

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

NATAŠA PIŠEK

VPLIV IZVLEČKA ČRNEGA ČAJA, RESVERATROLA IN LIPOKSINA A₄ NA Z
INTERLEVKINOM-1 β STIMULIRANO IZRAŽANJE IN AKTIVNOST TKIVNEGA
DEJAVNIKA V HUMANIH ENDOTELIJSKIH CELICAH

THE INFLUENCE OF BLACK TEA EXTRACT, RESVERATROL AND LIPOXIN A₄
ON INTERLEUKIN-1 β STIMULATED EXPRESSION AND ACTIVITY OF THE
TISSUE FACTOR IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Borutu Božiču in somentorici dr. Snežni Sodin-Šemrl za strokovno vodenje in za vse nasvete pri eksperimentalnem delu in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi kolektivu LIR za prijetno in sproščeno vzdušje v delovnem okolju.

Najlepša hvala mami, bratu ter seveda tudi tebi Jernej, za spodbude, razumevanje in zaupanje vame.

Izjava

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

Diplomantkin lastnoročni podpis

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Samo Kreft

Vsebina

VSEBINA	- 3 -
POVZETEK	- 5 -
ABSTRACT	- 6 -
SEZNAM OKRAJŠAV	- 8 -
UVOD	- 10 -
HEMOSTAZA	- 10 -
<i>Primarna hemostaza</i>	- 10 -
<i>Koagulacija</i>	- 11 -
<i>Tkivni dejavnik</i>	- 12 -
<i>Endotelijske celice</i>	- 13 -
SRČNO ŽILNE-BOLEZNI	- 14 -
<i>Ateroskleroza</i>	- 14 -
<i>Tromboza</i>	- 15 -
VNETJE.....	- 16 -
<i>Lokalizirano akutno vnetje</i>	- 16 -
<i>Sistemski akutni vnetni odziv</i>	- 17 -
INHIBITORJI VNETJA	- 17 -
<i>Izleček črnega čaja</i>	- 17 -
<i>Resveratrol</i>	- 18 -
<i>Protivnetni endogeni lipid - lipoksin A₄</i>	- 19 -
CITOKINI	- 21 -
<i>Interlevkin 1</i>	- 21 -
PROTEINI AKUTNE FAZE.....	- 22 -
<i>Serumski amiloid A</i>	- 22 -
CELIČNE KULTURE	- 23 -
<i>Gojenje celičnih kultur</i>	- 23 -
ORODJA ZA ŠTUDIJE CELIČNE AKTIVACIJE	- 24 -
<i>Verižna reakcija s polimerazo</i>	- 24 -
<i>Gelska elektroforeza</i>	- 25 -
<i>Kromogena metoda za določanje aktivnosti TF</i>	- 25 -
NAMEN DELA	- 26 -
MATERIALI IN METODE	- 27 -
MATERIALI	- 27 -
<i>Biološki material</i>	- 27 -
<i>Reagenti</i>	- 28 -
<i>Aparature in ostali potrebni materiali</i>	- 30 -
METODE	- 32 -
<i>Izvedba poskusa za določanje izražanja mRNA TF</i>	- 32 -
<i>Izolacija RNA iz celic</i>	- 33 -
<i>Spektrofotometrično določanje koncentracije RNA</i>	- 33 -
<i>Reakcija reverzne transkripcije</i>	- 34 -
<i>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</i>	- 35 -
<i>Agarozna elektroforeza in detekcija PCR fragmentov</i>	- 36 -
<i>Izvedba poskusa za merjenje aktivnosti TF</i>	- 37 -
<i>Predpriprava za določanje aktivnosti TF</i>	- 38 -
<i>Izvedba kromogene metode za določanje aktivnosti TF</i>	- 39 -
REZULTATI	- 41 -

VPLIV IZVLEČKA ČRNEGA ČAJA, RESVERATROLA IN LIPOKSINA A ₄ NA Z IL-1B STIMULIRANO IZRAŽANJE	
TKIVNEGA DEJAVNIKA V HUMANIH ENDOTELIJSKIH CELICAH	- 41 -
<i>Izražanje mRNA TF v HCAEC</i>	- 41 -
<i>Izražanje mRNA TF v HUVEC</i>	- 42 -
<i>Izražanje mRNA TF v HMVEC</i>	- 43 -
VPLIV IZVLEČKA ČRNEGA ČAJA, RESVERATROLA IN LIPOKSINA A ₄ NA Z IL-1B STIMULIRANO AKTIVNOST	
TKIVNEGA DEJAVNIKA V HUMANIH ENDOTELIJSKIH CELICAH	- 44 -
<i>Vpliv etanola na aktivnost tkivnega dejavnika</i>	- 44 -
<i>Vpliv izvlečka črnega čaja na z IL-1β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah</i>	- 45 -
<i>Vpliv resveratrola na z IL-1β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah</i>	- 46 -
<i>Vpliv lipoksina A₄ na z IL-1β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah</i>	- 47 -
<i>Vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na s SAA stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v HCAEC</i>	- 49 -
RAZPRAVA	- 52 -
SKLEP	- 60 -
LITERATURA	- 61 -

Povzetek

Sistem hemostaze, ki v normalnih razmerah omogoča učinkovito zaustavljanje krvavitve, sestavlja tudi ekstrinzična pot koagulacije, katere začetek je povezan z vezavo tkivnega dejavnika na faktor VII. Prisotnost vnetnih dejavnikov vpliva na povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika, kar povzroči spremembo antikoagulantne površine endotelijskih celic v prokoagulantno ter lahko posledično v sistemu žil vodi v razvoj tromboz. Namen mojega diplomskega dela je bil primerjati izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika v različnih tipih humanih endotelijskih celic, po stimulaciji z vnetnim dejavnikom interlevkinom-1 β ali serumskim amiloidom A. V nadaljevanju pa preveriti inhibitorni vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na z interlevkinom-1 β oziroma s serumskim amiloidom A stimulirano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika. Uporabljali in primerjali smo tri tipe endotelijskih celic, in sicer: endotelijske celice humane koronarne arterije, humane umbilikalne vene ter dermalne mikrovaskularne endotelijske celice. Iz celic v kulturi smo po 24-urni stimulaciji izolirali RNA ter jo v reakciji reverzne transkripcije prepisali v cDNA β -aktin ter cDNA TF, ki smo ju nato namnožili v verižni reakciji s polimerazo. Detekcijo pomnoženega fragmenta tkivnega dejavnika smo izvedli z elektroforezo na agaroznem gelu ter etidijevim bromidom. Prav tako smo iz celic v kulturi po 4-urni stimulaciji pripravili celični lizat ter nato s kromogeno metodo določili aktivnost tkivnega dejavnika v celičnem lizatu. Ugotovili smo, da interlevkin-1 β stimulira izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika na primarnih endotelijskih celicah, medtem ko je serumski amiloid A slab stimulator aktivnosti tkivnega dejavnika. Ugotovili smo, da lipoksin A₄ ni imel večjega vpliva na z interlevkinom-1 β stimulirano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika, medtem ko sta izvleček črnega čaja in resveratrol inhibirala z interlevkinom-1 β stimulirano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika pri vseh celičnih tipih, razen pri endotelijskih celicah humane umbilikalne vene, kjer sta povečala z interlevkinom-1 β stimulirano izražanje mRNA tkivnega dejavnika. Prav tako smo zaznali, da se izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika razlikuje glede na tip endotelijskih celic. Endotelijske celice humane koronarne arterije so bile bolj odzivne na vnetni dejavnik interlevkin-1 β kot endotelijske celice humane umbilikalne vene. Najmanj odzivne so bile dermalne mikrovaskularne endotelijske celice. Ugotovljene razlike v odzivanju različnih tipov endotelijskih celic bi lahko bile pomembne pri razlagi nastanka tromboze.

Abstract

The hemostasis system, which in normal conditions enables effective blood-clotting, consists also of the extrinsic coagulation pathway, the beginning of which is linked with the binding of the tissue factor to factor VII. The presence of inflammatory factors increases expression and activity of the tissue factor, causing a change of the anticoagulation surface of endothelial cells into a procoagulation surface that could subsequently result in thrombosis development in the blood vessel system. The purpose of my study was to compare the expression and activity of the tissue factor in different types of human endothelial cells after the stimulation with inflammatory factors interleukin-1 β and serum amyloid A. Secondly, the inhibitory effect of the black tea extract, resveratrol and lipoxin A₄ on interleukin-1 β and serum amyloid A stimulated expression and activity of the tissue factor was investigated. The following three types of human endothelial cells were used and compared: the endothelial cells of coronary artery, the human umbilical vein and the dermal microvascular endothelial cell. After a 24-hour stimulation in a cell culture, we proceeded with RNA isolation and its transcription into cDNA with the reverse transcription reaction. cDNA β -actin and cDNA TF were then multiplied in a polymerase chain reaction. The tissue factor fragment was detected by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide. After a 4-hour stimulation of the cultured cells, a cell lysate was prepared and the activity of the tissue factor in the cell lysate was determined.

We ascertained that interleukin-1 β stimulates the expression and activity of the tissue factor on primary endothelial cells and that the serum amyloid A is a weak stimulator of the tissue factor activity. Lipoxin A₄ did not exert a significant effect on interleukin-1 β stimulated expression and activity of the tissue factor. Comparingly, the black tea extract and resveratrol inhibited interleukin-1 β stimulated expression and activity of the tissue factor on all cell types, excluding the endothelial cells of human umbilical vein, where the interleukin-1 β stimulated expression of the tissue factor mRNA. It was also established that the expression and activity of the tissue factor is dependent upon the type of endothelial cells, which could be important in the interpretation of thrombosis onset. The endothelial cells of human coronary artery are more responsive to interleukin-1 β when compared with the endothelial cells of human umbilical vein. The dermal microvascular

endothelial cells were the least responsive. This differential responsiveness of specific endothelial cells could be important in the explanation of thrombosis development.

Seznam okrajšav

5-HETE	5-hidroksieikozatetraenojska kislina
5-HPETE	5-hidroksiperoksieikozatetraenojska kislina
ADP	adenozin difosfat
ACTH	adrenokortikotropni hormon
AMV	virus ptičje mieloblastoze (Avian Myeloblastosis Virus)
ApoA-1	apolipoprotein A-I
A-SAA	akutni serumski amiloid A
ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
BTE	izvleček črnega čaja (black tea extract)
CAT	katalaze
c-DNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CO₂	ogljikov dioksid
C-SAA	konstitutivni serumski amiloid A
COX	ciklooksigenaza
dNTP	deoksiribonukleotid
DMSO	dimetilsulfoksid
DPBS	Dulbeccov fosfatni pufer v slanici (Dulbecco' s phosphate buffered saline)
FBS	fetalni goveji serum
GST	glutation-S-transferaza
GPX	glutation-peroksidaza
HCAEC	endotelijske celice humane koronarne arterije (Human Coronary Artery Endothelial Cell)
HDL	lipoprotein visoke gostote
HHT	12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienojska kislina
HMVEC	humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice (Human Microvascular Endothelial Cell – Dermal)

HUVEC	endotelijske celice humane umbilikalne vene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula (Intercellular adhesion molecule-1)
IFN-γ	interferon gama
IL-1β	interlevkin -1 beta
IL-6	interlevkin 6
IL-8	interlevkin 8
LDL	lipoprotein nizke gostote
LXA4	lipoksin A ₄
NO	dušikov oksid
NF-κB	nuklearni faktor- κ B
MCP-1	monocitno kemotaktični protein 1
MgCl₂	magnezijev klorid
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
oLDL	oksidiran lipoprotein nizke gostote
PAF	dejavnik aktivacije trombocitov (platelet activation factor)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RSV	resveratrol
RT	reverzna transkriptaza
SOD	superoksidna dismutaza
SAA	serumski amiloid A
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik
TF	tkivni dejavnik
TFPI	inhibitor sintezne poti tkivnega aktivatorja
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa
TNF-β	dejavnik tumorske nekroze beta
TXA₂	tromboksan A ₂
VCAM-1	žilno-celična adhezijska molekula (vascular cell adhesion molecule-1)
vWf	von Willebrandov faktor

Uvod

Hemostaza

Hemostaza zajema vse procese in reakcije, ki prispevajo k učinkovitemu ustavljanju krvavitve po poškodbi žile. Poteka med beljakovinami v krvi (faktorji in zaviralci koagulacije in fibrinolize) in žilno steno (tkivni dejavnik, tkivni aktivator plazminogena), med celičnimi elementi krvi (trombociti) in žilno steno (endotelijske celice, celice gladkega mišičja), ki zagotavljajo, da ostaja kri v žilah tekoča ali da se strdi, kadar je žila poškodovana. Pri nepoškodovanih žilah vzdržuje normalna hemostaza kri tekočo, s čimer je omogočena preskrba organov in tkiv. Normalna hemostaza, ki se sproži ob poškodbi žilne stene, pa prepreči večjo krvavitev. Začne se s primarno hemostazo ter nadaljuje z aktivacijo koagulacije, ki učvrsti trombocitni krvni strdek. Zaščitni mehanizmi zaviralcev koagulacije preprečijo širjenje strdka, fibrinoliza pa strdek sčasoma razgradi. Motnje hemostaze vodijo do prepočasnega strjevanje krvi in s tem do krvavitev ali do prehitrega strjevanja krvi in s tem do nastankov strdkov (trombov) v žilah (tromboze). Evolucijsko je hemostaza naravnana bolj v smeri hitrega kot v smer počasnega strjevanja, zato so motnje hemostaze, ki vodijo do tromboze, bistveno pogostejše kot motnje, ki vodijo do krvavitev (1). Prirojene motnje, ki povzročajo krvavitve, so najpogosteje posledica pomanjklivosti ene same beljakovine (hemofilija A je posledica pomanjkanje faktorja VIII, hemofilija B je posledica pomanjkanja faktorja IX) (1, 2).

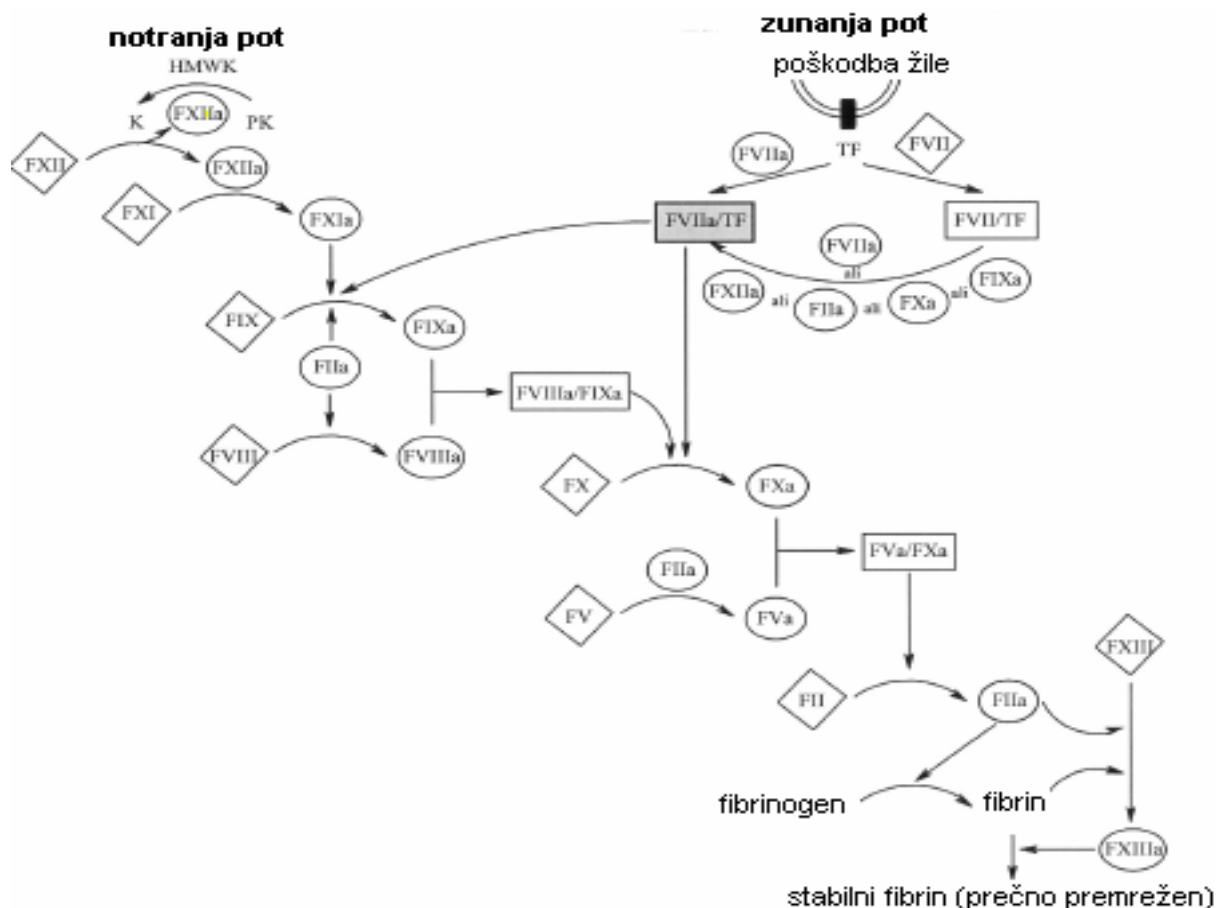
Primarna hemostaza

Sistem hemostaze se aktivira ob poškodbi žilne endotelijske plasti, ko pride kri v stik s subendotelijskimi celicami. Na subendotelijska kolagenska vlakna se začnejo adherirati trombociti. Vezava poteka preko dveh vrst trombocitnih receptorjev- glikoproteina Ia (GPIa), ki se poveže s kolagenom, in glikoproteina Ib (GPIb), ki se veže na kolagen preko von Willebrandovega dejavnika (vWf). vWf nastaja v endotelijskih celicah in trombocitih in kroži po krvi v kompleksu z dejavnikom strjevanja krvi VIII. Z adhezijo se začne aktivacija trombocitov, ki začnejo spreminjati svojo obliko iz diskoidne v sferično, s psevdopodiji in izločati vsebino iz zrnca α (vWf, fibrinogen, rastni faktorji (PDGF, EGF, TGF- β) trombocitni faktor 4 (TF-4), fibronektin, vitronektin, trombospondin) in gostih zrnca (ADP, ATP, serotonin, kalcijeve ione). Sproži se tudi hidroliza celične membrane

trombocitov, pri čemer nastajata tromboksan A₂ (TXA₂) in dejavnik aktivacije trombocitov (PAF). TXA₂, PDGF in serotonin delujejo kot močni vazokonstruktorji in upočasnijo tok krvi, poleg tega pa drugi mediatorji (ADP, PAF, TXA₂, vWf) privlačijo in aktivirajo nove trombocite. Trombociti se med seboj prepletajo s psevdopodiji, še pomembneje pa je ta proces – agregacija trombocitov – izražen preko izražanja kompleksa GPIIb/IIIa na membrani trombocitov, ki služi kot receptor za fibrinogen. Vezava fibrinogena na GPIIb/IIIa omogoči povezovanje sosednjih trombocitov, nastajanje večjih agregatov in na koncu nastanek primarnega strdka. Zaporedje vseh opisanih procesov imenujemo primarna hemostaza (1, 3).

Koagulacija

Sočasno s primarno hemostazo poteka tudi koagulacija (slika 1). Proces se sproži po dveh poteh – ekstrinzični ali eksogeni in intrinzični ali endogeni. Ekstrinzična aktivacija je hitrejša in poteka pri večjih poškodbah tkiva, ko pridejo v stik s krvjo tkivne, nevaskularne celice, ki imajo v svoji celični membrani transmembranski glikoproteinski tkivni dejavnik (3). Tkivni dejavnik ob prisotnosti kalcijevih ionov (Ca²⁺) aktivira FVII in nastali kompleks TF-FVIIa v aktivno obliko pretvori dejavnik X (Xa). Intrinzično aktivacijo sproži poškodba endotelija. Subendotelijski kolagen pospešuje aktivacijo dejavnika FXII, ki cepi prekalikrein v kalikrein. FXIIa v prisotnosti kininogena velike molekularne mase (HMWK) pretvori dejavnik FXI v FXIa, nato pa sledijo reakcije, v katerih se zaporedno aktivirata dejavnika IX in VIII. Na koncu kompleks iz aktiviranih dejavnikov VIIa in IXa, membranskih fosfolipidov in Ca²⁺ aktivira dejavnik X. Na tej stopnji se primarna in sekundarna hemostaza združita in nadaljni koraki potekajo enotno. Naprej se aktivira dejavnik V, ki nato skupaj z aktiviranim dejavnikom Xa, Ca²⁺ in membranskimi fosfolipidi aktivira protrombin do trombina. Funkcija tega dejavnika strjevanja krvi je pretvorba fibrinogenskih molekul v fibrinske monomere, ki pod vplivom dejavnika XIII polimerizirajo v netopno fibrinsko mrežo (3, 4).



