

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

ANA ŽAGAR

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2008

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

**Vpliv serumskega amiloida A in imunoglobulinov z
lipoksinom A₄ na izločanje interlevkina-6 v humanih
endotelijskih celicah**

ANA ŽAGAR

Ljubljana, 2008

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

DIPLOMSKA NALOGA

**Vpliv serumskega amiloida A in imunoglobulinov z
lipoksinom A₄ na izločanje interlevkina-6 v humanih
endotelijskih celicah**

**The Effect of Serum Amyloid A and Immunoglobulins in
the presence of Lipoxin A₄ on Interleukin-6 Release in
Human Endothelial Cells**

ANA ŽAGAR

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, SPS interna klinika, KC Ljubljana pod mentorstvom izr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl. Naloga predstavlja del večjega EU projekta Marie Curie-International Reintegration Grant MC-IRG #028414.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Ljubljana, 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos

Članica diplomske komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj

VSEBINA

VSEBINA	1
POVZETEK	3
ABSTRACT	4
OKRAJŠAVE	5
1. UVOD	7
1.1. VNETJE	7
1.1.1. Akutna faza vnetja	7
1.1.2. Serumski amiloid A	8
1.1.3. Interlevkin-6	10
1.1.4. Lipoksin A ₄	11
1.2. ŽILE	13
1.2.1. Endotelijske celice	13
1.3. AVTOIMUNOST	14
1.3.1. Imunoglobulinska frakcija seruma	15
1.3.2. Antifosfolipidni sindrom	15
1.3.3. Antifosfolipidna protitelesa	16
1.3.4. Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I	17
1.3.5. Monoklonska protitelesa	18
1.4. ENCIMSKO IMUNSKI TEST NA TRDNEM NOSILCU	18
2. NAMEN	20
3. MATERIALI IN METODE	21
3.1. MATERIALI	21
3.2. METODE	27
3.2.1. Delo s celicami	27
3.2.2. RNA analiza	31
3.2.3. Encimsko imunski test na trdem nosilcu	37
4. EKSPERIMENTALNO DELO	39
4.1. Koncentracijski vpliv LXA ₄ na izražanje IL-6	39
4.2. Vpliv etanola na izražanje IL-6	40
4.3. Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA ₄ na izražanje IL-6 pri HUVEC	40

4.4. Vpliv SAA in imunoglobulinov samih in ob prisotnosti LXA ₄ na izločanje IL-6 pri HUVEC, HCAEC in HMVEC.....	41
5. REZULTATI	44
5.1. Koncentracijski vpliv LXA ₄ na izražanje IL-6 v HUVEC in HCAEC.....	44
5.2. Vpliv etanola na izražanje IL-6 v HUVEC in HCAEC.....	45
5.3. Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA ₄ na izražanje IL-6 pri HUVEC	47
5.4. Vpliv SAA in imunoglobulinov (ob prisotnosti in odsotnosti LXA ₄) na izločanje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC.....	48
6. RAZPRAVA.....	54
6.1. AKTIVACIJA VNETNIH ODZIVOV V ENDOTELIJSKIH CELICAH	55
6.1.1. Vpliv SAA na endotelijske celice.....	56
6.1.2. Vpliv LXA ₄ na endotelijske celice.....	58
6.1.3. Vpliv SAA v prisotnosti LXA ₄ na endotelijske celice.....	59
6.2. VPLIV IMUNOGLOBULINOV NA ENDOTELIJSKE CELICE IN MODULACIJA NJIHOVIH ODZIVOV Z LXA ₄	61
6.2.1 Vpliv serumov na endotelijske celice.....	61
6.2.2. Vpliv antifosfolipidnih protiteles na endotelijske celice	63
6.2.3. Modulacija odzivov z LXA ₄	66
7. SKLEPI.....	67
8. LITERATURA	68

POVZETEK

Ateroskleroza in tromboza sta patogena procesa v ožilju, ki prizadaneja vse več ljudi. Novejši podatki kažejo na njuno prepletenost. Pri obeh gre za vnetne procese, ki lahko sprožijo in prispevajo k povečanemu izražanju adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic ter izločanju vnetnih citokinov, kar lahko vodi do poslabšanja stanja. Pri bolnikih z antifosfolipidnim sindromom (APS) se tromboze pojavljajo v arterijah, venah in mikrovaskulaturi, ter so posledica patogenih mehanizmov delovanja antifosfolipidnih protiteles na endotelijske celice. Imunoglobulini v serumih bolnikov z APS vplivajo na izločanje vnetnega citokina interleukina-6 (IL-6) iz endotelijskih celic. Serumski amiloid A (SAA) se kot pozitivni reaktant akutne faze vnetja lahko v velikih količinah pojavlja v serumih bolnikov z avtoimunskimi boleznimi ter v lehah aterosklerotičnih lezij.

Namen našega dela je proučiti vlogo akutnega SAA ter vlogo protiteles proti β_2 -glikoproteinu I v aktiviranju vnetnih odzivov v endoteliju. V naši študiji smo uporabili tri različne tipe humanih endotelijskih celic, izoliranih iz koronarne arterije, umbilikalnih ven ter dermalne mikrovaskularne endotelijske celice. Zanimala nas je dovzetnost različnih tipov endotelijskih celic na stimulacijo z SAA in s serumi bolnikov z APS, ter učinek lipoksina A_4 , endogenega eikozanoida, kot potencialnega protivnetnega dejavnika. Količino izločenega IL-6 smo vrednotili z encimsko imunskim testom na trdnem nosilcu.

Tako SAA kot serumi bolnikov z APS so najbolj stimulirali celice koronarne arterije. Med serumi bolnikov s primarnim APS ni bilo bistvenih razlik v stimulaciji celic, pri serumih bolnikov s sekundarnim APS pa so se pojavile razlike v stimulaciji izločanja IL-6. Minimalna stimulacija celic z IgG frakcijo, izolirano iz seruma bolnika z APS, in neodzivnost na monoklonska protitelesa, usmerjena proti β_2 -glikoproteinu I, potrjujeta pomen prisotnosti dodatnega eksogenega β_2 -glikoproteina I pri stimulaciji celic s protitelesi proti β_2 -glikoproteinu I. Naše študije potrjujejo specifičnost odziva endotelijskih celic, odvisnega od lokacije, funkcije endotelijskih celic kot tudi genetskega vpliva, obenem pa nakazujejo potencialno vlogo, ki jo igra SAA pri razvoju srčno-žilnih bolezni.

ABSTRACT

Atherosclerosis and thrombosis are very frequent pathogenic manifestations that affect more and more people. Both, atherosclerosis and thrombosis are proinflammatory events, where the expression of adhesion molecules on the endothelial cell surface and excretion of proinflammatory cytokines is increased. This could lead to the enhancement of the disease. Thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome (APS) is a consequence of pathogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies on endothelial vascular cells and can affect arteries, veins or the microvasculature. Immunoglobulins from the sera of patients with APS also stimulate secretion of proinflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) from endothelial cells. Serum amyloid A (SAA), the major vertebrate acute-phase reactant can be found in sera of patients with autoimmune diseases and in atherosclerotic lesions.

In our study, we have evaluated the effect of SAA and anti- β_2 glycoprotein I antibodies on pro-inflammatory activation of endothelial cells. We used three different types of human vascular endothelial cells from coronary artery, umbilical veins and dermal vascular endothelial cells. We have stimulated different types of vascular endothelial cells with human recombinant SAA and APS sera, and compared the responsiveness of these cells. We have also studied the effect of lipoxin A₄, an endogenous eicosanoid, as a proinflammatory agent. We evaluated IL-6 secretion with enzyme-linked immunosorbent assay.

Human artery endothelial cells mostly responded to both SAA or sera APS stimulation. Comparing sera from patients with primary APS there was no essential difference, but there was a difference between sera from patients with secondary APS on stimulation of IL-6 secretion. Cellular response to stimulation with IgG fraction isolated from APS sera was low and there was no response to monoclonal antibodies against β_2 -glycoprotein I. These findings confirm the fact that for anti- β_2 -glycoprotein I antibody stimulation the presence of exogenous β_2 -glycoprotein I is needed. Our studies confirm the specificity of endothelial cell responses that depends on location, function of endothelial cells and also genetics. At the same time, we have confirmed the role of SAA on the development and progress of cardiovascular diseases .

OKRAJŠAVE

aCL antikardiolipinska protitelesa
ALX /FRLP-1 z G proteinom sklopljen lipoksinski receptor
aPL antifosfolipidna protitelesa
APS antifosfolipidni sindrom
ATL z aspirinom sprožen lipoksin (Aspirin Triggered Lipoxin)
AMV virus ptičje mieloblastoze (Avian Myeloblastosis Virus)
A-SAA serumski amiloid A akutne faze vnetja
 β_2 GPI β_2 -glikoprotein I
cDNA komplementarna veriga mRNA
Cof monoklonska protitelesa usmerjena proti β_2 GPI
C-SAA konstitutivni SAA
cysLT1 cistein-levkotrienski receptor
DNA deoksiribonukleinska kislina
ELISA encimsko imunski test na trdnem nosilcu
HCAEC humane koronarne arterijske endotelijske celice
HDL visokogostotni lipoprotein
HMVEC humane mikrovaskularne endotelijske celice
HUVEC humane umbilikalne venske endotelijske celice
IL-1 β interlevkin-1 β
ICAM-1 medcelična adhezijska molekula-1
IL-1 interlevkin-1
IL-6 interlevkin-6
IL-8 interlevkin-8
IL-6R receptor za IL-6
LA lupusni antikoagulanti
LPS lipopolisaharidi
LXA₄ lipoksin A₄
mRNA informacijska ribonukleinska kislina
PAPS primarni APS
PCR verižna reakcija s polimerazo

PMN polimorfonuklearni levkociti

RT reverzna transkripcija

SAA serumski amiloid A

SLE sistemski lupus eritematozus

SAPS sekundarni APS

TNF- α dejavnik tumorske nekroze- α

VCAM-1 žilno-celična adhezijska molekula-1

1. UVOD

1.1. VNETJE

Vnetje je fiziološki odziv organizma na različne dražljaje, kot so vdor bakterij, travmatske poškodbe in vnos škodljivih snovi. Pri vnetju gre za zaporedje različnih pojavov, vključujoč spremembe mikrovaskularizacije, kopičenje fagocitov, odstranjevanje škodljivih snovi in obnova tkiva. Navzven se kaže kot oteklina, rdečina, lokalna toplota, bolečina in omejena funkcija prizadetega predela ali organa (1).

Pri vnetju sodeluje več mediatorjev. Kemokini, so skupina majhnih polipeptidov, aktivacijskih molekul, ki delujejo kemotaktično. Plazemski encimski mediatorji, predvsem bradikinin in fibrinopeptidi, povečajo prepustnost žilja, proteolitični encim plazmin pa razgradi fibrinski strdek v kemotaktične produkte in aktivira komplement. Različni fragmenti komplementa delujejo kot opsonini in so kemotaktični za nevtrofilne levkocite in monocite. Lipidni vnetni mediatorji, ki izhajajo iz membranskih fosfolipidov, so tromboksani, prostaglandini, levkotrieni, lipoksini in faktor, ki aktivira trombocite (Platelet Activating Factor). Citokini posredujejo številne lokalne in sistemske učinke (1).

Dolgotrajna navzočnost antigena lahko povzroči razvoj kroničnega vnetja in s tem obsežno okvaro tkiva. Kronično vnetje lahko spremlja različne avtoimunske bolezni pri katerih predstavlja prisotnost avtoimunskih protiteles dodatni dejavnik tveganja za razvoj sekundarnih bolezni kot so npr. kardiovaskularne bolezni (1).

1.1.1. Akutna faza vnetja

Okvara tkiva ali endotelija povzroči sproščanje različnih vazoaktivnih in kemotaktičnih mediatorjev. Poveča se pritok krvi v prizadeto območje in prepustnost endotelija kapilar in venul. Plazemske beljakovine izstopajo v zunaj-žilni prostor, kjer se proteolitično razgradijo v vnetno aktivne polipeptide (bradikinin, aktivni fragmenti sistema komplementa) (2). Citokini, ki nastanejo pri aktivaciji endotelija, in drugi vnetni mediatorji vplivajo na izražanje adhezijskih molekul na levkocitih in endotelijskih celicah ter tako posredujejo migracijo levkocitov skozi endotelij. Levkociti se vežejo na endotelij najprej s selektini. Ti levkociti se nekaj časa kotalijo po endoteliju, nato se ustavijo. Sprožilni signal na endoteliju (kemokini idr.) povzroči, da se celice prilepijo na celične adhezijske molekule (ICAM-1, VCAM-1 idr.), ki so izražene na endoteliju, ter se začnejo pomikati

skozi endotelij (1). V vnetišče vstopajo najprej nevtrofilni levkociti, ki fagocitirajo patogene mikrobe in sproščajo mediatorje, ki med drugim privabljajo makrofage v vnetišče. Nevtrofilni levkociti in makrofagi so najpomembnejše vnetne celice. Kasneje, ko se vključi imunski odziv, prispevajo k vnetju tudi aktivirani limfociti. Aktivirani makrofagi fagocitirajo mikrobe in izločajo citokine (interlevkin-1 (IL-1), interlevkin-6 (IL-6) in dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α)), ki prispevajo k vnetju tako, da lokalno povečajo prepustnost žil in povzročajo strjevanje krvi, posredno pa delujejo tudi kemotaktično (1).

Lokalno akutno vnetje spremlja sistemski odziv, imenovan reakcija akutne faze, ki jo posreduje kombinirano delovanje IL-1, TNF- α in IL-6. Zanj je značilna povišana telesna temperatura, ki preprečuje razmnoževanje številnih patogenih mikrobov in okrepi imunski odziv nanje. Reakcijo akutne faze spremlja tudi povečana sinteza hormonov (kortikosteroidov), povečano nastajanje levkocitov in izdelovanje številnih proteinov akutne faze v jetrih kot so serumski amiloid A (SAA), C-reaktivni protein, fibrinogen in drugi (1).

Fagociti, ki se nakopičijo v tkivu sproščajo tudi litične encime, ki okvarijo sosednje zdrave celice. Trajanje in intenzivnost lokalnega akutnega vnetja morata biti zato skrbno nadzorovana. Tako se omeji okvara tkiva in omogoči njegova obnova, ki je potrebna, da se rana zaceli (1).

Endotelijske celice pod vplivom vnetnih citokinov v akutni fazi vnetja prilagodijo svojo funkcijo. Z izločanjem vnetnih mediatorjev in spremembo prepustnosti, omogočajo prihod celicam, ki so ključne za resolucijo vnetja na mesto vnetja.

1.1.2. Serumski amiloid A

Družino serumskega amiloida A (SAA) sestavljajo številni različno izraženi apolipoproteini. Glede na to, kako se odzovejo na vnetje, jih delimo na dva glavna razreda. Serumski amiloid A akutne faze vnetja (A-SAA), je eden glavnih pozitivnih reaktantov akutne faze vnetja (3). Njegova serumska koncentracija se kot odziv na vnetje, bakterijske in glivične infekcije, poškodbe tkiva, ob revmatoidnem artritisu in vaskulitisu lahko do 1000-krat poveča in preseže vrednosti 1 g/l v cirkulaciji. Virusne infekcije in sistemski lupus eritomatozus (SLE) povzročijo zmerno povišanje SAA (do 0.1 g/l) (3). Med vnetjem A-SAA asociira pretežno s tretjo frakcijo visokogostotnega lipoproteina (HDL₃) in nadomesti apolipoprotein A-1, ki je v normalnih fizioloških pogojih prevladujoč apolipoprotein na teh delčkih (3, 5). Drugi razred SAA predstavlja t.i. konstitutivni SAA

(C-SAA), katerega ekspresija se med akutno fazo vnetja minimalno poveča. Za razliko od A-SAA je C-SAA vezan tako na normalni HDL, kot tudi na HDL akutne faze vnetja (3). Glavni citokini, ki inducirajo prepisovanje genov A-SAA so IL-1, TNF- α in IL-6. S citokini inducirano ekspresijo A-SAA ojačajo glukokortikoidi, ki se tudi sproščajo med vnetjem (3, 5). Družina genov SAA je pri ljudeh zbrana na kromosomu 11 (6). Ljudje imamo tri funkcionalne SAA gene (SAA1, 2 in 4), SAA3 pa je psevdogen, ki se ne prepisuje (ni podvržen transkripciji). SAA4 se izraža konstitutivno in kodira C-SAA (5, 6). Glavno mesto sinteze SAA so jetra, vendar se SAA1, SAA2 in SAA4 sintetizirajo tudi ekstrahepatično, v makrofagih, endotelijskih celicah, gladko-mišičnih celicah, adipocitih in drugih (5). Informacijska RNA (mRNA), ki kodira SAA, tako akutne faze kot konstitutivni, je prisotna tudi v glavnih celicah aterosklerotičnih lezij (5, 7). Plazemski nivo SAA je povečan tudi pri stanjih, ki predstavljajo povečano stopnjo tveganja za kardiovaskularne bolezni, kot so debelost, insulinska rezistenca, metabolni sindrom, diabetes in pri avtoimunskih boleznih kot so revmatoidni artritis, SLE, ter sekundarni antifosfolipidni sindrom (6, 8).

A-SAA ima pomembno vlogo pri obrambi organizma. Deluje preko različnih mehanizmov; spremeni transport oz. metabolizem lipidov, lahko stimulira vnetje, ali pa ima protivnetno delovanje (3). A-SAA kot stimulator vnetja inducira ekspresijo proteinaz, encimov, ki razgrajujejo ekstracelularni matriks in so pomembni za obnovo tkiva po tkivni poškodbi. A-SAA inducira vnetne citokine, lahko pa tudi sam preko vezave na celične receptorje ali vezavna mesta deluje kot citokin. Veže se na iste receptorje kot kemoatraktanti kot so N-formil-metionin-leucin-fenilalanin (N-formil-Met-Leu-Phe) in kemokini ter tako deluje kot kemotaktičen agens za vnetne celice kot so monociti, polimorfonuklearni levkociti (PMN) in limfociti T. Lokalna produkcija A-SAA vodi v aktivno kopičenje teh celic na mestu vnetja in ojačanje lokalnega vnetja (3).

A-SAA se po različnih poteh vpleta v metabolizem oz. transport lipidov. V akutni fazi imunskega odziva A-SAA inducira različne encime, vključene v metabolizem holesterola (3). Asociacija A-SAA s HDL spremeni metabolizem HDL. Poveča se transport holesterola perifernim celicam in tako omogoča dostavo lipidov, predvsem holesterola, perifernim celicam, ki imajo povečane potrebe po holesterolu, za pospešitev regeneracije tkiva na mestu vnetja. Nasprotno, v liposomu asociran SAA2, ne pa tudi SAA1, posreduje odtok holesterola iz celic in tako pospeši odstranjevanje velikih količin holesterola, ki se sprosti na mestu tkivne poškodbe pri vnetju (3, 6). A-SAA deluje protivnetno tako, da

vpliva na interakcije med limfociti T in makrofagi ter na funkcijo limfocitov T-pomagalk in tako zavira imunski odziv na antigene. A-SAA je močan inhibitor limfocitov, inhibira z IL-1 in TNF inducirano povišanje telesne temperature ter inhibira agregacijo trombocitov. A-SAA se veže na nevtrofilne levkocite in zavira oksidativni izbruh ter tako preprečuje oksidativno poškodbo tkiva med vnetjem (3, 5).

Hitro povišanje SAA med infekcijo in akutnim vnetjem, je za organizem ugodno, medtem ko je zmerno, kronično povišanje SAA (ki spremlja bolezni kot so metabolni sindrom, diabetes tipa 2 in druge kronične vnetne bolezni) za organizem lahko uničujoč. Podaljšana ekspresija A-SAA in posledično dalj časa trajajoča produkcija proteinaz vodi lahko v nastanek degenerativnih bolezni kot je npr. revmatoidni artritis (3). Trajna visoka ekspresija A-SAA vodi v razvoj amiloidoze, progresivne smrtne bolezni, pri kateri se proteolitični fragment A-SAA imenovan Amiloid A odlaga v obliki netopnih leh v glavnih telesnih organih (5). Zadrževanje HDL delčkov na žilni steni, ki ga posreduje SAA, pa vodi v nastanek penastih celic in razvoj aterosklerotičnih leh (6). Ateroskleroza spada med najpomembnejše vzroke obolenosti in smrtnosti v razvitem svetu. V žilni steni arterij, pa tudi ven, poškodba endotelija sproži zaporedje dogodkov kot so povečano kopičenje nizkogostotnih lipoproteinov (LDL), adhezija monocitov in njihovo potovanje v intimo, povečana adhezija trombocitov in sproščanje trombocitnih dejavnikov, razmnoževanje gladkomišičnih celic v mediji in potovanje v intimo, kopičenje intra- in ekstra-celularnih maščob, zvečano nastajanje medceličnine in vezivnega tkiva, propad penastih celic (maščobno degeneriranih monocitov in gladkomišičnih celic) in poapnitev. Tako nastane v intimi arterije zadebelitev, ki lahko ovira krvni obtok. Poškodbo endotelija lahko povzročijo velike strižne sile, imunske (protitelesa) in presnovne (hipoksija, endotoksini) poškodbe, infekcije, prosti radikali in drugi še ne popolnoma dokazani dejavniki. Prav zaradi tega je pomembno raziskati vpliv SAA na endotelijske celice (9).

1.1.3. Interlevkin-6

Interleukin 6 (IL-6) je multifunkcionalen citokin. Ima pomembno vlogo pri hematopoezi in imunskem odzivu (10). Regulira humoralni in celično posredovani imunski odziv ter tako igra pomembno vlogo pri vnetju in poškodbi tkiva. Inducira diferenciacijo aktiviranih limfocitov B v plazmatke, ki tvorijo protitelesa, proliferacijo limfocitov T in diferenciacijo citotoksičnih limfocitov T ter terminalno diferenciacijo makrofagov. Ojača z interlevkinom-3 inducirano proliferacijo hematopoetskih matičnih celic. Inducira tudi

dozorevanje megakariocitov (10, 11), celic iz katerih z odcepljanjem citoplazme nastajajo trombociti. V akutni fazi vnetja stimulira hepatocite k produkciji proteinov akutne faze kot so C-reaktivni protein, fibrinogen, α 1-antitripsin in SAA, ter sočasno zavre produkcijo albumina (11). IL-6 promovira tudi produkcijo rastnega faktorja za vaskularne endotelijske celice, pomembnega v procesu angiogeneze, in stimulira druge citokine (11). IL-6 aktivira trombocite in ima pro-koagulatorno delovanje. Velike količine IL-6 so našli tudi v aterosklerotičnih lezah (12). IL-6 producirajo endotelijske celice, gladko-mišične vaskularne celice, limfociti-T in limfociti-B, makrofagi, fibroblasti, keratinociti, mezangijske celice in nekatere tumorske celice (11, 12).

IL-6 deluje preko vezave na transmembranski receptor za IL-6 (IL-6R). Obstaja tudi topna oblika IL-6R brez citoplazemske domene, ki so jo opazili v normalnem serumu in sinovijski tekočini (10). Ta je v nasprotju z drugimi topnimi citokinskimi receptorji v kompleksu z IL-6 biološko aktiven (12). IL-6R je izražen na imunokompetentnih celicah (monocitih, makrofagih in nekaterih limfocitih) in hepatocitih, medtem ko na sinovijalnih fibroblastih, vaskularnih endotelijskih celicah ali osteoklastih stimulira ob prisotnosti topne oblike IL-6R (11). IL-6 inducira kortikosteroide, mediatorje vnetja, ki ojačajo s citokini stimulirano sintezo proteinov akutne faze ter inhibirajo nadaljno ekspresijo citokinov. Tako IL-6 preko negativne povratne zanke lahko zavira lastno produkcijo (3).

