

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIVA DEBEVEC

**VPLIV SERUMA OTROK Z ATOPIČNIM DERMATITISOM NA VNETNI ODZIV  
ČLOVEŠKIH ENDOTELIJSKIH CELIC**

**EFFECT OF PEDIATRIC ATOPIC DERMATITIS SERA ON THE  
INFLAMMATORY RESPONSE OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, SPS interna klinika, KC Ljubljana pod mentorstvomizr. prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom dr. Snežne Sodin-Šemrl.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Borutu Božiču za vse nasvete in pomoč pri diplomski nalogi in somentorici dr. Snežni Sodin-Šemrl za strokovno vodenje in vse pogovore v korist mojemu delu. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, še posebej pa se zahvaljujem Katjuši Mrak-Poljšak za tehnično in ostalo pomoč pri izvedbi dela.

Iskreno se zahvaljujem tudi svojim domačim, mami in očetu za vso podporo, spodbude in zaupanje vame med študijem ter Vidu za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

### **Izjava**

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

Ljubljana, junij 2009

Diplomantov podpis

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

# 1 VSEBINA

1	VSEBINA .....	II
2	POVZETEK .....	1
3	ABSTRACT .....	2
4	SEZNAM OKRAJŠAV .....	3
5	UVOD .....	5
5.1	Vnetje .....	5
5.1.1	Akutno vnetje .....	5
5.1.2	Kronično vnetje .....	6
5.2	Citokini in kemokini .....	6
5.2.1	Interlevkin-1 .....	7
5.2.2	Interlevkin-6 .....	7
5.2.3	Interlevkin-8 .....	8
5.2.4	Receptor $\beta$ za interlevkin-8 .....	8
5.3	Adhezijske molekule .....	8
5.3.1	Adhezijske molekule imunoglobulinske superdružine .....	9
5.4	Hemostaza .....	10
5.5	Tromboza .....	12
5.6	Endotelijske celice .....	13
5.6.1	Vloga endotelijskih celic pri vzdrževanju hemostaze .....	13
5.6.2	Vloga endotelijskih celic pri vnetju in trombozi .....	13
5.7	Imunska toleranca, avtoimunost in alergija .....	14
5.8	Atopični dermatitis (AD) .....	15
5.9	Sistemski lupus eritematosus (SLE) .....	17
5.10	Antifosfolipidni sindrom (APS) .....	18
5.10.1	$\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ -GPI) .....	19
5.10.2	Antifosfolipidna protitelesa (aPL) .....	20
5.11	Orodja za študij celične aktivacije .....	21
5.11.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	22
5.11.2	Agarozna gelska elektroforeza .....	22
5.11.3	Encimsko imunska metoda (ELISA) .....	22
6	NAMEN DELA .....	23

7	MATERIALI IN METODE	24
7.1	Materiali	24
7.1.1	Biološki materiali	24
7.1.2	Reagenti	25
7.1.3	Aparature in ostali materiali	28
7.2	Metode	29
7.2.1	Preverjanje ustreznosti vzorcev	29
7.2.2	Izvedba eksperimenta	30
7.2.3	Izolacija RNA	31
7.2.4	Določanje koncentracije RNA z UV spektrofotometrijo	32
7.2.5	Reverzna transkripcija	32
7.2.6	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	33
7.2.7	Agarozna gelska elektroforeza	34
7.2.8	Določanje koncentracij vnetnih mediatorjev	35
7.3	Eksperimentalno delo	39
8	REZULTATI	42
8.1	Rezultati merjenja IL-6 in endotoksina	42
8.2	Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-6 endotelijskih celic	43
8.2.1	Nukleinski nivo (mRNA)	43
8.2.2	Proteinski nivo	45
8.3	Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-8 endotelijskih celic	46
8.3.1	Nukleinski nivo (mRNA)	46
8.4	Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-8R $\beta$ endotelijskih celic	48
8.4.1	Nukleinski nivo (mRNA)	48
8.5	Vpliv seruma bolnikov na izražanje sICAM-1 endotelijskih celic	50
8.5.1	Proteinski nivo	50
8.6	Vpliv seruma bolnikov na izražanje sVCAM-1 endotelijskih celic	51
8.6.1	Proteinski nivo	51
9	RAZPRAVA	54
10	SKLEPI	68
11	REFERENCE	70
12	PRILOGA	74

## 2 POVZETEK

Vnetje je fiziološki odziv organizma na različne dražljaje, njegovo kronično obliko pa pogosto spremljajo različne bolezni imunskega sistema. Med procesom vnetja lahko pride tudi do aktivacije endotelijskih celic, kar lahko vodi v trombozo. Pogost pojav tromboze so opazili tudi pri posameznikih z visoko koncentracijo protiteles proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I.

Namen dela je bil primerjati in ugotoviti razlike v ekspresiji mRNA IL-6, IL-8 in IL-8R $\beta$  ter sekreciji molekul IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1 iz človeških koronarnih arterijskih endotelijskih celic (HCAEC) po stimulaciji s serumi otrok z atopičnim dermatitisom (AD) ter stimulaciji s serumi otrok s primarnim antifosfolipidnim sindromom (PAPS) in sistemskim lupusom eritematozusom (SLE). AD in SLE uvrščamo med kronične vnetne bolezni, za PAPS pa je značilen pojav tromboz. Aktivacijo endotelijskih celic s serumi otrok smo primerjali tudi z aktivacijo celic s serumi odraslih obolelih za PAPS in SLE ter zdravimi otroci. V serumih skoraj vseh preiskovanih obolelih, je bila prisotna povišana koncentracija anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Po 24-urni stimulaciji smo iz celic izolirali mRNA, jo s pomočjo reverzne transkriptaze pretvorili v cDNA in željene odseke podvojili z verižno reakcijo s polimerazo. Po elektroforezi na agaroznem gelu smo ločene fragmente detektirali z UV metodo. Nivoje molekul iz supernatanta stimuliranih celic pa smo določili z encimskim imunskim testom na trdnem nosilcu.

Dokazali smo, da so HCAEC, stimulirane s serumi otrok z AD izločile večje količine IL-6, na proteinskem nivoju kot celice, stimulirane s serumi drugih obolelih otrok. Čeprav so bile razlike v ekspresiji mRNA IL-6 in IL-8 ter sekreciji sICAM-1 in sVCAM-1 nakazane, niso bile značilno velike. Tako nam je z raziskavo uspelo potrditi prvi del hipoteze o statistično značilni razliki v vnetnem odzivu HCAEC po stimulaciji s serumi otrok z AD v primerjavi s serumi otrok s PAPS in SLE, ki temelji na razliki v izločenih nivojih IL-6. Poleg tega smo dokazali tudi, da so celice, stimulirane s serumi otrok z AD, izločile večje količine IL-6 in sICAM-1 kot celice, stimulirane s serumi zdravih otrok. Prav tako nam je uspelo dokazati značilno razliko v izločenem IL-6 in sICAM-1 po stimulaciji celic s serumi otrok v primerjavi s serumi odraslih obolelih za PAPS.

### 3 ABSTRACT

Inflammation is a physiological response of the organism to different stimuli and its chronic form is often accompanied by different diseases of the immune system. Activation of endothelial cells can occur during the process of inflammation which can subsequently lead to thrombosis. Frequent occurrence of thrombosis has also been found in individuals with high concentration of antibodies against  $\beta_2$ -glycoprotein I.

The purpose of our work was to compare and determine the differences in expression of mRNA IL-6, IL-8 and IL-8R $\beta$  and secretion of IL-6, sICAM-1 and sVCAM-1 molecules from human coronary artery endothelial cells (HCAEC) after stimulation with sera from children with atopic dermatitis (AD) and after stimulation with sera from children with primary antiphospholipid syndrome (PAPS) and systemic lupus erythematosus (SLE). AD and SLE are classified as chronic inflammatory diseases and PAPS is characterized by occurrence of thrombosis. The activation of endothelial cells with pediatric sera was also compared with activation of cells with sera from adults suffering from PAPS and SLE, and healthy children. Increased concentrations of anti- $\beta_2$ -GPI antibodies were present in majority of diseased sera. After a 24-hour stimulation we isolated mRNA from the cells, transcribed it to cDNA with reverse transcriptase and replicated the desired fragments with PCR. After the agarose gel electrophoresis the separated fragments were detected with UV. Levels of molecules in the supernatant of stimulated cells were detected with ELISA.

We demonstrated that HCAEC stimulated with sera from children with AD secreted greater amounts of IL-6 than the cells stimulated with sera from children with other diseases. Although differences in mRNA expression of IL-6 and IL-8 and secretion of sICAM-1 and sVCAM-1 were indicated, they could not be termed as significant. Therefore our research confirmed the first part of our hypothesis of a statistically significant difference in the inflammatory response of HCAEC to stimulation with sera from children with AD in comparison to those stimulated with sera from children with PAPS and SLE in terms of levels of released IL-6. In addition, we also demonstrated that HCAEC stimulated with sera from children with AD secreted greater amounts of IL-6 and sICAM-1 than cells stimulated with sera from healthy children. Moreover, the difference in secretion of IL-6 and sICAM-1, after stimulation with pediatric sera in comparison to adult sera with PAPS, was demonstrated.

## 4 SEZNAM OKRAJŠAV

AD – atopijski dermatitis

ANA – protijedrna protitelesa (antinuclear antibodies)

anti- $\beta_2$ -GPI – protitelesa proti  $\beta_2$ -glikoproteinu I

APC – antigen predstavitvena celica

aPL – antifosfolipidna protitelesa

APS – antifosfolipidni sindrom

$\beta_2$ -GPI –  $\beta_2$ -glikoprotein I

bp – bazni pari

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina (complementary deoxyribonucleic acid)

DNA – deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)

DPBS – Dulbeccov fosfatni pufer (Dulbecco's phosphate buffered saline)

EC – endotelijske celice

ELISA – encimsko imunska metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)

ENA-78 – epitelijski kemotaktični dejavnik za nevtrofilce-78 (epithelial neutrophil-activating peptide-78)

EDRF – endotelijski relaksirajoči faktor (endothelium-derived relaxing factor)

FBS – fetalni goveji serum (fetal bovine serum)

GCP-2 – granulocitni kemotaktični protein-2 (granulocyte chemotactic protein-2)

GM-CSF – kolonije stimulirajoči faktor za granulocite in makrofage (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

GRO- $\alpha$ , $-\beta$  in  $-\gamma$  – rastnemu sorodni onkogeni proteini- $\alpha$ , $-\beta$  in  $-\gamma$  (growth related oncogene- $\alpha$ , $-\beta$  and  $-\gamma$ )

HAEC – človeške aortne endotelijske celice (human aortic endothelial cells)

HCAEC – človeške koronarne arterijske endotelijske celice (human coronary artery endothelial cells)

hEGF – človeški epidermalni rastni dejavnik (human epidermal growth factor)

hFGF-B – človeški fibroblastni rastni dejavnik (human fibroblast growth factor)

HMWK – kininogen z veliko molekulsko maso (high-molecular-weight kininogen)

HRP – hrenova peroksidaza (horseradish peroxidase)

HUVEC – človeške umbilikalne venske endotelijske celice (human umbilical vein endothelial cells)

IL-1 $\beta$  (-4,-6,-8,-10,-12) – interleukin-1 $\beta$  (-4,-6,-8,-10,-12)

IL-8R $\beta$  – receptor  $\beta$  za IL-8

INF- $\gamma$  – interferon  $\gamma$

LDL – lipoproteini majhne gostote (low-density lipoprotein)

LPS – bakterijski lipopolisaharid

MIP-1 $\beta$  – makrofagni vnetni protein-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ )

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina (messenger ribonucleic acid)

NAP-2 – nevtrofilce aktivirajoči protein-2 (neutrophil activating peptide-2)

oxLDL – oksidiran lipoprotein majhne gostote (oxidized low-density lipoprotein)

PAF – faktor aktivacije trombocitov (platelet-activating factor)

PAI-1 – inhibitor aktivatorja plazminogena (plasminogen activator inhibitor)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

PGI<sub>2</sub> – prostaciklin (prostaglandin I<sub>2</sub>)

PK – prekalikrein

QPCR – kvantitativni PCR (quantitative PCR)

R<sup>3</sup>-IGF-1 – dolgi (R<sup>3</sup>) rekombinantni inzulinu podobni rastni dejavnik-1 (long (R<sup>3</sup>)-insulin-like growth factor-1)

ROS – reaktivne kisikove spojine (reactive oxygen species)

RT – reverzna transkripcija

SLE – sistemski lupus eritematosus

sICAM-1 – znotrajcelična adhezijska molekula (topna oblika) (intercellular adhesion molecule-1)

sVCAM-1 – žilna celična adhezijska molekula (topna oblika) (vascular cell adhesion molecule-1)

TF – tkivni faktor

TNF- $\alpha$  – dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )

VEGF – vaskularni endotelijski rastni dejavnik (vascular endothelial growth factor)



## 5 UVOD

### 5.1 Vnetje

#### 5.1.1 Akutno vnetje

Glavni znaki akutnega vnetja so vročina, rdečina, oteklina in nabrekanje poškodovanega tkiva in se pojavijo v nekaj minutah po poškodbi (1). Do poškodbe pride zaradi delovanja vnetnega agensa, kot so patogeni organizmi, poškodba celic in drugih vnetnih dražljajev, kar vodi v degranulacijo lokalnih mastocitov. Pri tem se v okolico celic sprosti histamin, ki povzroči arteriodilatacijo ter povečano prepustnost kapilar in venul. Oboje je najverjetneje posledica kontrakcije endotelijskih celic in s tem razširitve por med njimi (2). Zaradi izstopa tekočine iz krvnega obtoka pride do aktivacije različnih plazemskih sistemov (1). Končni produkt aktivacije kininskega sistema sta aktiviran Hagemanov faktor (F XIIa), ki sodeluje pri kontaktni (intrinzični) poti strjevanja krvi ter bradikinin in njemu sorodni kinini. Kinini dražijo bolečinske receptorje ter skupaj s fibrinopeptidi - biološko aktivnimi deli fibrinogena, vzdržujejo vazodilatacijo arteriol in povečano prepustnost žil. Tudi pri aktivaciji sistema komplementa nastajajo močni vnetni mediatorji, ki delujejo kot opsonini, kemotaktični agensi, povzročajo lizo celic ter sodelujejo pri degranulaciji mastocitov (2). Medtem na mestu rane izlita kri takoj oblikuje krvni čep, zgrajen iz ujetih in agregiranih trombocitov ter nevtrofilcev. Oboji sproščajo vnetne mediatorje, ki aktivirajo sistem koagulacije, delujejo kemoatraktivno ter tako pospešijo kopičenje celic, ki sodelujejo pri vnetju (3).

Nekaj ur po nastanku teh sprememb potujejo nevtrofilci preko aktiviranih endotelijskih celic iz krvi v tkivne prostore. Delovanje vnetnih citokinov na mestu poškodbe se kaže kot aktivacija endotelijskih celic in izražanje različnih adhezijskih molekul (ICAM, VCAM) na njihovi površini (3). V tkivu nevtrofilci fagocitirajo patogene mikrobe in sproščajo mediatorje, ki prispevajo k vnetju ter kemokine, ki v vnetišče privabljajo makrofage. Tako nekaj ur pozneje na mesto poškodbe prispejo makrofagi, ki prav tako fagocitirajo mikrobe in izločajo vnetne mediatorje in citokine. Najpomembnejši citokini, ki jih izločajo makrofagi so IL-1, IL-6 in TNF- $\alpha$ . Vsi trije delujejo lokalno, povečajo prepustnost žil, povzročajo strjevanje krvi ter vplivajo na učinke sistemske akutne faze. Ta sistemski odziv obsega povišano telesno temperaturo, levkocitozo in izdelovanje kortikosteroidov ter proteinov akutne faze v hepatocitih (1). Med endogene aktivatorje vnetne reakcije, ki jih

izločajo različni levkociti in endotelijske celice, sodijo tudi eikozanoidi ter faktor aktivacije trombocitov (PAF). Omenjeni mediatorji prav tako povzročajo vazodilatacijo ter vaskularno permeabilnost (2). Nekaj dni po poškodbi, ko se aktivira še imunski sistem, k vnetju prispevajo tudi aktivirani limfociti, predvsem limfociti T (3).

### 5.1.2 Kronično vnetje

Zaradi dolgotrajne navzočnosti antigena ali prikrite sistemske napake organizma se lahko razvije kronična oblika vnetja (3). Srečamo ga npr. pri okužbi z določenimi mikroorganizmi, številnih avtoimunskih boleznih in raznih tipih raka. Za kronično vnetje je značilno nakopičenje in aktivacija makrofagov, ki preko izločenih citokinov spodbujajo razmnoževanje fibroblastov. Makrofage aktivira predvsem IFN- $\gamma$ . Posledica je nastanek kolagena in razvoj fibroze, kar lahko ovira normalno funkcijo tkiva (1). Poleg makrofagov srečamo pri kroničnem vnetju tudi aktivirane keratinocite, fibroblaste in endotelijske celice ter nevtrofilce in limfocite. Vse te celice sodelujejo pri prekomerni izdelavi vnetnih citokinov (IL-1, TNF- $\alpha$  in IL-6) ter oblikovanju okolja bogatega z različnimi tipi proteaz in reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS). Prekomerna proteazna aktivnost povzroči razpad rastnih faktorjev ter proteinov pomembnih za obnovo tkiva, povečane ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) pa lahko vodijo v neposredno poškodbo celic in molekul zunajceličnega matriksa. Našteto odlojučno prispeva k okvari in propadanju vnetega tkiva (3).

## 5.2 Citokini in kemokini

Citokini so proteini, ki jih izločajo celice prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, predvsem pa limfociti Th in makrofagi. Navadno delujejo kot medcelične sporočilne molekule, ki po vezanju na receptorje tarčnih celic, spodbudijo v njih določeno biološko aktivnost. Citokine celice izločajo kot odziv na mikrobe ali druge patofiziološke antigene, pri čemer različni citokini sprožijo različne odzive vpletenih celic. V fazi aktivacije pridobljenega imunskega odziva citokini stimulirajo razmnoževanje in diferenciacijo limfocitov ter v efektorski fazi prirojenega in pridobljenega sistema aktivirajo različne efektorske celice, ki nato odstranijo mikrobe in druge antigene (4). Delujejo lahko avtokrino, endokrino, največkrat pa delujejo parakrino (1).

Tudi za kemokine ali kemotaktične citokine velja, da jih številni levkociti in endotelijske celice izdelujejo kot odziv na vnetne in različne patofiziološke dražljaje (1,5). Sicer so

kemokini velika družina strukturno homolognih molekul, ki spodbujajo naključno gibanje levkocitov (kemokineza) in usmerjajo njihovo potovanje (kemotaksa) ter tako nadzorujejo prehod nevtrofilcev, monocitov, celic T in bazofilcev iz krvi v tkiva (1,4). Poleg tega so vključeni tudi v številne druge biološke procese, kot so angiogeneza, embriogeneza in endogena izdelava pirogenov (6). Nekatere kemokine celice izdelujejo ves čas, tudi v odsotnosti vnetja. Ločimo dve glavni družini kemokinov, in sicer kemokine CC, kjer sta cisteinska ostanka na N-terminalnem koncu sosednja drug drugemu in družino CXC, kjer je med obema cisteinoma prisotna še ena aminokislina. Obe družini se razlikujeta glede na vrsto levkocitov, na katere delujeta (4). Znano je, da se nekateri kemokini vežejo na več različnih kemokinskih receptorjev in da nekateri receptorji vežejo več različnih kemokinov (5).

### 5.2.1 Interlevkin-1

Glavni vir citokina interlevkina-1 so aktivirani makrofagi in deluje podobno kot TNF- $\alpha$ . Izdelavo citokina pospeši stik z bakterijskimi produkti, kot je npr. LPS ali drugimi citokini, npr. TNF- $\alpha$ . Poleg makrofagov izdelujejo IL-1 tudi nevtrofilci, keratinociti in endotelijske celice. Obstaja v dveh oblikah: IL-1 $\alpha$  in IL-1 $\beta$ . Večina v cirkulaciji najdenega IL-1 je IL-1 $\beta$ , sicer pa sta oba ključna vnetna citokina in povzročata povečano izražanje površinskih adhezijskih molekul za levkocite na endotelijskih celicah, povečano izločanje kemokinov, vročino, kaheksijo, resorbcijo kosti, proteolizo mišic ter povečano nastajanje proteinov akutne faze. Učinkujeta lahko neposredno ali posredno preko spodbuditve drugih citokinov, npr. IL-6 ali TNF- $\alpha$  (1,4,7). Makrofagi izločajo tudi naravni inhibitor IL-1, ki je strukturno homologen citokinu, se veže na isti receptor, vendar je biološko neaktiven in tako deluje kot kompetitivni inhibitor IL-1 (4).

### 5.2.2 Interlevkin-6

Interlevkin-6 je pleiotropen citokin, ki ga izdelujejo celice T, celice B, monociti, fibroblasti, žilne endotelijske celice in nekatere druge celice, kot odziv na mikrobo in citokine, npr. IL-1 in TNF- $\alpha$  (8). Je poglavitni mediator reakcije akutne faze, pospešuje razmnoževanje in zorenje celic B ter s tem izločanje imunoglobulinov, pospešuje aktivacijo in zorenje celic T ter zorenje makrofagov. IL-6 aktivira tudi endotelijske celice, kar vodi v sproščanje IL-8, kemoatraktivnega proteina za monocite, izražanje adhezijskih molekul in novačenje levkocitov na mesto vnetja. Skupaj z IL-1 pospešujeta izločanje

metaloproteinaz iz matriksa. Poleg provnetnih lastnosti ima IL-6 tudi protivnetne lastnosti, kot je npr. ustavitev izločanja citokinov, ki povzročajo vnetje (TNF- $\alpha$  in IL-1). Neravnovesje med obema delovanjema najverjetneje prispeva h kroničnosti vnetja in razvoju bolezni (1,8).

### 5.2.3 Interlevkin-8

Interlevkin-8 sodi v skupino kemokinov CXC in tvori več aktivnih izoform. V raztopini lahko tvori dimere, kljub temu pa je najverjetneje biološko pomembna in aktivna oblika monomer. Izdelujejo ga aktivirani monociti, makrofagi, celice T in endotelijske celice kot odziv na IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ , LPS, ROS in druge stresne dejavnike. Deluje kot kemoatraktant za številne levkocite, pomembno vlogo pa igra tudi pri avtoimunosti, vnetju, okužbah, angiogenezi in nastanku tumorjev (1,5). Zaradi močnega provnetnega delovanja je IL-8 zelo natančno uravnavan, njegova koncentracija v normalnih tkivih pa je minimalna ali celo nezaznavna. Močna inhibitorja IL-8 sta IL-4 in IL-10 (5).

### 5.2.4 Receptor $\beta$ za interlevkin-8

Interlevkin-8 se z veliko afiniteto veže na dva homologna kemokinska receptorja - IL-8R $\alpha$  (CXCR1) in IL-8R $\beta$  (CXCR2). Kot ostali receptorji CXC sta sestavljena iz sedmih transmembranskih segmentov in sklopljena s proteinom G (5). Receptor IL-8R $\alpha$  selektivno veže samo IL-8 in granulocitni kemotaktični protein-2 (GCP-2), medtem ko IL-8R $\beta$  ni tako selektiven in veže s podobno veliko afiniteto še številne druge CXC kemokine, kot so epiteljski kemotaktični dejavnik za nevtrofilce-78 (ENA-78), rastnemu sorodni onkogeni proteini- $\alpha$ , - $\beta$  in - $\gamma$  (GRO- $\alpha$ , - $\beta$  in - $\gamma$ ) ter nevtrofilce aktivirajoči protein-2 (NAP-2) (9). Oba receptorja najdemo na številnih levkocitih in endotelijskih ter rakavih celicah, kjer sodelujeta pri nabiranju nevtrofilcev in angiogenezi, IL-8R $\beta$  pa tudi pri kopičenju makrofagov (5).