Slika 1: Koagulacija krvi

Tkivni dejavnik

Tkivni dejavnik je površinski celični receptor in kofaktor faktorja VII, IX in X (5). Pomembno vlogo ima pri regulaciji normalne hemostaze, arterijske tromboze, angiogeneze, tumorske rasti, metastaze in vnetnega odziva (6, 7, 8). Gen, ki kodira humani tkivni dejavnik je velik 12,4 kb in je lociran na kromosomski regiji 1p21-22 (9). Sestavljen je iz šestih eksonov, ki so medseboj ločeni s petimi introni (10). Promotorsko regijo sestavljajo dve vezavni mesti za transkripcijski faktor AP-1, eno NF- κ B, tri Egr-1 ter pet Sp1 vezavnih mest (11). Tkivni dejavnik je konstitutivno izražen na številnih celičnih tipih vključno s fibroblasti, gladkih mišičnih celicah ter epiteljskih celicah. Študije na celičnih kulturah so pokazale, da je promotor tkivnega dejavnika sposoben pod vplivom provnetnih citokinov (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , MCP-1), oLDL in komponent komplemента inducirati izražanje tkivnega dejavnika prav tako na ostalih celičnih tipih, kot so monociti ter endotelijske celice (12, 13). Tkivni dejavnik je 47 kDa velik transmembranski glikoprotein, ki spada v drugi razred družine citokinskih receptorjev in ga sestavlja 263

aminokislin. Sestavljen je iz treh domen: N-terminalne zunajcelične domene z 219 aminokislinami, transmembranske domene z 23 aminokislinami ter citoplazemske domene z 21 aminokislin. N-terminalna zunajcelična domena je sestavljena iz dveh pod-domen fibronektinskega tipa III, ki pomagata pri vezavi FVIIa. Transmembranska domena je potrebna za stabilizacijo molekule, medtem ko ima citoplazemska domena pomembno vlogo pri znotrajcelični signalizaciji (8). Ker je tkivni dejavnik transmembranski protein, zaenkrat kristalizacija proteina še ni uspela. Z rekombinantno tehnologijo pa so pripravili zunajcelično domeno proteina in določili njegovo strukturo. Ta protein je v vodi dobro topen, zato so ga imenovali topni tkivni dejavnik (5). Pri poškodbi žile TF veže dejavnik FVII ter ga z alosterično aktivacijo pretvori v aktivno obliko FVIIa. Komplex TF-FVIIa nosi polno encimsko aktivnost in z aktiviranjem FIX (FIXa) in FX (FXa) se sproži proces strjevanja krvi tako po zunanji kot notranji poti sistema strjevanja krvi. Posledica je nastanek majhnih količin trombina (FIIa). Ta omejena količina trombina nato aktivira FV (FVa), FVIII (FVIIIa) in tudi trombocite, ki se kopičijo na mestu poškodbe. Na površini aktiviranih trombocitov se nato vežeta FVIIIa in FIXa in tvorita kompleks, ki učinkoviteje aktivira dejavnik FX (FXa) kot kompleks TF-FVIIa. V nadaljevanju protrombinazni kompleks (FXa/FVa) aktivira protrombin v trombin, ki nato pretvori fibrinogen v fibrin, ki učvrsti trombocitni strdek (4). TFPI zavira ekstrinzično pot koagulacije, katere začetek je povezan z vezavo tkivnega dejavnika na faktor VII. Zaviralno deluje na aktivnost kompleksa TF/FVIIa/FXa ter tako po negativni povratni zanki inhibira aktivacijo dejavnika X in IX, nastanek fibrina in akumulacijo strdka na mestu poškodbe (5, 6).

Endotelijske celice

Notranjost vseh krvnih žil je obdana z endotelijskimi celicami. Površino endotelijskih celic odraslega človeka sestavlja približno 1 do 6×10^{13} celic, tehta približno 1 kg in pokriva površino enega do sedmih m² (15). Pomembna vloga endotelijskih celic je zagotavljanje neprepustnosti stene velikih žil in selektivne prepustnosti stene v malih žilah (kapilarah) (16). Ker so endotelijske celice v stiku s krvjo, vplivajo na potek hemostaze. Sintetizirajo sestavine vezivnega tkiva in imajo naslednje lastnosti: prokoagulacijske (sintezo tromboksana A₂, PAF, vWf ter tkivnega dejavnika), zaviranje trombocitne aktivacije (sinteza prostaciklina in NO), antikoagulacijske (zvečanje učinka antitrombina III, vezava proteina C z receptorjem endotelijske celice trombomodulinom), fibrinolitične (sinteza tkivnega aktivatorja plazminogena in urokinaza), antifibrinolitične (sinteza inhibitorja

tkivnega aktivatorja plazminogena), presnovne (presnova nekaterih maščob), vazokonstriksijske (s sintezo endotelina-1, tromboksana A₂ in prostaglandina H₂) kot tudi vazodilatacijske (s sintezo NO in prostaciklina-PGI₂). Zaradi anatomsko strateškega položaja med tokom krvi in gladkimi mišičnimi celicami so endotelijske celice izpostavljene najrazličnejšim dejavnikom, ki jih lahko reverzibilno ali ireverzibilno okvarjajo in povzročijo nenormalnosti v njihovem delovanju (16, 17). Dejavniki, ki lahko poškodujejo žilni endotelij, delujejo na različne načine in jih delimo na: fizikalne (povišan krvni tlak, turbulentni tok krvi), kemične (ogljikov monoksid, nikotin), presnovne (holesterol, homocistin) in biološke (bakterije, virusi, kompleksi antigen-protitelo, aktivirani trombociti in levkociti). Ti dejavniki lahko poškodujejo endotelij neposredno. Zaradi poškodbe pride do okvare obrambne sposobnosti endotelij, zato se poveča njegova prepustnost, hkrati pa se zmanjša tvorba zaščitnih snovi (prostaciklina, dilatacijskega dejavnika, tkivnega aktivatorja plazminogena), poveča pa nastajanje snovi s škodljivim delovanjem (rastnih in proliferacijskih dejavnikov, citokinov, metaloproteinaz in snovi z vazokonstriksijskim delovanjem) (18). Med bolezenska stanja, ki lahko povzročijo endotelijsko disfunkcijo raziskovalci predvsem prištevajo hiperholesterolemijo, hipertenzijo, sladkorno bolezen, kajenje in aterosklerozo (17).

Srčno žilne-bolezni

Ateroskleroza

Ateroskleroza je bolezen žilne stene aorte ter velikih in srednje velikih arterij mišičnega tipa in elastičnega tipa (16). V razvitih zahodnih državah je še vedno vodilni razlog obolevnosti ter umrljivost prebivalstva. Po teoriji o odzivu na poškodbo se aterosklerotični proces začne s poškodbo žilnega endotelija, kar vodi v povečano prepustnost, kopičenje lipoproteinov v intimi (predvsem LDL, ki vsebuje veliko holesterola), adhezijo trombocitov ter adhezijo in migracijo krvnih monocitov v intimo. Zadnji se transformirajo v makrofage, ki fagocitirajo nakopičene maščobe (penasti makrofagi). Aktivirani trombociti, makrofagi, endotelijske celice ter limfociti T izločajo dejavnike, ki vzdržujejo kronično vnetje ter sprožijo migracijo gladkomišičnih celic iz medijev v intimo, njihovo proliferacijo, fagocitozo maščob ter sintezo sestavin zunajceličnega matriksa (18).

Pri razviti aterosklerozi najdemo značilne morfološke spremembe od zgodnjih maščobnih leh do vezivno spremenjenih plakov v steni velikih arterij. Nevarne so zlasti nestabilne aterosklerotične lehe, ki imajo tanek vezivni pokrov in obilno lipidno jedro bogato s tkivnim dejavnikom, ki ob stiku s krvjo sproži koagulacijo (19). Take lehe so neodporne na hemodinamski stres, zato ob hemodinamskih neugodnih pogojih počijo, površina se odlušči, nastala razjeda pa predstavlja trombogeno podlago za nastanek krvnega strdka. Če nastane večji krvni strdek, ki povsem zapre žilno svetlino, pride do akutnih zapletov z značilnimi kliničnimi posledicami, kot so akutni srčnomišični infarkt, možganska kap in ishemija uda. Če pa nastane manjši krvni strdek, ki ne moti toka krvi, taka sprememba običajno ne povzroči kliničnih posledic. Neokluzivni strdek preraste vezivo, s tem pa se aterosklerotična leha počasi povečuje (18).

Tromboza

Tromboza je patološki proces, pri katerem pride do agregacije trombocitov in/ali do nastanka fibrinskega strdka, ki ovira kroženje krvi po krvožilnem sistemu (5). Pod vplivom kontinuiranega krvnega pretoka se lahko trombus odtrga od mesta pritrditve ter kot prosto plavajoč strdek (embolus) potuje po žili. Embolusi, ki izvirajo iz velikih arterij običajno zamašijo majhne sistemske arterije ali arteriole v možganih in ledvicah medtem ko embolusi, ki izvirajo iz venskega sistema potujejo v žile pljuč, kjer lahko povzročijo pulmonarni arterijski embolizem (5, 20).

Pri nastanku tromboze so pomembni trije patogenezni dejavniki (Virchowova triada), ki se pogosto pojavljajo v kombinaciji:

1. okvara endotelija (ki je lahko posledica poškodbe, travme, vnetja, infekcije in ateroskleroze)
2. motnje v toku krvi, ki se kažejo kot turbulenca ali staza
3. povečana koagulabilnost krvi (kot posledica zvišane koncentracije koagulacijskih beljakovin ali znižane koncentracije naravnih antikoagulantov)

Ker se strjevanje skoraj vedno pojavlja, ko je moten krvni pretok za več ur v katerikoli krvni žili telesa, imobilnost pacienta, priklenjenega na posteljo, in praksa podlaganja kolen z blazinami pogosto povzroči nastanek strdkov zaradi staze krvi v eni ali več venah nog (21). Včasih pride tudi do aktivacije strjevalnih mehanizmov v obširnih področjih cirkulacije, kar povzroči stanje, imenovano diseminirana intravaskularna koagulacija. To je običajno rezultat prisotnosti velikih količin travmatiziranega ali nekrotizirajočega tkiva v

telesu, kar sprošča velike količine tkivnih dejavnikov v kri. Trombi so majhni, a številni in zaprejo veliko število majhnih perifernih žil, kar močno zmanjša pretok kisika in hranil v tkiva (2).

Vnetje

Vnetje je lokalna reakcija tkiva na poškodbo, ki poteka predvsem na ravni mikrocirkulacije (22) in katerega cilj je omejiti, odstraniti in/ali uničiti škodljivi dejavnik: hkrati pa je vpletena v niz dogodkov, ki povzročajo zdravljenje poškodovanega tkiva. Lokalno se kaže kot rdečina, toplota, oteklina, bolečina in zmanjšana dejavnost organa. Razlikujemo akutno in kronično vnetje (16).

Lokalizirano akutno vnetje

Pri poškodbi tkiva se vnetna reakcija razvija postopoma. Ponavadi se začne z dilatacijo arteriol, kar povzroči povečan dotok krvi v tkivo ter posledično rdečino in toplino. V drugi fazi pride zaradi sproščanja kemičnih mediatorjev, ki vplivajo na mikrocirkulacijo, do zvečane prepustnosti kapilar in venul. Celice endotelija, ki tvorijo notranjo plast malih žil, se pod vplivom mediatorjev skrčijo in tako se med njimi razširijo pore, skozi katere lahko zdaj prehajajo v intersticij tekočina in plazemske beljakovine z veliko molekulsko maso, kot so protitelesa in komponente komplemента. To povzroči povečanje onkotskega tlaka beljakovin v intersticiju, kar poleg povečanega hidrostatskega tlaka v kapilari še dodatno prispeva h kopičenju tekočine v intersticiju. Posledica je oteklina. Krvne celice običajno ne izstopajo iz žil, zato postane kri bolj viskozna, hkrati pa se poveča upor v žili, kar upočasni tok krvi (16). Nevtrofilci se s pomočjo adhezijskih molekul, katerih izražanje je povečano pod vplivom kemotaktičnih dejavnikov (fragment komplemента C5a, TNF, IL-1, PAF), adherirajo na endotelijske celice in prehajajo skozi stene tankih žil v ekstracelularni prostor, nato pa migrirajo v smeri večje koncentracije kemotaktičnega dejavnika na mesto vnetišča. Tam fagocitirajo patogene mikrobo in sproščajo mediatorje, med drugim tudi kemokine, ki pritegnejo makrofage in limfocite. Makrofagi prispejo v vnetišče 5-6 ur potem, ko se začne vnetni proces. Kot aktivirane celice učinkovito fagocitirajo mikrobo in izločajo mediatorje in citokine (IL-1, IL-6 in TNF- α), ki imajo tako lokalne, kot tudi sistemske učinke. Lokalno povečajo prepustnost žil, povzročajo strjevanje krvi, v makrofagih in v endotelijskih celicah pa spodbujajo izdelovanje IL-8. Pomembno je, da sta

trajanje in jakost lokalnega akutnega vnetja skrbno nadzorovana, da se omeji okvara tkiva in da se omogoči obnova tkiva, ki je potrebna, da se rana zaceli. Pri omejevanju vnetja, pri pospeševanju razmnoževanja celic in odlaganju zunajceličnega matriksa je zelo učinkovit dejavnik tumorske nekroze β (TNF- β) (23).

Sistemiški akutni vnetni odziv

Sistemiški vnetni odziv, imenovan tudi reakcija akutne faze, je posredovan s citokini IL-1, IL-6 in TNF- α in vključuje povišano telesno temperaturo, povečana sinteza hormonov, kot sta ACTH in hidrokortizon, povečano produkcijo levkocitov in sintezo številnih proteinov akutne faze v jetrih, kot so C-reaktivni protein in serumski amiloid A (SAA) (23).

Inhibitorji vnetja

Izvleček črnega čaja

Iz listov čajevca *Thea sinensis* pridobivamo prave čaje. Glede na načine predelave ločimo tri vrste čaja: zeleni (green) ali nefermentirani čaj, rdeči (oolong) ali polfermentirani čaj in črni (black) ali fermentirani čaj (24). Čajni listi *Thea sinensis* vsebujejo glede na delež suhe teže čajnih listov: 25% flavanолоv, 3% flavonolov in flavonolnih glikozidov, 5% fenolne kisline, 3% ostalih polifenolov, 3% kofeina, 0,2 % teobromina, 4,2 % aminokislin, 0,5 % organske kisline, 4% monosaharidov, 13% polisaharidov, 7% celuloze, 15% proteinov, 6% lignina, 3% lipidov, 0,5% klorofila in ostalih pigmentov, 5%, mineralov in 0,1 % hlapnih spojin (25).

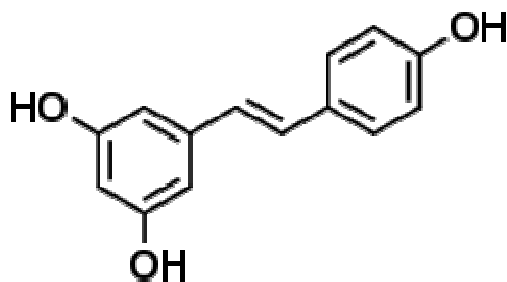
Pravi čaj je, poleg vode, najpogosteje zaužita pijača na svetu, zato je koristno ugotoviti njegove učinke na organizem (26). Pozitivni učinki črnega čaja so večinoma posledica delovanja polifenolnih spojin katehinov, tearubiginov in teaflavinov, ki jih sestavljajo štiri glavne spojine: teaflavin, teaflavin-3-galat, teaflavin-3'-galat in teaflavin-3,3'-digalat. Ti polifenoli preprečijo aktivacijo AP-1 in NF- κ B (27), inhibirajo delovanje protein kinaze C, ciklooksigenaze in lipoksigenaze ter tako inhibirajo nastanek TX in HHT, ki sta povezana z agregacijo trombocitov (28). Dokaze o moči čaja pri preprečevanju usodnih bolezni so

našli pri pet let trajajoči študiji na 895 moških, starih od 65 do 84 let, ki so jo opravili na Nizozemskem. Tisti, ki so zaužili veliko antioksidantnih flavonoidov, večinoma tako, da so popili dve ali več skodelic črnega čaja na dan, so imeli za polovico manj usodnih bolezni srca kot tisti, ki so pili malo čaja. Druge raziskave potrjujejo, da čaj znižuje koncentracijo holesterola v obliki LDL in zvišuje njegovo koncentracijo v obliki HDL, kar je ugodneje (1). Na osnovi različnih študij so ugotovili so, da imajo teaflavini zaradi fenolne hidroksilne skupine antioksidativno delovanje in da se njihovo delovanje lahko poveča s tvorbo galatov. Delujejo lahko kot lovilci prostih radikalov kot tudi kelatorji kovinskih ionov, prav tako pa lahko aktivirajo glutathion-S-transferazo (GST), glutathion-peroksidazo (GPX), superoksidno dismutazo (SOD) in katalaze (CAT) ter tako zavirajo lipidno peroksidacijo in nastanek ateroskleroze. Prav tako znižujejo krvni sladkor, zavirajo raka dojk, kolona, prostate in pankreasa (24, 28).

Resveratrol

Resveratrol (slika 2) je fitoaleksin, zaščitna sestavina, ki jo proizvaja rastlina kot obrambni sistem proti boleznim (29). Najdemo ga v rastlinah, kot so evkaliptus, lilija, jelka ali pa v živilih kot so murva in arašidi. Največji vir resveratrola je grozdje. Pojavlja se v trti, koreninah in pečkah, toda največjo koncentracijo resveratrola najdemo v kožici, kjer ga je od 50 do 100 mikrogramov v gramu kožice (30). Resveratrol se kot posledica maceracije nahaja v veliko večjem deležu v rdečem, kot pa v belem vinu. Grozdni sok, ki ni fermentiran, ni pomemben vir resveratrola (31). Resveratrol je učinkovit antioksidant, saj ima sposobnost keliranja kovinskih ionov ter lovljenja prostih radikalov (32). V odvisnosti od koncentracije lahko resveratrol stimulira ali inhibira celično proliferacijo (33). Prevladuje pa antiproliferativno delovanje, ki je najverjetneje posledica inhibicije deoksiribonukleotidne reduktaze, DNA polimeraze ter indukcije akumulacije p53 ter posledičnega povečanega prepisovanja beljakovine p21 (inhibitor od ciklina odvisnih kinaz CDK), ki zadrži celico v fazi G1. Kemoprotektivne lastnosti resveratrola naj bi bile med drugim povezane tudi z inhibicijo transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki je močno povezan z vnetimi in imunskimi odzivi, z regulacijo celične proliferacije in apoptoze, kar je pomembno pri razvoju tumorja ter ostalih bolezni, vključno z aterosklerozo (34). Že več let kroži domneva, da naj bi bil resveratrol poleg ostalih polifenolnih spojin odgovoren tudi za tako imenovani 'francoski paradoks' – pojav, da je med francosko populacijo kljub uživanju mastne in kalorične hrane nesorazmeren delež bolezni srca in ožilja (35). Znano

je tudi, da ima resveratrol antiagregacijsko ter protivnetno delovanje, saj zavira delovanje lipoksigenaze in COX ter posledično nastanek 5-HETE (5-hidroksieikozatetraenojske kisline), HHT (12-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienojske kisline) in tromboksana B₂ (TXB₂) (33). Raziskovalci so prav tako ugotovili, da resveratrol v relativno visokih koncentracijah (10-20 μM) v endotelijskih celicah humane umbilikalne vene (HUVEC) in monocitih inhibira indukcijo izražanja tkivnega faktorja z inhibicijo od NF-κB/Rel odvisno transkripcijo gena, ki nosi zapis za TF (36).



