

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA OMAN

VPLIV VNETNIH DEJAVNIKOV NA IZRAŽANJE
6-KETO PROSTAGLANDINA F1 ALFA V HUMANIH ENDOTELIJSKIH CELICAH

INFLUENCE OF INFLAMMATION FACTORS ON THE EXPRESSION OF
6-KETO PROSTAGLANDIN F1 ALPHA IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl. Laboratorijsko delo sem opravljal v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo Kliničnega centra, Ljubljana. Naloga predstavlja del večjega EU projekta Marie Curie-International Reintegration Grant MC-IRG #028414.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm. in somentorici dr. Snežni Sodin-Šemrl za strokovno pomoč in nasvete pri diplomskem delu ter vsem ostalim, ki so mi pomagali pri nastanku diplomske naloge.

Zahvaljujem se moji družini, ker so mi omogočili študij in me med njim podpirali ter mi pomagali. Še posebej pa se zahvaljujem moji Špeli za vso oporo, ki sem je bil deležen.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm. ter somentorice dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Diplomantov lastnoročni podpis

1. Vsebina

1.	Vsebina	1
2.	Povzetek	5
3.	Abstract.....	6
4.	Seznam okrajšav	7
5.	Uvod	9
5.1.	Hemostaza	9
5.1.1.	Koagulacija.....	9
5.1.2.	Tromboza	10
5.2.	Vnetje in vnetni odziv	10
5.2.1.	Akutno vnetje	11
5.2.2.	Kronično vnetje	12
5.3.	Transkripcijski faktorji	12
5.3.1.	NF- κ B kot eden pomembnejših vnetnih transkripcijskih faktorjev	12
5.4.	Prostaglandini	13
5.4.1.	Sinteza prostaglandinov.....	13
5.4.2.	Prostaciklin	15
5.4.3.	Učinki prostaciklina.....	16
5.4.4.	Razgradnja prostaciklina	17
5.5.	Endotelijske celice.....	17
5.6.	Stimulatorji vnetja	18
5.6.1.	Serumski amiloid A	18
5.6.2.	Interlevkin-1 β	18
5.7.	Inhibitorji vnetja	19
5.7.1.	Lipoksin A ₄	19

5.7.2.	Ekstrakt črnega čaja.....	19
5.7.3.	Resveratrol.....	20
5.8.	Orodja za študij vnetnega odziva na molekulsko-celični ravni.....	21
5.8.1.	Encimsko imunski test na trdnem nosilcu.....	21
5.8.2.	Metoda zamika elektroforezne mobilnosti.....	22
5.8.2.1.	Izolacija nuklearnih ekstraktov.....	22
5.8.2.2.	Določanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo.....	23
5.8.2.3.	Vezava biotina.....	23
5.8.2.4.	Elektroforeza.....	23
5.8.2.5.	Prenos na membrano.....	24
5.8.2.6.	Prečno premreženje.....	24
5.8.2.7.	Detekcija z luminolom.....	24
6.	Namen dela.....	25
7.	Materiali in metode.....	26
7.1.	Materiali.....	26
7.1.1.	Biološki material.....	26
7.1.2.	Reagenti.....	27
7.1.3.	Aparature in ostali material.....	29
7.2.	Metode.....	30
7.2.1.	Stimulacija celic.....	30
7.2.2.	Shranjevanje supernatantov.....	31
7.2.3.	Kompetitivni encimsko imunski test.....	32
7.2.3.1.	Predpriprava (6-keto prostaglandin F _{1α} EIA ELISA).....	32
7.2.3.2.	Priprava vzorca, standarda in specifičnih reagentov.....	32
7.2.3.3.	Nanos na ploščo.....	33
7.2.3.4.	Razvijanje plošče.....	34

7.2.3.5.	Branje plošče	35
7.2.3.6.	Rezultati.....	35
7.2.3.7.	Obdelava rezultatov	35
7.2.4.	Metoda zamika elektroforezne mobilnosti	37
7.2.4.1.	Izolacija nuklearnih ekstraktov.....	39
7.2.4.2.	Določanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo.....	40
7.2.4.3.	Vezava biotina	41
7.2.4.4.	Elektroforeza	44
7.2.4.5.	Prenos na membrano	45
7.2.4.6.	Prečno premreženje	45
7.2.4.7.	Detekcija z luminolom	46
8.	Rezultati.....	47
8.1.	Določanje koncentracije izločenega 6-keto prostaglandina $F_{1\alpha}$ iz primarnih endotelijskih celic.....	47
8.1.1.	Odvisnost izločanja 6-keto prostaglandina $F_{1\alpha}$ od koncentracije stimulatorja 47	
8.1.2.	Vpliv etanola na primarne humane endotelijske celice.....	48
8.1.3.	Vpliv lipoksina A_4 na primarne humane endotelijske celice	49
8.1.4.	Vpliv ekstrakta črnega čaja na primarne humane endotelijske celice	51
8.1.5.	Vpliv resveratrola na primarne humane endotelijske celice.....	52
8.2.	Določevanje NF- κ B z uporabo testa zamika elektroforezne mobilnosti.....	54
8.2.1.	Postavitev in testiranje metode	54
8.2.2.	Optimizacija metode.....	55
9.	Razprava.....	58
9.1.	Določevanje vplivov stimulatorjev in inhibitorjev na izločanje prostaciklina v primarnih humanih endotelijskih celicah	58

9.2.	Določevanje NF- κ B z uporabo metode zamika elektroforezne mobilnosti	62
10.	Sklep	65
11.	Literatura	67

2. Povzetek

Prostaciklin (PGI_2), z drugim imenom tudi prostaglandin I_2 , spada v družino prostaglandinov, derivatov arahidonske kisline. Odkrit je bil leta 1976. Je močan vazodilatator, inhibitor koagulacije trombocitov, pomemben pa je tudi njegov vpliv na vnetne procese. Namen mojega diplomskega dela je bil ugotoviti vplive serumskega amiloida A in interleukina- 1β kot potencialnih stimulatorjev vnetja, ter lipoksina A_4 , ekstrakta črnega čaja in resveratrola kot potencialnih inhibitorjev vnetja na izločanje PGI_2 v različnih endotelijskih celicah. Primerjali smo izločanje PGI_2 iz endotelijskih celic humane umbilikalne vene, koronarne arterije in dermalne mikrovaskularne endotelijske celice. Za ugotavljanje izločanja PGI_2 smo uporabili encimsko imunsko metodo, s katero smo določili koncentracijo izločenega razpadnega produkta PGI_2 6-keto prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$. Ugotovili smo, da tako serumski amiloid A kot tudi interleukin- 1β koncentracijsko povečata izločanje PGI_2 v primarnih endotelijskih celicah. Interleukin- 1β ($2 \mu\text{g/l}$) je izzval 5x večje izločanje PGI_2 pri endotelijskih celicah umbilikalne vene kot pri celicah koronarne arterije, medtem ko je serumski amiloid A ($2 \mu\text{M}$) izzval skoraj enako visoko izločanje PGI_2 pri obeh celičnih tipih. Mikrovaskularne endotelijske celice so izločale najmanjše količine PGI_2 . Ugotovili smo, da lipoksin A_4 ni imel večjega vpliva na izločanje PGI_2 , medtem ko se je ob dodatku ekstrakta črnega čaja izločanje povečalo na vseh treh celičnih tipih. Ravno obraten vpliv je imel resveratrol, ki je deloval kot močan inhibitor.

NF- κB je transkripcijski faktor, ki regulira vnetne dejavnike. Zanimalo nas je, ali serumski amiloid A stimulira NF- κB v endotelijskih celicah humanih koronarnih arterij. V prvi stopnji smo nameravali postaviti kemiluminiscenčno metodo zamika elektroforezne mobilnosti ter jo testirati. Izvedla se je izolacija nuklearnih ekstraktov ter z Bradfordovo metodo določitev koncentracije nuklearnih proteinov. Dvovijačni NF- κB oligonukleotid je bil označen z biotinom ter inkubiran skupaj z nuklearnimi ekstrakti, pridobljenimi iz različnih tipov primarnih humanih endotelijskih celic. Tako dobljene komplekse proteinov in DNA smo nanесли na ne-denaturirajoči poliakrilamidni gel. Po elektroforezi smo prenesli kompleks na membrano in ga detektirali z luminolom. Ugotovili smo, da je bila označitev NF- κB oligonukleotida največ 50%. Na gelu ni bilo ostankov proteinov po označitvi z Coomassiejevim briljantnim modrilom. Na membrani smo po barvanju s Ponceoujevim rdečilom zaznali prisotne proteine. Zaključili smo z optimizacijo pogojev metode.

3. Abstract

Prostacyclin (PGI₂), also known as prostaglandin I₂, is a member of prostaglandin family. It is a derivative of arachidonic acid and was discovered in 1976. PGI₂ is a potent vasodilator and inhibitor of platelet aggregation with an important inflammatory role. The purpose of this work was to study the influence of serum amyloid A and interleukin-1 β as potential stimulators of inflammation, and lipoxin A₄, black tea extract and resveratrol as potential inhibitors of inflammation on the release of PGI₂ from different types of endothelial cells. We have compared the release of PGI₂ from human umbilical vein endothelial cells, human coronary artery endothelial cells and human microvascular endothelial cells (dermal origin). We used a competitive ELISA that was modified to detect 6-keto prostaglandin F_{1 α} . We have found that serum amyloid A, as well as interleukin 1 β , increases PGI₂ secretion in endothelial cells in a concentration dependant manner. Our findings show that released PGI₂ from human umbilical vein endothelial cells after stimulation with interleukin 1 β (2 μ g/l) is 5 fold greater than from coronary artery endothelial cells. Following serum amyloid A (2 μ M) treatment of cells, the levels of released PGI₂ was very similar in both cell types. Microvascular endothelial cells released by far the lowest levels of PGI₂. Furthermore, our findings show that lipoxin A₄ does not modulate secretion of PGI₂, black tea extract increases the release of PGI₂ and resveratrol potently inhibits the secretion of PGI₂ from all three used cell types.

NF- κ B is a transcription factor that regulates inflammatory mediators. Our intent was to determine the impact of serum amyloid A on NF- κ B DNA binding in human coronary artery endothelial cells. In the first phase, our goal was to set-up the electrophoretic mobility shift assay and test it. We isolated nuclear extracts from stimulated cells and with the Bradford assay determined the concentration of nuclear extracted proteins. We labeled the double-stranded NF- κ B oligonucleotide with biotin and incubated it with the previously isolated nuclear extracts. The protein-DNA complex was run on a non-denaturing PAGE gel, followed by the transfer of the complex, after electrophoresis, onto a nylon membrane and detection with luminol. Our measurements showed that the labeling was lower than 50%. There were no remaining proteins on the gel after blotting (detection with Comassie brilliant blue). Proteins were detected on the membrane after blotting (detection with Ponceau Red). Optimization of the assay was performed.

4. Seznam okrajšav

5-HETE	5-hidroksieikozatetraenojska kislina
5-HT	5-hidroksitriptamin
6-keto PGF _{1α}	6-keto prostaglandin F _{1α}
ADP	adenozindifosfat
BTE	ekstrakt črnega čaja (black tea extract)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
cGMP	ciklični gvanozinmonofosfat
COX	ciklooksigenaza
cPLA ₂	citosolska fosfolipaza A ₂
DNA	deoksinukleinska kislina
ELISA	encimsko imunski test na trdnem nosilcu (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMSA	metoda zamika elektroforezne mobilnosti (electrophoretic mobility shift assay)
HCAEC	endotelijske celice humane koronarne arterije (Human Coronary Artery Endothelial Cell)
HHT	12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienojska kislina
HIV	virus pomanjkljive imunske odpornosti (human immunodeficiency virus)
HMVEC	humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice (Human Microvascular Endothelial Cell – Dermal)
HRP	hrenova peroksidaza (horseradish peroxidase)
HTT	12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienojska kislina
HUVEC	endotelijske celice humane umbilikalne vene (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)
IFN-γ	interferon gama
Ig	imunoglobulin
IgE	imunoglobulin E
IL	interlevkin
IL-1β	interlevkin 1 beta
LDL	nizkogostotni lipoprotein (low density lipoprotein)
LT	levkotrieni
LXA ₄	lipoksin A ₄
MDA	melondialdehid

MIF	makrofagni vnetni protein
MMP	matrična metaloproteinaza
NF- κ B	nuklearni faktor κ B
oLDL	oksidirani LDL
PAF	trombocitni aktivacijski faktor (platelet activation factor)
PG	prostaglandin
PGG ₂	PG endoperoksid
PGI ₂	prostaglandin I ₂ – prostaciklin
PPAR	perinuklearni peroksisinski proliferacijski receptor
RSV	resveratrol
SAA	serumski amiloid A
SRS	počasi delujoča anafilaktična snov (slow reacting substance of anaphylaxis)
TdT	terminalna deoksinukleotidilna transferaza (terminal deoxynucleotidyl transferase)
TF	tkivni faktor
TFPI	inhibitor sintezne poti tkivnega faktorja
TIMP (1, 3)	tkivni inhibitor metaloproteinaz
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor
TX	tromboksan

5. Uvod

5.1. Hemostaza

Hemostaza je proces, s katerim organizem preprečuje izgubo krvi pri poškodbi žile (1). Poteka med beljakovinami v krvi (faktorji in zaviralci koagulacije) in žilni steni (tkivni faktor, tkivni aktivator plazminogena), med celičnimi elementi v krvi (trombociti) in žilni steni (endotelijske celice). Do sprožitve procesov hemostaze običajno pride ob poškodbi žilne stene (2). Pri tem pride do primarne reakcije skrčenja žilne stene, prilepljanjem trombocitov nanjo, nastankom trombocitnega strdka, nastanek trombina ter fibrinskih niti, ki povežejo in učvrstijo trombocitni strdek. Širjenje strdka, fibrinolizo in v končni fazi razgradnjo strdka sprožijo zaviralci koagulacije (sekundarna koagulacija) (1, 2).

Motnje hemostaze lahko povzročijo prepočasno ali prehitro strjevanje krvi. Zaradi prepočasnega strjevanja krvi pride do podaljšanega časa krvavitve. Krvavitev je lahko površinska (v kožo ali sluznico) ali notranja (v telesne votline). Prirojene motnje so posledica pomanjkanja ene beljakovine (hemofilija A je posledica pomanjkanja faktorja VIII, hemofilija B pa faktorja IX). Motnje, ki se odražajo v prehitrem strjevanju krvi in vodijo do nastanka strdka, so posledica različnih bolezenskih stanj ali načina življenja. Strdek, ki pri tem nastane, delno ali v celoti zapre žilo in s tem oteži ali onemogoči pretok krvi v oziroma iz organov ali okončin (2).

5.1.1. Koagulacija

V krvi so našli (1) več kot 50 različnih substanc, ki vplivajo na koagulacijo krvi. Nekateri dejavniki (prokoagulanti) jo povzročajo, drugi (antikoagulanti) jo preprečujejo. Kako bo prišlo do koagulacije krvi, je odvisno od razmerja med omenjenima skupinama. V toku krvi običajno prevladujejo antikoagulanti, ob poškodbi žilne stene pa se na tem mestu poveča delež prokoagulantov, kar povzroči nastanek strdka.

Pri tem pride do številnih reakcij, ki jih v grobem lahko delimo na:

- 1) kaskadno reakcijo koagulacijskih faktorjev, do katere pride kot odziv na poškodbo žile in ima za produkt spojine, ki jih s skupnim imenom imenujemo aktivator protrombina
- 2) aktivator protrombina katalizira reakcijo med protrombinom in trombinom

- 3) trombin deluje kot encim in pretvori fibrinogen v fibrinska vlakna, v katera se vgradijo trombociti, krvne celice in plazma ter tvorijo strdek (1).

5.1.2. Tromboza

Trombus je nenormalen strdek, ki se razvije v ožilju. Ko se razvije, ga lahko stalen tok krvi odtrga od mesta pritrditve in nese s seboj po žili. Prosto plavajoč trombus se imenuje embolus. Embolus, ki nastane v velikih arterijah, potuje v periferijo, kjer lahko zamaši arterije ali arteriole v možganih ali ledvicah. Embolus, ki nastane v venskem sistemu, potuje v pljuča in lahko povzroči pljučno arterijsko embolijo.

Do trombo-emboličnega stanja pri človeku običajno pride zaradi:

- 1) hrapavosti endotelijske površine žile (ki je lahko posledica poškodbe, infekcije ali arterioskleroze)
- 2) počasnega toka krvi skozi žile (1, 3)
- 3) nenormalnega strjevanja krvi (3).

Ker do nastanka strdka pride skoraj vedno, ko je tok krvi ustavljen za več ur, se pogosteje pojavlja pri ležečih pacientih ter pri podlaganju kolen z blazinami, kar privede do zastoja venske krvi v nogah za več ur. Nastali strdek se lahko odtrga s podlage vene in prosto plava v smeri toka krvi.

Mehanizem strjevanja krvi je lahko aktiviran tudi v širšem območju krvnega obtoka, kar imenujemo razsejano intravaskularno strjevanje. Pojav je posledica obsežnega področja poškodovanega ali umirajočega tkiva. Trombi so majhni, a številni in zaprejo veliko število majhnih površinskih žil, kar zmanjša pretok kisika in hranil v tkiva (1).

5.2. Vnetje in vnetni odziv

Vnetje je zaporedje različnih pojavov, ki omogočajo obrambo pred infekcijo, celjenje ran, lahko pa so tudi odziv na fizično travmo. Pri tem pride do sprememb mikrovaskularizacije, kopičenja fagocitov, obnove tkiva in odstranitve škodljivih snovi. Končni rezultat vnetja je sproženje imunskega odziva ali očiščenje tkiva pred vsiljivci (4).

Vnetni odziv vključuje tri stopnje, ki so: vazodilatacija (povečan pritok krvi na prizadeto področje), povečana kapilarna prepustnost ter prehod fagocitov iz kapilar v tkivo skozi endotelijske celice (4, 5). Ločimo akutno in kronično vnetje (5).

5.2.1. Akutno vnetje

Akutno vnetje običajno nastane ob poškodbi tkiva. Zanj je značilen hiter odziv (do njega pride v nekaj minutah). Običajno je lokalizirano. Simptomi so: rdečina, vročina, oteklina, bolečina in posledično izguba funkcije (4).

V prvih nekaj minutah po poškodbi pride do razširitve ožilja. Zaradi povečanega dotoka krvi v tkiva se pojavijo prvi simptomi vnetja – rdečina in vročina. Krčenje sfinktrov venul, ki je posledica delovanja kemičnih mediatorjev (Preglednica I), predvsem bradikina in fibrinopeptidov, poveča pritisk v venulah in kapilarah ter zmanjša pretok krvi. Zaradi zastajanja krvi pride do hipoksije in acidoze, pri čemer se predvsem pri postkapilarnih venulah poveča prepustnost endotelija za beljakovine plazme in prehajanje tekočin iz tkiv. Posledica izstopanja beljakovin iz plazme v zunajžilni prostor je povečan pretok limfe. Pojavi se tudi nabrekanje in pordečitev tkiva (5).

Preglednica I: Prikaz najpomembnejših mediatorjev vnetja (5)

Ime	Delovanje
bradikinin	širi žile, poveča njihovo prepustnost in povzroča bolečino
histamin	širi žile, poveča njihovo prepustnost, spazmogen in povzroča kemokinezo
PAF	spazmogen, aktivira nevtrofilce, poveča prepustnost ožilja, sprošča trombocitni faktor
eikosanoidi	spreminjajo učinke drugih vazoaktivnih mediatorjev
PGE ₂	širi žile, okrepi učinek histamina, C5a in LTB ₄
PGI ₂	širi žile, blokira agregacijo trombocitov in krčenje bronhusov
TXA ₂	krči žile, povzroča agregacijo trombocitov in krči bronhuse
LTB ₄	kemotaksa makrofagov in nevtrofilcev, poveča prepustnost žil
IL-1, IL-6	pirogena, spodbudita nastanek proteinov akutne faze, aktivirata celice T
TNF- α	spodbudi endotelijske adhezijske molekule, citotoksičen učinek
limfotoksin	Fibroza
INF- γ	aktivacija makrofagov in celic K, spreminjanje vnetja
C3a, C5a	spazmogena, degranulirata mastocite, kemotaksa s C5a, povečata prepustnost žil

Po nekaj urah pride do prilepljanja nevtrofilcev na endotelijske celice, nato pa njihovo izstopanje skozi medcelične prostore v tkivo, kjer se pričnejo kopičiti. V primeru, da vzrok vnetja ni poškodba ampak okužba, pričnejo makrofagi fagocitirati prisotne patogene mikroorganizme. Sproščajo se tudi mediatorji vnetja, še posebej makrofagna vnetna proteina 1 α in 1 β (MIP-1 α in MIP-1 β), ki privabljata makrofage (sta kemokina in

povzročata kemotakso). Makrofagi so aktivirane celice, ki fagocitirajo mikrobo in izločajo mediatorje in citokine (IL-1, IL-6, TNF- α). Sproščajo tudi litične encime, ki lahko okvarijo sosednje, sicer zdrave in nepoškodovane celice. Pri obnovi s fagocitozo in lizo celic poškodovanega tkiva učinkovito sodeluje TNF- β (5).

