasL, ale za normálnych fyziologických podmienok sú rezistentné voči bunkovej smrti. Dokážu totiž produkovať inhibičný proteín FLIP (flice-like inhibitory protein), ktorý zabráňuje prenosu apoptického signálu následne po interakcii Fas-FasL (2, 15, 16).

Zápalový proces a migrácia leukocytov

Zápalová odpoveď zahŕňa účasť mnohých typov buniek, vrátane cirkulujúcich leukocytov, cievných endotelových a perivaskulárnych buniek (mastocyty, makrofágy). Pri poškodení tkaniva alebo zápale leukocyty migrujú cez subendotelový priestor na miesta infekcie pod vplyvom populárných zápalových cytokínov (TNF- α , IL-1, IFN-gama) a chemoatraktantov (bakteriálne peptidy, fragment komplementu C5a, faktor aktivujúci trombocyty (PAF), leukotrién B₂). Pri akútnom zápale ako prvé migrujú do zápalového ložiska zvyčajne neutrofily, pri chronickom zápale sú to makrofágy a T-lymfocyty, pri alergickom zápale eozinofily. Neutrofily eliminujú patogény fagocytózou, monocyty sa diferencujú na makrofágy, ktoré tiež fagocytujú patogé-

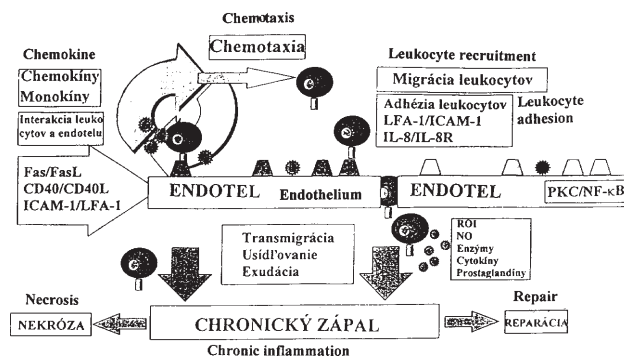


Fig. 2. The role of endothelium in inflammatory response. Chemokines and cytokines secreted by endothelial cells following injury or activation help recruit leukocytes. Leukocyte adhesion to endothelium occurs via cell surface adhesion molecules. Leukocyte-endothelial interactions (e. g. LFA-1/ICAM-1, CD40-CD40L, IL-8-IL-8 receptor, Fas-FasL) can signal the further release of cytokines and chemokines which exacerbate the inflammatory process. Migration of leukocytes allows the tissue level accumulation of inflammatory cells that can secrete a variety of products (NO, ROI, proteases and enzymes, inflammatory or reparative cytokines, growth factors, and eicosanoids). This balance of proinflammatory and anti-inflammatory mechanisms determines the progression of the inflammatory response to either progressive necrosis or tissue repair. PKC — proteinkinase C, NO — nitric oxide, ROI — reactive oxygen intermediates (Krishnaswamy, 1999).

Obr. 2. Úloha cievného endotelu v zápalovej odpovedi. Poškodenie alebo aktivácia endotelových buniek spôsobuje vylučovanie chemokínov a cytokínov, ktoré napomáhajú pri migrácii leukocytov do miesta zápalu. Adhezívne molekuly na povrchu buniek sprostredkujú adhéziu leukocytov na endotel. Interakcie leukocytov a endotelu (napr. interakcia LFA-1/ICAM-1, CD40-CD40L, IL-8-IL-8 receptor, Fas-FasL) signalizujú ďalšie uvoľnenie cytokínov a chemokínov, ktoré exacerbujú zápalový proces. Migrujúce leukocyty sa akumulujú v tkanivách a uvoľňujú rôzne produkty (NO, ROI, proteázy a enzýmy, zápalové a reparačné cytokíny, rastové faktory a eikosanoidy). Rovnováha medzi prozápalovými a protizápalovými mechanizmami určuje vývoj zápalovej odpovede k progresívnej nekróze alebo reparácii tkanív. PKC — proteínkináza C, NO — oxid dusnatý, ROI — reaktívne intermediáty kyslíka (Krishnaswamy, 1999).

ny, a T-bunky aktivujú bunkovú a humorálnu imunitnú odpoveď (17—19).