1.1.4. Lipoksin A₄

Lipoksini so eikozanoidni lipidni mediatorji, ki nastajajo iz arahidonske kisline kot odziv na vnetje ali poškodbo. V nasprotju z vnetnimi eikozanoidi, levkotrieni in prostaglandini, imajo lipoksini protivnetno delovanje (13, 13). Znani endogeni lipoksini so lipoksin A₄ (LXA₄) in lipoksin B₄ ter 15-epi-LXA₄, z aspirinom sprožen lipoksin (Aspirin Triggered Lipoxin, ATL). Za endogeno biosintezo lipoksinov je potrebna medcelična interakcija levkocitov z epitelijem, endotelijem ali trombociti. Gre za transcelularno biosintezo v kateri donorska celica sintetizira in sprošča komponento biosintezne kaskade, ki jo druga, sprejemna, celica privzame in pretvori v končno biološko aktivno molekulo. Znane so tri biosintezne poti. Ključno vlogo igra encim 5- in 15-lipoksigenaza aktiviranih levkocitov. Biosintezo 15-epi LXA₄ pa sproži acetilacija ciklooksigenaze-2 (COX-2), ki jo povzroči acetilsalicilna kislina (13, 13). Lipoksini so zelo nestabilni in se v organizmu hitro pretvorijo v metabolite, ki so biološko neaktivni (13, 13). Zato se v mnogih študijah lahko uporabljajo lipoksinški analogi.

Na molekularnem nivoju lahko delujejo lipoksini preko treh vrst (tipov) receptorjev. Za protivnetno delovanje je pomembna vezava lipoksiniv na z G-proteinom-sklopljen lipoksinški receptor (ALX oz. FPRL-1) ter na cistein-levkotrienski receptor (cysLT1) (13). ALX je 7-transmembranski receptor, ki sodi v družino kemokinskih receptorjev in ima sposobnost vezave pleiotropnih ligandov (lipidov in peptidov). LXA₄ se veže na ALX z visoko afinitetno, K_d je 1,7 nM. Peptidni ligandi, ki se vežejo na ALX so lahko SAA, sintezni peptidi, N-formilirani heksapeptidi, amiloid β, aneksin 1 in drugi. Konstanta disociacije N-formil-Met-Leu-Phe peptida je v primerjavi z LXA₄ 1000-krat manjša (fMLP; K_d = 5 μM). Interakcije proteina G, ki jih sproži vezava ligandov na receptor ter intracelularni amplifikacijski mehanizmi so za peptide in lipidne ligande različni, kar vodi v različne biološke odzive. Aktivacija mieloidnega ALX z N-formiliranimi peptidi (sub-μM konc.) inducira aktivacijo PMN, njihovo kemotakso in agregacijo, medtem ko vezava LXA₄ te učinke inhibira (13). Receptor se izraža na monocitih, bazolateralni membrani gastrointestinalnih epitelijskih celic, sinovijalnih fibroblastih, bronhialnih epitelijskih celicah in mezangijskih celicah.

Lipoksini zavirajo vnetje tudi preko kompetitivnega antagonizma pro-vnetnih eikozanoidov, levkotrienov, na levkotrienskih receptorjih (cysLT1). Ta mehanizem delovanja je bil dokazan na PMN, endotelijskih celicah, bronhialnih gladko-mišičnih celicah, intestinalnih epitelijskih in mezangijskih celicah (13). Lipoksini imajo na različne levkocite različno delovanje; stimulirajo aktivacijo monocitov in makrofagov ter inhibirajo aktivacijo PMN, eozinofilnih levkocitov in limfocitov. Lipoksini modulirajo tudi aktivnost celic nemieloidnega izvora kot so fibroblasti, endotelijske celice, gastrointestinalne epitelijske celice, renalne mezangijske celice in vranične dendritične celice (13). Dokazan je bil inhibitorni učinek lipoksinov na interakcije med endotelijem in levkociti ter na spremembe vaskularne permeabilnosti *in vivo* (13). Lipoksini in njihovi sintezni analogi imajo tako nasprotno-regulatorne učinke na vnetje žilja, akutne vnetne odzive in na z makrofagi/ dendritičnimi celicami/ limfociti T posredovane alergične reakcije in adaptivne imunske odzive (13).

Številne študije potrjujejo dejstvo, da vnetno bolezen spremlja povečana produkcija lipoksinov. Natančna vloga tvorbe lipoksinov v patofiziologiji vnetnih bolezni pa ostaja nezanesljiva. Zmanjšana produkcija lipoksinov je dokazana pri kronični astmi, kronični jetrni bolezni in kronični mielogeni levkemiji, pri nekaterih drugih boleznih kot so juvenilni periodonitis, ruptura aterosklerotične lehe in nazalni polipi pa je tvorba

lipoksinov povečana. Splošno velja, da LXA₄ in 15-epi-LXA₄ nastajajo pri vnetju in sodelujejo pri resoluciji vnetja, motnje biosinteze lipoksinov pa korelirajo z nesposobnostjo organizma, da odpravi akutno vnetno reakcijo in vodi v nastanek kroničnega vnetja (13).

1.2. ŽILE

Žilje predstavlja del organskega sistema imenovanega obtočila, katerega namen je, da oskrbuje tkiva s snovmi, ki jih potrebujejo za presnovo in vzdrževanje fiziološkega ravnovesja organizma (15). Notranjo površino žil, ki je v stiku s krvjo, pokriva enoskladni ploščati epitelij, imenovan endotelij. Notranjo vezivno plast žilne stene s pretežno vzdolžnimi sestavinami, pokrito znotraj z endotelijem, imenujemo intima. Srednja mišičnoelastična plast žilne stene je medija, zunanjo fibroelastično plast žilne stene, s pretežno vzdolžnimi sestavinami, pa imenujemo eksterna (16). Zgradba žilne stene je odvisna od funkcije žil. Arterije elastičnega tipa ležijo za srcem in funkcionalno blažijo razliko med sistoličnim in diastoličnim krvnim tlakom, zato imajo žilno steno bogato z elastičnimi vlakni. Arterije mišičnega tipa vplivajo na porazdelitev krvi v telesu in imajo debelejšo plast gladkih mišičnih celic. Medija ven je tanjša kot pri arterijah z eno do dvema plastema gladkomišičnih celic in kolagenskimi vlakni. Kapilare in venule so pomembne za izmenjavo snovi. Kapilare sestavlja plast endotelijskih celic, ki ležijo na bazalni lamini in posamezne vezivne celice, pri venulah je plast veziva debelejša. Stena kapilare je polprepustna in dopušča prehajanje raztopljenim snovem, ionom, plinom in ameboidno gibljivim levkocitom, ne prepušča pa eritrocitov in krvnih beljakovin (15).

1.2.1. Endotelijske celice

Endotelijske celice pokrivajo notranjo površino žil vseh organskih sistemov in regulirajo pretok hranljivih snovi, biološko aktivnih molekul in krvnih celic. Njihova sekretorna, sintezna, metabolična in imunološka funkcija je posredovana preko membranskih receptorjev za molekule kot so proteini, lipoproteini, metaboliti in hormoni, kot tudi preko specifičnih povezovalnih proteinov in receptorjev, ki omogočajo medcelične interakcije in interakcije celic z matriksom. Endotelij ima ključno vlogo tudi pri regulaciji pretoka krvi. Motnje pretoka, ki so posledica vnetja ali močnih hidrodinamičnih strižnih sil, spremenijo aktivnost endotelijskih celic, kar lahko vodi v protrombotično in antifibrinolitično stanje

(17). Med vnetjem se fenotip endotelijskih celic spremeni. Celice se aktivirajo, poveča se izražanje adhezijskih molekul, izločanje kemokinov in vnetnih citokinov.

Heterogenost endotelija med različnimi tkivi in tudi znotraj tkiva samega je vezana na njegovo funkcijo (17). Močan dejavnik, ki vpliva na endotelijski fenotip je mikrookolje, v katerem se nahajajo endotelijske celice, heterogenost endotelijev pa je posledica tudi različne starosti in genetske osnove. Endotelijske celice različnih tkiv se razlikujejo tudi v površinskem fenotipu in ekspresiji proteinov (von Willebrandov faktor, receptorij za transport snovi itd). Mikro- in makrovaskularne endotelijske celice se med drugim razlikujejo v občutljivosti rasti, sposobnosti tvorbe kapilarnih struktur, sintezi prostaciklina (PGI_2) in ekspresiji receptorjev za limfocite (17). Mason in sodelavci (18) so v svoji študiji dokazali razlike med humanimi umbilikalnimi venskimi endotelijskimi celicami (HUVEC) in dermalnimi mikrovaskularnimi endotelijskimi celicami v ekspresiji adhezijskih molekul (ICAM-1, VCAM-1 in E-selektina) po aktivaciji z agonisti proteinske kinaze C. Poročajo tudi, da se HUVEC in humane koronarne arterijske endotelijske celice (HCAEC), različno odzovejo na stimulacijo z SAA, kot stimulatorjem vnetja (19). Razlike med endoteliji različnih tipov žil se tako odražajo tudi v dovzetnosti za žilne bolezni. Arterije, vene in kapilare določenih organov so bolj nagnjene k vaskulitisu. Patogeneza venske in arterijske tromboze je različna, kot je tudi različna dovzetnost teh dveh tipov žil do ateroskleroze (17).

Med vnetjem se fenotip endotelijskih celic spremeni. Celice se aktivirajo, poveča se izražanje adhezijskih molekul, izločanje kemokinov in vnetnih citokinov.

1.3. AVTOIMUNOST

Avtoimunost je imunski odziv proti antigenom lastnega telesa. Nastopi zaradi porušanja mehanizmov, ki vzdržujejo toleranco (neodzivnost) do lastnih antigenov. Dejavniki, ki prispevajo k nastanku avtoimunske bolezni, vključujejo imunske abnormalnosti, genetično ozadje, ki predisponira k avtoimunosti, lokalne spremembe tkiva in mikrobne okužbe. Pri nastanku avtoimunskih bolezni sodelujejo predvsem krožeča avtoimunska protitelesa, imunski kompleksi in avtoreaktivni limfociti T (20).

Avtoimunske bolezni so lahko sistemske ali za organ specifične. Pri avtoimunskih boleznih, specifičnih za organ, je imunski odziv usmerjen na tarčni antigen, ki je samo v določenem organu ali žlezi, tako da so manifestacije omejene v glavnem na ta organ. Pri sistemskih avtoimunskih boleznih je prizadetih več organov in tkiv, saj so tarča napada

predvsem organsko nespecifični antigeni. Ti so bodisi v krvnem obtoku ali pa sestavine celic (npr. deoksiribonukleinska kislina (DNK), centromeri, citoplazemske sestavine). Med sistemske avtoimunske bolezni uvrščamo SLE in antifosfolipidni sindrom (APS) (20). Majhne količine avtoprotiteles, imenovanih »naravna« avtoprotitelesa, so prisotne tudi pri zdravih krvodajalcih. Nastanejo v normalnih razmerah med imunskim odzivom. To so navadno šibko afinitetna protitelesa razreda IgM in ne povzročajo okvar tkiva (21).

1.3.1. Imunoglobulinska frakcija seruma

Serum je čisti del frakcije krvi po odstranitvi krvnih teles (eritrocitov, levkocitov, trombocitov) in fibrina, ki se uporablja za diagnostične in terapevtske namene (16). Sestava seruma je odraz stanja organizma, trenutnega in dolgoročnega. Elektolitska sestava, prisotnost proteinov, kot so proteini akutne faze vnetja in specifični imunoglobulini, so pomembni diagnostični kazatelji.

Imunoglobulini so beljakovine, ki sodelujejo v imunskem procesu. Pojavljajo se v petih razredih; IgA, IgD, IgE, IgG in IgM. Imunoglobuline v izločani obliki imenujemo protitelesa. Protitelesa IgG frakcije so monomerne molekule sestavljene iz dveh identičnih lahkih in dveh identičnih težkih verig γ povezanih z disulfidnimi vezmi. Vsaka molekula ima dve vezišči (2 Fab) za antigen, ki sta gibljivo pritrjeni na Fc regijo in tako lahko zavzame obliko črke T ali Y. To omogoča, da ena molekula protitelesa lahko veže enake epitope na različnih molekulah ali celicah, ali pa se pritrdi na dva enaka epitopa na isti molekuli antigena, če sta si epitopa dovolj blizu skupaj (21). Protitelesa posredujejo svoje efektorske funkcije šele, ko se vežejo z antigenom. V IgG razredu so štirje podrazredi IgG1, IgG2, IgG3 in IgG4, ki se med seboj razlikujejo po številu vezi S-S v gibljivem delu molekule in tudi po biološki vlogi (21).

1.3.2. Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) je avtoimunska bolezen, za katero je značilna daljša (vsaj šest tednov) prisotnost antifosfolipidnih protiteles (aPL), določenih kot lupusni antikoagulant ali antikardiolipinska protitelesa, v plazmi bolnikov z trombozami in/ali nosečniškimi zapleti (nepojasnjene smrti fetusa, prezgodnja rojstva, nerazložljivi zaporedni spontani splavi). Za postavitev diagnoze APS zadošča prisotnost enega kliničnega in enega laboratorijskega kriterija (22, 23, 24). Tromboza lahko prizadene vene, arterije ali

mikrovaskulaturu, zato se lahko bolezen sekundarno klinično manifestira kot bolezni srca, možganske bolezni, kožne bolezni in druge (23, 25, 26). Redkeje je prisotna povečana nagnjenost h krvavitvam (25). Če se APS pojavi kot samostojni sindrom, govorimo o primarnem APS (PAPS), če pa se zgornjim znakom pridruži še kakšna druga avtoimunska bolezen, najpogosteje je to sistemski lupus eritomatosus (SLE), govorimo o sekundarnem APS (SAPS) oz APS + spremljajoča bolezen (22, 24).

Antifosfolipidna protitelesa in antifosfolipidni sindrom se vse pogosteje pojavljajo tudi pri otrocih. Pri otrocih z aPL se pojavljajo tri oblike; asimptomatski aPL, primarni in sekundarni APS. Prehodna napatogena aPL so pogosta pri otrocih po prebolelih infekcijah, medtem ko so trombotični zapleti pri otrocih s »pravimi« aPL redki. Pri otrocih prevladuje venska tromboza zgornjega venskega sistema, ki se pojavlja na neobičajnih lokacijah. Vzrok tromboze pri otrocih so tudi prirojene redkosti kot je homozigotno pomankanje proteina C in S (25).

1.3.3 Antifosfolipidna protitelesa

Ime antifosfolipidna protitelesa (aPL) izvira iz prvotnega mnenja, da ta protitelesa prepoznajo epitope anionskih in nevtralnih fosfolipidov kot so kardiolipin, fosfatidilserin, fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, na celični površini. Kasneje je bilo ugotovljeno, da se večina aPL, ki opredeljujejo APS, ne veže direktno na fosfolipide, ampak njihovo vezavo na celično površino posredujejo plazemski proteini, vezani na fosfolipidni dvosloj aktiviranih monocitov, trombocitov, endotelijskih celic. Ti proteini so β_2 -glikoprotein I (β_2 GPI), protrombin, aneksin V, protein C, protein S in proteini kininogenskega sistema (visoko- in nizko-molekulski kininogeni). Patofiziološko je pomembna gostota proteinov, ki se vežejo na površino poškodovanih celic. Povečana gostota plazemskih proteinov omogoča bivalentno vezavo protiteles, kar poveča protrombotično naravo poškodovanih celic (23).

V diagnostiki APS se določa prisotnost dveh vrst antifosfolipidnih protiteles: to so lupusni antikoagulant (LA) in antikardiolipinska protitelesa (aCL), IgG in IgM (22, 23). Metoda določanja aCL (encimsko imunski test na trdnem nosilcu (ELISA)) je za bolnike s povečanim tveganjem za tromboze manj specifična kot metoda določanja LA (22). aCL so namreč prisotna tudi pri bolnikih z odsotnostjo kliničnih znakov APS. To so bolniki, ki jemljejo določena zdravila (fenotiazine, hidralazine, fenitoin in valprolat), ter bolniki z virusnimi infekcijami kot so sifilis, Lymska bolezen, hepatitis C ali človeški virus imunske

pomankljivosti (Human Immunodeficiency Virus). Z zdravili ali infekcijo inducirana aCL so običajno prisotna v nizkem titru in ne povečajo tveganja za trombozo. Imenujemo jih tudi benigna protitelesa. Za razvoj tromboz je pretežno odgovoren IgG izotip aCL – specifično IgG2. Benigna protitelesa so IgG1 in IgG3 podrazreda. Vežejo se direktno na kardiolipin, medtem ko se patogene IgG2 aCL, vežejo na negativno nabite fosfolipide preko β_2 -GPI (26). Protitelesa proti β_2 GPI omogočajo razlikovanje teh dveh skupin aCL in so po novem zajeta med klasifikacijska merila za antifosfolipidni sindrom (27).

1.3.4. Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I

Protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I (β_2 GPI) so specifična skupina protiteles iz heterogene družine aPL. Poznani sta dve populaciji IgG protiteles proti β_2 GPI, ki prepoznata različne epitope na različnih domenah β_2 GPI in se razlikujeta v vpletenosti v tromboze. Tip protiteles proti β_2 GPI, ki je tesno povezan z trombozo, prepozna epitope na β_2 GPI, šele ko se ta veže na ustrezno površino in konformacijsko spremeni (28). β_2 GPI je plazemski protein, katerega sinteza primarno poteka v jetrih, mRNA za β_2 GPI pa so našli tudi v endotelijskih celicah, placenti in v celicah centralnega živčnega sistema (29). Sam po sebi ima relativno nizko afiniteto do negativno nabitih fosfolipidov. V prisotnosti protiteles proti β_2 GPI pride do nastanka bivalentnega kompleksa, ki ga sestavljata dve molekuli β_2 GPI in eno protitelo proti β_2 GPI. Interakcija med β_2 GPI in protitelesom proti β_2 GPI poveča avidnost β_2 GPI za negativno nabite fosfolipide tudi do sto-krat. Kompleksi protitelo- β_2 GPI lahko uspešneje tekmujejo s faktorji strjevanja za vezavo na katalitično fosfolipidno površino kot β_2 GPI sam (24, 30). Nedavno je bilo dokazano, da je tudi za aktivacijo trombocitov z β_2 GPI dimerizacija ključnega pomena (30).

Protitelesa proti β_2 GPI preko mehanizmov inhibicije antikoagulantne aktivnosti ter spremembe aktivnosti krvnih (monocitov, trombocitov) in/ali endotelijskih celic posredujejo nastanek tromboz pri APS (24, 29). aPL inhibirajo aktivacijo proteina C, inhibitorja prokoagulantnih faktorjev Va in VIIIa ter antikoagulantno funkcijo aktiviranega proteina C. Neinhibirana faktorja Va in VIIIa pospešujeta koagulacijo in zvišata dovzetnost za trombozo. aPL podpirajo hiperkoagulabilno stanje tudi preko vpliva na aktivnost antitrombina III, ki je pomemben inhibitor koagulacijskih faktorjev Xa in trombina, motijo pa tudi fibrinolitični del hemostaze in tako prispevajo k razvoju arterijske ali venske tromboze (24).

Protitelesa proti β_2 GPI se vežejo na endotelijske celice preko β_2 GPI, ki ga sintetizirajo endotelijske celice in transportirajo na celično površino ali preko zunanjega β_2 GPI, vezanega na fosfolipide ali druge receptorske molekule (megalin, omega karboksiliran 7-ketoholesterolil-9-karboksinonanoat, aneksin II). Na endotelijske celice vezani aPL zvišajo sintezo E-selektina, medceličnih adhezijskih molekul-1 (ICAM-1), žilno-celičnih adhezijskih molekul-1 (VCAM-1) in sekrecijo vnetnih citokinov (IL-1 β , IL-6), ter tako inducirajo koagulatorno-trombotični fenotip endotelijskih celic (24).

1.3.5. Monoklonska protitelesa

Monoklonska protitelesa, so populacija enakih protiteles, ki jih izdeluje posamezen klon limfocitov B z identičnim prepoznavnim mestom za določen antigen (16). Leta 1975 sta Kohler in Milstein izdelala metodo za pridobivanje pravih specifičnih monoklonskih protiteles, ki temelji na somatični hibridizaciji med normalno protitelesa izdelujočo celico B in mielomsko celico in selekciji zlitih celic, ki izločajo protitelesa željene specifičnosti (30).

Koike in sodelavci (31) so za svoje študije pripravili monoklonska protitelesa proti β_2 GPI, ki so bila izolirana iz miši in iz bolnikov z APS in so imela dobro okarakterizirane epitope. Monoklonska protitelesa usmerjena proti tretji (Cof-20 in Cof-22) in četrti (Cof-21) domeni β_2 GPI, imajo aktivnost LA, medtem ko monoklonska protitelesa usmerjena proti peti domeni in karboksilnemu koncu četrte domene β_2 GPI te aktivnosti nimajo. Aktivnost LA je torej odvisna od epitopske specifičnosti. Le monoklonska protitelesa z aktivnostjo LA ojačajo vezavo β_2 GPI na fosfolipide ter tako spremenijo funkcijo vaskularnih endotelijskih celic (31).

1.4. ENCIMSKO IMUNSKI TEST NA TRDNEM NOSILCU

Encimsko imunski test na trdnem nosilcu (ELISA) je imunska metoda določanja specifičnih proteinov (antigenov), v kateri ima ključno vlogo pri detekciji encim. Antigene, ki imajo več epitopov, lahko določimo kvantitativno s sendvič ELISA. Na spodnji površini vdolbinic mikrotiterske plošče so imobilizirana protitelesa. S temi protitelesi reagira antigen vzorcev in standardov znanih koncentracij, ki jih pipetiramo v vdolbinice. Vdolbinice nato speremo. Detekcija poteka s pomočjo sekundarnih protiteles, ki so biotinizirana. Ta reagirajo z antigenom, na drugih vezavnih mestih kot primarna protitelesa. Po odstranitvi presežnih sekundarnih protiteles s spiranjem, dodamo encim

hrenovo peroksidazo, ki je konjugirana s streptavidinom. Hrenova peroksidaza se preko streptavidina veže na biotinilirana protitelesa. Po ponovnem spiranju dodamo kromogen substrat, tetrametilbenzidin (TMB), ki ga encim oksidira, pri čemer se vsebina vdolbinic obarva. Intenziteta obarvanja je proporcionalna koncentraciji antigena v vzorcu. Le-to lahko določimo spektrofotometrično (32, 33).

2. NAMEN

V okviru diplomske naloge bomo proučevali vlogo akutnega SAA ter vlogo protiteles proti β_2 GPI v aktiviranju vnetnih odzivov v endoteliju in določili modulacijo teh odzivov z LXA₄.

Za ta namen bomo uporabili humane primarne endotelijske celice (umbilikalne venske, koronarne arterijske, mikrovaskularne dermalne).

Naše hipoteze so sledeče:

1. SAA stimulira ekspresijo vnetnega citokina IL-6 na proteinskem in mRNA nivoju;
2. protitelesa proti β_2 GPI zvišujejo nivo izločenega IL-6;
3. LXA₄ kot potencialni protivnetni dejavnik modulira izražanje IL-6 v celicah, stimuliranih z SAA in protitelesi proti β_2 GPI.