5.2.2. Kronično vnetje

Kronično vnetje se razvije, ko je tujek (antigen) zaradi upiranja fagocitozi dolgo časa prisoten v organizmu. Trdoživost je lahko posledica posebnih komponent celične stene, ki jih imajo nekateri mikroorganizmi. Kronično vnetje je lahko tudi avtoimunskega izvora ali pa posledica določenih tipov raka. Zanj je značilno kopičenje in aktivacija makrofagov, ki sproščajo citokine. Citokini, predvsem IFN- γ , ki aktivira makrofage in TNF- α , spodbujajo razmnoževanje fibroblastov in nastanek kolagena. Pri tem pride do razvoja fibroze, ki ovira normalno funkcijo tkiva. Sledi nastanek granuloma, tumorju podobne gmote. V granulomu se v središču nahajajo večjedrne celice velikanke, ki nastanejo z zlitjem aktiviranih makrofagov. Obdajajo jih epiteloidne celice, kakor imenujemo velike spremenjene makrofage, ki so podobni epitelijem celicam (5).

5.3. Transkripcijski faktorji

Transkripcijski faktorji so proteini. So odgovorni za uravnavanje ekspresije genov prek specifične vezave na promotor in enhancer (ojačevalec) na genu (6). Za vnetje sta najbolj pomembna AP-1 in NF- κ B (7).

5.3.1. NF- κ B kot eden pomembnejših vnetnih transkripcijskih faktorjev

Nuklearni faktor NF- κ B, odkrit leta 1986, je eden izmed pomembnejših transkripcijskih faktorjev (6). V fiziološki vlogi vpliva na imunski in vnetni odgovor, konstitutivno aktivacijo pa so našli tudi pri številnih oblikah raka, kardiovaskularnih boleznih, diabetesu in kroničnem vnetju (6, 8). Družina NF- κ B/Rel, ki uravnava imunski in vnetni odgovor, je sestavljena iz petih članov: NF- κ B p50, NF- κ B p52, p65 (RelA), RelB in c-Rel (6, 8). Aktivni na DNA vezoči kompleks NF- κ B/Rel družine se veže na κ B mesto (5'-GGGPuNNPyPyCC-3'), kjer je N katerikoli nukleotid, Pu je purin, Py je pirimidin (6).

Aktivacijo NF- κ B sestavljata dve fazi; sprostitev selektivnega NF- κ B kompleksa iz inhibitorja in premestitve NF- κ B kompleksa v nukleus in aktivacija tarčnega gena (6). V

neaktivni obliki se NF- κ B nahaja v citosolu vezan na inhibitorni κ B protein (I κ B) (7, 8). Ob stimulaciji je inhibitorni κ B protein fosforiziran, sproščen z NF- κ B in razgrajen (7). NF- κ B se po ločitvi iz I κ B prenese v jedro, kjer aktivira gensko transkripcijo (7). Pri tem se veže na značilno DNA sekvenco v specifičnih genih (7).

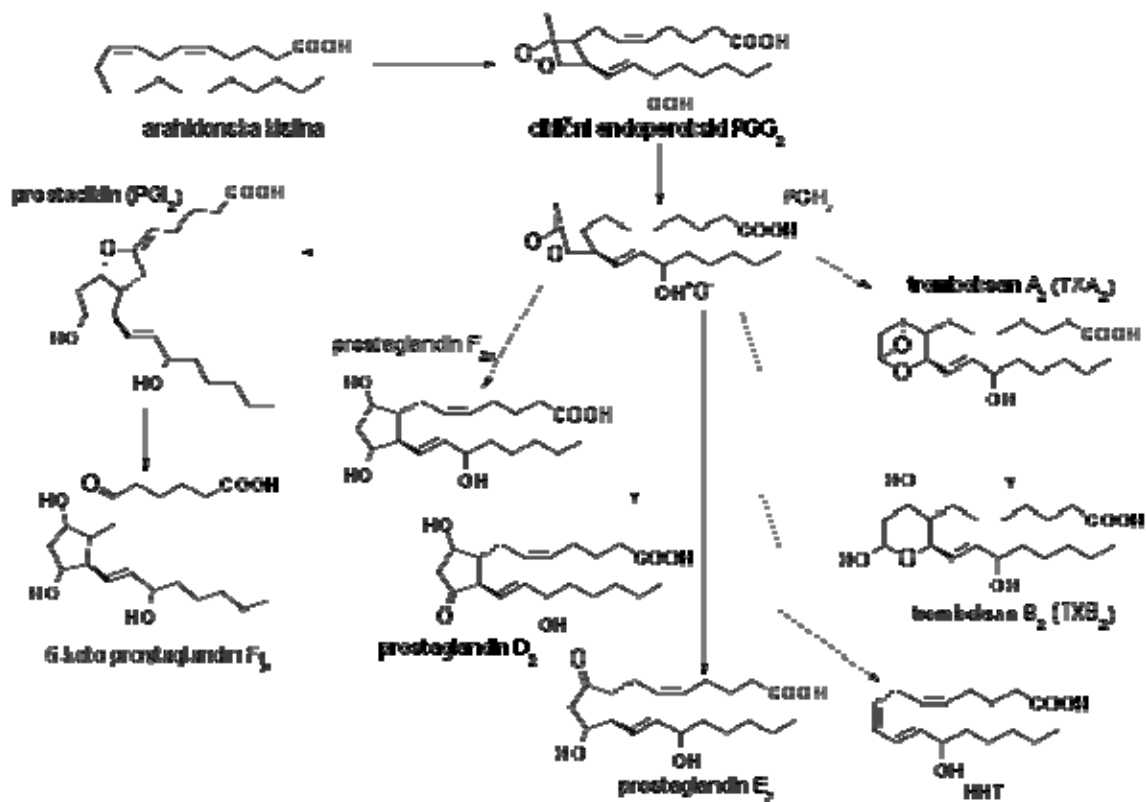
5.4. Prostaglandini

Prostaglandini so bili odkriti že pred 70 leti. Tedaj se je pričelo raziskovanje njihove biokemije, metabolnih poti in fiziološke vloge v različnih delih organizma. Gre za družino nenasičenih maščobnih kislin C₂₀, ki se sintetizirajo iz številnih esencialnih maščobnih kislin. Najpomembnejši prekursor je arahidonska kislina, ki je pomembna sestavina celičnih membran (9).

Arahidonska kislina je najpogostejša maščobna kislina, prisotna v celičnih fosfolipidih. V telo jo lahko dobimo neposredno iz hrane ali pa z nenasičenjem in podaljševanjem verige linolne kisline. Stimulacija arahidonske kisline povzroči tvorbo prostaglandinov, katerih proizvedena količina se razlikuje med posameznimi celičnimi tipi (10).

5.4.1. Sinteza prostaglandinov

Arahidonska kislina se ob delovanju fosfolipaz odcepi od fosfolipidne membrane (Slika 1). Po odcepu jo metabolizirata dva encima: prostaglandin G/H sintaza (ciklooksigenaza) (10, 11) ter lipoksigenaza. Prva iz arahidonske kisline tvori prostaglandinski endoperoksid (PGG₂), nestabilno spojino, ki se pretvori v PGH₂ (11). PGH₂ encimsko ali neencimsko izomerizira do stabilnih PGE₂, PGF₂ in PGD₂. Pri tem nastaja tudi 12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienojska kislina (HHT) in melondialdehid (MDA). Lipoksigenaze iz arahidonske kisline tvorijo lipoksine in levkotriene (10).



Slika 1: Prikaz sinteze prostaglandinov iz arahidonske kisline (10).

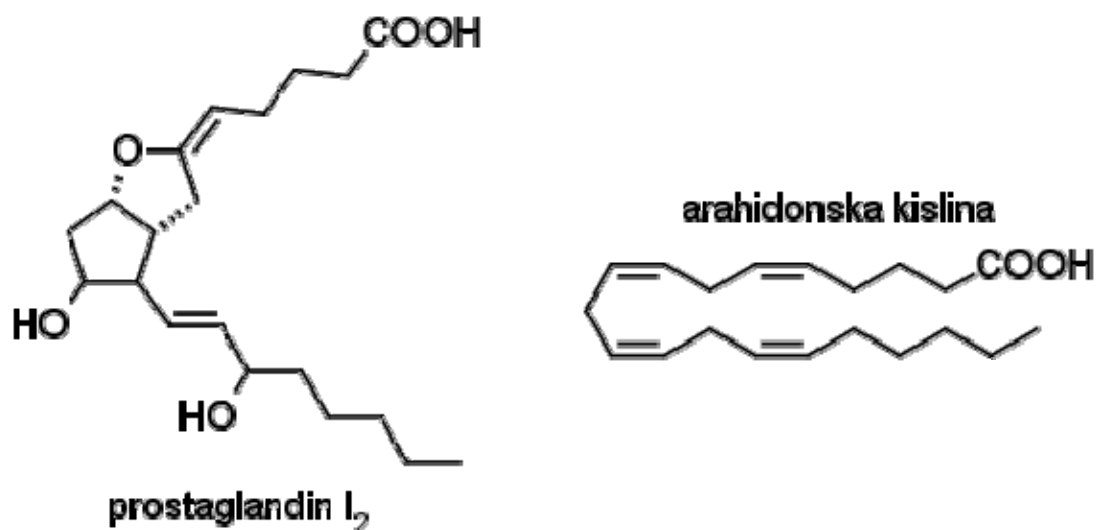
Ciklooksigenazno aktivnost povzročata dva različna genska produkta, COX-1 in COX-2. COX-1 se stalno izraža v večini tkiv in sprošča prostaglandine, ki sodelujejo v t.i. vzdrževalnih procesih, kot sta na primer gastrointestinalna integriteta in vaskularna homeostaza. COX-2 se pojavlja predvsem v monocitih, makrofagih, nevtrofilnih granulocitih in endotelijskih celicah. Med njegove spodbujevalce spadajo lipopolisaharidi, rastni faktorji, citokini in forbolni estri, inhibitorji pa so glukokortikoidi, protivnetni citokini in interleukina 10 in 4. Iz tega lahko sklepamo, da COX-2 skrbi za višek prostanooidov, do katerega pride ob vnetnih procesih (11, 12). Poleg omenjenih dveh COX-1 in COX-2 poznamo tudi COX-3, ki je verjetno aktivnejša v zaključni stopnji vnetnega odziva, a je še zelo neraziskana (12).

Endotelijske celice, gladke mišične celice in fibroblasti imajo vsi sposobnost sintetizirati PGI₂, ker imajo endoperoksidne prekursorje, potrebne za to sintezo (9). Prostaglandinske endoperoksidaze se encimsko pretvorijo v dva nestabilna produkta: prostaciklin (PGI₂) in tromboksan A₂ (TXA₂) (10). PGI₂ je močan vazodilator, hipotenziv in inhibitor agregacije trombocitov, TXA₂ pa je vazokonstriktor in agregator trombocitov. Dokazno je, da

trombociti ne sprostijo prostaglandin endoperoksidov, če ni hkrati inhibirana tudi tromboksan sintetaza (9).

5.4.2. Prostaciklin

Prostaciklin (PGI_2), derivat arahidonske kisline (Slika 2), so odkrili leta 1976 in spada v družino prostaglandinov. Na začetku je bil poznan pod imenom prostaglandin X, ki so ga kasneje preimenovali v prostaglandin I_2 . Deluje hipotenzivno, je močan vazodilatator in antiagregator trombocitov (9, 10, 11, 13, 14).



Slika 2: PGI_2 (levo) in arahidonska kislina (desno)

Tako kot številne druge spojine, ki izhajajo iz arahidonske kisline, tudi PGI_2 nastaja pod vplivom encima ciklooksigenaza (COX). Ker je PGI_2 zelo nestabilna spojina, se v nekaj minutah spontano pretvori v bolj stabilno in kemično neaktivno spojino 6-keto prostaglandin $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) (13).

PGI_2 ni močan trombocitni adheziv (9). Večje žilne stene imajo sposobnost sinteze PGI_2 , ki je največja v intimi in hitro pada proti adventiciji. Endotelijske celice so tudi najaktivnejše proizvajalke PGI_2 (10, 11, 14). Ugotovili so, da arterije v zajcih, podganah in psih izdelajo več PGI_2 kot vene. To potrjujejo tudi ugotovitve, da humane pulmonarne arterije proizvedejo več PGI_2 kot pulmonarne vene (10).

Žilne stene lahko sintetizirajo PGI_2 tako iz svojih endogenih predhodnikov kot tudi iz prostaglandinskih endoperoksidov, ki jih sproščajo trombociti, kar nakazuje biokemične

interakcije med trombociti in žilno steno (10). Bele krvne celice, ki tudi sintetizirajo endoperoksidaze in TXA_2 , lahko sodelujejo z žilno steno in pospešijo produkcijo PGI_2 .

PGI_2 ima kratek razpolovni čas (pri 37°C in pH 7,4 je razpolovni čas 2 min), zato deluje blizu mesta sinteze. Njegovo ime, I_2 , je nastalo zaradi zaporedja, po katerem je bil najden – za prostaglandinom H, indeks 2 pa označuje, da je nastal iz maščobne kisline z dvema nenasičenima vezema. Substrata za njegovo sintezo sta endoperoksida PGG_2 in PGH_2 (9).

PGI_2 je stabilnejši v bazičnem mediju, še posebej pri pH nad 8,4. Pri 22°C po 20 minutah ni več zaznati njegovega delovanja (9).

5.4.3. Učinki prostaciklina

Prostaciklin (PGI_2) je eden najmočnejših endogenih inhibitorjev agregacije trombocitov (je 30 do 40 krat aktivnejši kot PGE_2). Deluje na aktivacijo trombocitne adenil-ciklaze, ki poveča koncentracijo cikličnega adenzin monofosfata (cAMP) (9, 10). Povečana koncentracija cAMP v endotelijskih celicah predstavlja tudi negativno povratno zvezo produkciji PGI_2 v endoteliju (10).

Pri adheziji trombocitov na poškodovano endotelijsko steno PGI_2 ne igra pomembne vloge, saj šele velika količina PGI_2 povzroči zmanjšanje adhezije. Ko se trombociti prilepijo na žilno steno, pa PGI_2 lahko prepreči nadaljnjo agregacijo. Lipidne peroksidaze so močni inhibitorji sinteze PGI_2 . Hipertenzija in hiperholesterolemija poškodujeta endotelijsko celico, a ker pride do zmanjšanja sinteze in izločanja PGI_2 , žilna stena ne more preprečiti agregacije trombocitov, ki izražajo mitogene faktorje. Le-ti stimulirajo proliferacijo gladke muskulature in potencirajo razvoj plaka. PGI_2 v ledvicah regulira vaskularno rezistenco, izločanje elektrolitov, sintezo in izločanje renina. V kardiovaskularnem sistemu regulira tok krvi in omejuje sistemsko hipertenzijo. V reproduktivnem traktu PGI_2 in 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ nastajata v uterusu, žilah placente in seminalnih veziklih. Sta regulatorja zarodkovega in placentnega krvnega obtoka. PGI_2 tudi inhibira izločanje želodčnih sokov preko vazodilatacije ter izražanje z indometacinom sprožene gastrične erozije (9). Lokalno apliciran (dodan v hrčkove lične vrečke) PGI_2 inhibira formacijo tromba prek ADP v mikrocirkulaciji, sistemsko pa v zajcih prepreči električno vzpodbujen tromb v karotidni arteriji in poveča čas krvavitve (10).

Postaciklin deluje prek dveh tipov receptorjev, IP receptorjev in $\text{PPAR}\delta$ receptorjev. Za ustrezno fiziološko delovanje je potrebno pravilno ravnotežje med delovanjem prek enega

in drugega tipa receptorjev. V nasprotnem primeru lahko pride do patoloških učinkov delovanja PGI₂ (12, 15). V organizmu je nujno potrebno prisotno tudi ravnotežje med PGI₂ in TXA₂, saj le-to preprečuje hipertenzijo, kap, aterosklerozo, miokardni infarkt, pa tudi druge bolezni srca in ožilja. Zaradi tega je pomembna previdnost pri uživanju COX-2 inhibitorjev, predvsem v posameznikih, ki so še posebej občutljivi na porušenje ravnotežja (12).

5.4.4. Razgradnja prostaciklina

PGI₂ je relativno kratko obstojna spojina. Njegova biološka aktivnost v vodnih raztopinah izgine v obdobju 20 min, saj pride do transformacije v stabilen produkt – 6-keto PGF_{1α}, ki je tudi glavni razgradni produkt PGI₂ (9, 16). Poleg 6-keto PGF_{1α} lahko pod vplivom encima 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaze nastane tudi razgradnji produkt PGI₂ 6,15-diketo PGF_{1α}, ki lahko vpliva na rezultate analiznih metod (16).

5.5. Endotelijske celice

Endotelijske celice lahko najdemo na lumnu krvnih žil, kjer tvorijo enoskladni ploščati endotelij. So izrazito ploščate, visoke 1-2 μm in imajo premer 10-20 μm (17).

Nahajajo se na žilni steni in imajo pomembno vlogo pri prehajanju različnih molekul: plinov, vode, ionov, pa tudi celic skozi žilne stene v okoliška tkiva oziroma iz njih (17). Endotelij lahko izloča agonistične in protiagonistične substance, ki pomagajo pri ohranjanju homeostaze. Povzroča lahko vazodilatacijo in vazokonstrikcijo, trombotične in protitrombotične komponente, fibrinolitične in protifibrinolitične procese, vključuje se v celično proliferacijo in migracijo, pritrjevanje levkocitov in njihovo aktivacijo ter v imunološke in vnetne procese. Na propustnost endotelija vplivajo vnetni citokini, reaktivne kisikove spojine, trombin, PTF in med drugim tudi dvig Ca²⁺ ionov (18).

Povišan krvni tlak, povišane vrednosti holesterola v krvi, kajenje in debelost spadajo med klasične aterosklerotične dejavnike tveganja, ki vplivajo tudi na stanje samega endotelija. Med novejšje faktorje tveganja za nastanek ateroskleroze pa spadajo virusi, bakterije, protrombotični faktorji, proteini akutne faze in obenem označevalci vnetja (C-reaktivni protein (CRP) ter serumski amiloid A (SAA)). Klasični in novi dejavniki tveganja za nastanek ateroskleroze poškodujejo endotelij. Poškodovan endotelij se odzove z nenormalnim delovanjem (transendotelijska migracija levkocitov, povečana adhezivnost,

povečana permeabilnost) (19), vazokonstrikcijo, kopičenjem vnetnih celic, poveča se produkcija citokinov. Vsi ti odzivi sprožijo nastanek strdka in ateroskleroze (18).

5.6. Stimulatorji vnetja

5.6.1. Serumski amiloid A

Serumski amiloid A (SAA) se nahaja v organizmih sesalcev in ptičev (20) in je eden glavnih proteinov akutne faze vnetja. V človeškem telesu so našli štiri različne predstavnike iz družine SAA, ki so jih označili s številkami od 1 do 4, pri čemer sta SAA1 in SAA2 akutna serumska amiloida A, SAA3 je psevdogen, SAA4 pa konstitutivni serumski amiloid A (21). V normalnih okoliščinah nastaja v jetrih, kjer ga inducirajo TNF, IL-1, IL-6 (20, 21). V času akutnega miokardnega infarkta pa nastaja tudi v aterosklerotičnih lezijah (20, 21, 22). Pri vnetju se lahko njegovo izražanje poveča za 100 do 1000 krat (17, 18, 19). To velja za akutni SAA1 in SAA2, medtem ko se konstitutivni SAA 4 (ki je stalno prisoten v celici) ne poveča bistveno (21).

SAA inducira ekspresijo tkivnega faktorja (TF) in inhibira izražanje inhibitorja sintezne poti tkivnega faktorja (TFPI) v endotelijskih celicah. V nevtrofilnih granulocitih inducira izražanje IL-8 (22). Inhibira aktivnost trombocitov. V odvisnosti od doze inhibira izločanje serotonina med aktivacijo s trombinom. Zmanjša tudi produkcijo TXB₂ (23).

Akutni SAA je vpleten v patogenezo številnih kroničnih bolezni, kot so na primer amiloidoza z amiloidom A, ateroskleroza in revmatoidni artritis. Poleg tega sodeluje tudi pri metabolizmu in transportu lipidov (21).

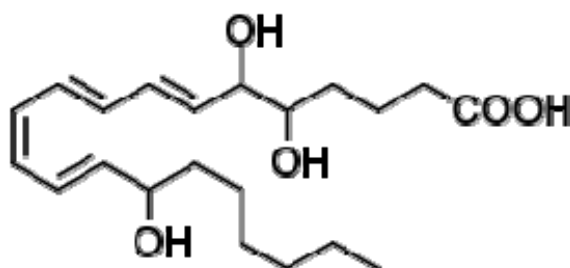
5.6.2. Interlevkin-1 β

Interlevkin-1 β (IL-1 β) je provnetni citokin, ki igra osrednjo vlogo v obrambnem mehanizmu in homeostazi (24). Njegova produkcija poteka preko neklasičnih poti proteinske sekrecije. Endotoksini sprožijo sintezo neaktivnega IL-1 β prekursorja, ki se premakne iz citosola v sekretorni lizosom. Pri vezanju na prokaspazo-1, se le-ta aktivira v kaspazo-1, ki pretvori prekursor IL-1 β v aktivno obliko (25). Sama kaspaza-1 igra tudi pomembno vlogo pri procesu programirane celične smrti – apoptoze (24).

5.7. Inhibitorji vnetja

5.7.1. Lipoksin A₄

Lipoksini so endogeni eikozanoidni mediatorji, ki potencialno inhibirajo vnetne procese s signalizacijo preko posebnih receptorjev v monocitnih ter fagocitnih celicah. Eden pogosteje uporabljenih lipoksinov, lipoksin A₄ (LXA₄, Slika 3) znižuje vnetje z inhibiranjem sinteze IL-6, IL-8 in matrične metaloproteinaze 3 (MMP-3) ter vpliva na zvišanje tkivnega inhibitorja metaloproteinaz (TIMP) (26) ter znižuje aktivacijo NF-κB (27).