Po primárnom podráždení (infekcia, poškodenie alebo hypersenzitívna reakcia) sa zo stimulovaných makrofágov a mastocytov uvoľňujú mediátory (histamín, kyslíkové radikály, PAF, leukotriény, cytokíny), ktoré viažu receptory na endotelových bunkách a vedú k rýchlej mobilizácii P-selektínu z Weibel-Paladeho granúl na bunkový povrch. V priebehu niekoľko minút sa stráca L-selektín z povrchu leukocytov a zvyšuje sa expresia a aktivácia β_2 -integrínov. Celý proces diapedézy leukocytov je rozdelený do niekoľkých krokov. Selektíny sprostredkujú počiatočný fenomén, nadviazanie a kotúľanie. V nasledujúcom kroku sa mení tvar leukocytov, ktoré sa začnú kĺzať po endotelových bunkách. Adherované bunky sa bez účasti iných adhezívnych molekúl opäť uvoľňujú do cirkulácie, je to tzv. prechodná adhézia. Integríny, ako aj členy imunoglobulínovej veľkorodiny sprostredkujú pevnú adhéziu - prilepenie leukocytov na endotel. Pohyb leukocytov po endoteli sa zastavuje a leukocyty prechádzajú cez základnú membránu endotelu a migrujú cez extravaskulárne tkanivo k svojmu cieľu — transmigrácia (obr. 1) (17, 20).

Výsledná koordinovaná expresia adhezívnych molekúl, interleukínov, rastových faktorov, chemokínov, prostanoïdov a oxidu dusnatého vedie k vývoju zápalovej odpovede, pre ktorú je charakteristická adhézia a migrácia buniek. Adhézia leukocytov na endotel má významné miesto v patogenéze mnohých ochorení (napr. kardiovaskulárnych, respiračných, pohybového systému, malígnych, neurologických, renálnych, infekčných atď.). Adherenčná schopnosť leukocytov a modulačné faktory adhézie sú základom poznania medzibunkových interakcií pri orgánových dysfunkciách alebo poškodeníach tkanív. Hlavným bodom úsilia je identifikácia adhezívnych glykoproteínov, ktoré umožňujú väzbu leukocytov na cievny endotel. Proces adhézie leukocytov na endotel a špecifická regulácia exprese adhezívnych molekúl je hlavným cieľom protizápalovej terapie (19).

Ludský endotel má centrálnu úlohu v regulácii zápalových odpovedí na tkanivovej úrovni. Aktivovaná proteínkináza C a nukleárny faktor- κ B (NF- κ B) spôsobujú expresiu zápalových génov v bunkách, adhéziu a iné formy stimulácie endotelu. NF- κ B je autoregulačný, indukuje tiež expresiu inhibičného proteínu I- κ B α , čo má za následok inhibíciu transkripcie cieľových génov. Výsledkom negatívnej spätnej väzby je návrat endotelu do pokojového štádia. Aktivované leukocyty odpovedajú na infekciu alebo antigénové podráždenie v tkanivách uvoľnením reaktívnych intermediátov kyselíka, oxidu dusnatého, proteáz a enzýmov (myeloperoxidázy), prostanoïdov a cytokínov. V závislosti od intenzity zápalovej odpovede dochádza k nekróze tkanív alebo ich reparácii (obr. 2) (2, 21).

Poškodenie cievneho endotelu

V cievnom endoteli dochádza pri jednotlivých patofyziologických stavoch k súboru zmien, ako sú nadmerne zvýšená expresia adhezívnych molekúl, zvýšená produkcia cytokínov (najmä s prozápalovými účinkami a rastovými aktivitami), zmenená priepustnosť pre plazmové proteíny a lipoproteíny, zmeny v rovnováhe medzi prokoagulačnými a fibrinolytickými aktivitami a zmeny cievneho tonusu. Z hľadiska vzniku zápalovej reakcie má kľúčový význam nadmerná adhezivnosť endotelu pre leukocyty (osobitne neutrofile) a produkcia prozápalových cytokínov. Endotelová dysfunkcia je základom hypertenzie, hyperlipidémie a aterosklerózy, hemolyticko-uremického syndrómu, vaskulítid a iných kardiovaskulárnych porúch a chorôb. Poškodenie cievneho endotelu sa prejavuje aj pri rejeckii transplantátov, infekčných, reumatických a malígnych procesoch (22, 23).