## 5.3 Adhezijske molekule

Pomemben mehanizem medceličnega komuniciranja so specifične interakcije med molekulami izraženimi na površini levkocitov in molekulami na površini potencialnih tarčnih celic. Te molekule imenujemo adhezijske molekule. So membranski glikoproteini in prispevajo k razvoju vnetja in drugih patoloških stanj. Adhezija levkocitov na endotelij ali osnovno membrano žil je pomembna pri migraciji krožečih levkocitov na mesto vnetja.

V primeru povečanega izražanja adhezijskih molekul na levkocitih in endotelijskih celicah, je povečana tudi sama adhezija celic. Poleg tega imajo adhezijske molekule tudi druge funkcije; sodelujejo pri prepoznavanju antigenov, delujejo kot kostimulatorji pri aktivaciji celic T ter spodbujajo efektorske mehanizme aktiviranih limfocitov, npr. citotoksičnost limfocitov T in od protiteles odvisno celično citotoksičnost (10). Poznamo več družin adhezijskih molekul, ki imajo podobno zgradbo, vendar različne specifičnosti za ligand. Od celične vrste, njihovega stadija diferenciacije in aktivacije je odvisno, katere adhezijske molekule se na celicah izražajo. Te družine so: integrini, selektini, imunoglobulinska superdružina in molekule, ki vsebujejo ogljikove hidrate (1).

### 5.3.1 Adhezijske molekule imunoglobulinske superdružine

Glavna lastnost molekul, ki pripadajo imunoglobulinski superdružini je, da so sestavljene iz enakih predelov kot imunoglobulini. Družino delimo na šest podskupin, od katerih nas najbolj zanimata intracelularna celična adhezijska molekula-1 (ICAM-1) in vaskularna celična adhezijska molekula-1 (VCAM-1) (10).

#### 5.3.1.1 ICAM-1

Skupino intracelularnih celičnih molekul delimo na ICAM-1, ICAM-2 in ICAM-3. Molekula ICAM-1 ima pet imunoglobulinskih predelov in je pod fiziološkimi pogoji v nizkih količinah izražena na številnih celicah, npr. levkocitih, endotelijskih in epitelijskih celicah (11,12). Med vnetjem (vpliv citokinov INF- $\gamma$ , IL-1 in TNF- $\alpha$ ), zgodnjim prepoznavanjem antigena in pri nekaterih tipih karcinomov, pride na endotelijskih celicah do izrazito povečanega izražanja ICAM-1, ki igra pomembno vlogo tudi pri kroničnem vnetju. Molekula ICAM-1 se veže z ustreznimi  $\beta_2$  integrini (LFA-1 in MAC-1), izraženimi na nevtrofilcih, celicah T in makrofagih, kar omogoča trdno vezavo levkocitov na endotelij, njihovo usmeritev na mesto poškodbe ter aktivacijo (12). Aktivna je tudi topna oblika adhezijske molekule – sICAM-1, ki je normalno prisotna v človeškem serumu in zvišana pri različnih vnetnih in avtoimunih boleznih (10). sICAM-1 prisoten v cirkulaciji vsebuje večino ekstracelularnega dela molekule ICAM-1 in lahko veže LFA-1 (13).

### 5.3.1.2 VCAM-1

Molekula VCAM-1 vsebuje šest ali sedem imunoglobulinskih predelov in je izražena na velikem številu različnih celic. Podobno kot pri ICAM-1, pride pod vplivom citokinov IL-1, IL-4, TNF- $\alpha$  in INF- $\gamma$ , do povečanega izražanja VCAM-1 na endotelijskih celicah. Molekula VCAM se veže na  $\beta_1$  integrin VLA-4 in integrin  $\alpha_4\beta_7$  na levkocitih, s čimer uravnava adhezijo aktiviranih monocitov, limfocitov, bazofilcev in eozinofilcev na endotelijskih celicah ter njihovo ekstravazacijo in migracijo skozi endotelij na mesto vnetja (10,14). Aktivna je tudi topna oblika sVCAM-1, ki so jo opazili pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi in različnimi oblikami raka (10).

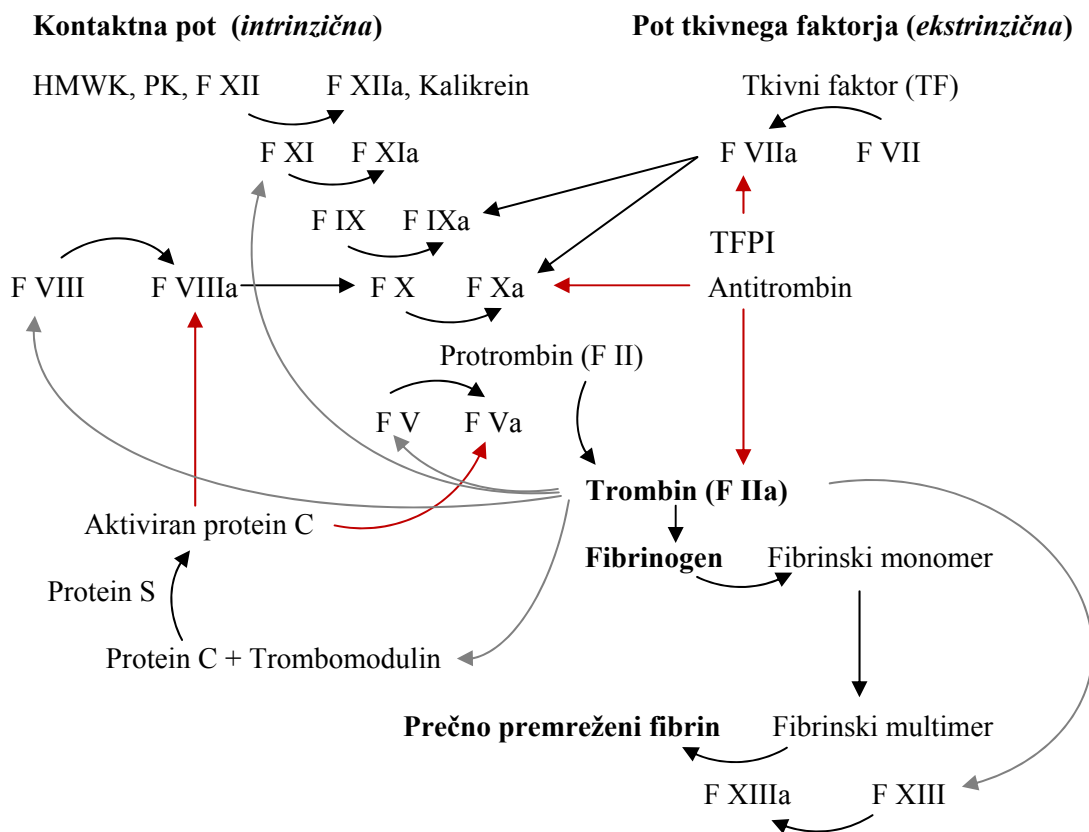
## 5.4 Hemostaza

Hemostaza je visoko prilagodljiv proces, ki nadzoruje pretočnost krvi in ki po poškodbi tkiva sproži nastanek krvnega čepa, z namenom ustavitve ali omejitve krvavenja. Sestavljajo jo trije procesi: primarna hemostaza, koagulacija ter fibrinoliza (15).

Primarna hemostaza je rezultat interakcij med steno žil, trombociti ter adhezivnimi molekulami in vodi v nastanek trombocitnega strdka. Prva reakcija na poškodbo žilja je skrčenje mišic v stenah žil ter adhezija trombocitov na subendotelijski matriks. Tu pride do morfoloških sprememb krvnih ploščic, ki kot take sproščajo molekule z različnimi funkcijami - med drugim pospešijo adhezijo in agregacijo trombocitov ter sodelujejo pri strjevanju krvi. Pride tudi do izpostavitve negativno nabitega fosfatidil serina na zunanji strani membrane (15).

Aktivacija koagulacije se prične z izpostavitvijo tkivnega faktorja (TF) - integralnega membranskega proteina, aktiviranemu faktorju koagulacije VII (15,16). Kaskada strjevanja krvi je predstavljena na Sliki 1 (stran 11). Izpostavljenost TF krvi je lahko posledica poškodbe žil, ki razkrije celice z izraženim TF na površini ali pa nenormalnega izražanja TF na aktiviranih monocitih in endotelijskih celicah, v primeru sepse, prisotnosti vnetnih citokinov in TNF- $\alpha$  (15,16). Kompleks TF/VIIa aktivira faktorja IX in X, zaradi česar nastanejo majhne količine faktorja Xa (začetna faza) (15). Faktor IXa je v plazmi relativno stabilen in difundira k aktiviranim trombocitom, faktor Xa pa je v plazmi nestabilen in ga lahko hitro inhibirata antitrombin III in inhibitor poti tkivnega faktorja (TFPI). Na površini celic z izraženim TF faktor Xa veže faktor Va in oblikuje kompleks Xa/Va (16). Posledica

je nastanek majhne količine trombina (FIIa), ki vodi v aktivacijo trombocitov ter faktorjev V, VIII in XI (faza ojačitve). Na površini aktiviranih trombocitov nastane nato ob prisotnosti anionskih fosfolipidov, kalcija in kompleksa IXa/VIIIa velika količina faktorja Xa (propagacijska faza) (15,16). Faktor Xa pa skupaj s fosfolipidi, faktorjem Va in kalcijem tvori protrombinazni kompleks, ki pretvori protrombin v trombin. Velika količina nastalega trombina omogoča cepitev peptidne vezi v fibrinogenu in povzroči nastanek fibrinskih monomerov in v končni fazi polimerizacijo fibrina ter nastanek stabilnega fibrinsko-trombocitnega strdka (15).



**Slika 1:** Kaskada strjevanja krvi: HMWK - kininogen z veliko molekulsko maso, PK - prekalikrein, TFPI - inhibitor poti tkivnega faktorja. Črne/sive puščice predstavljajo glavno/dodatno pot strjevanja krvi, rdeče pa inhibitorje strjevanja krvi.

Kontaktna ali intrinzična pot strjevanja krvi igra manjšo vlogo pri fiziološki hemostazi. Začetek sproži stik med krvjo in negativno nabito površino. To povzroči aktivacijo prekalikreina, kininogena in faktorja XII, kar se odraža v nastanku faktorja Xa (15). Večina bioloških površin, ki aktivirajo faktor XII, se izrazi šele v času bolezni (17).

Omejitev širjenja nastalih fibrinskih strdkov in njihovo razgradnjo pa uravnava proces fibrinolize, pri katerem aktivni encim plazmin razcepi fibrinsko mrežo strdka v manjše fibrinske fragmente. Kot koagulacija, je tudi fibrinoliza sestavljena iz notranje poti, ki poteka preko kontaktne aktivacije in zunanje poti, ki poteka preko aktivatorjev proencima plazminogena (18).

## 5.5 Tromboza

Strjevanje krvi kot je opisano zgoraj, je normalno dogajanje, ki ob poškodbi žilne stene preprečuje krvavitev. Krvni strdek pa lahko nastane tudi kot posledica patološkega procesa in se pojavi ne da bi bila žilna stena poškodovana, kar imenujemo tromboza (19), nagnjenost k nastanku tromboze pa trombofilija. Trombofilija je pretežno posledica motenj v koagulaciji in fibrinolizi in je zato stanje, pri katerem je dinamično ravnovesje med nastankom in razgradnjo fibrina nagnjeno v smer nastajanja fibrina (18). Strdki lahko delno ali popolnoma zamašijo žile, kar vodi v hude okvare organov, saj otežijo ali onemogočijo pritek (arterijska tromboza) oz. odtok krvi iz organov in okončin (venska tromboza) (18). Embolus (delec strdka) se lahko tudi odkrhne, potuje s krvjo in zamaši kako pomembno žilo, oddaljeno od mesta nastanka (19). Sam nastanek strdka je lahko omejen le na določen odsek žile ali pa strdki nastajajo razsejano po večjem delu žilja (18).

Do tromboze pride običajno zaradi enega ali kombinacije naslednjih dejavnikov:

- Upočasnjenega pretoka krvi (turbulenca, stenoza)
- Poškodbe žilnega endotelija (vnetje, endotelijska disfunkcija, ateroskleroza)
- Spremembe sestave krvi – hiperkoagulabilnost (nenormalno delovanje trombocitov, koagulacije, fibrinolize in metabolnih ali hormonskih faktorjev) (20)

Glede na mesto in patofiziologijo nastanka tradicionalno ločimo vensko in arterijsko trombozo. Pri venski trombozi srečamo rdeči strdek, sestavljen iz rdečih krvnih celic in fibrina, pri arterijski trombozi pa se na arteriosklerotični lehi naredi bel trombus, sestavljen pretežno iz trombocitov (20,21). Kljub očitnim razlikam pa študije dokazujejo, da je etiopatogenetski mehanizem obeh bolezni podoben in da tako pri pojavu venske kot arterijske tromboze, sodelujeta vnetje ter aktivacija trombocitov. Najverjetneje pride v obeh primerih do aktivacije koagulacijske kaskade z nastankom trombina in posledično fibrina, ki poveže strdek (21).



## 5.6 Endotelijske celice

Enojna plast endotelijskih celic sestavlja metabolično aktivno tkivo, ki obdaja notranjost žil in igra pomembno vlogo pri regulaciji žilnega tonusa, koagulaciji in fibrinolizi, celični rasti in diferenciaciji ter imunskih in vnetnih odzivih organizma (22,23,24).

### 5.6.1 Vloga endotelijskih celic pri vzdrževanju hemostaze

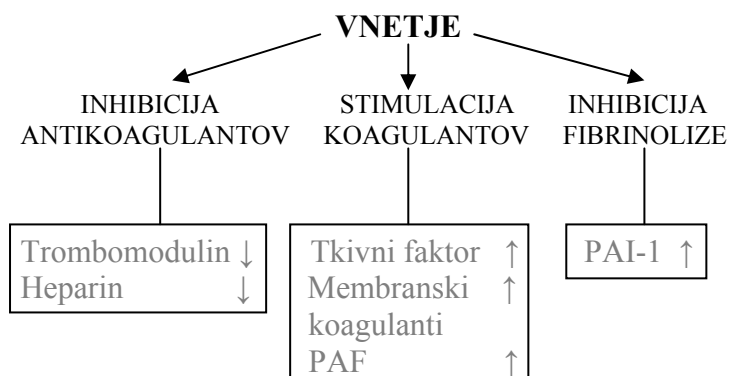
Pod normalnimi pogoji izražajo endotelijske celice površino z antitrombotičnimi lastnostmi in tako aktivno sodelujejo pri oviranju površinske adhezije trombocitov in preprečevanju strjevanja krvi. Eden izmed glavnih načinov vzdrževanja antitrombotičnega stanja je kontroliranje delovanja trombina. Endotelijske celice ohranjajo nizko aktivnost trombina na številne načine, med drugim z izražanjem heparan sulfata na površini, ki poveča delovanje antitrombina III ter dermatan sulfata v subendoteliju, ki povečuje antitrombinsko aktivnost heparinskega kofaktorja II. Endotelijske celice ovirajo delovanje trombina tudi preko inhibicije poti tkivnega faktorja ter izražanja glikoproteina trombomodulina na njihovi površini. Vezanje trombina na trombomodulin ima za posledico povečano afiniteto trombina do antikoagulantnega proteina C. Tako aktiviran protein C poveča delovanje aktivatorja plazminogena, inaktivira faktorja strjevanja krvi Va in VIIIa ter veže faktor Xa. Aktivnost proteina C je še ojačana s sodelovanjem kofaktorja proteina S, ki ga izdelujejo endotelijske celice same. Vezava trombina na trombomodulin se kaže tudi v zmanjšani zmožnosti encima za aktivacijo trombocitov, faktorja V, XIII in fibrinogena. Tako vezan trombin hitro podleže endocitozi in posledično razgradnji (23,24). Način vzdrževanja antitrombotičnega stanja (inhibicija kaskade strjevanja krvi) je predstavljen na Sliki 1, stran 11.

### 5.6.2 Vloga endotelijskih celic pri vnetju in trombozi

Kot že omenjeno, endotelijske celice aktivno sodelujejo tudi pri procesu vnetja. Ob poškodbi z mehničnimi ali biokemičnimi dražljaji izražajo endotelijske celice širok spekter odzivov. Akutni odziv na vnetni dražljaj je neodvisen od *de novo* mRNA ali sinteze proteinov in se kaže v aktivaciji ionskih kanalov, spremenjeni tvorbi mediatorjev, arteriolodilataciji, kontrakciji endotelijskih celic, povečani prepustnosti žil ter izražanju površinskih molekul (2,22). Endotelijske celice pa lahko izražajo tudi zapletene dolgoročne odzive, ki vključujejo *de novo* mRNA in sintezo proteinov (22). Površina tako

spremenjenih aktiviranih endotelijskih celic se spremeni v vazokonstriktorno in provnetno (24), s povečano ekspresijo adhezijskih molekul in povečano sintezo različnih citokinov (25).

Poleg omenjenega lahko z vnetjem povezana aktivacija endotelijskih celic spremeni celično površino tudi v protrombotično. Eden izmed glavnih vzrokov omenjenega stanja je



**Slika 2:** Vpliv vnetja na regulacijo strjevanja krvi.

*PAI-1 – inhibitor aktivatorja plazminogena*

Aktivirane celice poleg TF, izpostavijo na zunanji membrani tudi anionske fosfolipide, receptorje za faktorje koagulacije (IX, IXa, X in Xa), sproščajo aktivatorje trombocitov (PAF) ter inhibitorje fibrinolize (PAI-1) (15,18,24). Vnetje vpliva tudi na inhibicijo antikoagulantov. Vpliv vnetnih mediatorjev na regulacijo strjevanja krvi je predstavljen na Sliki 2. Vezava faktorjev koagulacije na receptorje vodi v aktivacijo protrombina in nastanek fibrina na površini celic. Natančna lokacija vseh teh vezavnih mest ni znana (24). K prokogulacijskemu stanju pa prispevajo tudi endotelijske celice same s stalnim izločanjem von Willebrandovega faktorja - nosilca faktorja strjevanja VIII v cirkulaciji in pomembega kofaktorja pri adheziji trombocitov na subendotelij (23).

povečana prisotnost tkivnega faktorja na površini, ki ga endotelijske celice normalno ne izražajo (24). Do povečanega izražanja TF pride ob izpostavljanju celic vnetnima citokinoma IL-1 ter TNF- $\alpha$  pa tudi trombinu ali bakterijskim LPS (23).

## 5.7 Imunska toleranca, avtoimunost in alergija

Stanje neodzivnosti, ki posamezniku omogoča, da normalno ne reagira na lastne in nekatere tuje antigene in je specifično za določen antigen, imenujemo imunska toleranca (1,4). Glavni dogodek pri razvoju avtoimunosti je prepoznavanje lastnih antigenov preko avtoreaktivnih limfocitov ter poškodba tkiva, kot posledica delovanja aktiviranih limfocitov in njihovih citokinov. Za poškodbe tkiva so odgovorni različni efektorski mehanizmi, kot so npr. imunski kompleksi ali krožeča avtoprotitelesa, odvisno od vrste

avtoimunske bolezni (4). Avtoimunost se normalno prepreči s selekcijo v timusu (limfociti T) oz. kostnem mozgu (limfociti B), prepreči pa se tudi z mehanizmom, ki inaktivira kljub negativni selekciji dozorele limfocite, reaktivne z lastnimi antigeni. Majhna količina avtoimunskih protiteles nastaja tudi v normalnih razmerah imunskega sistema, vendar so šibko afinitetna, razreda IgM in ne povzročajo okvar tkiva. Nastanek velikih količin močno afinitetnih avtoprotiteles pa lahko vodi v patološko avtoimunost (1). Glavna dejavnika, ki vplivata na nastanek avtoimunske bolezni sta genetično ozadje ter vpliv okolja. Večina bolezni je poligenskih, pri razvoju in poslabšanju avtoimunosti pa prispevajo tudi hormoni, neuravnoteženo nastajanje citokinov, pogosto pa sodelujejo tudi virusne in bakterijske okužbe. Pri tem srečamo dva glavna mehanizma; aktivacija prirojenega imunskega sistema na mestu okužbe, povečano izražanje kostimulatorjev na APC in posledična prekinitev tolerance limfocitov T do lastnega ter povezovanje limfocitov s križno reaktivnimi antigeni, kar vodi do aktivacije avtoaktivnih limfocitov B (1,4). Avtoimunost lahko povzročijo tudi anatomske spremembe tkiva, kot so vnetje, slaba prekrvavljenost ali fizična poškodba, pri čemer se sprostijo skriti (sekvestrirani) antigeni, ki lahko sprožijo ustrezne imunske odzive. Poškodba tkiva nastane tudi kot posledica avtoimunskih reakcij, kar razloži zakaj so avtoimunske bolezni pogosto kronične in napredujoče (4).

Pogoste imunske bolezni, ko telo prepozna sicer neškodljiv antigen iz okolja pa imenujemo alergije. Tudi te bolezni imajo močno genetično ozadje. Alergijska reakcija ali takojšna preobčutljivost nastane, če posameznik ponovno sreča antigen, proti kateremu je telo v preteklosti že izoblikovalo IgE protitelesa. Antigen omogoči križno povezovanje dveh IgE molekul vezanih na mastocite in bazofilce, ki sprostijo številne farmakološko aktivne mediatorje. Omenjeno vodi v lokalno vnetje. Za kasnejši stadij takojšne preobčutljivosti, ki jo imenujemo reakcija pozne faze, pa je značilen nastanek vnetnega infiltrata, bogatega z eozinofilci. Posameznike, ki so nagnjeni k močnim preobčutljivostnim odzivom imenujemo atopiki (1).

## 5.8 Atopični dermatitis (AD)

Primer alergije je atopični dermatitis, ki je kronična vnetna bolezen povezana s kožno preobčutljivostjo na sicer neškodljive dejavnike okolja. Objektivna laboratorijska preiskava za postavitve diagnoze ne obstaja, tako da le-ta temelji na skupku kliničnih znakov. Ti znaki pa so: srbenje, izpuščaji po obrazu in ekstenzorni strani okončin pri

dojenčkih in otrocih, fleksorni izpuščaji pri odraslih ter kroničnost dermatitisa. V koži bolnikov so ugotovili zmanjšano vsebnost ceramidov, kar vodi do izrazito suhe kože in povečane absorpcije antigenov. Omenjene karakteristike veljajo tudi za navidez neprizadeto kožo. Bolezen ima močno genetično ozadje. Več študij je potrdilo polimorfizme genov, povezanih z razvojem in nagnjenostjo k AD, kot so geni za citokine Th2, kemokine, kostimulatorne molekule, receptorje, itd. AD se ponavadi prične v zgodnjem otroštvu (10-20%), lahko pa se nadaljuje ali celo začne tudi v odrasli dobi (1-3%). Ugotovili so visok porast bolezni, predvsem v industrializiranih državah (26).