Slika 2: Struktura resveratrola

Protivnetni endogeni lipid - lipoksin A₄

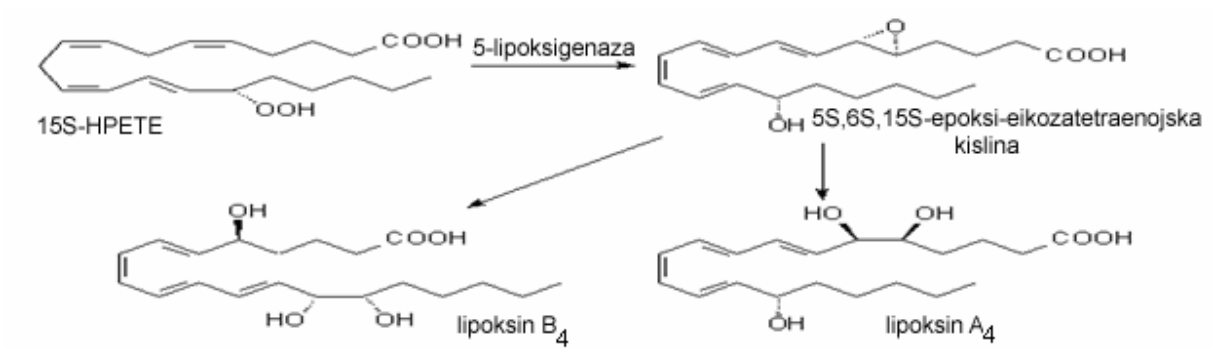
Lipoksin A₄ je endogeni lipid, katerega sinteza lahko poteka po treh poteh:

1. Prva biosintezna pot :

Je glavna pot sinteze lipoksina znotraj vaskulature ter vključuje delovanje nevtrofilne 5-lipoksigenaze ter trombocitne 12-lipoksigenaze. Nevtrofilna 5-lipoksigenaza katalizira oksigenacijo arahidonske kisline do levkotriena A₄ (LTA₄), ki se nato v trombocitih pod vplivom oksigenaznega delovanja 12-lipoksigenaze pretvori v lipoksin A₄.

2. Druga biosintezna pot:

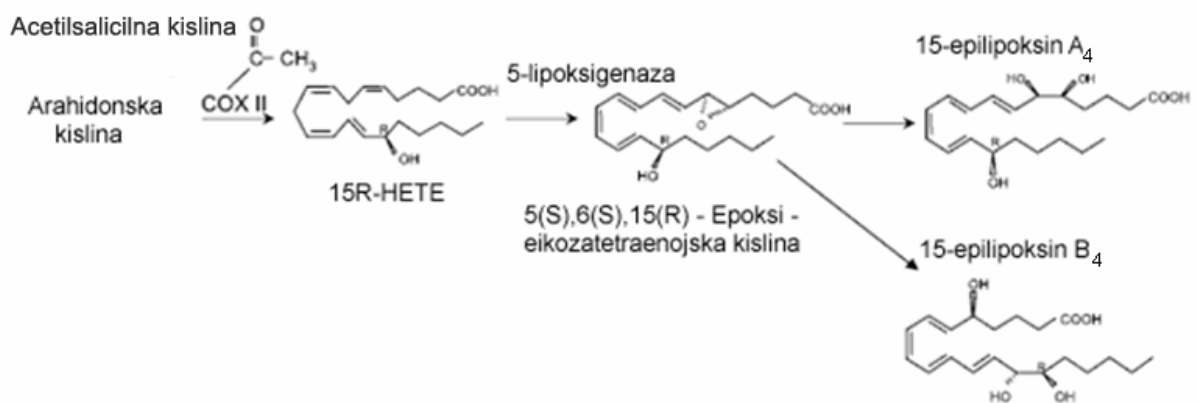
V epitelijskih celicah ali monocitih 15-lipoksigenaza katalizira oksigenacijo arahidonske kisline do 15S-hidroperoksieikotetraenojske kisline (15S-HPETE). Ta ali reducirana oblika hidroksieikozatetraenojske kisline (15S-HETE) se v nevtrofilnih pod vplivom 5-lipoksigenaze pretvori v nestabilno 5S,6S,15S-epoksi-eikozatetraenojsko kislino, ki se nato v odvisnosti od celičnega tipa pretvori v lipoksin A₄ (LXA₄) ali lipoksin B₄.



Slika 3: Shema sinteze lipoksina A₄

3. Tretja biosintezna pot ali z acetilsalicilno kislino sprožena sinteza epi-lipoksina A₄:

Acetilsalicilna kislina ireverzibilno inhibira encim COX-1 v trombocitih in s tem preprečuje nastajanje trombokšana A₂, prav tako pa inducira acetilacijo encima COX-2 ter spremeni njegovo delovanje iz endoperoksidne v lipoksigenazno ter tako povzroči nastanek 15(R)-hidroksieikozatetraenojsko kislino (15(R)-HETE), ki se nato pod vplivom levkocitne 5-lipoksigenaze pretvori najprej v nestabilno 5(S), 6(S), 15(R)-epoksieikozatetraenojsko kislino ter nato v 15-epilipoksin A₄ ali 15-epilipoksin. Pod vplivom acetilsalicilne kisline nastali lipoksin A₄ ima številne biološke učinke enake, kot jih ima lipoksin le da so ti učinki še bolj učinkoviti (37).



Slika 4: Shema sinteze lipoksina A₄

Lipoksini so kratkoživeči endogeno nastali eikozanoidi. Njihovo nastajanje se poveča pod vplivom provnetnih citokinov med akutno vnetnim procesom. Kot visoko afinitetni agonisti lipoksinkega receptorja A₄ (ALX) ter kot visokoafinitetni antagonisti cisteinskega

levkotrienskega receptorja 1 (cysLT1) posredujejo protivnetno delovanje (37). Inhibirajo sintezo IL-1 β , IL-8, IL-6, nastanek superoksidnega aniona ter aktivacijo NF- κ B in AP-1 (37, 38). Lipoksini imajo različno delovanje na posamezne levkocite, stimulirajo aktivacijo makrofagov ter monocitov, medtem ko inhibirajo aktivacijo polimorfonuklearnih nevtrofilcev, eozinofilcev in limfocitov. Prav tako pa modulirajo delovanje fibroblastnih, endotelijskih in gastrointestinalnih epitelijskih celic (37).

Citokini

Citokini so velika družina nizkomolekulskih (8-25 kD) regulacijskih proteinov, navadno glikoproteinov, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti in makrofagi. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrani celice tarče in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto. Zaradi te velike afinitete lahko citokini posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Večina citokinov deluje na kratke razdalje, samo na sosednje celice, le nekateri delujejo na oddaljene celice. Pomembna lastnost citokinov je pleotropnost, kar pomeni, da lahko v različnih celicah sprožajo različne biološke učinke. Delujejo lahko parakrino, avtokrino, endokrino, sinergistično ali antagonistično (23). V skupino citokinov spadajo interlevkini, interferoni, zraven pa še hematopoetski dejavniki, rastni dejavniki in kemokini (39). Med številnimi fiziološkimi odzivi, za katere je potrebna udeležba citokinov, je razvoj humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter zdravljenje ran (23).

Interlevkin 1

Interlevkin-1 je pleotropni citokin, ki se pri vnetju izloča iz aktiviranih makrofagov, limfocitov ter iz endotelijskih celic. IL-1 po vezavi na receptor za IL-1 spodbudi delovanje transkripcijskih dejavnikov NF- κ B in AP-1 (3). V endotelijskih celicah spodbuja izločanje tudi drugih citokinov kot so IL-8, IL-6 in TNF ter sintezo različnih citokinskih receptorjev, adhezijskih molekul, kot so ICAM-1, VCAM-1 in E-selektina, rastnih faktorjev, metaloproteinaz matriksa, tkivnega dejavnika, fibrinogena, plazminogenega aktivatorja urokinaznega tipa, NO, prostaciklina in proteaze nexin 1 (40). IL-1 povzroča povišano telesno temperaturo, saj je endogeni pirogen, mobilizacijo nevtrofilcev iz kostnega mozga v kri in proliferacijo njihovih matičnih celic v kostnem mozgu, sodeluje pri aktivaciji

limfocitov T in limfocitov B, spodbuja proteolizo v mišicah, sintezo beljakovin akutne faze v jetrih, povzroča neješčnost in zaspanost, zavre eritropoezo na ravni matičnih celic v kostnem mozgu ter inducira izločanje adrenikortikotropnega hormona in kortikosteroidov (22).

Proteini akutne faze

Serumski amiloid A

SAA predstavlja družino apolipoproteinov, in sicer akutno-fazni SAA (A-SAA) in konstitutivni SAA (C-SAA). Poznani so štirje humani geni: SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4, ki se nahajajo na kromosomu 11. Gena SAA1 in SAA2 kodirata proteine akutne faze SAA1 in SAA2 (A-SAA), katerih *in vivo* koncentracija se med procesom vnetja, ki je posledica infekcije, travme in poškodbe, lahko poveča tudi do 1000-krat in doseže koncentracijo tudi do 1 g/L. Produkta genov za SAA1 in SAA2 kažeta 90% nukleotidno istovetnost, medtem ko sekvenca gena SAA3 kaže 70% istovetnost s proteinoma SAA1 in SAA2. SAA3 je psevdogen, ki se zaradi vrinjenja dodatne baze v eksonu 2, pri ljudeh ne izrazi. Humani gen SAA4, je konstitutivno izražen gen in je v nasprotju z A-SAA minimalno izražen med akutno faznim odzivom (41, 42). Čeprav so jetra primarno mesto sinteze A-SAA in C-SAA obstaja tudi njihova ekstrahepatična sinteza. SAA najdemo v številnih normalnih človeških tkivih: dojkah, možganih, pljučih, gastrointestinalnem traktu, koži in placenti (43). Pri kroničnih vnetjih lahko iz A-SAA nastaja netopni amiloid A, ki se nalaga v tkivih, kar povzroči amiloidozo in lahko tudi odpoved organov (22).

In vitro ter *in vivo* študije so pokazale, da izražanje SAA med vnetjem spodbudijo citokini kot so IL-1, IL-6 in TNF- α . SAA inducira izražanje vnetnega citokina IL-1 in adhezijskih molekul, prav tako pa je vključen v indukcijo encimov, ki razgrajujejo ekstracelularni matriks. V organizmu aktivira levkocite, inducira kemotakso in pospeši fagocitozo. Vpleten je tudi v transport in metabolizem lipidov, predvsem holesterola (41, 22, 44). Med akutno fazno reakcijo se SAA kot apolipoprotein veže na HDL lipoproteine ter tako iz njega izpodrine apolipoprotein A-I (ApoA-I) ter na ta način spremeni metabolizem in transport holesterola, kar lahko prispeva k aterogenezi (45). V endotelijskih celicah inducira izražanje in aktivnost TF, medtem ko značilno zmanjša transkripcijo, aktivnost in izločanje inhibitorja sintezne poti tkivnega aktivatorja (TFPI) ter tako prispeva k trombozi

(46). Povišana koncentracija SAA bi lahko bila značilen dejavnik, ki bi napovedovala tveganje za aterotrombotične zaplete kot tudi kardiovaskularne bolezni (45, 47).

Celične kulture

Celična kultura je homogena populacija celic, ki živi in se razmnožuje v ustreznem gojišču, v *in vitro* pogojih. Njena uporaba omogoča lažjo dostopnost za opazovanje in eksperimentiranje. Prednosti pred organizmom so lažje zagotavljanje enakih in definiranih pogojev poskusa za vse celice in lažje spreminjanje pogojev. Ko študiramo celične kulture, se moramo zavedati razlik glede fizioloških funkcij *in vivo*. Problemi gojenja celic v kulturi so v izgubi specifičnih lastnosti celic, proliferaciji, spremembi tro-dimenzionalne strukture tkiva, zaradi katere se prekinejo interakcije med celicami in medceličnino, manjka živčni in endokrini sistem, zaradi spremembe okolja pa lahko pride do izgub specifičnih celičnih funkcij. Toda, če upoštevamo te razlike, nam lahko celične kulture služijo kot dober model za proučevanje celic (48).

Gojenje celičnih kultur

Celične kulture gojimo v CO₂ inkubatorju, pri temperaturi 37 °C, 5% atmosferi CO₂ in 100% vlažnosti. Gojišče mora vsebovati aminokislino, sladkorje, maščobe, elemente v sledovih, poleg tega pa še antibiotike, antimikotike, antioksidante ter fetalni goveji serum, ki vsebuje vse rastne faktorje, ki vplivajo na celično rast, pritrjevalne faktorje, dodatne minerale, lipide in hormone. Delo s celičnimi kulturami mora potekati v aseptičnih pogojih, in sicer v komorah s sterilnim pretokom zraka, ki se jih pred pričetkom dela razkuži z enournim obsevanjem z ultravijolično svetlobo. Poleg tega, da delamo v aseptičnem okolju, moramo imeti na razpolago tudi sterilni laboratorijski pribor, steklovino in gojišča. Pri rokovanju s celicami je potrebno obvezno nositi zaščitna oblačila: haljo, rokavice, copate in kapo. Zelo pomemben je tudi invertni mikroskop za opazovanje rasti in ustreznosti živih celic. Celične kulture, ki jih trenutno ne rabimo, lahko shranjujemo v tekočem dušiku na -180 C dlje časa. Zamrzujemo le zdrave celice, v zelo gosti suspenziji (2×10^6 celic/mL), in sicer tako, da jim pred zamrznitvijo dodamo krio-zaščitno sredstvo: do 10% glicerola ali dimetilsulfoksida (DMSO). Postopek zamrzovanja mora potekati počasi, da preprečimo nastajanje kristalov v celicah (1° C na minuto), zato epruvelko s celicami najprej čez noč prenesemo v zamrzovalnik (-80 C) v posebni posodi, šele nato pa

jih shranimo v tekočem dušiku. Odtajanje poteka hitro, s potopitvijo krio epruvete v vodno kopel (37° C) in nasaditvijo v ustrezno gojišče, pri čemer je potrebno čim hitreje odstraniti glicerol ali dimetilsulfoksid (DMSO), ki sta lahko toksična za celice (48, 49).

Orodja za študij celične aktivacije

Verižna reakcija s polimerazo

PCR je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA. Možnosti za uporabo te metode so ogromne, saj PCR omoča direktno kloniranje genomske DNA ali cDNA, usmerjeno mutagenozo DNA in analizo DNA, ki je dostopna v majhnih količina (50). Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, deoksinukleozid-trifosfati, ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg²⁺ ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA polimeraza. Najpogosteje se uporablja Taq DNA-polimeraza, ki je izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (50, 51). Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige. V stopnji denaturacije s segrevanjem na 94-95 °C razklenemo verigi DNA in iz dvoverižne dobimo enoverižni DNA. Nato znižamo temperaturo na 40-60°C, pri čemer pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov na enoverižne DNA. Temperaturo dvignemo na 72 °C, ki je optimalna za delovanje termostabilne DNA-polimeraze. Encim se veže na oligonukleotidni začetnik in v smeri 5' proti 3' izgradi komplementarno verigo DNA. DNA, ki nastane v prvem ciklu, služi kot dodatna matrica za izgradnjo novih kopij v drugem ciklu. Teoretično se torej z vsakim ciklom število kopij želenega odseka DNA podvoji. Navadno izvedemo 20-40 ciklov (52). Kadar je naš vzorec RNA, uporabimo za pomnoževanje obratno prepisovanje in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR). V tem primeru RNA z encimom reverzno transkriptazo najprej prepisemo v komplementarno DNA (cDNA), ki jo nato pomnožimo s PCR (53). Pri običajnem (konvencionalnem) PCR poteka detekcija produktov po končanem pomnoževanju, in sicer navadno z elektroforezno ločbo produktov na agaroznem gelu (52).

Gelska elektroforeza

Elektroforeza je standardna metoda za ločevanje, prepoznavo in čiščenje fragmentov DNA. Z agarozno elektroforezo lahko v električnem polju ločujemo molekule, velike od par 10 bp do približno 50 kb. Gel pripravimo tako, da trdno agarozo s segrevanjem raztopimo v elektroforeznem pufru. Z ohlajevanjem raztopine tvori agarozna gel, katerega gostota je odvisna od koncentracije agaroze. Hitrost potovanja DNA je odvisna od velikosti in oblike DNA, koncentracije agaroze, napetosti električnega polja, sestave elektroforeznega pufra in interkelirajočega barvila. Nukleotidno zaporedje fragmentov DNA in temperatura, pri kateri poteka elektroforeza ne vplivata na hitrost potovanja v gelu (50). Za detekcijo nukleinskih kislin se običajno uporablja etidijev bromid (3,9-diamino-5-etil-7fenil-5H-dibenzo(c,e) azepinijev bromid). To fluorescenčno barvilo se nespecifično interkelira med bazne pare dvovertične DNA v razmerju ena molekula etidijevega bromida na 2,5 bazna para in pod UV lučjo (254-366 nm) emitira intenzivno rdeče-oranžno svetlobo z valovno dolžino 590 m. Interkelirani etidijevi ioni fluorescirajo dvajset do tridesetkrat intenzivneje kot nevezani (3).

Kromogena metoda za določanje aktivnosti TF

Kromogena metoda za določanje aktivnosti TF meri peptidilno aktivnost humanega tkivnega dejavnika v celičnem lizatu. Vzorce pomešamo s humanim faktorjem VII in humanim faktorjem X ter jih inkubiramo pri 37° C. Če vzorci vsebujejo lipidiran aktivni TF pride do nastanka kompleksa TF-FVIIa, ki pretvori humani faktor X v aktiviran faktor Xa. Le-ta nato po dodatku kromogenega substrata FXa povzroči njegov razpad ter sprostitvev p-nitroanilina, ki po hidrolizi obarva raztopino. Intenziteto nastale barve oziroma absorbanco izmerimo v spektrofotometru pri valovni dolžini 405 nm. Koncentracijo lipidiranega aktivnega TF v neznanem vzorcu pa odčitamo iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z vzorci z znanimi koncentracijami lipidiranega aktivnega TF. Rezultate izrazimo kot aktivnost tkivnega dejavnika (54).

Namen dela

Diplomska naloga je del projekta, ki proučuje povezavo med vnetjem, aterosklerozo in trombozo v endotelijskih celicah. Izražanje in povečana aktivnost tkivnega dejavnika na humanih endotelijskih celicah je značilna lastnost akutnega in kroničnega vnetja in glavni dejavnik, ki povzroči spremembo antikoagulantne površine endotelijskih celic v prokoagulantno ter lahko na ta način v sistemu žil vodi do nastanka tromboze.

Namen diplomske naloge je primerjati odziv izražanja in aktivnosti tkivnega dejavnika na različnih tipih humanih endotelijskih celic, po stimulaciji z vnetnim dejavnikom IL-1 β ali SAA, v nadaljevanju pa preveriti inhibitorni vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A4 na izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika v celicah stimuliranih z IL-1 β oziroma SAA. Uporabljali in primerjali bomo tri tipe endotelijskih celic, in sicer: endotelijske celice humane koronarne arterije, endotelijske celice humane umbilikalne vene ter humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice. Iz celic v kulturi bomo po 24-urni stimulaciji izolirali RNA ter jo v reakciji reverzne transkripcije prepisali v cDNA, ki jo bomo nato namnožili v verižni reakciji s polimerazo. Detekcijo pomnoženega fragmenta tkivnega dejavnika bomo izvedli z elektroforezo na agaroznem gelu ter etidijevim bromidom. Prav tako pa bomo po 4-urni stimulaciji celic v kulturi pripravili celični lizat ter nato s kromogeno metodo določili aktivnost tkivnega dejavnika v celičnem lizatu.

Cilji diplomske naloge so:

1. Preveriti, če IL-1 β stimulira izražanje mRNA TF, ki se razlikuje glede na tip humanih endotelijskih celic.
2. Preveriti, če celice stimulirane z vnetnim dejavnikom IL-1 β zmanjšajo izražanje mRNA TF po dodatku izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A4.
3. Preveriti, če vnetna dejavnika IL-1 β in SAA stimulirata aktivnost TF, ki se razlikuje glede na tip humanih endotelijskih celic.
4. Preveriti, če celice stimulirane z IL-1 β ali SAA, zmanjšajo aktivnost TF po dodatku izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A4.