V patologických podmienkach sa zvyšuje lokálna expresia adhezívnych molekúl (ICAM-1, VCAM-1, E- a P-selektín) a hladina solubilných adhezívnych molekúl (najmä z rodiny integrínov a imunoglobulínovej veľkorodiny) v sére, ktoré korelujú s aktivitou ochorenia a slúžia ako markery aktivácie leukocytov a endotelu. Znakom mnohých vaskulárnych ochorení (napr. Wegenerova granulomatóza, polyarteritis nodosa, obrovskobunková arteritída, systémový lupus erythematosus a reumatoidná artritída) je aj tvorba antiendotelových protilátok, ktoré sa odlišujú od iných autoprotilátok (antineutrofilových alebo anti-DNA). Existuje hypotéza, že antiendotelové protilátky rozpoznávajú limitovaný počet antigénov cievneho endotelu, indukujú uvoľnenie mediátorov pochádzajúcich z endotelu (napr. IL-1), aktivujú interakcie medzi leukocytmi a endotelovými bunkami, a tak prispievajú k patogenéze ochorení (24).

Farmakologické prístupy

Pochopenie molekulárnej úlohy endotelových buniek pri zápalu vedie k efektívnejším stratégiám liečby vážnych zápalových a imunologických ochorení. Modelové systémy zápalových ochorení *in vitro* aj *in vivo* slúžia na sledovanie jednotlivých krokov diapedézy leukocytov (kotúľanie, adhézia a migrácia), ktoré majú komplexný a viacfaktorový bunkový a molekulárny základ. Existujú tri potenciálne úrovne protizápalovej liečby, ktoré sa dotýkajú interakcie leukocytov a endotelu, a to uvoľnenie zápalových mediátorov a ich väzba s receptormi, syntéza adhezívnych molekúl a funkcia adhezívnych molekúl (19, 25).

Niektoré štúdie poukazujú na zníženie funkčnosti adhezívnych molekúl pomocou monoklonových protilátok, ktorých cieľom sú špecifické adhezívne glykoproteíny. Iný prístup, ktorý si získal pozornosť v experimentálnom prostredí, je aplikácia solubilných foriem adhezívnych receptorov, ako je napríklad sICAM-1, sialylovaný Lewisov antigén X a glykoproteínový ligand P-selektínu-1. Klinické skúšky monoklonových protilátok proti adhezívnym molekulám cievneho endotelu alebo leukocytov (napr. anti- β 1 a β 2 integrínom, anti-ICAM-1, anti-VCAM-1, anti-P- a anti-L-selektínu) priniesli kolísavý úspech pri liečbe niektorých zápalových ochorení (reumatoidnej artritídy, systémového lupus erythematosus, astmy) a v prevencii akútnej rejeckie transplantátu obličky alebo poškodenia myokardu. Potreba vyšších dávok u ľudí (v porovnaní s blokujúcimi experimentmi *in vitro*) a myši pôvod väčšiny monoklonových protilátok obmedzujú ich dlhodobější aplikáciu. Môžu vyvolať vznik antiidiotypových protilátok a iné imunitné reakcie, neutropéniu. Tento problém antigénnosti zmierňujú humanizované monoklonové protilátky (26–32).

Súčasný výskum dokazuje, že transkripčné faktory AP-1 (activation protein-1) a NF- κ B sú hlavnými terčami bežne používaných protizápalových liečiv, včítane glukokortikoidov, aspirínu, salicylátov, solí zlata a D-penicilamínu. Jedna možnosť regulácie syntézy proteínov je použitie nezmyselných („antisense“) oligonucleotidov, ktoré blokujú produkciu špecifických podjednotiek NF- κ B, a tým inhibujú expresiu adhezívnych molekúl na endoteli. Oligonukleotidové lákadlá ako ďalšia stratégia inhibície určitých zložiek zápalovej odpovede špecificky interferujú s regulačnými proteínmi (transkripčnými faktormi). Trendom farmakologických prístupov je identifikácia a charakterizácia biochemických dráh v adhezívnom procese leukocytov, a to na hladine aktivácie receptorov, biosyntézy alebo funkčnosti adhezívnych molekúl. Vývoj bezpečných a účinných terapeutických látok pre liečbu zápalových ochorení sa zameriava na jednotlivé molekulárne zložky zápalovej odpovede (19, 32–34).