Do sedaj sta bili opisani dve obliki AD. Prva je »ekstrinzična«, ki je povezana z IgE posredovano preobčutljivostjo in prizadane večino pacientov (70-90%) (26,27). Pri tej obliki je nivo serumskega IgE močno povišan, pri hudih oblikah bolezni srečamo tudi IgE avtoprotitelesa. Druga oblika je »intrinzična« in je brez IgE posredovane preobčutljivosti (10-30%) (26,27). Pri obeh oblikah srečamo eozinofilijo (26). Pri akutni ekstrinzični obliki AD srečamo v koži povečano število spominskih celic T, ki izražajo kožni limfocitni antigen in proizvajajo povečane količine citokinov Th2 ter nenormalno nizke vrednosti INF- $\gamma$  in IL-12. Citokini Th2 vključujejo IL-4 in IL-13, ki sta znana povzročitelja preklopa izotipa k IgE sintezi ter IL-5, ki igra pomembno vlogo pri razvoju in preživetju eozinofilcev (28). Prisotne APC (npr. makrofagi) izražajo visoko afinitetne receptorje Fc $\epsilon$ RI in nosijo molekule IgE, ki po križnem povezovanju z antigenom povzročijo sproščanje histamina, kot opisano zgoraj. Pri intrinzični obliki srečamo manj IL-4 in IL-13, kot pri ekstrinzični (26). Za kronično obliko AD je značilno zadebeljeno vnetno tkivo, ki nastane kot posledica kroničnega vnetja. Glavni mononuklearni celični infiltrat v koži so makrofagi, k vnetju pa pripomorejo tudi eozinofilci. Število APC, ki nosijo IgE je povečano, zmanjša pa se število celic T, med katerimi je manj celic, ki izražajo mRNA IL-4 in IL-13 in več tistih, ki izražajo mRNA IL-5, IL-12 in INF- $\gamma$  (26). Tako srečamo pri AD dve fazi – začetna, kjer prevladuje odziv tipa Th2 in poznejša faza s profilom Th1. Najverjetneje je preklap posledica citokina IL-12, ki ga lokalno izločajo različne celice (npr. eozinofilci in dendritične celice) (27).

Citokina TNF- $\alpha$  in IL-1, ki ju izločajo celice iz okolja (mastociti, dendritične celice in keratinociti), se vežeta na receptorje na žilnem endoteliju. Tu aktivirata celično signalizacijo in sprožita izražanje žilnih endotelijskih adhezijskih molekul. Omenjena

citokina posredno prek dendritičnih celic spodbudita izločanje IL-4 in IL-13 iz naivnih Th celic. Iz keratinocitov se sproščata ob izpostavitvi proinflammatorym citokinom ali ob mehničnem dražljaju, npr. praskanju. Od tod povezava med praskanjem in poslabšanjem Th2 posredovanega vnetja pri AD (26).

## 5.9 Sistemski lupus eritematozus (SLE)

Sistemski lupus eritematozus je avtoimunska revmatična bolezen za katero je značilno nastajanje protiteles proti številnim lastnim molekulam, predvsem sestavinam celičnega jedra (29,30). Za nastanek bolezni je odločilen splet okoliščin, med katere sodijo genska dovzetnost, imunski odkloni, zunanji dejavniki in spolni hormoni (31). Prevalenca bolezni je zelo različna, odvisna od rase, narodnosti in socialno-ekonomskega položaja in se tako giblje med 4 do 250 bolnikov na 100.000 oseb. Bolezen se lahko pojavi v vsaki starosti, najpogosteje pa jo zasledimo pri mladih ženskah, črne rase (31,32). Bolezen spremljajo povišana telesna temperatura, utrujenost in izguba telesne teže, največkrat pa prizadane kožo, sklepe, hematopoetični sistem, ledvice, pljuča in centralni živčni sistem, čeprav je lahko v bolezen vpleten vsak organ (30,31). Patološke značilnosti pri pacientu so vnetje, vaskulitis, nalaganje imunskih kompleksov, ateroskleroza in vaskulopatija (29). Pri otrocih in mladostnikih je nastop bolezni resnejši, prizadane pa podobne organe, kot pri odraslih, predvsem pa ledvice (33).

Dedovanje bolezni je poligensko, saj gre pri večini pacientov za medsebojno delovanje vsaj štirih genov (odvisno od rase in narodnosti) (29,32). Raziskave so pokazale polimorfizme v genih povezanih s prisotnostjo protiteles proti sestavinam celičnega jedra in zmanjšano aktivnostjo sistema komplementa (29). Polimorfizme so opazili tudi v številnih genih za proteine, ki so vključeni v apoptozo, razne receptorje, funkcijo celic B in T, produkcijo citokinov ter komplementa (29,30). Pri bolnikih obeh spolov so opazili tudi nenormalen metabolizem estrogenov, ki vodi v ojačano delovanje 16- $\alpha$  metabolita ter znižano raven plazemskih androgenov - slednje predvsem pri ženskah. Najverjetneje se neravnovesje med delovanjem estrogenov in androgenov kaže v številnih odstopanjih imunskega sistema, ki vključujejo celice B, celice T in celice monocitnega razreda (29).

Število celic B, ki izločajo protitelesa v periferni krvi, je pri bolnikih z aktivnim SLE tako močno povečano. Najverjetneje imajo te celice moteno toleranco za lastno ter so bolj

dovzetne za poliklonsko aktivacijo z antigeni, citokini in drugimi dražljaji, kot normalne celice (29,32). Tudi delovanje celic T je okrnjeno, njihovo celotno število je zmanjšano, do napak v njihovem delovanju pa pride že na začetku poti aktivacije. Kljub temu, da so celice aktivne, sta zmožnost proliferacije, kot odziv na stimulacijo z mitogeni ter produkcija IL-2 zmanjšani. Tako pride do pomanjkljivega odziva Th1, ki je lahko posledica vpliva citokinov Th2, napačne interakcije med APC in celicami T, pomanjkanja zaviralnega učinka citotoksičnih celic T in naravnih celic ubijalk, prisotnosti inhibitorjev IL-2 in zmanjšane izražanja receptorjev za IL-2. Opazili so tudi povečano produkcijo citokina IL-10 in INF- $\alpha$  ter zmanjšano produkcijo IL-12, kar vodi v povečano produkcijo protiteles (29,30,32). Pri pacientih z SLE pogosto odkrijejo tudi antifosfolipidna protitelesa, ki niso nujno povezana s pojavom tromboz (30).

Glavna motnja pri bolnikih z SLE je tako produkcija avtoprotiteles, usmerjenih proti številnim lastnim molekulam, ki jih najdemo v jedru (ANA), citoplazmi in na površini celice ter različnim topnim molekulam v krvi. Najverjetneje tvorijo imunske komplekse *in situ* v tkivih, kjer se nato odlagajo, kar vodi v aktivacijo komplementa in poškodbo organa (29,32). Odlaganje imunskih kompleksov je posledica okvare sistema odstranjevanja omenjenih kompleksov s fagocitnimi celicami. Okvarjen je tudi sistem odstranjevanja povečanega števila apoptotičnih celic, ki tako služijo kot antigen za sprožitev avtoaktivnih limfocitov in kot antigen za tvorbo novih imunskih kompleksov. Drugi možni mehanizem okvare tkiva je neposredno delovanje protiteles, tudi preko translokacije antigenov iz notranjosti na površino celice ali celično posredovana citotoksičnost (29,32). Pri otrocih je pogosteje zvišana koncentracija anti-DNA protiteles, kot pri odraslih (33).

## 5.10 Antifosfolipidni sindrom (APS)

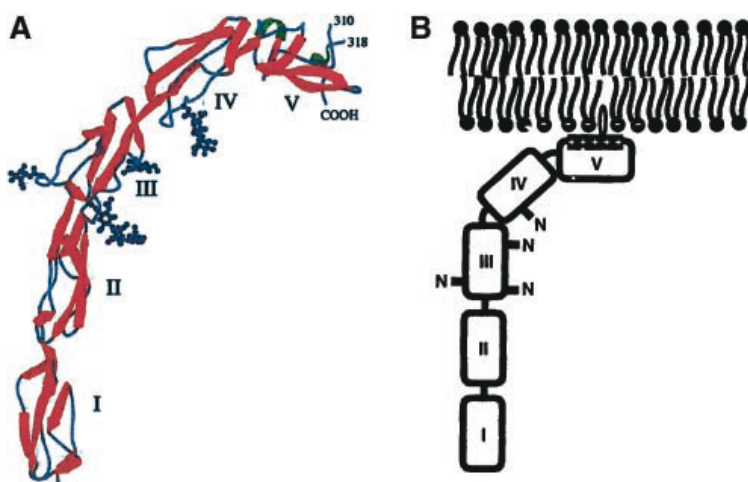
Antifosfolipidni sindrom je avtoimunska bolezen, za katero so značilna antifosfolipidna protitelesa in vsaj ena klinična manifestacija bolezni, najpogosteje je to venska ali arterijska tromboza in ponavljajoči se splavi (34). Poleg tromboz se lahko pojavijo še trombocitopenija, hemolitična anemija, livedo retikularis, prizadetost srčnih zaklopk, pljučna hipertenzija ter motnje centralnega živčevja (31). Za lažjo postavitev diagnoze, so osnovali uradni kriterij, imenovan »Sapporo kriterij«, po katerem mora bolnik ustrezati vsaj enemu kliničnemu in enemu laboratorijskemu kriteriju. Kljub postavljenim merilom, pa v vsakodnevem diagnosticiranju APS še vedno obstajajo težave, kar se kaže tudi v

dopolnitvah osnovnega kriterija, v obliki dodatnih klasifikacijskih kriterijev (35). Sindrom se lahko pojavi samostojno (primarni APS) ali v kombinaciji z boleznimi vezivnega tkiva (sekundarni APS) (34). Med 100.000 ljudmi jih za APS zboli približno 40-50. Najvišji pojav bolezni beležijo pri bolnikih s sistemskim lupusom eritematozusom, globoko vensko trombozo, možgansko kapjo pri mladih in ponavljajočimi se splavi (36).

### 5.10.1 $\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ -GPI)

$\beta_2$ -glikoprotein I ( $\beta_2$ -GPI) ali apolipoprotein H (ApoH), glavni avtoantigen za izdelovanje antifosfolipidnih protiteles, je vpleten v različne avtoimunske bolezni, kot je npr. antifosfolipidni sindrom. Vključen je tudi v proces koagulacije, tromboze, metabolizma lipidov in arterioskleroze (37). V plazmi je prisoten v koncentraciji od 10 do 300 mg/L (0,25 – 5,0  $\mu$ M), mRNA pa najdemo v endotelijskih celicah, placenti, celicah centralnega živčnega sistema in hepatocitih, največji vir sinteze so jetra (38).

Je enoverižni polipeptid z molekulsko maso 36,3, sestavljen iz 326 aminokislin, ki so urejene v pet zaporednih enot istega tipa (domena I, II, III, IV in V) (38). Domena V se



**Slika 3:**

*A - Prostorska oblika molekule humanega  $\beta_2$ -GPI*

*B - Poenostavljen prikaz vezave humanega  $\beta_2$ -GPI na celično membrano*

razlikuje od ostalih štirih, saj vsebuje 84 aminokislin, ostale pa približno 60 (35). Te dodatne aminokislone tvorijo veliko hidrofobno zanko, ki ima 200 nm dolg odsek 14 pozitivno nabitih aminokislin, kar omogoča elektrostatske interakcije z anionsko skupino fosfolipidov (35,38). V sredini tega odseka je hidrofobna skupina, ki omogoča vsidranje v membrano (38), Slika 3.

Vezavno mesto za fosfolipide v domeni V je na zunanem delu zanke, na vrhu molekule. Ko se  $\beta_2$ -GPI veže na površino celice, sta domeni I in II izpostavljeni daleč stran od površine membrane. Ker sta domeni III in IV močno glikozilirani in tako zavarovani pred interakcijami protein-protein, sta domeni I in II idealno izpostavljeni za interakcije z

drugimi proteini in omogočata vezavno mesto za npr. anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa (38). Tudi domena I vsebuje hidrofobni odsek, ki naj bi bil visoko imunogen, saj se večina protiteles veže prav nanj (35). Fiziološka vloga  $\beta_2$ -GPI ni znana, najverjetneje pa je naravni in-vivo antikoagulant, saj z vezavo na negativno nabite fosfolipide inhibira intrinzično pot strjevanja krvi (34).

### 5.10.2 Antifosfolipidna protitelesa (aPL)

Antifosfolipidna protitelesa, ki se pojavljajo pri APS so heterogena skupina med seboj sorodnih, a ne identičnih protiteles. Med njimi so: antikardiolipinska in anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa ter lupusni antikoagulant (protitelesa proti protrombinu, aneksu V,  $\beta_2$ -glikoproteinu I ( $\beta_2$ -GPI) itd.) (35,38). Kljub zavajajočemu imenu, se aPL ne vežejo direktno na anionske fosfolipide, ampak so usmerjena proti serumskim proteinom z afiniteto do anionskih fosfolipidov (38). Do sedaj so odkrili več takšnih, z APS povezanih proteinov (protrombin, protein C, protein S in aneksin V), klinično najpomembnejši pa je  $\beta_2$ -GPI (34,35). *In vivo* mehanizem, odgovoren za trombozo in spontane splave pri pacientih z APS ni popolnoma razjasnjen, identificirali pa so vrsto potencialnih patogenih poti. Antifosfolipidna protitelesa naj bi se vmešavala v koagulacijsko kaskado, kar domnevno vodi v prokoagulatorno stanje. Primeri vključujejo povečano rezistenco na aktiviran protein C in aneksin V, vpliv na pot antitrombina III, inhibicijo fibrinolize in povečano aktivnost tkivnega ter von Willebrandovega faktorja (34,35). Poročali so tudi o avtoprotitelesih proti trombomodulinu, protrombinu, proteinu C in proteinu S (39). Mehanizem patogeneze pri otrocih še ni podrobno raziskan, najverjetneje pa je isti kot pri odraslih. Razlike pa se kažejo v spektru kliničnih manifestacij, saj pri otrocih ni običajnih faktorjev tveganja, ki so prisotni pri odraslih (npr. ateroskleroza, kajenje, hipertenzija, oralni kontraceptivi, itd.), ni spontanah splavov, imunski in drugi sistemi še niso razviti popolnoma, povečan je pojav z infekcijo povzročenih protiteles, itd. Najpogosteje je APS pri otrocih povezan s pojavom arterijske ter venske tromboze in manj pogosteje z nevrološkimi in hematološkimi manifestacijami (40).

Raziskave so sicer pokazale, da so anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, raznovrstna skupina protiteles, saj so usmerjena proti vsem možnim epitopom na proteinu in ni nujno, da njihova prisotnost povzroči trombozo (35,38). Patološka naj bi bila le protitelesa proti domeni I, z aktivnostjo lupusnega antikoagulant, ki kažejo veliko korelacijo s pojavom tromboz (35).



Sam po sebi ima  $\beta_2$ -GPI relativno nizko afiniteto do negativno nabitih fosfolipidov. Prisotnost anti- $\beta_2$ -GPI protiteles omogoča navzkrižno povezovanje dveh  $\beta_2$ -GPI molekul, kar poveča njuno afiniteto do stokrat. Le kompleks protitelo- $\beta_2$ -GPI lahko vpliva na vezavo faktorjev strjevanja krvi na katalitično površino fosfolipidov, ne pa  $\beta_2$ -GPI sam (38). Vezava aPL na površino endotelijskih celic tako preko kompleksa protitelo- $\beta_2$ -GPI, vodi do celične aktivacije, kar se izraža v povečani ekspresiji površinskih celičnih adhezijskih molekul (ICAM, VCAM, E-selektin), povečanemu izločanju IL-1 $\beta$ , IL-6 in IL-8 ter prostaglandinov (38,39,41). Aktivirane endotelijske celice pa so, kot že omenjeno, znani promotorji koagulacije (38). aPL naj bi vplivali tudi na celo vrsto drugih genov za kemokine, proinflamatorne citokine, celične receptorje, rastne in transkripcijske faktorje, pro-trombotične in pro-adhezivne gene, itd. (41).

aPL preko kompleksa aktivirajo tudi monocite in trombocite (34,38). Aktivacija teh celic se kaže v agregaciji trombocitov in povečani aktivnosti tkivnega faktorja, glavnega iniciatorja kaskade strjevanja krvi (34,38). Neposredno vezanje eksogenega  $\beta_2$ -GPI na površino celic olajša stalen negativni naboj celic, povečana ekspresija negativno nabitega fosfatidilserina, na površini celic med apoptozo in specifični receptorji na zunanji membrani celic (34,39). Aktivacija vseh teh celic je tako pravzaprav posledica vezave  $\beta_2$ -GPI na specifične receptorje na površini celic in ne direktne vezave na fosfolipide (35,38). Možna je tudi aktivacija EC preko vezave anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na endogen  $\beta_2$ -GPI, ki ga EC izražajo na svoji površini (39). Aktivacija celic z aPL je ponavadi šibka in premajhna, da bi popolnoma aktivirala celico. Najverjetneje aPL le omogočijo, da postane celica bolj dovzetna za delovanje drugih aktivatorjev, ki jih lahko tako aktivirajo pri nižji koncentraciji. Tako je nujno potreben še drugi udarec (second hit). To razloži, zakaj kljub konstantni prisotnosti aPL v plazmi, bolniki ne trpijo stalno zaradi trombotičnih komplikacij. Povečano je le tveganje za nastanek tromboze oz. zapletov pri nosečnosti (38). Nekatere študije pa izpostavljajo tudi pomen drugih lastnosti protiteles – za patogenezo naj ne bi bila pomembna samo koncentracija, temveč tudi avidnost protiteles. Možno je, da se le-ta povečuje tekom razvoja bolezni (42).

## 5.11 Orodja za študij celične aktivacije

Homogeno populacijo celic, ki v *in vitro* pogojih živi in se v ustreznem gojišču razmnožuje, imenujemo celična kultura. Celične kulture omogočajo lažjo dostopnost za

opazovanje in eksperimentiranje (43), pri dokazovanju njihove aktivacije na nukleinskem in proteinskem nivoju pa se poslužujemo naslednjih metod:

### 5.11.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij željnega odseka DNA. Reakcijsko zmes za PCR sestavljajo vzorec DNA, dva oligonukleotidna začetnika, deoksinukleozid-trifosfati,  $Mg^{2+}$  ioni, reakcijski pufer in termostabilna DNA-polimeraza. Reakcija poteka ciklično, vsak cikel pa je sestavljen iz treh stopenj: denaturacije, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige. Kadar je naš vzorec RNA, ga najprej z encimom reverzno transkriptazo prepíšemo v komplementarno DNA (cDNA), ki jo nato pomnožimo s PCR (RT-PCR) (44).

### 5.11.2 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki se zaradi velikosti por v matriksu gela, uporablja predvsem za ločevanje večjih molekul, kot so npr. nukleinske kisline. Omenjena elektroforeza temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju in razlik v njihovi velikosti, zamreženost gelov pa uravnavamo z različno koncentracijo agaroze. Pri tem velja, da manjše molekule potujejo hitreje kakor večje. Poleg vzorcev, lahko v žepke nanesimo tudi standarde znanih dolžin, s pomočjo katerih določimo velikost nukleinske kisline. Detekcijo fragmentov nam omogoča gelu dodan etidijev bromid, ki se vgradi v DNA in ki pod UV-lučjo fluorescira pri 310 nm (45).

### 5.11.3 Encimsko imunska metoda (ELISA)

Metoda ELISA se odlikuje po svoji hitrosti in visoki občutljivosti, saj lahko z njo detektiramo zelo majhne koncentracije iskane molekule (celo pod 1 ng) (45). Z metodo lahko kvalitativno in kvantitativno določimo protitelesa in antigene, pri čemer moramo pripraviti umeritveno krivuljo s pomočjo znanih koncentracij preiskovane molekule. Protitelesa določujemo z indirektno ELISA-o, antigene pa s sendvič ELISA-o. Pri tej tehniki je končni produkt antigen, ujet med imobilizirano protitelo v mikrotitrski jamici in protitelo z vezanim encimom. Po dodatku substrata izmerimo absorbanco obarvanega produkta reakcije (1).

## 6 NAMEN DELA

Protitelesa anti- $\beta_2$ -GPI se pojavljajo pri številnih avtoimunskih boleznih, kot so atopični dermatitis (AD), sistemski lupus eritematosus (SLE) in antifosfolipidni sindrom (APS). Vendar pa posledice njihove prisotnosti pri boleznih niso enake. Pri APS namreč anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa povzročajo trombozo, medtem ko pri AD in SLE kljub njihovi prisotnosti tega zapleta ni vedno opaziti. Dokazano je bilo, da je razvoj tromboze na celičnem nivoju odvisen od vnetja.

Namen diplomske naloge je tako razumeti vlogo otroškega seruma, s povišano koncentracijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles na aktivacijo vnetnega odziva v endotelijskih celicah. Dokazati nameravamo hipotezo, da serumi otrok z AD povzročijo v primerjavi s serumom otrok z APS in SLE, drugačen vnetni odziv humanih koronarnih arterijskih endotelijskih celic (HCAEC).

HCAEC bomo izpostavljali serumom otrok in odraslih obolelih z APS, SLE in AD. Po 24 urni stimulaciji celic v plošči s 6 vdolbinicami, bomo naredili kolekcijo supernatantov ter izolirali mRNA. S pomočjo metod ELISA in RT-PCR bomo nato v nadaljevanju ugotovili, kako serumi obolelih vplivajo na proteinskem ter nukleinskem nivoju (mRNA) na vnetni odziv HCAEC.

### **Pri tem so cilji sledeči:**

1. Primerjava vpliva serumov otrok z AD, APS in SLE na izražanje:
  - IL-6 na nukleinskem in proteinskem nivoju
  - IL-8 in njegovega receptorja IL-8R $\beta$  na nukleinskem nivoju
  - sICAM-1 in sVCAM-1 na proteinskem nivoju
2. Primerjava vpliva serumov otrok z AD, APS in SLE na aktivacijo EC v primerjavi s serumi odraslih obolelih in zdravih otrok.

## 7 MATERIALI IN METODE

### 7.1 Materiali

#### 7.1.1 Biološki materiali

- Človeške koronarne arterijske endotelijske celice (HCAEC – Human Coronary Artery Endothelial Cells), Cambrex, Warkersville, MD, ZDA
- Gojišče za celice, v katerem je:
  - Osnovno rastno gojišče (EBM-2: Endothelium Cell Basal Medium-2, 500 ml, Clonetics<sup>®</sup>, Cambrex, Warkersville, MD, ZDA)
  - Rastno dopolnilo za gojišče (EGM<sup>®</sup>-2 MV SingleQuots, Clonetics<sup>®</sup>, Cambrex, Warkersville, MD, ZDA), ki vsebuje:
    - Fetalni goveji serum (FBS), 25 ml,
    - Hidrokortizon, 0,2 ml,
    - Rekombinantni humani fibroblastni rastni dejavnik (hFGF-B), 2 ml,
    - Rekombinantni humani vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), 0,5 ml,
    - Dolgi R rekombinantni inzulinu podobni rastni dejavnik-1 (R<sup>3</sup>-IGF-1), 0,5 ml,
    - Askorbinska kislina, 0,5 ml,
    - Rekombinantni humani epidermalni rastni dejavnik (hEGF), 0,5 ml,
    - Gentamicin sulfat, Amfotericin-B (GA-1000), 0,5 ml
- Komplet za test na bakterijske endotoksine (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT<sup>®</sup> Plus), Cambrex Bio Science, Walkersville, ZDA, v katerem je:
  - Lizat amebocitov iz raka ostvarja (*Limulus polyphemus*) (LAL), liofiliziran
  - Endotoksin 055:B5 iz bakterije E.Coli, 10 ng, liofiliziran
- Rekombinantni humani interleukin-1 $\beta$ , Biosource<sup>™</sup>, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- 9 serumov pediatričnih bolnikov\* (3 bolniki z AD, 3 bolniki s primarnim APS in 3 bolniki z SLE)
- 6 serumov odraslih bolnikov\* (3 bolniki s primarnim APS in 3 bolniki z SLE)
- 3 serumi zdravih otrok\*

- 3 serumi zdravih (odraslih) krvodajalcev\*
  - \* serumi so bili odvzeti za namen raziskav znotraj nacionalnega programa (UKC, Revmatologija) ter projekta (UKC, Pediatrija) in ne posebej za namen naše študije. Za diplomsko nalogo so bili uporabljeni ostanki serumov, ki se sicer zavržejo.