Materiali in metode

Materiali

Biološki material

- endotelijske celice humane umbilikalne vene (HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells), Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- endotelijske celice humane koronarne arterije (HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial cells), Cambrex; Warkersville, MD, ZDA
- humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice (HMVEC-d –Human Microvascular Endothelial Cells-Dermal)
- gojišče za HUVEC, ki vsebuje:
 - osnovno rastno gojišče: (EBM-2: Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free), 500mL Clonetics , Cambrex; Warkersville, MD, ZDA
 - gojišče EGM-2 Single Quots, Clonetics, Cambrex; Warkersville, MD, ZDA, ki vsebuje:
 - fetalni goveji serum (FBS), 10 mL
 - humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B), 2mL
 - hidrokortizon (Hydrocortisone), 0,2 mL
 - žilni endotelijski rastni faktor (VEGF), 0,5mL
 - dolgi R rekombinantno inzulino podoben rastni faktor-1 (R3-IGF-1), 0,5mL
 - askorbinska kislina (Ascorbic acid), 0,5mL
 - GA-1000 (gentamicin sulfat, amfoterocin-B), 0,5mL
 - heparin
- gojišče za HMVEC-d in HCAEC, ki vsebuje
 - osnovno rastno gojišče: (EBM-2: Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free), 500mL Clonetics , Cambrex; Warkersville, MD, ZDA
 - gojišče EGM-2 MV, ki vsebuje:
 - fetalni goveji serum (FBS)
 - humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B), 2mL
 - hidrokortizon (Hydrocortisone), 0,2 mL

- žilni endotelijski rastni faktor (VEGF), 0,5mL
- dolgi R rekombinantno inzulino podoben rastni faktor-1 (R3-IGF-1), 0,5mL
- askorbinska kislina (Ascorbic acid), 0,5mL
- GA-1000 (gentamicin sulfat, amfoterocin-B), 0,5mL
- rekombinantni človeški apo-SAA, Peprotech, London, UK
- rekombinantni človeški interleukin 1 β – Invitrogen, Carlsbad, ZDA

Reagenti

- analizni komplet za izolacijo RNA: RNAagents® Total RNA Isolation System, Promega, Madison, ZDA, ki vsebuje:
 - RNAagents® Denaturacijsko raztopino:
 - natrijev citrat 26mM
 - N-lavril sarkozin 0,5%
 - β -merkaptoetanol 0,125M
 - gvanidinijev tiocianat 4M
 - 2M Natrijev acetat (pH 4,0)
 - fenol:kloroform:izoamilni alkohol (99:24:1, pH 4,7)
 - izopropanol
 - voda brez nukleaz (Nuclease-Free Water)
- analizni komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription Systems), Promega, Madison, ZDA, ki vsebuje:
 - reverzno transkriptazo AMV (Avian Myeloblastosis Virus)
 - oligonukleotidne začetnike oligo (dT)
 - dNTP (deoksiribonukleotidno) mešanico, 10 mM
 - rekombinantni RNazni inhibitor rRNasin®
 - MgCl₂, 25 mM
 - 10 \times pufer za reverzno transkripcijo
- analizni komplet za verižno reakcijo s polimerazo (PCR master mix), Promega, Madison, WI, ZDA, ki vsebuje:
 - osnovno mešanico za PCR
 - voda brez nukleaz (Nuclease-free water)

- oligonukleotidni začetniki: Small Sequence detection primers, Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Velika Britanija (preglednica I)

Preglednica I: Pregled zaporedij in temperature prileganja začetnih oligonukleotidov ter pričakovane dolžine fragmentov DNA (S: smerni, AS: protismerni začetni oligonukleotid)

mRNA	Zaporedje začetnega oligonukleotida	Temperatura prileganja	Velikost fragmenta
β -aktin	S: 5' - ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG - 3' AS: 5' - CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC - 3'	59° C	838 bp
TF	S: 5' - ACT ACT GTT TCA GTG TTC AAG CAG TGA TTC - 3' AS: 5' - ATT CAG TGG GGA GTT CTC CTT CCC AGC TCTG - 3'	52° C	232 bp

- analizni komplet za agarozno elektroforezo
 - agarozni gel: E-gel 1% agarose, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
 - označevalec velikosti DNA fragmentov: E-gel® Low Range Quantitative DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
 - barvilo: 10× Blue juice, Gel Loading Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- analizni komplet za določevanje aktivnosti TF (Actichrome® TF kit), American diagnostica, Stamford, Connecticut, ki vsebuje:
 - koncentrirani analizni pufer (10×):
 - Tris
 - NaCl
 - FBS (telečji serumski albumin)
 - CaCl₂
 - NaN₃
 - Hexadimethrine Bromide
 - standard lipidiranega tkivnega dejavnika v liofilizirani obliki
 - humani faktor VIIa v liofilizirani obliki
 - humani faktor X v liofilizirani obliki
 - kromogeni substrat Spectrozyme® FXa v liofilizirani obliki
 - raztopino za zaustavitev reakcije, ki vsebuje glacialno očetno kislino

- visoko prečiščena voda brez Dnaz in Rnaz (Ultra PURE™ distilled water DNase, RNase free), Gibco™, Invitrogen, ZDA
- HEPES Buffered saline solution, Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- Trypsin 10× (Trypsin/Versene EDTA), Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- tripansko modrilo (Trypan blue Stain), BioWhittaker™, Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- krioprotektiv (Cryoprotective Medium) z dimetil sulfoksidom (DMSO), Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- nevtralizacijska raztopina za tripsin (NTS), Clonetics™, Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- fosfatni pufer v slanici: Dulbecco's phosphate buffered Saline (DPBS) 10×, brez kalcija in magnezija, Bio Whittaker, Cambrex, ZDA
- destilirana in deionizirana voda, Biowhittaker™, Warkersville, MD, Cambrex, ZDA
- razkužilo (Kohrsolin FF), Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- absolutni etanol, Ethanol absolute – 99,5%, Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija
- resveratrol – Sigma, Saint Louis, ZDA
- izvleček črnega čaja (tea extract from black tea), Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija
- lipoxin A₄, Sigma-Aldrich GmbH, Nemčija

Aparature in ostali potrebni materiali

- mikroskop BH-2, Olympus, Tokyo, Japonska
- vakumska črpalka, Vacuum pump XF54 230 50, Milipore, Schwalbach, Nemčija
- avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- aparat za slikanje gelov: G-Box, Syngene, Cambridge, Velika Britanija
- spektrofotometer, Tecan Sunrise, Zurich, Švica
- mikroliterska kvarčna kiveta, Camspec, QS, 10,000 mm, Cambridge, Velika Britanija

- aparat za verižno reakcijo s polimerazo. Thermal Cycler 2720, Applied biosystems, Foster City, CA, ZDA
- programska oprema za slikanje gelov, GeneSnap from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- programska oprema za obdelavo slike gelov, GeneTools from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- aparat za elektroforezo: E-gel Power Base™, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- inkubator, Heto Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- 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
- vibracijski mešalnik, Assister, Nemčija
- 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
- šestprekatne plošče, Tissue culture test plates: 9,6 cm², TPP, Trasadingen, Švica
- dvanajstprekatne plošče, Tissue culture test plates: 3,6cm², TPP, Trasadingen, Švica
- droben laboratorijski pribor

METODE

Izvedba poskusa za določanje izražanja mRNA TF

Celice smo nasadili v šest-prekatne plošče ter jih nato po laboratorijskem protokolu gojili do konfluentnosti (55). Ko so celice dosegle ustrezno prekrivnost (vsaj 90%) so bile pripravljene za eksperiment. Z uporabo vakumske črpalke smo odstranili gojišče ter ga zamenjali z 2 mL gojišča, segretega na 37° C, ki ni vsebovalo FBS (fetalni goveji serum) in celice prenesli v inkubator za dve ure. Nato smo gojišče zamenjali z 2 mL svežega gojišča enake sestave, ki smo mu dodali ustrezno koncentracijo stimulatorja (IL-1 β) in/ali inhibitorja (izvleček črnega čaja, resveratrol in lipoksin A₄) (Preglednica (II)). Po 24-urni stimulaciji smo izvedli kolekcijo vzorcev. Iz posameznega prekata smo odpipetirali supernatant v ustrezno označene 1,5 mL epruvete in jih centrifugirali 3 minute pri 14000 \times g. Iz epruvet smo po centrifugiranju odpipetirali po 800 μ L zgornjega dela supernatanta v novo označene epruvete ter shranili na -20 C. Vsak prekat plošče, v katerem so se nahajale celice, smo sprali z 2 mL ledeno mrzlega DPBS. V vsak prekat smo dodali 300 μ L ledene denaturacijske raztopine, ki je povzročila lizo celic ter mešali, dokler ni postala raztopina viskozna. Šestprekatne plošče smo shranili na -80° C ter celice tako pripravili na izolacijo RNA.

Preglednica II: Končne koncentracije uporabljenih stimulatorjev/inhibitorjev

Stimulator/Inhibitor	Končna koncentracija
interlevkin 1 β	1 μ g/L
izvleček črnega čaja	40 mg/l
resveratrol	40 nM
lipoksin A ₄	100 nM

Izolacija RNA iz celic

Izolacija RNA je potekala v digestoriju na ledu, saj smo na ta način upočasnili delovanje RNA-z. Uporabljali smo sterilne filter nastavke, pipete s filtri ter avtoklavirane epruvete. Denaturacijsko raztopino s celicami (300 μ L) smo iz vsakega prekata šestprekatne plošče prenesli v ustrezno označeno 1,5 mL epruveto, takoj premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali na ledu 5 minut. Vmes smo še dvakrat premešali pri istih pogojih. Nato smo dodali 30 μ L 2M natrijevega acetata in petkrat premešali z obračanjem. Po dodatku 300 μ L fenol/kloroform/izoamilnega alkohola, petkratnim mešanjem z obračanjem ter deset sekundnim močnim stresanjem je sledila 15 minutna inkubacija na ledu in 20 minutno centrifugiranje v centrifugi Sigma 3K30 pri 4° C, 10000 \times g. Vodno fazo smo previdno odpipetirali v nove ustrezno označene epruvete ter jim dodali enak volumen izopropanola. Petkrat premešali z obračanjem ter inkubirali 50 minut na -20° C ter nato nadaljevali z 20 minutnim centrifugiranjem (enaki pogoji). Supernatant smo odstranili, oborino RNA pa sprali z 1,0 mL ledeno mrzlega 75% etanolom. Vzorce smo petkrat premešali z obračanjem ter ponovno centrifugirali 20 minut pri 4° C, 10000 \times g. Nato smo odstranili supernatant ter oborino RNA sušili v komori z laminarnim pretokom zraka približno eno uro. Posušeni oborini RNA smo dodali 30 μ L vode brez nukleaz ter deset minut inkubirali na vodni kopeli pri 56° C. Na koncu smo vzorce z izolirano RNA s pipetiranjem dobro premešali ter shranili na -80° C (56).

Spektrofotometrično določanje koncentracije RNA

Čistost ter koncentracijo izolirane RNA smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. 2,3 μ L izolirane RNA smo dodali 67,7 μ L sterilizirane in destilirane vode, s čimer smo dosegli 30 kratno redčitev vzorcev. Pripravljeni raztopini smo izmerili absorbance pri absorpcijskem maksimum nukleinskih kislin: 260 nm ter absorpcijskem maksimumu aromatskih kislin triptofana in tirozina, ki sta sestavna dela večine proteinov: 280 nm. Nato pa smo izračunali razmerje A_{260}/A_{280} , ki kaže na čistočo vzorca in izračunali koncentracijo RNA po enačbi 1. Pri čistem vzorcu RNA je razmerje A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2 (57). Kontaminacija vzorca s proteini in fenoli pa ima za posledico zmanjšano razmerje med obema absorbancama. Če je raztopina nukleinske kisline čista, velja, da je absorbance enoverižne RNA s koncentracijo 40 mg/L pri 260 nm in dolžini optične poti 1 cm enaka 1.

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times 30 \times 40 \text{ mg / L}$$

$$\text{Faktor redčitve} = 30$$

Enačba 1: izračun koncentracije RNA

Reakcija reverzne transkripcije

Iz izolirane RNA smo s pomočjo reverzne transkriptaze in začetnih oligonukleotidov oligo-dT sintetizirali komplementarno verigo mRNA, imenovano cDNA. Glede na število vzorcev smo si izračunali ter pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala pufer RT, magnezijev klorid, deoksiribonukleotid (dNTP), RNazni inhibitor, začetni oligonukleotid oligo-dT, reverzno transkriptazo AMV in vodo brez nukleaz (Preglednica III). Reagente in RNA smo med delom hranili na ledu. V ustrezno označene avtoklavirane epruvete smo s sterilnimi nastavki odpipetirali 14,4 μL reakcijske mešanice, volumen vzorca RNA, ki je ustrezal 1 μg RNA, in tak volumen vode brez nukleaz, da je bil končni volumen v epruveti 30 μL . Volumen vzorca izolirane RNA, ki ustreza 1 μg RNA smo izračunali po enačbi 2, volumen dodane vode pa po enačbi 3. Vse epruvete smo na kratko centrifugirali ter s pomočjo aparata Thermal Cycler 2720 in programom 30 minut pri 43° C, 30 minut pri 53° C in 5 minut pri 94° C izvedli reakcijo reverzne transkripcije. Po končani reakciji smo vzorce centrifugirali in shranili na -20° C ali pa nadaljevali z verižno reakcijo s polimerazo (58).

Preglednica III: Sestavine RT reakcijske mešanice za en vzorec

10× pufer RT	3 µL
dNTP	3 µL
MgCl ₂	6 µL
začetni oligonukleotidi oligo dT	1 µL
RNazni inhibitor	0,75 µL
reverzna transkriptaza AMV	0,6 µL
voda brez nukleaz	0,05 µL
skupni volumen	14,4 µL

$V \text{ vzorca} = \frac{1000\text{ng}}{C_{\text{RNA}}}$	$V \text{ vode} = 15,6\mu\text{L} - V \text{ vzorca}$
<i>Enačba 2: Izračun volumna RNA vzorca</i>	<i>Enačba 3: Izračun volumna vode</i>

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili želeni odsek cDNA. Glede na število vzorcev v posameznem poskusu smo si izračunali ter pripravili v 1,5 ml epruveti ustrezen volumen reakcijske mešanice, ki je vsebovala osnovno mešanico za PCR, začetna oligonukleotida R in F ter vodo brez nukleaz (Preglednica IV). V ustrezno označeno epruveto smo odpipetirali 22 µL reakcijske mešanice in po 3 µL produktov reakcije reverzne transkripcije. Za vsak poskus posebej smo pripravili še negativno PCR kontrolo, tako da smo odpipetirali 22 µl reakcijske mešanice in 3µL vode brez nukleaz, s čimer smo izključili možnost kontaminacije reakcijske mešanice.

Preglednica IV: sestavine reakcijske mešanice PCR za en vzorec

osnovna mešanica PCR	12,5 μ L
začetni oligonukleotid R	1,25 μ L
začetni oligonukleotid S	1,25 μ L
voda brez nukleaz	7 μ L
skupni volumen	22 μ L

Vse epruvete smo kratko centrifugirali in vstavili v aparat za PCR, Thermal Cycler 2720 ter nastavili ustrezen program za PCR (preglednica V). Reakcija je potekala v ciklih, ki so bili sestavljeni iz denaturacije DNA, prileganja začetnih oligonukleotidov in pomnoževanja želenega odseka DNA. V prvi stopnji smo izvedli denaturacijo DNA pri temperaturi 94° C (1 minuta). Sledilo je prileganje začetnih oligonukleotidov (1 minuta). Pri pomnoževanju odseka DNA, ki nosi zapis za TF smo prileganje začetnih oligonukleotidov izvedli pri temperaturi 52° C, pri β aktinu pa pri temperaturi 59° C. V tretji stopnji se je pri temperaturi 72° C veriga podaljševala (1,3 minute). Po končanih ciklih je aparat 10 minut obdržal temperaturo 72° C, nato pa se je temperatura znižala na 4° C. Po končani reakciji smo vzorce centrifugirali in shranili na -20° C ali nadaljevali z agarozno elektroforezo.

Preglednica V: Pogoji verižne reakcije s polimerazo

mRNA	število ciklov	denaturacija	prileganje	pomnoževanje	velikost fragmenta
β aktin	25	94° C / 1 min	59° C / 1 min	72° C / 1,3 min	838 bp
TF	35	94° C / 1 min	52° C / 1 min	72° C / 1,3 min	232 bp

Agarozna elektroforeza in detekcija PCR fragmentov

Z agarozno gelsko elektroforezo smo ločevali molekule DNA na osnovi velikosti, zato smo zraven vzorcev na gel nanesti še označevalec velikosti. Glede na število vzorcev smo v 1,5 mL epruveto pripravili gelsko mešanico, ki je vsebovala pufer Blue Juice in vodo brez nukleaz (preglednica VI). Celotno vsebino smo premešali s kratkim centrifugiranjem, ter v vsako ustrezno označeno epruveto odpipetirali 7,5 μ L gelske mešanice in 12,5 μ L vzorca

iz RT-PCR reakcije. Vse epruvete smo kratko centrifugirali. Posebej smo pripravili še označevalec velikosti (E-gel low range DNA Ladder), in sicer: 0,5 μ L 20 bp označevalca velikosti DNA fragmentov in 19,5 μ L vode brez nukleaz.

Pripravljeno gelsko ploščo 1% agaroze (E-gel® agaroze), ki je že vsebovala etidijev bromid smo vstavili v elektroforezno celico, priključeno na električni tok, ter izvedli dvominutno pred-elektroforezo. Odstranili smo glavniček ter v prvi žepki nanesli označevalec velikosti (dolžinski marker), v ostale žepke pa po 20 μ L pripravljenih vzorcev. Na gel smo nanesli tudi negativno kontrolo PCR. Po končani 30 minutni elektroforezi smo v G:BOX-u gel izpostavili UV transluminatorju. S pomočjo programske opreme GeneSnap from SynGene smo posneli sliko gela. Slike gelov smo nato obdelali s programsko opremo GeneTools from SynGene, pri čemer smo izračunali površino pod krivuljo za vsak fragment, ki nam je podala količino posameznega produkta PCR. To vrednost smo normalizirali glede na izražanje β aktina in denzitometrično razmerje grafično prikazali.

Preglednica VI:

pufer Blue juice	2 μ L
voda brez nukleaz	5,5 μ L
skupni volumen	7,5 μ l

Izvedba poskusa za merjenje aktivnosti TF

Celice smo nasadili v dvanajst-prekatne plošče. Vsak drugi dan smo zamenjali gojišče in celice opazovali pod mikroskopom. Ko so celice dosegle ustrezno prekrivnost (vsaj 90%) so bile pripravljene za eksperiment. Z uporabo vakumske črpalke smo odstranili gojišče ter ga zamenjali z 2 mL gojišča, segretega na 37° C, ki ni vsebovalo FBS (fetalni goveji serum) in celice prenesli v inkubator za tri ure. Nato smo gojišče zamenjali z 2 mL svežega gojišča enake sestave, ki smo mu dodali ustrezno koncentracijo stimulatorja (IL-1 β , SAA) in/ali inhibitorja vnetja (izvleček črnega čaja, resveratrol in lipoksin A4) (Preglednica VII). Po 4-urni stimulaciji smo izvedli kolekcijo vzorcev. Iz posameznega prekata smo odpipetirali supernatant v ustrezno označene 1,5 mL epruvetke in jih centrifugirali 3 minute pri 14000 \times g v centrifugi Eppendorf Mini spin plus. Iz epruvet smo po centrifugiranju odpipetirali po 800 μ L zgornjega dela supernatanta v novo označene epruvete ter shranili na -20 C. V vsak prekat plošče s celicami smo dodali 150 μ L pufru s

pH = 4 in sestave: 50mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 ter mešali dokler ni raztopina postala viskozna. Dvanajst-prekatne plošče s celicami smo shranili na -80° C.