Stimulaciji celic bo sledila analiza celičnega odziva. Količino izločenega IL-6 bomo določili z uporabo metode ELISA. Ekspresijo IL-6 mRNA bomo vrednotili tako, da bomo mRNA izolirali, prepisali v komplementarno DNA (cDNA), želene fragmente pomnožili z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) ter analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

Cilji diplomske naloge so:

1. določanje in primerjava vplivov SAA (v prisotnosti in odsotnosti LXA₄) na izražanje IL-6 mRNA in proteina v humanih primarnih endotelijskih celicah;
2. določanje in primerjava vplivov protiteles proti β_2 GPI (monoklonska protitelesa, IgG frakcija in serum), v prisotnosti in odsotnosti LXA₄, na izražanje IL-6 na proteinskem nivoju;
3. primerjava odzivov različnih tipov endotelijskih celic na zgoraj omenjene stimulacije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Reagenti

- razkužilo (Kohrsolin FF); Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- HEPES-BSS pufer (HEPES Buffered saline solution); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- tripsin 10x raztopina (Trypsine/Versene EDTA); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- raztopina za nevtralizacijo tripsina (Trypsin Neutralising Solution); CloneticsTM, Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- tripansko modrilo (Trypan Blue Stain 0.4% 100 ml); Bio WhittakerTM, Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- 10x DPBS, Dulbeccov fosfatni pufer (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca and Mg); Bio WhittakerTM, Cambrex, Verviers, Belgija
- reagenti za izolacijo RNA (RNAgents[®] Total RNA Isolation System); Promega, Madison, WI, ZDA
 - RNAgents[®] Denaturacijska raztopina; 26mM Na citrat (pH 4.0), 0,5% N-lauril sarkozin, 0,125M β -merkaptotanol, 4M gvanidinijski tiocianat ;
 - natrijev acetat, 2M, pH 4.0
 - fenol/kloroform/izoamil alkohol (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol) v razmerju 99:24:1, pH 4.7
 - izopropanol
 - voda brez nukleaz, H₂O_{sd}
- absolutni etanol (Ethanol absolut-99.5%); Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Nemčija
- reagenti za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System); Promega, Madison, WI, ZDA
 - magnezijev klorid (MgCl₂), 25 mM
 - 10x pufer za reverzno transkripcijo (10x RT pufer); 100mM Tris-HCl (pH 9.0 pri 25°C), 500mM KCl, 1% Triton^R X-100
 - mešanica nukleotidov, dNTP, 10mM

- rekombinantni RNazni ribonukleazni inhibitor je encim, ki inhibira RNaze, in s tem upočasni razgradnjo RNA
 - AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverzna Transkriptaza, 10 U/ μ l
 - oliginukleotidni začetniki, oligo dT, 20 μ g
 - voda brez nukleaz, H₂O_{sd}
- reagenti za verižno reakcijo s polimerazo
- PCR Master Mix; Promega, Madison, WI, ZDA
- voda brez nukleaz, H₂O_{sd} (Nuclease-free water)
 - osnovna zmes PCR: 50 U/mL *Taq* DNA Polimeraze, 400 μ L dATP, 400 μ L dGTP, 400 μ L dCTP, 400 μ L dGTP, 3 mM MgCl₂, reakcijski pufer (pH 8.5) ;
- PCR Super Mix ; Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- osnovna zmes PCR: 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μ M dGTP, 220 μ M dATP, 220 μ M dTTP, 220 μ M dCTP, 22 U rekombinantne *Taq* DNA Polimeraze/mL, stabilizatorji;
- oligonukleotidni začetniki (Small Sequence Detection Primers) v liofilizirani obliki 10 nmol; Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Velika Britanija (Preglednica I)
- Delovna koncentracija je znašala 10 pmol/ μ l.

Preglednica I: Bazno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov β -aktina in interleukina-6 (IL-6), uporabljenih v reakciji verižne reakcije s polimerazo (PCR)

mRNA	bazno zaporedje oligonukleotidnega začetnika	dolžina oligonukl. začet.
β -aktin	S. 5'- ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'	32 bp
	AS. 5'- CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'	32 bp
IL-6	S. 5'- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	23 bp
	AS. 5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'	22 bp

- barvilo-BlueJuiceTM Gel Loading Buffer (10x); 65%(w/v) sukroze, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 0.3% (w/v) Bromfenol Modro; Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- označevalec velikosti fragmentov DNA 20 bp (PCR Low Ladder, 20 bp); Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA

- označevalec velikosti fragmentov DNA 50 bp (50 bp DNA Ladder); Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- destilirana voda za celice (Biowatter™ distilled water for cells); Cambrex, Verviers, Belgija
- reagenti za encimski imunski test na trdnem nosilcu za IL-6 (BioSource Immunoassay Kit Human Interleukin-6 (Hu IL-6) ELISA); BioSource, Nivelles, Belgija
 - standard rekombinantnega humanega IL-6 (Hu IL-6 Standard)
 - pufer za redčenje standarda (Standard Dilluent Buffer)
 - mikrotitrna plošča, katere površina je prekrita z protitelesi proti Hu IL-6 (Hu IL-6 Antibody-Coated Wells)
 - z biotinom označena protitelesa proti Hu IL-6 (Hu IL-6 Biotin Conjugate)
 - 100x koncentrat Streptavidin-Peroksidaza (Streptavidin-Peroxidase (HRP), (100x) concentrate)
 - raztopina za redčenje koncentrata Streptavidin-Peroksidaze (Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent)
 - 25x koncentrat za spiranje (Wash Buffer Concentrate (25x))
 - stabiliziran kromogen (Stabilized Chromogen); Tetramethylbenzidin (TMB)
 - raztopina Stop (Stop solution)

Biološki material

- humane dermalne mikrovaskularne endotelijske celice (HMVEC-d - Human Microvascular Endothelial Cells-Dermal); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- humane umbilikalne venske endotelijske celice (HUVEC –Human Umbilical Vein Endothelial Cells); Pooled Cells, EGM, cryo amp; Lot No.:4F0904(prva zbirka celic) Lot No.: 6F3636 (druga zbirka celic); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- humane koronarne arterijske endotelijske celice (HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial Cells), EGM-2MV, cryo amp; Lot No.:4F0879 (prva zbirka celic), Lot No.: 6F4194(druga zbirka celic); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- gojišče (preglednica II); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA

Preglednica II: Sestava gojišč za HUVEC, HCAEC in HMVEC

osnovno gojišče za HUVEC EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free); 500 ml (CC-3156)	osnovno gojišče za HCAEC/ HMVEC-d EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free); 500 ml (CC-3156)
Dodatki osnovnemu gojišču EGM-2 Single Quots (CC-4176)	Dodatki osnovnemu gojišču EGM-2MV Single Quots (CC-4147)
Fetalni goveji serum (FBS); 10 ml	FBS; 25 ml
Hidrokortizol (Hydrocortisone); 0,2 ml	Hidrokortizol; 0,2 ml
Humani fibroblastni rastni faktor-B (hFGF-B); 2 ml	hFGF-B; 2 ml
Vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF); 0,5 ml	VEGF; 0,5 ml
Dolgi R rekombinantni inzulinsko podobni rastni faktor-1 (R ³ -IGF-1); 0,5 ml	R ³ -IGF-1; 0,5 ml
askorbinska kislina (Ascorbic acid); 0,5 ml	askorbinska kislina; 0,5 ml
Humani epidermalni rastni faktor (hEGF); 0,5 ml	HEGF; 0,5 ml
gentamicin sulfat, amfotericin-B (GA-1000); 0,5 ml	GA-1000; 0,5 ml
Heparin; 0,5 ml	

- rekombinantni Humani apo-Serumski Amiloid A; stock conc.= 1 mg/ml ; PreproTech, EU
- monoklonska protitelesa Cof-21; (stock conc.= 0,8 µg/µl); nam je posredoval profesor Takao Koike iz Hokkaido University School of Medicine v Sapporu (Japonska)
- lipoxin A₄, etanolna raztopina; (stock conc.=50 µg/ml etanola); Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
- IgG frakcija odraslega bolnika s primarnim APS (4,9 g/l)
- serum krvodajalca Zavoda za transfuziologijo
- 4 serumi bolnikov (pediatrični bolnik s primarnim APS, odrasel bolnik s primarnim APS, pediatrični bolnik s sekundarnim APS in odrasel bolnik s sekundarnim APS)

Aparature in ostali material

- 2% agarozni gel (E-Gel® 2% Agarose (GP)); Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- aparat za slikanje gelov (G:BOX, Syngene (applied Biosystems)), Cambrige, Velika Britanija
- aseptična komora s sterilnim pretokom zraka, LaminAir scan 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- avtoklav A-11, Kambrič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- centrifuga- minifuge T, Sepatech, Beijerland, Nizozemska
- centrifuga, Mini spin plus, Eppendorf HQ, Hamburg, Nemčija
- 50 ml-epruvete , TPP, Trasadingen, Švica
- 1,5 ml-epruvete, ne/sterilne, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- 200 µl-epruvete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- hemocitometer 1/10 MM DEEP, Nemčija
- inkubator, Heto-Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- 70 µl-kvarčna kiveta, Camspec, QS, 10,00 mm, Cambridge, Velika Britanija
- mikroskop BH-2, Olympus, Tokyo, Japonska b071 BH-2
- aparat za PCR, Thermal Cyclor 2720, Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA
- pipeta Biohit (m1000, m100, m10) Biohit, Helsinki, Finska
- pipete, Eppendorf; Hamburg, Nemčija
- pipetno držalo Biohit MidiPlus, Biohit Oyj, Laippatie 1, Helsinki, Finland
- pipetni nastavki-stekleni, sterilni (1 ml, 10 ml, 25 ml); TPP, Trasadingen, Švica
- pipetni nastavki-sterilni s/brez filtra (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Eppendorf HQ, Hamburg, Nemčija
- platenke za gojenje celic, 75 cm², T-75 Tissue culture flasks, TPP, Trasadingen, Švica
- plošče s 6 vdolbinicam, Tissue culture test plates: 9.6 cm², TPP, Trasadingen, Švica
- programska oprema za slikanje gelov, GeneSnap from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- programska oprema za obdelavo slike gelov, Gene Tools from SynGene, Cambrige, Velika Britanija
- spektrofotometer-M501 Single Beam Scanning UV/Visible Spectrofotometer, Camspec M501, Cambrige, Velika Britanija
- stojalo-E-Gel® PowerBase™ Version 4, Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA

- vakumska črpalka, Vacuum Pump XF54 230 50, Millipore, Schwalbach, Nemčija
- vibracijski mešalnik-vortex, Assister, Nemčija
- vodna kopel, tip 1003, GFL, Burgwedel, Nemčija
- vodna kopel TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija

3.2. METODE

3.2.1. Delo s celicami

S celicami smo delali v aseptični komori v prostoru za celično kulturo. Pol ure pred začetkom dela smo v aseptični komori prižgali UV-lučko. Delavno površino in vse, kar smo postavili v aseptično komoro, smo obrisali s 70% etanolom. Z vklopom ventilatorja smo povzročili laminarni tok zraka, ki preprečuje prehod delcev v aseptično komoro in iz nje. Uporabljali smo le sterilne platenke (platenke za gojenje celic), plošče s 6 vdolbinicami, 50 ml-epruvete, 1,5 ml-epruvete in pipetne nastavke. Vse platenke, epruvete smo pred uporabo ustrezno označili. Vratove platenk, zamrzovalnih posodic, 50 ml-epruvet smo pred in po uporabi ožgali s plamenom. Pri pipetiranju gojišča, smo uporabili nov pipetni nastavek, ko je bilo potrebno. Delali smo le z enim celičnim tipom naenkrat. Med delom z različnimi celičnimi tipi smo delavno površino dobro razkužili s 70% etanolom.

Odmrzovanje celic

Priprava gojišča: Osnovnemu gojišču, ki ne vsebuje rastnih faktorjev, smo dodali rastne faktorje potrebne za razmnoževanje celic in atibiotike, ki preprečujejo okužbo celic. Osnovno gojišče za HUVEC, HCAEC in HMVEC je bilo isto, ker gre za endotelijske celice, dodatki za HUVEC pa se razlikujejo od dodatkov za HCAEC in HMVEC v količini seruma neskotenega goveda (FBS, fetal bovine serum) in prisotnosti heparina (preglednica II, str.18). Osnovno gojišče smo segreli v vodni kopeli na 37°C. Dodatke osnovnemu gojišču smo vzeli iz zamrzovalnika, jih postavili na sobno temperaturo za 30 min, da so se odtalili in segreli na sobno temperaturo. V aseptični komori smo osnovnemu gojišču dodali predpisano količino dodatkov (preglednica II), ter dobro premešali. Dobljeno popolno gojišče smo alikvotirali v sterilne 50 ml-epruvete in jih shranili v hladilnik (4°C).

Priprava platenk za gojenje celic: glede na število celic v zamrzovalni posodici/plastenki za gojenje celic in njihovo viabilnost (podatki v certifikatu celic) ter priporočeno naselitveno gostoto in površino platenk za gojenje celic smo izračunali število potrebnih platenk za gojenje celic enačbi 1.

$$\text{število plastenke za gojenje celic} = \frac{\text{število celic} \times \text{procent viabilnosti}}{\text{željena naselitvena gostota} \times \text{površina plastenke}}$$

Enačba 1 : Izračun števila plastenke za gojenje celic

Primerno popolno gojišče z 2% FBS smo segreli v vodni kopeli na 37°C (30min). V aseptični komori smo odpipetirali po 15 ml pripravljenega gojišča v plastenke za gojenje celic in jih postavili v inkubator (5% CO₂, 37°C, 100 % relativna vlažnost) za 30 min.

Iz tekočega dušika smo vzeli zamrzovalno posodico s celicami, ter jo na ledu prenesli v 37°C vodno kopel za 1-2 min, da so se celice odtalile. Vsebino zamrzovalne posodice smo rahlo premešali s stresanjem, obrisali z 70% etanolom ter jo postavili v aseptično komoro. Zamrzovalno posodico smo previdno odprli, rahlo s plamenom ožgali (prežarili) vrat in vsebino premešali s pipetiranjem 2x gor in dol z 1 ml-pipeto. Plastenke z gojiščem smo vzeli iz inkubatorja ter odpipetirali v vsako po 500 µl vsebine zamrzovalne posodice. Nekaj 10 µl smo pustili za štetje celic. Plastenke s celicami smo pozibali in postavili v inkubator (5% CO₂, 37°C, 100% relativna vlažnost). Po štirih urah smo gojišče zamenjali.

Menjava gojišča: Gojišče smo menjali vsak drugi dan. V aseptični komori smo z vakumsko črpalko odsesali staro gojišče, ter s sterilno pipeto odpipetirali ustrezen volumen svežega gojišča segretega na 37°C. Pri odsesavanju smo posodico rahlo nagnili, da se je gojišče zbralo v kot, in pazili da se s pipetnim nastavkom vakumske črpalke nismo dotaknili površine, na katero so bile priraščene celice. Curek svežega gojišča je bil blag in ni bil usmerjen direktno na površino s celicami.

Ko so celice dosegle 80-90% prekrivnost, smo jih precepljali v sveže plastenke za gojenje celic; če pa smo želeli celice uporabiti za eksperiment, smo jih precepili v plošče s 6 vdolbinicami.

V plastenke za gojenje celic smo odpipetirali po 15 ml, v posamezno vdolbinico plošč s 6 vdolbinicami pa po 2 ml ustreznega popolnega gojišča, segretega na sobno temperaturo, ter jih postavili v inkubator (5% CO₂, 37°C, 100 % relativna vlažnost) , da se je gojišče segrelo in atmosfera v ventiliranih plastenkah izenačila.

Precepljanje celic

Celice v plastenkah za gojenje celic smo vzeli iz inkubatorja in jih prenesli v aseptično komoro, kjer smo jih sprali s HEPES-BSS pufrom; z vakumsko črpalko smo odsesali staro gojišče, v vsako plastenko odpipetirali po 5 ml na 37°C segretega HEPES-BSS pufra in plastenko rahlo pozibali. Nato smo HEPES odsesali z vakumsko črpalko. Tako smo odstranili odlepljene celice in celične ostanke. V vsako plastenko smo odpipetirali po 2 ml na sobno temperaturo segrete Tripsin/EDTA 1x raztopine tako, da smo pokrili površino plastenke, malo pozibali in postavili v inkubator (37°C). Tripsin smo po 2 min delovanju nevtralizirali z dodatkom 4 ml raztopine za nevtralizacijo tripsina segrete na sobno temperaturo. Površino, na kateri so rasle celice, smo 2x sprali s curkom in celice s pipeto prenesli v 50 ml-epruvete. Dodatno smo plastenko sprali z 2 ml HEPES-BSS pufra ter dodali v 50 ml-epruvete. Pod mikroskopom smo preverili ali smo plastenke dobro sprali. V plastenkah je lahko ostalo največ 5 % celic. Celice v 50 ml-epruvetah smo centrifugirali pri 218 x g, 5 min, 22°C. Z vakumsko črpalko smo odsesali supernatant (pustili smo 100-200 µl s celicami spodaj). Epruveto s celicami smo pretresli, da se je usedlina celic razrahljala. Celicam smo dodali do 6 ml ustreznega na 37°C segretega popolnega medija z 2% FBS.

Štetje celic in določanje viabilnosti: V 1,5 ml-epruveto smo odpipetirali 10 µl tripanskega modrila ter enak volumen celične suspenzije in premešali s pipetiranjem gor in dol. 10 µl mešanice smo kanili na objektno stekelce z mrežo (hemocitometer), ter pokrili s krovnim stekelcem. Pod mikroskopom smo prešteli (žive in mrtve) celice. Šteli smo celice znotraj posameznega kvadranta in celice, ki so se nahajale na zgornjem in levem robu kvadranta. Če je bila vsota celic štirih kvadrantov večja od 400, smo celično suspenzijo redčili. Za redčenje 1:10 smo odpipetirali v 1,5 ml-epruveto z 10 µl tripanskega modrila 9 µl PBS (phosphate buffered saline) in 1 µl celic. Število kvadrantov, ki smo jih prešteli je bilo odvisno od variabilnosti števila celic v posameznem kvadrantu. Pri veliki variabilnosti smo prešteli vseh osem kvadrantov. Iz povprečnega števila celic v enem kvadrantu smo izračunali število celic v 1 ml celične suspenzije (enačba 2), iz tega pa celokupno število celic (enačba 3).

$$\text{celice/ml} = n \times 10^4$$

n...povprečno število celic v enem kvadrantu

Enačba 2: Izračun števila celic v 1 ml celične suspenzije

$$\text{celokupno število celic} = \text{celice/ml} \times V$$

V...celokupni volumen celične suspenzije

Enačba 3: Izračun celokupnega števila celic

Celična viabilnost je razmerje med povprečnim številom živih celic in povprečnim številom vseh celic v posameznem kvadrantu (enačba 4).

$$\text{viabilnost celic} = \frac{\sum \text{žive celice}}{\sum \text{vse celice}}$$

Enačba 4: Izračun celične viabilnosti

Določili smo jo s pomočjo tripanskega modrila, ki mrtve celice obarva, živih pa ne. Celice smo prešteli v roku 5 minut.

Iz dobljenih podatkov smo, upoštevajoč željeno naselitveno gostoto, izračunali število plastenkov za gojenje celic in/ali plošč s 6 vdolbinicami (enačba 1) ter volumen celične suspenzije (enačba 5) za posamezno platenko za gojenje celic in/ ali vdolbinico plošč s 6 vdolbinicami.

$$\text{volumen celične suspenzije} = \frac{\text{celokupni volumen celične suspenzije}}{\text{število plastenkov za gojenje celic}}$$

Enačba 5: Izračun volumna celične suspenzije

Izračunan volumen celične suspenzije smo odpipetirali v platenko za gojenje celic in/ali vdolbinico plastenke s 6 vdolbinicami s segretim popolnim gojiščem. Pred prenosom smo celice v 50 ml-epruveti premešali s pipetiranjem gor in dol, da smo zagotovili enakomerno porazdelitev celic v suspenziji. Plastenke in/ ali plastenke s 6 vdolbinicami s celicami smo pozibali in jih postavili v inkubator (37°C, 5% CO₂, 100% relativna vlažnost).

Obdelava celic

Ko so celice v plastenkah s 6 vdolbinicami dosegle 80-90% prekrivnost so bile pripravljene za eksperiment. Dve uri pred eksperimentom smo celicam zamenjali gojišče. V vsako vdolbinico platenk s 6 vdolbinicami smo odpipetirali po 2 ml ustreznega na 37°C segretega popolnega gojišča brez FBS. Celice smo inkubirali 2 uri na 37°C, 5% CO₂ in 100% relativni vlažnosti. Tik pred eksperimentom smo gojišče še enkrat zamenjali (uporabili smo popolno gojišče brez FBS). Celicam smo nato dodali ustrezne volumne izbranih reagentov. Pri pipetiranju smo pazili, da curek ni bil direkten na celice. Celice smo inkubirali (5% CO₂, 37°C, 100% relativna vlažnost) 24 ur.

Kolekcija celic

Po 24-urni inkubaciji smo celice vzeli iz inkubatorja. Supernatant (malo več kot 1 ml) iz posameznih vdolbinic plošč s 6 vdolbinicami smo odpipetirali v pripravljene 1,5 ml-epruvete in centrifugirali na sobni temperaturi, 14000 xg, 4 min. Približno 900 µl supernatanta smo prenesli v nove 1,5 ml-epruvete in ga zamrznili na -20°C. Supernatante smo nato uporabili za vrednotenje na proteinskem nivoju (metoda ELISA).

Preostanek gojišča v vdolbinicah smo odsesali z vakumsko črpalko. Celice, pritrjene na spodnjo površino vdolbinic plošč s 6 vdolbinicami, smo sprali z 1x DPBS segretim na sobno temperaturo, po 1 ml v vsako vdolbinico. Plošče s 6 vdolbinicami smo rahlo pozibali in 1x DPBS odsesali z vakumsko črpalko. V digestoriju smo v vsako vdolbinico dodali po 300 µl RNAgents® Denaturacijske raztopine, ki povzroči popokanje celičnih membran in s tem denaturacijo celic. Plošče s 6 vdolbinicami smo zibali, dokler ni postala vsebina vdolbinic viskozna. Denaturirane celice smo zamrznili na -80°C in jih naprej uporabili za analizo na nivoju RNA (izolacija RNA → RT → PCR → gelska elektroforeza).

3.2.2. RNA analiza

Izolacija RNA

Denaturirane celice smo vzeli iz -80°C in jih pustili približno 10 min na sobni temperaturi, da so se odtalile. Denaturacijsko raztopino s celicami (300 µl) smo iz posamezne vdolbinice plošč s 6 vdolbinicami prenesli v 1,5-ml epruveto, takoj zvrtnčili in inkubirali na ledu 5 min. Vmes smo 3x vrtinčili. Dodali smo 30 µl hladnega (na ledu) 2M Na acetata

in mešali 5x z obračanjem. Nato smo dodali še 300 µl fenol/kloroform/izoamilni alkohol iz spodnje organske faze in mešali z obračanjem 5x. Po močnem mešanju s stresanjem 10 sek smo epruvete s celicami inkubirali na ledu 15 min. Sledilo je 20-min centrifugiranje pri 4°C, 1000 xg (program 26, Sigma 3K30).