## 7.1.2 Reagenti

- Reagenti, potrebni za delo s celicami
  - 10x DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline without Ca and Mg), Biowhittaker™, Cambrex, Verviers, Belgija
  - Visoko prečiščena voda brez DNaz in RNaz (Ultra PURE™ distilled water DNase, RNase free, Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
  - Razkužilo (Kohrsolin FF), Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- Komplet za izolacijo RNA (RNAgents® Total RNA Isolation System), Promega, Madison, WI, ZDA, v katerem je:
  - RNAgents® denaturacijska raztopina (gvanidinijev tiocianat v pufru citrat/sarkozin/β-merkaptioetanol)
  - 2M natrijev acetat (pH 4,0)
  - Fenol : Kloroform : Izoamilalkohol (99 : 24 : 1, pH 4,7)
  - Izopropanol
  - Voda brez nukleaz
- Komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System), Promega, Madison, WI, ZDA, v katerem je:
  - Reverzna transkriptaza AMV (visoka koncentracija)
  - Rekombinantni RNazni inhibitor
  - Oligonukleotidni začetniki oligo(dT)
  - Mešanica dNTP
  - 10x pufer za reverzno transkripcijo
  - Magnezijev klorid (MgCl<sub>2</sub>)
  - Voda brez nukleaz
- Komplet za verižno reakcijo s polimerazo (PCR Master Mix), Promega, Madison, WI, ZDA, v katerem je:
  - Voda brez nukleaz

- PCR Master Mix, ki vsebuje:
  - *Taq*DNA polimerazo
  - ndNTP
  - Magnezijev klorid (MgCl<sub>2</sub>)
  - Pufer (pH 8,5)
- Oligonukleotidni začetniki (Small Sequence Detection Primers), Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Velika Britanija (Tabela 1)
- Gel marker (BlueJuice™ Gel Loading Buffer), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- Označevalec velikosti DNA fragmetov (50 bp DNA Ladder - Low range DNA marker), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- 4% agarozni gel (E-Gel® Agarose Gels), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- Analizni komplet za IL-6 ELISA (Human IL-6 Immunoassay Kit), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA, v katerem je:
  - Rekombinantni človeški IL-6, standard
  - Pufer za redčenje standarda (*Standard Diluent Buffer*)
  - Mikrotitrna ploščica s pripetimi protitelesi proti človeškemu IL-6 (96 luknjic)
  - Anti-IL-6 protitelo s konjugiranim biotinom
  - Streptavidin peroksidaza (HRP), koncentrat
  - Raztopina za redčenje streptavidin peroksidaze (*Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent*)
  - Koncentrirani pufer za spiranje (25x) (*Wash Buffer Concentrate*)
  - Stabilizator kromogena
  - Stop raztopina
  - Adhezivni strip za pokrivanje ploščice
- Analizni komplet za sICAM-1 ELISA (Human sICAM-1 Immunoassay Kit), BioSource, Nivelles, Belgija, v katerem je:
  - Ploščica s pripetimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu sICAM-1 (96 luknjic)
  - Anti-sICAM-1 monoklonsko protitelo s konjugiranim HRP (koncentrat)
  - Standard sICAM-1 (10 µg/L)
  - Koncentrirani pufer za spiranje (20x)
  - Raztopina za redčenje vzorca

- Koncentrirani pufer za Assay (20x)
- Raztopina s substratom (tetrametilbenzidin)
- Stop raztopina
- Držalo za trake
- Adhezivni pokrov za ploščice
- Analizni komplet za sVCAM-1 ELISA (Human sVCAM-1 Immunoassay Kit), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA, v katerem je:
  - Rekombinantni človeški sVCAM-1, standard
  - Pufer za redčenje standarda (*Standard Diluent Buffer*)
  - Ploščica s pripetimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu sVCAM-1 (96 luknjic)
  - Anti-sVCAM-1 protitelo s konjugiranim biotinom
  - Streptavidin peroksidaza (HRP), koncentrat
  - Raztopina za redčenje streptavidin peroksidaze (*Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent*)
  - Koncentrirani pufer za spiranje (25x) (*Wash Buffer Concentrate*)
  - Stabilizator kromogena
  - Stop raztopina
  - Adhezivni strip za pokrivanje ploščice

**Tabela 1: Sekvence oligonukleotidnih začetnikov za preiskovane gene**

mRNA	Sekvenca oligonukleotidnega začetnika	Dolžina fragmenta
β-aktin	S 5'-ACT TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'	838 bp
	AS 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'	
Interlevkin-6	S 5'-ATG AAC TCC TCC TCC ACA AGC GC-3'	628 bp
	AS 5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'	
Interlevkin-8	S 5'-CAA GGA GTG CTA AAG AAC T-3'	187 bp
	AS 5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT-3'	
Interlevkin-8Rβ (1. stopnja)	S 5'-GGA CTC CTC AAG ATT CTA GCT ATA C-3'	578 bp
	AS 5'-GTA TGC AGA GCT GTC TCA CTG GAG-3'	
Interlevkin-8Rβ (2. stopnja)	S 5'-GGC TTG ATC AGC AAG GAC TCC CTG C-3'	290 bp
	AS 5'-TTA TGG CAA GGG GTG AGG CAC CAG-3'	

### 7.1.3 Aparature in ostali materiali

- Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka: LaminAir 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- Mikroskop: BH-2, Olympus, Tokyo, Japonska
- Inkubator: Heto Holten Cellhouse tip 154, Astel, Francija
- Avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- Centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- Vodna kopel: TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- Vodna kopel, tip 1003, GFL, Burgwedel, Nemčija
- Vakuumska črpalka za odsesavanje gojišča: Vacuum pump XF5423050, Milipore, Schwalbach, Nemčija
- Spektrofotometer: Camspec M-501, Cambridge, Velika Britanija
- Aparat za RT-PCR: Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA
- Aparat za slikanje gelov: G:Box from Syngene, Cambridge, Velika Britanija
- Kasetna za gel: E-Gel<sup>®</sup> PowerBase<sup>™</sup>, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- Vrtinčnik-vortex, Assister, Nemčija
- Čitalec mikrotitrskih plošč Tecan
- 6 prekatne testne plošče za celične kulture (Tissue culture test plates), TPP, Trasadingen, Švica
- Pipete: Eppendorf<sup>®</sup> research (adjustable)
- Pipete: Eppendorf<sup>®</sup> research (multi-channel)
- Pipete: Biohit Mechanical pipettes, Biohit, Helsinki, Finska
- Serološki pipetni nastavki (10 ml, 25 ml), Dispenser, TPP, Trasadingen, Švica
- Pipeta za serološke nastavke: Biohit Midi Plus, Biohit, Helsinki, Finska
- Centrifugirne epruvete (15 ml, 50 ml) (Centrifuge tubes), TPP, Trasadingen, Švica
- Steklene epruvete
- Strgalo za celice (13 mm) (Cell scraper), TPP, Trasadingen, Švica
- Standardne epruvete (1,5 ml) (Standard Micro Test Tube), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- 70 µl kvarčna kiveta: Camspec, QS, 10.00 mm, Cambridge, Velika Britanija



- Epruvete PCR (0,2 ml), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Pipetni nastavki (10 µl, 100 µl, 1000 µl): ep T.I.P.S., Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Pipetni nastavki s filtrom (10 µl, 100 µl, 1000 µl): ep Dualfilter T.I.P.S., Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Pipetni nastavki (100 µl): Neptune™ Barrier Tips 100, CLP, Kampenhout, Belgija
- Programska oprema za obdelavo gelov: GeneTools from Syngene, Cambridge, Velika Britanija

## 7.2 Metode

### 7.2.1 Preverjanje ustreznosti vzorcev

Prisotnost interleukina-6 v vzorcih smo določevali z encimsko imunskim testom ELISA, za neprimeren vzorec pa smo smatrali tiste, katerih vsebnost IL-6 je presegala količino 7 ng/L. Rezultati merjenja so predstavljeni v Tabeli 17 in Tabeli 18 (stran 42, 43). Podroben postopek določevanja koncentracije IL-6 z ELISA-o je opisan pod točko 7.2.8.

Endotoksine smo določevali s pomočjo kvalitativnega testa na endotoksine Gram negativnih bakterij (Limulus Amebocyte Lysate, PYROGENT® Plus) – LAL test. Test temelji na reakciji med strjevalnim proteinom v amebocitih raka ostvarja in endotoksini bakterij. Reakcija je encimska, pri tem pa nastane želatinast gel (46). Liofiliziran lizat amebocitov v viali smo raztopili v 5,2 ml sterilne vode in dobili zadostno količino lizata za testiranje 50-ih vzorcev. Sledilo je rahlo stresanje raztopine, pri čemer smo morali paziti, da ni nastala pena. Endotoksin bakterije E.Coli v viali smo raztopili s 5 ml sterilne vode in raztopino približno 15 minut stresali na vrtničniku. Nato smo 0,1 ml te raztopine v sterilizirani stekleni epruveti razredčili na 1,0 EU/ml. Količino vode, ki jo je bilo potrebno dodati, smo določili po naslednjem računu (Enačba 1):

$$V_{H_2O} \text{ (ml)} = 0,1 (X-1),$$

**Enačba 1:** *Izračun potrebne vode za redčenje raztopine endotoksina na 1 EU/ml*

pri čemer je X koncentracija endotoksina v EU/ml, deklarirana na analiznem certifikatu posameznega kita. Osnovno raztopino smo nato postopoma v ločenih sterilnih steklenih

epruветah redčili, tako da smo dobili raztopine različnih koncentracij, ki so nam služile kot pozitivna kontrola (standardi) (Tabela 2).

**Tabela 2: Prikaz priprave različnih koncentracij endotoksina**

Epruveta	Volumen vode	Volumen raztopine dodane vodi	Koncentracija endotoksina
1	1 ml	1 ml iz 1EU/ml	0,5 EU/ml
2	1 ml	1 ml iz Epr. 1	0,25 EU/ml
3	1 ml	1 ml iz Epr. 2	0,12 EU/ml
4	1 ml	1 ml iz Epr. 3	0,06 EU/ml
5	1 ml	1 ml iz Epr. 4	0,03 EU/ml

Po pripravi vseh potrebnih raztopin smo v sterilne steklene epruvete prenesli ločeno po 0,1 ml standardov, vzorcev in sterilne vode (negativna kontrola). Pri tem smo morali paziti, da med prenašanjem ni prišlo do kontaminacije z mikroorganizmi ali endotoksini. Sledil je dodatek 0,1 ml raztopljenega lizata v vsako epruveto. Po dodatku lizata smo epruveto močno pretresli, jo zatesnili s parafilmom in postavili v inkubator na 37 °C za 60 minut. Postopek smo ponovili za vse epruvete. Po pretečenem času smo epruvete vzeli iz inkubatorja, jih obrnili za 180° in preverili morebiten nastanek gela.

## 7.2.2 Izvedba eksperimenta

Koronarne arterijske endotelijske celice, s katerimi smo izvajali eksperiment, so pripadale 58 let stari belki. Celice, ki so jih predhodno ustrezno gojili in jih nato zamrznili, smo odmrznili in jih kot 5. pasažo precepili v 6 prekatno testno ploščo za celične kulture, jim na dva dni menjavali gojišče ter jih gojili v inkubatorju (Heto Holten Cellhouse) pri točno določenih pogojih: 37 °C, 5% atmosferi CO<sub>2</sub> ter 100% relativni vlažnosti dokler niso prerasle 90% površine vdolbinic (konfluentna rast). Pri tem smo za vsak eksperiment uporabili dve testni plošči, vse poskuse pa smo opravili v dvojniku. Pred izvedbo eksperimenta smo celicam zamenjali gojišče s svežim na 37°C segretim gojiščem, ki ni vsebovalo FBS in jih za 2 uri postavili nazaj v inkubator. Sledila je ponovna odstranitev medija celicam z vakuumsko črpalko ter nanos 2 ml svežega gojišča, prav tako brez FBS. V vdolbinice s celicami smo nato nanесли po 4 µl stimulatorja IL-1β razredčenega v razmerju 1:50 (vdolbinici 3 in 4 na 1. ploščici), ki nam je služil kot pozitivna kontrola oz. 20 µl ustreznega seruma preiskovancev (vdolbinice 5 in 6 na 1. ploščici; vdolbinice 1 - 6 na 2. ploščici). V vdolbinici 1 in 2 na 1. ploščici nismo dajali ničesar in sta nam služili kot

ozadje. Da so se tekočine med seboj pomešale, smo ploščico na rahlo pretresli, ter celice za 24 ur dali nazaj v inkubator. Sledila je kolekcija supernatantov. 1 ml supernatanta smo prenesli v 1,5 ml epruvete, kjer smo ga 1 minuto centrifugirali pri sobni temperaturi na 14.000 x g. Nato smo 900 µl dobljenega supernatanta odpipetirali v čiste 1,5 ml epruvete ter jih shranili na -20°C. Preostali medij na ploščici smo odstranili z vakuumsko črpalko in celice enkrat spirali z 2 ml ledeno mrzlega DPBS. Celicam smo nato dodali 300 µl ledenega denaturacijskega pufra ter mešali, dokler ni raztopina postala viskozna. Nato smo testne ploščice do izvedbe izolacije RNA shranili na -80°C. Celotno rokovanje s celicami je potekalo v aseptični komori z laminarnim pretokom zraka ob uporabi sterilnih pipetnih nastavkov.

### 7.2.3 Izolacija RNA

Izolacijo RNA smo izvajali v digestoriju na ledu. Zamrznjene plošče s celicami, ki smo jih hranili na -80°C, smo odtajali in 300 µl denaturacijskega pufra s celicami prenesli v 1,5 ml epruvete in jih takoj zvrtnčili. Celice smo nato 5 minut inkubirali na ledu in jih vmes trikrat premešali na vrtinčniku. Sledil je dodatek 30 µl 2M natrijevega acetata in mešanje tekočine v epruvetah s petkratnim obračanjem. Celicam smo nato dodali 300 µl mešanice fenol:kloroform:izoamilalkohol (PhOH/CHCl<sub>3</sub>/IAA), ki smo jo vzeli iz spodnje organske faze raztopine. Zopet je sledilo mešanje s petkratnim obračanjem ter močno stresanje približno 10 sekund in 15-minutna inkubacija na ledu. Epruvete smo nato dali v na 4°C ohlajeno centrifugo (Sigma 3K30, program 26) ter jih centrifugirali 20 minut pri 10.000 x g. Pri tem je prišlo do ločbe med organsko fazo ter vodno fazo. Zgornjo vodno fazo smo nato prenesli v novo epruveto in ji dodali enako količino izopropanola, s čimer smo omogočili precipitacijo RNA. Raztopino smo premešali s petkratnim obračanjem ter jo 50 minut inkubirali na -20°C. Nato smo epruvete dali za 20 minut v ohlajeno centrifugo (4°C) in centrifugirali pri 10.000 x g. Dobljeni oborini na dnu epruvete smo pazljivo odstranili supernatant ter jo sprali z 1,0 ml 75% ledenomrzlega etanola. Epruvete smo premešali s petkratnim obračanjem in jih 20 minut centrifugirali (4°C, pri 10.000 x g). Končni oborini smo ponovno odstranili supernatant in jo sušili v laminariju približno 90 minut. Po končanem sušenju smo oborini dodali 30 µl vode brez nukleaz ter epruvete 10 minut inkubirali v vodni kopeli GFL, tip 1003, pri 56°C. Raztopino z RNA smo premešali s petkratnim pipetiranjem ter odmerili 2,3 µl tekočine v že pripravljene epruvete za

določanje koncentracije RNA. Preostanek raztopine smo shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$  za RT-PCR reakcije.

#### 7.2.4 Določanje koncentracije RNA z UV spektrofotometrijo

Čistost in izkoristek RNA smo določali s pomočjo UV spektrofotometra Camspec M-501. V 1,5 ml epruvete smo odpipetirali točno 67,7  $\mu\text{l}$  vode brez nukleaz ter ji dodali 2,3  $\mu\text{l}$  ustrezne izolirane RNA iz vzorca, s čimer smo raztopino RNA razredčili 30x. Nato smo 70  $\mu\text{l}$  razredčene raztopine odpipetirali v kvarčno kiveto, pri čemer smo morali paziti, da zunanje stene kivete niso bile omočene, saj bi to pomenilo napako v merjenju absorbance. V ta namen smo stene kivete pred merjenjem obrisali s staničevino. Absorbanco vzorca smo v spektrofotometru izmerili pri dveh valovnih dolžinah ( $\lambda$ ) - 260 in 280 nm. Postopek smo ponovili za vse vzorce. Na ta način smo z razmerjem med absorbanco pri 260 nm in absorbanco pri 280 nm dobili podatek o čistosti izolirane RNA, saj je  $A_{260}/A_{280}$  pri čistem vzorcu nukleinske kisline med 1,8 in 2,0.

Za čisto raztopino nukleinske kisline s koncentracijo 40 mg/L velja, da je absorbanca pri valovni dolžini 260 nm in dolžini optične poti 1 cm enaka 1, kar omogoči izračun koncentracije RNA po Enačbi 2:

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

30 . . . redčitev vzorca iz 2,3  $\mu\text{l}$  na 70  $\mu\text{l}$

40 . . . koncentracija RNA pri absorbanci 1

**Enačba 2:** *Izračun koncentracije RNA*

#### 7.2.5 Reverzna transkripcija

S postopkom reverzne transkripcije smo enoverižno RNA prevedli v dvoverižno (komplementarno) cDNA, ki nam je kasneje služila kot matrica za PCR. Najprej smo si v 1,5 ml epruveto pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala RT pufer, deoksiribonukleotide (dNTP), magnezijev klorid ( $\text{MgCl}_2$ ), začetne oligonukleotide (oligo dT), RNAzni inhibitor, reverzno transkriptazo virusa Avian Myeloblastosis (AMV RT) in vodo brez nukleaz (Tabela 3). Volumen uporabljenih reagentov je bil odvisen od števila vzorcev, vedno pa smo vzeli prebitek v količini za en vzorec. Reagente in vzorce smo med delom hranili na ledu, uporabljali pa smo sterilne nastavke in avtoklavirane epruvete. Da

smo na koncu v vseh PCR epruветah dobili enako količino cDNA, je bilo potrebno najprej izračunati kolikšen volumen raztopine izolirane RNA in vode moramo reakcijski mešanici za RT dodati. Po protokolu imata voda in vzorec RNA skupni volumen 15,6  $\mu$ l, ustrezne volumne pa smo izračunali z Enačbo 3 in Enačbo 4.

$$V_{\text{vzorec}} (\mu\text{l}) = 1000 \mu\text{g}/C_{\text{RNA}}$$

$$V_{\text{vode}} (\mu\text{l}) = 15,6 \mu\text{l} - V_{\text{vzorec}}$$

**Enačba 3:** Izračun volumna vzorca za RNA

**Enačba 4:** Izračun volumna vode

V avtoklavirane epruvete PCR smo nato prenesli 14,4  $\mu$ l reakcijske mešanice in ji dodali preračunano količino vode in vzorca tako, da je skupen volumen raztopine znašal 30  $\mu$ l. Napolnjene epruvete smo nato premešali na vrtinčniku in jih ustrezno označene vstavili v aparat za RT-PCR: Thermal Cycler 2720. Program za reverzno transkripcijo je predstavljen v Tabeli 4.

**Tabela 3:** Sestava reakcijske mešanice za reakcijo reverzno transkripcije za en vzorec

Reagenti	Količina ( $\mu$ l)
10x RT pufer	3
dNTP	3
MgCl <sub>2</sub>	6
oligo dT	1
RNAzni inhibitor	0,75
AMV RT	0,6
H <sub>2</sub> O brez nukleaz	0,05

**Tabela 4:** Program za reverzno transkripcijo

Temperatura (°C)	Čas (min)
43	30
53	30
94	5

## 7.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR nam omogoča pomnožitev točno določenega fragmenta cDNA do velikega števila kopij (45). Za ocenitev količine podvojene cDNA v posameznih vzorcih, smo za kontrolni gen izbrali  $\beta$ -aktin. V 1,5 ml epruветi smo najprej pripravili reakcijsko mešanico za verižno reakcijo s polimerazo, katere volumen je bil odvisen od števila vzorcev. Sestava reakcijske mešanice je predstavljena v Tabeli 5. Izbira začetnega oligonukleotida F in R je

bila odvisna od fragmenta DNA, ki smo ga želeli podvojiti. Začetne oligonukleotide smo pred uporabo redčili v razmerju 1:10 tako, da smo v 1,5 ml epruveti zmešali 90 µl vode brez nukleaz in 10 µl raztopine oligonukleotidnega začetnika.

**Tabela 5: Sestava reakcijske mešanice za PCR za en vzorec**

Reagent	Količina (µl)
PCR Master Mix	12,5
F začetni oligonukleotid	1,25
R začetni oligonukleotid	1,25
H <sub>2</sub> O brez nukleaz	7

Po kratkem stresanju na vrtinčniku, smo mešanico razdelili v označene epruvete PCR po 22 µl in dodali 3 µl ustreznega vzorca iz RT reakcije. Naredili smo tudi negativno kontrolo tako, da smo namesto vzorca mešanici dodali 3 µl vode brez nukleaz. Epruvete smo nato premešali na vrtinčniku, jih tesno zaprli, dali v aparat za RT-PCR: Thermal Cycler 2720 ter nastavili ustrezen program za podvojevanje. Med delom smo reagente in vzorce hranili na ledu, uporabljali sterilne nastavke in avtoklavirane epruvete. Program za verižno reakcijo s polimerazo za različne gene je predstavljen v Tabeli 6.

**Tabela 6: Program za verižno reakcijo s polimerazo za različne gene**

mRNA	Denaturacija	Prileganje oligonukleotidov	Pomnoževanje	Število ciklov
β-aktin	94°C 1 minuta	59°C 1 minuta	72°C 1,5 minute	25
IL-6	94°C 1 minuta	50°C 1 minuta	72°C 1,5 minute	30
IL-8	94°C 1 minuta	37°C 1 minuta	72°C 1,5 minute	30
Interlevkin-8Rβ (1. stopnja)	94°C 1 minuta	50°C 1 minuta	72°C 1 minuta	30
Interlevkin-8Rβ (2. stopnja)	94°C 45 sekund	57°C 45 sekund	72°C 45 sekund	30

### 7.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

Pri agarozni gelski elektroforezi ločujemo nukleinske kisline na osnovi naboja in velikosti (45). V 1,5 ml epruveti smo pripravili mešanico za gel z gel markerjem, katere sestava je predstavljena v Tabeli 7. Mešanico smo za nekaj sekund postavili na vrtinčnik in jo po 7,5

μl prenesli v označene epruvete PCR. V vsako epruveto smo nato dodali 12,5 μl produkta iz PCR in jih premešali na vrtinčniku.