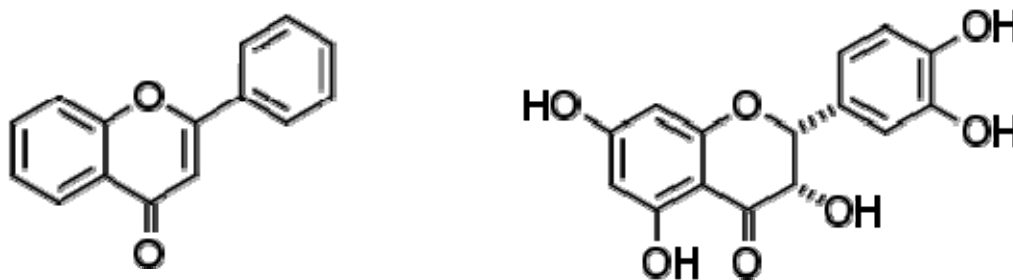
Slika 3: Lipoksin A₄

5.7.2. Ekstrakt črnega čaja

Pravi čaj je, poleg vode, najpogosteje zaužita pijača na svetu, zato je koristno ugotoviti njegove učinke na organizem (28). Bogat je z antioksidanti, predvsem polifenoli ((katehini, flavonoli (Slika 4), teaflavini in tearubigini)) (29). Ti polifenoli, katehini in flavonoli zajemajo reaktivne kisikove spojine, predvsem superoksidni anion (28), ter vežejo prenašalne metalne ione (29). So antioksidanti, inhibirajo agregacijo trombocitov prek številnih mehanizmov, med drugim tudi prek inhibicije lipoksigenaze, ciklooksigenaze, cAMP fosfodiesteraze in cGMP fosfodiesteraze, so antagonisti na tromboksanskega receptorja ter zmanjšanja aktivacije fosfolipaze C. Flavonoidi ugodno vplivajo na bolnike s koronarnimi arterijskimi boleznimi (28). Študije so tudi pokazale, da uživanje črnega ali zelenega čaja zmanjša število poškodb DNA, kar so pripisali preprečevanju oksidacije DNA (30).

Oksidirani LDL je glavni povod za nastanek ateroskleroze. Flavonoidi iz čaja zavirajo peroksidacijo povzročeno s prostimi radikali, s čimer zavirajo nastanek ateroskleroze. Prav tako znižujejo krvni tlak. Vendar pa poskusi kažejo, da so za vidne učinke potrebne velike

količine popitega čaja, prek šest skodelic dnevno, ali zaužiti ekstrakti črnega čaja (BTE) (29, 30).

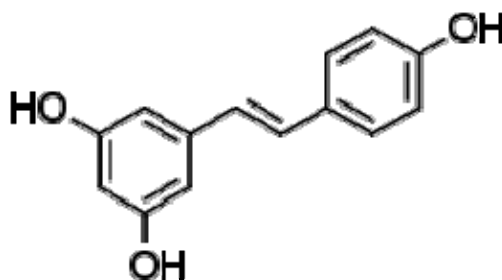


Slika 4: Struktura flavona (levo) in epikatehina (desno)

5.7.3. Resveratrol

Resveratrol (RSV) (Slika 5) je glavna aktivna učinkovina stilbena fitoaleksina, ki so ga prvič izolirali iz izvlečka korenine *Polygonum Capsidalum*, ki izvira iz Orienta. Relativno visoke koncentracije RSV najdemo tudi v vinu, pa tudi v drevesih (npr. evkaliptus, jelka in nekatere vrste lilij). Prvotno so ugotavljali predvsem njegove učinke na kardiovaskularno sistem (npr. lipidni metabolizem, vpliv na trombocite), poleg tega pa preučujejo tudi njegov vpliv na kancerogenezo in njegovo imunološko vlogo (31).

Zaradi antioksidativnega delovanja RSV deluje kardio- in nevroprotektivno. Zniža namreč toksični efekt reaktivnih kisikovih spojin. Pri tem zniža količino oksidiranih lipoproteinov. Zaradi antioksidativnega delovanja ščiti tudi pred jetrno fibrozo, saj inhibira proliferacijo hepatičnih zvezdastih celic. Ker vpliva tudi na inhibicijo s forbolnim estrom pospešenega nastanka intraceluralnih reaktivnih kisikovih spojin, ima antikancerogeno delovanje (31). Opazili so tudi šibko agonistično delovanje na estrogenske receptorje, ki pa ne igra klinično pomembne vloge (32).



Slika 5: Struktura resveratrola

Protivnetno deluje predvsem na alergijske in vnetne bolezni, kar je posledica povečanja aktivnosti levkocitov. Pri procesu sodelujeta dva encima 5-HETE in COX-2, ki iz arahidonske kisline tvorita prostaglandine, slednji pa tudi HTT in TXA₂. Vse to lahko pripelje do agregacije trombocitov. RSV inhibira 5-HETE, HTT in TXB₂.

Poleg omenjenega, RSV vpliva tudi na ekspresijo določenih genov prek transkripcijskih faktorjev. Tako prepreči aktivacijo NF-κB, AP-1 ter TNF, vpliva pa tudi na apoptozo in proliferacijo celic (31, 32, 33). To delovanje je koncentracijsko odvisno, saj določene koncentracije sprožijo apoptozo, druge pa jo preprečijo (31).

5.8. Orodja za študij vnetnega odziva na molekulsko-celični ravni

Za študij vnetnega odziva na molekulsko-celični ravni lahko uporabimo širok spekter orodij. Nekatera so specifična za proučevanje vnetnega odziva, ostala so splošna in se uporabljajo tudi v drugih naravoslovnih vedah. Metode za izolacijo antigenov in protiteles se uporabljajo tudi v biokemiji, za gensko sekvencioniranje imunološko pomembnih molekul pa se uporabljajo primarno v molekularni genetiki (34). Gojenje celičnih kultur, ki so pomembne za proučevanje vnetnega odziva *in vitro*, je domena biologije (35). Imunologija je kot veda razvila določene zanjo specifične metode. Večina teh metod je povezana s proučevanjem interakcij med antigenom in protitelesom. Najbolj znani metodi sta encimsko imunski test na trdnem nosilcu (ELISA) in radioimunska metoda (RIA), pogosto uporabljene pa so tudi metode obarjanja (34).

5.8.1. Encimsko imunski test na trdnem nosilcu

ELISA je metoda za določevanje prisotnosti antigenov ali protiteles v vzorcu, ki je lahko serum ali supernatant celic, ter njihove koncentracije. Encim, konjugiran s protitelesom, katalizira reakcijo pretvorbe brezbarvnega substrata do obarvanega produkta (5).

Poznamo več različic ELISA testov, ki jih lahko delimo na kompetitivne in nekompatitivne (indirektna ELISA, sendvič ELISA). Vsaka od njih lahko kvalitativno zazna prisotnost protitelesa ali antigena, nato pa iz umeritvene krivulje, ki jo pripravimo s pomočjo znanih koncentracij protitelesa ali antigena, kvantitativno določimo njihovo koncentracijo v vzorcu (4). Indirektno ELISA uporabljamo za odkrivanje in kvantitativno določevanje protiteles v vzorcu. Sendvič ELISA uporabimo za določevanje antigenov z večjim številom

epitopov (4, 5). Kompetitivna ELISA temelji na tekmovanju med označenim protitelesom in protitelesom v vzorcu za vezavo na antigen v mikrotitrski vdolbinici. Za razliko od prejšnjih dveh metod, kjer je močnejša absorbanca pomenila tudi več antigena oziroma protitelesa, pa tu zaradi kompetitivnosti manjša absorbanca pomeni več primarnega protitelesa (4).

5.8.2. Metoda zamika elektroforezne mobilnosti

Metoda zamika elektroforezne mobilnosti (EMSA – Electrophoretic mobility shift assay) je metoda za študij interakcij med proteini in DNA (36). Ker kompleksi med proteini in DNA migrirajo skozi poliakrilamidni gel počasneje kot sama DNA (37), jih lahko s pomočjo kemiluminiscence ali radiotopov zaznamo. DNA vezana na protein se na gelu nahaja višje pravimo, da je prišlo do premika (shift) ali zaostajanja (retardation) (37, 38).

Metodo EMSA lahko uporabimo za ločevanje kompleksov z različno stehiometrijo ali različno konformacijo. Prav tako lahko uporabimo nuklearne ali celične ekstrakte. Kvalitativno se uporablja za identifikacijo sekvenčno specifičnih na DNA vezočih se proteinov (transkriptorskih faktorjev) v lizatu in za določevanje vezavnih sekvenc na določenem regulatornem odseku določenega gena. EMSA se lahko uporablja tudi kvantitativno za določevanje kinetičnih in termodinamskih parametrov (36). Hitrost potovanja po gelu pada v odvisnosti od števila proteinov, vezanih na dan DNA fragment. Količina upočasnjene fragmenta je linearno odvisna od količine nanesenega vzorca, kar pomeni, da zastaja celoten kompleks DNA-protein (38).

Kinetična stabilnost ni pogoj za detekcijo kompleksa. Samo stabilnost poveča majhna koncentracija solnega pufru v gelu, ki poveča afiniteto vezave, asociacijo pospešuje tudi nedostopnost ostalega volumna gela reaktantom. Možno je tudi, da se vezavna konstanta poveča zaradi ostalih interakcij z gelom, ki tvori mrežo zaradi katere disociirane komponente ne morejo prosto difundirati po gelu (38).

Do spremembe hitrosti potovanja pride zaradi sejalne sposobnosti (sieving power) gela. Sprememba je odvisna od velikosti in oblike kompleksa, ne pa od njegovega naboja (39, 40).

5.8.2.1. Izolacija nuklearnih ekstraktov

Za preučevanje regulacijskih mehanizmov genov se rajši kot lizat celic uporabijo nuklearni

ekstrakti, saj lahko ostale celične komponente vplivajo na stabilnost jedrnih proteinov. Prav tako so jedrni proteini v lizatu celih celic prisotni v nižjih koncentracijah (so bolj razredčeni) kot pa v nuklearnem ekstraktu. Z izbranimi reagenti razbijemo celično membrano. Pri tem se sprosti citoplazemska vsebina. S pomočjo centrifugiranja ločimo jedra od citoplazemskega ekstrakta. Z dodatkom ustreznih reagentov razbijemo jedrno steno in po centrifugiranju dobimo izolirani nuklearni ekstrakt (41).

5.8.2.2. Določanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo

Določanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo temelji na spremembi maksimuma absorbanca barvila Comassiejevo briljantno modriilo G-250 s 465 nm na 595 nm kot odziv na vezavo proteina (42). Barvilo lahko obstaja v treh oblikah: kationski, anionski in nevtralni. Na makromolekule se lahko veže prek Van der Waal-ovih in hidrofobnih interakcij (43). Do reakcije vezave pride v približno dveh minutah, kompleks pa je obstojen do ene ure (44).

5.8.2.3. Vezava biotina

Terminalna deoksinukleotidilna transferaza (TdT) lahko vgradi 1-3 biotinizirane ribonukleotide na 3' konec DNA verige. Z vezavo na 3' konec sonde se zmanjša verjetnost sovplivanja s hibridizacijo ali sekvenčno specifične vezave proteionov (45).

5.8.2.4. Elektroforeza

Elektroforeza je metoda separacije na principu različne hitrosti migracije nabitih delcev v puferski raztopini, prek katere je napeljan enosmerni tok. Uporablja se lahko za ločevanje anorganskih anionov in kationov, aminokislin, kateholaminov, drog, vitaminov, ogljikovih hidratov, peptidov, proteinov, nukleinskih kislin, nukleotidov in polinukleotidov. Najpomembnejša lastnost elektroforeze je velika resolucija. Lahko loči spojine v zmesi s širokim spektrom molekulskih mas. Tako lahko loči med nukleinskimi kislinami velikosti nekaj sto nukleotidov pa do oligonukleotidov, velikih samo nekaj nukleotidov.

Princip ločbe temelji na razliki v hitrosti potovanja delcev (zaradi razlik v njihovem naboju in razlik v njihovi velikosti) skozi gel ali ozko cev. Zaradi toka, ki teče skozi medij (puffer in gel), pride do premikanja nabitih delcev. Večje kot je razmerje med nabojem in velikostjo, hitreje ioni potujejo po električnem polju.

Najpogosteje se uporabljata gelska elektroforeza in kapilarna elektroforeza. Slednja je hitra, ima veliko resolucijo in potrebuje majhne količine vzorca, a potrebujejo posebne naprave za upravljanje in obdelavo signala. Pri prvi lahko hkrati analiziramo več vzorcev, aparatura je enostavna in relativno poceni. Je najbolj pogosto uporabljena metoda elektroforeze. Njene slabosti so počasnost in težka avtomatizacija, hkrati pa zahteva kar nekaj spretnosti in potrpežljivosti, da dobimo resnično dobre rezultate (46).

5.8.2.5. Prenos na membrano

Prenos DNA iz gela na membrano je prvi izvedel Southern leta 1975. Pri tem je uporabil agarozni gel in nitrocelulozno membrano. Po njem se prenos DNA imenuje Southernov prenos (47). Kasneje so metodo prilagodili tudi za prenos mRNA (northern prenos) in za prenos proteinov (western prenos) (5), prenos pa je mogoč tako iz agaroznih kot tudi iz poliakrilamidnih gelov (47). Ker je kapilarni transfer iz gela na membrano prešibak, so za izpiranje proteinov iz gela uporabili električni tok, pri čemer je gel postavljen na strani katode (-), membrana pa na strani anode (+) (47).

5.8.2.6. Prečno premreženje

Prečno premreženje je metoda imobilizacije DNA na membrano. Sam postopek je odvisen od vrste membrane, ki jo bomo uporabili, metode prenosa iz gela na membrano in metode imobilizacije. Prenos v bazičnem povzroči tvorbo kovalentnih vezi s pozitivno nabito membrano, zato imobilizacija ni potrebna. V kolikor pri pozitivni membrani uporabimo transfer v nevtralnem ali pa uporabimo nevtralno membrano, lahko uporabimo dve različni metodi imobilizacije: UV radiacija ali pečenje v pečici (vakuumska ali mikrovalovna) (48).

5.8.2.7. Detekcija z luminolom

Z biotinom označeno sondo lahko zaznamo s pomočjo visokospecifične reakcije med biotinom in streptavidinom, ki je konjugiran z encimom. Encim je lahko hrenova peroksidaza (HRP). Zaznavanje biotina nato poteka v sistemu z luminolom. HRP katalizira oksidacijo luminola v prisotnosti vodikovega peroksida, pri čemer nastane visokoreaktiven endoperoksit, ki emitira svetlobo pri 425 nm (48).

6. Namen dela

Diplomska naloga je zasnovana kot del projekta, ki proučuje vpliv različnih vnetnih dejavnikov na izločanje koagulacijskih faktorjev ter na nastanek tromboz. Vnetni proces je pomemben del odziva organizma na poškodbo ali tujek, v katerega so neposredno ali posredno vpleteni imunski sistem, koagulacijski faktorji in endotelijske celice.

Diplomska naloga je razdeljena na dva ločena dela. V prvem delu proučujemo vpliv stimulatorjev in inhibitorjev vnetja na izločanje prostaciklina iz netransformiranih primarnih humanih endotelijskih celic umbilikalnih ven, koronarnih arterij ter mikrovaskularnih endotelijskih celic. Naša hipoteza je, da prostaciklin deluje protivnetno in da se poveča njegovo izločanje ob stimulaciji endotelijskih celic s serumskim amiloidom A in interleukinom-1 β , ki sta stimulatorja vnetja, in da se zniža izločanje prostaciklina ob stimulaciji celic z lipoksinom A₄, ekstraktom črnega čaja ter resveratrolom. Ker povečane količine endogenega prostaciklina lahko vzpodbudijo proti-trombotične in protikoagulativne procese, so cilji prvega dela diplomske naloge:

- 1) Določiti vpliv naraščajoče koncentracije SAA na izločanje prostaciklina iz primarnih humanih endotelijskih celicah.
- 2) Določiti vpliv naraščajoče koncentracije IL-1 β na izločanje prostaciklina iz primarnih humanih endotelijskih celicah.
- 3) Primerjati sproščanje prostaciklina med HCAEC, HUVEC in HMVEC.
- 4) Določiti vpliv potencialnih inhibitorjev vnetja (lipoksin A₄, ekstrakt črnega čaja, resveratrol) na s SAA inducirano in z IL-1 β inducirano produkcijo prostaciklina.

Ker je NF- κ B eden glavnih vnetnih regulatorjev v jedru, je pomembno, da določimo kakšen vpliv ima akutni SAA na NF- κ B DNA vezavo v HCAEC. Zato so bili cilji drugega dela diplomske naloge:

- 5) Proučiti vpliv SAA na transkripcijski faktor NF- κ B.
- 6) Vzpostaviti metodo za proučevanje vezave transkripcijskih faktorjev (kemiluminescenčna EMSA), ki vključuje: izolacijo nuklearnih ekstraktov, določanje koncentracije proteinov (metoda po Bradfordu), vezavo biotina, elektroforezo, prenos na membrano, prečno premreženje ter detekcijo kemiluminescence.

7. Materiali in metode

7.1. Materiali

7.1.1. Biološki material

- humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice (HMVEC-d – Human Microvascular Endothelial Cells-Dermal), Cambrex, ZDA
- endotelijske celice humane koronarne arterije (HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial Cells), Cambrex, ZDA
- endotelijske celice humane umbilikalne vene (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells), Cambrex, ZDA
- gojišče za HUVEC celice, ki vsebuje:
 - osnovno gojišče (EBM-2 :Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free), 500 mL Clonetics®, Cambrex, ZDA
 - EGM™-2 Single Quots®, Clonetics®, Cambrex, ZDA, ki vsebuje:
 - fetalni goveji serum (FBS), 10 mL
 - hidrokortizol (Hydrocortisone), 0,2 mL
 - humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B), 2 mL
 - vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), 0,5 mL
 - dolgi R rekombinantni inzulinsko podobni rastni faktor-1 (R3-IGF-1), 0,5 ml
 - askorbinska kislina (Ascorbic acid), 0,5 mL
 - humani epidermalni rastni faktor (hEGF), 0,5 mL
 - gentamicin sulfat (GA-1000), 0,5 mL
 - heparin, 0,5 mL
- gojišče za HMVEC-d in HCAEC celice, ki vsebuje:
 - osnovno gojišče (EBM-2 : Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free), 500 mL Clonetics®, Cambrex, ZDA

- EGM™-2 MV Single Quots®, Clonetics®, Cambrex, ZDA, ki vsebuje:
 - fetalni goveji serum (FBS), 25 mL
 - hidrokortizol (Hydrocortisone), 0,2 mL
 - humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B), 2 mL
 - vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), 0,5 mL
 - dolgi R rekombinantni inzulinsko podobni rastni faktor-1 (R3-IGF-1), 0,5 ml
 - askorbinska kislina (Ascorbic acid), 0.5 mL
 - humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B), 0,5 mL
 - gentamicin sulfat (GA-1000), 0,5 mL
- rekombinantni humani Apo-Serumski amiloid A, Peprtech, ZDA
- rekombinantni humani interlevkin 1 β , BioSource™, Invitrogen, ZDA

7.1.2. Reagenti

- analizni komplet za določevanje 6-keto prostaglandina F_{1 α} (6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA kit), Cayman Chemical Company, Ann Arbor, ZDA
 - 6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA Antiserum
 - 6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA AChE Tracer
 - 6-keto Prostaglandin F_{1 α} EIA Standard
 - EIA Buffer Concentrate
 - Wash Buffer Concentrate
 - Tween-20
 - Mouse Anti-Rabbit IgG Coated Plate (96 Well)
 - Ellman's Reagent
 - EIA Tracer Dye
 - EIA Antiserum Dye
- analizni komplet za izolacijo citoplazemskih in nuklearnih ekstraktov (NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents), Pierce, Rockford, ZDA

- Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I)
- Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II)
- Nuclear Extraction Reagent (NER)
- analizni komplet za označevanje 3'DNA z biotinom (Biotin 3' End DNA Labeling Kit),
Pierce, Rockford, ZDA
 - 5X TdT Reaction Buffer
 - Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)
 - Biotin-11-UTP
 - Unlabeled Control Oligo
 - Biotin-Control Oligo
- analizni komplet za kemoluminiscenco (LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit),
Pierce, Rockford, ZDA
 - 10x Binding Buffer
 - Biotin-EBNA Control DNA
 - Unlabeled EBNA DNA
 - Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA) Extract
 - Poly (dI*dC)
 - 50% Glycerol
 - 1% NP-40
 - 1M KCl
 - 100 mM MgCl₂
 - 200 mM EDTA pH 8,0
 - 5x Loading Buffer
- analizni komplet za detekcijo nukleinskih kislin z kemiluminiscenco (Chemiluminescent
Nucleic Acid Detection Module), Pierce, Rockford, ZDA
 - Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate
 - Chemiluminescent Substrate

- Luminol/Enhancer Solution
 - Stable Peroxidase Solution
 - Blocking Buffer
 - 4x Wash Buffer
 - Substrate Equilibration Buffer
- membrane Biodyne® A&B Precut Nylon Membranes (8x12cm), Pierce, Rockford, ZDA
- razkužilo (Kohrsolin FF), Bode Chemie, Nemčija
- visoko prečiščena voda brez Dnaz in Rnaz (Ultra PURE™ distilled water DNase, RNase free), Gibco™, Invitrogen, ZDA
- absolutni etanol, Ethanol absolut – 99,5%, Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija
- resveratrol – Sigma, Saint Louis, ZDA
- tea extract from black tea, Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija
- lipoxin A4, Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija
- recombinant human apo-SAA, Peptotech, London, UK
- recombinant human apo-SAA, MBL, Watertown, ZDA
- interleukin 1 β – Invitrogen, Carlsbad, ZDA

7.1.3. Aparature in ostali material

- vodna kopel TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- komora s sterilnim pretokom zraka, LaminAir scan, Heto Holten, Allerod, Danska
- inkubator, Heto Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- vakuumska črpalka, Vaccum pump XF54 230 50, Milipore, Nemčija
- mikroskop BH-2, Olympus, Japonska
- centrifuga 3K30, Sigma, ZDA
- avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- vodna kopel, tip 1003, GFL, Hanover, Nemčija
- centrifuga, Mini spin plus, Eppendorf, Hamburg, Nemčija

- komora z laminarnim pretokom zraka, LaminAir scan, Heto Holten, Allerod, Danska
- aparat za verižno reakcijo s polimerazo, Thermal Cycler 2720, Applied biosystems, ZDA
- vibracijski mešalnik, Assister, Nemčija
- aparat za slikanje gelov, G:BOX, Syngene, Velika Britanija
- programska oprema za slikanje gelov, GeneSnap from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- programska oprema za obdelavo slike gelov, GeneTools from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- spektrofotometer, Tecan Sunrise, Zurich, Švica
- sterilni pipetni nastavki s filtri 10 μL , 100 μL , 1000 μL , Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifugirne epruvete 50 mL, TPP, Trasadingen, Švica
- platenke za tkivne kulture 75 cm^2 , Tissue cultured flask: 75 cm^2 , TPP, Trasadingen, Švica
- šestprekatne plošče, Tissue culture test plates: 9,6 cm^2 , TPP, Trasadingen, Švica
- pokončna enota za elektroforezo (Vertical Electrophoresis Units) TV400, Fisherbrand (Fisher Scientific), Leicestershire, England
- usmernik Biorad 1000/500, Biorad Laboratories, Hercules, ZDA
- droben laboratorijski pribor

7.2. Metode

7.2.1. Stimulacija celic

Primarne endotelijske celice smo gojili po laboratorijskem protokolu (49). Ko so dosegle ustrezno stopnjo konfluentnosti (vsaj 90%), smo jih stimulirali s stimulatorji in inhibitorji vnetja (SAA, IL-1 β , lipoksin A₄, ekstrakt črnega čaja, resveratrol). Pred pričetkom poskusa so bile celice v popolnem gojišču z dodanim FBS. Dve uri pred stimulacijo smo celicam zamenjali gojišče, pri čemer smo prejšnje gojišče odpipetirali iz gojitvene platenke in dodali 5 ml gojišča brez FBS-a. Postopek smo ponovili čez dve uri, ko smo pričeli s

stimulacijo. Nanesli smo za poskus načrtovane stimulatorje in inhibitorje v ustreznih, prej pripravljenih koncentracijah (Preglednica II). Tako stimulirane celice smo pustili inkubirati 24 ur pri 37°C za določevanje vpliva na sproščanje PGI₂ in 30 min pri 37°C za določevanje nuklearnih faktorjev.