Preglednica VII: Končne koncentracije uporabljenih stimulatorjev/inhibitorjev za merjenje aktivnosti TF

Stimulator/Inhibitor	Končna koncentracija
interlevkin 1 β	1 μ g/L
serumski amiloid A	1 μ M
izvleček črnega čaja	40 mg/l
resveratrol	40 nM
lipoksin A ₄	1 nM

Predpriprava za določanje aktivnosti TF

Pred pričetkom obdelave vzorca smo si pripravili reagente za določanje aktivnosti TF, in sicer tako (5):

- 1) *analizni pufer*: vsebini viala (5 ml) smo dodali 45 ml filtrirane, deionzirane vode in premešali
- 2) *humani Faktor VIIa*: viali s faktorjem VIIa smo dodali 1,4 ml filtrirane, deionzirane vode in premešali
- 3) *humani Faktor X*: viali s faktorjem X smo dodali 1,4 ml filtrirane, deionzirane vode in premešali.
- 4) *kromogeni substrat Spectrozyme® FXa*: viali s Spectrozyme® FXa smo dodali 2 ml filtrirane, deionzirane vode in premešali.
- 5) *lipidiran TF standard*: vsebini viala z lipidiranim aktivnim TF smo dodali 2,3 mL analiznega pufera ter tako pripravili 500 mM standardno raztopino lipidiranega aktivnega TF in pri tem nežno mešali, dokler se ni standardna raztopina lipidiranega aktivnega TF popolnoma raztopila. Iz 500 mM osnovne standardne raztopine aktivnega lipidiranega TF standarda smo nato z redčitvami pripravili različne koncentracije standardne raztopina aktivnega lipidiranega tkivnega dejavnika, in sicer 30 pM, 15 pM, 7,5 pM, 3,75 pM, 1,88 pM in 0 pM (*Preglednica VIII*).

Preglednica VIII: Prikaz priprave znane koncentracije standardne raztopine lipidiranega aktivnega TF

Koncentracija standardne raztopine lipidiranega aktivnega TF [pM]	Volumen in koncentracija standardne raztopine lipidiranega aktivnega TF	Volumen standardnega redčitvenega pufra [μ L]
30	20 μ l , c = 500 pM	313
15	100 μ l, c = 30 pM	100
7,5	100 μ l, c = 15 pM	100
3,75	100 μ l, c = 7,5 pM	100
1,88	100 μ l, c = 3,75 pM	100
0	/	100

Nato pa smo si v dvanajst prekatnih ploščah iz puferne raztopine celic s postopkom trikratnega zamrzovanja 15 minut pri -80° C in odtaljevanja deset minut pri 37° C pripravili celični lizat. Po trideset minutni inkubaciji pri 37° C smo v vsakem prekatu plošče postrgali celice s plastičnim strgalnikom ter nato odpipetirali 25 μ L celičnega lizata v ustrezno označene epruvetke. Na ta način smo si pripravili vzorce, primerne za izvedbo kromogene metode za določanje aktivnosti TF. Preostanek celičnega lizata pa smo odpipetirali v 1,5mL epruvete ter jih shranili na -80° C.

Izvedba kromogene metode za določanje aktivnosti TF

Po pripravi vzorcev je sledil postopek za izvedbo kromogene metode za TF. Pri našem delu smo uporabili ploščo s 96 vdolbinicami. Na ploščo smo nanegli 50 μ L assay pufra s pH=8,4. Nato smo nanegli v duplikatih po 25 μ L standardov ali vzorcev, ki smo jih predhodno redčili z analiznim pufrom, in sicer HCAEC 1:5, HUVEC 1:3 ter HMVEC 1:2. Po dodatku 25 μ L FVIIa in 25 μ L FX smo ploščo pokrili in jo pri 37° C inkubirali 15 minut. V vse vdolbinice smo nato nanegli še kromogeni substrat, pri čemer se je raztopina v vdolbinicah pokrite plošče po dvajset minutni inkubaciji pri 37° C obarvala rumeno. Na koncu smo z dodatkom očetne kisline ustavili reakcijo. 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. Po merjenju smo dobili meritve absorbanco v obliki tabele izpisane na ekranu. Potrebna je bila nadaljna računska obdelava rezultatov. V MS Excelu smo si naredili lastno predlogo za lažje preračunavanje podatkov. Najprej smo si izračunali povprečno absorbanco standardov ter vzorcev. Nato smo na osnovi znanih koncentracij standardnih raztopin lipidiranega aktivnega tkivnega dejavnika ter izmerjenih absorbanco izračunali enačbo umeritvene oziroma standardne krivulje (Enačba 4) ter na osnovi enačbe umeritvene krivulje še koncentracijo lipidiranega aktivnega TF v vzorcih. Rezultate smo podali kot aktivnost tkivnega dejavnika.

$$y = ax^2 + bx + c$$

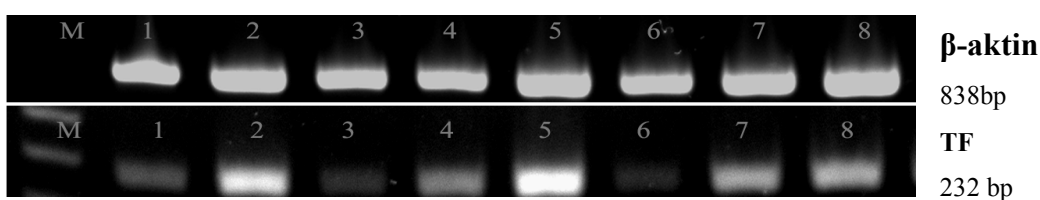
Enačba 4: Enačba umeritvene krivulje: $y = A$, a , b in c so koeficienti kvadratne funkcij, x = koncentracija lipidiranega aktivnega dejavnika

Rezultati

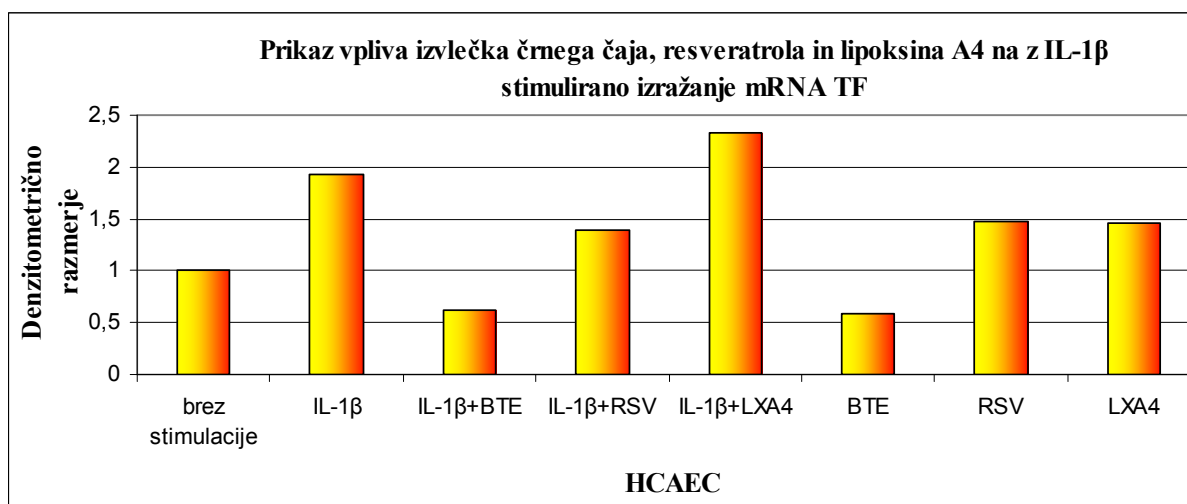
Vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na z IL-1 β stimulirano izražanje tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah

Izražanje mRNA TF v HCAEC

Nestimulirane celice so izražale zelo majhno količino mRNA TF (slika 5, oznaka 1, spodnji panel), medtem ko je stimulacija z IL-1 β dvakrat povečala izražanje mRNA TF (slika 5, oznaka 2). Izvleček črnega čaja in resveratrol sta zmanjšala stimulativen učinek IL-1 β , kar smo dokazali z močnim znižanjem izražanja mRNA TF po dodatku izvlečka črnega čaja (slika 5, oznaka 3 in slika 6) in rahlim znižanjem izražanja mRNA TF po dodatku resveratrola celicam, stimuliranih z IL-1 β (slika 5, oznaka 4 in slika 6). Lipoksin A₄ je nekoliko povečal stimulativen učinek IL-1 β , kar smo opazili s povečanim izražanjem mRNA TF po dodatku celicam stimuliranih z IL-1 β (slika 5, oznaka 5 slika 6). Glede na izražanje mRNA TF v nestimuliranih celicah smo ugotovili, da je izvleček črnega čaja močno znižal izražanje mRNA TF (slika 5, oznaka 6 in slika 6), medtem ko sta resveratrol in lipoksin A₄ rahlo povečala izražanje mRNA TF (slika 5, oznaka 7, 8 in slika 6).



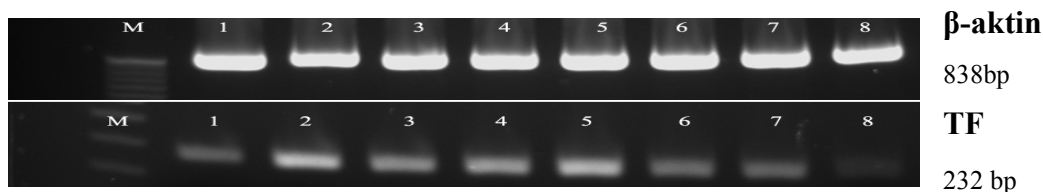
Slika 5: mRNA izražanje TF v IL-1 β stimuliranih HCAEC, po modulaciji z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (M- DNA označevalec velikosti, bp-bazni pari)



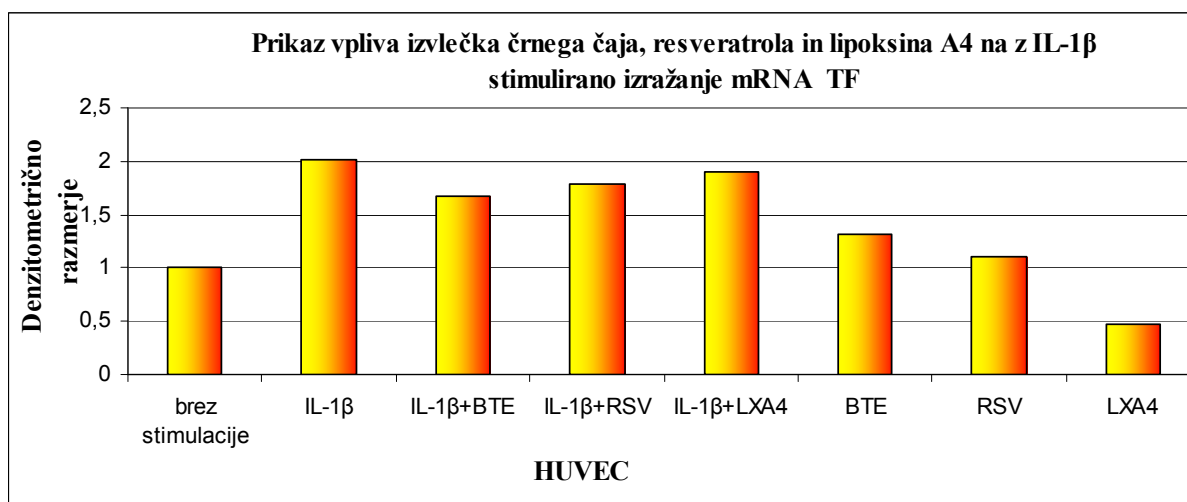
Slika 6: Denzitometrična razmerja med intenzivnostjo mRNA po normalizaciji z beta aktinom glede na kontrolo nestimuliranih HCAEC pri različnih modulacijah stimulatívne učinka z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (raven izražanja TF v stimuliranih/nestimuliranih celicah)

Izražanje mRNA TF v HUVEC

Nestimulirane celice so komaj zaznavno izražale mRNA TF (slika 7, oznaka 1), medtem ko je stimulacija z IL-1 β dvakrat povečala izražanje mRNA TF. Vidimo lahko, da pri z IL-1 β stimuliranih HUVEC dodatek izvlečka črnega čaja in resveratrol sicer malo zniža izražanje mRNA TF, a je to znižanje premajhno, da bi bilo značilno (slika 7, oznaka 3, 4 in slika 8). Lipoksin A₄ ni vplival na stimulatívni učinek IL-1 β , saj je bilo izražanje mRNA TF v celicah stimuliranih z IL-1 β in lipoksinom A₄ enako izražanju mRNA TF v celicah stimuliranih z IL-1 β (slika 7, oznaka 5 in slika 8). Glede na izražanje mRNA TF v nestimuliranih HUVEC smo ugotovili, da izvleček črnega čaja in resveratrol bistveno ne vplivata na izražanje mRNA TF (slika 7, oznaka 6, 7 in slika 8), medtem ko lipoksin A₄ nekoliko zniža izražanje mRNA TF. (slika 7, oznaka 8 in slika 8).



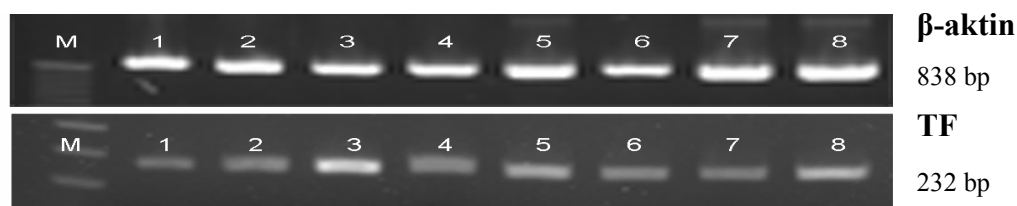
Slika 7: mRNA izražanje TF v IL-1 β stimuliranih HUVEC, po modulaciji z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (M- DNA označevalec velikosti, bp-bazni pari.)



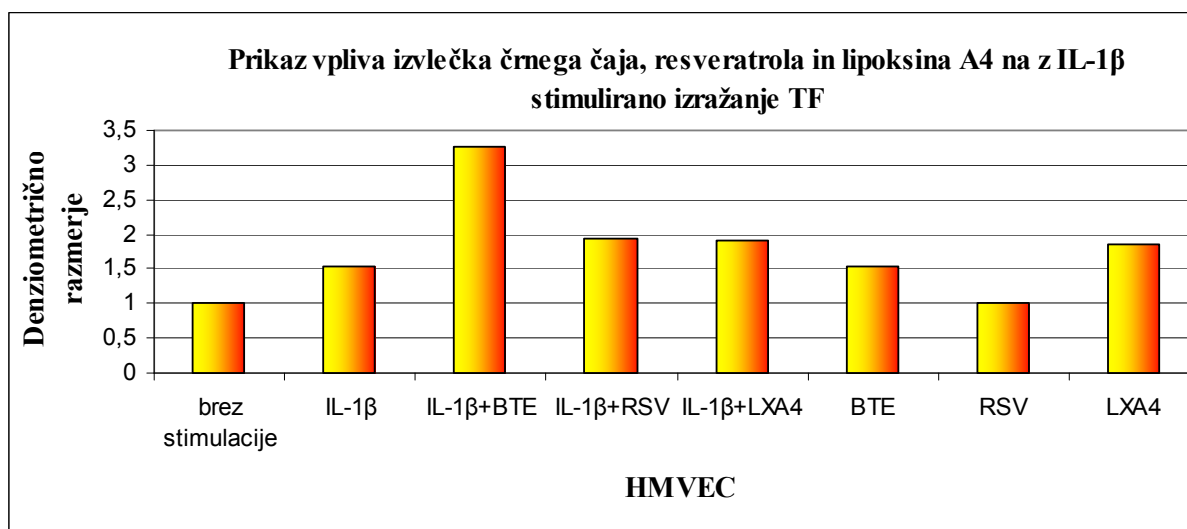
Slika 8: Denzitometrična razmerja med intenzivnostjo mRNA po normalizaciji z beta aktinom glede na kontrolo nestimuliranih HUVEC pri različnih modulacijah stimulativnega učinka z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (raven izražanja TF v stimuliranih/nestimuliranih celicah)

Izražanje mRNA TF v HMVEC

Odzivnost HMVEC je bila zelo majhna tako, da smo lahko majhne razlike med poskusi zaznali šele na podlagi denzitometričnega razmerja. Tako smo ugotovili, da nestimulirane HMVEC skoraj niso izražale mRNA TF (slika 9, oznaka 1), medtem ko je stimulacija HMVEC z IL-1 β rahlo a neznačilno povečala izražanje mRNA TF. Odzivnost HMVEC je bila močno povečana ob hkratni stimulaciji HMVEC z izvlečkom črnega čaja in IL-1 β (slika 9, oznaka 3 in slika 10), kar nas je nekoliko presenetilo, saj smo pri HCAEC in HUVEC opazili ravno obraten učinek. Opazili smo tudi, da je bila odzivnost HMVEC, stimuliranih z IL-1 β in resveratrolom ali lipoksinom A₄ (slika 9, oznaka 4, 5 in slika 10), rahlo povečana glede na odzivnost HMVEC, stimuliranih samo z IL-1 β (slika 9, oznaka 2 in slika 10). Glede na izražanje mRNA TF v nestimuliranih HMVEC smo ugotovili, da sta izvleček črnega čaja in lipoksin A₄ rahlo povečala izražanje mRNA TF (slika 9, oznaka 6, 8 in slika 10), medtem ko resveratrol ni vplival na izražanje mRNA TF (slika 9, oznaka 7 in slika 10).



Slika 9: mRNA izražanje TF v IL-1 β stimuliranih HMVEC, po modulaciji z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (M- DNA označevalec velikosti, bp-bazni pari)



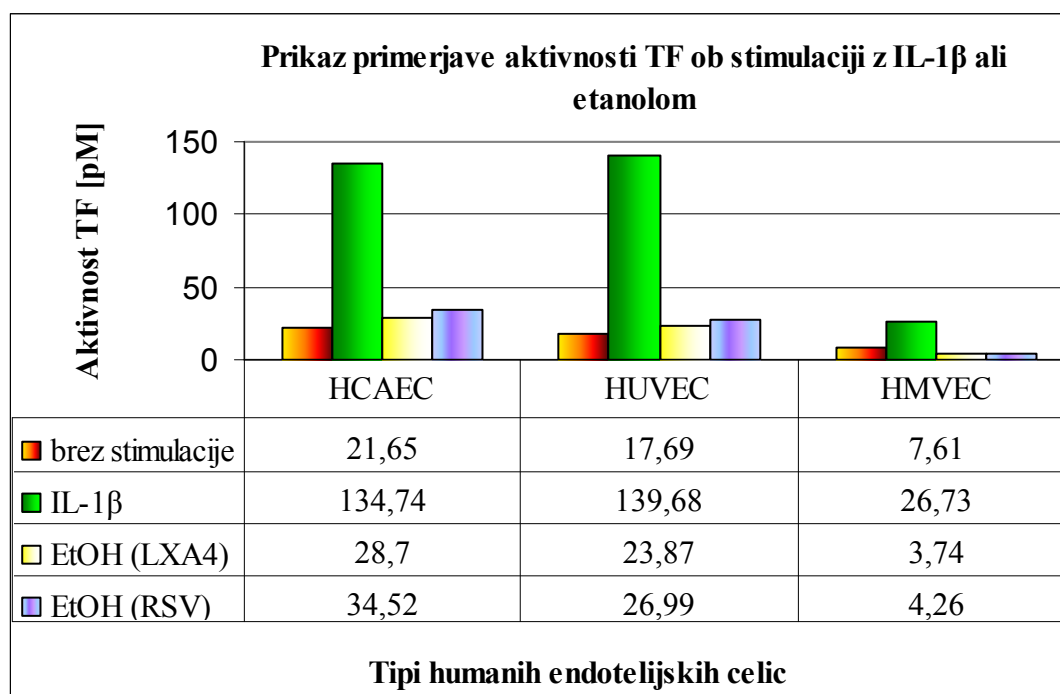
Slika 10: Denzitometrična razmerja med intenzivnostjo mRNA po normalizaciji z beta aktinom glede na kontrolo nestimuliranih HMVEC pri različnih modulacijah stimulatívne učinka z izvlečkom črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ (raven izražanja TF v stimuliranih/nestimuliranih celicah)

Vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na z IL-1 β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah

Vpliv etanola na aktivnost tkivnega dejavnika

Ker sta resveratrol in lipoksin A₄, ki smo jih v nadaljnjih poskusih uporabljali kot potencialna inhibitorja, raztopljena v etanolu, smo želeli ugotoviti vpliv samega etanola na endotelijske celice. Etanol je pri celičnem tipu HCAEC in celičnem tipu HMVEC rahlo

povečal aktivnost tkivnega dejavnika, medtem ko je pri celičnem tipu HMVEC rahlo zmanjšal aktivnost tkivnega dejavnika, a je to povečanje oziroma zmanjšanje premajhno, da bi ga lahko ločili od napake metode oziroma variabilnosti aktivnosti TF znotraj posameznega celičnega tipa. Kot pozitivna kontrola nam je služil IL-1 β , ki je deloval stimulatивно na odziv celic. Povečane odzivnosti celic nismo zaznali z etanolom, saj je bila odzivnost celic primerljiva z odzivnostjo nestimuliranih celic (ozadja). Tako smo dodali 0,5 μ L 96% etanola, kar je v mediju predstavljalo 0,048 % raztopino etanola in je bilo enako volumnu dodanega resveratrola, ter 0,93 μ L 98% etanola, kar je v mediju predstavljalo 0,091% raztopino etanola in je bilo enako volumnu dodanega lipoksina A₄ (slika 11).