**Tabela 7: Sestava mešanice za gel za en vzorec**

Reagent	Količina (μl)
Blue Juice Buffer	2
H <sub>2</sub> O brez nukleaz	5,5

Poleg vzorcev in negativne kontrole smo pripravili tudi raztopino z znanimi standardnimi dolžinami DNA fragmentov. V ta namen smo v epruveto PCR dodali 19,5 μl vode brez nukleaz in 0,5 μl 50 bp označevalca velikosti (50 bp DNA Ladder) ter vse skupaj premešali. Elektroforezo smo izvajali na 4% agaroznem gelu (E-Gel<sup>®</sup> Agarose Gels), z že vključenim etidijevim bromidom. Gel smo postavili v kaseto za gel in izvedli dvominutno predelektroforezo. Nato smo glavniček gela odstranili in v prvo luknjico nanесли označevalec velikosti, v ostale luknjice pa po 20 μl ustreznega vzorca oz. negativno kontrolo. Po 30 minutni elektroforezi smo gel prenesli v aparat G:Box, kjer smo z UV metodo detektirali posamezne fragmente DNA. Gel smo slikali s pomočjo programa GeneSnap pri različnih časih ekspozicije, od katerih je bil najboljši pri 400 ms. Nato smo sliko na računalniku prenesli v program GeneTools, kjer smo s pomočjo denzitometrije izračunali površino pod krivuljo za posamezen fragment. Podatke smo nato v programu Excel normalizirali glede na izražanje β-aktina v posameznem vzorcu in jih tudi grafično ponazorili.

## 7.2.8 Določanje koncentracij vnetnih mediatorjev

Po 24-urni stimulaciji smo celicam odvzeli supernatant, v katerega so celice tekom stimulacije izločile številne proteine. Z encimskim imunskim testom (sendvič ELISA) smo v supernatantu določili indikatorje celične aktivacije IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1.

### 7.2.8.1 Določanje koncentracije IL-6

Za spiranje mikrotitrne ploščice s pripetimi protitelesi proti IL-6 smo pripravili pufer za spiranje tako, da smo en del koncentrata razredčili s 24 deli deionizirane vode. Pred nanosom raztopin na ploščico so morali biti vsi reagenti segreti na sobno temperaturo. Nato smo pripravili IL-6 standarde (Hu IL-6). Osnovni Hu IL-6 standard smo s pufrom za

redčenje standarda po navodilu na viali razredčili na koncentracijo 2500 ng/L. Vialo smo narahlo pomešali in pustili stati 10 minut. Osnovno raztopino standarda Hu IL-6 smo nato v eprugetah redčili tako, da smo dobili standarde različnih koncentracij. Med vsakim korakom smo vsebino epruget dobro premešali na vrtničniku. Način redčenja in končne koncentracije standardov so prikazani v Tabeli 8.

**Tabela 8: Prikaz redčenja standardov Hu IL-6**

Epruveta	Volumen pufru za redčenje (µl)	Volumen dodanega standarda (µl)	Koncentracija standarda (ng/L)
viala	/	/	2500
1	800	200 iz viala	500
2	300	300 iz epruvete 1	250
3	300	300 iz epruvete 2	125
4	300	300 iz epruvete 3	62,5
5	300	300 iz epruvete 4	31,2
6	300	300 iz epruvete 5	15,6
7	300	300 iz epruvete 6	7,8
8	300	/	0

Sledil je nanos 100 µl raztopine za redčenje v vdolbinico za slepo vrednost ter v preostale ustrezne vdolbinice po 100 µl standarda ali vzorca. Vzorec, kjer smo za stimulacijo celic uporabili IL-1β smo pred nanosom 50x redčili. Vse raztopine smo nanašali v dvojniku, vdolbinico za kromogen slepo pa smo pustili prazno. Nato smo v vse vdolbinice, razen kromogen slepo, nanесли 50 µl biotin konjugata, nežno pomešali, ploščico pokrili in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo pripravili raztopino streptavidin peroksidaze (HRP). Količina pripravljene raztopine je bila odvisna od števila trakov, veljalo pa je pravilo, da se za vsak trak z 8 vdolbinicami razredči 10 µl streptavidin peroksidaze (HRP) koncentrata z 1 ml raztopine za redčenje streptavidin peroksidaze. Po inkubaciji smo tekočino na ploščici odlili in jo 4x spirali s pufrom za spiranje. Sledil je nanos 100 µl raztopine streptavidin peroksidaze v vse vdolbinice, razen v kromogen slepo. Ploščico smo zopet pokrili in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo tekočino na ploščici ponovno odlili in jo 4x spirali s pufrom za spiranje. Nato smo v vse vdolbinice dodali 100 µl stabilizatorja kromogena. Sledila je 30 minutna inkubacija na temnem pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice dodali 100 µl stop raztopine. S čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan smo nato izmerili absorbanco pri 450 nm ter s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo IL-6 v vzorcih.



### 7.2.8.2 Določanje koncentracije sICAM-1

Pred pričetkom merjenja koncentracije sICAM-1 so morali biti vsi reagenti in vzorci segreti na sobno temperaturo. Najprej smo pripravili raztopino za spiranje tako, da smo 50 ml koncentrata razredčili z 800 ml (20x) deionizirane vode. Razredčili smo tudi 5,0 ml pufru za Assay s 95 ml deionizirane vode. Nato smo se iz osnovne raztopine standarda (10 µg/L) v viali lotili priprave standardov različnih koncentracij. Med vsakim korakom smo vsebino epruvet dobro premešali na vrtinčniku. Način redčenja in končne koncentracije standardov so predstavljeni v Tabeli 9.

**Tabela 9: Prikaz redčenja standardov sICAM-1**

Epruveta	Volumen pufru za redčenje (µl)	Volumen dodanega standarda (µl)	Koncentracija standarda (µg/L)
viala	/	/	10
1	250	250 iz viala	5
2	250	250 iz epruvete 1	2,5
3	250	250 iz epruvete 2	1,25
4	250	250 iz epruvete 3	0,625
5	250	/	0

Pred nanosom raztopin na mikrotitrsko ploščico s pripetimi protitelesi proti sICAM-1 smo ploščico 2x spirali s 300 µl razredčene raztopine za spiranje. Pri tem smo morali paziti, da ni kaj raztopine za spiranje ostalo v vdolbinicah. Sledil je nanos 100 µl raztopine za redčenje v vdolbinico za slepo vrednost ter po 100 µl standarda ali vzorca v preostale ustrezne vdolbinice. Vse raztopine smo nanašali v dvojniku. Tik pred uporabo smo s pufrom za Assay iz koncentrata pripravili raztopino HRP-konjugata in jo po 50 µl nanesli v vse vdolbinice na ploščici, vključno z vdolbinico za slepo vrednost. Ploščico smo pokrili in inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi na rotorju pri 1,67 s<sup>-1</sup>. Po pretečenem času smo tekočino na ploščici odlili, jo 3x spirali in v vse vdolbinice odpipetirali po 100 µl raztopine s substratom, tetrametilbenzidinom. Sledila je 10 minutna inkubacija ploščice pri sobni temperaturi na rotorju pri 1,67 s<sup>-1</sup>. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 100 µl stop raztopine in s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan izmerili absorbanco pri 450 nm. Koncentracijo sICAM-1 v vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje.

### 7.2.8.3 Določanje koncentracije sVCAM-1

Za spiranje mikrotitrne ploščice s pripetimi protitelesi proti sVCAM-1 smo pripravili pufer za spiranje tako, da smo en del koncentrata razredčili s 24 deli deionizirane vode. Pred nanosom raztopin na ploščico so morali biti vsi reagenti segreti na sobno temperaturo. Nato smo pripravili sVCAM-1 standarde. Osnovni sVCAM-1 standard smo s pufrom za redčenje standarda po navodilu na viali razredčili na koncentracijo 750 µg/L. Vialo smo narahlo pomešali in pustili stati 10 minut. Osnovno raztopino standarda sVCAM-1 smo nato v epruvetah redčili tako, da smo dobili standarde različnih koncentracij. Med vsakim korakom smo vsebino epruvet dobro premešali na vrtinčniku. Način redčenja in končne koncentracije standardov so prikazani v Tabeli 10.

**Tabela 10: Prikaz redčenja standardov sVCAM-1**

<b>Epruveta</b>	<b>Volumen pufera za redčenje (µl)</b>	<b>Volumen dodanega standarda (µl)</b>	<b>Koncentracija standarda (µg/L)</b>
viala	/	/	750
1	900	100 iz viala	75
2	300	300 iz epruvete 1	37,5
3	300	300 iz epruvete 2	18,7
4	300	300 iz epruvete 3	9,37
5	300	300 iz epruvete 4	4,69
6	300	300 iz epruvete 5	2,34
7	300	300 iz epruvete 6	1,17
8	300	/	0

Sledil je nanos 100 µl raztopine za redčenje v vdolbinico za slepo vrednost ter v preostale ustrezne vdolbinice po 100 µl standarda oz. vzorca. Vse raztopine smo nanašali v dvojniku, vdolbinico za kromogen slepo pa smo pustili prazno. Nato smo v vse vdolbinice, razen kromogen slepo, nanесли 50 µl biotin konjugata, nežno pomešali, ploščico pokrili in inkubirali 2 uri pri 37°C. Med inkubacijo smo pripravili raztopino streptavidin peroksidaze (HRP). Količina pripravljene raztopine je bila odvisna od števila trakov, veljalo pa je pravilo, da se za vsak trak z 8 vdolbinicami razredči 10 µl streptavidin peroksidaze (HRP), koncentrata z 1 ml raztopine za redčenje streptavidin peroksidaze. Po inkubaciji smo tekočino na ploščici odlili in jo 4x spirali s pufrom za spiranje. Sledil je nanos 100 µl raztopine streptavidin peroksidaze v vse vdolbinice, razen v kromogen slepo. Ploščico smo zopet pokrili in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo tekočino na

ploščici ponovno odlili in jo 4x spirali s pufrom za spiranje. Nato smo v vse vdolbinice dodali 100  $\mu$ l stabilizatorja kromogena. Sledila je 30 minutna inkubacija na temnem pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice dodali 100  $\mu$ l stop raztopine. S čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan smo nato izmerili absorbanco pri 450 nm ter s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo sVCAM-1 v vzorcih.

### 7.3 Eksperimentalno delo

Eksperiment smo izvedli na 5. pasaži celic HCAEC, ki smo jih nasadili v 6-prekatne plošče in jih gojili do konfluentnosti. 2 uri pred eksperimentom smo celicam odstranili staro gojišče in ga zamenjali s svežim gojiščem brez FBS. Postopek smo ponovili tik pred eksperimentom, ko smo v 2 ml gojišča dodali še različne stimulatorje (IL-1 $\beta$  oz. serume otrok in odraslih) in celice ponovno 24 ur inkubirali. Vzorce smo izbrali na podlagi prisotnosti anti- $\beta_2$ -GPI v serumu. Podatki o pacientih in zdravih preiskovancih, katerih serume smo uporabili pri izvedbi eksperimenta, so predstavljeni v Tabeli 17 in Tabeli 18.

Pri pediatričnih pacientih smo nanose izvedli na sledeči način: pri 1. ploščici smo vdolbinici 1 in 2 pustili prazni in si tako zagotovili meritev slepe vrednosti (B). Sledil je nanos stimulatorja IL-1 $\beta$  (1000 ng/L) v vdolbinici 3 in 4, ki je služil kot pozitivna kontrola. V vdolbinici 5 in 6 pa smo dodali serume obolelih za PAPS. Na 2. ploščico smo v vdolbinici 1 in 2 nanесли serume obolelih za SLE, v vdolbinici 3 in 4 serume obolelih za AD, v zadnji dve vdolbinici, 5 in 6, pa smo dodali serume zdravih preiskovancev (N). Pregled uporabljenih stimulatorjev in volumen njihovega nanosa pri ugotavljanju vpliva seruma otrok na vnetni odziv HCAEC, je predstavljen v Tabeli 11, Tabeli 12 in Tabeli 13. Nekateri eksperimente smo zaradi slabe izolacije mRNA naredili dvakrat.

**Tabela 11: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri pediatričnih preiskovancih za eksperiment 1 in 4**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	S136	20 $\mu$ l
2	/	/	/	2	SLE	S136	20 $\mu$ l
3	IL-1 $\beta$	/	4 $\mu$ l	3	AD	G488	20 $\mu$ l
4	IL-1 $\beta$	/	4 $\mu$ l	4	AD	G488	20 $\mu$ l
5	PAPS	S475	20 $\mu$ l	5	N	E1172	20 $\mu$ l
6	PAPS	S475	20 $\mu$ l	6	N	E1172	20 $\mu$ l

**Tabela 12: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri pediatričnih preiskovancih za eksperiment 2**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	S326	20 µl
2	/	/	/	2	SLE	S326	20 µl
3	IL-1β	/	4 µl	3	AD	H103	20 µl
4	IL-1β	/	4 µl	4	AD	H103	20 µl
5	PAPS	R733	20 µl	5	N	E1179	20 µl
6	PAPS	R733	20 µl	6	N	E1179	20 µl

**Tabela 13: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri pediatričnih preiskovancih za eksperiment 3**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	S299	20 µl
2	/	/	/	2	SLE	S299	20 µl
3	IL-1β	/	4 µl	3	AD	G828	20 µl
4	IL-1β	/	4 µl	4	AD	G828	20 µl
5	PAPS	S594	20 µl	5	N	E1176	20 µl
6	PAPS	S594	20 µl	6	N	E1176	20 µl

Pri odraslih pacientih je bil nanos nekoliko drugačen, saj nismo uporabili serumov odraslih obolelih za atopičnim dermatitisom. V vdolbinici 5 in 6 na 2. ploščici smo v nekaterih primerih dodali serume obolelih za PAPS in za SLE, ki smo ga predhodno že nanosili v dvojniku na 1. oz. 2. ploščico. Nekatere vzorce odraslih pacientov smo tako naredili v trojniku. Pri eksperimentih 7 in 8 smo v primeru bolnika s PAPS pomotoma uporabili napačen vzorec, zato podatki niso prikazani. Pregled uporabljenih stimulatorjev in volumen njihovega nanosa pri ugotavljanju vpliva seruma odraslih na vnetni odziv HCAEC, je predstavljen v Tabeli 14, Tabeli 15 in Tabeli 16. Tudi tu smo nekatere eksperimente zaradi slabe izolacije mRNA naredili dvakrat.

**Tabela 14: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri odraslih preiskovancih za eksperiment 5 in 9 (trojnik smo naredili le pri eksp. 9)**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	Q927	20 µl
2	/	/	/	2	SLE	Q927	20 µl
3	IL-1β	/	4 µl	3	N	1440 626	20 µl
4	IL-1β	/	4 µl	4	N	1440 626	20 µl
5	PAPS	P372	20 µl	5	(PAPS)	(P372)	(20 µl)
6	PAPS	P372	20 µl	6	(SLE)	(Q927)	(20 µl)

**Tabela 15: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri odraslih preiskovancih za eksperiment 6**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	O495	20 µl
2	/	/	/	2	SLE	O495	20 µl
3	IL-1β	/	4 µl	3	N	1440 624	20 µl
4	IL-1β	/	4 µl	4	N	1440 624	20 µl
5	PAPS	P54	20 µl	5	/	/	/
6	PAPS	P54	20 µl	6	/	/	/

**Tabela 16: Uporabljeni stimulatorji in volumen njihovega nanosa pri odraslih preiskovancih za eksperiment 7 in 8 (trojnik smo naredili le pri eksp. 8)**

1. ploščica				2. ploščica			
Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.	Prekat	Stimul.	Vzorec	Vol.
1	/	/	/	1	SLE	M566	20 µl
2	/	/	/	2	SLE	M566	20 µl
3	IL-1β	/	4 µl	3	N	1440 603	20 µl
4	IL-1β	/	4 µl	4	N	1440 603	20 µl
5	/	/	/	5	/	/	/
6	/	/	/	6	(SLE)	(M566)	(20 µl)

## 8 REZULTATI

Namen eksperimentalnega dela je bil ugotoviti, kako serumi obolelih za AD, PAPS in SLE vplivajo na vnetni odziv HCAEC na nukleinskem (mRNA) in proteinskem nivoju ter dokazati morebitne razlike v teh odzivih. Vse eksperimente smo izvedli na pediatričnih vzorcih in vzorcih pridobljenih pri odraslih obolelih ter zdravih kontrolnih skupinah. Podatki o preiskovancih so predstavljeni v Tabeli 17 in Tabeli 18. Za vsako diagnozo in kontrolno skupino smo testirali po tri serume bolnikov/zdravih preiskovancev v dvojniku (nekateri tudi v trojniku) in njihova povprečja prikazali kot končni rezultat. Izjema so odrasli oboleli za PAPS, kjer so, zaradi napačno uporabljenega tretjega vzorca, podatki pridobljeni le na dveh serumih. Prikazane slike gelov predstavljajo reprezentativen vzorec za preiskovan citokin/kemokin in izbrano starostno skupino. Pregled odzivov HCAEC na stimulacijo s serumi otrok je predstavljen v Tabeli 19 na strani 53.

### 8.1 Rezultati merjenja IL-6 in endotoksina pred izvedbo eksperimentov ter ostali predhodno pridobljeni podatki

**Tabela 17: Pregled pomembnejših podatkov za vzorce pediatričnih pacientov**

Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Anti- $\beta_2$ -GPI			IL-6 (ng/L)	LPS
				IgG	IgM	IgA		
S475	PAPS	M	17,2	> 16	<2	<2	4	neg
R733	PAPS	M	16,1	> 16	<2	<2	4	neg
S594	PAPS	Ž	17,4	> 16	<2	<2	4	neg
S136	SLE	Ž	16,1	2	2	9	1	neg
S326	SLE	Ž	17,5	<2	<2	3	1	neg
S299	SLE	Ž	15,9	2	3	2	1	neg
G488	AD	M	0,5	5	0	1	5	neg
H103	AD	M	2,0	7	6	0	6	neg
G828	AD	Ž	0,5	> 16	/	/	3	neg
E1172	normala	Ž	4,9	/	/	/	2	neg
E1179	normala	M	5,0	/	/	/	1	neg
E1176	normala	M	4,9	/	/	/	2	neg

/ ni meritve; dodatni podatki o pediatričnih pacientih so predstavljeni v Tabeli 21 v Prilogi

**Tabela 18: Pregled pomembnejših podatkov za vzorce odraslih pacientov**

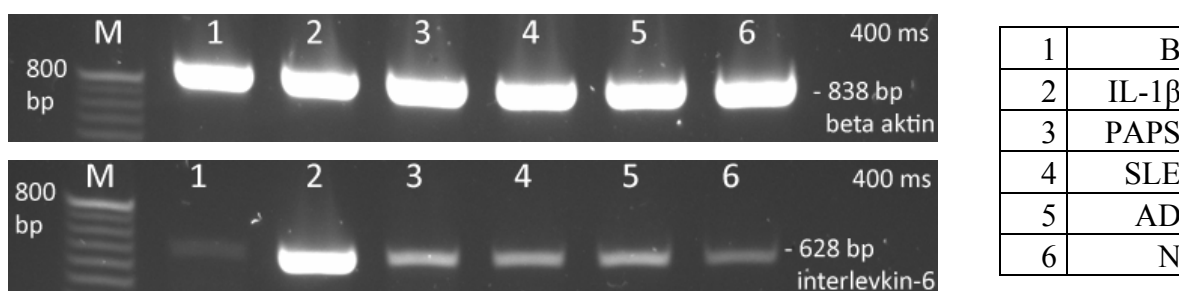
Vzorec	Diagnoza	Spol	Starost (leta)	Anti- $\beta_2$ -GPI			IL-6 (ng/L)	LPS
				IgG	IgM	IgA		
P372	PAPS	Ž	38	7	0	3	5	neg
P54	PAPS	M	61	> 16	<2	<2	5	neg
Q927	SLE	/	45	4	2	3	6	neg
O495	SLE	Ž	30	> 16	4	9	6	neg
M566	SLE	Ž	36	1	4	1	2	neg
1440626	normala	/	/	/	/	/	3	neg
1440624	normala	/	/	/	/	/	3	neg
1440594	normala	/	/	/	/	/	4	neg

/ ni meritve; dodatni podatki o odraslih pacientih so predstavljeni v Tabeli 21 v Prilogi

## 8.2 Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-6 endotelijskih celic

### 8.2.1 Nukleinski nivo (mRNA)

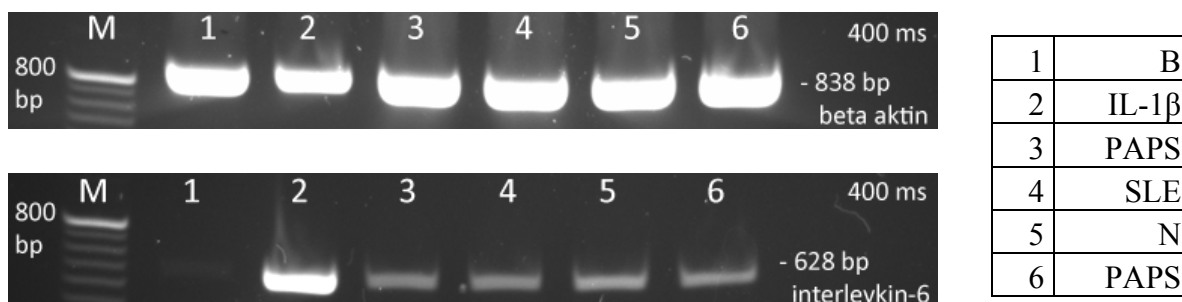
Pri pediatričnih bolnikih je do največjega odziva prišlo pri tistih celicah, ki smo jih stimulirali s serumi obolelih otrok za PAPS. Povišanje se nakazuje tudi pri celicah na katere smo nanесли serume obolelih za AD. Količina izražene mRNA IL-6 pri celicah, ki smo jih stimulirali s serumi SLE bolnika je bila v območju vrednosti zdravih preiskovancev (N). Opazili smo velik odziv celic HCAEC na stimulacijo s pozitivno kontrolo IL-1 $\beta$ , saj je bila količina izražene mRNA IL-6 v povprečju 5-krat večja, kot v primeru stimulacije celic s serumi obolelih.