Ludské endotelové bunky *in vitro*

Pôvodná publikácia kultivácie ľudských endotelových buniek *in vitro* z roku 1973 (35) ovplyvnila pohľad na úlohu endotelu. Pasívna bariéra medzi krvou a cievnu stenou sa zmenila na dynamické tkanivo, ktoré má dôležitú úlohu pri regulácii hemostázy, cievneho tonusu, angiogenézy a zápalovej odpovede. Jaffeyho originálny model izolácie endotelových buniek má vo výskume endotelu široké uplatnenie. Ludské endotelové bunky izolované z pupočníkovej cievy (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) majú zárodočný pôvod a makrovaskulárnu povahu. Ďal-

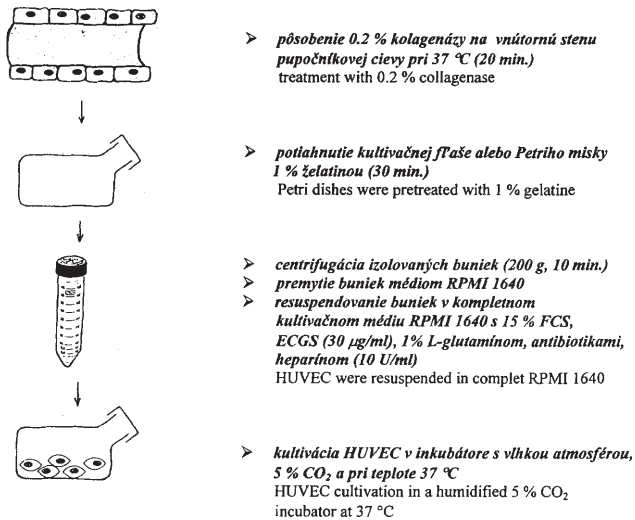


Fig. 3. Preparation of HUVEC. FCS — fetal calf serum, ECGS — endothelial cell growth supplement.

Obr. 3. Schéma izolácie HUVEC. FCS — fetálne telacie sérum, ECGS — rastový suplement pre endotelové bunky.

šími zdrojmi ľudských endotelových buniek sú časť veny sapheny získanej po srdcovom bypasse, stehnová tepna alebo pulmonálne bunky mikrovaskulárneho endotelu. Mnohé skupiny vedcov vyvíjajú okrem primárnych bunkových kultúr aj permanentné bunkové línie ľudských endotelových buniek (napr. fúziou HUVEC s ľudskou epitelovou líniou A549 alebo transformáciou ľudských endotelových buniek z kostnej drene opičím vírusom 40) (36—38).

V poslednom období prebieha masívny rozvoj bunkovej a molekulárnej biológie endotelových buniek. Sféra výskumnej aktivity kladie dôraz na štúdium zápalu, angiogenézy, transdukčných signálov a funkčnosti endotelu. Regulačná funkcia endotelu je spojená s produkciou zápalových mediátorov, ako sú IL-1 β , IL-6, IL-8 a PAF, rovnako ako expresiou adhezívnych molekúl, ktoré kontrolujú interakciu endotelových buniek a buniek cirkulujúcej krvi. Podstatná úloha expresie adhezívnych molekúl endotelu v regulácii zápalu je hlavným bodom výskumu mnohých vedeckých skupín (39, 40).