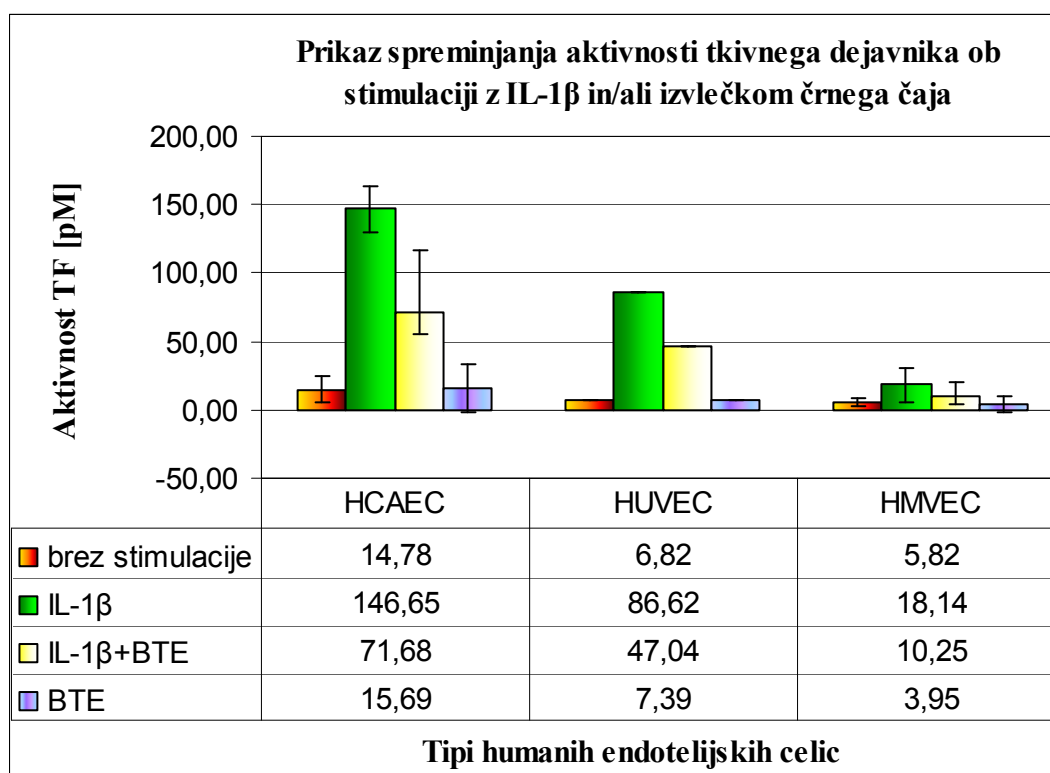


Slika 11: Vpliv etanola na aktivnosti tkivnega dejavnika: primerjava znotraj posameznih tipov humanih endotelijskih celic

Vpliv izvlečka črnega čaja na z IL-1 β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah

Pri poskusih stimulacije celic z IL-1 β je le-ta pri vseh celičnih tipih povečal aktivnost tkivnega dejavnika. Največje povečanje aktivnosti tkivnega dejavnika je povzročil pri celičnem tipu HCAEC, nekoliko nižje pri celičnem tipu HUVEC, najnižje pa pri celičnem

tipu HMVEC. Pri stimulaciji celic, z IL-1 β in izvlečkom črnega čaja, smo pri vseh celičnih tipih opazili močno znižanje aktivnosti tkivnega dejavnika, iz česar lahko sklepamo, da je izvleček črnega čaja inhibitor aktivnosti tkivnega dejavnika. Vidimo lahko, da dodatek izvlečka črnega čaja ni vplival na aktivnost tkivnega dejavnika na nobenem celičnem tipu, saj so imele vse stimulirane celice primerljivo aktivnost tkivnega dejavnika z nestimuliranimi celicami (slika 12).

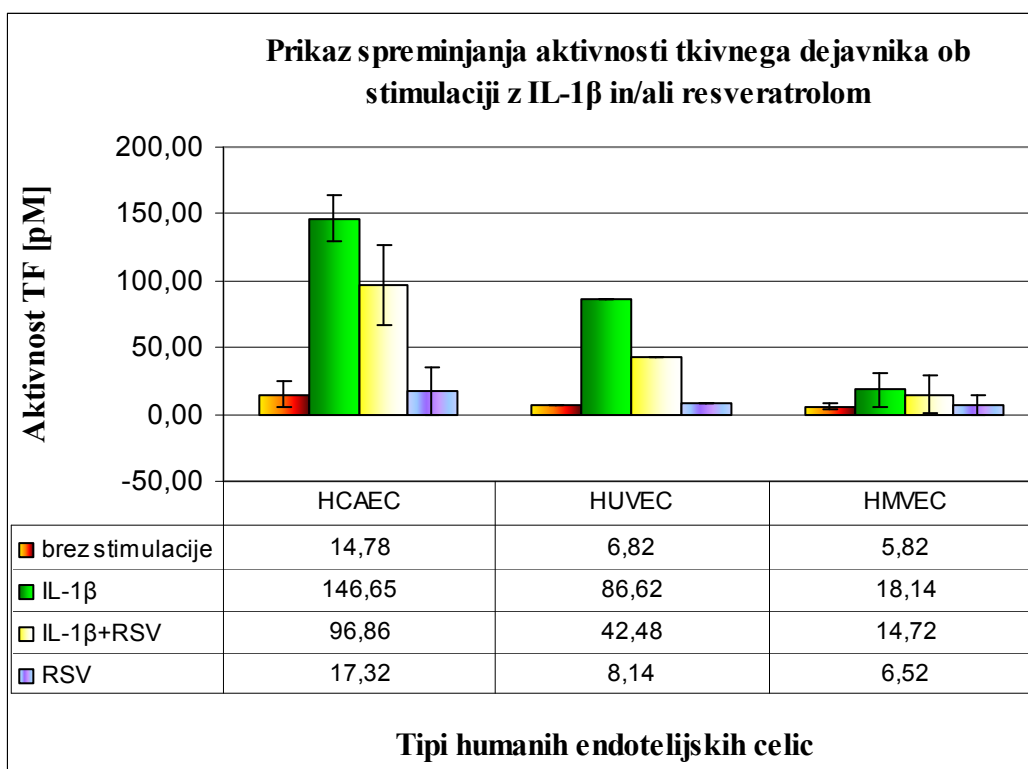


Slika 12: Vpliv izvlečka črnega čaja (BTE) na z IL-1 β stimulirano aktivnosti tkivnega dejavnika: primerjava znotraj posameznih tipov humanih endotelijskih celic

Vpliv resveratrola na z IL-1 β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah

Pri poskusih stimulacije celic z IL-1 β je le-ta pri vseh celičnih tipih povečal aktivnost tkivnega dejavnika. Pri HCAEC in HUVEC smo po dodatku IL-1 β in resveratrola opazili značilno znižanje aktivnosti tkivnega dejavnika, iz česar bi lahko sklepali, da ima resveratrol inhibitorni vpliv na aktivnost tkivnega dejavnika. HMVEC, stimulirane z IL-1 β in resveratrolom, kažejo sicer rahlo znižan odziv v primerjavi z celicami, stimuliranimi z IL-1 β , a so razlike premajhne, da bi jih lahko označili kot značilne. Opazili smo tudi, da dodatek resveratrola samega ni imel vpliva na aktivnost tkivnega dejavnika na nobenem

celičnem tipu, saj so imele te celice primerljivo aktivnost tkivnega dejavnika z nestimuliranimi celicami (slika 13).

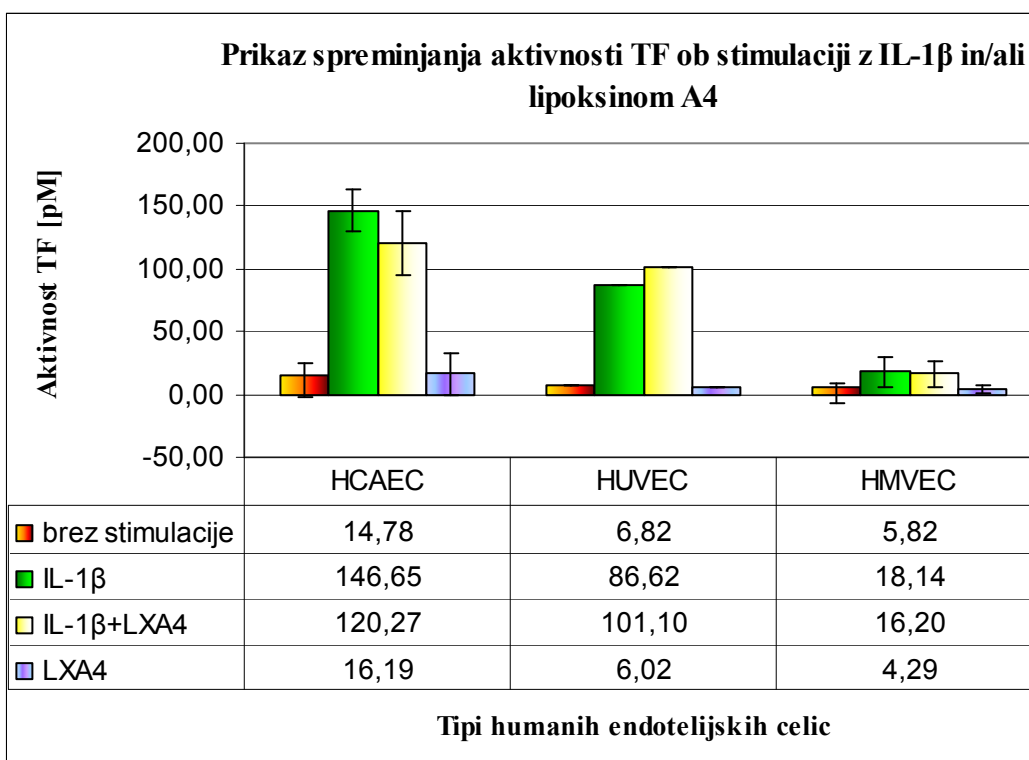


Slika 13: Vpliv resveratrola (RSV) na z IL-1 β stimulirano aktivnosti tkivnega dejavnika: primerjava znotraj posameznih tipov humanih endotelijskih celic

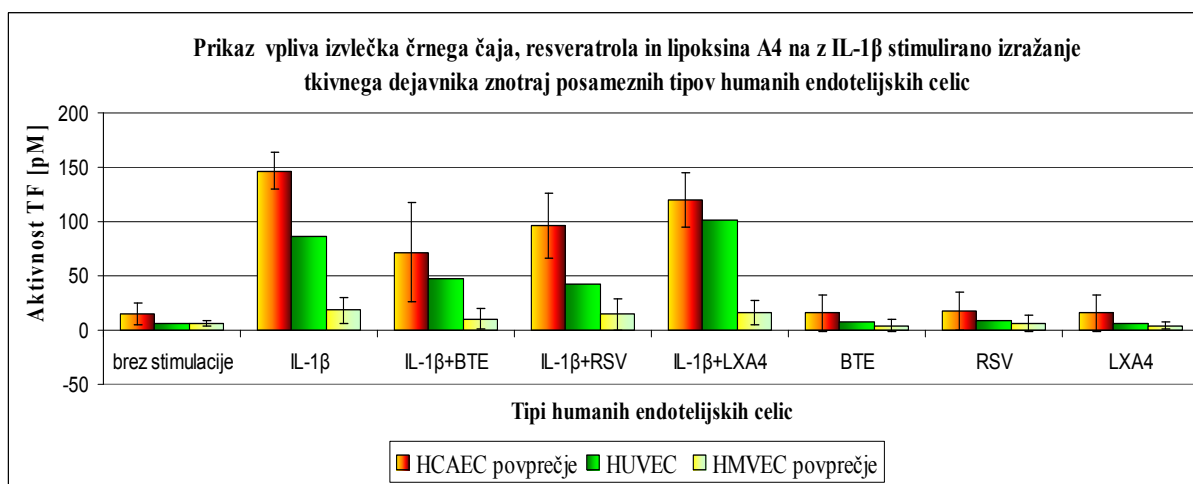
Vpliv lipoksina A₄ na z IL-1 β stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah

Pri poskusih stimulacije celic z IL-1 β je le-ta pri vseh celičnih tipih povečal aktivnost tkivnega dejavnika. Pri HCAEC smo po dodatku IL-1 β in lipoksina A₄ opazili rahlo znižanje aktivnosti tkivnega dejavnika, pri HUVEC pa rahlo povečanje aktivnosti tkivnega dejavnika. Razlike v povečanju oziroma znižanju aktivnosti tkivnega dejavnika po dodatku IL-1 β in lipoksina A₄ so tako v HCAEC kot tudi HUVEC premajhne, da bi jih lahko označili za značilne. Pri HMVEC nismo zaznali spremembe v aktivnosti tkivnega dejavnika po dodatku IL-1 β in lipoksina A₄, saj je bila aktivnost tkivnega dejavnika v z IL-1 β in lipoksinom A₄ stimuliranih HMVEC primerljiva z aktivnostjo tkivnega dejavnika v z IL-1 β stimuliranih HMVEC. Pri vseh celičnih tipih smo prav tako ugotovili, da dodatek

lipoksina A₄ ne vpliva na aktivnost tkivnega dejavnika, saj je le-ta primerljiva z aktivnostjo tkivnega dejavnika v nestimuliranih celicah (slika 14).



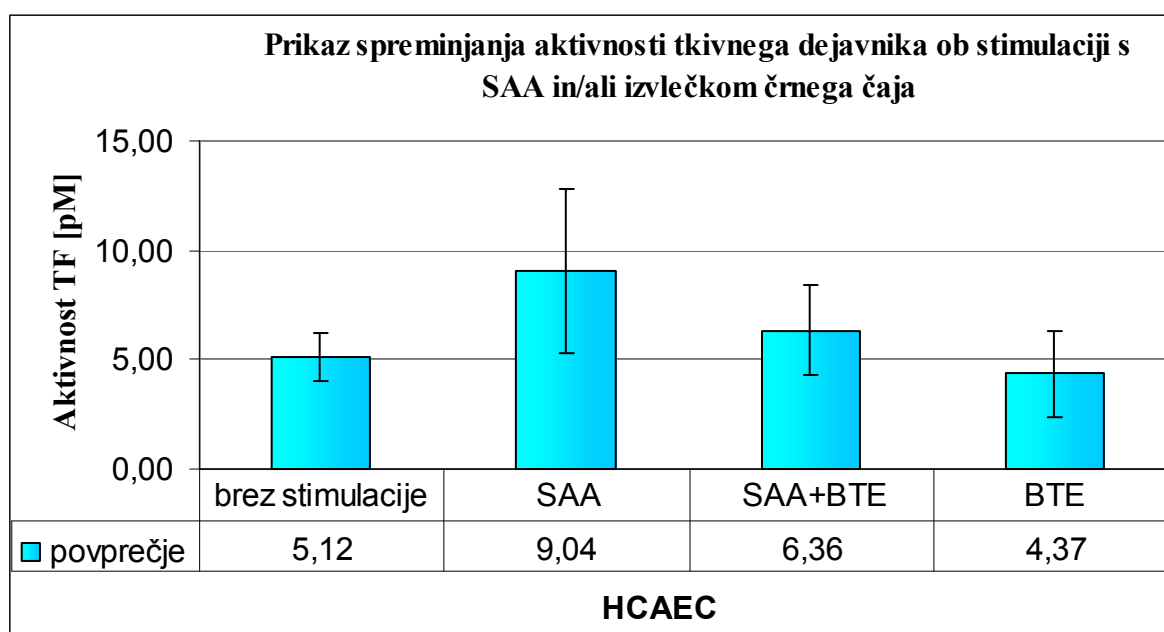
Slika 14: Vpliv lipoksina A₄ (LXA4) na z IL-1 β stimulirano aktivnosti tkivnega dejavnika: primerjava znotraj posameznih tipov humanih endotelijskih celic



Slika 15: Povzetni prikaz vpliva izvlečka črnega čaja (BTE), resveratrola (RSV) in lipoksina A₄ (LXA4) na z IL-1 β stimulirano aktivnosti tkivnega dejavnika: primerjava znotraj posameznih tipov humanih endotelijskih celic

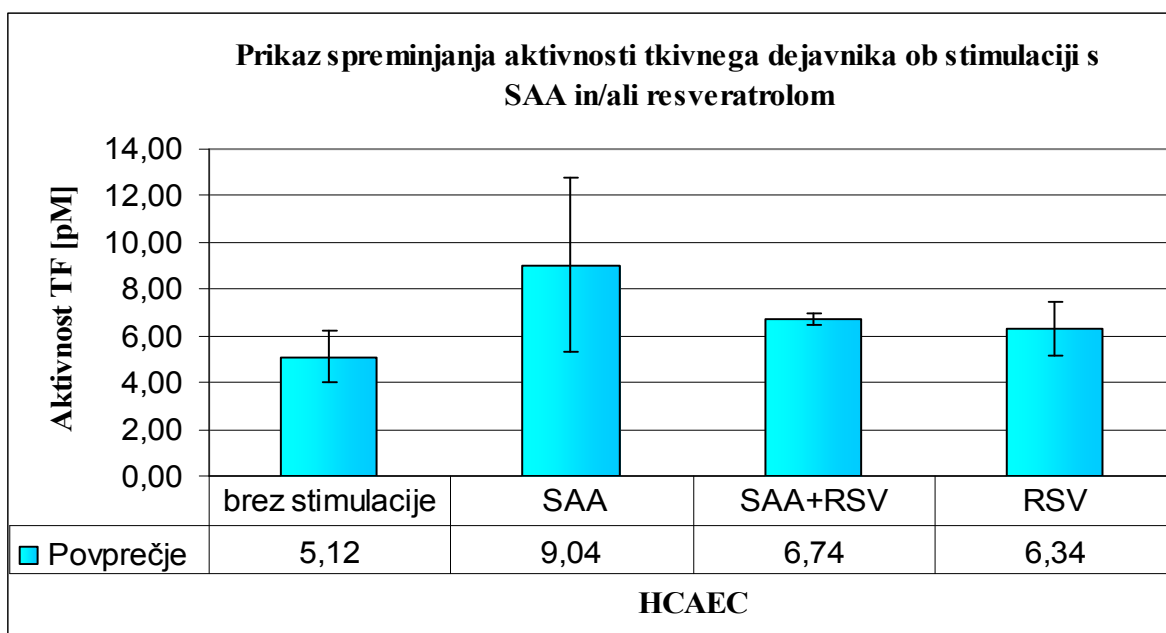
Vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na s SAA stimulirano aktivnost tkivnega dejavnika v HCAEC

Pri stimulaciji HCAEC s SAA smo na osnovi dveh poskusov opazili, da obstaja trend naraščanja aktivnosti tkivnega dejavnika, a so razlike v aktivnosti tkivnega dejavnika med s SAA stimuliranimi HCAEC ter nestimuliranim HCAEC v povprečju majhne ter tako neznačilne. Opazili smo, da celice, stimulirane s SAA in izvlečkom črnega čaja kažejo manjši odziv kot celice, stimulirane samo s SAA in da je odziv celic, stimuliranih z izvlečkom črnega čaja, prav tako nižji od odziva nestimuliranih celic (Slika 16 in slika 19).