**Slika 4:** Izražanje mRNA IL-6 v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok

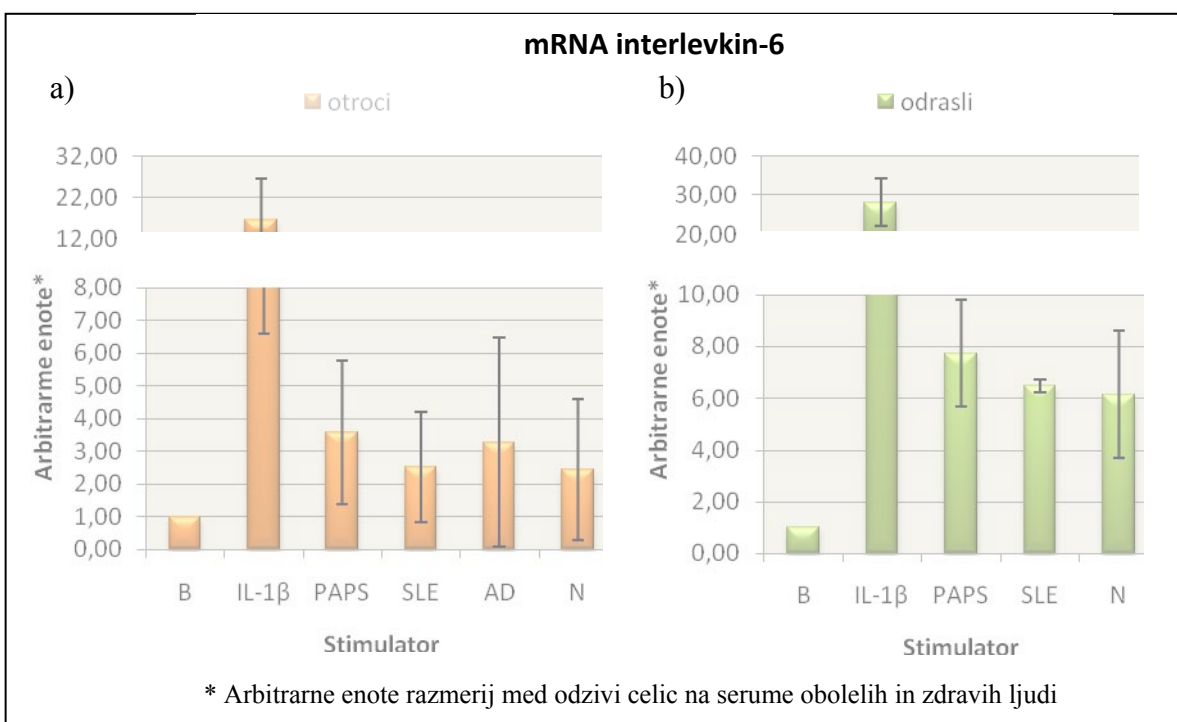
Tudi pri eksperimentu stimulacije celic HCAEC s serumi odraslih, smo na nukleinskem nivoju izmerili podobno razmerje v količini izražene mRNA IL-6 po stimulaciji s serumi obolelih, saj je bila v povprečju pri serumih PAPS ekspresija mRNA nekoliko višja, kot pri

serumih SLE. Pri SLE je bila ekspresija mRNA IL-6 zopet v območju vrednosti zdravih preiskovancev (N). Velik odziv celic smo izmerili tudi po stimulaciji s pozitivno kontrolo IL-1 $\beta$  (v povprečju 5-krat večji odziv, kot v primeru stimulacije s serumi obolelih).



**Slika 5:** Izražanje mRNA IL-6 v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi odraslih

Razlike med rezultati pri obeh starostnih skupinah so premajhne, da bi jih označili kot statistično značilne (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Vsi rezultati so določeni relativno glede na meritev nestimuliranih celic v prekату 1, brez dodanih stimulansov (B).

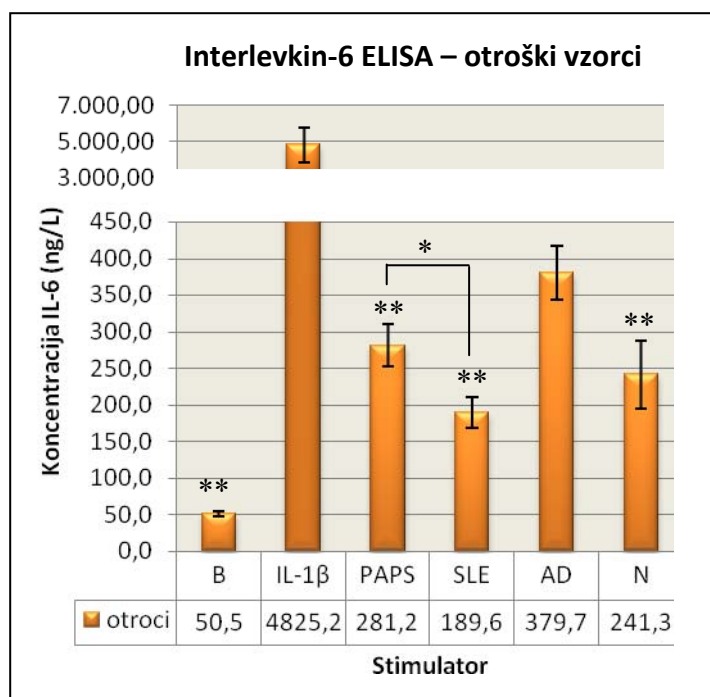


**Slika 6:** Razmerje med izražanjem mRNA IL-6 v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok (a) in odraslih (b) (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)



## 8.2.2 Proteinski nivo

Na proteinskem nivoju smo pri pediatričnih bolnikih največjo izločeno količino IL-6 izmerili pri celicah stimuliranih s serumi pacientov z AD. Količina izločenega IL-6 teh celic je bila v povprečju 379,7 ng/L, kar je statistično značilna razlika v primerjavi s celicami tretiranimi s serumi zdravih otrok (241,3 ng/L) ter celicami tretiranimi s serumi otrok s PAPS (281,2 pg/) oz. SLE (189,6 ng/L) (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Tako smo najmanjšo količino izločenega IL-6 v skladu z izmerjeno količino mRNA določili pri obolelih bolnikih z SLE. Tu se je nivo izločenega IL-6 spustil celo pod nivo celic tretiranih s serumi zdravih otrok, vendar statistično značilne razlike s t testom dveh neodvisnih vzorcev ( $\alpha = 0,05$ ) nismo dokazali. Statistično značilno razliko smo določili tudi med celicami tretiranimi s serumi obolelih za PAPS oz. SLE (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Odziv celic na stimulacijo z IL-1 $\beta$  je bil zelo intenziven, saj je količina izmerjenega IL-6 znašala 4825,2 ng/L, kar je v povprečju 96-krat več kakor po stimulaciji s nestimuliranimi celicami.

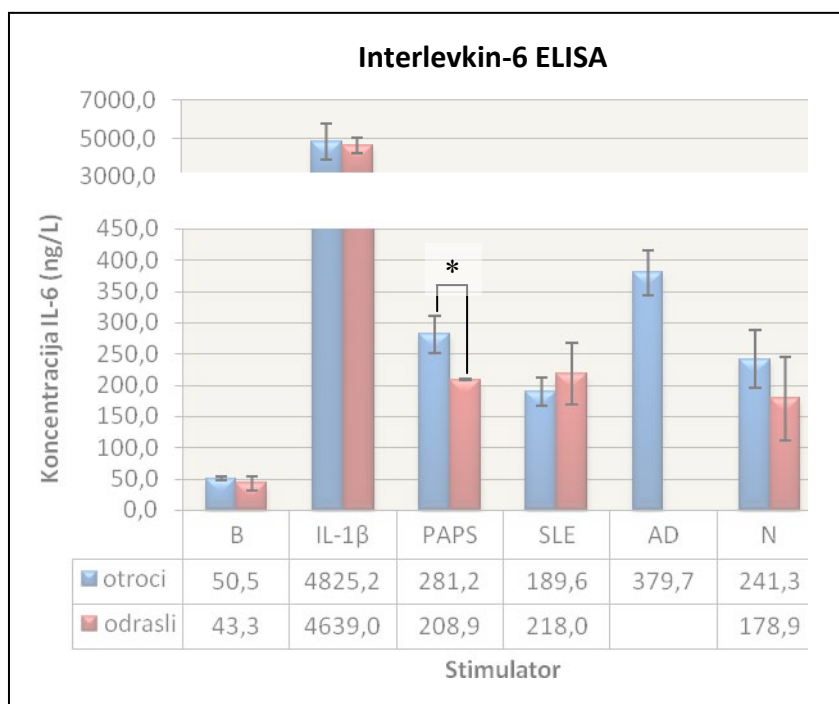


\*\* Statistično značilna razlika v primerjavi z AD ( $\alpha = 0,05$ )

\* Statistično značilna razlika med PAPS in SLE ( $\alpha = 0,05$ )

**Slika 7:** Količina izločenega IL-6 iz HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok (označeni so standardni odkloni med povprečji treh posameznih eksperimentov)

Količina izločenega IL-6 pri SLE je sicer v obeh starostnih skupinah v istem območju vrednosti (189,6 oz. 218,0 ng/L), pri otroškem PAPS pa, v primerjavi z odraslim, opazimo statistično značilno večjo količino izločenega IL-6 (281,2 oz. 208,9 ng/L) (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Od obeh obolelih starostnih skupin, je bila najvišja količina IL-6 izločena iz HCAEC po stimulaciji celic s serumi otrok z AD. Odziv celic na stimulacijo z IL-1 $\beta$  je med obema starostnima skupinama zelo primerljiv (4825,2 oz. 4639,0 ng/L), kar pomeni, da je bil eksperiment tehnološko dobro izveden.



\* Statistično značilna razlika med otroci in odraslimi PAPS ( $\alpha = 0,05$ )

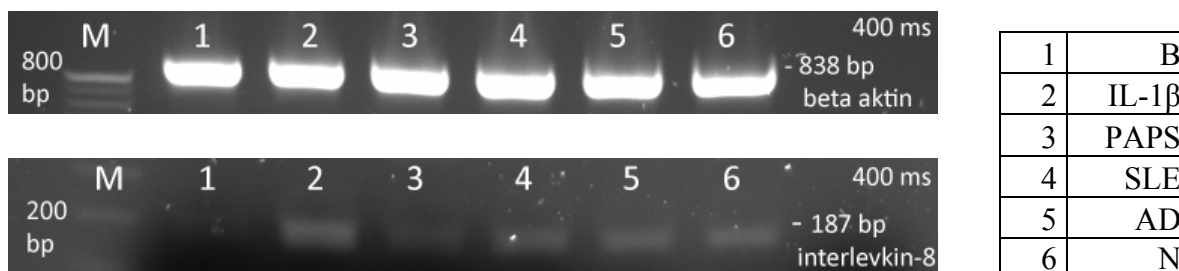
**Slika 8:** Primerjava količine izločenega IL-6 iz HCAEC pri otrocih in odraslih (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)

## 8.3 Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-8 endotelijskih celic

### 8.3.1 Nukleinski nivo (mRNA)

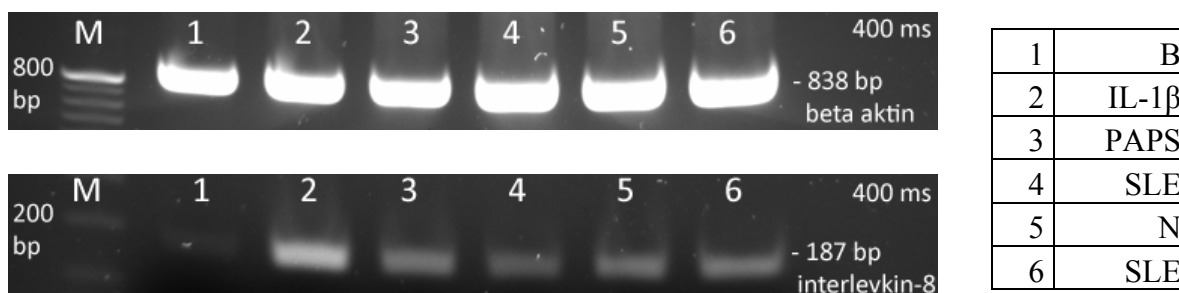
Po stimulaciji celic s serumi obolelih otrok, je do največjega odziva na mRNA nivoju prišlo pri celicah stimuliranih z serumi otrok s PAPS. Povišanje opazimo tudi pri celicah stimuliranih s serumi AD, pri celicah stimuliranih s serumi SLE pa smo določili izražanje

mRNA IL-8 pod nivojem izražanja celic stimuliranimi s serumi zdravih preiskovancev. Do največjega odziva je prišlo po stimulaciji celic z IL-1 $\beta$ .



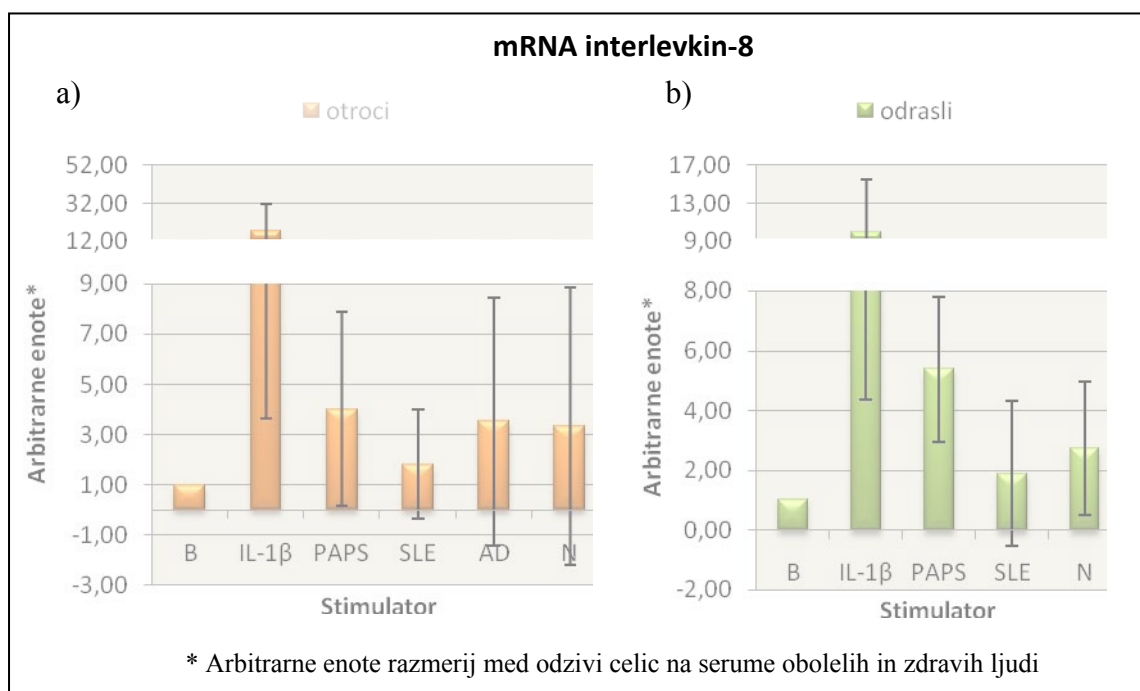
**Slika 9:** Izražanje mRNA IL-8 v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok

Pri celicah stimuliranih s serumi odraslih obolelih za PAPS, je v primerjavi s celicami stimuliranimi s serumi zdravih odraslih darovalcev (N), nakazano povišano izražanje mRNA IL-8. V primeru stimulacije celic s serumi obolelih za SLE pa je nivo izražanja mRNA IL-8 nižji, kot pri celicah stimuliranih s serumi zdravih preiskovancev. Razmerje izražanja mRNA IL-8 celic, po stimulaciji s PAPS in SLE, je med obema starostnima skupinama primerljiv. Do največjega odziva je prišlo po stimulaciji z IL-1 $\beta$ .



**Slika 10:** Izražanje mRNA IL-8 v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi odraslih

Razlike med rezultati pri obeh starostnih skupinah so premajhne, da bi jih označili kot statistično značilne (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Vsi rezultati so določeni relativno glede na meritev nestimuliranih celic, ki smo jih gojili v prekatu 1 brez dodanih stimulansov (B).

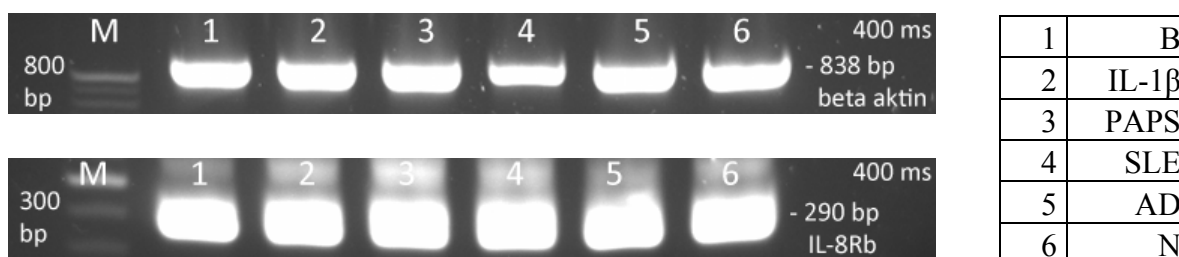


**Slika 11:** Razmerje med izražanjem mRNA IL-8 v HCAEC po stimulaciji z IL-1β in serumu otrok (a) in odraslih (b) (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)

## 8.4 Vpliv seruma bolnikov na izražanje IL-8Rβ endotelijskih celic

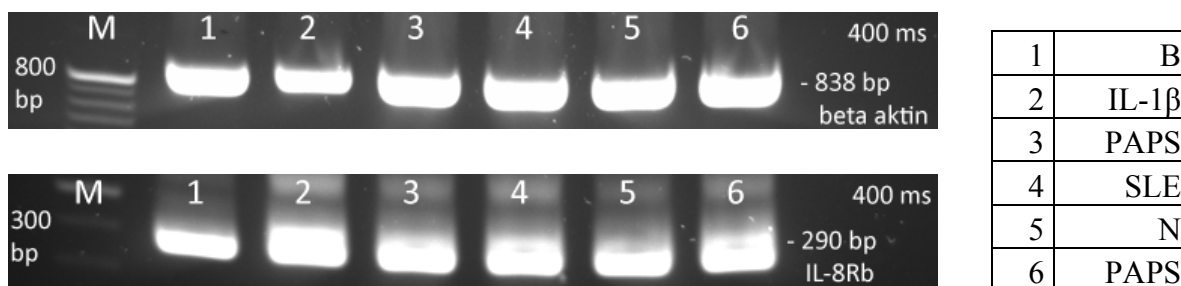
### 8.4.1 Nukleinski nivo (mRNA)

Izražanje mRNA IL-8Rβ je bilo pri celicah stimuliranih s serumu obolelih in zdravih otrok nekoliko nižje kot pri nestimuliranih celicah (B), razlike pa so skoraj zanemarljive. Tudi nivo izražanja mRNA IL-8Rβ v celicah stimuliranih z IL-1β, je bil v območju vrednosti nestimuliranih celic.



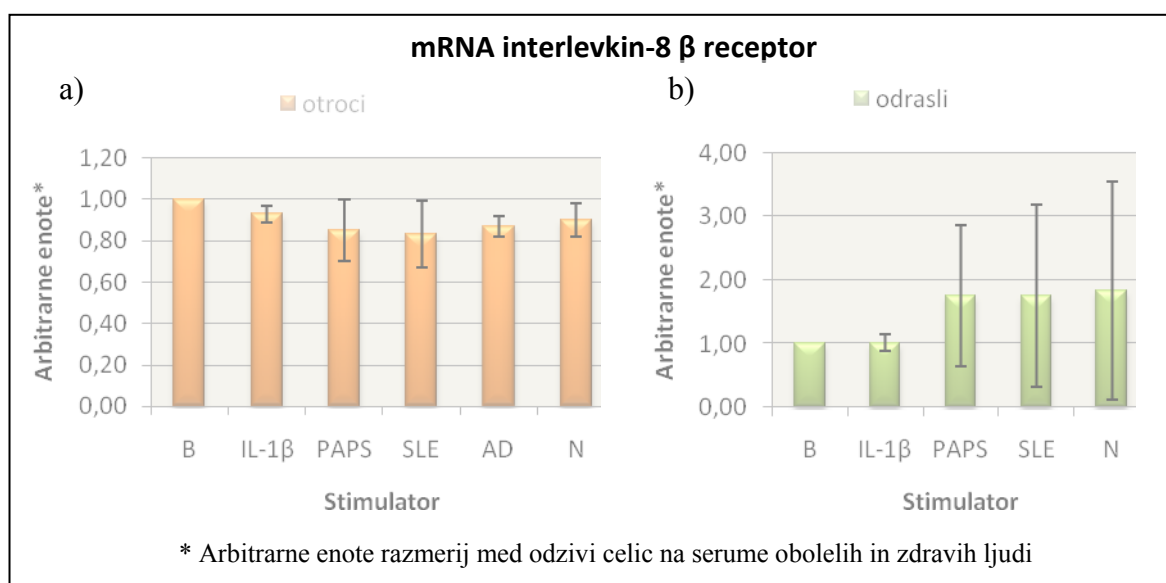
**Slika 12:** Izražanje mRNA IL-8Rβ v HCAEC po stimulaciji z IL-1β in serumu otrok

Pri celicah stimuliranih s serumi obolelih odraslih, je nivo izražanja mRNA IL-8R $\beta$  nekoliko višji, kakor pri nestimuliranih celicah. Do največjega izražanja mRNA IL-8R $\beta$  je prišlo pri celicah, stimuliranih s serumi zdravih krvodajalcev, vendar so razlike tudi tu zanemarljive. Razmerje izražanja mRNA IL-8R $\beta$  celic po stimulaciji s PAPS in SLE je med obema starostnima skupinama primerljiv. Celice, stimulirane s pozitivno kontrolo IL-1 $\beta$ , so izražale mRNA IL-8R $\beta$  na nivoju nestimuliranih celic.



**Slika 13:** Izražanje mRNA IL-8R $\beta$  v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi odraslih

Razlike med rezultati pri obeh starostnih skupinah so premajhne, da bi jih označili kot statistično značilne (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Vsi rezultati so določeni relativno glede na meritev nestimuliranih celic, ki smo jih gojili v prekatu 1, brez dodanih stimulansov (B).

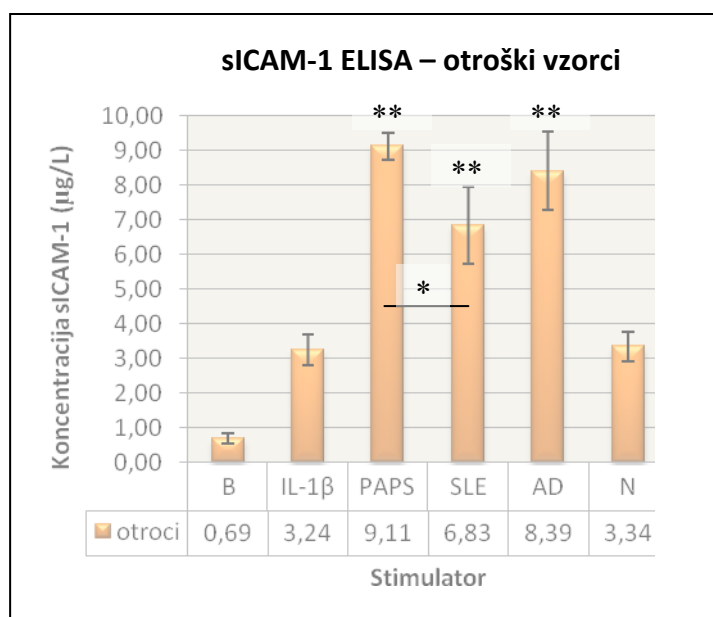


**Slika 14:** Razmerje med izražanjem mRNA IL-8R $\beta$  v HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok (a) in odraslih (b) (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)

## 8.5 Vpliv seruma bolnikov na izražanje sICAM-1 endotelijskih celic

### 8.5.1 Proteinski nivo

V primerjavi s celicami, na katere smo dodali serume zdravih otrok, ki so v serum izločile sICAM-1 v koncentraciji 3,43  $\mu\text{g/L}$ , so celice, stimulirane s serumi obolelih otrok z AD, PAPS in SLE, v supernatant izločile statistično značilno večjo količino sICAM-1 (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Povprečna količina izločenega sICAM-1 je bila pri celicah tretiranih s serumi obolelih za AD 8,39  $\mu\text{g/L}$ , pri PAPS 9,11  $\mu\text{g/L}$  ter pri SLE 6,83  $\mu\text{g/L}$ . Ugotovili smo statistično pomembno razliko med izločeno količino sICAM-1, po primerjavi supernatantov celic stimuliranih s serumi PAPS oz. SLE (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Količina izločenega sICAM-1, ki smo jo določili pri celicah stimuliranih s pozitivno kontrolo IL-1 $\beta$ , je znašala 3,24  $\mu\text{g/L}$ .