Preglednica II: Končne koncentracije uporabljenih stimulatorjev/inhibitorjev

Stimulator/Inhibitor	Končna koncentracija
serumski amiloid A	1 µM
interlevkin 1β	1 µg/l
lipoksin A ₄	100 nM
ekstrakt črnega čaja	40 mg/l
resveratrol	40 nM
etanol	uporabili smo 96% etanol v enakem volumnu, kot je bil uporabljen pri lipoksinu A ₄ (1 µl) in resveratrolu (1,85 µl)

Po preteku polurne ali 24-urne stimulacije smo iz vsake gojitvene posode odpipetirali 1 ml supernatanta v pripravljene ter označene 1,5 ml epruvete, jih zamašili in shranili na ledu.

Pri določevanju nuklearnih faktorjev smo prilepljenim celicam dodali 3 ml proteaznih inhibitorjev. S pomočjo plastičnih strgal smo z dna platenke postrgali celice. Tekočino s plavajočimi celicami smo odpipetirali v ohlajene 15 ml epruvete. Platenko smo nato še enkrat sprali z 1 ml proteaznih inhibitorjev ter tekočino s preostalimi celicami odpipetirali v ohlajeno 15 ml epruveto. Kadar smo več platenk celic stimulirali z istim stimulatorjem ali inhibitorjem, smo vsebino platenk stimuliranih z istim reagentom odpipetirali v isto 15 ml epruveto. 15 ml epruvete smo ustrezno označili (datum, številka poskusa, številka vzorca, vsebina) in postavili na led.

7.2.2. Shranjevanje supernatantov

Supernatante smo po prihodu iz celičnega laboratorija centrifugirali z uporabo mikrocentrifuge. Centrifugiranje je trajalo 3 min pri 14.000 obratih na minuto. 900 µl supernatanta smo odpipetirali v nove 1,5 ml epruvete, jih označili s številko poskusa, datumom poskusa in številko gojitvene platenke. Tako označene 1,5 ml epruvete smo shranili v skrinji na -20°C.

7.2.3. Kompetitivni encimsko imunski test

7.2.3.1. Predpriprava (6-keto prostaglandin F_{1 α} EIA ELISA)

Pred pričetkom obdelave vzorca smo pripravili reagente, ki so se morali ogreti na sobno temperaturo ali razredčiti v gojišču celične kulture. Pripravili smo EIA pufer (EIA Buffer) in spiralni pufer (Wash Buffer). Sledila je priprava standardov, ki smo jih redčili v predpisanih razmerjih s prečiščeno vodo ali gojiščem. Če je bilo potrebno, smo redčili tudi naše vzorce. Sledil je nanos reagentov, standardov in vzorcev na razvijalno ploščo, inkubacija plošče, spiranje, nanos reagentov na ploščo, ponovna inkubacija plošče, merjenje vzorcev in obdelava rezultatov.

EIA pufer smo pripravili tako, da smo vzeli vialo št. 4, ki vsebuje EIA puferski koncentrat in ga redčili z 90 ml prečiščene vode. Pri tem smo vialo očistili vseh soli, ki so se pritrdile na stene ali njen zamašek.

Spiralni pufer smo pripravili tako, da smo vsebino ene vial koncentrata spiralnega pufra redčili z 2 l prečiščene vode. Vialo smo dobro sprali z vodo, da ni prišlo do izgub zaradi zaostalega koncentrata. Nato smo dodali 1 ml Tween 20 iz vial številka 5a. Redčitev koncentrata spiralnega pufra je bila 1/400.

7.2.3.2. Priprava vzorca, standarda in specifičnih reagentov

Znane koncentracije standardne raztopine (Preglednica III) smo pripravimo tako, da smo prenesli 100 μ l 6-keto PGF_{1 α} standarda, ki se nahaja v viali št. 3, v čisto 1,5 ml epruveto in ga redčili z 900 μ l prečiščene vode. Pri tem smo dobili standardno raztopino koncentracije 5ng/ml. Vzeli smo osem čistih 1,5 ml epruвет in jih označili s številkami od 1 do 8. V prvo 1,5 ml epruveto smo prenesli 900 μ l gojišča, v ostale pa 500 μ l gojišča. Nato smo v prvo 1,5 ml epruveto prenesli 100 μ l pripravljenega standarda s koncentracijo 5 ng/ml in jo dobro premešali. Iz prve 1,5 ml epruvete smo vzeli 500 μ l redčenega standarda in ga prenesli v 1,5 ml epruveto št. 2, dobro premešali in ponovno prenesli 500 μ l redčenega standarda iz 1,5 ml epruvete št. 2 v 1,5 ml epruveto št. 3. Postopek smo ponavljali do 1,5 ml epruvete št. 8.

Preglednica III: Koncentracije 6-keto PGF_{1α} standarda v 1,5 ml epruvetah

Št. 1,5 ml epruvete	1	2	3	4	5	6	7	8
Koncentracija standarda [μg/l]	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9

6-keto PGF_{1α} sledilo smo pripravili tako, da smo vsebino viala št. 2, ki vsebuje 100 dtn 6-keto PGF_{1α} sledila, redčili s 6 ml EIA pufru.

6-keto PGF_{1α} antiserum smo pripravili tako, da smo vsebino viala št. 1 redčili s 6 ml EIA pufru, pri čemer smo pazili, da smo odstranili ves antiserum iz viala, tako da do izgub ni prihajalo.

7.2.3.3. Nanos na ploščo

Pri našem delu smo uporabljali ploščo s 96 vdolbinicami, pri čemer so se posamezni stolpci lahko odstranili iz okvirja plošče in se shranili ter uporabili za naslednjo analizo. Plošča je bila del analiznega kompleta in je bila pripravljena za uporabo, dodatno obdelovanje in čiščenje ni bilo potrebno. Za nanos na ploščo je proizvajalec postavil nekaj zahtev, ki smo se jih držali.

Vsak set je po priporočilih proizvajalca moral vsebovati vsaj dve prazni vdolbinici (blank – Blk), dve vdolbinici za nespecifično vezavo (NSB), dve vdolbinici za maksimalno vezavo (B₀), in v duplikatu nanesene pripravljene redčene koncentracije standarda (Std1 – Std2). Vsak vzorec je bil pripravljen v duplikatu (50) (Preglednica IV).

Preglednica IV: Prikaz nanosa standardov in vzorcev na ploščo (S = standard, V = vzorec)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Std1	Std1	Vz1	Vz1	Vz9	Vz9	Vz17	Vz17	Vz25	Vz25	Vz33
B	Blk	Std2	Std2	Vz2	Vz2	Vz10	Vz10	Vz18	Vz18	Vz26	Vz26	Vz33
C	NBS	Std3	Std3	Vz3	Vz3	Vz11	Vz11	Vz19	Vz19	Vz27	Vz27	Vz34
D	NBS	Std4	Std4	Vz4	Vz4	Vz12	Vz12	Vz20	Vz20	Vz28	Vz28	Vz34
E	B ₀	Std5	Std5	Vz5	Vz5	Vz13	Vz13	Vz21	Vz21	Vz29	Vz29	Vz35
F	B ₀	Std6	Std6	Vz6	Vz6	Vz14	Vz14	Vz22	Vz22	Vz30	Vz30	Vz35
G	B ₀	Std7	Std7	Vz7	Vz7	Vz15	Vz15	Vz23	Vz23	Vz31	Vz31	Vz36
H	TA	Std8	Std8	Vz8	Vz8	Vz16	Vz16	Vz24	Vz24	Vz32	Vz32	Vz36

Na ploščo smo nanesti gojišče, 100 µl v NSB vdolbinici (C1 in D1) ter 50 µl v B₀ vdolbinice (E1, F1, G1) (Preglednica V).

Preglednica V: Prikaz nanašanja vzorcev, standardov in reagentov v vdolbinice na plošči pred inkubacijo.

Vdolbinica	EIA pufer	Standard/vzorec	Sledilo	Antiserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	-	-
NSB	100µl	-	50µl	-
B ₀	50µl	-	50µl	50µl
Vzorec / standard	-	50µl	50µl	50µl

V prostorčke stolpcev 2 in 3 smo nanesti 50 µl pripravljenih redčitev standarda. Iz 1,5 ml epruvete št. 1 smo nanesti po 50 µl raztopine v vsako od vdolbinic Std1 (A2 in A3), iz 1,5 ml epruvete št. 2 smo nanesti po 50 µl raztopine v vsako od vdolbinic Std2 (B2 in B3) ter tako nadaljevali do konca (po 50 µl raztopine iz 1,5 ml epruvete št. 8 v vsako od vdolbinic Std8, torej vdolbinici H2 in H3).

Po skici, predstavljeni v preglednici (Preglednica IV), smo nanesti po 50 µl vzorca v za to namenjena vdolbinice. V vsako od vdolbinic, razen v polja Blk in TA (A1, B1, H1), smo dodali po 50 µl vnaprej pripravljenega 6-keto PGF_{1α} AchE sledila. Preostanek 6-keto PGF_{1α} AchE sledila smo shranili na 4°C do naslednjega dne. V vsako od vdolbinic na plošči, razen v vdolbinice Blk, NSB in TA, smo dodali po 50 µl vnaprej pripravljenega 6-keto PGF_{1α} antiseruma.

Ploščo smo pokrili s plastičnim lepilnim filmom in inkubirali 18 ur (prek noči) pri temperaturi 4°C v temi.

7.2.3.4. Razvijanje plošče

Naslednjega dne smo pripravili Ellmanov reagent tako, da smo vzeli vialo št. 8 in jo sprali z 20 ml prečiščene vode, kar je zadostovalo za 100 vdolbinic na plošči. Zaradi nestabilnosti Ellmanovega reagenta smo ga shranjevali med postopkom v temi, kar je tudi zahteva proizvajalca (50).

Ploščo smo odkrili in petkrat sprali s spiralnim pufrom (vsako vdolbinico smo 5x napolnili

z 250 μ l spiralnega pufra, pretresli in izpraznili), ki smo ga pripravili prejšnji dan. V vsako vdolbinico smo dodali 200 μ l Ellmanovega reagenta, v vdolbinico H1 (vdolbinica za polno aktivnost – TA, Preglednica IV) pa smo dodali še 5 μ l 6-keto PGF_{1 α} AchE sledila. Ploščo smo pokrili s filmom in razvili. Najboljše razvijanje smo dosegli ob uporabi vibracijskega mešalnika, ki smo ga pokrili, tako da se je plošča razvijala v temi. Samo razvijanje je potekalo eno uro do eno uro in pol. Po eni uri smo namreč pričeli izvajati meritve, s čimer smo zagotovili optimalni čas branja plošče.

7.2.3.5. Branje plošče

Za branje plošče smo uporabili UV spektrometer Tecan Sunrise, ki je povezan z računalnikom. Merili smo absorbanco pri valovni dolžini 405 nm. Spodnjo stran plošče smo pred meritvijo obrisali, tako smo odstranili morebitno umazanijo, kapljice ali prstne odtise, kar bi lahko vplivalo na rezultate. Prav tako smo preverili, ali se je vsebina katere od vdolbinic morda polila – sprememba volumna bi prav tako vplivala na absorbanco.

Pri merjenju smo morali paziti, da v vdolbinicah B₀ absorbanca ni bila nižja od 0,3 ali višja od 0,8. Nižja absorbanca je pomenila daljši čas razvijanja plošče, višja pa, da se je plošča razvijala predolgo. V kolikor je prišlo do politja vsebine plošče ali previsoko absorbanco polj B₀, smo vdolbinice sprali s spiralnim pufrom, na novo pripravili Ellmanov reagent ter ponovili celoten postopek razvijanja in branja plošče (50).

7.2.3.6. Rezultati

Po merjenju s Tecan Sunrise aparaturom smo dobili meritve absorbanc v obliki tabele izpisane na ekranu. Potrebna je bila nadaljnja računsko obdelava rezultatov.

7.2.3.7. Obdelava rezultatov

Proizvajalec predlaga, da rezultate obdelamo s pomočjo računalnika. Za to nam nudi celo poseben program, predlogo za MS Excel, ki omogoča takojšnje izračunavanje koncentracij. Zaradi določenih specifičnosti principa dela v našem laboratoriju (drugačna smer nanosa duplikatov) ter spremenljivega števila vzorcev smo naredili lastno predlogo za računanje ter preverili, ali se naši rezultati ujemajo z rezultati dobljenimi z uporabo proizvajalčeve predloge. Za ročno izračunavanje rezultatov nam proizvajalec predlaga naslednje korake:

- izračunati povprečno absorbanco Blk prostorčkov in jo odšteti od vseh ostalih absorbanc (Enačba 1)

$$\overline{Blk} = \frac{A_{A1} + A_{B1}}{2}$$

Enačba 1: Povprečna absorbanca ozadja

- izračunati povprečno absorbanco NSB prostorčkov (Enačba 2)

$$\overline{NSB} = \frac{(A_{C1} - \overline{Blk}) + (A_{D1} - \overline{Blk})}{2}$$

Enačba 2: Povprečna absorbanca NSB

- izračunati povprečno absorbanco B₀ prostorčkov (Enačba 3)

$$\overline{B_0} = \frac{(A_{E1} - \overline{Blk}) + (A_{F1} - \overline{Blk}) + (A_{G1} - \overline{Blk})}{3}$$

Enačba 3: Povprečna absorbanca maksimalne vezave

- izračunati popravljeno B₀ (popravljen maksimalna vezava), kar naredimo tako, da odštejemo povprečno NSB absorbanco dobljeno v koraku 2 od povprečne B₀ absorbanco dobljene po Enačbi 3 (Enačba 4)

$$B_0^{pop} = \overline{B_0} - \overline{NSB}$$

Enačba 4: Popravljen B₀

- izračunati %B/B₀ (%standardne vezave/maksimalna vezava) v preostalih prostorčkih, kar naredimo tako, da od prostorčkov, v katerih je bodisi standard bodisi vzorec, odštejemo povprečno NSB absorbanco dobljeno v koraku 2, dobljeno razliko delimo s popravljeno B₀ dobljeno v koraku 4 ter pomnožimo s 100 (Enačba 5).

$$\%B / B_0^{A2} = ((A_{A2} - \overline{Blk}) - \frac{\overline{NSB}}{B_0^{pop}}) \times 100$$

Enačba 5: Izračun %B/B₀ za polje A2, kjer se nahaja standard S1

Sledi izračun standardne krivulje %B/B₀ vrednosti standardov, za katero proizvajalec predlaga, da jo narišemo na semilogaritemski papir. Uporabimo povprečne vrednosti

$\%B/B_0$, ki smo jih pred tem izračunali po enačbi (Enačba 6):

$$\%B/B_0^{S1} = \frac{\%B/B_0^{A2} + \%B/B_0^{A3}}{2}$$

Enačba 6: Povprečna vrednost $\%B/B_0$ za standard SI

Enačba standardne krivulje je (Enačba 7):

$$y = k \times \ln(x) + n$$

Enačba 7: Enačba umeritvene krivulje; k je koeficient naklona, n je presečišče osi x , $\ln(x)$ je naravni logaritem vrednosti x

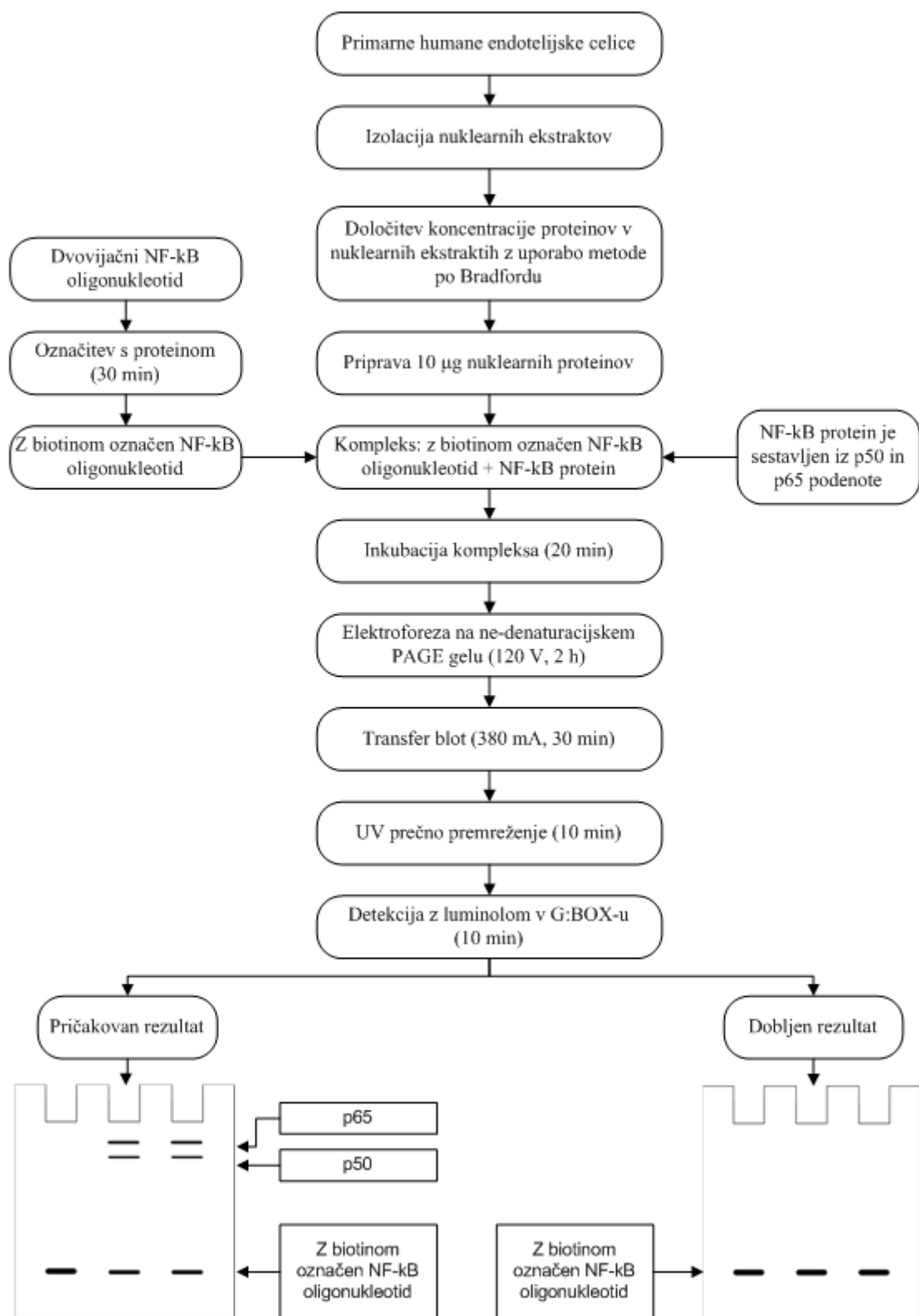
Izračun koncentracije vzorcev je možen šele, ko izračunamo enačbo standardne oz. umeritvene krivulje. Izračunamo $\%B/B_0$ za vsak vzorec. Koncentracijo določimo prek umeritvene krivulje (iz vrednosti $\%B/B_0$ določimo vrednost in koncentracijo preberemo na x osi grafa oziroma uporabimo enačbo umeritvene krivulje). Vrednosti $\%B/B_0$ morajo biti v intervalu 20% – 80% koncentracijskega območja standarda, mejna območja niso več linearna (Enačba 8) (50).

$$x = e^{\frac{y-n}{k}}$$

Enačba 8: Izračun koncentracije [$\mu\text{g/l}$]; y je $\%B/B_0$, n je presečišče osi x , k je naklon premice

7.2.4. Metoda zamika elektroforezne mobilnosti

Celoten potek metode EMSA smo razdelili na več krajših postopkov: stimulacija celic (opisan pri poglavju Materiali in metode – Metode), izolacija nuklearnih ekstraktov, vezava označenih nukleinskih faktorjev na izolirano DNA, elektroforezna ločba produktov, prenosa in pritrditev DNA na membrano ter detekcija lis na membrani (Slika 6). Zaradi kompleksnosti metode smo vsak del metode obravnavali kot del celote in hkrati kot ločen, samostojen del. Metodo smo zastavili prek navodil, ki jih ob analiznem kompletu dostavi proizvajalec, nato pa s pomočjo izkušenj preteklega laboratorijskega dela ter različnimi prilagoditvami poskušali dan protokol izboljšati in prilagoditi našemu namenu ter opremi v laboratoriju.