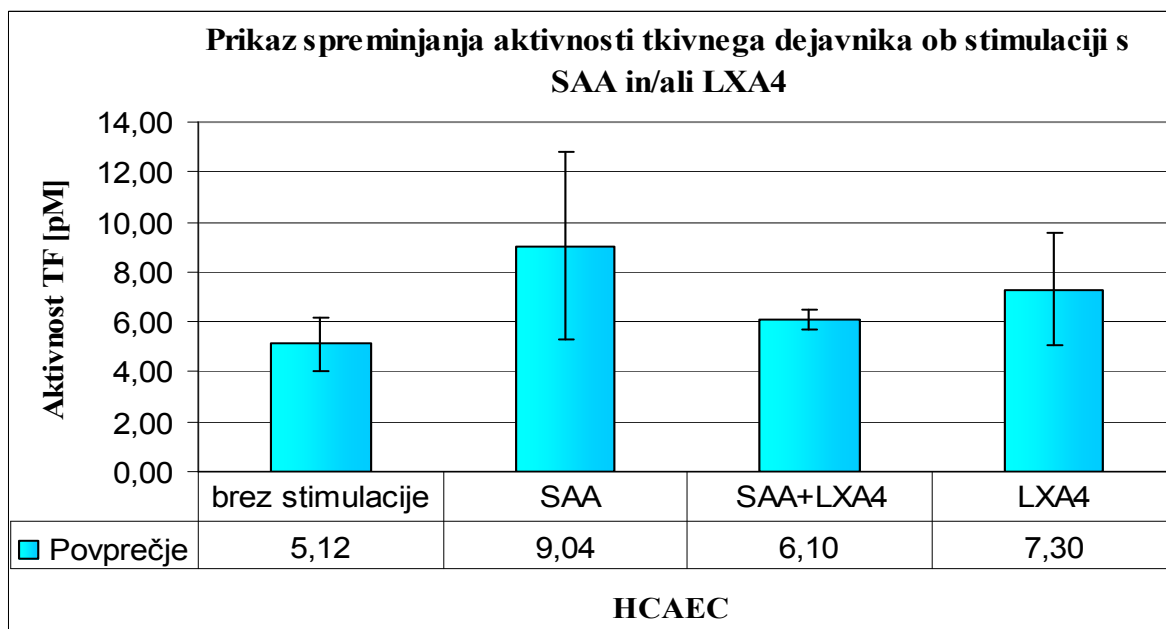
Slika 16: Vpliv SAA in/ali izvlečka črnega čaja (BTE) na aktivnost tkivnega dejavnika v HCAEC

V primerjavi s SAA stimuliranimi HCAEC smo v s SAA in resveratrolom stimuliranih HCAEC zaznali rahlo znižanje aktivnosti tkivnega dejavnika. Prav tako smo opazili, da kažejo celice stimulirane s SAA rahlo večjo aktivnost tkivnega dejavnika kot nestimulirane celice (slika 17 in slika 19).

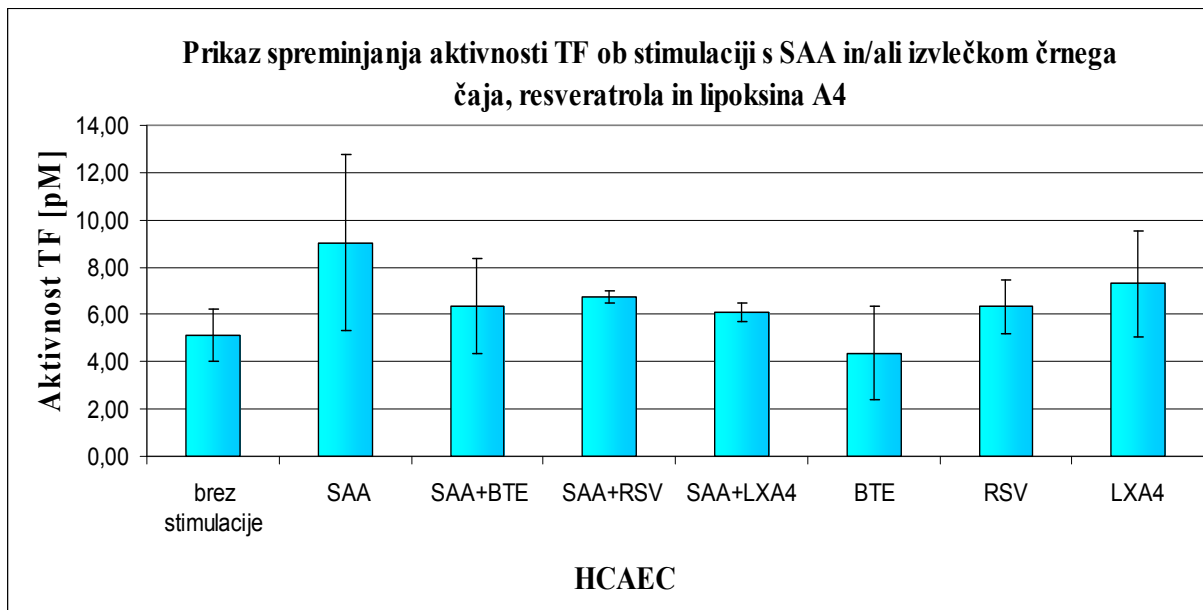


Slika 17: Vpliv SAA in/ali resveratrola (RSV) na aktivnost tkivnega dejavnika v HCAEC

Pri HCAEC smo po dodatku lipoksina A₄ opazili rahlo, a neznačilno povečanje aktivnosti tkivnega dejavnika. Pri HCAEC, stimuliranih s SAA in lipoksinom A₄ pa smo zaznali nižjo aktivnost tkivnega dejavnika kot pri celicah stimuliranih samo s SAA, a so razlike premajhne, da bi jih lahko označili kot signifikantne (slika 18 in slika 19).



Slika 18: Vpliv SAA in/ali lipoksina A₄ (LXA4) na aktivnost tkivnega dejavnika v HCAEC



Slika 19: Povzetni prikaz vpliva izvlečka črnega čaja (BTE), resveratrola (RSV) in lipoksina A₄ (LXA4) na s SAA stimulirano aktivnosti tkivnega dejavnika v HCAEC

Razprava

Endotelijske celice modulirajo ravnotežje med trombozo ter hemostazo (59). To ravnotežje je lahko porušeno zaradi prekomernega izražanja tkivnega dejavnika na površini endotelijskih celic. Povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika na humanih endotelijskih celicah je lastnost akutnega in kroničnega vnetja in je lahko povezano z življensko ogrožujočo trombozo. V diplomski nalogi smo izhajali iz hipoteze, da povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika spremeni antikoagulantno površino endotelijskih celic v prokoagulantno, in da se poveča njegovo izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika ob stimulaciji endotelijskih celic z vnetnim dejavnikom IL-1 β ali SAA. Tako bi lahko povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika na endotelijskih celicah vzpodbudilo trombotične in koagulativne procese. Prav tako smo predvidevali, da bi se lahko znižalo izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika ob stimulaciji celic z izvlečkom črnega čaja, resveratrolom in lipoksinom A₄. Za ta namen smo uporabili tri različne tipe humanih endotelijskih celic (HCAEC, HUVEC ter HMVEC).

Celice, ki smo jih uporabili pri izvedbi poskusov, smo nasadili v šest-prekatne plošče. Ko so celice dosegle vsaj 90% prekrivnost, je posamezen prekat vseboval 10⁶ celic. Po izvedbi poskusa ter 24-urni stimulaciji celic smo izolirali RNA. Izolacija RNA je potekala v digestoriju na ledu, saj smo na ta način upočasnili delovanje RNAz ter se izognili škodljivim vplivom kemikalij. Lizo celic ter sprostitvev RNA smo povzročili z denaturacijskim pufrom, ki je vseboval inhibitorja RNAze: gvanidinijev tiocianat ter β -merkaptotanol, natrijev citrat ter Na-lavril sarkozin. Z ekstrakcijo v fenol:kloroform:izoamilalkoholu smo izvedli ločitev RNA od DNA ter proteinov, pri čemer smo v zgornji vodni fazi dobili RNA, v vmesni ter spodnji fazi pa proteine ter DNA. Slabše ločevanje faz je vplivalo na razmerje med A₂₆₀ in A₂₈₀. Vodno fazo smo odstranili s precipitacijo RNA v enaki količini izopropanola ter nastalo oborino spirali s 75% etanolom. Zaradi majhne količine RNA ponavadi nismo videli oborine. Po sušenju oborine v komori s sterilnim pretokom zraka smo z UV-spektrofotometrom izmerili absorbanco, izračunali razmerje med A₂₆₀/A₂₈₀ in tako določili čistost vzorca. Razmerja so bila različna (od 1,3 do 1,8), vendar so bila v posameznem poskusu približno enaka. Iz celic smo

izolirali celotno RNA, nas pa je zanimala le informacijska RNA, ki ima na koncu 3' značilno zgradbo iz poliadenilnega repa, kar smo izkoristili v reakciji reverzne transkripcije. V vzorcu RNA smo z oligonukleotidnimi začetniki oligo(dT)₁₅ in reverzno transkriptazo AMV sintetizirali komplementarno verigo mRNA, imenovano cDNA. Želene odseke cDNA smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo, pri čemer smo uporabili oligonukleotidne začetnike za TF in β -aktin, katerega izražanje je enako v stimuliranih in nestimuliranih celicah. Pomnožene produkte PCR smo ločili z elektroforezo na agaroznem gelu. Detekcijo pa smo izvedli z UV transluminatorjem. Opazili smo, da so bile slike gelov različno osvetljene. Uporabljali smo komercialno pripravljene gele, ki so imeli že dodan etidijev bromid in možno je, da so vsebovali različno koncentracijo etidijevega bromida, ki je lahko po UV osvetlitvi različno seval. Prav tako pa je možno, da je prišlo do upada koncentracije etidijevega bromida zaradi izpostavljenosti svetlobi. Znano je namreč, da etidijev bromid na svetlobi razpada.

Podatki iz relativnega RT-PCR imajo večji kvantitativni pomen, če se reakcija konča, medtem ko sta oba β -aktin in TF zaznana in pomnožena v eksponentni fazi. Ker smo uporabljali primarne humane celice, smo morali število ciklov za TF povečati (35 ciklov), drugače ne bi dobili zaznave v določenih vzorcih. Tako smo dosegli s PCR produktom za TF že plato reakcije. V tem primeru smo "žrtvovali" bolj kvantitativne rezultate za splošno zaznavo, celotno metodo z β -aktin normalizacijo pa smo izpeljali zgolj kot "nalogo v normaliziranju". Boljša alternativa za kvantificiranje produkta bi bil kvantitativni PCR v realnem času.

Čeprav so bile vse uporabljene celice humane endotelijske celice, smo med njimi opazili razlike v odzivih. HCAEC in HUVEC so se izkazale za enako odzivne celice pri stimulaciji z IL-1 β . Najmanj odzivni tip celic je bil HMVEC, katerega odziv je bil tako nizek, da smo lahko majhne razlike med poskusi zaznali šele na podlagi denzitometričnega razmerja. Močan odziv HCAEC in HUVEC na stimulacijo z IL-1 β nakazuje na dovzetnost arterijskega in venskega endotelija na provnetne dražljaje in protrombotične dogodke. HCAEC so bile prav tako najodzivnejše v izločanju IL-6, kar še potrjuje zgornje podatke (60).

Ker iz literature ni znano, ali izvleček črnega čaja lahko vpliva na z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF, je bila naša naloga ugotoviti vlogo izvlečka črnega čaja na z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF v primarnih humanih endotelijskih celicah. Ugotovili smo, da izvleček črnega čaja v z IL-1 β stimuliranih HCAEC in HUVEC zmanjša z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF in da je inhibitorni vpliv izvlečka črnega čaja na z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF bistveno večji v HCAEC kot v HUVEC. Razlog za inhibitorni vpliv izvlečka črnega čaja na z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF v HCAEC in HUVEC bi lahko pripisali protivnetnemu delovanju izvlečka črnega čaja. Možno je namreč, da izvleček črnega čaja inhibira aktivacijo vnetnega nuklearnega faktorja NF- κ B in tako onemogoči njegov prehod iz citosola v jedro ter vezavo na promotor TF (11). V nasprotju z našimi pričakovanji so HMVEC, stimulirane z izvlečkom črnega čaja in IL-1 β kazale povečano izražanje mRNA TF v primerjavi s celicami, stimuliranih z IL-1 β . Tako lahko sklepamo, da je v celični kulturi, ki smo jo stimulirali z IL-1 β in izvlečkom črnega čaja, prišlo do aditivne aktivacije signalnih poti, zaradi katerih je prišlo do povečanega izražanja mRNA TF. Razlog za povečano izražanje mRNA TF bi lahko bila tudi okužbe kulture, saj LPS in endotoksini povečajo izražanje mRNA TF (59, 61), vendar je to manj možna razlaga. Celice smo namreč opazovali pod mikroskopom in ni bilo nikakršnih znakov kontaminacije, kot bi lahko bilo na primer zmanjšano število celic, odstop celic od podlage, neprozoren medij, plavajoči celični ostanki. Zato predvidevamo, da v HMVEC pride do različnih regulacijskih procesov, ki potencirajo izražanje TF v prisotnosti IL- β in izvlečkom črnega čaja.

Ker so študije pokazale, da resveratrol v relativno visokih koncentracijah (10-20 μ M) v endotelijskih celicah humane umbilikalne vene (HUVEC) po stimulaciji z IL-1 β inhibira indukcijo izražanja mRNA TF (36), nas je v nadaljevanju zanimal vpliv resveratrola na izražanje mRNA TF. Resveratrol je pri celičnem tipu HCAEC značilno znižal z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF, medtem ko je pri celičnem tipu HUVEC in HMVEC neznačilno moduliral (zmanjšal oziroma povečal) z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF. Pri vseh treh celičnih tipih, stimuliranih z resveratrolom samim, smo zaznali rahlo povečano izražanje mRNA TF v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Razlog, da resveratrol zniža z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF, bi lahko pripisali protivnetnemu delovanju resveratrola. Znano je namreč, da inhibira aktivacijo vnetnih nuklearnih faktorjev NF- κ B in AP-1 (33) ter prepreči transkripcijo mRNA zapisa za TF (62).

V nadaljevanju smo preverili vpliv lipoksina A_4 na izražanje mRNA TF. Stimulacija primarnih humanih endotelijskih celic z lipoksinom A_4 ni vplivala na izražanje mRNA TF. Izražanje mRNA TF je bilo pri tipu celic HCAEC in HMVEC sicer višje pri z lipoksinom A_4 stimuliranih celicah v primerjavi z nestimuliranimi, a je ta razlika majhna in jo ne moremo označiti kot značilno. Pri celičnem tipu HUVEC je zaznati rahel upad izražanja mRNA TF, a tudi ta razlika je tako majhna, da jo lahko pripišemo napaki metode. Celice, stimulirane z IL-1 β in lipoksinom A_4 , so v primerjavi s celicami, stimuliranimi samo z IL-1 β , pokazale rahlo povečano izražanje mRNA TF. Le pri tipu celic HUVEC nismo zaznali razlike v izražanju mRNA TF med z lipoksinom A_4 in IL-1 β stimuliranimi celicami v primerjavi z nestimuliranimi celicami.

Sama prisotnost višjih koncentracij mRNA za TF še ne pomeni tudi povečane aktivnosti TF. Zato smo njegovo aktivnost merili v ločenem poskusu enako obdelanih celic. Pred izvedbo metode za določanje aktivnosti TF v celičnem lizatu smo morali najprej pripraviti ustrezne vzorce celičnega lizata, v katerih bo lipidiran TF še vedno aktiven. Tako smo ugotovili, da lahko iz humanih endotelijskih celic v dvanajst prekatnih ploščah, ki smo jim predhodno dodali 150 μ L pufra, pripravimo s postopkom trikratnega zamrzovanja 15 minut pri -80° C in odtaljevanja deset minut pri 37° C ustrezen celični lizat z lipidiranim aktivnim TF. Prav tako smo ugotovili, da je potrebno vzorce celičnega lizata predhodno redčiti, in sicer vzorce celičnega lizata s HCAEC 1:5, vzorce celičnega lizata s HUVEC 1:3 in vzorce celičnega lizata s HMVEC 1:2. Po ustrezni pripravi vzorcev z aktivnim lipidiranim TF smo pričeli z izvedbo kromogene metode. Pri našem delu smo uporabili ploščo s 96 vdolbinicami. Koncentracijo lipidiranega aktivnega v neznanem vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z vzorci z znanimi koncentracijami lipidiranega aktivnega TF. Aktivnost TF, ki smo jo merili in tudi v literaturi (63, 64, 54) pomeni koncentracijo lipidiranega aktivnega TF, ki je sposoben vezati FVII, ga alosterično aktivirati ter v nadaljevanju povzročiti aktivacijo ekstrinzične koagulacije ter posledično nastanek krvnega strdka. Ne gre za direktno merjenje encimske aktivnosti. Merjenje aktivnosti koagulacijskih faktorjev s kromogenimi substrati ima prednost pred merjenem aktivnosti proti naravnemu substratu, ker so meritve bolj ponovljive in jih je lahko avtomatizirati. Poleg tega je manj možnosti za nespecifične interakcije in napačno tolmačenje rezultatov. Slaba stran teh metod je v tem, da merimo aktivnost

koagulacijskega faktorja na sintetičen in na ne-naraven substrat (1). Ne glede na uporabo sintetičnega substrata je aktivnost lipidiranega TF izredno težko meriti. Zaznali smo namreč, da se s časom, odkar smo pripravili standarde lipidiranega tkivnega dejavnika, njihova aktivnost stalno znižuje in da po enem mesecu standardi lipidiranega tkivnega dejavnika niso več aktivni.

IL-1 β in SAA stimulirata v endotelijskih celicah humane umbilikalne vene (HUVEC) izražanje in aktivnost TF (40, 46), ter tako povzročita spremembo antikoagulantne površine endotelijskih celic žile v prokoagulantno. Tako je bil eden od naših ciljev določiti vpliv vnetnih dejavnikov (IL-1 β ali SAA) na aktivnost TF v različnih tipih humanih endotelijskih celicah. IL-1 β zaradi provnetnih in protrombotičnih učinkov na endotelijske celice ter zaradi nastajanja v endotelijskih celicah aterosklerotične lehe velja za enega prvih citokinov, ki pripomorejo k vnetju žilne stene, aterosklerozi ter nastanku tromboze (65). Naši rezultati kažejo, da je IL-1 β je pri vseh treh celičnih tipih močno povečal aktivnost TF. Največje povečanje aktivnosti je povzročil pri celičnem tipu HCAEC, nekoliko nižje pa pri HUVEC. 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.

Pri stimulaciji HCAEC s SAA smo na osnovi dveh poskusov opazili, da obstaja trend naraščanja aktivnosti TF. V literaturi najdemo večje zvišanje aktivnosti TF v s SAA stimuliranih endotelijskih celicah humane umbilikalne vene z uporabo enake metode (46), vendar ta skupina uporablja skoraj 2x višjo koncentracijo SAA (20 μ g/mL) za stimulacijo celic.

V nadaljevanju smo preverili tudi vpliv etanola na aktivnost TF, saj sta bila tako lipoksin A₄ kot resveratrol raztopljena v etanolu. Ugotovljeno je bilo, da kronično uživanje alkohola spodbuja povečano izločanje vnetnih citokinov: IL-1 β , IL-6 ter TNF- α , medtem ko akutno uživanje alkohola zmanjša s patogeni povzročeno indukcijo vnetnih citokinov (66). Na osnovi rezultatov študije, kjer so ugotovili, da etanol inhibira endotelijsko aktivacijo, in sicer s preprečitvijo vstopa transkripcijskega faktorja NF- κ B v jedro (67) smo sklepali, da bi lahko imel etanol, v katerem smo raztopili resveratrol in lipoksin A₄, vpliv tudi na aktivnost TF. V kolikor bi to ugotovili, bi morali to upoštevati pri vrednotenju rezultatov. Aktivnosti TF so bile nekoliko večje pri z etanolom stimuliranih HCAEC ter

HUVEC kot pri nestimuliranih HCAEC in HUVEC, ter manjše pri z etanolom stimuliranih HMVEC kot pri nestimuliranih HMVEC celicah, a so bile razlike premajhne, da bi lahko bile značilne.