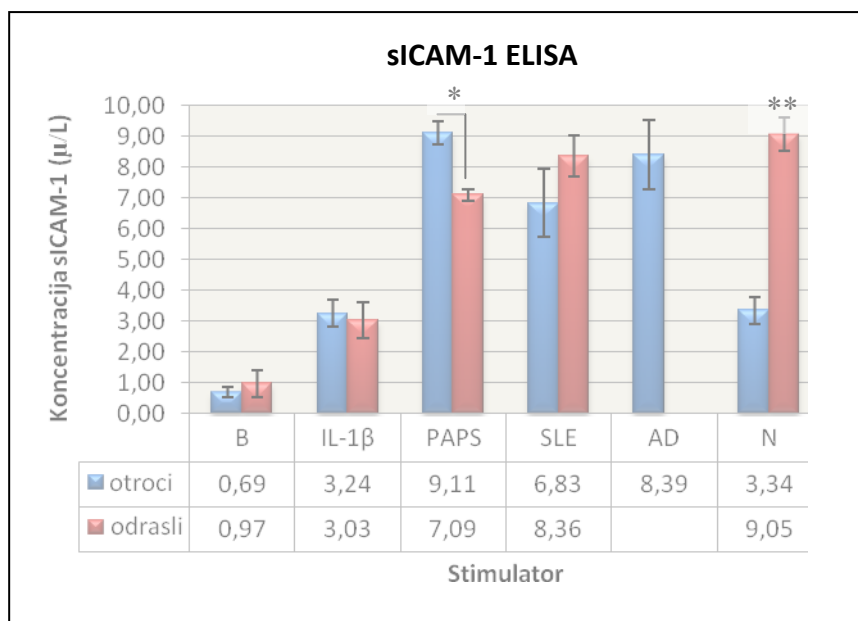
\*\* Statistično značilna razlika v primerjavi z N ( $\alpha = 0,05$ )

\* Statistično značilna razlika med PAPS in SLE ( $\alpha = 0,05$ )

**Slika 15:** Količina izločenega sICAM-1 iz HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok (označeni so standardni odkloni med povprečji treh posameznih eksperimentov)

Celice izpostavljene serumom odraslih obolelih za PAPS so v povprečju izločile 7,09  $\mu\text{g/L}$  sICAM-1 in celice stimulirane s serumi odraslih obolelih za SLE, 8,36  $\mu\text{g/L}$ . Obe vrednosti sta nižji od povprečnega nivoja izločenega sICAM-1 iz celic, stimuliranih s serumi

odraslega zdravega krvodajalca (9,05  $\mu\text{g/L}$ ) (N). V primeru PAPS, je razlika statistično tudi značilna (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Dokazali smo tudi statistično značilno razliko v količini izločene molekule sICAM-1 med obema starostnima razredoma pri bolnikih s PAPS, dočim nam omenjenega pri bolnikih z SLE, z istim, t testom dveh neodvisnih vzorcev ( $\alpha = 0,05$ ), ni uspelo dokazati. Celice tretirane z IL-1 $\beta$  so izločile 3,03  $\mu\text{g/L}$  sICAM-1, kar je primerljivo z odzivom celic pri pediatričnih vzorcih (3,24  $\mu\text{g/L}$ ).



\* Statistično značilna razlika med otroci in odraslimi PAPS ( $\alpha = 0,05$ )

\*\* Statistično značilna razlika v primerjavi z odraslimi PAPS ( $\alpha = 0,05$ )

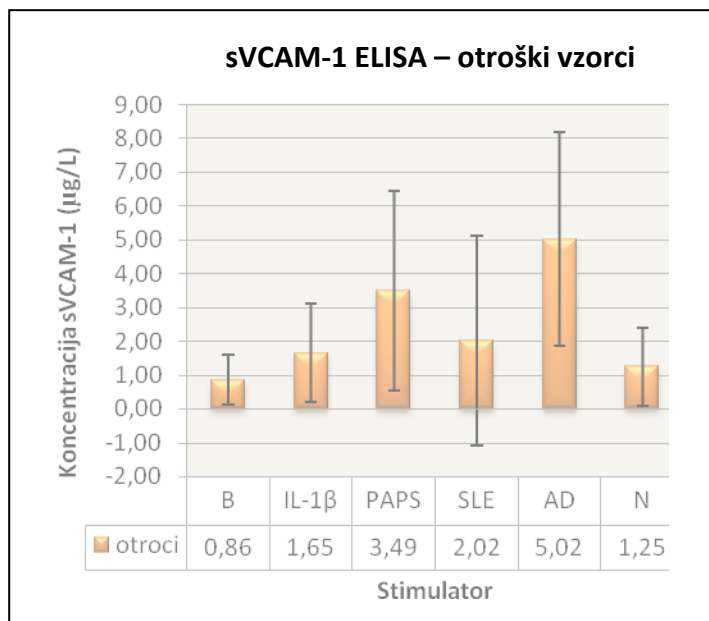
**Slika 16:** Primerjava količine izločenega sICAM-1 iz HCAEC pri otrocih in odraslih (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)

## 8.6 Vpliv seruma bolnikov na izražanje sVCAM-1 endotelijskih celic

### 8.6.1 Proteinski nivo

Največ sVCAM-1 so v povprečju izločile celice stimulirane s serumom otrok z AD, in sicer 5,02  $\mu\text{g/L}$ . V primerjavi s celicami stimuliranimi s serumom zdravih otrok za 3,8  $\mu\text{g/L}$  več, vendar razlika statistično ni bila značilna (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Sledile so celice stimulirane s serumom otrok s PAPS, ki so v povprečju izločile 3,49  $\mu\text{g/L}$  molekul, najmanj sVCAM-1 pa so v supernatant sprostile celice, stimulirane s serumom obolelih otrok za SLE, in sicer 2,02  $\mu\text{g/L}$ . Statistično pomembnih razlik v vzorcu sproščanja sVCAM-1 iz

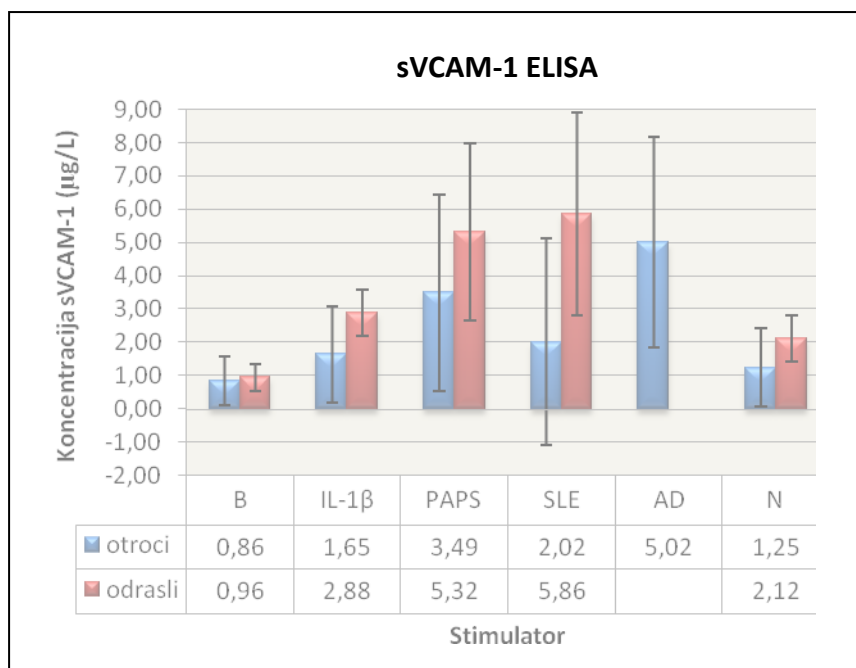
celic tretiranih s serumi AD in celic tretiranih s serumi ostalih dveh bolezni, nam s t testom dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ , ni uspelo dokazati. Tudi primerjava izločene količine sVCAM-1 iz celic, tretiranih s serumi obolelih za PAPS in SLE in serumi zdravih otrok, ni pokazala statistično pomembnih razlik (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Nivo izločanja nestimuliranih celic (0,89  $\mu\text{g/L}$ ) je bil v območju vrednosti izločanja celic stimuliranih s serumi zdravih otrok (1,25  $\mu\text{g/L}$ ). Celice stimulirane z IL-1 $\beta$  so izločile 1,65  $\mu\text{g/L}$  molekule sVCAM-1.



**Slika 17:** Količina izločenega sVCAM-1 iz HCAEC po stimulaciji z IL-1 $\beta$  in serumi otrok (označeni so standardni odkloni med povprečji treh posameznih eksperimentov)

V primeru stimulacije celic s serumi odraslih, so v povprečju največ sVCAM-1 izločile celice tretirane s serumi obolelih za SLE - 5,86  $\mu\text{g/L}$ . V primerjavi z otroškim vzorcem več kot za polovico več (3,84  $\mu\text{g/L}$ ), vendar razlika statistično ni bila dokazljiva (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Celice pod vplivom serumov odraslih obolelih s PAPS, so v povprečju izločile 5,32  $\mu\text{g/L}$  sVCAM-1, kar je statistično primerljivo s pediatričnim vzorcem (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Razlik nam prav tako ni uspelo dokazati med nivojem izločenega sVCAM-1 iz celic, stimuliranih s serumi zdravih odraslih krvodajalcev in odraslih obolelih za PAPS oz. SLE (t test dveh neodvisnih vzorcev,  $\alpha = 0,05$ ). Nivo izločenega sVCAM-1 pri celicah, stimuliranih s pozitivno kontrolo IL-1 $\beta$  je bil 2,88  $\mu\text{g/L}$ , primerljiv z meritvijo pri pediatričnih vzorcih (1,65  $\mu\text{g/L}$ ).





**Slika 18:** Primerjava količine izločenega sVCAM-1 iz HCAEC pri otrocih in odraslih (označeni so standardni odkloni med povprečji treh/dveh posameznih eksperimentov)

**Tabela 19:** Pregledna tabela odzivov HCAEC na stimulacijo s serumi otrok obolelih za PAPS/SLE/zdravih otrok v primerjavi s serumi otrok z AD

Odziv EC v primerjavi s serumi otrok z AD	PAPS	SLE	Zdravi otroci
	otroci	otroci	otroci
<b>Nukleinski nivo (mRNA)</b>			
IL-6	=	↓↓	↓↓
IL-8	=	↓↓	=
IL-8R $\beta$	=	=	=
<b>Proteinski nivo</b>			
IL-6	↓↓↓*	↓↓↓*	↓↓↓*
sICAM-1	=	↓↓	↓↓↓*
sVCAM-1	↓	↓↓	↓↓

↓↓↓\* statistično nižje vrednosti  
↓ nakazane nižje vrednosti

↓↓ nakazane veliko nižje vrednosti  
= ni razlike

## 9 RAZPRAVA

Atopični dermatitis (AD) je kronična vnetna bolezen kože, za katero se domneva, da je pravzaprav odraz neke večje sistemske motnje, ki povzroča tudi druge oblike atopij. V serumu bolnikov največkrat izmerimo povišano vrednost protiteles razreda IgE. Pri 42% obolelih z AD pa zasledimo tudi IgG anti- $\beta_2$ -protitelesa (47). Anti- $\beta_2$ -protitelesa so sicer glavni povzročitelj kliničnih znakov bolezni, za katero je značilen nastanek arterijskih in venskih tromboz - antifosfolipidnega sindroma (APS). Pri bolnikih z AD kljub prisotnosti omenjenih protiteles ni opaziti povečanega pojava tromboz v primerjavi z zdravo populacijo. Znana je tudi neposredna povezava med vnetjem in trombozo, zato nas je zanimala razlika v vnetnem odzivu humanih koronarnih arterijskih endotelijskih celic (HCAEC) po stimulaciji celic s serumi obolelih otrok z AD in primarnim APS (PAPS). Pogost spremljevalec APS je tudi sistemska vezivno- tkivna bolezen - sistemski lupus eritematosus (SLE), zato smo v primerjavo vnetnega odziva celic vključili tudi serume otrok s to boleznijo. Pri samostojnem SLE prav tako kot pri AD ne zaznamo tromboz, ki bi bile posledica prisotnosti anti- $\beta_2$ -GPI protiteles. Vnetni odziv HCAEC na serume otrok, smo primerjali še z odzivom HCAEC na stimulacijo s serumi odraslih obolelih za PAPS in SLE ter zdravimi otroci. V okviru naše raziskave nas je tako najbolj zanimala regulacija imunskega in vnetnega odziva ter regulacija hemostaze, na nivoju endotelijskih celic (EC).

Kot model za pojasnitev vloge seruma bolnikov z AD, PAPS in SLE, pri endotelijski aktivaciji, vnetju in trombozi, smo si izbrali HCAEC, saj so izrednega pomena pri razvoju ateroskleroze in arterijske tromboze. Zaradi pomembnih razlik med arterijskimi in venskimi EC, lahko najverjetneje HCAEC upoštevamo zgolj kot reprezentativen model za razvoj patoloških sprememb endotelija v arterijskem tipu žil. Znano je namreč, da kljub navidezni homogenosti, izražajo EC iz različnih delov ožilja visoko diferencirane funkcije, ki so posledica genetske raznolikosti žil in vpliva okolja. Te razlike se ne odražajo le v različnih adhezijskih molekulah na površini celic, temveč tudi v različnih odzivih celic na isti dražljaj (24). Raziskave na HCAEC so zaradi težkega dostopa do celic omejene, zato jih večina temelji predvsem na humanih umbilikalnih venskih EC (HUVEC) (22). Tako je tudi veliko literaturnih virov, na katere se opira naša diplomska naloga, vključevalo raziskave prav na HUVEC ter tudi drugih tipih EC in upoštevati je potrebno, da se bodo

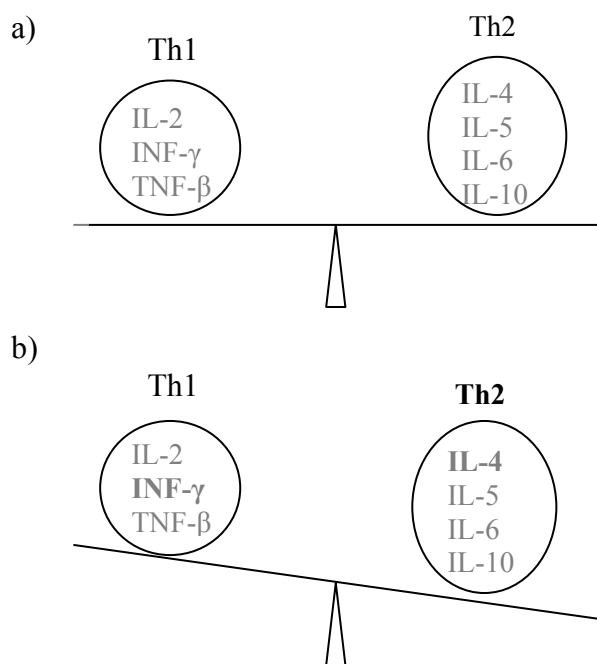
podatki teh raziskav zaradi prej omenjene raznolikosti, morda razlikovali od podatkov za HCAEC.

Osnova eksperimentalnega dela diplomske naloge je bila aktivacija izbranih EC preko stimulacije s serumi obolelih. Pri tem je bil glavni cilj raziskave primerjava vpliva serumov otrok z AD, z vplivom serumov otrok s PAPS in SLE, na vnetni odziv HCAEC. Primarni izbor pacientov so bili otroci predvsem zato, ker je pri tej starostni skupini klinične znake bolezni lažje pripisati zgolj diagnosticiranemu obolenju in ne drugim dejavnikom, ki so jim dodatno izpostavljeni odrasli (npr. ateroskleroza, kajenje, hipertenzija in oralni kontraceptivi). Znano je, da se kljub odsotnosti kliničnih znakov kakršnekoli avtoimunske bolezni titer avtoprotiteles s starostjo povečuje, prav tako pa se povečuje oksidativni stres in z njim povezani patološki procesi. Poleg tega je imunski odziv in posledični klinični znaki zaradi nerazvitih organskih sistemov pri otrocih lahko drugačen kot pri odraslih (40), zato je potrebno obe starostni skupini ločiti. Za otroke smo smatrali osebe stare od 0,5 do vključno 18 let.

Do aktivacije EC pride sicer v *in vivo* pogojih pri različnih vnetnih stanjih, predvsem pod vplivom IL-1, TNF- $\alpha$  ali oxLDL, pa tudi različnih protiteles ter bakterijskih endotoksinov (LPS). Vsi ti reagenti površino EC spremenijo v vazokonstriktorno, provnetno in protrombotično (24). Omenjeno spremembo endotelija pa lahko tudi merimo, saj se kaže v povečani ekspresiji adhezijskih molekul in tkivnega faktorja, povečani sintezi različnih citokinov ter povečanem izločanju drugih protrombotičnih molekul (25). Ker sta AD in SLE vnetni bolezni, vnetje pa je povezano z aktivacijo EC in trombozo, ki se pojavlja pri APS, smo domnevali, da bo na podlagi prisotnih citokinov in protiteles v serumih obolelih, prišlo do aktivacije HCAEC, ki naj bi se tako odražala v spremenjeni ekspresiji mRNA interlevkina-6 (IL-6), interlevkina-8 (IL-8) in receptorja  $\beta$  za IL-8 (IL-8R $\beta$ ), povečanem izločanju proteina interlevkina-6 ter izražanju znotrajcelične adhezijske molekule (ICAM-1) in žilne celične adhezijske molekule (VCAM-1), na površini EC. Da bi preprečili lažno zvišane rezultate na testiranih EC, smo pred pričetkom eksperimentalnega dela več potencialnih vzorcev testirali na LPS ter povišane vrednosti IL-6, kot posledice morebitne predhodne infekcije. Za neprimerne vzorce serumov pacientov in zdravih preiskovancev smo smatrali tiste, katerih vsebnost IL-6 je presegala količino 7 ng/L. Oba testirana

parametra bi kot močna stimulatorja vaskularnih EC namreč lažno povečala ekspresijo oz. koncentracijo raziskovanih molekul na nukleinskem in proteinskem nivoju (48).

Pomembno vlogo pri odzivu imunskega sistema, igrajo tudi celice T CD4+, ki so sestavljene iz dveh poglavitnih subpopulacij: celice Th1 in celice Th2. Subpopulaciji se razlikujeta po citokinih, ki jih po aktivaciji izločata, znano pa je, da citokini ene skupine



**Slika 19:**

(a) ravnovesje citokinov Th1 in Th2 v normalnih fizioloških pogojih

(b) neravnovesje citokinov Th1 in Th2 pri bolnikih z AD v akutni fazi

inhibirajo izdelovanje in delovanje citokinov druge skupine. Tako celice Th1 sintetizirajo IL-2, INF- $\gamma$  in TNF- $\beta$ , celice Th2 pa izdelujejo nasprotno delujoče, IL-4, IL-5, IL-6 in IL-10 (1). V normalnih fizioloških pogojih je izdelava obeh podvrst citokinov v ravnovesju in delujejo zaščitno, v skladu s potrebami organizma (Slika 19 a). Njihovo neravnovesje pa lahko vodi v patološka stanja, kot so alergije in avtoimunske bolezni.

Tipičen primer neravnovesja citokinov Th1 in Th2 je AD, kronična vnetna bolezen kože, ki se ponavadi prične v zgodnjem otroštvu (pri večini pred 2. letom

starosti), lahko pa tudi kasneje in v odrasli dobi. Tipični klinični znaki obolenja so izpuščaji na koži, srbenje ter kroničnost dermatitisa (26). V začetni, akutni fazi bolezni so glavni vnetni infiltrat v koži celice s profilom Th2, ki izločajo IL-4 in IL-13, znana povzročitelja preklopa izotipa k sintezi IgE protiteles. Sproščeni IgE se vežejo na visoko afinitetne receptorje za IgE na mastocitih, iz katerih se po ponovni izpostavitvi antigenu sprosti provnetni histamin. Vezava histamina na EC izzove sproščanje številnih vazodilatatornih molekul, ki omogočajo izstop plazme iz žil, omenjeno pa vodi v nastanek

srbečega kožnega izpuščaja (1). V drugi fazi bolezni, približno 24-48 ur pozneje, pride v kronično zadebeljenem vnetem tkivu do preklopa k sintezi citokinov celic Th1 (49). Neravnovesje med IL-4 in INF- $\gamma$ , nagnjeno na stran prekomerne produkcije prvega, številni navajajo kot glavni vzrok patogeneze pri AD (50,51) (Slika 19 b).

AD pa se pojavi tudi pri 30% posameznikov z SLE (28), kar pojasnjuje dejstvo, da je SLE prav tako kot AD klasificiran kot bolezen s profilom Th2, čeprav nekateri navajajo drugače (52). V serumu obeh bolezni zasledimo podobne vnetne mediatorje, vendar pa naj bi šlo pri SLE predvsem za neravnovesje med IL-10 in IL-12, pri AD pa kot že omenjeno, za neravnovesje med citokinoma IL-4 in INF- $\gamma$ . Za SLE so sicer značilna protitelesa podtipa IgG, usmerjena proti številnim lastnim molekulam, ki preko nastanka imunskih kompleksov, povzročajo endotelijsko disfunkcijo, vnetje, vaskulitis in vaskulopatijo. V patogenezo bolezni je sicer lahko vpleten vsak organ (30), pri otrocih pa bolezen v glavnem prizadane ledvice, v poškodbo katerih naj bi bila najpogosteje vpletena anti-dsDNA protitelesa (33). Predvsem pri mladih ženskah se SLE pogosto pojavi tudi v kombinaciji z APS. APS pa lahko obstaja tudi kot samostojno obolenje in tedaj ga imenujemo primarni APS. Bolnik mora za postavitev diagnoze APS ustrezati vsaj enemu kliničnemu (tromboza ali ponavljajoči se splavi) in enemu laboratorijskemu kriteriju. Laboratorijski kriterij so v visokem titru prisotna antikardiolipinska ali anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa ali lupusni antikoagulant v razmaku vsaj 12 tednov (53). Z razliko od AD, ki je bolezen z zgodnjim nastopom, se APS pri otrocih redko pojavi pred 15. letom starosti (53). Omenjeno dokazujejo tudi naši vzorci, saj so vsi pacienti starejši od 15 let. Najpogosteje je otroški APS povezan s pojavom arterijske ter venske tromboze, v vseh primerih pa obolenje spremljajo povišane serumske koncentracije antifosfolipidnih protiteles, med katere sodijo tudi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa (40).

Primerjava odziva celic po stimulaciji s serumi otrok vseh treh omenjenih bolezni je na proteinskem nivoju pokazala, da so celice stimulirane s serumi otrok z AD sprostile statistično značilno večje količine citokina IL-6, kot v primeru stimulacije celic s serumi otrok s PAPS ali z SLE. Molekulo IL-6 smo na proteinskem nivoju ovrednotili s pomočjo metode ELISA. Na vnetni odziv celic v primeru seruma atopikov, je najverjetneje vplivala prisotnost različnih citokinov v njihovem serumu. V ločenih raziskavah so namreč v serumu otrok obolelih za AD, poleg povišanih vrednosti antigen specifičnih in celokupnih

IgE protiteles, izmerili še povišane koncentracije molekul IL-4, IL-8, IL-10, IL-18, IL-31 in TNF- $\alpha$  (50,51,54,55,56) (Tabela 20). Po nekaterih navedbah, naj bi bil sicer serumski nivo IL-6 pri obolelih otrocih primerljiv s tistim pri zdravih otrocih (51), naša raziskava pa je pokazala, da je bila v serumih otrok z AD količina IL-6 večja ( $4,7 \pm 1,5$  ng/L), kot pri zdravih preiskovancih ( $1,7 \pm 0,6$  ng/L). Podobno so opazili v raziskavi, na sicer odraslih oboleli za AD, kjer je bila serumska koncentracija IL-6 pri obolelih statistično večja, kot pri zdravih odraslih (57). Omenjeno lahko nakazuje na specifičen spekter citokinov, ki jih srečamo pri različnih starostnih skupinah ali pa na različnost meritvenih metodik uporabljenih med različnimi laboratoriji.