Endotel je *in vivo* vystavený konštantnému šmykovému napätiu, a preto sa venuje veľká pozornosť modifikácii prietokových podmienok *in vitro*. Dynamické systémy tzv. prietokové komôrky umožňujú štúdium funkčnosti endotelových buniek. Na sledovanie medzibunkových interakcií slúžia viaceré modely kokultúr ako vyššie formy organizácie buniek (napr. kokultúra endotelových buniek s bunkami hladkých svalov). Endotelové bunky majú významné miesto pri sledovaní funkčnosti expresie adhezívnych molekúl v blokujúcich experimentoch a pri inkorporácii génov do organizmu (napr. zvýšenie expresie génu pre syntázu oxidu dusnatého technikou génovej transfekcie) (38, 41).

V laboratóriu tkanivových kultúr (Oddelenie klinickej imunológie, ÚPKM) pripravujeme primárne bunkové kultúry izoláciou endotelových buniek z pupočníkovej cievy, ktoré využívame na sledovanie mechanizmu zmenenej adhézie imunokompetent-

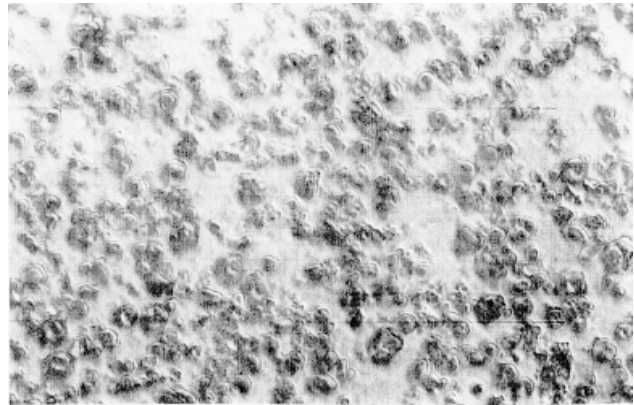


Fig. 4. Photomicrograph of 10-day old cultured HUVEC (Leitz Diavert, x126).

Obr. 4. Fotografia znázorňuje monovrstvu 10-dňovej kultúry HUVEC (Leitz Diavert, zväčš. 126-krát).

ných buniek na endotel, štúdium expresie adhezívnych molekúl pri objasňovaní patogenézy a perspektívne aj terapie zápalových ochorení (kokultúra endotelových buniek s imunokompetentnými bunkami). Zamerali sme sa na testovanie pacientov s alergickou astmou a skupinu kortikodependentných astmatikov, u ktorých sme zaznamenali významné zmeny v adhezii periférnych mononukleárných buniek (PBMK) na endotel a expresii povrchových molekúl počas liečby kromoglykátom sodným (Intal) (42, 43) alebo selénovej suplementácie (44).

Metóda izolácie a kultivácie HUVEC

Na izoláciu a kultiváciu cievnych endotelových buniek sme vypracovali modifikáciu štandardnej procedúry (35). Na vnútornú stenu pupočníkovej cievy sme nechali pôsobiť 0,2 % kolagenázu (Sigma), ktorá spôsobila uvoľnenie buniek do roztoku. Izolované bunky sme premyli kultivačným médiom RPMI 1640 a resuspendovali v RPMI 1640 obohatenom 15 % fetálnym telacím sérom, 1 % L-glutamínom, antibiotikami (penicilín 100 U/ml, streptomycín 100 µg/ml, gentamycín 2,5 µg/ml), heparínom (10 U/ml) a rastovým suplementom pre endotelové bunky (30 µg/ml, Sigma). HUVEC (optimálna koncentrácia 2.10⁵ buniek/ml) sme kultivovali v inkubátore s vlhkou atmosférou, 5 % CO₂ a pri teplote 37 °C. Prichytenie buniek a vytvorenie monovrstvy sme zabezpečili potiahnutím dna Petriho misky alebo kultivačnej fľaše 1 % roztokom želatíny (Sigma) (obr. 3). Endotelové bunky sme identifikovali na základe morfológického kritéria alebo pozitívnym farbením antiendotelovou monoklonovou protilátkou (QBEND10, Immunotech) s naviazaným fluoresceínom (FITC) a detekciou na prietokovom cytometri (Coulter Epics XL). HUVEC sú homogénne, široké (30x50 µm), polygonálneho tvaru s centrálnou uloženým jadrom a nezreteľným bunkovým ohraničením. Príklad súvislej monovrstvy 10-dňovej kultúry endotelových buniek je na obrázku 4.