Pri stimulaciji celic z izvlečkom črnega čaja in IL-1 β smo pri vseh treh uporabljenih celičnih tipih zaznali nižjo aktivnost TF, kot pri celicah, stimuliranih samo z IL-1 β . Iz česar lahko sklepamo, da izvleček črnega čaja inhibira z IL-1 β stimulirano aktivnost TF. HCAEC, stimulirane s SAA in izvlečkom črnega čaja kažejo rahlo nižjo aktivnost TF kot celice stimulirane samo s SAA, a so razlike premajhne, da bi jih lahko označili kot značilne. Glede na nestimulirane celice so celice, stimulirane le z izvlečkom črnega čaja, kazale enako aktivnost TF. Eden od možnih razlogov, da izvleček črnega čaja inhibira z IL-1 β aktivnost TF, je ta da zaradi protivnetnega delovanja inhibira fosforilacijo ter posledično degradacijo inhibicijskega proteina κ B ter tako prepreči aktivacijo vnetnega transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki preko specifične vezave na promotor TF uravnava ekspresijo gena, ki nosi zapis za TF. Znano je namreč, da nefosforiliran inhibični κ B protein v citosolu tvori kompleks z NF- κ B ter tako prekriva signalno zaporedje transkripcijskega dejavnika NF- κ B, ki je potrebno za translokacijo v jedro (3). Na podlagi prej ugotovljenih dejstev, da izvleček črnega čaja inhibira z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF, bi lahko sklepali, da v HCAEC in HUVEC do določene mere obstaja korelacija med aktivnostjo in izražanjem mRNA TF.

Resveratrol je pri vseh treh celičnih tipih endotelijskih celic znižal z IL-1 β stimulirano aktivnost TF. Prav tako je znižal aktivnost TF v HCAEC, ki smo jih predhodno stimulirali s SAA, a je to znižanje premajhno, da bi bilo značilno. Glede na nestimulirane celice so celice, stimulirane le z resveratrolom samim, kazale enako aktivnost TF. Ugotovitve se skladajo s podatki v literaturi, kjer so pri HUVEC ugotovili inhibičen učinek resveratrola na z IL-1 β stimulirano aktivnost TF (36). Eden od razlogov, zakaj resveratrol znižuje z IL-1 β stimulirano aktivnost TF je ta, da inhibira aktivacijo vnetnih nuklearnih faktorjev NF- κ B in AP-1 ter prepreči transkripcijo mRNA zapisa za tkivni faktor (33). NF- κ B in AP-1 sta pomembna transkripcijska faktorja za encim COX, ki iz arahidonske kisline sproži sintezo prostaglandinov, med drugim tudi PGE-1, za katerega je znano, da znižuje s citokini inducirano aktivnost TF (68). Zato je pri vrednotenju rezultatov potrebno upoštevati, da aktivnost TF ni odvisna le od mRNA TF temveč tudi od drugih dejavnikov. Druga možna

razlaga, zakaj resveratrol inhibira aktivnost TF, pa je ta, da kot inhibitor PKC prepreči fosforilacijo citoplazemske domene TF, ki je pomembna postranslacijska modifikacija TF. Iz podatkov iz literature je znano, da inhibitorji PKC zmanjšajo aktivnost TF (69).

Stimulacija primarnih humanih endotelijskih celic z lipoksinom A_4 ni vplivala na aktivnost TF. HCAEC, stimulirane z vnetnima dejavnikoma (IL-1 β ali SAA) in lipoksinom A_4 , so v primerjavi s celicami, stimuliranih samo z IL-1 β ali SAA, pokazale manjšo aktivnost TF, a je ta razlika majhna in je ne moremo označiti za značilno. Nasprotno se je pokazalo pri tipu celic HUVEC, stimuliranih z IL-1 β , kjer je bila aktivnost TF, ki so jo kazale celice, stimulirane z IL-1 β in lipoksinom A_4 , višja od tiste, ki so jo kazale celice, stimulirane samo z IL-1 β .

Pri rezultatih smo naleteli na situacijo, kjer so vse narejene ponovitve poskusa pokazale določen dvig ali upad aktivnosti tkivnega dejavnika, a so se aktivnosti TF med seboj razlikovale. Izračun standardnih deviacij je tako pokazal, da so se odzivi pri celicah, stimuliranih z vnetnimi dejavniki, nestimuliranih celicah ter celicah, stimuliranih z izvlečkom črnega čaja ali resveratrola oziroma lipoksina A_4 , prekrivali. Zato smo pri interpretaciji rezultatov vzporednih (ali ponovljenih) poskusov bolj upoštevali trende ali razmerja kot pa posamične absolutne vrednosti. Pri rezultatih lahko opazimo nihanja v odzivnosti različnih tipov humanih endotelijskih celic stimuliranih in nestimuliranih celic. Znano je namreč, da se endotelijske celice iz različnih tkiv medseboj razlikujejo glede na fenotip površine celic in po odzivu na stimulacijo s citokini (70). Spremembe v odzivnosti celic so lahko tako posledica različnega starostnega, genetskega, rasnega izvora celic, nasaditvene gostote, različne temperature okolice, medijev ter reagentov. Študije na endotelijskih celicah femoralne arterije pavijanov so potrdile pomembnost pasaže celic, saj so pokazale, da se celice po 30. delitvi ali 10. pasaži postale povečane, oslABLJENE in postarane. Tudi odziv na stimulacijo s citokini je bil močnejši v višjih pasažah (71). Zato smo za čim boljšo primerljivost med poskusi uporabljali 5. pasažo celic HCAEC, HUVEC in HMVEC. Celice so izvirale iz ženskih in moških darovalcev, katerih starost se je gibala od 19 in 57 let. Potrebno bi bilo omeniti, da so HUVEC bile pridobljene iz več neznanih darovalcev, HCAEC ter HMVEC pa iz posamičnega darovalca, katerih spol in rasa sta bila znani.

Endotelijske celice modulirajo ravnotežje med trombozo ter hemostazo. Povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika povzroči spremembo antiokoagulantne površine celic v prokoagulantno ter lahko na ta način v sistemu žil vodi do nastanka tromboze. Pri naših poskusih smo opazili razlike v odzivnosti posameznih tipov celic. HCAEC so bile bolj odzivne na vnetni dejavnik IL-1 β kot HUVEC. Najmanjši odziv smo opazili pri HMVEC. Večina *in vitro* študij, povezanih z aktivacijo endotelijskih celic, uporablja endotelijske celice humane umbilikalne vene, pridobljene iz vene placente in popkovnine. Kljub dejstvu, da se na umbilikalnih endotelijskih celicah le redko pojavijo žilne bolezni, se HUVEC veliko uporabljajo kot model venskih celic za raziskovanje mehanizmov, ki privedejo do nastanka tromboze (72). Ker se ateroskleroza in z njo povezana tromboza najpogosteje razvije v velikih arterijah, dobimo pri naših poskusih najbolj reprezentativne rezultate na kulturi celic, izoliranih iz koronarne arterije. Velika odzivnost HCAEC kaže na veliko dovzetnost arterij na provnetne in protrombotične zaplete, medtem ko nizka odzivnost HMVEC kaže ravno obratni učinek. Pri interpretaciji rezultatov se moramo zavedati, da uporabljamo izolirano celično kulturo in ne organizem, zato so poskusi na humanih endotelijskih celicah, ki predstavljajo *ex vivo* model, in obenem, do sedaj, najboljši celični model realnega stanja in odstopanja so možna. Prav tako moramo upoštevati dejstvo, da v kontroliranih pogojih pri celičnih kulturah za razliko od tkiva znotraj organizma, ne prihaja do vplivov ostalih tkiv, organov in sistemov organizma, ki bi lahko vplivali na regulacijo vnetnega procesa, hemostaze ter tromboze.

Tekom diplomskega dela smo uspešno izpolnili zastavljene cilje. Uspešno smo prikazali razlike v izražanju in aktivnosti tkivnega dejavnika glede na tip endotelijskih celic kot tudi učinke IL-1 β , SAA, izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah. Ker sta povečano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika na humanih endotelijskih celicah značilna lastnost akutnega in kroničnega vnetja in glavni dejavnik, ki povzroči spremembo antiokoagulantne površine endotelijskih celic v prokoagulantno, bi bilo v prihodnje pomembno preučiti mehanizme, s katerimi izvleček črnega čaja, resveratrol in drugi potencialni modulatorji vnetja inhibirajo izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika, saj bi lahko na ta način omejili posledice, ki lahko nastanejo, med njimi tudi razvoj tromboze.

Sklep

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv izvlečka črnega čaja, resveratrola in lipoksina A₄ na z interleukinom-1 β stimulirano izražanje in aktivnost tkivnega dejavnika v humanih endotelijskih celicah. Pri tem smo ugotovili naslednje:

1. Uporabljeni celični tipi humanih endotelijskih celic so različno odzivni. Najbolj odziven tip je HCAEC, sledi HUVEC, HMVEC pa so zelo nizko odzivne na uporabljene stimulatorje.
2. IL-1 β je močno povečal izražanje in aktivnost TF v vseh treh celičnih tipih: HCAEC, HUVEC in HMVEC.
3. HCAEC, stimulirane s SAA, povečajo aktivnost TF v primerjavi z nestimuliranimi HCAEC. Po izračunu povprečij pa vrednosti kažejo na neznačilno povečanje aktivnosti TF.
4. Izvleček črnega čaja je v HCAEC in HUVEC značilno zmanjšal z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF. Pri vseh treh celičnih tipih pa je izvleček črnega čaja močno zmanjšal z IL-1 β stimulirano aktivnost TF.
5. Resveratrol je deloval zaviralno na z IL-1 β stimulirano izražanje mRNA TF v HCAEC, medtem ko je v HUVEC in HMVEC neznačilno moduliral izražanje mRNA TF. Resveratrol je pri vseh treh celičnih tipih zmanjšal z IL-1 β stimulirano aktivnost TF.
6. Lipoksin A₄ ni značilno moduliral vpliva IL-1 β na izražanje mRNA TF ali na aktivnost TF.

Literatura

1. Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami, Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center, Ljubljana, 2005: 9.
2. Urleb-Šarinović V: Hemostatske motnje: strokovno srečanje ob tridesetletnici hemostaziloške dejavnosti v Splošni bolnišnici, Splošna bolnišnica Maribor, 2006.
3. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do zdravilne učinkovine, 1.izdaja, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.
4. Guyton AC, Hall JE: Human physiology and mechanisms of disease, 6th ed., W.B. Saunders, 1996.
5. Kranjc A, Šolmajer T: Antikoagulanti z zaviralnim učinkom na pot tkivni faktor/faktor VIIa. Farm vestn 2004; 55: 479-490.
6. Versteeg HH, Spek AC, PeppelenBosch MP, Richel D: Tissue factor and Cancer Metastasis: The Role of Intracellular and Extracellular Signaling pathways. Mol Med. 2004; 10(1-6): 6-11.
7. Rao MVL, Pendurthi RU: Tissue factor- Factor VIIa Signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 47-56.
8. Maly A. M., Tomasov P, Hajek P, Blasko P, Hrachovinova I, Salaj P, Veselka J: The role of Tissue factor in thrombosis and haemostasis. Physiol. Res. 2007;56:658-695.
9. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb Haemost 1991; 66:67-79.
10. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS: Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. Biochemistry 1989; 28:1755-62.
11. Förster Y, Meye A, Albrecht S, Schwenzler B: Tissue factor and tumor. Clinical and laboratory aspects. Clinica Chimica Acta 2006; 364: 12-21.
12. Bokarewa IM, Morrissey HJ, Tarkowski A.: Tissue factor as a proinflammatory agent. Arthritis Res 2002; 4:190-195.
13. Eirltzen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. Blood Coagul Fibrinolysis 2004; 15: 521-538.
14. Mackman N: Role of Tissue factor in Haemostasis, Thrombosis, and Vascular

- development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1015-1022.
15. Cines DB, Pollak ES, Buck CA: Endothelial cells in Physiology and the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561.
 16. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, 3., popravljena in dopolnjena izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2002.
 17. Žižek B: Endotelijska disfunkcija in ateroskleroza, *Medicinski razgledi* 1998; 37(Suppl 3): 47-48.
 18. Poredoš P: Etiopatogeneza ateroskleroze, *Med razgl* 1998; 37(Suppl 3):1-10.
 19. Blinc A: Stabilna in nestabilna aterosklerotična leha, *Med razgl* 1998; 37(Suppl 3):85-90.
 20. Williams AD, Lemke LT: Foye's principles of Medicinal Chemistry, 5et ed, Lippincott Williams&Wilkins, 2002.
 21. Jerjes-Sanchez C: Venous and arterial thrombosis: a Continuous spectrum of the same disease?. *Eur. Heart J.* 2005;26(1):3-4.
 22. Bresjanac M, Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2001:46.
 23. Vozelj M: Temelji imunologije, prva izdaja, DZS, Ljubljana, 2000.
 24. Kapš P, Medle B: Čaj in zdravje, Karantanija, Ljubljana, 2006.
 25. Balentine DA., Bouwens LCM., Wiseman SA: The Chemistry of Tea Flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1997; 37(8).
 26. Duffy SJ, 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.
 27. Wang C, Li Y: Research progress on property and application of theaflavins. *African Journal of Biotechnology* 2006;5(3):213.
 28. Hong J, Smith TJ, Ho C-T, August DA, Yang CS: Effect of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase- dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology* 2001;62(9):1175-1183.
 29. Celloti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS: Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J Chromatogr* 1996 12; 730(1-2): 47-52.

30. Das DK, Maulik N: Resveratrol in Cardioprotection: A therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Molecular interventions* 2006; 6:36-47.
31. Wagner H: *Zdravilna moč vina, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2001.*
32. Belguendouz LL, Fremont M, Gozzelino T: Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:811-816.
33. Perviaz S: Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB Journal*. 2003; 17:1975-1985.
34. Estrov Z, Shishoidia S, Faderel S, Harris D, Van Q, Kantarijan HM, Talpaz M, Aggarwal BB: Resveratrol block interleukin-1-induced activation of nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *American Society of Hematology*; 2003.
35. Kopp P: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrom of the 'French paradox'?. *European Journal of Endocrinology*. 1998; 138:619.
36. Pendurthi UR, Williams JT, Rao MLV: Resveratrol, a Polyphenolic Coumpound 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;19:419-426.
37. McMahan B, Godson C: Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *J Physiol Renal Physiol* 2004; 286:F189
38. 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.
39. Wrabner B: *Citokini v kliniki-novi pogledi, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007.*
40. Puhlmann M, Weinreich DM, Farma JM, Carroll NM, Turner EM, Jr HRJ: Interleukin-1 β induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial Tissue Factor (TF) activity. *Journal of Translational Medicine* 2005; 3:37.
41. Uhlar CM, Whitehead AS: Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry* 1999; 265: 501-523.
42. Kluge-Beckerman B, Drumm ML, Benson MD: Nonexpression of the human serum amyloid A three (SAA3) gene. *DNA Cell Biol* 1991; 10(9): 651-61.
43. O' Hara R, Murphy PE, Whitehead SA, FitzGerald O, Bresnihan B: Acute-phase

- serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res* 2000; 2:142-144.
44. Shoval-Urieli S, Cohen P, Eisenberg S, Matzner Y: Widespread Expression of Serum Amyloid A in Histologically Normal Human Tissue: Predominant localization to the Epithelium. *Histochem Cytochem* 1998; 46:1377-1384.
 45. Johnson DB, Kip EK, Marroquin CO, Ridker MP, Kelsey FS, Shaw JL, Pepine JC; Sharaf B, Merz BNC, Sopko G, Olson BM, Reis ES: Serum Amyloid A as a Predictor of Coronary Artery Disease and Vascular Outcome in Women. *Circulation* 2004; 109:726-732.
 46. Zhao Y, Zhou S, Heng C-K: Impact of Serum Amyloid A on Tissue factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor Expression and Activity in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27:1645.
 47. Malle JE, De Beer FC: Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J. Clin Invest* (1996) 26: 427-35.
 48. Batista U: Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 20-24.
 49. Sodin-Šemrl S: Gojenje celic, Praktični priročnik, Interno gradivo LIR, Ljubljana, 2006.
 50. Herzog-Velikonja B, Gruden K: Praktikum iz molekularne biologije-teoretični del, Študentska založba, Ljubljana, 2000: 59.
 51. Sorscher DH: DNA amplification techniques. In: Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. Totowa: Humana Press; 1997: 89-101.
 52. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2004; 55: 215-220.
 53. Farrell RE. RT PCR. In: *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1998: 283-322.
 54. Actichrome® TF kit. American diagnostica Stamford, Connecticut.
 55. Koželj M: Primerjava izražanja tkivnega faktorja v različnih tipih humanih endotelijskih celic, diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana; 2007.
 56. RNAagents Total RNA Isolation System. *Tecnicall Bulletin*, Promega, ZDA; 2005.
 57. Bavec A, Goličnik M, Rižner Lanišnik T, Makovec T, Glavač Ravnik M, Rozman M, Zorko M: *Biokemija 1. Navodila za vaje, 2., popravljena in dopolnjena izd.*,

Študentska založba, Ljubljana, 2007.

58. Reverse transcription system. Technical Bulletin. Promega. ZDA; 2002.
59. Yang Y, Loscalzo J: Regulation of Tissue Factor Expression in Human Microvascular Endothelial Cells by Nitric Oxide. *Circulation* 2000; 101; 2144-2148.
60. Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Kveder T, Tomšič M, Sodin-Semrl S: Serum amyloid A activation of inflammatory and adhesion molecules in human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *European Journal of inflammation* 2007; 5(2):73-83.
61. Pernerstorfer T, Stohlawetz P, Hollenstein U, Dzirlo L, Eichler H-G, Kapiotis S, Jilma B, Speiser W: Endotoxin-Induced Activation of the Coagulation Cascade in Humans Effect of Acetylsalicylic Acid and Acetaminophen. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999; 19: 2517-2523.
62. 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
63. Wiiger MT, Pringle S, Pettersen KS, Narahara N, Prydz H: Effect of Binding of Ligand (FVIIa) to Induced Tissue Factor in Human Endothelial Cells. *Thrombosis Research* 2000; 98:311.
64. Lang D, Terstesse M, Dohle F, Philip B, Banas B, Paules H-G, Heidenreich S: Protein kinase C (PKC) dependent induction of tissue factor (TF) by mesangial cells in response to inflammatory mediators and release during apoptosis. *Br J Pharmacol*. 2002; 137(7): 1116–1124.
65. von der Thüsen JH, Kuiper J, van Berkel TCJ, Biessen EAL: Interleukins in atherosclerosis: molecular pathway and therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 133-166.
66. Szabo G.: Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*. 1999;34(6):830-41.
67. Jonsson AS, Palmblad JE: Effect of ethanol on NF-kappaB activation, production of myeloid growth factors, and adhesive events in human endothelial cells. *J Infect Dis* 2001 Sep 15; 184(6): 761-9.
68. Cadray Y, Dupouy D, Boneu B: Arachidonic Acid Encances the Tissue factor expression of Mononuclear Cells by the Cyclo-Oxygenase-1 Pathway: Beneficial

- Effect of n-3 Fatty Acids. *The journal of Immunology* 1998;160:6145-6150.
69. Egorina EM, Sovershaev MA, Østerud B: Regulation of tissue factor procoagulant by post-transcriptional modifications. *Thromb Res.* 2008 Jan 7; : 18191444.
 70. Cines DB, Pollak ES, Buck CA: Endothelial cells in Physiology and the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 1998; 91:3527.
 - 71 Shi Q, Aida K, Vandenberg JL, Wang XL: Passage-dependent changes in baboon endothelial cells-relevance to in vitro aging. *DNA Cell Biol.* 2004; 23(8):502-9.
 72. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M: A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature Protocols* 2007; 2:481-485.