Slika 6: Diagram prikazuje potek dela pri metodi zamika elektroforezne mobilnosti ter pričakovan in dobljen rezultat.

7.2.4.1. Izolacija nuklearnih ekstraktov

Delo smo po stimulaciji celic in shranjevanju supernatanta nadaljevali zunaj celičnega laboratorija. Centrifugo smo ohladili na 4°C. Vse reagente smo ohladili na ledu. 15 ml epruvete s celicami smo centrifugirali 3 min pri centrifugalni sili 500 x g na 4°C. Pripravili smo reagenta z imenom CER I in NER I. 1200 µl CER I smo dodali 12 µl 100 x koncentriranega proteaznega inhibitorja in 12 µl 100x koncentrirane EDTA. 600 µl NER I smo dodali 6 µl 100 x koncentriranega proteaznega inhibitorja in 6 µl 100 x koncentrirane EDTA. Tako pripravljena reagenta smo ponovno hladili na ledu.

S serološkimi pipetami smo odpipetirali supernatant iz centrifugirane 15 ml epruvete. Zaradi močnega pritiska, ki ga povzročijo serološke pipete, nismo odpipetirali do suhega ampak smo zadnji mililiter odpipetirali s pomočjo 1 ml pipete. V 15 ml epruveto smo na usedlino dodali 200 µl po zgornjem postopku pripravljenega ledenega CER I z inhibitorji ter 15 ml epruveto vrtinčili ter stresali, da se je usedlina popolnoma resuspendirala. Nato smo prenesli vso tekočino v ohlajeno 1,5 ml epruveto ter zmes hladili 10 min na ledu.

Ohlajenim 1,5 ml epruvetam smo dodali 11 µl ledenega CER II ter vrtinčili 5 s pri najvišjih obratih. Zmes smo 1 min inkubirali na ledu ter ponovno vrtinčili 5 s na najvišji obratih. Sledilo je 5 min centrifugiranja pri 16.000 x g v ohlajeni centrifugi (4°C).

Supernatant, plazemski ekstrakt, smo prenesli v čisto, ohlajeno 1,5 ml epruveto. Označili smo jo s črkami CE (citoplazemski ekstrakt), datumom, številko eksperimenta in številko vzorca. Tako označene 1,5 ml epruvete smo shranili v skrinji na -80°C.

Preostalo usedlino smo resuspendirali s 100 µl predpripravljenega ledenega NER reagenta. Suspenzijo smo vrtinčili na najvišjih obratih 15 s, nato 10 min inkubirali na ledu. Postopek vrtinčenja in inkubacije smo skupaj ponovili 4x. Po zadnji inkubaciji smo suspenzijo ponovno vrtinčili 15 s na najvišjih obratih, nato pa centrifugirali 10 min pri 16.000 x g v na 4°C ohlajeni centrifugirki.

Supernatant smo prenesli v čisto, ohlajeno 1,5 ml epruveto. Iz nje smo vzeli 7 µl supernatanta in ga prenesli v 100 µl epruveto. 1,5 ml epruvete smo označili s črkama NE (nuklearni ekstrakt), številko eksperimenta, datumom in številko vzorca ter shranili pri -80°C. 100 µl epruvete smo označili s številko eksperimenta in številko vzorca. Shranili smo jih do postopka določanja koncentracije proteinov na -20°C (običajno do naslednjega dne).

7.2.4.2. Določanje koncentracije proteinov z Bradfordovo metodo

Proteine v vzorcu smo določili po Bradfordovi metodi skladno z navodili proizvajalca reagentov (42), po kateri merimo absorbanco obarvane raztopine. Za umeritveno premico BSA smo raztopili v PBS pufru s $\text{pH} = 7,4$ tako, da smo dobili končno koncentracijo raztopine 1 g/l. Iz tako pripravljene raztopine smo pripravili vzorce standarda, ki so nam služili za pripravo umeritvene krivulje. V 8 pripravljenih 2,5 ml epruvet smo odpipetirali ustrezen volumen PBS ter ustrezen volumen prej pripravljene raztopine BSA v PBS koncentracije 1 g/l (Preglednica VI). Raztopini smo dobro premešali s pipeto in vibracijskim mešalnikom.

Preglednica VI: Nanos raztopine BSA v PBS znanih koncentracij za izračun umeritvene krivulje

Št. 2,5 ml epruvete	V BSA 1g/L [μL]	V PBS pH 7,4 [μL]	V barvila [μL]	končna konc. BSA v 2,5 ml epruveti [$\mu\text{g/mL}$]
1	0	800	200	0
2	0,5	799,5	200	0,5
3	1	799	200	1
4	3	797	200	3
5	5	795	200	5
6	8	792	200	8
7	10	790	200	10
8	20	780	200	20

Pripravili smo 100 μl epruvete, v katerih je bilo 7 μl raztopin nuklearnih ekstraktov, ki smo jih pripravili v ustreznem poskusu (običajno prejšnji dan). V vnaprej pripravljene 2,5 ml epruvete smo odpipetirali ustrezen volumen PBS z $\text{pH} = 7,4$. Iz vsake 100 μl epruvete smo odpipetirali po 5 μl vzorca v 2,5 ml epruvete s PBS (Preglednica VII). Epruvete smo premešali s pipeto in vibracijskim mešalnikom.

Preglednica VII: Količine reagentov potrebne za pripravo raztopin vzorcev

V [μL] PBS pH 7,4	V [μL] vzorca	V [μL] barvila
795	5	200

V vsako od 2,5 ml epruvet, tako tistih s standardnimi koncentracijami BSA kot tistimi z

vzorci, smo dodali 200 μ l Bio Rad barvila ter dobro premešal, da se je barvilo enakomerno porazdelilo po raztopini.

Po preteku petih minut so bili standardni in vzorci pripravljeni za nadaljnjo obdelavo. Iz vsake 2,5 ml epruvete smo v ustrezno vdolbinico na mikrotitrski plošči odpipetirali 100 ml raztopine. Postopek smo za vsako 2,5 ml epruveto ponovili, da smo dobili dvojnike (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Prikaz enega izmed možnih nanosov standardov in vzorcev na mikrotitrsko ploščo

(S pomeni standard, V predstavlja vzorec)

	1	2	3	4
A	S1	S1	V1	V1
B	S2	S2	V2	V2
C	S3	S3	V3	V3
D	S4	S4	V4	V4
E	S5	S5	V5	V5
F	S6	S6	V6	V6
G	S7	S7	-	-
H	S8	S8	-	-

Tako nanesenim vzorcem smo merili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Ker obarvan kompleks, ki je nastal med proteinom in BioRad barvilom, razpade v času 30 min, smo morali merjenje narediti v času med 5 min in 30 min po nanosu barvila na standarde in vzorce. Za merjenje smo uporabili TEACAN aparaturo, ki je izmerila absorbanco raztopin na mikrotitrski plošči pri valovni dolžini 595 nm.

S pomočjo računalniške obdelave dobljenih rezultatov smo izračunali enačbo umeritvene krivulje. Z njeno pomočjo smo lahko izračunali koncentracije proteinov v vzorcu, pri čemer smo upoštevali redčenja in korekcijo rezultata s korekcijskim faktorjem.

7.2.4.3. Vezava biotina

Vse sestavine analiznega kompleta za vezavo biotina, razen terminalne deoksinukleotidilne transferaze (TdT), smo odmrznili in postavili na led. TdT smo ohranili na temperaturi -20°C. Pripravili smo delovno raztopino 2 U/ μ l TdT (Preglednica IX).

Preglednica IX: Priprava delovne raztopine TdT s koncentracijo 2 U/ μ l

	za 2 vzorca	za 5 vzorcev
5x TdT reakcijski pufer	2 μ l	5 μ l
prečiščena voda	7 μ l	17,5 μ l
stock TdT [20U/ μ l]	1 μ l	2,5 μ l
skupaj	10 μ l	25 μ l

Pripravili smo vzorce in kontrolne vzorce in jih inkubirali 30 min na temperaturi 37°C. Nato smo v vse 100 μ l epruvete dodali 2,5 μ l 0,2 M EDTA s pH 8.0 in ustavili reakcijo vezave (Preglednica X).

Preglednica X: Priprava vzorcev (1., 2.) in kontrolnega vzorca (3.)

	1	2	3
voda	25 μ l	25 μ l	25 μ l
5x TdT reakcijski pufer	10 μ l	10 μ l	10 μ l
neoznačeni kontrolni oligonukleotid	3 μ l NF + 2 μ l TE	3 μ l NF + 2 μ l TE	5 μ l iz analiznega kompleta
biotin-11-UTP	5 μ l	5 μ l	5 μ l
razredčen TdT [2U/ μ l]	5 μ l	5 μ l	5 μ l
skupni volumen	50 μ l	50 μ l	50 μ l

V vsako 100 μ l epruveto smo dodali 50 μ l raztopine kloroform:izoamil-alkohol v razmerju 24:1. Po kratkem mešanju na vibracijskem mešalniku smo 2,5 ml epruvete 2 min centrifugirali na mikrocentrifugi pri 14.000 obratih na minuto, da sta se fazi ločili. Zgornjo, vodno fazo smo odstranili in shranili za nadaljnjo obdelavo.

Pripravili smo 100 ml TE pufra (Preglednica XI). V njem smo 10 min namakali najlonsko membrano.

Preglednica XI: Priprava 100ml TE pufra

reagent	molska masa [g/mol]	masa [g]
10nM tris*HCl	121,14	0,121
1mM EDTA (pH = 8,0)	372,24	0,037
prečiščena voda	18,0	do 100 ml
umeri s pH metrom do pH = 8,0		

2 μL kontrolnega z biotinom označenega oligonukleotida smo razredčili z 38 μL TE pufra. 2 μL kontrolnega neoznačenega oligonukleotida smo razredčili z 38 μL TE pufra. Pripravljene reagente smo nanegli v 100 μL epruvete (Preglednica XII).

Preglednica XII: Določevanje odstotka vezave biotina na oligonukleotid

% biotina	100	75	50	25	0
z biotinom označen kontrolni oligonukleotid	12 μL	9 μL	6 μL	3 μL	0 μL
neoznačen kontrolni oligonukleotid	0 μL	3 μL	6 μL	9 μL	12 μL
TE pufer	48 μL	48 μL	48 μL	48 μL	48 μL
skupaj	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL	60 μL

Vzorci 1, 2 in 3 smo redčili s TE pufrom do končne koncentracije 10nM tako, da smo 6 μL produkta redčili z 54 μL TE pufra. 50 μL tako pripravljenih raztopin vzorcev in kontrolnih vzorcev smo nanegli na mikrotitrsko ploščico v vdolbinice A6, A7 in A8. V polja A1 – A5 smo dodali 50 μL vzorcev pripravljenih po navodilu (Preglednica XI).

Pripravili smo redčitve vzorcev, ki jih prikazuje Preglednica XII tako, da smo v vdolbinice B1 – H6 dodali 2 μL TE pufra. Iz vdolbinic vrstice A smo vzeli 25 μL raztopine in jih dodali v ustrezne vdolbinice vrstice B. Postopek redčitve smo ponavljali do vrstice H.

Membrano smo vzeli iz TE pufra. S papirno brisačko smo popivnali odvečno tekočino. Membrano smo položili na steklo, da se ni izsušila. Iz mikrotitrsko plošče smo iz vdolbinic A1 – H8 vzeli 2 μL vzorca in ga nanašali na polja na membrani. Nanašali smo previdno, da se vzorec ni razlil po membrani, ampak se je vpil vanjo. Po končanem nanašanju smo izvedli prečno premreženje tako, da smo membrano postavili v G:BOX z zgornjo stranjo proti UV luči in 10 min prečno premrežili s transiluminatorjem.

Tako obdelano membrano smo lahko prihranili za naslednji dan ali pa takoj nadaljevali s postopkom detekcije.

7.2.4.4. Elektroforeza

Pred pričetkom elektroforeze smo pripravili 5x (Preglednica XIII) in 0,5x (Preglednica XIV) TBE puffer in ju ohladili na 4°C.

Preglednica XIII: Priprava 1 l 5x TBE puferske raztopine

Tris base	54 g
borna kislina	27,5 g
0,5M EDTA (pH = 8,0)	20 ml
prečiščena voda	do 1 l

Preglednica XIV: Priprava 4 l 0,5x TBE puferske raztopine

5x TBE	400 ml
prečiščena voda	do 4 l

Sestavili smo aparaturo za elektroforezo. Pripravili smo 5% TE poliakrilamidni gel (Preglednica XV) in ga vlili v prostor med stekelcema. Vložili smo glavniček ustrezne debeline in odstranili morebitne prisotne zračne mehurčke. Počakali smo, da se je gel strdil, kar se je zgodilo med 15 min in 30 min po vlitju gela. Odstranili smo glavniček in aparaturo vložili v kadičko. V kadičko smo vlili 0,5x TBE pufersko raztopino, pri čemer smo notranji žep napolnili do vrha, zunanjšega pa do polovice. Na kadičko smo pritrdili pokrov in izvedli pre-elektroforezo. Pre-elektroforezo smo izvajali 35 min pri stalni napetosti 120 V.

V času, ko je tekla pre-elektroforeza, smo pripravili vzorce in kontrolne pripravke. Pri sobni temperaturi smo jih inkubirali 20 min. Nato smo jih s nežnim pipetiranjem premešali. V vsak vzorec in kontrolni pripravek smo dodali 5 µl nanašalnega pufra ter jih narahlo premešali s pipetiranjem.

Ko je preteklo 35 min, smo prekinili pre-elektroforezo. Luknjice na gelu smo izprali s pufrom. V vsako izmed luknjic smo dodali 20 µl vzorca. Pazili smo, da se je vzorec usedel

na dno žepka. Kadičko smo pokrili s pokrovom in jo priklopili na izvor napetosti. Elektroforezo smo izvajali pri stalni napetosti 120 V, dokler ni bazna linija prepotovala $\frac{3}{4}$ gela. Za to pot je običajno potrebovala 2 h.

Preglednica XV: Priprava 5% nedenaturirajočega gela (2 velika gela)

30% Acryl/Bis A	12,0 ml
5X TBE	7,2 ml
prečiščena voda	52,5 ml
10% APS	717 μ l
TEMED	71,7 μ l

Tedaj smo elektroforezo ustavili, izklopili napetost ter razstavili aparaturo. Iz stekelc smo odstranili gel in ga pripravili za nadaljnjo obdelavo.

7.2.4.5. Prenos na membrano

Dva Whatmanova filter papirja smo obrezali, da smo dobili ustrezno velikost. Na enako velikost smo obrezali tudi najlonsko membrano. En list papirja in membrano smo namočili v 0,5x TBE pufer za 10 min. Pripravili smo Transfer blot aparaturo. Gobice smo za 10 min namočili v 0,5x TBE pufer.

Gel smo z ene od steklenih plošč prenesli na suh Whatmanov blot papir. V 0,5x TBE smo namočili eno stranico plastičnega ogrodja aparature. Nanj smo položili eno predhodno namočeno gobico. Nanjo smo položili blot papir z gelom tako, da je bil papir položen na gobici. Na gel smo položili membrano in s pomočjo valja odstranili zračne mehurčke. Na membrano smo položili drugi Whatmanov blot papir, z valjem odstranili mehurčke ter vse skupaj prekrili z novo, predhodno namočeno gobico.

Ogrodje aparature smo zaprli in zapahnili ter vpeli v kadičko napolnjeno z 0,5 TBE pufrom. Pri tem smo pazili, da je bila stran z gelom na strani negativne elektrode, membrana pa na strani pozitivne. Aparaturo smo priključili na vir napetosti. Prenos na membrano je potekal 30 min pri stalnem toku 380 mA.

7.2.4.6. Prečno premreženje

Po končanem transferju smo še vlažno membrano z označenim nukleinskim ekstraktom

položili v G:BOX tako, da je bila zgornja stran obrnjena proti izvoru UV svetlobe. S pomočjo transiluminatorja, ki je oddajal UV svetlobo, smo prečno premrežili označen nuklearni ekstrakt in membrano. Po končanem premreženju smo membrano shranili v temnem prostoru, da se je posušila.

7.2.4.7. Detekcija z luminolom

Pufer za blokado in 4x spiralni pufer smo ogreli na 50°C, substrat ekvilibrajoči pufer pa na sobno temperaturo. Pripravili smo osušeno najlonsko membrano, na katero smo s prečnim premreženjem v prejšnjih korakih vezali označen nukleinski ekstrakt.

20 ml pufra za blokado smo nanесли na membrano in ob rahlem stresanju inkubirali 15 min. Pufer za blokado smo odlili in prilili 20 ml svežega pufra za blokado z dodanim 66,7 µl stabiliziranim streptavidinom HRP, tako da je bilo razmerje 1:300. Ob rahlem stresanju smo inkubirali membrano nadaljnjih 15 min.

V tem času smo pripravili spiralni pufer tako, da smo 40 ml 4x spiralnega pufra dodali 120 ml prečiščene vode. Blokirajoč pufer s konjugatom smo odlili, membrano prenesli v čisto kadičko in jo sprali s pripravljenim spiralnim pufrom. Spiranje je potekalo 5 min pri rahlem stresanju. Po petih minutah smo spiralni pufer odlili in membrano prelili z novim spiralnim pufrom (20 ml) ter ob blagem stresanju spirali 5 min. Postopek spiranja smo ponovili skupno štirikrat.

Membrano smo prenesli v novo kadičko in dodali 30 ml substrat ekvilibracijskega pufra. Ob rahlem stresanju smo inkubirali 5 min. V tem času smo pripravili raztopino 6 ml luminola in 6ml stabilne peroksidne raztopine. Membrano smo po petih minutah prenesli v novo kadičko in jo prekrili z mešanico luminola in peroksidne raztopine. Kadičko smo za 5 min postavili v temen prostor, pri čemer smo preprečili morebitno stresanje.

Membrano smo po petih minutah vzeli iz kadičke in rob naslonili na papirnato brisačo, da se je odvečna raztopina vpila. Zavili smo jo v plastiko, da smo membrano ohranili vlažno. Pri tem smo se izogibali nastanku mehurčkov in gubic, ki bi lahko vplivali na rezultat. Še vlažno membrano smo z zgornjo stranjo obrnjeno proti kameri postavili v G:BOX in slikali.

Slikanje je potekalo pri maksimalno odprti zaslonki. Čas odprtosti zaslonke smo prilagajali med 5 min in 15 min, najbolj optimalne rezultate smo dobili pri 10 min slikanju. Sliko smo nato obdelali v programu GeneSnap.