V experimentoch adhézie leukocytov na endotel a modulácie expresie adhezívnych molekúl sme použili HUVEC po druhom

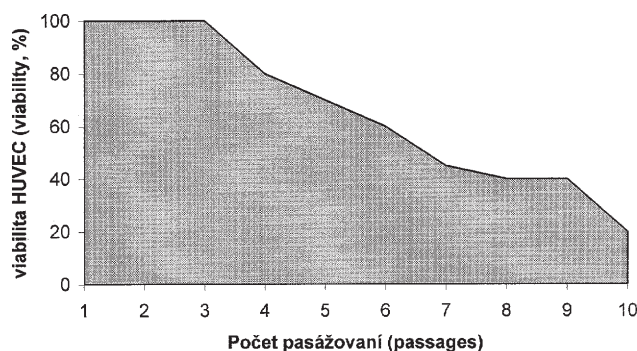


Fig. 5. Growth curve of HUVEC in vitro. Endothelial cells which were isolated from the umbilical vein grew in a confluent monolayer within one week (2 passages). Cell viability 80–100 % was preserved during 4 passages (period suitable for experiments). The HUVEC survival was gradually declined and after 24 days (6–7 passages) it was reduced to 50 %.

Obr. 5. Prežívanie HUVEC in vitro. Endotelové bunky, ktoré sme izolovali z pupočníkovej cievy, vytvorili v priebehu týždňa (2 pasážovania) súvislú monovrstvu. Bunky si zachovali 80–100 % viabilitu do štvrtého pasážovania (obdobie vhodné pre experimenty). Prežívanie HUVEC postupne klesalo a po 24 dňoch (6–7 pasážovania) sa znížilo na 50 %.

až štvrtom pasážovaní. Prežívanie HUVEC v závislosti od počtu pasážovania sme znázornili na obrázku 5. Zo súvislej monovrstvy sme bunky oddelili enzymovou cestou 0,1 % roztokom trypsinu v EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová) alebo mechanicky zoškrabovačom pre bunkové kultúry.

Záver

Výskum mechanizmov adhézie a aktivácie endotelu postupne odhaľuje nové možnosti rozvoja diagnostických a terapeutických látok. Adhéziu a migráciu leukocytov cez endotelovú bariéru sprostredkujú adhezívne molekuly, ktoré majú dôležitú úlohu pri zápalových a alergických ochoreniach. Akútny zápal je spojený s infiltráciou neutrofilov a zvýšenou expresiou E-selektínu a P-selektínu, kým pri chronickom zápale prevláda expresia ICAM-1 alebo VCAM-1. V patologických podmienkach sa zvyšuje lokálna expresia adhezívnych molekúl v tkanivách a hladiny solubilných molekúl v sére, ktoré korelujú s aktivitou ochorenia. Endotelové adhezívne molekuly slúžia ako nové diagnostické markery niektorých ochorení (systémový lupus erythematosus, vaskulitída, ateroskleróza, psoriatická artritída atď.). Stupeň aktivácie a poškodenia tkaniva určuje expresia povrchových antigénov na endoteli (napr. neinvazívne zobrazenie nádorového tkaniva antiendotelovými monoklonovými protilátkami). Vývojovým trendom nových protizápalových a imunosupresívnych liečiv je modulácia expzie povrchových molekúl alebo ich antagonistov, inhibícia niektorého kroku v migračnom procese leukocytov (konvenčné prostriedky, génová terapia) (9, 32, 45).

V súčasnosti sledujeme expresiu adhezívnych molekúl na PBMC, stanovujeme solubilné adhezívne molekuly, ako aj aktívne markery na eozinofiloch. Okrem toho pripravujeme metódy na určenie expzie adhezívnych molekúl v kokultúre HUVEC a pľnej krvi a na dôkaz antiendotelových protilátok v sére, ktoré

umožňujú monitorovanie zápalových ochorení a účinnosti liečby, a to priebežným sledovaním aktivácie endotelu *in vitro*.