Zgornjo vodno fazo z RNA smo prenesli v novo 1,5 ml-epruveto, DNA in proteini so ostali v organski fazi in v medfazi. Pri pipetiranju smo epruveto nagnili in pipetirali na nasprotni strani, kamor je delovala centrifugalna sila. S pipeto smo izmerili volumen vodne faze in RNA oborili z dodatkom enakega volumna ledenomrzlega izopropanola, mešanjem 5x z obračanjem in inkubacijo 50 min na -20°C. Nato smo mešanico centrifugirali 20 min, 4°C, 10000 xg (program 26, Sigma 3K30). Supernatant smo odstranili in usedlino RNA sprali z 1,0-ml 75 % hladnega etanola. Po mešanju z obračanjem 5x, smo 20 min centrifugirali (4°C, 10000 xg (program 26, Sigma 3K30)) in supernatant odstranili. RNA smo sušili v aseptični komori približno 90 min. Pazili smo, da usedline nismo preveč posušili, ker je osušeno RNA zelo težko resuspendirati.

RNA smo raztopili v 30 µl vode brez nukleaz. Po 10-min inkubaciji v vodni kopeli pri 56°C smo vsebino epruvete premešali z 5x pipetiranjem gor in dol ter zamrznili na -80°C.

Ugotavljanje čistosti ter izkoristka RNA (merjenje absorbance)

Po izolaciji smo preverili, kakšna je kakovost izolirane RNA. Spektrofotometrično smo določili njeno količino in čistost.

V posamezne 1,5 ml-epruvete smo odpipetirali 67,7 µl vode brez nukleaz ter 2,3 µl izolirane RNA ter premešali. V 70 µl-kiveto smo odpipetirali 70 µl vzorca in s spektrofotometrom izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 260 nm, 280 nm in 320 nm. Organske baze v nukleinskih kislinah imajo absorpcijski maksimum pri 260 nm. 1 absorbančna enota A_{260} pomeni, da je koncentracija enoverižne RNA v raztopini 40 µg/ml (34). Iz absorbance pri 260 nm smo izračunali koncentracijo izolirane RNA (enačba 6) in volumen RNA, ki ustreza 1 µg RNA (enačba 7).

$$C_{\text{RNA}} = A_{260} \times 30 \times 40 \mu\text{g/ml}$$

30...faktor redčenja

Enačba 6: Izračun koncentracije RNA

$$V_{\text{RNA}} = \frac{1000 \text{ ng}}{C_{\text{RNA}} (\text{ng}/\mu\text{l})}$$

Enačba 7: Izračun volumna RNA vzorca za RT, ki ustreza 1 µg RNA

Izračunali smo tudi razmerje A_{260}/A_{280} , ki pove čistost produkta. Idealno razmerje je med 1.7 in 2.0 (34). Nižje razmerje kaže na prisotnost drugih proteinov in DNA v vzorcu. Z merjenjem absorbanca pri 320 nm smo preverili prisotnost organskih topil, uporabljenih pri izolaciji.

Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija (RT) je metoda, s katero smo izolirano mRNA prepisali v komplementarno enoverižno DNA (cDNA). Ključno vlogo ima v tej reakciji je imel encim AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverzna Transkriptaza, ki je na osnovi celotne ali poli(A)+ izolirane RNA sintetiziral enoverižno cDNA (35).

V 1,5 ml-epruveti smo pripravili reakcijsko mešanico (preglednica III).

Preglednica III: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo reverzne transkripcije (RT)

(10x RT pufer - pufer za reverzno transkripcijo, dNTP - nukleotidi, oligo dT - timidinski nukleotidi, AMV RT – encim AMV reverzna transkriptaza)

	1x	12x+2
voda brez nukleaz	0,05 µl	0,7 µl
10x RT pufer	3 µl	42 µl
MgCl ₂	6 µl	84 µl
dNTP	3 µl	42 µl
oligo dT	1 µl	14 µl
RNazni inhibitor	0,75 µl	10,5 µl
AMV RT	0,6 µl	8,4 µl
skupni volumen	14,4 µl	201,6 µl

Reagente smo hranili na ledu. Pred pipetiranjem smo reagente dobro premešali. Reagente smo v mešanico dodajali po naslednjem zaporedju: voda brez nukleaz, 10x RT pufer, MgCl₂, dNTP, oligo dT, nazadnje smo dodali še encime Rekombinantni RNasin® Ribonukleazni Inhibitor in AMV Reverzno Transkriptazo. Reakcijsko mešanico smo dobro

premešali s pipetiranjem gor in dol. Po kratkem centrifugiranju (30 s, 14000 xg) smo alikvotirali po 14,4 µl mešanice v posamezno 200 µl-epruveto. Nato smo dodali izračunan volumen vode brez nukleaz (enačba 8), ter volumen RNA, ki ustreza 1 µg RNA (enačba 7).

$$V_{\text{vode}} = 15,6 \mu\text{l} - V_{\text{RNA}}$$

Enačba 8: Izračun volumna vode

Celotno mešanico smo dobro premešali s pipetiranjem gor in dol, kratko centrifugirali (30 s, 14000 xg). Epruvete smo postavili v aparaturo in nastavili program za reverzno transkripcij. 30 min inkubaciji reakcijske mešanice pri 43°C, je sledila 30 min inkubacija pri 53°C. Reakcijsko mešanico smo nato segreli na 94°C za 5 min. Sledila je inkubacija pri 4°C, da se je AMV Reverzna Transkriptaza inaktivirala. Tako smo preprečili njeno vezavo na cDNK (33). Po končani reakciji smo dobljene produkte shranili na -20°C.

Verižna reakcija s polimerazo

Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo enoverižno cDNA, ki smo jo dobili pri RT, prevedli v dvoverižno DNA ter pomnožili želeni odsek dobljene DNA. Ključno vlogo je imel v tej reakciji encim *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA Polimeraza.

V 1,5 ml-epruveto smo odpipetirali ustrezen volumen za reakcijo potrebnih reagentov (preglednica IV) v naslednjem zaporedju: voda brez nukleaz, osnovna zmes PCR, ustrezen F (forward) in R (reverse) začetni oligonukleotid.

Preglednica IV: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

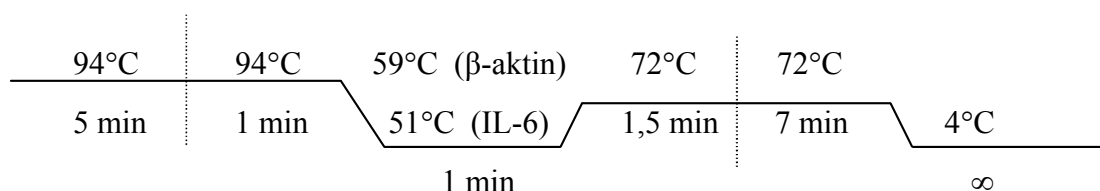
	1x (Promega)	14x	1x (Invitrogen)	14x
voda brez nukleaz	7 µl	98 µl	/	/
osnovna zmes PCR	12,5 µl	175 µl	22,5 µl	315 µl
F začetni oligonukleotid	1,25 µl	17,5 µl	0,5 µl	7 µl
R začetni oligonukleotid	1,25 µl	17,5 µl	0,5 µl	7 µl
produkt reverzne transkripcije	3 µl	42 µl	1,5 µl	21 µl
skupni volumen	25 µl	350 µl	25 µl	350 µl

Dobljeno mešanico smo dobro premešali s pipetiranjem gor in dol ter kratko centrifugirali (30 s, 14000 xg). Reakcijsko mešanico smo alikvotirali po 22 μ l (23,5 μ l) mešanice v 200 μ l-epruveto in dodali 3 μ l (1,5 μ l) produkta reverzne transkripcije. Kontrolno negativno reakcijo smo pripravili tako, da smo namesto produkta reverzne transkripcije dodali vodo brez nukleaz (3 μ l). Po kratkem centrifugiranju (30 s, 14.1x10³ rcf), smo 200 μ l epruvete postavili v aparat za PCR in nastavili ustrezen program za PCR (preglednica V).

Preglednica V: Reakcijski pogoji v aparatu za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

	stopnje PCR reakcije	začetna denaturacija	denaturacija	prileganje	podaljševanje	končno podaljševanje	prekinitev
β -aktin	temperatura	94°C	94°C	59°C	72°C	72°C	4°C
	čas	5 min	1 min	1 min	90 s	7 min	∞
	št.ciklov		25				
IL-6	temperatura	94°C	94°C	51°C	72°C	72°C	4°C
	čas	5 min	1 min	1 min	90 s	7 min	∞
	št.ciklov		30				

Program za PCR:



Reakcija je potekala v treh korakih; Začetna denaturacija pri 94°C, kjer sta se komplementarni verigi DNA ločili in smo dobili dve linearni verigi DNA, ki sta predstavljali matrico za nadaljnje pomnoževanje odseka. Sledilo je prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri temperaturi med 45°C in 60°C. Izbira temperature prileganja je bila specifična glede na odsek, ki smo ga želeli pomnožiti in je omogočila specifičnost prileganja oligonukleotidnih začetnikov (36). Zadnji korak je bil podaljševanje odseka pri 72°C. Ti koraki so se večkrat ponovili. Zadnja ponovitev je imela še fazo končnega podaljševanja pri 72°C, ki je pripomogla k boljšemu izkoristku.

Priprava oligonukleotidnih začetnikov

Oligonukleotidni začetniki so se nahajali v liofilizirani obliki. Pred uporabo jih je bilo potrebno resuspendirati in pripraviti ustrezno redčitev.

Liofilizirane oligonukleotidne začetnike smo centrifugirali (14000 xg, 1 min, sobna temperatura), dodali 100 µl vode brez nukleaz brez pipetiranja gor in dol, ter postavili za 10 min v vodno kopel pri 56°C. Nato smo vsebino pipetirali gor in dol vsaj 10x, da smo oligonukleotidne začetnike dobro resuspendirali. Tako smo pripravili t.i. zalogo začetnic in jih postavili na led. Redčitev 1:10 smo pripravili tako, da smo v 1,5 ml-epruvete odpipetirali 90 µl vode brez DNaze in RNaz, dodali 10 µl zaloge začetnic in dobro premešali. Zalogo začetnic smo shranili na -80°C, 1:10 oligonukleotidne začetnike pa na -20°C.

Agarozna gelska elektroforeza

Dobljene fragmente DNA smo ločili in detektirali s pomočjo agarozne gelske elektroforeze.

V 1,5 ml-epruveto smo odpipetirali ustrezen volumen vode brez nukleaz ter barvilo BlueJuice in vsebino zvrtnčili (preglednica VI).

Preglednica VI: Sestava mešanice za agarozno gelsko elektroforezo

	1x	(število alikvotov (7) + 2)x
barvilo Blue Juice	2 µl	14 µl
voda brez nukleaz	5,5 µl	38,5 µl
skupni volumen	7,5 µl	52,5 µl

Pripravljeno mešanico smo alikvotirali po 7,5 µl v 200 µl-epruvete, dodali 12,5 µl produkta PCR reakcije in kratko centrifugirali (30 s, 14000 xg). Na 2% agarozni gel smo nanesli po 20 µl gelske mešanice.

Označevalec baznih parov smo pripravili tako, da smo v 200 µl-epruveto odpipetirali 19,5 µl vode brez nukleaz in 1,5 µl označevalca velikosti fragmentov 50 baznih parov. Po kratkem centrifugiranju smo 20 µl pripravljenega označevalca velikosti fragmentov 50 baznih parov nanesli v prvo linijo na 2% agaroznem gelu. Elektroforeza je potekala 30 min pri 12 V.

3.2.3. Encimsko imunski test na trdem nosilcu

Z metodo encimsko imunskega testa na trdnem nosilcu (ELISA) smo kvantitativno opredelili količino IL-6, ki so ga izločile celice kot odziv na uporabljene modulatorje izločanja. Delali smo po navodilu proizvajalca (33).

Vse reagente, standarde in vzorce smo segreli na sobno temperaturo.

Priprava pufru za spiranje: 1 volumsko enoto 25x koncentrata smo premešali s stresanjem in redčili z 24 volumskimi enotami destilirane vode. Vsebino smo dobro premešali z obračanjem steklenice in steklenico zaprli z zamaškom z obrušom. Pripravljeni pufer za spiranje smo porabili v 14-dneh.

Priprava standardov: Standard rekombinantnega humanega IL-6 v liofilizirani obliki (Hu IL-6 Standard) smo rekonstituirali z dodatkom predpisane količine (1,6 ml) pufru za redčenje standarda. Previdno smo premešali in pustili stati 10 min, da se je liofilizant prepojil.

Redčitve smo pripravili tako, da smo v ustrezno označene epruvete (250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 pg/ml, 0 pg/ml) odpipetirali po 300 µl pufru za redčenje standarda. Platenko s standardom smo dobro pretresli, vsebino pipetirali gor in dol in prenesli 200 µl rekonstituiranega standarda v epruveto (500 pg/ml) z 800 µl pufru za redčenje standarda. Vsebino epruvete smo premešali s pipetiranjem gor in dol in vrtinčenjem, ter prenesli 300 µl v pripravljeno epruveto (250 pg/ml) z 300 µl pufru za redčenje standarda. Sledilo je pipetiranje gor in dol, vrtinčenje in prenos 300 µl v naslednjo epruveto. Postopek smo večkrat ponovili. Le v zadnji epruveti (0 pg/ml) je bil le pufer za redčenje standarda. Tako smo dobili ustrezne redčitve.

Priprava vzorcev: Vzorce smo vrtinčili 4x po 5s pri 2500 cpm. Če je bilo potrebno smo vzorce redčili. Za redčenje 1:5 smo po vrtinčenju prenesli po 60 µl vzorca v epruvete z 240 µl pufru za redčenje standarda, pipetirali gor in dol in zvrtnili.

Glede na število vzorcev smo določili potrebno število ploščic z 8 vdolbinicami v mikrotiterski plošči, ter jih vstavili v okvir. Vse standarde, vzorce in slepe smo nanašali v duplikatu in rezultate podali kot povprečje dveh meritev. Standarde in vzorce smo pred nanosom še enkrat vrtinčili ter odpipetirali po 100 µl v posamezno vdolbinico. Vdolbinici 1A in 2A smo pustili prazni za kromogeno slepo. Mikrotitersko ploščo smo pozibali, da se je vsebina porazdelila po vdolbinicah.

V vse vdolbinice, razen v kromogeno slepo smo odpipetirali po 50 µl biotiniliranega sekundarnega protitelesa proti Hu IL-6, mikrotitersko ploščo rahlo pozibali, da se je vsebina vdolbinic premešala, in pokrili s folijo ter inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi.

Priprava Streptavidin-Peroksidaza delavne raztopine: Raztopino, ki je vsebovala encim Streptavidin-Peroksidaza smo pripravili približno pol ure pred nanosom. 100x koncentrat Streptavidin-Peroksidaze smo segreli na sobno temperaturo ter premešali s stresanjem in pipetiranjem gor in dol. Za vsako ploščico z 8 luknjicami, smo 10µl 100x koncentrata Streptavidin-Peroksidaze razredčili z 1 ml raztopine za redčenje koncentrata Streptavidin-Peroksidaze. Raztopino za redčenje smo pretresli in odpipetirali potrebno količino v kadičko. Dodali smo ustrezen volumen 100x koncentrata Streptavidin-Peroksidaze in kadičko pozibali, da se je vsebina enakomerno premešala. Ker se 100x koncentrat Streptavidin-Peroksidaze nahaja v 50% glicerolu, je raztopina viskozna in potrebuje nekoliko več časa, da se po dodatku diluenta enakomerno razredči.

Po 2-urni inkubaciji smo vsebino vdolbinic odlili, otresli na staničevino ter vdolbinice 4-krat sprali z 300 µl pufru za spiranje. Po vsakem spiranju smo mikrotitersko ploščo dobro otresli na staničevino. V vse luknjice razen v kromogeno slepo (1A in 2A) smo odpipetirali po 100 µl Streptavidin-Peroksidaza delavne raztopine, ploščo pozibali in pokrili s folijo ter inkubirali 30 min pri sobni temperaturi.

Po inkubaciji smo vsebino luknjic odlili in sprali 4-krat s puffrom za spiranje. Mikrotitersko ploščo smo dobro otresli po staničevini, da se je vsebina luknjic osušila. V vsako luknjico smo dodali po 100 µl stabiliziranega kromogena. Vsebinska luknjica je začela postajati modra. Mikrotitersko ploščo smo postavili v temen prostor in inkubirali pri sobni temperaturi do 30 min. Nato smo dodali 100 µl raztopine Stop v vsako luknjico in mikrotitersko ploščo pozibali. Vsebinska luknjica se je obarvala rumeno.

S čitalcem absorbance za mikrotiterske plošče smo v roku 3 min po dodatku raztopine Stop pri 450 nm izmerili absorbanco posamezne vdolbinice. Čitalec smo umerili s kromogeno slepo sestavljeno iz 100 µl stabiliziranega kromogena in 100 µl raztopine Stop. Na osnovi izmerjene absorbance standardov z znano koncentracijo Hu IL-6, smo izdelali umeritveno krivuljo. S pomočjo enačbe umeritvene krivulje za standarde smo izračunali koncentracijo Hu IL-6 v vzorcih. Vzorce, pri katerih je bil odziv višji kot pri najvišjem standardu (500 pg/ml), smo redčili s puffrom za redčenje standarda v razmerju 1:5 in dobljene absorbance množili z faktorjem redčenja.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Koncentracijski vpliv LXA₄ na izražanje IL-6

- HUVEC

Poskus smo izvedli na HUVEC četrte pasaže prve zbirke celic, ki smo jih gojili v ploščah s 6 vdolbinicami. Ko so celice dosegle 80-90% prekrivnost so bile pripravljene za eksperiment. 2-uri pred eksperimentom, smo celicam zamenjali gojišče. Uporabili smo gojišče za HUVEC brez FBS, segret na 37°C. Celice smo inkubirali 2 uri v inkubatorju in jim ponovno zamenjali gojišče (brez FBS). Nato smo v aseptični komori v vsako vdolbinico dodali ustrezen volumen LXA₄ (preglednica VII, panel A). Po 24-urni inkubaciji smo v aseptični komori supernatante iz posameznega prekata prenesli v 1,5 ml-epruvete, jih centrifugirali 3 min na 14000 x g ter zamrznili na -20°C za nadaljno proteinsko analizo. Celice, pritrjene na spodnjo površino vdolbinic plošč s 6 vdolbinicami, smo sprali z 1x DPBS ter jim v digestoriju dodali po 300 µl denaturacijskega pufra. Plošče s 6 vdolbinicami smo pozibali, da je vsebina vdolbinic postala viskozna in jih zamrznili na -80°C. Tako smo celice pripravili za nadaljnjo mRNA analizo.

Preglednica VII: Koncentracija in dodani volumen lipoksina A₄ (LXA₄) oz. EtOH

(B- ozadje)

panel A	koncentracija	volumen oz. redčenje	panel B	‰	volumen oz. redčenje
B	/	/	B	/	/
LXA ₄	1nM	1:1000 (2µl/2ml)	EtOH	0,007 ‰	1:1000 (2µl/2ml)
LXA ₄	10 nM	1:100 (2µl/2ml)	EtOH	0,07 ‰	1:100 (2µl/2ml)
LXA ₄	100 nM	1:10 (2µl/2ml)	EtOH	0,7 ‰	1:10 (2µl/2ml)
LXA ₄	1000 nM	2µl/2ml	EtOH	7 ‰	2µl/2ml
LXA ₄	10000 nM	20µl/2ml	EtOH	70 ‰	20µl/2ml

- HCAEC

Za poskus smo uporabili HCAEC pete pasaže prve zbirke celic. Poskus na HCAEC smo izvedli pri enakih pogojih (preglednica VII, panel A) kot poskus na HUVEC.

4.2. Vpliv etanola na izražanje IL-6

• HUVEC

Za poskus smo uporabili HUVEC četrte pasaže prve zbirke celic. Poskus smo izvedli vzporedno s poskusom vpliva LXA₄ na izražanje IL-6 pri HUVEC. Ko so celice v ploščah s 6 vdolbinicami dosegle 80-90% prekrivnost in so bile pripravljene na poskus, smo v posamezne vdolbinice odpipetirali ustrezne volumne pripravljenih etanolnih raztopin (preglednica VII, panel B) in plošče s 6 vdolbinicami pozibali. Po 24-urni inkubaciji smo izvedli kolekcijo.

• HCAEC

Za poskus smo uporabili HCAEC pete pasaže prve zbirke celic. Poskus na HCAEC smo izvedli pri enakih pogojih (preglednica VII, panel B) kot poskus na HUVEC.

4.3. Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA₄ na izražanje IL-6 pri HUVEC

Za eksperiment smo uporabili HUVEC druge pasaže druge zbirke celic. Ko so celice v ploščah s 6 vdolbinicami dosegle 80-90% prekrivnost in so bile pripravljene za eksperiment, smo v aseptični komori v posamezno vdolbinico plošč s 6 vdolbinicami dodali ustrezne volumne pripravljenih reagentov (preglednica VIII). Najprej smo v ustrezne vdolbinice dodali inhibitor LXA₄, plošče s 6 vdolbinicami pozibali, nato pa stimulator SAA. Celice smo inkubirali 24 ur.

Preglednica VIII: Koncentracije in dodani volumni serumskega amiloida A (SAA) in lipoksina A₄ (LXA₄)

	koncentracija	volumen		koncentracija	volumen oz. redčenje
B (ozadje)	/	/	/	/	/
SAA	1000 nM	24 µl	/	/	/
SAA	1000 nM	24 µl	LXA ₄	10 nM	1:100 (2 µl/2ml)
SAA	1000 nM	24 µl	LXA ₄	100 nM	1:10 (2 µl/2ml)
SAA	1000 nM	24 µl	LXA ₄	1000 nM	2 µl/2ml
/	/	/	LXA ₄	10 nM	1:100 (2 µl/2ml)
/	/	/	LXA ₄	100 nM	1:10 (2 µl/2ml)
/	/	/	LXA ₄	1000 nM	2 µl/2ml

4.4. Vpliv SAA in imunoglobulinov samih in ob prisotnosti LXA₄ na izločanje IL-6 pri HUVEC, HCAEC in HMVEC

Da bi imeli večji pregled nad podatki o bolnikih ter njihovih serumih, smo izdelali Preglednico IX.

Preglednica IX: Pregled podatkov o bolnikih ter njihovih uporabljenih serumih

(aCL – antikardiolipinska protitelesa, anti- β_2 GPI – protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, LA – aktivnost lupusnih antikoagulantov, IL-6 – interleukin-6, PAPS – bolnik s primarnim antifosfolipidnim sindromom, SAPS – bolnik s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom)

	spol/leto rojstva	aCL (IgG)	anti- β_2 GPI (IgG)	LA	IL-6 (pg/ml)
PAPS-odrasel	moški (1948)	>30	16	-	6
PAPS-pediatrični	moški (1990)	24	8	+ *	17
SAPS-odrasel	ženski (1974)	8	/	-	22
SAPS-pediatrični	ženski (1987)	<5	/	+ *	/
krvodajalec		neg	/	-	12

* vrednosti so bile izmerjene pred antikoagulantno terapijo

Pražna vrednost za aCL je 5 arbitrarnih enot, za anti- β_2 GPI pa 2 arbitrarni enoti. Pražna vrednost za IL-6 je 8 pg/ml (8).

• HUVEC

Poskus smo izvedli na HUVEC druge zbirke celic. Izvedli smo ga v dveh serijah. V obeh smo uporabili celice četrte pasaže.