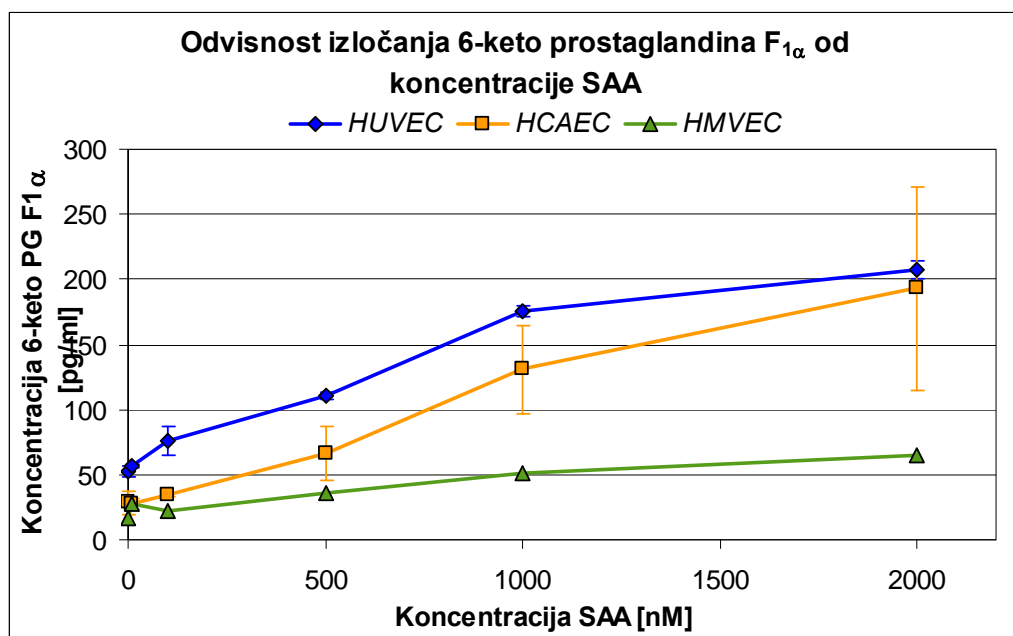
8. Rezultati

8.1. Določanje koncentracije izločenega 6-keto prostaglandina $F_{1\alpha}$ iz primarnih endotelijskih celic

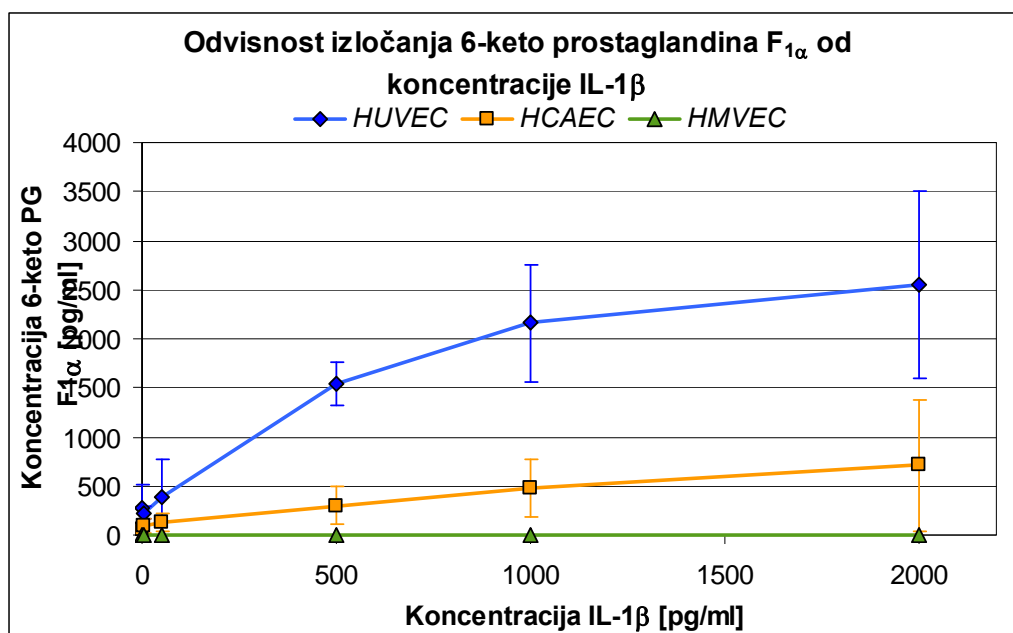
8.1.1. Odvisnost izločanja 6-keto prostaglandina $F_{1\alpha}$ od koncentracije stimulatorja

Koncentracija izločenega 6-keto $PGF_{1\alpha}$ iz vseh treh primarnih humanih endotelijskih celičnih tipov z večanjem koncentracije SAA in IL-1 β narašča. Naraščanje ni linearno ampak potenčno, pri vseh treh celičnih tipih se namreč pri največjih koncentracijah stimulatorja prične pojavljati plato. Vendar pa so uporabljene koncentracije stimulatorjev prenizke, da bi bil razločno viden (Slika 7, Slika 8, Slika 9).

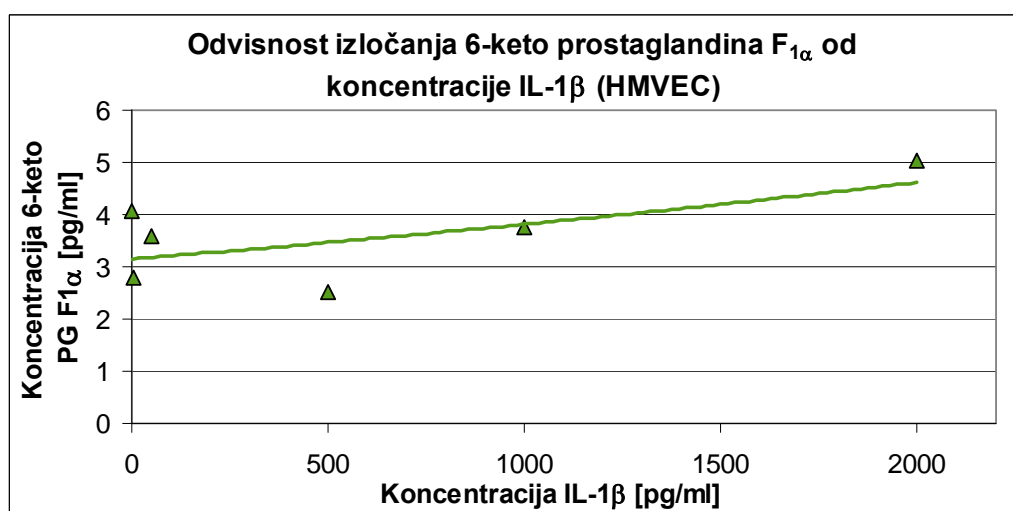
Opazimo lahko, da je IL-1 β povzročil izločanje večje količine 6-keto $PGF_{1\alpha}$ od SAA. Razlika med z IL-1 β povzročenim (2 μ g/l) izločanjem 6-keto $PGF_{1\alpha}$ pri HUVEC in HCAEC je kar 5x-na, medtem ko pri s SAA stimuliranim izločanjem 6-keto $PGF_{1\alpha}$ pri HUVEC in HCAEC ni bistvene razlike. Za nadaljnje delo smo uporabili koncentracije, kjer je bil dosežen plato (konc. SAA = 1 μ M, konc. IL-1 β = 1 μ g/l).



Slika 7: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto $PGF_{1\alpha}$ v odvisnosti od koncentracije SAA: primerjava med različnimi tipi endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)



Slika 8: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1α} v odvisnosti od koncentracije IL-1β: primerjava med različnimi tipi endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)



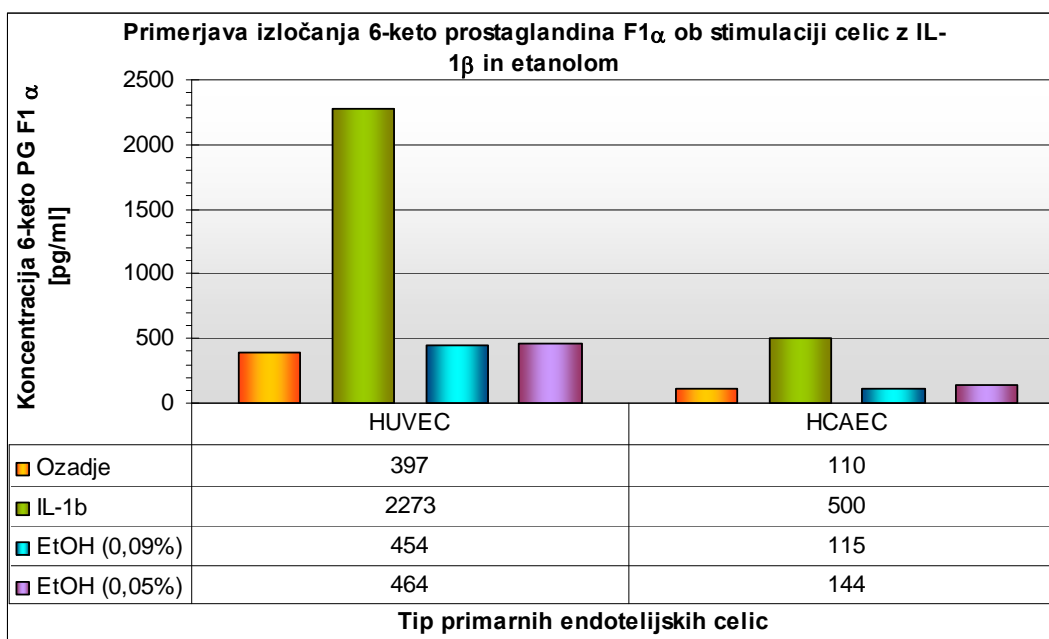
Slika 9: Povečava prikaza spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1α} v odvisnosti od koncentracije IL-1β pri HMVEC

8.1.2. Vpliv etanola na primarne humane endotelijske celice

LXA₄ in resveratrol, ki smo jih v nadaljnjih eksperimentih uporabljali kot potencialna inhibitorja, sta raztopljena v etanolu. Zato smo želeli ugotoviti vpliv etanola samega na endotelijske celice.

Etanol je tako pri celičnem tipu HUVEC kot tudi pri celičnem tipu HCAEC sicer malo

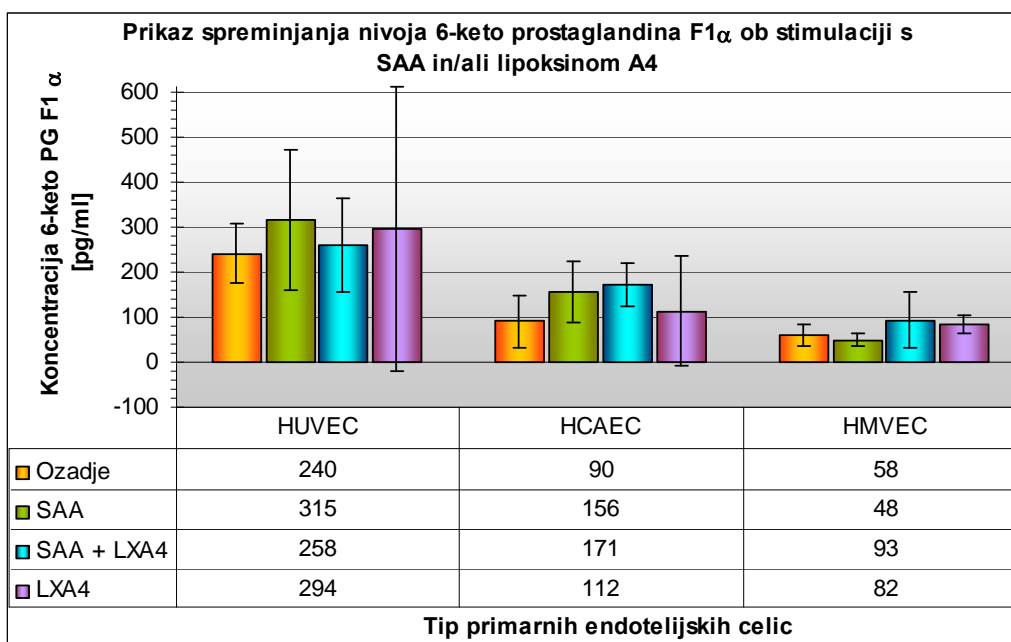
povečal izločanje 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, a je to povečanje premajhno, da bi ga lahko ločili od napake metode. IL-1 β smo uporabili kot pozitivno kontrolo in je deloval stimulatивно, odziv celic nanj je bil mnogo večji kot pa odziv celic na etanol, ki je bil primerljiv z ozadjem. Tako smo dodali 1 μl etanola, kar je v mediju predstavljalo 0,05% raztopino etanola in je bilo enako volumnu dodanega resveratrola, ter 1,85 μl etanola, kar je v mediju predstavljalo 0,09% raztopino etanola in je bilo enako volumnu dodanega lipoksina A_4 . (Slika 10).



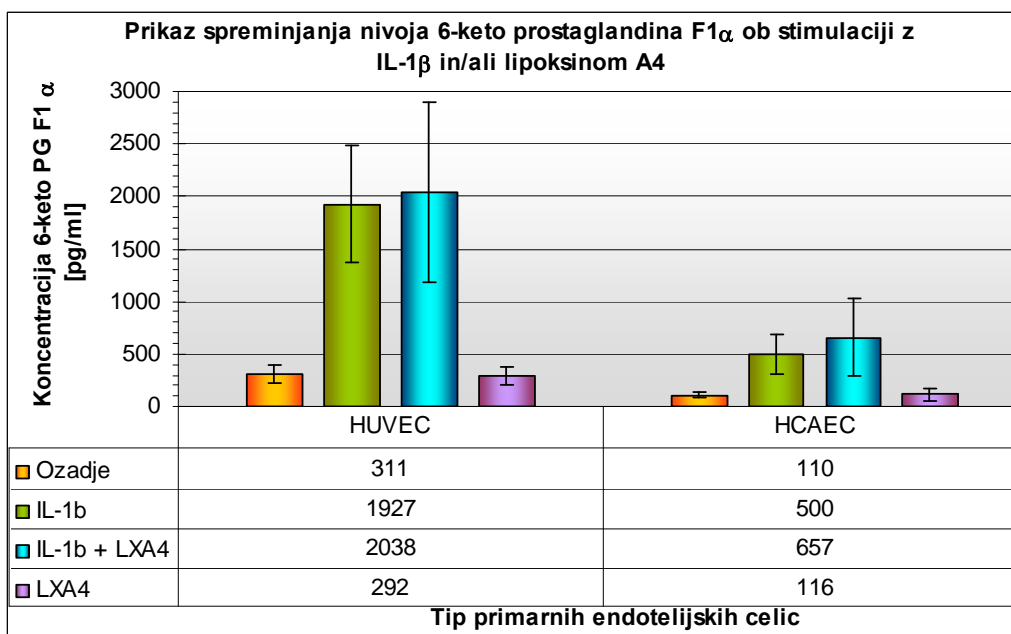
Slika 10: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ ob stimulaciji s IL-1 β ali etanolom: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic

8.1.3. Vpliv lipoksina A_4 na primarne humane endotelijske celice

Pri HUVEC in HMVEC smo po dodatku LXA_4 opazili porast koncentracije 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, pri HCAEC pa padeč koncentracije 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Slika 11, Slika 12). Koncentracije 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ se značilno ne razlikujejo od koncentracij 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ pri celicah, ki jih nismo stimulirali in tudi ne od tistih stimuliranih samo s SAA ter SAA in lipoksinom A_4 . Celice, stimulirane z IL-1 β in lipoksinom A_4 kažejo rahlo večji odziv kot celice stimulirane samo z IL-1 β , a so razlike premajhne, da bi jih lahko označili kot značilne.



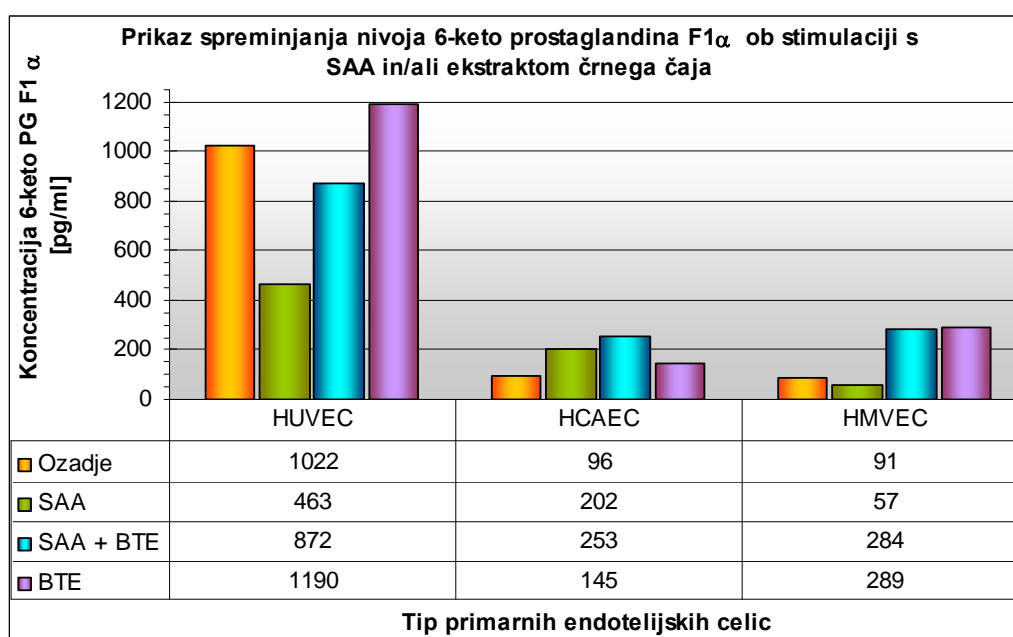
Slika 11: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1 α} ob stimulaciji s SAA in/ali lipoksinom A₄: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)



Slika 12: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1 α} ob stimulaciji z IL-1 β in/ali lipoksinom A₄: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)

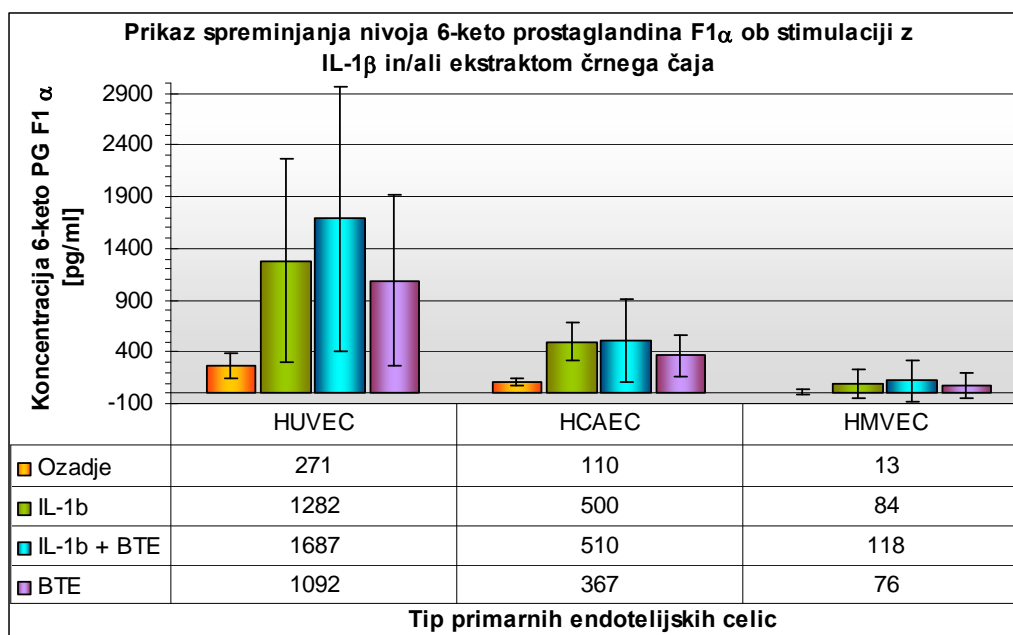
8.1.4. Vpliv ekstrakta črnega čaja na primarne humane endotelijske celice

Pri seriji poskusov stimulacije HUVEC in HMVEC s SAA in ekstraktom črnega čaja smo zaradi visokega odziva celic, ki niso bile stimulirane, pokazali, da SAA deluje kot inhibitor. HCAEC so ob stimulaciji s SAA pričele proizvajati več 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$. Vidimo lahko, da so celice vseh treh celičnih tipov po stimulaciji z ekstraktom črnega čaja pričele proizvajati večje količine PGI_2 tako proti nestimuliranim celicam kot tudi proti s SAA stimuliranim celicam istega celičnega tipa, kar lahko vidimo v povečani koncentraciji določenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Slika 13).



Slika 13: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ ob stimulaciji s SAA in/ali ekstraktom črnega čaja: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic

Pri poskusih stimulacije celic z $\text{IL-1}\beta$ je le-ta v vseh treh celičnih tipih povečal izločanje PGI_2 . Povečano izločanje PGI_2 je v vseh treh celičnih tipih povzročil tudi ekstrakt črnega čaja. Pri stimulaciji celic z $\text{IL-1}\beta$ in ekstraktom črnega čaja smo opazili rahlo povečanje koncentracije izločenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, kar je, glede na ostala zgoraj omenjena rezultata, tudi pričakovano (Slika 14). Z uporabo parnega t testa pri $\alpha = 0,05$ pa nismo mogli dokazati značilne razlike med določeno koncentracijo 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, izločenega med različno stimuliranimi celicami.