Literatúra

- Cain B.S., Meldrum D.R., Selzman C.H., Cleveland J.C., Meng X., Sheridan B.C., Banerjee A., Harken A.: Surgical implications of vascular endothelial physiology. *Surgery*, 122, 1997, s. 516–526.
- Krishnaswamy G., Kelley J., Yerra L., Smith J.K., Chi D.S.: Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J. Interferon Cytokine Res.*, 19, 1999, s. 91–104.
- Schiffirin E.L.: The endothelium and control of blood vessel function in health and disease. *Clin. Invest. Med.*, 17, 1994, s. 602–620.
- Štvrtinová V., Ferenčík M., Hulín I., Jahnová E.: Cievny endotel ako operátor prenosu informácií medzi kardiovaskulárnym a imunitným systémom. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 5–19.
- Dart A.M., Chin-Dusting J.P.F.: Lipids and the endothelium. *Cardiovasc. Res.*, 43, 1999, s. 308–322.
- Horváthová M.: Adhezívne molekuly v interakciách leukocytov a endotelu. *Bratisl. lek. Listy*, 96, 1995, s. 217–222.
- Topper J.N., Gimbrone M.A.: Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today*, 1999, Januar, s. 40–46.
- Etzioni A.: Adhesion molecules in host defense. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1, 1994, s. 1–4.
- Etzioni A.: Adhesion molecules — their role in health and disease. *Pediatr. Res.*, 39, 1996, s. 191–198.
- Faull R.J.: Adhesion molecules in health and disease. *Aust. NZ J. Med.*, 25, 1995, s. 720–730.
- Mantovani A., Bussolino F., Introna M.: Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol. Today*, 18, 1997, s. 231–240.
- Gimbrone M.A., Nagel T., Topper J.N.: Biochemical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J. Clin. Invest.*, 99, 1997, s. 1809–1813.
- Yamaguchi H., Ishii E., Tashiro K., Miyazaki S.: Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis. *Leukemia Lymphoma*, 31, 1998, s. 61–69.
- Repo H., Harlan J.M.: Mechanisms and consequences of phagocyte adhesion to endothelium. *Ann. Med.*, 31, 1999, s. 156–165.
- Briscoe D.M., Alexander S.I., Lichtman A.H.: Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 1998, s. 525–531.
- Walsh K., Sata M.: Is extravasation a Fas-regulated process? *Mol. Med. Today*, 1999, February, s. 61–67.
- Pitzalis C.: Adhesion and migration of inflammatory cells. *Clin. Exp. Rheum.*, 11, 1993, Suppl. 8, s. S71–S76.
- Imhof B.A., Dunon D.: Basic Mechanism of leukocyte migration. *Horm. Metab. Res.*, 29, 1997, s. 614–621.
- Panéš J., Perry M., Granger D.N.: Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Brit. J. Pharmacol.*, 126, 1999, s. 537–550.