Ko so celice v ploščah s 6 vdolbinicami dosegle 80-90 % prekrivnost in so bile pripravljene za eksperiment, smo v ustrezne vdolbinice odpipetirali po 2 μ l pripravljenega LXA₄. Nato smo v vse vdolbinice, razen v kontrolo ozadja dodali ustrezne stimulatorje, nazadnje pa še 2 μ l etanola v vdolbinice brez LXA₄ (preglednica X). Po dodatku vsakega reagenta smo ploščo s 6 vdolbinicami pozibali, da se je vsebina, ki smo jo dodali lepo porazdelila po celicah. Po 24 urni inkubaciji smo izvedli kolekcijo.

Preglednica X: Koncentracije in dodani volumni stimulatorjev in modulatorjev izločanja interleukina-6 (IL-6)

LXA₄ – lipoksin A₄, *SAA* – serumski amiloid A, *Cof-21* – monoklonska protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I, *IgG aPL* – IgG frakcija bolnika z antifosfolipidnim sindromom, *PAPS* – bolnik s primarnim antifosfolipidnim sindromom, *SAPS* – bolnik s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom)

	stimulatorji	koncentracija	volumen	LXA ₄ 100 nM	EtOH 0,7 ‰
1	B (ozadje)	/	/	/	2 µl
2	B(ozadje)	/	/	2 µl	/
3	SAA	1000 nM	24 µl	/	2 µl
4	SAA	1000 nM	24 µl	2 µl	/
5	Cof-21	16 µg/ml	20 µl	/	2 µl
6	Cof-21	16 µg/ml	20 µl	2 µl	/
7	IgG aPL	1%	40,8 µl	/	2 µl
8	IgG aPL	1%	40,8 µl	2 µl	/
9	serum PAPS odrasli	1%	20 µl	/	2 µl
10	serum PAPS odrasli	1%	20 µl	2 µl	/
11	serum PAPS pediatrični	1%	20 µl	/	2 µl
12	serum PAPS pediatrični	1%	20 µl	2 µl	/
13	serum SAPS odrasli	1%	20 µl	/	2 µl
14	serum SAPS odrasli	1%	20 µl	2 µl	/
15	serum SAPS pediatrični	1%	20 µl	/	2 µl
16	serum SAPS pediatrični	1%	20 µl	2 µl	/

17	serum normala	1%	20 µl	/	2 µl
18	serum normala	1%	20 µl	2 µl	/

- **HCAEC**

Poskus smo izvedli na HCAEC druge zbirke celic. Izvedli smo ga v dveh serijah. V prvi seriji smo uporabili celice četrte pasaže, v drugi pa celice pete pasaže.

Poskus na HCAEC smo izvedli pri enakih pogojih (preglednica X) kot poskus na HUVEC.

- **HMVEC**

Poskus smo izvedli na HMVEC druge zbirke celic. Izvedli smo ga v dveh serijah. V prvi seriji smo uporabili celice četrte pasaže, v drugi pa celice pete pasaže.

Poskus na HMVEC smo izvedli pri enakih pogojih (preglednica X) kot poskus na HUVEC.

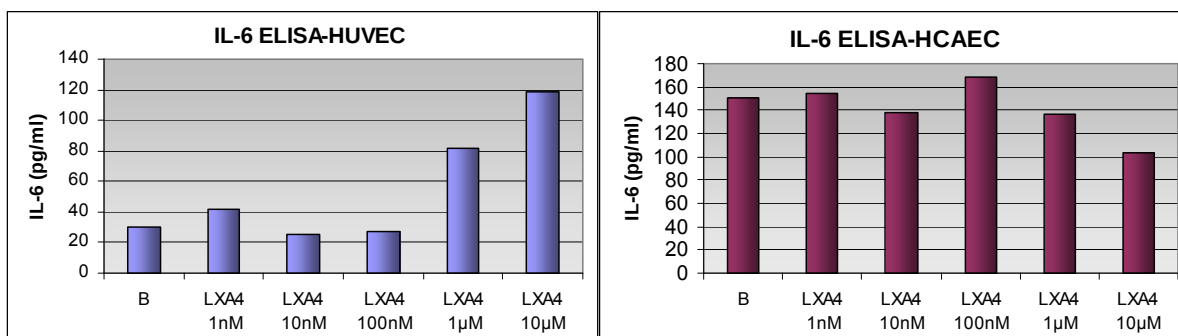
5. REZULTATI

5.1. Koncentracijski vpliv LXA₄ na izražanje IL-6 v HUVEC in HCAEC

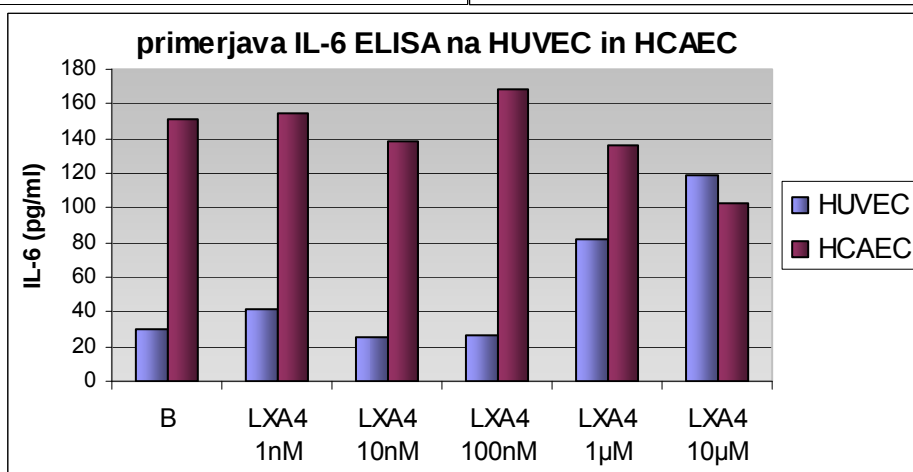
LXA₄ v nanomolarni (1 nM, 10 nM, 100 nM) koncentraciji ni vplival na izločanje IL-6 ne pri HUVEC (slika 1 A, stolpec 1, 2, 3, 4) ne pri HCAEC (slika 1 B, stolpec 1, 2, 3, 4)

A.

B.



C.



Slika 1: Koncentracijski vpliv LXA₄ na izločanje IL-6 proteina iz HUVEC in HCAEC

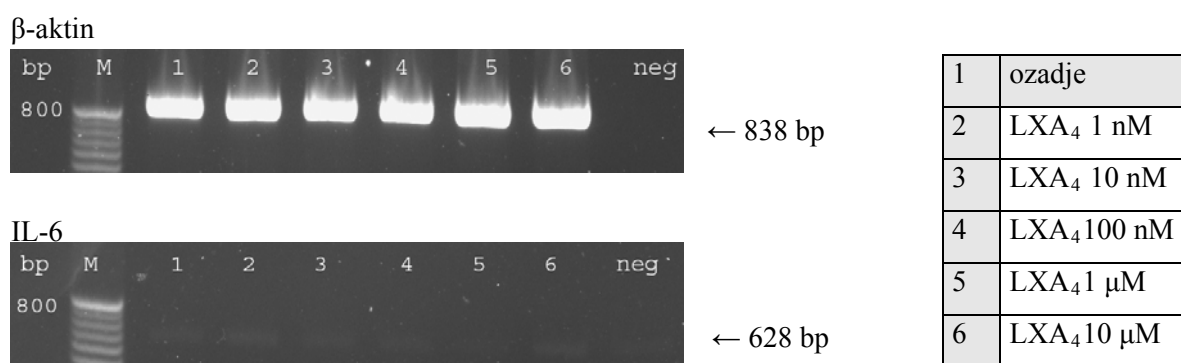
IL-6 ELISA supernatantov; HUVEC p4, LXA₄ (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM); HCAEC p5, LXA₄ (1 nM, 10nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM); čas stimulacije 24 ur (*B* – kontrola ozadja, *IL-6* – interleukin-6, *LXA₄* – lipoksin A₄)

Pri mikromolarnih koncentracijah (1 µM, 10 µM) je bil pri HUVEC prisoten trend povečanega izločanja vnetnega citokina IL-6 (slika 1 A, stolpec 5, 6), pri HCAEC pa se je nad 100 nM z naraščanjem koncentracije (1 µM, 10 µM) povečevala inhibicija izločanja IL-6 (slika 1 B, stolpec 5, 6). Pri HUVEC je LXA₄ 10 µM do 4-krat povečal izločanje IL-6 v primerjavi s kontrolo ozadja, kjer ni bilo dodanega LXA₄ (slika 1 A, stolpec 1, 6). Pri

HCAEC je 10 μM LXA₄ zmanjšal izločanje IL-6 za 30% glede na kontrolo (slika 1 B, stolpec 1, 6).

HCAEC izločajo v odsotnosti modulatorjev izločanja večje količine IL-6 kot HUVEC. Razmerje izločenega vnetnega citokina IL-6 je bilo HCAEC:HUVEC = 5:1 (slika 1 C, stolpec 1). Ker je LXA₄ nad 100 nM deloval kot stimulator izločanja IL-6 pri HUVEC (slika 6, stolpec 8) in šibkejši inhibitor izločanja IL-6 pri HCAEC, se razmerje med izločenim IL-6 pri HCAEC in HUVEC spreminja z naraščanjem koncentracije LXA₄; pri 100 nM je bilo razmerje podobno razmerju kontrol, pri 1 μM je bila razlika v količini izločenega IL-6 manjša, pri 10 μM je količina izločenega IL-6 pri HUVEC presegla količino IL-6 izločenega pri HCAEC (slika 1 C). Za nadaljnje eksperimente smo uporabili nM koncentracije.

Na mRNA nivoju pri HCAEC, LXA₄ ni vplival na izražanje IL-6 pri nobeni od uporabljenih koncentracij (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM) (slika 2).

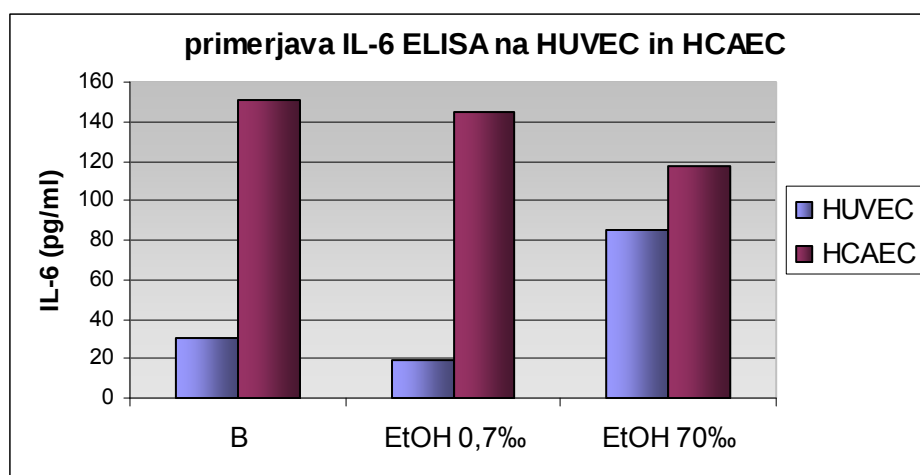


Slika 2: Koncentracijski vpliv LXA₄ na mRNA izražanje IL-6 pri HCAEC

mRNA analiza; HCAEC p5, LXA₄ (0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM); čas ekspozicije β -aktin: 1000 ms, IL-6: 1000 ms (*M* – DNA označevalec velikosti, *bp* – bazni pari)

5.2. Vpliv etanola na izražanje IL-6 v HUVEC in HCAEC

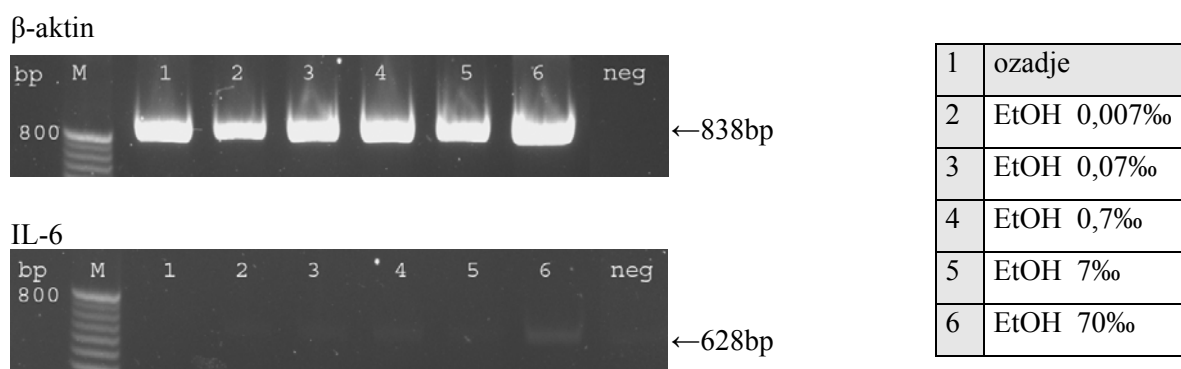
Etanol v 0,7‰ koncentraciji ni vplival na izločanje IL-6 v primerjavi s kontrolo ozadja. Pri 100-krat višji koncentraciji (70‰) je etanol stimuliral HUVEC in povečal izločanje IL-6 2,7-krat glede na kontrolo izločanja, ter deloval inhibitorno na izločanje IL-6 pri HCAEC (zmanjša izločanje IL-6 za 10%) (slika 3).



Slika 3: Vpliv etanola na izločanje IL-6 pri HUVEC in HCAEC

IL-6 ELISA supernatantov; EtOH (0,7‰, 7 ‰), HUVEC p4, HCAEC p5 (*B – kontrola ozadja, IL-6 – interlevkin-6, EtOH - etanol*)

Učinek 70‰ etanola na moduliracijo izražanja IL-6 pri HCAEC potrjuje tudi mRNA analiza (slika 4, lisa 6).



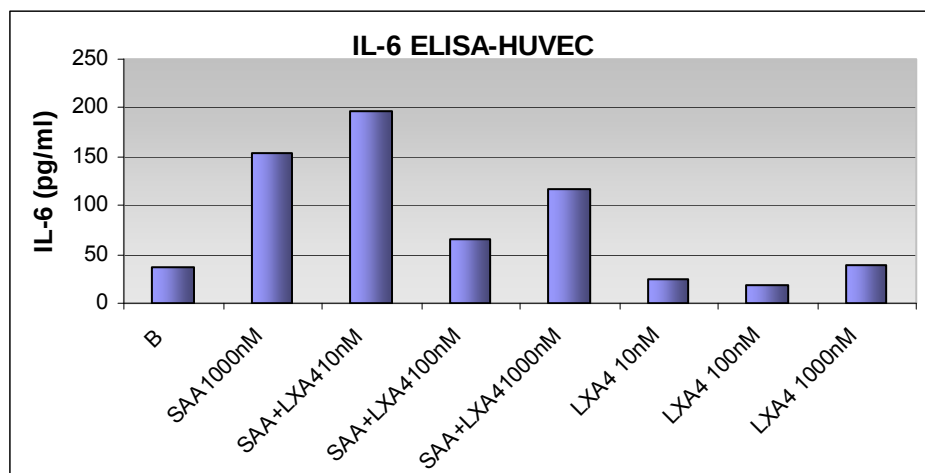
Slika 4: Koncentracijski vpliv etanola na mRNA ekspresijo IL-6 pri HCAEC

mRNA analiza; HCAEC p5, EtOH (0,007‰, 0,07‰, 0,7‰, 7‰, 70‰); čas ekspozicije β-aktin: 1000 ms, IL-6: 1000 ms; (*M – DNA označevalec velikosti; bp – bazni pari*)

Šibka lisa mRNA analize pri stimulaciji HCAEC s 70‰ EtOH nakazuje vnetno delovanje.

5.3.Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA₄ na izražanje IL-6 pri HUVEC

SAA (1000nM) je pri HUVEC stimuliral izločanje IL-6 (slika 5, stolpec 2) in izražanje IL-6 mRNA (slika 6, stolpec 2).



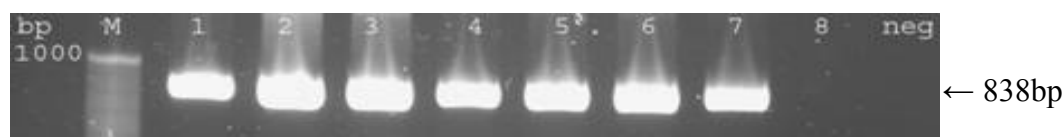
Slika 5: Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA₄ na izločanje IL-6 pri HUVEC

IL-6 ELISA supernatantov; HUVEC p2, SAA 1000nM, LXA₄ (10 nM, 100 nM, 1000 nM); (*B – kontrola ozadja, SAA – serumski amiloid A, IL-6 – interlevkin 6, LXA₄ – lipoksin A₄*)

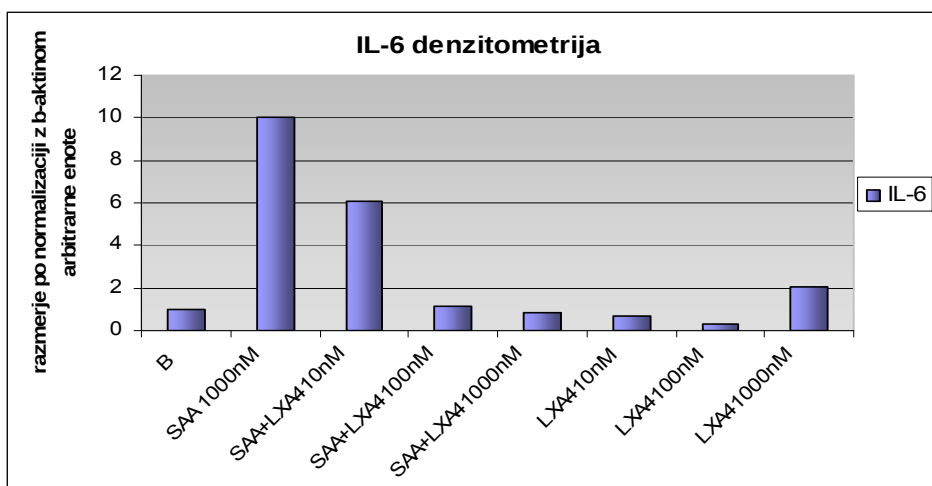
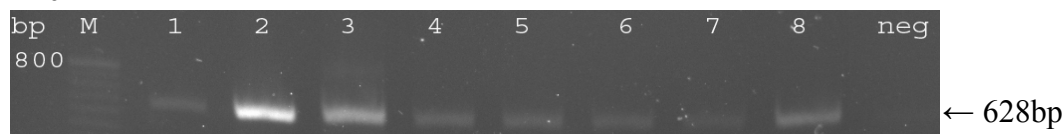
Na proteinskem nivoju je LXA₄ 10 nM v kombinaciji z SAA (1000 nM) deloval aditivno in povečal SAA-stimulirano izločanje IL-6 (slika 5, stolpec 3), pri 100 nM in 1000 nM pa je LXA₄ zmanjšal SAA-stimulirano izločanje IL-6, pri čemer je bila inhibicija najmočnejša pri 100 nM LXA₄.

Na mRNA nivoju se z naraščanjem koncentracije LXA₄ kaže trend inhibicije SAA-stimuliranega izražanja IL-6 (slika 6, stolpec 1, 2, 3, 4, 5). Inhibicija izražanja IL-6 mRNA je bila pri 100 nM 6-krat močnejša kot pri 10 nM, medtem ko med 100 nM in 1000 nM LXA₄ v intenziteti inhibicije ni bilo razlik (slika 6, stolpec 4, 5).

β -aktin



IL-6



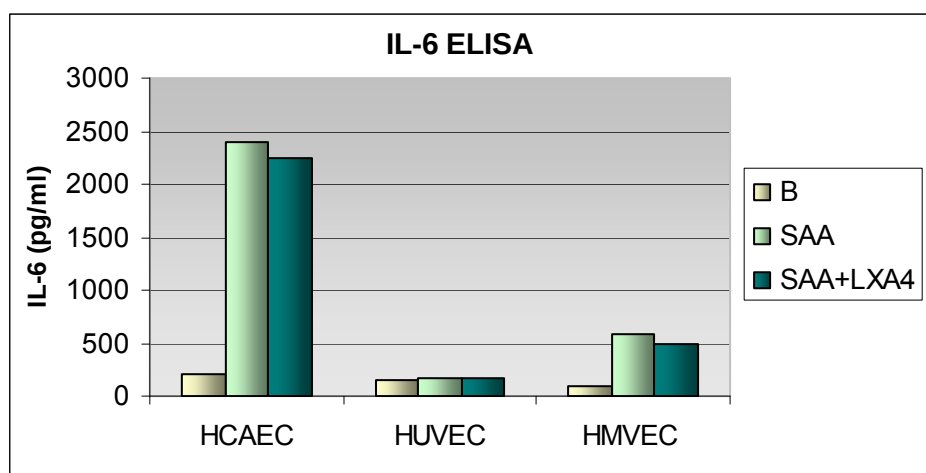
Slika 6: Vpliv SAA v prisotnosti naraščajočih koncentracij LXA₄ na mRNA izražanje IL-6 pri HUVEC

mRNA analiza; HUVEC p2, SAA 1000 nM, LXA₄ (10 nM, 100 nM, 1000 nM), čas ekspozicije β -aktin: 1200 ms, IL-6: 1200 ms; (M – DNA označevalec velikosti, bp – bazni pari, SAA – serumski amiloid A, IL-6 – interlevkin 6, LXA₄ – lipoksin A₄)

5.4. Vpliv SAA in imunoglobulinov (ob prisotnosti in odsotnosti LXA₄) na izločanje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC

• SAA

SAA pri 1000 nM koncentraciji je najmočneje stimuliral izločanje vnetnega citokina IL-6 pri HCAEC. Količina izločenega IL-6 se je v primerjavi s kontrolo ozadja pod vplivom SAA povečala 12-krat. Stimulacija je bila prisotna tudi pri HMVEC (6,5-krat kontrole ozadja), HUVEC so se na stimulacijo z SAA 1000 nM minimalno odzvale (slika 7).



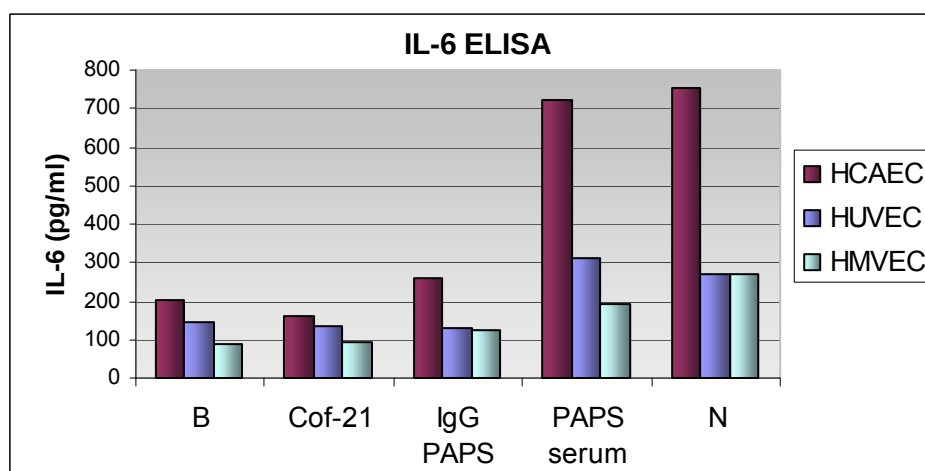
Slika 7: Primerjava vpliva SAA v prisotnosti in odsotnosti LXA₄ na izločanje IL-6 pri različnih tipih endotelijskih celic

IL-6 ELISA supernatantov; SAA 1000 nM, LXA₄ 100 nM; prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (*B – kontrola ozadja, SAA – serumski amiloid A, IL-6 – interlevkin-6, LXA₄ – lipoksin A₄*)

LXA₄ 100 nM je rahlo inhibiral SAA-stimulirano izločanje IL-6 pri HCAEC in HMVEC. Kljub inhibiciji, je bila količina izločenega IL-6 visoko nad nivojem kontrole ozadja (slika 7).