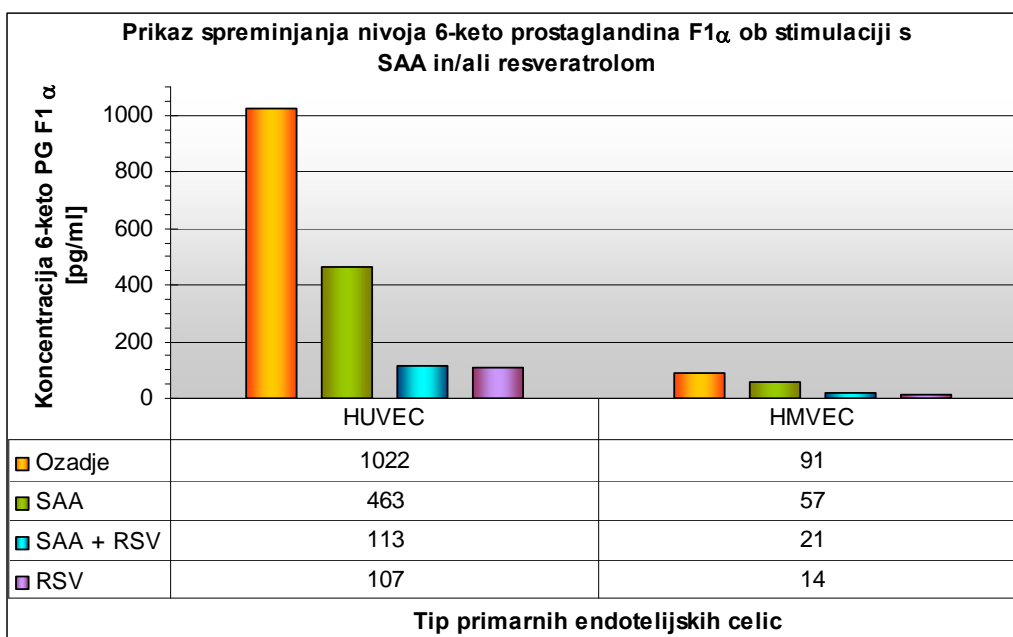


Slika 14: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF $_{1\alpha}$ ob stimulaciji z IL-1 β in/ali ekstraktom črnega čaja: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)

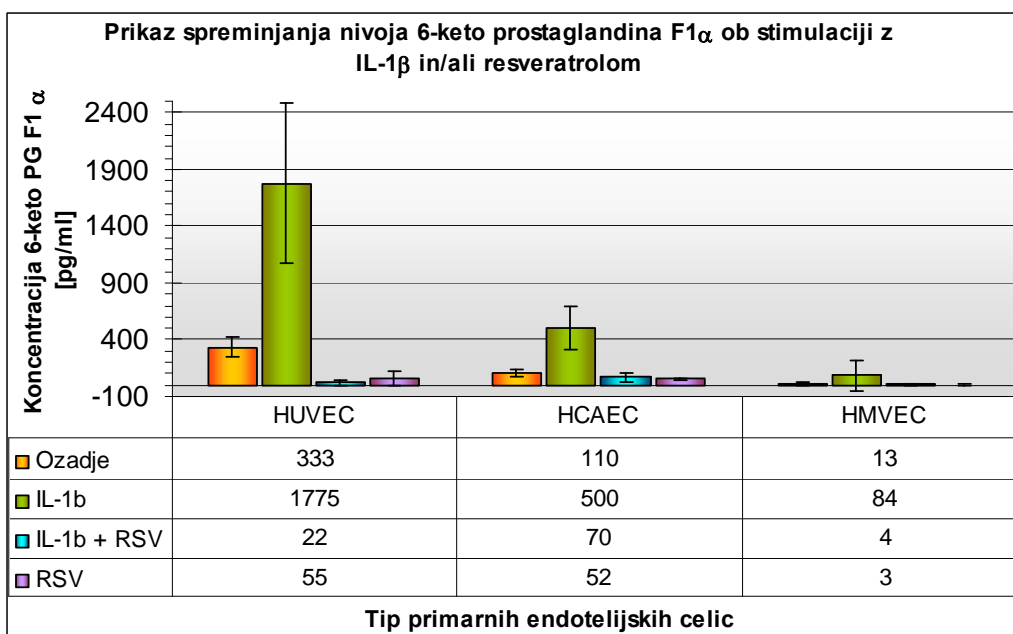
8.1.5. Vpliv resveratrola na primarne humane endotelijske celice

Resveratrol je povzročil močno znižanje koncentracije 6-keto PGF $_{1\alpha}$ v HUVEC in HMVEC, iz česar lahko sklepamo, da je inhibitor izločanja PGI $_2$. Znižanje koncentracije 6-keto PGF $_{1\alpha}$ na omenjenih celičnih tipih je povzročil tudi v primeru, ko smo celice stimulirali s SAA in resveratrolom (Slika 15, Slika 16).

Znižanje koncentracije 6-keto PGF $_{1\alpha}$ je bilo pri HUVEC značilno (parni t-test, $\alpha = 0,05$), medtem ko pri ostalih dveh celičnih tipih značilnega znižanja nismo dokazali, čeprav se iz grafičnega prikaza rezultatov vidi trend upada koncentracije. Pri HUVEC smo dokazali tudi značilno znižanje koncentracije 6-keto PGF $_{1\alpha}$ tudi v primeru stimulacije z IL-1 β in hkratne inhibicije z resveratrolom (parni t-test, $\alpha = 0,05$), medtem ko med izločeno koncentracijo PGI $_2$ pri celicah stimuliranih z resveratrolom in IL-1 β ter pri celicah stimuliranih z resveratrolom ta razlika ni značilna (parni t-test, $\alpha = 0,05$).



Slika 15: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1 α} ob stimulaciji s SAA in/ali resveratrolom: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic

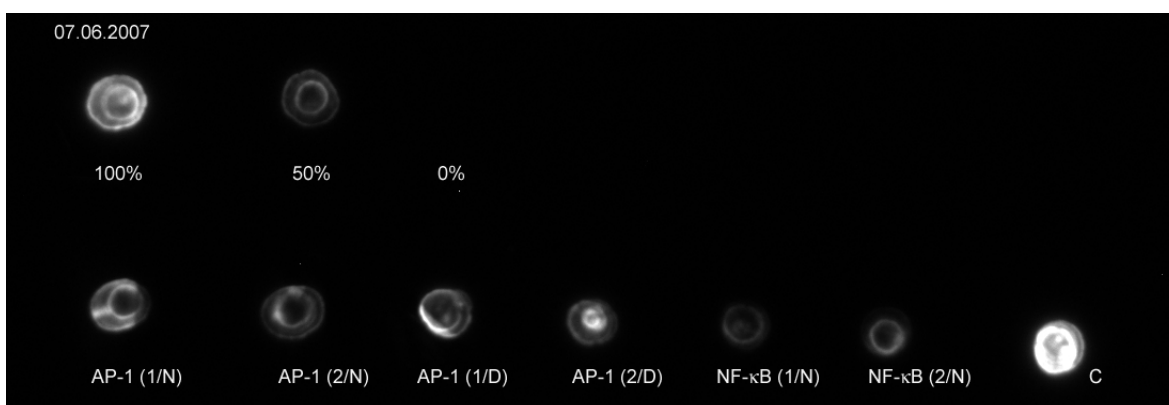


Slika 16: Prikaz spreminjanja nivoja 6-keto PGF_{1 α} ob stimulaciji z IL-1 β in/ali resveratrolom: primerjava znotraj posameznih tipov primarnih endotelijskih celic (označeni so standardni odkloni)

8.2. Določevanje NF- κ B z uporabo testa zamika elektroforezne mobilnosti

8.2.1. Postavitev in testiranje metode

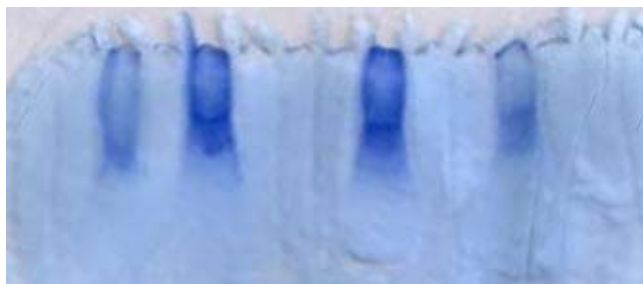
Po protokolih EMSA smo izvedli določevanje NF- κ B DNA vezave. Supernatante, ki smo jih odvzeli stimuliranim celicam, smo ustrezno obdelali in shranili. Iz celic smo izolirali citoplazemske in nuklearne ekstrakte. Nuklearni ekstrakti so vsebovali proteine, katerih koncentracijo smo dokazali z uporabo metode po Bradfordu za določanje proteinov. Na nukleotidno zaporedje specifično za NF- κ B smo vezali biotin. Iz rezultatov, ki smo jih dobili, lahko razberemo, da je bila stopnja vezave do 50%. S programskim določevanjem odstotka vezave biotina na nukleotidno zaporedje smo določili, da je bila vezava približno 30% (Slika 17).



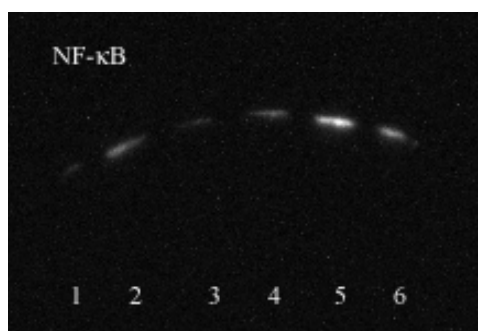
Slika 17: Test uspešnosti vezave biotina na nuklearne faktorje.

Na ne-denaturiran PAGE gel smo nanegli nuklearne ekstrakte v kombinaciji z biotinom označenim NF- κ B oligonukleotidom. Ustreznost pogojev elektroforeze smo preizkusili z barvanjem gela v Comassiejevem briljantnem modrilu, ki proteine v gelu obarva temno modro (Slika 18). Čeprav je bila membrana pozitivno nabita, in je vezala proteine, smo želeli preveriti morebitno uhajanje proteinov iz membrane. Hkrati smo iz rezultatov želeli izključiti človeško napako zamenjave katode in anode. To smo dosegli z barvanjem membrane s Ponceaujevim rdečilom. Membrana se je pri barvanju obarvala svetlo rdeče, na njej pa so se pojavile temno rdeče lise na mestih, kjer naj bi se nahajali proteini. S tem smo dokazali, da membrana po prenosu vsebuje proteine.

Detekcijo smo izvedli po protokolu. Na dobljeni sliki (Slika 19) vidimo eno linijo, ki predstavlja nevezan biotin. Na sliki nismo zaznali z biotinom označenega NF- κ B oligonukleotid.



Slika 18: V Comassiejevem briljantnem modrilu obarvan gel z nanesenimi nuklearnimi ekstrakti po elektroforezi.



Slika 19: Detekcija biotina na membrani. Slikanje z uporabo G:BOX aparature, čas slikanja 5 min. Vidimo biotin.

8.2.2. Optimizacija metode

Za postavitev in optimizacijo metode zamika elektroforezne mobilnosti smo postopek prilagodili (Preglednica XVI).

Reagente, ki smo jih tekom posameznih stopenj uporabili, smo ves čas hranili na ledu, tako da smo znižali čas njihove izpostavljenosti sobnim temperaturam.

75 cm² gojitvene posode smo po strganju pregledali pod mikroskopom, da smo ugotovili uspešnost odstranitve celic iz dna. V kolikor smo v posodi pustili preveliko količino celic, smo strganje in izpiranje ponovili.

Pri elektroforezi smo uravnavali hitrost potovanja vzorca po gelu s spreminjanjem toka in

napetosti ter časa potovanja toka po gelu. Uspešno smo odstranili robni efekt, ki je bil opazen kot ukrivljenost barvila robnih nanosov. Enakomeren in dovolj hiter prehod iz žepka v gel smo zagotovili z uporabo stalne napetosti 120 V. Čas poteka elektroforeze smo tako omejili na dve uri, kar je bil tudi čas, ko je spodnje barvilo prepotovalo $\frac{3}{4}$ dolžine gela.

Metoda	Uporabljene vrednosti
vezava biotina:	
• spreminjanje biotin-11-UTP	<u>5 μl</u> , 6 μ l, 10 μ l
• spreminjanje TdT	<u>5 μl</u> , 10 μ l
inkubacija kompleksa:	
• količina označenega oligonukleotida	20 fmol, 40 fmol, 60 fmol, 80 fmol
• količina nuklearnega ekstrakta	<u>10 μg</u> , 15 μ g, 20 μ g, 30 μ g, 50 μ g, 60 μ g
• čas	<u>20 min</u> , podaljševali do 35 min
elektroforeza:	
• čas	1 h, 1,5 h, <u>2 h</u> , 3 h
• napetost	<u>120 V</u>
• tok	<u>25 mA</u>
prenos na membrano:	
• Comassiejevo briljantno modrilo	na gelu ni temno modrih lis – prenos proteinov na membrano je bil uspešen
• Ponceaujevo rdečilo	na membrani so temno rdeče lise – proteini so na membrani
prečno premreženje:	
• čas	3 min, 5 min, <u>10 min</u> , <u>15 min</u>
detekcija:	
• delo z luminolom	delo v temi, brez stresanja
• čas slikanja	2 min, 5 min, 10 min , 20 min
• pogoji G:BOX	polno odprta zaslonka, občutljivost senzorja nastavljena na kvaliteto slike

Preglednica XVI: Spremembe in testi, ki smo jih izvedli med postavitvijo in izboljševanjem metode zamika elektroforezne mobilnosti. V protokolih podane vrednosti so prikazane podčrtano, odebeljeno pa tiste, ki smo jih uporabili pri delu.

Transfer iz gela na membrano smo izvedli z uporabo Transfer blot aparature pri stalnem toku 380 mA. Prenos je trajal 30 min. Z barvanjem gela pred in po prenosu (barvanje v Comassiejevem briljantnem modrilu) smo zagotovili, da se je ves detektirani produkt v tem času prenesel iz gela na membrano. Z barvanjem membrane po prenosu vzorca (barvanje v Ponceaujevem rdečilu) iz gela na membrano smo dokazali, da je vzorec prenesen na membrano in da je prenos ustrezen.

Detekcija je potekala v skladu s protokolom analiznega kompleta. Zadnji del smo zaradi občutljivosti kompleksa luminol-peroksid izvajali v temi, kar je dalo boljše rezultate kot pri izvajanju detekcije tega dela detekcije na svetlobi. Slikanje membrane z uporabo G:BOX aparature smo prilagodili našim pogojem. Pri tem smo programsko odprti zaslonko na njen najbolj odprti položaj. Poiskali smo najbolj ugoden čas slikanja (glede na odprtost zaslonke) in ugotovili, da dobimo najboljšo sliko, ko slikanje traja 10 min. Z optimizacijo smo izboljšali metodo in dobili slike z boljšo ločljivostjo.

9. Razprava

9.1. Določevanje vplivov stimulatorjev in inhibitorjev na izločanje prostaciklina v primarnih humanih endotelijskih celicah

Prostaciklin (PGI_2), močan vazodilatator in inhibitor agregacije trombocitov, je v organizmu slabo obstojna spojina, ki v organizmu v nekaj minutah, v ustreznem pufru pa v pol ure, razpade na stabilne razgradne produkte. Najpomembnejši razgradnji produkt je 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, literatura pa navaja tudi 6,15-diketo $\text{PGF}_{1\alpha}$ (16). Analizni komplet, ki smo ga imeli na voljo, zagotavlja zanesljivo spremljanje sprememb izločanja PGI_2 prek določevanja izločenega razgradnega produkta 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ (50).

Izhajali smo iz hipoteze, da je PGI_2 protivnetna snov z ugodnimi učinki, ki so potrebni za ponovno vzpostavitev mirujočega stanja celic, ki je odvisna od COX-2.

Ker iz literature ni znano, ali SAA lahko vpliva na PGI_2 , je bila naša prva naloga ugotoviti vlogo na izločanje PGI_2 v primarnih humanih endotelijskih celicah. Naše delo smo pričeli z merjenjem odvisnosti izločenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ od naraščajočih koncentracijah stimulatorja SAA. Ugotovili smo, da se z večanjem koncentracije SAA večja tudi odziv celic nanj. Večanje izločanja PGI_2 pa ni linearno, naklon premice interpolacijske premice pri najvišjih uporabljenih koncentracijah upada. Čeprav plato pri uporabljenih koncentracijah še ni viden, pa nanj lahko sklepamo iz zmanjšanega naklona krivulj. Ugotovili smo, da se je na SAA najbolj odzval tip celic HUVEC, sledil mu je HCAEC, medtem ko so se HMVEC ob stimulaciji odzvale v komaj opaznem obsegu. Za nadaljnje delo smo uporabili SAA v koncentraciji 1 μM , saj se je tu že začel nakazovati plato.

Preverili smo tudi vpliv naraščajočih koncentracij IL-1 β na izločanje PGI_2 iz primarnih humanih endotelijskih celic. Ugotovili smo, da z večanjem koncentracije IL-1 β narašča tudi koncentracija izločenega PGI_2 . Tudi tu, podobno kot pri stimulaciji s SAA, naraščanje ni linearno, ampak se pri najvišjih uporabljenih koncentracija prične pojavljati plato, ki pa ga pri naši najvišji uporabljeni koncentraciji stimulatorja še nismo dosegli. Ugotovili smo, da je bil najbolj odziven tip celic na IL-1 β HUVEC, nato HCAEC in HMVEC. Koncentracije izločenega PGI_2 pri HMVEC so bile na meji zaznavnosti metode. Za nadaljnje delo smo uporabili IL-1 β v koncentraciji 1 $\mu\text{g/l}$. Rezultate potrjujejo tudi druge

študije, pri katerih so po štiriindvajset urni inkubaciji HUVEC stimuliranih z IL-1 β v koncentraciji 1 μ g/l zaznali značilno zvišanje razgradnega produkta PGI₂, 6-keto PGF_{1 α} (51).

Opazili smo razlike med različnimi tipi primarnih endotelijskih celic. HUVEC so se izkazale za najbolj odzivne celice pri stimulaciji s SAA in IL-1 β . Posebej visok odziv je bil pri stimulaciji z IL-1 β , ki je bil kar 5x višji kot v HCAEC, ki pa so se ob stimulaciji z SAA odzvale v podobnem obsegu kot HUVEC. Za celična tipa HCAEC ali HMVEC do sedaj še ni bilo objavljenih podatkov o nivojih 6-keto PGF_{1 α} . Najmanj odzivni tip celic je bil HMVEC, katerega odziv je bil tako nizek, da so bila nihanja komaj opazna in bi jih lahko pripisali napaki metode (50).

Stimulacija primarnih humanih endotelijskih celic z lipoksinom A₄ ni vplivala na izločanje PGI₂. Izmerjene koncentracije 6-keto PGF_{1 α} pri tipu celic HUVEC in HMVEC so sicer višje pri z lipoksinom A₄ stimuliranih celicah v primerjavi z nestimuliranimi, a je ta razlika majhna in jo ne moremo označiti kot značilno. Pri celičnem tipu HCAEC je zaznati rahel upad koncentracije izločenega PGI₂, a tudi ta razlika je tako majhna, da jo lahko pripišemo napaki metode. Celice, stimulirane s stimulatorjem vnetja (SAA ali IL-1 β) in lipoksinom A₄, so v primerjavi s celicami, stimuliranimi samo s SAA ali z IL-1 β , pokazale povečano izločanje PGI₂. Nasprotno se je pokazalo samo pri tipu celic HUVEC, stimuliranih s SAA, kjer je bila koncentracija PGI₂, ki so jo izločile celice, stimulirane s SAA in lipoksinom A₄, nižja od tiste, ki so jo izločile celice, stimulirane samo s SAA. Ugotovitve se skladajo s podatki v literaturi, kjer so pri HUVEC ugotovili stimulativen učinek lipoksina A₄ na izločanje PGI₂, a razlika ni bila značilna (52).

V nadaljevanju smo ugotovili, da ekstrakt črnega čaja v vseh treh uporabljenih tipih celic poveča izločanje PGI₂. Pri HUVEC in HMVEC je bolj učinkovit stimulator izločanja PGI₂ kot SAA, medtem ko je pri HCAEC od SAA manj učinkovit. Manj učinkovit je tudi od IL-1 β .

Povečano izločanje PGI₂ v endotelijskih celicah zaradi stimulacije z ekstraktom črnega čaja je delno v nasprotju z našimi pričakovanji. Ker črni čaj velja za inhibitorja vnetja, SAA pa je eden izmed stimulatorjev, smo pričakovali, da bo ekstrakt črnega čaja prek COX inhibiral izločanje PGI₂. Znano je namreč, da je izločanje PGI₂ odvisno od prisotnosti COX-2 (Vir 58). Vendar pa so nekatere študije ugotovile, da črni čaj ne vpliva na COX-2

(54). Znano je tudi, da flavoni v ekstraktu črnega čaja delujejo prek inhibicije adenilat ciklaze na trombocitni cAMP odziv celic na PGI₂ (55).

Druga možna razlaga, zakaj črni čaj kot inhibitor vnetja povzroča povišano sproščanje PGI₂, temelji na tem, da je PGI₂ zgolj eden od številnih modulatorjev vnetja. Že TXA₂, ki prav tako nastaja iz arahidonske kisline pod vplivom COX, ima PGI₂ nasprotne učinke (5). Razmerje med PGI₂ in TXA₂ je lahko eden od dejavnikov, ki sproži ali zavre vnetje. Pri razlaganju rezultatov in njihovi prenosljivosti v realne situacije se moramo zavedati, da so poskusi izvedeni v kontroliranih laboratorijskih pogojih. Uporabili smo primarne humane endotelijske celice, ki so primer *ex vivo* modela, in se s tem približali človeškemu organizmu. Vendar ker uporabljamo izolirano celično kulturo in ne tkivo znotraj organizma, so poskusi zgolj približek realnega stanja in odstopanja so možna. V organizmu je možnih namreč več mehanizmov regulacije vnetnega procesa, medtem ko v kontroliranih pogojih celične kulture ne prihaja do vplivov ostalih tkiv, organov in organizma (35, 56).

Omenil bi še posebnost pri poskusu stimulacije celic tipa HUVEC z ekstraktom črnega čaja in SAA. Zaradi nenavadno visoke koncentracije 6-keto PGF_{1α} v supernatantu celic, ki niso bile podvržene stimulaciji (ozadje), je v stimuliranih celicah videti, kot bi SAA inhibiral izločanje 6-keto PGF_{1α}. Ostali poskusi, izvedeni na tem celičnem tipu, kažejo stimulacijo izločanja 6-keto PGF_{1α} pod vplivom SAA. Tako lahko sklepamo, da je v celični kulturi, ki je nismo stimulirali, prišlo do neke motnje, zaradi katere so celice pričele prekomerno izražati PGI₂. Čeprav iz tega poskusa ne moremo razbrati vpliva ekstrakta črnega čaja na ta celični tip, pa lahko iz razmerja med izmerjenima 6-keto PGF_{1α} v celicah stimuliranih s SAA in v celicah, stimuliranih z ekstraktom črnega čaja, razberemo, da je ekstrakt črnega čaja boljši stimulator izločanja PGI₂ kot SAA. To ugotovitev potrди tudi serija poskusov, kjer smo stimulirali celice z IL-1β in ekstraktom črnega čaja. Pri njej smo ob normalnem ozadju ugotovili, da ekstrakt črnega čaja poveča izločanje PGI₂.