20. **Kevil Ch.G., Bullard D.C.:** Roles of leukocyte/endothelial cell adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis. *Amer. J. Med.*, 106, 1999, s. 677—687.
21. **Lehoux S., Tedgui A.:** Signal transduction of mechanical stress in the vascular wall. *Hypertension*, 32, 1998, s. 338—345.
22. **Winn R., Vedder N., Ramamoorthy Ch., Sharar S., Harlan J.:** Endothelial and leukocyte adhesion molecules in inflammation and disease. *Blood Coag. Fibrinol.*, 9, 1998, Suppl. 2, s. S17—S23.
23. **Shimokawa H.:** Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31, 1999, s. 23—37.
24. **Carvalho D., Savage C.O.S., Isenberg D., Pearson J.:** IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine manner. *Arthr. Rheum.*, 42, 1999, s. 631—640.
25. **Diáz-González F., Sánchez-Madrid F.:** Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunol. Today*, 19, 1998, s. 169—172.
26. **Sfikakis P.P., Charalambopoulos D., Vayiopoulos G., Oglesby R., Sfikakis P., Tsokos G.C.:** Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 12, 1994, s. 5—9.
27. **Oppenheimer-Marks N., Lipsky P.E.:** Adhesion molecules as targets for the treatment of autoimmune diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 79, 1996, s. 203—210.
28. **Le Mauff B., Le Meur Y., Hourmant M., Debray M., Boefard F., Alberici G., Souillou J.P., Scherrmann J.M.:** A dose-searching trial of an anti-LFA-1 monoclonal antibody in first kidney transplant recipients. *Kidney Intern.*, 49, 1996, Suppl. 53, s. S44—S50.
29. **Nishimura Y., Takei Y., Kawano S., Goto M., Nagano K., Tsuji S., Nagai H., Ohmae A., Fusamoto H., Kamada T.:** The F(ab)₂ fragment of an anti-ICAM-1 monoclonal antibody attenuates liver injury after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 61, 1996, s. 99—104.
30. **Cavazzana-Calvo M., Bordigoni P., Michel G., Esperou H., Souillet G., Leblanc T., Stephan J.L., Vannier J.P., Mechinaud F., Reiffers J., Vilmer E., Landman-Parker J., Benkerrou M., Baruchel A., Pico J., Bernaudin F., Bergeron C., Plouvier E., Thomas C., Wijdenes J., Lacour B., Blanche S., Fischer A.:** A phase II trial of partially incompatible bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukaemia in children: prevention of graft rejection with anti-LFA-1 and anti-CD2 antibodies. *Brit. J. Haematol.*, 93, 1996, s. 131—138.
31. **Kootstra C.J., Van der Giezen D.M., Van Krieken J.H.J.M., De Heer E., Bruijn J.A.:** Effective treatment of experimental lupus nephritis by combined administration of anti-CD11a and anti-CD54 antibodies. *Clin. Exp. Immunol.*, 108, 1997, s. 324—332.
32. **Mojcik Ch.F., Shevach E.M.:** Adhesion molecules. A rheumatologic perspective. *Arthr. Rheum.*, 40, 1997, s. 991—1004.
33. **Lee J.I., Burckart G.J.:** Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.*, 38, 1998, s. 981—993.
34. **Xia L., Pan J., Yao L., McEver R.P.:** A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood*, 91, 1998, s. 1625—1632.
35. **Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R.:** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.*, 52, 1973, s. 2745—2756.
36. **Johnson A.R.:** Human pulmonary endothelial cells in culture. *J. Clin. Invest.*, 65, 1980, s. 841—850.
37. **Muller A.M., Cronen C., Muller K.M.:** Comparative analysis of the reactivity of human umbilical vein endothelial cells in organ and monolayer culture. *Pathobiology*, 67, 1999, s. 99—107.
38. **Kirkpatrick C.J., Otto M., Van Kooten T., Krump V., Kriegsmann J., Bittinger F.:** Endothelial cell cultures as a tool in biomaterial research. *Mater. Med.*, 10, 1999, s. 589—594.
39. **Senden N.H.M., Jeunhomme T.M.A.A., Heemskerk J.W.M., Wagenvoort R., Veer C., Hemker H.C., Buurman W.A.:** Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J. Immunol.*, 161, 1998, s. 4318—4324.
40. **Herlaar E., Brown Z.:** p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol. Med. Today*, 5, 1999, s. 439—447.
41. **Gimbrone M.A.:** Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Amer. J. Pathol.*, 155, 1999, s. 1—5.
42. **Horváthová M., Podivínský F., Gazdík F., Jahnová E.:** Effect of disodium cromoglycate treatment on peripheral blood mononuclear cell adhesion to cultured endothelium in allergic asthmatics. *Physiol. Res.*, 47, 1998, s. 445—451.
43. **Jahnová E., Horváthová M., Gazdík F.:** Expression of adhesion molecules and effect of disodium cromoglycate treatment in asthmatics. *Physiol. Res.*, 47, 1998, s. 439—443.
44. **Horváthová M., Jahnová E., Gazdík F.:** Effect of selenium supplementation in asthmatic subjects on the expression of endothelial cell adhesion molecules in culture. *Biol. Trace Element Res.*, 69, 1999, s. 15—26.
45. **Gimbrone M.A.:** Vascular endothelium in health and disease. S. 49—61. In: Haber E. (Ed.): *Molecular cardiovascular medicine*. New York, Scientific American Medicine 1995.

Received May 2, 2000.

Accepted June 16, 2000.