• Imunoglobulini

Monoklonska protitelesa Cof-21 (16 µg/ml) niso vplivala na izločanje IL-6 pri nobenem od treh tipov endotelijskih celic. IgG frakcija (1%) bolnika s PAPS je stimulira izločanje IL-6 pri HCAEC in HMVEC, serum bolnika s PAPS (1%) pa je stimuliral izločanje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC. Stimulacija je bila največja pri HCAEC. 3,5-krat izločanja kontrole ozadja. Po količini izločenega IL-6 sledijo HUVEC in nato HMVEC. Tudi serum krvodajalca je deloval stimulirajoče na izločanje IL-6, najmočneje pri HCAEC, sledijo HMVEC in HUVEC (slika 8).

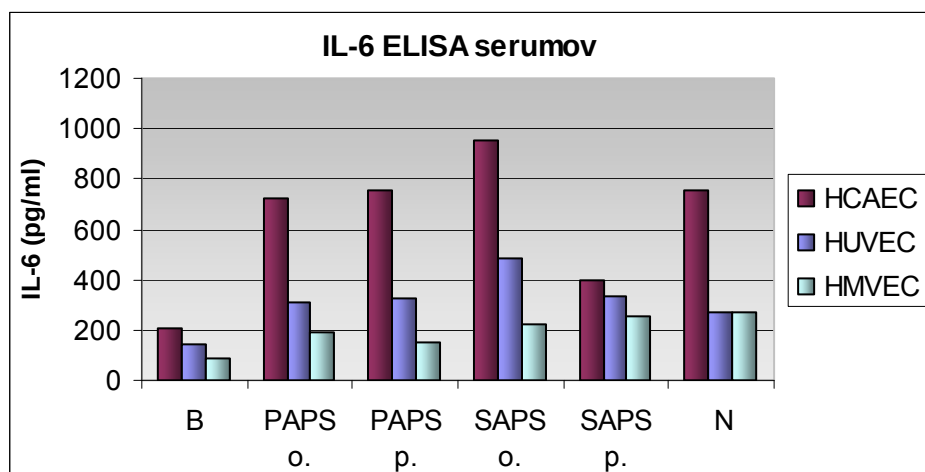


Slika 8: Vpliv imunoglobulinov na izločanje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC

IL-6 ELISA supernatantov; SAA 1000nM, Cof-21 16µg/ml, IgG 1%, serumi 1%; prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (*B* – kontrola ozadja, *N* – normala, *SAA* – serumski amiloid A, *IgG* – imunoglobulini G)

- **Primerjava vpliva serumov pediatričnih in odraslih bolnikov s PAPS in SAPS na izločanje IL-6**

Serumi bolnikov s PAPS, SAPS in krvodajalca so stimulirali izločaje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC (slika 9).



Slika 9: Primerjava vpliva serumov pediatričnih in odraslih bolnikov s PAPS in SAPS na izločanje IL-6

IL-6 ELISA supernatantov; serumi 1%, prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (*B* – kontrola ozadja, *PAPS* – serum bolnika s primarnim antifosfolipidnim sindromom, *SAPS* – serum bolnika s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom *o.* – odrasli, *p.* – pediatrični, *N* – normala)

Serum odraslega in serum pediatričnega bolnika s PAPS sta k izločanju IL-6 najmočnejše stimulirala HCAEC (3,6-krat kontrole ozadja), odziv HUVEC in HMVEC je bil manjši.

Pri bolnikih s SAPS, je bilo izločanje citokina IL-6 pri HCAEC 2,4-krat večje pod vplivom seruma odraslega kot pediatričnega bolnika. Pri HUVEC je bila ta razlika veliko manjša, pri HMVEC pa je bila razlika med vplivom seruma odraslega in pediatričnega bolnika minimalna.

Pri odraslih bolnikih je serum bolnika s SAPS močnejše stimuliral vse tri tipe endotelijskih celic (HCAEC, HUVEC in HMVEC) k izločanju IL-6, kot serum bolnika s PAPS. Stimulacija je bila največja pri HCAEC, sledijo HUVEC in nato HMVEC. Pri pediatričnih bolnikih je bila stimulacija HCAEC večja pri PAPS kot pri SAPS (slika 9). Serum pediatričnega bolnika s PAPS je najmočnejše stimuliral HCAEC, sledijo HUVEC in HMVEC. Serum pediatričnega bolnika s SAPS pa se je izkazal kot najmočnejši stimulator HMVEC, sledijo HUVEC in HCAEC (preglednica XI).

Preglednica XI: Primerjava vpliva serumov bolnikov z antifosfolipidnim sindromom (APS) na različne tipe endotelijskih celic kot faktor osnovnega izločanja

(PAPS – serum bolnika s primarnim antifosfolipidnim sindromom, SAPS – serum bolnika s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom, o. – odrasli, p. – pediatrični, N – normala)

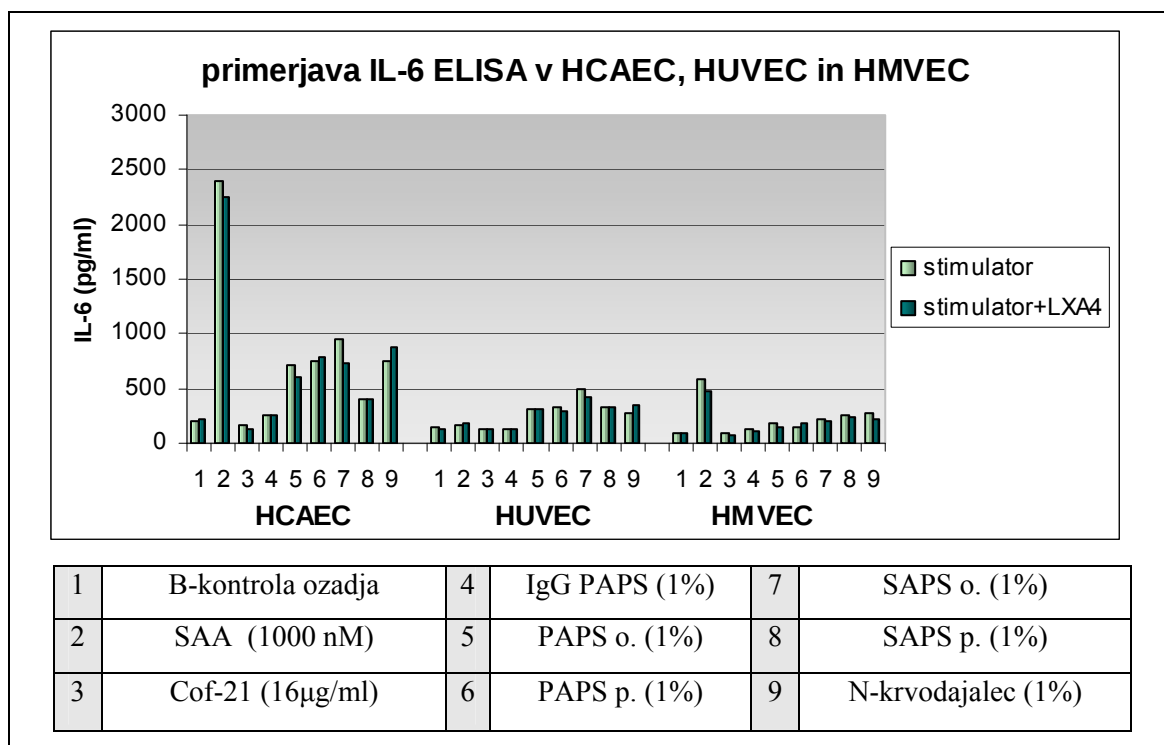
	HCAEC	HUVEC	HMVEC
PAPS o.	3,6	2,1	2,1
PAPS p.	3,7	2,2	1,7
SAPS o.	4,7	3,3	2,5
SAPS p.	1,9	2,3	2,8
N	3,7	1,8	3

• Primerjava vpliva SAA in imunoglobulinov na izločanje IL-6

Med različnimi tipi vaskularnih endotelijskih celic so se pokazale razlike v osnovnem izločanju IL-6 (kontrola ozadja) in razlike v odzivnosti na različne stimulatorje (slika10).

Različni stimulatorji so imeli na različne tipe celic različen vpliv. Izmed vseh treh tipov endotelijskih celic so izločale HCAEC daleč največ IL-6 tako pod vplivom SAA, kot tudi pod vplivom imunoglobulinov oz. serumov. Pri HUVEC in HMVEC so bili učinki SAA in imunoglobulinov ravno obratni. SAA je stimuliral izločanje IL-6 pri HMVEC, medtem ko je bila pri HUVEC stimulacija z SAA komaj zaznavna. V nasprotju z SAA pa so

uporabljeni serumi oz. imunoglobulini povzročili večje izločanje IL-6 pri HUVEC kot pri HMVEC (slika 10).

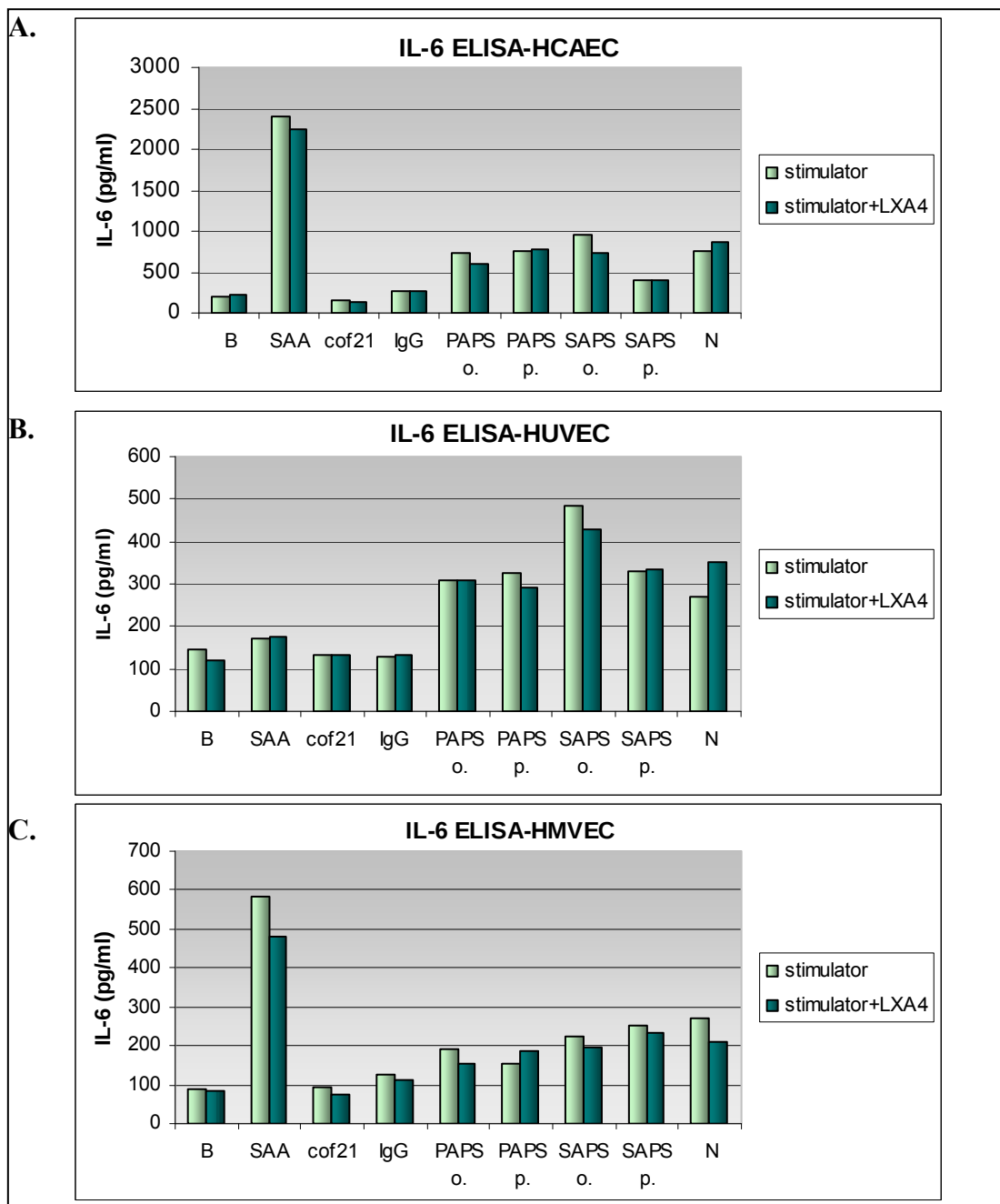


Slika 10: Primerjava vpliva SAA in imunoglobulinov, v odsotnosti in prisotnosti LXA₄, na izločanje IL-6 med različnimi tipi endotelijskih celic

IL-6 ELISA supernatantov; LXA₄ 100 nM; prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (*B* – kontrola ozadja, *SAA* – serumski amiloid *A*, *Cof-21* – monoklonska protitelesa proti β_2 -glikoproteinu *I*, *IgG* – frakcija imunoglobulina *G* bolnika z antifosfolipidnim sindromom, *PAPS* – serum bolnika s primarnim antifosfolipidnim sindromom, *SAPS* – serum bolnika s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom, *o.* – odrasli, *p.* – pediatrični *N* – normala, *IL-6* – interlevkin-6, *LXA₄* – lipoksin *A₄*)

• Vpliv LXA₄ v kombinaciji z imunoglobulini na izločanje IL-6

Inhibitorni učinki LXA₄ na izločanje IL-6 iz endotelijskih celic, stimuliranih z imunoglobulini so se izrazili predvsem na HCAEC in v manjši meri na HMVEC (slika 11). LXA₄ je inhibiral s serumom odraslega bolnika s PAPS in SAPS povzročeno izločanje IL-6 iz HCAEC in HMVEC. Pri HUVEC je prišlo do inhibicije le pri serumu bolnika s SAPS. V kombinaciji s serumom krvodajalca pa je LXA₄ deloval stimulatorno in povečal izločanje IL-6 pri HCAEC in HUVEC, medtem ko je imel pri HMVEC inhibitorni učinek (slika 11).



Slika 11: Vpliv SAA in imunoglobulinov v prisotnosti in odsotnosti LXA₄ na izločanje IL-6 pri HCAEC (A), HUVEC (B) in HMVEC (C)

IL-6 ELISA supernatantov; SAA 1000 nM, LXA₄ 100 nM, cof21 16 µg/ml, IgG 1%, serum 1%; prikazane vrednosti so povprečje dveh poskusov (*B* – kontrola ozadja, *SAA* – serumski amiloid A, *Cof-21* – monoklonska protitelesa proti β₂-glikoproteinu I, *IgG* – frakcija imunoglobulina G bolnika z antifosfolipidnim sindromom, *PAPS* – serum bolnika s primarnim antifosfolipidnim sindromom, *SAPS* – serum bolnika s sekundarnim antifosfolipidnim sindromom, *o.* – odrasli, *p.* – pediatrični, *N* – normala, *IL-6* – interlevkin-6, *LXA₄* – lipoksin A₄)

6. RAZPRAVA

Tromboze, ki so značilni klinični znak bolnikov z APS, so posledica različnih patogenih mehanizmov kot so zmanjšana fibrinoliza, vezava antifosfolipidnih protiteles na plazemske proteine, ki zavirajo strjevanje krvi (protein C, protein S in trombomodulin) (26), inhibicija aktivacije proteina C, prokoagulantni fenotip monocitov, aktivacija trombocitov in aktivacija endotelijskih celic (37, 38). Hipoteza dveh udarcev (two hit) pravi, da je za sproženje kaskade koagulacije potreben dodatni faktor (37). V naši študiji smo proučevali aktivacijo endotelijskih celic.

Prisotnost protiteles proti β_2 GPI vezanih na β_2 GPI na površini endotelijskih celic, le-te aktivira. Aktivacija endotelijskih celic se kaže v povečani ekspresiji adhezijskih molekul in posledično večjemu številu adhezirajočih levkocitov ter v povečani sintezi in izločanju vnetnih citokinov, ki aktivacijo celic še povečajo. To vodi v izražanje adhezivnega in vnetnega fenotipa endotelijskih celic, ki sta skupaj povezana s koagulantnim stanjem (37).

Aktivacija endotelijskih celic je bila dokazana v *in vitro* študijah na celičnih kulturah in tudi v *in vivo* študijah. V študiji Montel-Manzano in sodelavcev (39) so IgG bolnika z APS stimulirali adhezijo mišjih levkocitov na endotelijske celice. Da so rezultati *in vitro* študij reprezentativni za primerljive dogodke *in vivo* kaže tudi povišanje bioloških označevalcev aktivacije endotelijskih celic v periferni krvi bolnikov z APS (40, 41).

Tako protitelesa proti β_2 GPI aktivirajo endotelijske celice ter inducirajo celični fenotip, ki podpira trombotično stanje pri bolnikih z APS (37). Skupaj s trombotičnimi zapleti se pri bolnikih z APS pojavlja vse pogostejše tudi ateroskleroza (8, 37). Proces ateroskleroze in tromboze sta v številnih primerih prepletena. Avtoimunska aterogeneza pri bolnikih z APS naj bi bila povezana s prisotnostjo protiteles. Aktivacija endotelijskih celic pripelje lahko do patogenega mehanizma, ki pospeši potek ateroskleroze, ki se pojavlja s sindromom (37).

Povečano izločanje vnetnega citokina IL-6 iz endotelijskih celic pod vplivom serumov bolnikov z APS potrjuje pro-vnetno vlogo protiteles proti β_2 GPI. Le-to so dokazali že s študijami, v katerih so določali adhezijo monocitov na endotelijske celice in ekspresijo adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic.

Z našimi eksperimenti smo nameravali potrditi vpliv SAA na vnetne procese v ožilju in vnetno vlogo protiteles proti β_2 GPI. Vrednotili smo količino izločenega vnetnega citokina IL-6, ter učinke primerjali med različnimi tipi vaskularnih endotelijskih celic.

6.1. AKTIVACIJA VNETNIH ODZIVOV V ENDOTELIJSKIH CELICAH

Endotelijske celice nimajo le vloge razmejevanja krvi in tkiv, ampak so tudi pod vplivom različnih kemičnih mediatorjev prisotnih v krvi in tkivu ter aktivno sodelujejo v procesu vnetja. Endotelijske celice same producirajo različne citokine, kemokine, adhezijske molekule in rastne faktorje in imajo pomembno vlogo v vnetnem in imunskem odzivu. Pri vnetju izražajo faktorje kot so E-selektin, VCAM-1, ICAM-1, IL-6, interlevkin-8 (IL-8) in ciklooksigenaza-2, ter tako spodbujajo kemotakso in zadrževanje levkocitov na mestu vnetja. V preteklosti so različne raziskovalne skupine za aktivacijo vnetnih odzivov v endotelijskih celicah uporabljale TNF- α , interlevkin-1 β (IL-1 β) in lipopolisaharide (LPS). Vnetni odziv so vrednotili preko povečanega izražanja adhezijskih molekul VCAM-1, ICAM-1, E-selektina, vnetnega citokina IL-6 ter kemokina IL-8, ter preko vrednotenja adhezije mononuklearnih monocitov na endotelij.

Kuldo in sodelavci (42) so proučevali vpliv TNF- α in IL-1 β samih in v kombinaciji na ekspresijo VCAM-1, IL-8 in IL-6 pri HUVEC in potrdili stimulatorno delovanje. McDouall in sodelavci (43) so proučevali vpliv vnetnih citokinov TNF- α in IL-1 β na ekspresijo VCAM-1, E-selektina in ICAM-1 v humanih endotelijskih celicah korenine (human aortic root) aorte, HCAEC in srčne mikrovaskulature. Ugotovili so, da tako TNF- α kot IL-1 β , stimulirajo izražanje adhezijskih molekul v vseh treh tipih endotelijskih celic, pri čemer so med različnimi tipi celic opazili velike razlike v odzivnosti. LPS je stimuliral izločanje IL-6, IL-8 v HCAEC ter IL-6, IL-8 in adhezijskih molekul pri HUVEC (44, 45 46).

V študiji Briones in sodelavcev (47) so stimulirali HCAEC in HUVEC z TNF- α , interlevkinom-1 α (IL-1 α) ter primerjali sproščanje kemokinov, med njimi IL-8, transformirajočega rastnega faktorja- β 2 (TGF- β 2) itd. Ugotovili so, da HCAEC in HUVEC izražajo kemokine različno, kar bi lahko vplivalo na mestno specifično kopičenje podtipov levkocitov. Lakota in sodelavci (19) so leta 2007 proučevali izražanje IL-6, IL-8 in adhezijskih molekul pri HCAEC in HUVEC, stimuliranih z SAA. HCAEC in HUVEC so

se razlikovale v količini izločenih IL-6, IL-8 ter VCAM-1, ICAM-1 in E-selektina. Pri HUVEC je bil nivo izraženih adhezijskih molekul rahlo višji kot pri HCAEC, količina izločenih vnetnih citokinov in kemokinov pa je bila večja pri HCAEC. HCAEC so bolj dovzetne za A-SAA stimulirano izražanje vnetnih citokinov, kar naj bi vplivalo na večjo dovzetnost HCAEC za vnetje in aterogenezo.

V naši študiji smo primerjali vpliv SAA in serumov bolnikov z APS na izločanje IL-6 pri treh tipih vaskularnih endotelijskih celic: HCAEC, HUVEC in HMVEC. Ugotovili smo, da se celice z različno intenziteto odzovejo na stimulacijo, na kar vpliva tudi vrsta stimulatorja. Ne glede na uporabljen stimulator (SAA ali serum) so se najmočneje odzvale HCAEC, ki so že v osnovi izločale največ IL-6. Pri stimulaciji z SAA so bile med HUVEC in HMVEC bolj odzivne HMVEC, pri stimulaciji s serumi pa HUVEC. Razlike v odzivnosti med HUVEC in HCAEC potrjujejo rezultate študij Lakota in sodelavcev (19) in Briones in sodelavcev (47).

Zaključimo lahko, da so HCAEC, v primerjavi z HUVEC in HMVEC, bolj dovzetne za spremembe in patogene procese, povezane z njihovo aktivacijo. Razlike v odzivnosti se pojavljajo tudi znotraj istega tipa celic, v odvisnosti od dajalca, kar potrjuje rezultate študije Beck in sodelavcev (46), v kateri so se HUVEC različnih bolnikov različno odzvale na stimulacijo z LPS in TNF- α . Specifičnost odziva endotelijskih celic, vezano na funkcijo in lokacijo celic, potrjujejo tudi študije McDouall RM in sodelavcev (43) kateri poročajo, da se endotelijske celice v različnih predelih koronarnega drevesa razlikujejo v vzorcu osnovnega in s citokini-stimuliranega izražanja adhezijskih molekul.