Resveratrol je pri vseh treh celičnih tipih endotelijskih celic močno znižal izločanje PGI₂ pod koncentracijo, ki so jo izločile že nestimulirane celice. Prav tako je resveratrol inhibiral proizvodnjo PGI₂ tudi v celicah, ki smo jih predhodno stimulirali s stimulatorjem vnetja (SAA ali IL-1β). Tudi v teh celicah je prišlo do znižanja koncentracije PGI₂ pod koncentracijo, ki so jo izločile nestimulirane celice. Resveratrol med drugim protivnetnim delovanjem inhibira aktivacijo vnetnih nuklearnih faktorjev NF-κB in AP-1 (31, 32) ter

prepreči transkripcijo mRNA zapisa za tkivni faktor (33). NF- κ B in AP-1 sta pomembna transkripcijska faktorja za encim COX, ki sproži sintezo prostaglandinov, med drugimi tudi PGI₂, iz arahidonske kisline. Inhibicija omenjenih transkripcijskih faktorjev tako pomeni zmanjšanje količine COX ter zmanjšanje sinteze prostaglandinov iz arahidonske kisline.

Preverili smo tudi vpliv etanola na izločanje PGI₂, saj sta bila tako LXA₄ kot resveratrol raztopljena v etanolu. Ugotovljeno je bilo, da kronično uživanje alkohola spodbuja izločanje vnetnih dejavnikov (IL-1, IL-6, TNF) in niža nivo IFN- γ (57). Akutno uživanje alkohola inducira vnetne mediatorje in citokine, znano je tudi, da vpliva na dvig koncentracije prostaglandina E₂ (57). Koncentracije etanola, ki smo jih uporabili, so bile enake koncentracijam etanola, v katerih sta bila raztopljena LXA₄ in resveratrol. Ekstrakt črnega čaja, SAA in IL-1 β so bili raztopljeni v vodi. V kolikor bi ugotovili, da kakšno od gojišč, ki smo jih uporabili pri raztapljanju naših reagentov, vpliva na izločanje PGI₂, bi to morali upoštevati pri interpretaciji rezultatov. Koncentracije 6-keto PGF_{1 α} so sicer malo večje pri z etanolom stimuliranih celicah kot pri nestimuliranih celicah, a so razlike zelo majhne in jih ne moremo označiti kot značilne. Razlika je bila tako majhna, da bi jo lahko pripisali nihanju v izločanju PGI₂ znotraj celičnih kultur.

Pri rezultatih lahko opazimo nihanja v izmerjenih koncentracijah 6-keto PGF_{1 α} . Nihanja so opazna tako pri nestimuliranih celicah kot tudi pri stimuliranih. Lahko jih pripišemo različnim pasażam celic, različnemu izvoru celičnih kultur, določena nihanja pa so prisotna tudi, ker so celice živi organizmi, za njih pa so značilna nihanja v odzivih zaradi različnih zunanjih in tudi notranjih dejavnikov. Do razlik lahko pride zaradi različnega spola, starosti in rase darovalcev ter zaradi različne starosti ter pasaže celic (35). Uporabili smo celice tretje, četrte, pete in šeste pasaže. Najpogostejši pasaži sta bili peta in šesta. Celice so izvirale tako iz moških kot iz ženskih darovalcev, katerih starost se je gibala od 19 let do 56 let. Med njimi so bili predstavniki bele, hispanske, azijske in črne rase. Pomembno je tudi omeniti, da smo poskuse opravili s celicami tipa HUVEC, ki so bile pridobljene s kolekcijo iz več donorjev, medtem ko so bile celice HCAEC ter HMVEC pridobljene iz enega donorja. Za razliko od slednjih pri prvih spol, starost celic in rasa niso določeni. Do spremembe odzivnosti celic lahko pripelje tudi okužba kulture. Okužene kulture pričnejo odmirati, pred tem pa kot odziv na okužbo pričnejo izločati velike količine vnetnih faktorjev. Vendar pa se zaradi odmiranja celic taka kultura pod mikroskopom loči od ostalih (35). Ostali dejavniki, ki vplivajo na odzivnost celic, so: temperatura okolice,

temperatura gojišča in reagentov, hitrost dela s celicami, starost celične kulture ter predhodno shranjevanje celic (zmrzovanje).

V določenih primerih smo prilagodili metodo dela tako, da smo na analizni plošči pridobili mesto še za en vzorec. To nam je omogočal protokol dela (50), ki predpisuje vsaj dve polji za maksimalno vezavo (B_0) in ne tri, za katere je narejen načrt protokola. Prav tako protokol (50) sam ne predpisuje polja za polno aktivnost (TA), ki ni potreben za obdelavo rezultatov, ampak le kot diagnostično sredstvo, če metoda ne bi delovala. Eno polje B_0 smo izpustili, ko smo ugotovili, da nam ELISA daje dobre, zanesljive in ponovljive rezultate, in na njegovo mesto nanesti vzorec. Prav tako smo, ker je metoda delovala, lahko izpustili polje TA in v zanj pripravljeno vdolbinico nanesti vzorec.

Pri rezultatih smo pogosto naleteli na situacijo, kjer so vse narejene ponovitve poskusa pokazale določen dvig ali upad koncentracije izločenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$, a so se koncentracije izločenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ med seboj močno razlikovale.. Izračun standardne deviacije je tako pokazal, da se koncentracijska območja izločenega 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ pri nestimuliranih celicah, celicah stimuliranih s stimulatorjem vnetja in celicah stimuliranih z inhibitorji vnetja prekrivajo.

9.2. Določevanje NF- κ B z uporabo metode zamika elektroforezne mobilnosti

Določevanje DNA vezave transkripcijskih faktorjev je postopek, sestavljen iz številnih metod. Čeprav so vse znane in pogosto uporabljene, smo morali biti zaradi števila stopenj pozorni na izgube, do katerih lahko pride med celotnim postopkom. Vsako metodo, ki smo jo izvedli, smo temeljito preverili in poskušali izboljšati tako, da bi izgube čim bolj zmanjšali. Rezultat so transkripcijski faktorji, vezani na DNA, katera je odvisna od tipa in stimulacije celic, načina detekcije, ... Metoda določevanje DNA vezave transkripcijskih faktorjev nam omogoča vpogled v regulacijo transkripcije in za določevanje NF- κ B vezave smo izbrali metodo EMSA, saj je to ena glavnih in uveljavljenih metod za določevanje vezave proteinov ali njihovih kompleksov na DNA. Določevali smo vpliv akutnega SAA na NF- κ B, saj do sedaj še ni bil dokazan v primarnih endotelijskih celicah koronarne arterije. Za izboljšanje detekcije smo si pripravili večje količine nuklearnega ekstrakta. To smo dosegli z povečanjem števila celic, za kar kar smo uporabili 75cm^2 gojitvene posode (58).

Pri postopku izolacije nuklearnega ekstrakta je kot posledica centrifugiranja prišlo do nastanka usedline, ki jo je bilo potrebno resuspendirati. Prva usedlina je bila rahla in njeno resuspendiranje ni predstavljalo težav, druga usedlina pa je bila trda in njeno resuspendiranje težje. Zaradi tega je verjetno prihajalo do določenih izgub, ki so se odražale na končnem rezultatu zaznanih kompleksov.

Stopnja vezave biotina na nukleotidno zaporedje je bila v našem primeru nizka. Za izboljšanje stopnje označevanja bi bilo potrebno prilagoditi metodo vezave biotina na nukleotidno zaporedje. Ker smo mi uporabili dvovijačno DNA in je bilo potrebno pred označitvijo dvojno vijačnico denaturirati, označiti, nato pa renaturirati, so bile določene izgube v označitvi. Kot izboljšanje bi lahko kupili enovijačno nukleotidno zaporedje in poskusili biotin vezati na le-tega, nato pa združiti oba s čimer bi se izognili izgubam signala kot posledica nizke vezave biotina na NF- κ B DNA fragment analiznega kompleta (58).

Pri postopku prenosa proteinov iz gela na membrano smo za preverjanje ustreznosti pogojev preverili prisotnost proteinov na gelu in membrani. Gel, ki je moral po prenosu postati prazen, smo obarvali z Comassiejevim briljantnim modrilom, ki se uporablja za določevanje proteinov na gelu. Gel ni po barvanju vseboval nobene obarvane lise, kar je pomenilo, da je vzorec potoval iz gela. Zaradi napake v postopku bi lahko vzorec iz gela potoval stran od membrane, do česar bi lahko prišlo v primeru obrnjenega naboja, ali pa prek membrane v raztopino. Da smo preverili, ali membrana resnično vsebuje proteine, smo jo obarvali z Ponceaujevim rdečilom. Na membrani so se po barvanju pokazale temnejše lise, kar je pomenilo, da so naši pogoji ustrezni in da se pri naši metodi prenesejo proteini iz gela na membrano. Najlonska membrana, ki smo jo uporabili, je bila močno pozitivno nabita in je kazala visoko afiniteto do nuklearnih faktorjev (59).

Po prenosu proteinov na membrano smo morali le-te nanjo pritrditi. Za pritrditev smo uporabili tehniko prečnega premreženja proteinov z uporabo UV sevanju, pri čemer smo morali paziti, da membrana ni bila preveč ali premalo izpostavljena UV sevanju. Pri uporabi sevanja pride do tvorbe prečnega premreženja med majhnim delom timina v DNA in pozitivno nabitih amino skupin na površju membrane. Predolgo obsevanje privede do zmanjšanja signala, saj se preveč timina veže na membrano (48). Proces prečnega premreženja smo preverili, pri čemer smo opazovali morebitne izgube vzorca med procesom ter optimalen čas pritrditve. Opazili smo, da smo dobili najboljšo pritrditev pri

uporabi 10 min obsevanja z UV svetlobo. Pri tem smo morali paziti, da se membrana ni pritrdila na podlago, saj bi z odtrganjem le-te od podlage odtrgali tudi plast vzorca in posledično bi pri detekciji dobili nižji signal. Do pritrditve bi lahko prišlo pri osušitvi membrane zaradi povišane temperature ali predolgega časa obsevanja.

Pri detekciji smo uporabili tehniko kemiluminiscence in ne radioaktivnega sevanja. EMSA, ki kot metodo detekcije uporablja radioaktivno sevanje, omogoča lažjo detekcijo kot metode, ki ne uporabljajo radioaktivnega sevanja. Vendar pa laboratorij, v katerem sem opravljal diplomsko delo, nima podeljene licence za tovrstno delo z radioaktivnim materialom. Detekcija z radioaktivnim elementom predstavlja tudi določeno tveganje za osebe, ki se z njo ukvarja, tako da so s tega vidika neradioaktivne metode primernejše za rokovanje. Pri izbiri pa smo se zavedali, da bomo zaradi samega principa metode dobili nižje signale in da bo potrebna optimizacija metode.

Za slikanje smo uporabili digitalno kamero v sistemu G:BOX. Občutljivost slikanja nanjo je omejeno z občutljivostjo njenega senzorja. Zaradi šibkih signalov je možno, da kamera kljub daljšemu času slikanja ni bila sposobna zajeti dejanskega svetlenja, saj jakost svetlobe ni presegla praga občutljivosti senzorja. Tako bi lahko poleg slikanja z digitalno kamero v G:BOX aparaturi bilo dobro preveriti tudi metodo detekcije z uporabo slikanja na rentgenski film. V nasprotju z digitalno fotografijo digitalne kamere je slikanje na rentgenski film analogna metoda, film pa je tudi občutljivejši kot kamera.

Dolgi časi slikanja je lahko povzročil tudi sušenje membrane. Suha membrana prekine svetenje kompleksa. Slikanje pri daljših časih je tako poleg večjega šuma tudi prikazalo manjši signal. Membrano smo zaradi tega zavili v folijo. Pri tem smo morali paziti na nastanek gub in zbijanje membrane.

Prehod nuklearnih faktorjev v nukleus bi lahko dokazali tudi z alternativno metodo ELISA. Z njim bi lahko potrdili, ali naši vzorci vsebujejo iskane nuklearne faktorje.

Z uporabo pozitivna kontrole (z IL-1 β stimulirane celice) smo si pomagali določiti pomankljivosti v postopkih in poiskati možne izboljšave tehnike kemiluminiscence EMSA.

10. Sklep

V prvem delu diplomske naloge smo izhajali iz hipoteze, da PGI₂ deluje protivnetno in da se poveča njegovo izločanje ob stimulaciji endotelijskih celic z SAA ter z IL-1β, ki sta stimulatorja vnetja. Tako bi lahko povečane količine endogenega PGI₂ lahko vzpodbudile proti-trombotične in proti-koagulativne procese. Prav tako smo predvidevali, da bi se lahko znižalo izločanje PGI₂ ob stimulaciji celic z lipoksinom A₄, ekstraktom črnega čaja ter resveratrolom. Za ta namen smo uporabili tri različne tipe humanih endotelijskih celic (HCAEC, HUVEC ter HMVEC). Ugotovili smo:

1. Izločanje PGI₂ iz HUVEC, HCAEC in HMVEC se koncentracijsko povečuje kot odziv na zvišano koncentracijo SAA ter IL-1β.
2. HUVEC izločijo 5x več PGI₂ pri stimulaciji z najvišjo uporabljeno koncentracijo IL-1β (2 μg/l) kot HCAEC. Razlika med izločenim PGI₂ pri z najvišjo uporabljeno koncentracijo SAA (2 μM) stimuliranih HUVEC in HCAEC je komaj zaznavna.
3. Uporabljeni primarni endotelijski celični tipi so različno odzivni. Na uporabljene stimulatorje je najbolj odziven tip celic HUVEC, sledita HCAEC in HMVEC.

Kot potencialne inhibitorje vnetja smo uporabili lipoksin A₄, ekstrakt črnega čaja in resveratrol. Ob testiranju stimulacije izločanja PGI₂ smo ugotovili:

4. Celice, stimulirane z ekstraktom črnega čaja, so izločale večje količine PGI₂ kot nestimulirane celice. Najbolj odzivne na ekstrakt črnega čaja so bile HMVEC, najmanj pa HCAEC glede na nestimulirano izločanje PGI₂. V kombinaciji z IL-1β ali SAA pa je ekstrakt črnega čaja prav tako izzval povečano izločanja PGI₂.
5. Resveratrol je deloval močno zaviralno na izločanje PGI₂ v vseh treh celičnih tipih, tudi v kombinaciji z IL-1β ali SAA.
6. Resveratrol in ekstrakt črnega čaja delujeta nasprotno na izločanje PGI₂, predvidevamo, da vplivata na različne signalne poti znotraj celic.

Drugi del diplomske naloge je vključeval proučevanje NF-κB kot glavnega regulatorja vnetja. Naš cilj je bil vpeljati metodo zamika elektroforezne mobilnosti in z njo določiti vpliv akutnega SAA na NF-κB DNA vezavo v HCAEC ob vzporedni uporabi pozitivne kontrole (IL-1β).

Ugotovili smo:

1. Ugotovili smo, da zaradi težavnosti kemilumiscenčne detekcije nismo uspeli zaznati zamika pričakovanih kompleksov predvsem zaradi uporabe primarnih celičnih kultur.
2. Za nadaljnje delo priporočamo uporabo večjga števila izhodiščnih celic, detekcijo z rentgenskim slikanjem in potrditev metode zamika elektroforezne mobilnosti z vzporedno metodo vezave NF- κ B oligonukleotida na NF- κ B proteine v obliki ELISA.

Tekom diplomskega dela smo uspešno izpolnili večino zastavljenih ciljev. Prikazali smo učinke SAA, IL-1 β , lipoksina A₄, ekstrakta črnega čaja in resveratrola na izločanje PGI₂ v primarnih humanih endotelijskih celicah. Uspešno smo vzpostavili in izboljšali metodo zamika elektroforezne mobilnosti in pokazali smer nadaljnjega dela določevanje NF- κ B vezave.

11. Literatura

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
2. Stegnar M. Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2004.
3. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease?. *Eur. Heart J.* 2005;26(1):3-4.
4. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Janis K. Immunology. 5th ed. New York: W.H. Freeman and co.; 2002.
5. Vozelj M. Temelji imunologije. prva izdaja.. Ljubljana: DZS; 2000.
6. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(16):5308-19.
7. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(1):66-77.
8. Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(6):425-35.
9. Kelton JG, Blajchman MA. Prostaglandin I₂ (prostacyclin). *Can Med Assoc J.* 1980;122(2):175-97.
10. Moncada S. Prostacyclin and arterial wall biology. *Arteriosclerosis.* 1982;2(3):193-207.
11. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(1):272-7.
12. Nasrallah R, Hebert RL. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(2):F235-46.
13. Lim H, Dey SK. Minireview: A Novel Pathway of Prostacyclin Signaling – Hanging

Out with Nuclear Receptors. *Endocrinology*. 2002;143(9):3207-10.

14. Heindl B, Reichle F, Becker BF. Sevoflurane but not isoflurane can reduce prostacyclin production of endothelial cells. *Eur J Anaesthesiol*. 2003;20(2):116-9.
15. Wise H. Multiple signalling options for prostacyclin. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(7):625-30.
16. Wong PY-K, Sun FF, McGiff JC. Metabolism of Prostacyclin in Blood Vessels. *J Biol Chem*. 1978;253(16):5555-7.
17. Verančič P, Romih R, Pšeničnik M. Praktični pouk celične biologije. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije. 2003.
18. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:4.
19. Kvietys PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol*. 1997;273(6 Pt 1):G1189-99.
20. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. Expression of Apolipoprotein Serum Amyloid A mRNA in Human Atherosclerotic Lesions and Cultured Vascular Cells: Implications for Serum Amyloid A Function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(8):3186-90.
21. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*. 1999;265(2):501-23.
22. Zhao Y, Zhou S, Heng C. Impact of Serum Amyloid A on Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor Expression and Activity in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(7):1645-50.
23. Zimlichman S, Danon A, Nathan I, Mozes G, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J Lab Clin Med*. 1990;116(2):180-6.
24. Wewers MD. IL-1 β : An endosomal exit Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(28):10241-2.
25. Dinarello CA.: Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(9):1355-9.

26. Sodin-Semrl S, Taddeo B, Tseng D, Varga J, Fiore S. Lipoxin A4 Inhibits IL-1 β -Induced IL-6, IL-8 and Matrix Metalloproteinase-3 Production in Human Synovial Fibroblasts and Enhances Synthesis of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *J Immunol.* 2000;164(5):2660-6.
27. Sodin-Semrl S, Spagnolo A, Mikus R, Barbaro B, Varga J, Fiore S. Opposing regulation of interleukin-8 and NF-kappaB responses by lipoxin A4 and serum amyloid A via the common lipoxin A receptor. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2004;17(2):145-56.
28. Duffy S J, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney JF. Effect of Acute and Chronic Tea Consumption on Platelet Aggregation in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(6):1084-9.
29. Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean MEJ. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJ Med.* 2001;94(5):277-82.
30. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. *J Nutr.* 2003;133(10):3285S-3292S.
31. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003;17(14):1975-85.
32. Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, Fenwick PS, Leung RH, Ito K, Russell RE, Barnes PJ. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(4):L774-83.
33. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells : A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(2):419-26.
34. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology.* 5th ed. Mosby, 1998.
35. Batista U. Gojenje sesalskih celic v *in vitro* pogojih. Ljubljana: Študentska založba, 2005.
36. Pierce. EMSA.

(<http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=7EDAC33E-3981-4E58->

); 13.1.2008.

37. Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 1981;9(13):3047-60.
38. Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1981;9(23):6505-25.
39. Elnitski L, Jin VX, Farnham PJ, Jones SJM. Locating mammalian transcription factor binding sites: A survey of computational and experimental techniques. *Genome Res.* 2006;16(12):1455-64.
40. Orchard K, May GE. An EMSA-based method for determining the molecular weight of a protein – DNA complex. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(14):3335-6.
41. NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents. Rockford: Pierce; 2003.
42. BioRad Protein Assay. München: BioRad; 2006.
43. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369-74.
44. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
45. Biotin 3' End DNA Labeling Kit. Rockford: Pierce; 2005.
46. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis*; 5th ed. Saunders College Publishing; 1998.
47. Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell: Instruction Manual. California: BioRad; 2000
48. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
49. Koželj M. Primerjava izražanja tkivnega faktorja v različnih tipih humanih endotelijskih celic. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2007.
50. 6-keto prostaglandin F_{1α} EIA. Ann Arbor: Cayman Chemical Company; 2007.

51. Olszanecki R, Gebaska A, Korbut R. Production of prostacyclin and prostaglandin E2 in resting and IL-1beta-stimulated A549, HUVEC and hybrid EA.HY 926 cells. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(4):649-60.
52. Brezinski ME, Gimbrone MA, Nicolaou KC, Serhan CN. Lipoxins stimulate prostacyclin generation by human endothelial cells. *FEBS Lett.* 1989;245(1-2):167-72.
53. Klumpp G, Schildknecht S, Nastainczyk W, Ullrich V, Bachschmid M. Prostacyclin in the cardiovascular system: new aspects and open questions. *Pharmacol Rep.* 2005;57 Suppl:120-6.
54. Luceri C, Caderni G, Sanna A, Dolara P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *J Nutr.* 2002;132(6):1376-9.
55. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):673-751.
56. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2003
57. Szabo G: Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.* 1999;34(6):830-41.
58. LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit. Rockford: Pierce; 2003.
59. Biotrans® A & B Precut Nylon Membranes (8x12cm). Rockford: Pierce; 1995.