6.1.1.Vpliv SAA na endotelijske celice

Vnetni učinki SAA so bili proučevani na različnih celičnih tipih: fibroblastih, nevtrofilnih levkocitih, monocitih in limfocitih T. Badalato in sodelavci (48, 49) poročajo o migraciji in adheziji humanih monocitov, PMN in limfocitov T pod vplivom SAA *in vitro*. Furlaneto in Campa (50, 51) poročata o stimulatornem delovanju SAA (100 μ g/ml) na izločanje TNF- α , IL-1 β in IL-8 iz nevtrofilnih levkocitov ter IL-8 iz monocitov. Na fibroblastih SAA stimulira sproščanje IL-8, sintezo matriks metaloproteinaze-3 (MMP-3) (52). O vplivu SAA na endotelijske celice je bilo izvedenih manj študij. Mullan in sodelavci (53) so proučevali vpliv A-SAA na izražanje adhezijskih molekul na HMVEC in adhezijo perifernih mononuklearnih celic na le-te. A-SAA je povečala izražanje VCAM-1 in ICAM-

1 (časovno in koncentracijsko-odvisno), enako učinkovito kot IL-1 β in TNF- α . A-SAA je promoviral adhezijo mononuklearnih celic periferne krvi na HMVEC (53).

V študiji Yang in sodelavcev (54) je SAA povečal produkcijo IL-6 in IL-8 pri HCAEC. Lakota in sodelavci (19) so proučevali koncentracijski vpliv SAA na izločanje IL-6 in izražanje adhezijskih molekul na HCAEC in HUVEC. Proteinski nivo VCAM-1 in ICAM-1 je bil pri obeh celičnih tipih primerljiv, z večjim odzivom HUVEC. SAA je stimuliral IL-6 izločanje in mRNA izražanje, z naraščajočo koncentracijo (do 2000 nM) se je količina izločenega IL-6 povečevala. Plato IL-6 je bil pri HCAEC dosežen pri 1000 nM (12 μ g/ml), pri HUVEC pa pri 500 nM (612 μ g/ml). HUVEC in HCAEC so se na SAA stimulacijo različno odzvale; HUVEC so bile manj odzivne od HACEC in so izločale manj IL-6. Pri višjih koncentracijah je bila razlika med obema tipoma celic večja (19). Na osnovi rezultatov te študije smo za naše študije izbrali 1000 nM SAA.

V naši študiji smo proučevali odzivnost treh tipov humanih endotelijskih celic; koronarnih arterijskih, umbilikalnih venskih in dermalnih mikrovaskularnih, na stimulacijo z SAA. SAA je stimuliral izločanje IL-6 na mRNA (10-krat kontrole izločanja) in proteinskem (do 4-krat kontrole izločanja) nivoju, kar je skladno z rezultati študije Lakota in sodelavcev (19). Različni tipi endotelijskih celic so se razlikovali v količini izločenega IL-6. Na stimulacijo so se najbolj odzvale HCAEC, sledijo HMVEC in nato HUVEC. Razlike v odzivnosti HCAEC in HUVEC lahko primerjamo z rezultati Lakota in sodelavcev (19). Razlike v odzivnosti HUVEC in HMVEC v naši študiji se razlikujejo od rezultatov M. Martinčič (55), kjer so bile HUVEC bolj odzivne od HMVEC. M. Martinčič je uporabljala enake pogoje (čas stimulacije, koncentracije SAA), vrednotila je mRNA ekspresijo IL-6, medtem, ko smo v naši študiji vrednotili količino izločenega IL-6. Razlika bi lahko bila posledica dejavnikov, ki vplivajo na vmesne stopnje med prepisom mRNA in sintezo oziroma izločanjem proteinov, ali pa tudi razlik v preciznosti metod ELISA in mRNA analize. mRNA analiza je semi-kvantitativna metoda, medtem ko je ELISA kvantitativna metoda. Najverjetneje pa razliko lahko pripišemo različni predispoziciji posameznikov, ki prispevajo celice v različne zbirke celic, na vnetne bolezni. O velikih razlikah v odzivnosti celic HUVEC različnih dajalcev na vnetno stimulacijo govorijo že Beck in sodelavci (46) v študiji, v kateri so proučevali vnetni potencial endotelijskih celic. Celice HUVEC so ločili na tiste, ki se močno odzovejo na vnetno stimulacijo in na celice, z nizkim vnetnim potencialom, kar je verjetno gensko pogojeno.

6.1.2. Vpliv LXA₄ na endotelijske celice

Lipoksini so eikozanoidi, ki nastajajo iz arahidonske kisline ob vnetju in poškodbi tkiva. Njihovo protivnetno delovanje je vezano na njihovo vezavo na dva različna receptorja, ALX in cysLT1. Mehanizem delovanja je pri obeh receptorjih različen. Na ALX, LXA₄ deluje agonistično, na cysLT1 receptorju, pa deluje kot kompetitiven antagonist in tako preprečuje vezavo in delovanje vnetnih eikzanoidov (13). O izražanju ALX na vaskularnih endotelijskih celicah ni poročil, izvedene pa so bile študije na cysLT1 receptorju na humanih vaskularnih endotelijskih celicah (56). Številne študije poročajo o učinku LXA₄ na krvne celice, ki sodelujejo pri vnetju. LXA₄ in njegovi analogi antagonizirajo delovanje nevtrofilnih levkocitov tako, da zavirajo njihovo migracijo na mesto vnetja (57, 58) in adhezijo (59). Inhibirajo TNF- α stimulirano tvorbo superoksinega aniona ter sproščanje IL-1 β (60). Pri monocitih lipoksin sicer aktivira kemotakso, ne pride pa do tvorbe superoksidnega aniona, ki je odgovoren za protivnetno delovanje (61).

O vplivu lipoksinov na endotelijske celice je manj podatkov. Nascimento in sodelavci (62) poročajo da analog z aspirinom sproženega lipoksina (ATL) (1-1000 nM) zavre tvorbo reaktivnih kisikovih spojin, stimulirano z različnimi reagenti na HUVEC in tako zavre vnetje. V študiji Andersson in sodelavcev (63) na HCAEC so LXA₄ in analogi zmanjšali LPS in TNF- α stimulirano adhezijo nevtrofilnih levkocitov na HCAEC. Učinek je bil dosežen preko vpliva lipoksinov na adhezijske molekule nevtrofilnih levkocitov in ne na endotelijskih celicah. Zmanjšanje LPS in TNF- α stimuliranega izražanje E-selektina in ICAM-1 na HCAEC v prisotnosti LXA₄ in analogov je bilo minimalno. V naši študiji smo prvič proučevali vpliv LXA₄ na izločanje IL-6 na endotelijskih celicah. Ugotovili smo, da se pri in nad 1 μ M LXA₄ oba tipa celic različno odzoveta na stimulacijo. Pri HUVEC se izločanje IL-6 poveča, pri HCAEC pa zmanjša. Do 100 nM ni razlik glede na osnovno izločanje. Rezultate lahko primerjamo z rezultati študije El Kebir in sodelavcev (64), kjer lipoksin ni imel vpliva na preživetje in apoptozo nestimuliranih nevtrofilnih levkocitov.

LXA₄ je lipid, zelo občutljiv na spremembe temperature, oksidira na zraku in razpade na svetlobi, zato se nahaja v obliki raztopine 100% etanola. Le-ta bi lahko stimuliral vnetje. Čeprav Andersson in sodelavci (63) poročajo da 0,1% etanol ni imel učinka na eksperimente, smo preverili vpliv etanola v uporabljenih koncentracijah na HUVEC in HCAEC. Pri 0,7%, ki ustreza 100 nM raztopine LXA₄, etanol ni vplival na izločanje IL-6, medtem ko je bila pri 70% etanolu prisotna modulacija izločanja; pri HCAEC je deloval kot inhibitor izločanja IL-6, pri HUVEC pa je izločanje IL-6 stimuliral. O različnem vplivu

različnih koncentracij etanola na molekularne poti v endotelijskih celicah so poročali že Liu in sodelavci (65). Nizke koncentracije etanola (2-20 mM kar ustreza 9%-90%) so aktivirale anti-apoptotične poti v endotelijskih celicah, medtem ko so visoke koncentracije etanola (50-100 mM kar ustreza 0,227%-0,455%) aktivirale pro-apoptotično pot (65).

Modulatorno delovanje etanola pri 70% koncentraciji na HCAEC potrjuje tudi šibka lisa na agaroznem gelu. Intenzivnost lise je sicer prešibka, da bi izvedli normalizacijo gelskih nanosov s pomočjo β -aktina kot pozitivno kontrolo konstitutivnega izražanja. Vseeno pa lahko rezultate mRNA analize kritično opredelimo na podlagi primerjave vizuelne ocene intenzitete lis β -aktina in IL-6 pod vplivom LXA₄ oziroma etanola. LXA₄ pri uporabljenih koncentracijah (1, 10, 100nM, 1, 10 μ M) ne stimulira ekspresije IL-6 in s tem vnetja. Šibka lisa na agaroznem gelu na mestu nanosa 70% koncentracije etanola pa nakazuje pro-inflamatorno delovanje etanola pri teh koncentracijah. Sicer je pri β -aktinu 100 nM lisa najbolj intenzivna, vendar če primerjamo lisi kontrole ozadja in β -aktina 10 μ M ter sovpadajoči lisi pri stimulaciji z etanolom, lahko brez zadržkov trdimo o učinku najvišje koncentracije etanola na HCAEC. Ker lise pri 70% koncentraciji etanolne raztopine LXA₄ ni, lahko predvidevamo, da LXA₄ v etanolni raztopini zavira z etanolom stimulirano ekspresijo mRNA za IL-6. Tu je potrebna večja kritičnost, saj je tudi lisa β -aktina pri stimulaciji z LXA₄ šibkejša kot pri stimulaciji z etanolom.

Razlike v učinku 70% etanola na izražanje IL-6 na mRNA in proteinskem nivoju pri HCAEC so najverjetneje posledica vmesnih stopenj med transkripcijo in izločanjem IL-6.

6.1.3. Vpliv SAA v prisotnosti LXA₄ na endotelijske celice

LXA₄ in SAA sta pomembna mediatorja vnetja z nasprotujočimi si učinki. Vezava obeh ligandov na isti ALX vodi v različne regulatorne poti. Liganda se na receptor vežeta z različnimi afinitetami. ALX na endotelijskih celicah še ni bil kloniran. Proučevali so učinek vezave LXA₄ in SAA na ALX pri fibroblastih in nevtrofilnih levkocitih. V študijah na nevtrofilnih levkocitih so proučevali vpliv SAA in LXA₄ na apoptozo nevtrofilnih levkocitov, ki je ključna za optimalno izražanje in resolucijo (umiritev) vnetja. Z aspirinom sproženi lipoksin (ATL) in njegov analog sta izničila z SAA posredovan antiapoptotični signal, medtem ko sam LXA₄ ni imel učinka na preživetje in apoptozo nevtrofilnih levkocitov (64). O nasprotujočih si učinkih LXA₄ in SAA poročajo tudi Sodin-Šemrl in sodelavci (52). SAA stimulira produkcijo IL-8 in matriks metaloproteinaze-3, medtem ko LXA₄ preko vezave na isti ALX inhibira IL-1 β stimulirano produkcijo IL-8 in matriks

metaloproteinaze-3. V naši študiji smo prvič proučevali vpliv LXA₄ na SAA stimulirane endotelijske celice. Vrednotili smo količino izločenega vnetnega citokina IL-6. V študiji Wu in sodelavcev (66) je LXA₄ deloval inhibitorno na izločanje IL-6 pri TNF- α stimuliranih glomerularnih mezangijskih celicah.

V naši študiji je koncentracijski vpliv LXA₄ pokazal, da LXA₄ pri in nad 100 nM deluje inhibitorno na s SAA-stimulirano izločanje IL-6, pri čemer je bila moč inhibicije največja pri 100 nM. Rezultati so primerljivi s študijo Andersson in sodelavcev (63), kjer so preučevali koncentracijski vpliv (0, 1, 10, 100, 1000 nM) LXA₄ in njegovega analoga na izločanje IL-6 pri monocitih. LXA₄ je stimuliral izločanje IL-6, pri čemer je stimulacija pri 100 nM upadla skoraj na osnovno raven izločanja, pri 1000 nM pa se je spet rahlo dvignila (63). Na osnovi teh dveh študij lahko postavimo hipotezo, da dvig koncentracije LXA₄ iz fiziološke (1 nM) na 100 nM zmanjša produkcijo IL-6 v telesu preko delovanja na različne vrste celic. V nasprotju z 100 nM, pa je LXA₄ v 10 nM koncentraciji, izmed vseh uporabljenih koncentracij, v študiji Andersson in sodelavcev (63) najmočnejše stimuliral izločanje IL-6 pri monocitih. V naši študiji je na proteinskem nivoju na endotelijskih celicah LXA₄ 10 nM v kombinaciji z 1000 nM SAA deloval aditivno. Zaključimo lahko, da LXA₄ 10 nM poveča izločanje IL-6 v testiranih celicah.

Stimulatorno oz. aditivno delovanje LXA₄ na izločanje IL-6, bi lahko bila posledica razmerij SAA (1000 nM) in LXA₄ (10 nM). To potrjuje tudi eksperiment na HUVEC, kjer je pri kombinaciji SAA 200 nM in LXA₄ 1nM prišlo do aditivnega delovanja, ne pa tudi pri kombinaciji SAA 20 nM in LXA₄ 1nM (podatki niso prikazani).

Inhibitorno delovanje LXA₄ 100 nM na izločanje IL-6 na HUVEC potrjuje tudi analiza mRNA. Pri izvedbi analize mRNA smo imeli nekaj tehničnih problemov. Pri nanosu 8 pri β -aktinu je prišlo do izgube lise. Ker je lisa pri LXA₄ prisotna, ni bilo izgube RNA med izolacijo, ampak je do napake prišlo pri RT, PCR ali pri gelski elektroforezi. Za izračun razmerij intenzitete ekspresije mRNA pri različnih koncentracijah LXA₄ smo uporabili povprečje intenzitet lis β -aktina.

Inhibicija s SAA stimuliranega izločanja IL-6 pri endotelijskih celicah z LXA₄ je majhna. Količina izločenega IL-6 je kljub inhibiciji visoko nad nivojem kontrole ozadja. To navaja na domnevo, da je ALX na vaskularnih endotelijskih celicah nizko izražen. Glede na to, da ALX na vaskularnih endotelijskih celicah do sedaj še ni bil kloniran, je možno, da so učinki SAA posredovani preko drugih receptorjev, in da je za večji vpliv LXA₄ na endotelijske celice verjetno potreben tudi dodaten kofaktor ali dodatna stimulacija.

Glede na to, da raztopina LXA₄ 100 nM, kot tudi etanol, ki ustreza tej koncentraciji, nista imela vpliva na HCAEC in HUVEC, ter da je ista koncentracija LXA₄ inhibirala s SAA stimulirano izločanje IL-6 pri HUVEC, ki je manj odziven tip celic (19), smo za nadaljne eksperimente uporabili koncentracijo 100 nM.

Pri proučevanju vpliva LXA₄ na različne tipe endotelijskih celic se je pokazalo rahlo inhibitorno delovanje na s SAA stimulirano izločanje IL-6 pri HCAEC in HUVEC. HUVEC so, za razliko od predhodnega poskusa, ostale neodzivne. Razlika v odzivnosti HUVEC, bi lahko bila posledica pasaže p2 vs p5, ali pa genetske predispozicije, saj smo poskusa izvajali na različnih zbirkah celic.

6.2. VPLIV IMUNOGLOBULINOV NA ENDOTELIJSKE CELICE IN MODULACIJA NJIHOVIH ODZIVOV Z LXA₄

V naši študiji smo proučevali vpliv protiteles proti β_2 GPI na vnetne procese, ter učinke primerjali med tremi različnimi tipi vaskularnih endotelijskih celic. Vrednotili smo količino izločenega vnetnega citokina IL-6. Celice smo stimulirali z monoklonskimi protitelesi usmerjenimi proti četrti domeni β_2 GPI, s čisto IgG frakcijo bolnika z APS ter s serumom bolnikov z PAPS in SAPS. Za normalo smo uporabili serum krvodajalca, kot pozitivno kontrolo smo uporabili SAA.

6.2.1 Vpliv serumov na endotelijske celice

Študij, v katerih so za proučevanje vpliva komponent seruma na patogene procese v endotelijskih celicah uporabili serume, je malo. Hoare in sodelavci (67) so proučevali ali komponente serumov bolnikov s srčnim popuščanjem aktivirajo endotelijske celice in vnetne odzive pri srčnem popuščanju. Dokazali so, da serum bolnikov s srčnim popuščanjem aktivira humane pulmonalne arterijske endotelijske celice, in ima tako vnetni potencial. V študiji Ahmed in sodelavcev (68) so uporabili serume bolnikov s sklerodermo in proučevali vpliv protiteles na humane dermalne endotelijske celice. V naši študiji smo prvič proučevali vpliv serumov bolnikov z APS na izločanje vnetnega citokina IL-6 pri treh tipih vaskularnih endotelijskih celic. Primerjali smo odzive glede na diagnozo bolnikov.

Celice smo stimulirali z 1% serumom. Optimalno gojišče za rast celic HUVEC je gojišče z 1% FBS, medtem ko HCAEC in HMVEC gojimo v gojišču z 2,5 % FBS (priporočila Cambrex Belgium). Študije kažejo, da 72-urna inkubacija HUVEC z 20 % serumom inducira apoptozo celic, serum bolnikov z akutnim koronarnim sindromom pa hitrost apoptoze značilno poveča (69). Z namenom, da bi bile celice pri stimulaciji čim manj podvržene stresom in da bi odzive različnih tipov celic medsebojno čim lažje primerjali, smo vse tipe celic stimulirali z 1% serumom.

Znano je, da endotoksin (LPS) lahko inducira aktivacijo endotelijskih celic in tako poveča produkcijo citokinov in ekspresijo adhezijskih molekul. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, smo vzorce seruma in IgG frakcije, izolirane iz seruma, predhodno testirali na prisotnost endotoksina. Poleg odsotnosti endotoksina smo v uporabljenih serumih in IgG frakciji, z metodo ELISA preverili tudi prisotnost IL-6, ki bi lahko dal lažno pozitivne rezultate. Sodin-Šemrl in sodelavci (8) namreč poročajo o povišanih vrednostih SAA, IL-6 in C-reaktivnega proteina v serumu bolnikov s SAPS in SLE+aPL, ne pa tudi pri bolnikih s PAPS in krvodajalcih. V naši študiji so bile vrednosti IL-6 v uporabljenih serumih, razen pri serumu odraslega bolnika s PAPS, rahlo nad prazno vrednostjo. V serumu odraslega bolnika s SAPS so bile vrednosti IL-6 nekoliko višje, v primerjavi z ostalimi bolniki, vendar bistveno nižje od vrednosti v supernatantu zabeležene po stimulaciji celic. Zato o lažno pozitivnem učinku IL-6 v serumu ne moremo govoriti.

Serume bolnikov smo izbrali naključno. Gre za bolnike z APS (primarnim ali sekundarnim). Serumi se medsebojno razlikujejo v količini IgG aCL, protiteles proti β_2 GPI, količini IL-6 in aktivnosti LA. Med serumi bolnikov s PAPS in SAPS ni odstopanj, ki bi razlikovale PAPS in SAPS na klinični ravni.

O vplivu serumov bolnikov z APS na vnetne procese je malo poročil. Večina študij je bila izvedena z uporabo IgG frakcij, izoliranih iz serumov bolnikov z APS. V naši študiji so uporabljeni serumi stimulirali izločanje IL-6 v primerjavi s kontrolo ozadja. Kar lahko primerjamo z rezultati študije Vega-Ostertag in sodelavcev (70) pa tudi Simantov in sodelavcev (71), kjer poročajo, da so IgG bolnikov z APS stimulirali izločanje IL-6 in IL-8 oz. izražanje adhezijskih molekul na HUVEC. Serumi bolnikov z APS stimulirajo aktivacijo endotelijskih celic in se tako vpletajo v mehanizem trombotičnih zapletov.

Simantov in sodelavci (71) poročajo, da v stimulaciji adhezije z IgG bolnikov z APS ter IgG bolnikov z APS+SLE ni bilo značilnih razlik. O težkem ločevanju primarnega in sekundarnega APS (glede na genetske dejavnike, potek bolezni, patogenezo, prognozo,

stimulatorje) poroča tudi Harris in sodelavci (72). V študiji Hanly in sodelavcev (73) so se pokazale velike razlike v vezavi IgG različnih bolnikov z APS in SLE, vendar med bolniki s PAPS in SLE ni mogoče potegniti tipičnih razlik v gostoti vezave IgG. V naši študiji med serumi bolnikov s PAPS ni bilo bistvenih razlik v vplivu na izločanje IL-6. Stimulacija izločanja IL-6 s serumom odraslega bolnika SAPS je bila, v primerjavi s serumi bolnikov s PAPS, višja pri vseh tipih endotelijskih celic. Pri pediatričnem bolniku s SAPS pa je bila količina IL-6 pri HCAEC, v primerjavi z ostalimi serumi, bistveno nižja. Ker gre za pilotne študije, bi težko govorili o generaliziranem pojavu, čeprav v člankih lahko zasledimo hipoteze o različnih patogenih mehanizmih aktivacije pri pediatričnih in odraslih bolnikih z avtoimunskimi boleznimi (74, 75, 76). Razlog manjše stimulacije seruma pediatričnega bolnika s SAPS na HCAEC, bi lahko bil tudi heterogenost vpliva aPL na endotelijske celice o kateri so poročali že Pierangeli in sodelavci (38). Ti so v svoji študiji dokazali, da IgG aCL, protiteles proti β_2 GPI in LA pozitivnih bolnikov z različnimi manifestacijami APS, aktivirajo endotelijske celice z različno intenziteto, kar kaže na heterogenost funkcije aPL (38). Nadaljnje študije bi šle v smer večjega števila različnih vzorcev serumov pediatričnih in odraslih bolnikov s APS.

Normala se ni razlikovala od ostalih serumov v stimulaciji izločanja IL-6. Podobno kot v študiji Hanly in sodelavcev (72) je tudi naša normala izzvala odziv primerljiv s serumi bolnikov z APS. Je pa v naši študiji stimulacija s serumi bila prisotna, v navedeni študiji (72) pa ne. Stimulirajoči učinek seruma krvodajalca na izločanje IL-6 pri HCAEC, HUVEC in HMVEC, lahko kaže na morebitni začetni stadij še ne diagnosticirane vnetne bolezni. Zato bi morali v nadaljevalnih študijah vzeti večje število serumov različnih krvodajalcev.

Primerjava vpliva serumov na različne tipe vaskularnih endotelijskih celic je pokazala, da vsi serumi, z izjemo seruma pediatričnega bolnika s PAPS, k izločanju IL-6 najbolj stimulirajo HCAEC, sledijo HUVEC in nato HMVEC. Rezultati se skladajo z dejstvom, da se tromboze pri bolnikih z APS pojavljajo tako v arterijah in venah, kot tudi v mikrovaskulaturi (22, 24)

6.2.2. Vpliv antifosfolipidnih protiteles na endotelijske celice

Številne študije poročajo o vplivu antifosfolipidnih protiteles na vnetne procese v endotelijskih celicah. Študije so bile izvedene pretežno na HUVEC z uporabo IgG bolnikov z APS. Chen in sodelavci (77) poročajo o povečani ekspresiji negativno nabitih

fosfolipidov ter povečanjem izražanju ICAM-1 na celični površini pod vplivom IgG bolnikov z APS (1 g/l, 6ur). IgG bolnikov z APS povečajo tudi ekspresijo VCAM-1 in E-selektina ter vnetnih citokinov IL-6 in IL-8 (70, 78, 79). Tudi Simantov in sodelavci (71) so dokazali stimulacijo HUVEC z IgG bolnikov z APS (100 mg/l, 4ure). Inkubacija endotelijskih celic z IgG bolnikov z APS je povečala ekspresijo adhezijskih molekul; E-selektina, ICAM-1 in VCAM-1. Adhezija monocitov na HUVEC, stimuliranih z IgG bolnikov, je bila značilno večja v primerjavi z adhezijo monocitov pri HUVEC, inkubiranih z IgG krvodajalcev. Poročajo tudi, da je za vezavo antikardiolipinskih protiteles na anionske fosfolipide nujno potreben plazemski protein β_2 GPI. Čista frakcija IgG bolnikov z APS v gojišču brez seruma ni stimulirala adhezije monocitov, dodatek β_2 GPI, ki je kofaktor za reaktivnost antikardiolipinskih protiteles, je induciral adhezijo monocitov. Tej študiji nasprotujejo rezultati študije Hanly in sodelavcev (72) prisotnost β_2 GPI ni spremenila avidnosti IgG bolnikov z SLE in PAPS na HUVEC. Tudi predhodna aktivacija celic s TNF- α ni doprinesla k povečani vezavi IgG v prisotnosti in odsotnosti β_2 GPI. Da so protitelesa proti β_2 GPI, tista komponenta IgG frakcij bolnikov z APS, ki stimulirajo endotelijske celice potrjujejo študije, v katerih so za stimulacijo uporabili izolirana protitelesa proti β_2 GPI in/ali monoklonska protitelesa proti β_2 GPI. Meroni in sodelavci (80) so proučevali vpliv protiteles proti β_2 GPI na vnetne procese v endotelijskih celicah in ugotovili, da vezava protiteles proti β_2 GPI inducira NF- κ B translokacijo, kar vodi v vnetni fenotip endotelijskih celic primerljiv fenotipu, ki ga inducirajo mikrobnimi produkti (LPS) in citokini. V študiji Hamid in sodelavci (81) so protitelesa proti β_2 GPI bolnikov s PAPS stimulirala ekspresijo številnih genov pri HUVEC. Med njimi gene za celične receptorje in adhezijske molekule, gene za citokine in kemokine, koagulacijske gene, anti- in apoptotične gene, transkripcijske faktorje, gene, ki kodirajo proteine, vključene v metabolizem, signaliziranje itd. Gharavi in sodelavci (82) poročajo, da monoklonska protitelesa usmerjena proti β_2 GPI (4-urna inkubacija) povečajo ekspresijo E-selektina, ICAM-1 in VCAM-1 na HUVEC (podobno kot LPS).

V naši študiji smo uporabili IgG frakcijo (100 mg/l), izolirano iz seruma bolnika s PAPS ter monoklonska protitelesa usmerjena proti četrti domeni β_2 GPI (Cof-21). Prvič smo preučevali vpliv omenjenih stimulatorjev na izločanje IL-6 pri treh tipih endotelijskih celic; HUVEC, HCAEC in HMVEC. HCAEC in HMVEC so se na stimulacijo z IgG bolnika z APS odzvale s povečanim izločanjem IL-6. Pri HUVEC ni bilo odziva. Uporabljena monoklonska protitelesa v danih pogojih (gojišče brez seruma, 24 urna

inkubacija) niso stimulirala izločanja IL-6 pri nobenem tipu endotelijskih celic. Rezultati nasprotujejo rezultatom študije Vega-Ostertag in sodelavcev (70) v kateri so IgG bolnikov z APS (200 mg/l) stimulirali ekspresijo vnetnih citokinov IL-6 in IL-8 na HUVEC. Vzrok bi lahko bil v odsotnosti eksogenega β_2 GPI. Vega-Ostertag in sodelavci (71) so v času stimulacije (4 ure) uporabili gojišče z 1% FBS, medtem ko smo v naši študiji (24 urna-stimulacija) uporabili gojišče brez FBS, ki bi lahko bil vir β_2 GPI. To hipotezo potrjujejo tudi Simantov in sodelavci (71) ki poročajo, da vezava protiteles proti β_2 GPI po 5-urni kultivaciji v gojišču brez seruma izgine in se povrne po dodatku β_2 GPI. Tudi neodzivnost celic na stimulacijo s Cof-21 bi lahko bila posledica odsotnosti eksogenega β_2 GPI, ali pa je za delovanje Cof-21 potrebna dodatna stimulacija oz. prisotnost kofaktorja. Naš naslednji korak bi lahko sedaj vključeval koncentracijsko povišanje antigena β_2 GPI ob prisotnosti protitelesa, kar bi omogočilo njuno vezavo in signaliziranje znotraj celic.

Nekateri avtorji pa poročajo, da je vezava protiteles proti β_2 GPI na endotelijske celice posredovana preko β_2 GPI sintetiziranega v endotelijskih celicah. Caronti in sodelavci (83) so v študiji dokazali, da HUVEC izražajo β_2 GPI mRNA neodvisno od prisotnosti seruma v gojišču. Količina mRNA je bila v primeru 3-dnevne inkubacije v gojišču brez seruma in v gojišču s serumom podobna. Dokazali so tudi imunoreaktivnost endotelijskih celic na monoklonska protitelesa proti β_2 GPI (v citoplazmi in na membrani), kultiviranih 3 dni v gojišču s FCS in gojišču brez FCS, kar nakazuje endogeno sintezo β_2 GPI, ki se iz citoplazme transportira na celično površino (83).

Minimalen odziv HCAEC in HMVEC na IgG bolnika s PAPS bi lahko bil posledica močnejše ekspresije β_2 GPI na površini HCAEC in HMVEC v primerjavi z HUVEC, ki so bile neodzivne. O manjši ekspresiji β_2 GPI pri HUVEC v primerjavi z HMVEC so poročali že Meroni in sodelavci (37). O ekspresiji HCAEC pa ni poročil. Za potrditev te hipoteze bi morali določiti stopnjo endogene sinteze β_2 GPI pri HCAEC v primerjavi z HMVEC in HUVEC (v času 26 ur in gojišču brez FBS).

Neodzivnost vaskularnih endotelijskih celic na stimulacijo z monoklonskimi protitelesi proti β_2 GPI in nizka odzivnost na IgG frakcijo bolnika s PAPS, v primerjavi z odzivom na serum istega bolnika kaže, da ima sinteza β_2 GPI v endotelijskih celicah minimalen vpliv na s protitelesi proti β_2 GPI posredovano stimulacijo.

Ker monoklonska protitelesa, usmerjena proti β_2 GPI, niso stimulirala izločanja IL-6 niti pri HCAEC, bi lahko bila stimulacija HCAEC in HMVEC z IgG bolnika z APS posledica prisotnosti tudi drugih protiteles razreda G, katerih delovanje ni nujno vezano na prisotnost

β_2 GPI. Pri HUVEC učinki ostalih protiteles v uporabljeni koncentraciji niso vidni zaradi manjše odzivnosti tega tipa endotelijskih celic. Tretja hipoteza je, da niso protitelesa tista, ki stimulirajo ekspresijo IL-6, ampak druge komponente seruma, na primer albumini. To potrjuje tudi stimulatorni učinek seruma krvodajalca in dejstvo, da je serum bolnika s PAPS stimuliral izločanje IL-6 iz HCAEC 9-krat močnejše kot IgG istega bolnika. Poleg tega je bila koncentracija IgG v serumu manjša. V nadaljevanju študije bi lahko preverili vpliv albuminov na endotelijske celice.

6.2.3. Modulacija odzivov z LXA₄

O vplivu LXA₄ na s serumi oz. aPL stimulirane endotelijske celice ni poročil. V naši študiji smo prvič proučevali vpliv imunoglobulinov z LXA₄ na tri tipe endotelijskih celic. Inhibitorni učinek LXA₄ na izločanje IL-6, stimulirano s serumi bolnikov z APS, je bil minimalen. LXA₄ se v naši študiji ni izkazal kot potencialni inhibitor vnetnih procesov v endotelijskih celicah, stimuliranih z imunoglobulini.

V naši študiji smo prvič proučevali vpliv SAA in serumov bolnikov z APS na teh tipih endotelijskih celic. Primerjali smo vplive serumov pediatričnih in odraslih bolnikov, ter vplive serumov bolnikov z primarnim in sekundarnim APS. Prvič smo tudi proučevali vpliv lipidnega vnetnega mediatorja LXA₄ na endotelijske celice. Naše študije so bile pilotne narave in so vključevale majhno število bolnikov, vendar je bila njihova moč v tem, da so bili eksperimenti izvedeni v ponovitvi in rezultati podani kot povprečje.

Potrdili smo vnetne učinke SAA in serumov bolnikov z APS na endotelijskih celicah, medtem ko se LXA₄ ni izkazal kot močan inhibitor vnetnih procesov izzvanih z omenjenimi stimulatorji. Potrdili smo tudi razlike v odzivnosti različnih tipov endotelijskih celic.

7. SKLEPI

V okviru proučevanja vpliva SAA in serumov bolnikov z APS na gojene endotelijske celice smo ugotovili naslednje:

1. SAA je stimuliral izločanje vnetnega citokina IL-6. Stimulacija je bila najmočnejša pri HCAEC, in sicer približno 5-krat višja v primerjavi z HMVEC in HUVEC;
2. pod vplivom serumov bolnikov z APS je bila koncentracija izločenega IL-6 pri HCAEC 2-krat višja, kot pri HUVEC in HMVEC;
3. LXA₄ je rahlo inhibiral izločanje IL-6 pri HCAEC in HMVEC, ki je bilo stimulirano z SAA- in/ali s serumi odraslih bolnikov z APS;
4. med serumi odraslih in pediatričnih bolnikov z APS ni bilo značilnih razlik v stimulaciji izločanja IL-6. HCAEC so izločale pod vplivom seruma pediatričnega bolnika s SAPS bistveno manj IL-6, kot pod vplivom ostalih uporabljenih serumov.

Močna odzivnost HCAEC, v primerjavi s HUVEC in HMVEC, na uporabljene stimulatorje nakazuje večjo dovzetnost endotelijskih celic iz arterij na patogene procese z vnetjem.

8. LITERATURA

1. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 327-352
2. Bresjanac M: **Izbrana poglavja iz patološke fiziologije**, 9. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2003: 45-54
3. Uhlar CM, Whitehead AS. **Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant**. Eur J Biochem. 1999;265(2):501-523.
4. Jovanović DB.: **Clinical importance of determination of serum amyloid A**. Srp Arh Celok Lek. 2004;132 (7-8):267-271
5. Jensen LE, Whitehead AS. **Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response**. Biochem J. 1998, 15;334 (Pt 3):489-503.
6. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. **Lipoprotein -associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?** Journal of Lipid Research 2005;46: 389-403
7. Meek RL, Urieli-Shoval S, Benditt EP. **Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(8):3186-3190.
8. Sodin-Šemrl S, Žigon P, Čučnik S, Kveder T, Blinc A, Tomšič M, Rozman B. **Serum amyloid A in autoimmune thrombosis**. Autoimmun Rev. 2006;6(1):21-27.
9. Bresjanac M: **Izbrana poglavja iz patološke fiziologije**, 9. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2003: 235-249
10. Hirano T, Taga T, Matsuda T, Hibi M, Suematsu S, Tang B, Murakami M, Kishimoto T.: **Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis**. Int J Cell Cloning. 1990;8 Suppl 1:155-66; discussion 166-7.
11. Nishimoto N, Kishimoto T. **Interleukin 6: from bench to bedside**. Nat Clin Pract Rheumatol. 2006;2(11):619-626.
12. Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA. **Markers of inflammation and coronary artery disease**. Med Sci Monit. 2002;8(1):RA5-12.

13. McMahon B, Godson C. **Lipoxins: endogenous regulators of inflammation.** Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Feb;286(2):F189-201.
14. Parkinson JF. **Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation.** Inflamm Allergy Drug Targets. 2006;5(2):91-106.
15. Ruda Pleskovič, Raja Gošnak Dahmane, Aleksandra Mulinović Živin: **Histologija**, Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo v LJ, 2006, 4:31-32
16. Slovenski Medicinski e-Slovar, 2002, Lek d.d. in Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani
17. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM.: **Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders.** Blood. 1998;91(10):3527-3561
18. Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Haskard DO. **Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation.** Am J Physiol. 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1233-1240.
19. K. Lakota, K. Mrak-Poljšak, B. Rozman, T. Kveder, M. Tomšič and S. Sodin-Šemrl. **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):73-81
20. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 283-303
21. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 47-65
22. Ortel TL. **Thrombosis and the antiphospholipid syndrome.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005;462-468.
23. Triplett DA. **Antiphospholipid antibodies.** Clin Adv Hematol Oncol. 2003 Dec;1(12):726-730.
24. S. Čučnik, B. Rozman, B. Božič. **Pomen protiteles proti β_2 -glikoproteinu I,** Farm Vestn 2004;55: 207-214
25. Kamat AV, D'Cruz DP, Hunt BJ. **Managing antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in children.** Haematologica. 2006;91(12):1674-1680.
26. Keswani SC, Chauhan N. **Antiphospholipid syndrome.** J R Soc Med. 2002;95(7):336-342.

27. M. Kos-Golja, S. Praprotnik. Revmatološki priročnik za družinskega zdravnika. Tretja, dopolnjena izdaja, 2008
28. de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. **Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change.** Blood. 2006;107(5):1916-1924.
29. de Groot PG, Derksen RH. **Pathophysiology of the antiphospholipid antibodies.** Neth J Med. 2004;62(8):267-272.
30. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 66-74
31. Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, Ichikawa K, Koike T, Suzuki K. **Anti-beta2-glycoprotein I (beta2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the beta2GPI binding to phospholipids.** J Clin Invest. 1997;99(9):2260-2268.
32. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 112, 113
33. Human IL-6, Protocol Booklet, Biosource, Belgija. 2006;5(2):91-106.
34. RNAgents Total RNA Isolation Systems, Technical Bulletin, Promega, ZDA, 2002
35. Reverse Transcription System, Tehnical Bulletin, Promega, ZDA, 2002
36. Sambrook, Fritsch. **Maniatis Molecular cloning: a Laboratory Manual**, second edition, 1989, by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
37. PL Meroni, E Raschi, C Testoni. **Endothelium as a target for anti-phospholipid antibodies and for therapeutical intervention.** Autoimmunity. Reviews 2002;1:55-60
38. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. **Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo.** Circulation. 1999;99(15):1997-2002.
39. Montiel-Manzano G, Romay-Penabad Z, Papalardo de Martínez E, Meillon-García LA, García-Latorre E, Reyes-Maldonado E, Pierangeli SS. **In vivo effects of an inhibitor of nuclear factor-kappa B on thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies.** Ann N Y Acad Sci. 2007;1108:540-553.
40. Kaplanski G, Cacoub P, Farnarier C, Marin V, Grégoire R, Gatel A, Durand JM, Harlé JR, Bongrand P, Piette JC. **Increased soluble vascular cell adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus**

- erythematosus-related antiphospholipid syndrome: correlations with the severity of thrombosis.** *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):55-64.
41. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. **In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant.** *J Clin Invest.* 1999;104(1): 93-102
 42. Kuldo JM, Westra J, Asgeirsdóttir SA, Kok RJ, Oosterhuis K, Rots MG, Schouten JP, Limburg PC, Molema G. **Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro.** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(5):C1229-1239.
 43. McDouall RM, Farrar MW, Khan S, Yacoub MH, Allen SP. **Unique sensitivities to cytokine regulated expression of adhesion molecules in human heart-derived endothelial cells.** *Endothelium.* 2001;8(1):25-40.
 44. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. **TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS.** *Cardiovasc Res.* 2002;56(1):126-134
 45. Cheng J, Yuan J, Zheng J. **[The effect of Lipopolysaccharide (LPS) on morphology and function of human umbilical endothelial cells (HUVECs)].** 200;17(3):155-158.
 46. Beck GC, Rafat N, Brinkkoetter P, Hanusch C, Schulte J, Haak M, van Ackern K, van der Woude FJ, Yard BA. **Heterogeneity in lipopolysaccharide responsiveness of endothelial cells identified by gene expression profiling: role of transcription factors.** *Clin Exp Immunol.* 2006;143(3):523-533.
 47. Briones MA, Phillips DJ, Renshaw MA, Hooper WC. **Expression of chemokine by human coronary-artery and umbilical-vein endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines.** *Coron Artery Dis.* 2001;12(3):179-186.
 48. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. **Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes.** *J Exp Med.* 1994;180(1):203-209.

49. Xu L, Badolato R, Murphy WJ, Longo DL, Anver M, Hale S, Oppenheim JJ, Wang JM. **A novel biologic function of serum amyloid A. Induction of T lymphocyte migration and adhesion.** J Immunol. 1995;155(3):1184-1190.
50. Furlaneto CJ, Campa A. **A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil.** Biochem Biophys Res Commun. 2000;268(2):405-408.
51. Ribeiro FP, Furlaneto CJ, Hatanaka E, Ribeiro WB, Souza GM, Cassatella MA, Campa A. **mRNA expression and release of interleukin-8 induced by serum amyloid A in neutrophils and monocytes.** Mediators Inflamm. 2003;12(3):173-8.
52. 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):145-156.
53. Mullan RH, Bresnihan B, Golden-Mason L, Markham T, O'Hara R, FitzGerald O, Veale DJ, Fearon U. **Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NF-kappaB-dependent signal transduction pathway.** Arthritis Rheum. 2006;54(1):105-149
54. Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pollin TI, Ryan AS, Nicklas BJ, Snitker S, HorensteiRB, Hull K, Goldberg NH, Goldberg AP, Shuldiner AR, Fried SK, Gong DW. **Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications.** PLoS Med. 2006;3(6):e287.
55. M. Martinčič. **Vpliv transformirajočega rastnega faktorja beta1 na izločanje interleukina 6 in izražanje interleukina 8 v aktiviranih endotelijskih celicah.** Diplomaska naloga, 2007.
56. Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, and Serhan CN. **Selectivity of recombinant human leukotriene D₄, leukotriene B₄, and lipoxin A₄ receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ and regulation of vascular and inflammatory responses.** Am J Pathol 2001;158: 3-9
57. Takano T, Fiore S, Maddox JF, Brady HR, Petasis NA, Serhan CN. **Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent**

- inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors.** J Exp Med. 1997;185(9):1693-1704.
58. Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, Serhan CN. **Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells.** J Immunol. 2003;170(5):2688-1694.
 59. Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, Colgan SP, Madara JL. **Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils.** Biochemistry. 1995;34(44):14609-14615.
 60. Hachicha M, Pouliot M, Petasis NA, Serhan CN. **Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis.** J Exp Med. 1999;189(12):1923-1930
 61. Fierro Simões RL, Fierro IM. **Involvement of the Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway on human monocyte chemotaxis induced by ATL-1, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog.** J Immunol. 2005;175(3):1843-1850.
 62. Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. **Aspirin-triggered lipoxin A4 blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidative mechanism.** Thromb Haemost. 2007;97(1):88-98.
 63. Andersson P, Serhan CN, Petasis NA, Palmblad J. **Interactions between lipoxin A4, the stable analogue 16-phenoxy-lipoxin A4 and leukotriene B4 in cytokine generation by human monocytes.** Scand J Immunol. 2004;60(3):249-256
 64. El Kebir D, József L, Khreiss T, Pan W, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. **Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation.** J Immunol. 2007;179(1):616-622.
 65. Liu J, Tian Z, Gao B, Kunos G. **Dose-dependent activation of antiapoptotic and proapoptotic pathways by ethanol treatment in human vascular endothelial cells: differential involvement of adenosine.** J Biol Chem. 2002;277(23):20927-20933.

66. Wu SH, Lu C, Dong L, Zhou GP, He ZG, Chen ZQ. **Lipoxin A4 inhibits TNF-alpha-induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells.** *Kidney Int.* 2005;68(1):35-46.
67. Hoare GS, Birks EJ, Bowles C, Marczin N, Yacoub MH. **In vitro endothelial cell activation and inflammatory responses in end-stage heart failure.** *J Appl Physiol.* 2006 101(5):1466-1473.
68. Ahmed SS, Tan FK, Arnett FC, Jin L, Geng YJ. **Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies.** *Arthritis Rheum.* 2006;54(7):2250-2262.
69. Valgimigli M, Agnoletti L, Curello S, Comini L, Francolini G, Mastroianni F, Merli E, Pirani R, Guardigli G, Grigolato PG, Ferrari R. **Serum from patients with acute coronary syndromes displays a proapoptotic effect on human endothelial cells: a possible link to pan-coronary syndromes.** *Circulation.* 2003;107(2):264-270.
70. Vega-Ostertag M, Casper K, Swerlick R, Ferrara D, Harris EN, Pierangeli SS. **Involvement of p38 MAPK in the up-regulation of tissue factor on endothelial cells by antiphospholipid antibodies.** *Arthritis Rheum.* 2005 May;52(5):1545-1554.
71. Simantov R, Lo SK, Gharavi A, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. **Antiphospholipid antibodies activate vascular endothelial cells.** *Lupus.* 1996;5(5):440-441.
72. Harris EN, Pierangeli SS. **Primary, Secondary, Catastrophic Antiphospholipid Syndrome: is there a difference?** *Thromb Res.* 2004;114(5-6):357-361.
73. Hanly JG, Hong C, Issekutz A. **Beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibody binding to resting and activated cultured human endothelial cells.** *J Rheumatol.* 1996;23(9):1543-1549.
74. Avcin T, Silverman ED. **Antiphospholipid antibodies in pediatric systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome.** *Lupus.* 2007;16(8):627-633
75. von Scheven E, Elder ME. **Association between beta2-glycoprotein I gene polymorphisms and pediatric SLE and antiphospholipid antibodies.** *Lupus.* 2005;14(6):440-444.

76. von Scheven E, Glidden DV, Elder ME. **Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in pediatric systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome.** Arthritis Rheum. 2002;47(4):414-420.
77. Chen PP, Lin YC, Wu KC, Yen JH, Ou TT, Wu CC, Liu HW, Tsai WC. **Activation of endothelial cells by antiphospholipid antibodies--a possible mechanism triggering thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome.** Kaohsiung J Med Sci. 2006;22(10):484-490.
78. Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, Bardin N, Harlé JR, Sampol J, Dignat-George F, Anfosso F. **Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome.** Int Immunol. 2005;17(4):489-500.
79. Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Hall J, Harris EN, Pierangeli SS. **E-Selectin mediates pathogenic effects of antiphospholipid antibodies.** J Thromb Haemost. 2003;1(4):843-848.
80. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Tincani A, Balestrieri G, Molteni R, Khamashta MA, Tremoli E, Camera M. **Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype.** Arthritis Rheum. 2001;44(12):2870-2878.
81. Hamid C, Norgate K, D'Cruz DP, Khamashta MA, Arno M, Pearson JD, Frampton G, Murphy JJ. **Anti-beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome.** Ann Rheum Dis. 2007;66(8):1000-1007.
82. Gharavi AE, Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu XW, Espinola RG, Harris EN. **GDKV-induced antiphospholipid antibodies enhance thrombosis and activate endothelial cells in vivo and in vitro.** J Immunol. 1999;163(5):2922-2927.
83. Caronti B, Calderaro C, Alessandri C, Conti F, Tinghino R, Palladini G, Valesini G. **Beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage.** Clin Exp Immunol. 1999;115(1):214-219.