**Tabela 20: Pregled povišanih in znižanih vnetnih mediatorjev v serumu AD, APS in SLE v primerjavi z zdravimi preiskovanci (literaturni viri so navedeni v oklepajih)**

	AD	PAPS	SLE
<b>V serumu povišani vnetni mediatorji</b>	IL-4** (51,54)	IL-1 (65)	<b>IL-6***</b> (29)
	<b>IL-6 (?)***</b> (51,57)	IL-4** (65)	IL-10* (29)
	IL-8 (51)	<b>IL-6***</b> (66)	IL-15 (29)
	IL-10* (55)	TNF- $\alpha$ *** (66)	IL-16 (29)
	IL-18* (50)		IL-18* (29)
	TNF- $\alpha$ *** (51)		TNF- $\alpha$ *** (67)
	IL-31 (56)		INF- $\gamma$ (29)
		OxLDL (25)	
<b>V serumu znižani vnetni mediatorji</b>	INF- $\gamma$ ** (51)	IL-2 (66)	IL-12 (68)
		IL-8 (65)	TGF- $\beta$ (30)
		IL-10 (65)	
		INF- $\gamma$ ** (66)	

\*\*\* vnetni mediatorji tipični za vse tri bolezni

\*\* vnetni mediatorji tipični za AD in APS

\* vnetni mediatorji tipični za AD in SLE

V serumu obolelih za AD lahko tako najdemo vsaj štiri potencialne aktivatorje EC, ki so lahko bili vzrok statistično večjega sproščanja IL-6 iz HCAEC. Prvi je IL-4, za katerega so študije izvedene na človeških aortnih EC (HAEC) potrdile, da poveča sproščanje omenjenega citokina (58) ter sam IL-6, IL-18 in TNF- $\alpha$ , ki so znani aktivatorji EC in lahko prav tako povečajo sekrecijo proteina IL-6 iz HCAEC v supernatant (8,59). Na izločanje IL-6 je morda vplival tudi citokin IL-31, za katerega poročajo, da je v sokulturi nesmrtnih človeških bronhialnih epiteljskih celic in eozinofilcev močno povečal izločanje IL-6 (60). mRNA IL-31 je v visoki meri prisotna v koži atopikov, serumska koncentracija citokina pa sovпада z aktivnostjo bolezni (60), kar je močan dokaz patofiziološke vloge omenjenega

citokina pri razvoju AD in morda tudi pri vzdrževanju serumske koncentracije IL-6. Najverjetneje je ena pomembnejših funkcij prisotnega IL-6 pri AD, pospešitev razmnoževanja in zorenja celic B ter tako produkcija IgE protiteles, v sodelovanju z IL-4 (1) ter aktivacija EC, ki omogoča novačenje levkocitov na mesto kožnega vnetja (8). Poleg omenjenega, poročajo v okviru mišjega modela AD o pomembni vlogi IL-6 tudi pri sprožitvi angiogeneze kožne mikrovaskulare, kjer naj bi sodeloval pri indukciji ekspresije proangiogenih faktorjev (61). Poleg EC, so vir povečanega IL-6 v sistemu atopika lahko tudi hiperaktivirani krvni monociti, ki spontano izločajo povečane količine IL-6, pa tudi IL-10 in TNF- $\alpha$ . Vzrok hiperaktivacije naj bi bil enterotoksin B bakterije *Staphylococcus aureus*, ki pogosto naseljuje kožo obolelih z AD (62). Poročali so tudi o povečani sekreciji IL-6 iz mastocitov, po izpostavljanju celic ekstraktu kvasovk iz rodu *Malassezia spp.* Omenjena kvasovka je kožni parazit in kar 50% obolelih za AD nosi IgE protititelesa proti omenjenemu alergenu (63). Povečane serumske koncentracije IL-6 povezujejo tudi s slabo kvaliteto spanja, ki je zaradi stalnega draženja kože, pri atopikih zelo pogost (64). Posebnega vpliva prisotnih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles v serumih AD na odziv HCAEC nismo opazili, saj je bil nivo izločenega IL-6 pri bolniku G-828 z najvišjo IgG frakcijo omenjenih protiteles v skupini atopikov primerljiv z nivojem pri ostalih dveh bolnikih z AD (podatki niso prikazani). Študije na HUVEC so sicer pokazale, da povzroči vezava anti- $\beta_2$ -GPI/ $\beta_2$ -GPI kompleksa na površino EC ekspresijo številnih genov, ki so vpleteni v procese vnetja, adhezije levkocitov in koagulacije, med katere sodi tudi IL-6 (41).

S pomočjo RT-PCR smo dokazovali ekspresijo IL-6 ter nekaterih drugih molekul, tudi na nukleinskem nivoju. Kljub značilni razliki v količini sproščenega IL-6 med stimulacijo s serummi AD in serummi ostalih dveh bolezni, nam razlik v izražanju omenjenega citokina na nukleinskem nivoju ni uspelo dokazati. Izražanje mRNA IL-6 je bilo po stimulaciji EC s serumih otrok z SLE sicer nekoliko nižje, kot s serummi otrok z AD, vendar razlika statistično ni bila značilna. Za natančnejšo določitev izražanja in kvantifikacijo mRNA molekul bi potrebovali kvantitativni PCR (QPCR). Metoda RT-PCR, ki smo jo uporabili mi, je namreč semikvantitativna in ne poda absolutnih vrednosti.

Poleg molekule IL-6, smo na proteinskem nivoju preiskovali tudi izražanje z vnetjem inducibilnih adhezijskih molekul, ICAM-1 in VCAM-1. Izražanje obeh molekul smo izmerili preko njunih topnih oblik, sICAM-1 in sVCAM-1, katerih serumska koncentracija

je prav tako povečana v primeru različnih vnetij in za katere se predvideva, da korelirajo z molekulami na površini (13). Kljub razliki v izločenem citokinu IL-6 nam na nivoju adhezijskih molekul bistvenih razlik v vnetnem odzivu HCAEC na stimulacijo s serumi obolelih otrok ni uspelo dokazati. Sekretacija sVCAM-1 je bila sicer, v primeru stimulacije celic s serumi PAPS in SLE, v primerjavi z AD nakazano nižja, kot tudi sICAM-1 v primeru stimulacije s serumi SLE v primerjavi z AD, vendar jih statistično nismo mogli dokazati. V primeru seruma atopika G-828 z višjo IgG frakcijo anti- $\beta_2$ -GPI protiteles kot pri ostalih dveh serumih otrok z AD, večje količine izločene molekule sICAM-1 in sVCAM-1 nismo izmerili (podatki niso prikazani).

Na podlagi omenjenega je, skupaj z ozirom na nivoje IL-6, možno sklepati na zanemarljiv vpliv prisotnosti anti- $\beta_2$ -GPI protiteles v serumih otrok z AD na vnetni odziv EC. Naš sklep potrjuje tudi študija, ki je ugotovila, da anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, ki se pojavljajo pri 42% obolelih z AD pravzaprav niso patološka in kot taka, ne povzročajo aktivacije EC in tromboz (47). V primerjavi s trombotično-patološkimi protitelesi, ki se vežejo na  $\beta_2$ -GPI preko domene I, se protitelesa atopičnih pacientov vežejo na domeno V, torej na ali v bližini vezavnega mesta  $\beta_2$ -GPI za fosfolipide. Tak kompleks tako ni zmožen vezave na fosfolipide v membrani EC ali trombocitov in ne povzroča njihove aktivacije. Povečana količina anti- $\beta_2$ -GPI protiteles pri bolnikih z AD, je najverjetneje posledica odziva organizma na nepatogene prehranske antigene, ki se pri praktično vseh otrocih zgodi do 3. meseca starosti (47). Pri tem pride do sinteze IgG1 protiteles, ki vrh doseže v zgodnjem otroštvu, nato pa sčasoma upada. Pri bolnikih z AD predvidevajo, da je ravno nezmožnost prekinitve te prehodne sinteze protiteles, vzrok povišanih vrednosti IgG1 anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, tudi kasneje v življenju. Pri atopikih so prav tako opazili, da je frekvenca pojava anti- $\beta_2$ -GPI protiteles odvisna od let in se s starostjo zmanjšuje (47).

V raziskavi nas je zanimala tudi ekspresija mRNA IL-8 in njegovega receptorja  $\beta$ . Primerjava ekspresije mRNA IL-8 ni pokazala bistvenih razlik v vnetnem odzivu HCAEC na serume obolelih otrok. Tudi v tem primeru je bila ekspresija molekul pri SLE nakazano nižja kot pri serumih AD, vendar statistično ni bila značilna. PCR za ovrednotenje izražanja gena za IL-8R $\beta$  smo morali narediti v dveh stopnjah, saj bi namreč po 30 ciklih reakcije dobili premalo podvojene cDNA, večje število ciklov pa bi vodilo v nespecifično vezavo začetnih oligonukleotidov. Tudi IL-8R $\beta$  ni pokazal praktično nobenih razlik med



vsemi tremi boleznimi, smo pa, kot vemo, prvič dokazali prisotnost receptorja na HCAEC. Jasno izražene lise so bile namreč prisotne pri vseh obravnavanih celicah, tudi nestimuliranih. Glede na sliko gelov, je bila količina dobljene cDNA IL-8R $\beta$  v vzorcih pravzaprav prevelika, zato bi morali število ciklov v 2. stopnji PCR zmanjšati. Reakcija podvojevanja se namreč postopoma ustavlja, dokler ne doseže platoja, ko se popolnoma ustavi, zaradi česar je pravo količino dobljenega vzorca nemogoče določiti. Vzorci z različnim začetnim številom kopij cDNA lahko tako dosežejo enak plato (44), kar se je najverjetneje zgodilo tudi v našem primeru, zaradi česar je podobna ekspresija mRNA receptorja le navidezna. Ekspresijo IL-8R $\beta$  in tudi ostalih molekul mRNA bi bilo potrebno izvesti s QPCR in jih tako tudi kvantitativno ovrednotiti.

Tako kot pri AD, je bil vnetni odziv HCAEC na stimulacijo s serumu otrok s PAPS in SLE najverjetneje posledica delovanja prisotnih vnetnih mediatorjev v serumih pa tudi različnih protiteles. V študijah, ki so zajemale vse starostne skupine obolelih za PAPS, so v serumu, poleg povišanih vrednosti molekul, ki jih najdemo tudi v serumu bolnikov z AD (IL-4, IL-6 in TNF- $\alpha$ ), izmerili še povišane koncentracije IL-1 in antifosfolipidnih protiteles (aPL) (Tabela 20, stran 58) (65,66). Med aPL, kot že omenjeno, sodijo tudi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, ki so s svojimi protrombogenimi lastnostmi, glavni povzročitelj patogeneze pri PAPS. Prisotnost omenjenih protiteles v serumu obolelih, je tako eden izmed možnih dejavnikov, ki je vplival na aktivacijo HCAEC *in vitro*. Tudi vnetni citokin IL-1 je znan aktivator EC, tako venskih kot arterijskih. Celice aktivira preko kompleksa NF- $\kappa$ B, transkripcijskega faktorja, ki vpliva na številne gene, kot so npr. IL-6, ICAM-1, VCAM-1 in drugi (22). Prav tako smo v serumih otrok in odraslih z SLE identificirali vrsto potencialnih aktivatorjev EC, saj so v mnogih študijah izmerili povišane koncentracije različnih avtoprotiteles ter molekul IL-6, IL-10, IL-18, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  in OxLDL (Tabela 20, stran 58) (25,29,67). Pogosto so med avtoprotitelesi, ki jih odkrijejo v serumu obolelih s samostojnim SLE, tudi anti- $\beta_2$ -GPI protitelesa, ki so, tako kot pri AD, netrombogena. Predvidevamo, da je vzrok pojava drugačen kot pri atopikih, saj se SLE pojavi kasneje v življenju, ko je faza pretirane reakcije na prehranske antigene, značilna za otroke, že mimo. Najverjetneje je vzrok povišanih serumskih vrednosti netrombogenih anti- $\beta_2$ -GPI protiteles pri SLE, motena toleranca za lastno (29). Za SLE so klinično morda pomembnejša anti-endotelijaska protitelesa (AECA). Študija *in vitro* stimulacije HUVEC z IgG frakcijo AECA iz seruma SLE je namreč pokazala, da omenjena protitelesa aktivirajo EC, pri čemer pride

do povečane ekspresije ICAM-1 in VCAM-1 na površini EC ter povečane sekrecije IL-6 v supernatant (69). Molekuli INF- $\gamma$  ter OxLDL, ki ju tudi najdemo v serumu obolelih pa omenjajo v povezavi z endotelijsko disfunkcijo, v okviru nastanka ateroskleroze (25).

Tako smo glede na vrsto patogenih dejavnikov v serumih obolelih za APS in SLE ter glede na klinične manifestacije obeh bolezni, kot so tromboza in ateroskleroza ter pri samem SLE, vaskulitis in podobne z vnetjem povezane spremembe endotelija, pričakovali, da bodo pokazatelji celične aktivacije, kot spremljevalci endotelijske poškodbe, v primerjavi z AD, povišani. Vendar pa je bila serumska koncentracija IL-6, ki smo jo pri pediatričnih vzorcih s PAPS izmerili mi (4 ng/L) primerljiva s koncentracijo v serumih otrok z AD ( $4,7 \pm 1,5$  ng/L), koncentracija IL-6 pri otrocih z SLE (1 ng/L) pa je bila celo bistveno nižja, kot pri AD. Majhne vrednosti IL-6 v serumih otrok z SLE lahko nakazujejo na nizko aktivnost bolezni, kar bi pojasnilo šibkejše odzive HCAEC na stimulacijo s serumi otrok z SLE v primerjavi z AD. Eden od razlogov za nizke serumske koncentracije IL-6 bi lahko bila tudi terapija. Prav tako bi šibek odziv EC na serume SLE pojasnila odsotnost AECA v serumih. V študiji na HUVEC so namreč ugotovili, da serumi obolelih za SLE brez AECA, ne vplivajo na ekspresijo adhezijskih molekul in sekrecijo provnetnih citokinov (69). V ta namen, bi bilo v serumih SLE potrebno ovrednotiti še koncentracijo AECA. Morda je bil slabši odziv HCAEC na serume obolelih za PAPS in SLE posledica prisotne askorbinske kisline (ASA) v celičnem mediju. Ugotovili so namreč obstoj redoks-občutljivih protiteles, s povečano afiniteto do antigenov po oksidaciji in večjo sposobnostjo aktivacije HUVEC (70). Če je oksidacija protiteles eden izmed patoloških mehanizmov tudi v telesu in potencialno v našem eksperimentu, je morda prav prisotnost ASA-e preprečila delovanje protiteles na preiskovane HCAEC. Obstaja tudi možnost, da smo imeli vzorce s pretežno venskimi trombozami/zapleti in z njimi povezanimi vnetnimi dejavniki, ki imajo kot taki morda manjši vpliv na arterijske celice. Eksperimente bi bilo zato dobro narediti tudi na HUVEC.

Vnetne odzive HCAEC na serume obolelih otrok smo primerjali tudi z odzivi celic na serume zdravih otrok. Tako smo ugotovili pomembno razliko med serumi zdravih otrok in otrok z AD, saj so HCAEC v primeru otrok z AD sprostile statistično značilno večje količine IL-6 in sICAM-1. To dokazuje, da komponente seruma obolelih za AD povzročijo patološko aktivacijo preiskovanih EC v *in vitro* in predvidoma tudi v *in vivo* pogojih. Tudi

izmerjena serumska vrednost IL-6 je bila, kot že omenjeno, v serumih otrok z AD statistično večja kot v primeru serumov zdravih otrok, kljub temu pa sta bili obe koncentraciji znotraj meja zdravih krvodajalcev. Dejavniki s potencialnim vplivom na sekrecijo IL-6 in vloga IL-6 pri atopikih so opisani že zgoraj, na sekrecijo sICAM-1 pa so prav tako najverjetneje vplivali IL-6, IL-18 in TNF- $\alpha$ , prisotni v serumih obolelih. Vsem je namreč skupno, da povečajo sekrecijo adhezijske molekule sICAM-1 iz EC (8,59). Molekula ICAM-1 igra sicer pomembno vlogo pri patogenezi AD, saj je ključna pri razvoju kroničnega vnetja, ki ga opazimo pri tej bolezni. Njena vezava z ustreznimi  $\beta_2$  integrini, izraženimi na nevtrofilcih, celicah T in makrofagih, omogoča trdno vezavo levkocitov na endotelij, njihovo usmeritev na mesto vnetja ter aktivacijo (12). O zvišanih serumskih koncentracijah sICAM-1 pri AD poročajo različne študije, med katerimi je nakazana tudi možnost o povezavi med aktivnostjo bolezni in serumsko koncentracijo omenjene adhezijske molekule (71).

Citokini IL-6, IL-18 in TNF- $\alpha$  naj bi vplivali tudi na sekrecijo sVCAM-1 ter na ekspresijo mRNA IL-6 in IL-8 (5,8,59). Raziskava je sicer pokazala nakazane razlike v primeru ekspresije mRNA IL-6 in sekrecije sVCAM-1 po stimulaciji s serumi AD, v primerjavi z zdravimi otroci, vendar so bile le-te statistično premajhne. Pri določevanju mRNA IL-8 in njegovega receptorja IL-8R $\beta$  razlik v izražanju mRNA nismo zaznali, kljub poročanju o povečani serumski koncentraciji IL-8, specifično pri AD (51). Seveda pa ni nujno, da so vir kemokina IL-8 pri bolnikih z AD ravno aktivirane EC, saj nekateri kot vir IL-8 pri kožnih obolenjih navajajo keratinocite (51). Na pomembno vlogo adhezijske molekule sICAM-1 pri razvoju različnih bolezni imunskega sistema opozarja tudi dejstvo, da smo statistično pomembno razliko v njeni sekreciji določili tudi v primeru stimulacije celic s serumi otrok s PAPS in SLE, v primerjavi s serumi zdravih otrok. Pri ostalih molekulah razlik med omenjenimi skupinami, nismo dokazali. Vzrok slabe ekspresije IL-8 v primeru AD in PAPS, je morda v prisotnem IL-4, ki inhibira sproščanje kemokina (5) ali pa v prenizki koncentraciji stimulatornih molekul, saj je IL-8 zaradi močnega provnetnega učinka uravnavan zelo natančno.

Molekule v serumih obolelih z AD pa imajo poleg omenjenih tudi druge možne funkcije. Citokinu IL-4 pripisujejo namreč pomembno vlogo pri vzdrževanju endotelijske disfunkcije, poslabšanju ateroskleroze ter arterijski in venski trombozi (65). Poleg

navedenega povečata IL-6 in IL-18 tudi ekspresijo matriksnih metaloproteinaz iz EC (8,59), ki lahko dodatno poškodujejo tkivo, povišane vrednosti IL-6 pa povezujejo tudi s pojavom venske tromboze, aktivacijo koagulacije in trombocitov (66). Postavlja se torej vprašanje, zakaj pri bolnikih z AD ni povečanega pojava tromboz v primerjavi z zdravimi, kljub temu, da serum atopika dokazano povzroča aktivacijo EC, stopnjo, potrebno za pričetek kaskade strjevanja krvi. Če kot prototip bolezni s pojavom tromboz vzamemo APS ugotovimo, da se AD od APS, poleg različne narave protiteles, loči tudi po različnem spektru citokinov in kemokinov, ki jih srečamo v serumih obolelih. Obe bolezni imata sicer nekaj skupnih mediatorjev, ki aktivirajo EC (IL-4, IL-6 in TNF- $\alpha$ ), vendar lahko iz različnih znakov bolezni sklepamo, da ni pomembna zgolj koncentracija citokina v serumu, pač pa predvsem razmerje med citokini. Tako domnevajo, da pri APS k poškodbi endotelija, poleg anti- $\beta_2$ -GPI protiteles, prispeva tudi prekomerno delovanje IL-4, saj so ugotovili znižane vrednosti IL-10, znanega inhibitorja njegove sekrecije iz celic T (65). Poleg tega je z delovanjem IL-4 povezan tudi IL-8, ki selektivno zavira sintezo IgE protiteles *in vitro* (51). Tudi njegova serumska koncentracija je pri APS znižana, medtem ko sta oba citokina, IL-8 in IL-10, pri AD zvišana, kar najverjetneje omejuje sistemsko delovanje IL-4. Poleg tega je IL-10 znan tudi po zaviranju sproščanja provnetnih citokinov (IL-1, TNF- $\alpha$ ) (1), kar še dodatno prispeva k omejeni aktivaciji endotelija pri AD. V serumih obolelih z AD smo poleg IL-4, kot že omenjeno, identificirali še vrsto drugih molekul, ki bi lahko vodile v poškodbo endotelija in tako prispevale k razvoju tromboze ali ateroskleroze. Vendar pa kljub njihovi kronični prisotnosti v krvi v literaturi nismo zasledili povečane frekvence pojava nobene od omenjenih disfunkcij endotelija. Pravzaprav je imunski sistem atopikov organiziran tako, da vzdržuje vnetne procese predvsem na ravni kože, ki je tudi glavni vir vstopa antigenov v telo. Za obolenje so namreč značilne zvišane koncentracije različnih kemokinov ter celic T s kožnim limfocitnim antigenom, ki omogočajo aktivno in specifično usmeritev limfocitov T in drugih levkocitov na mesto kožnega vnetja (49). Do neke mere zaščitno vlogo imajo pri atopikih morda tudi IgE protitelesa, ki naj bi bila vpletena v, z IgE protitelesi povzročeno prekomerno *in vivo* stimulacijo trombocitov (72). Ti aktivirani trombociti v povišani koncentraciji izločajo spojine, ki normalno pospešujejo nastanek tromboembolične motnje, pri AD pa intenzivno sodelujejo pri procesu vnetja v koži obolelih (73). Tako prekomerno stimulirani trombociti se funkcionalno spremenijo in izčrpajo, zaradi česar kažejo manjšo

tendenco do medsebojne agregacije in strjevanja krvi, kljub morebitni prisotnosti protrombogenega dražljaja (72). Da pri AD vseeno prihaja do sistemske, vendar omejene aktivacije endotelija pa morda potrjuje dejstvo, da so v serumih obolelih otrok z AD, izmerili povišane koncentracije sICAM-1, za katere predvidevamo, da bi lahko bile odraz sistemske, nelokalne aktivacije celic. V dveh ločenih eksperimentih so namreč ugotovili, da je zdravljenje AD s sistemskimi kortikosteroidi značilno znižalo vrednosti prvotno povišanega sICAM-1, medtem ko enakega učinka z lokalnim zdravljenjem dermatitisa z UVA1 terapijo niso dosegli (71). Seveda pa je potrebno vzeti v obzir tudi to, da sama endotelijska aktivacija še ne vodi v trombozo in da je poleg vnetnih mediatorjev za njen pojav potrebna tudi okvara različnih mehanizmov, ki sicer preprečujejo nastanek tromboz, kot je to vidno pri obolenjih kot sta APS in SLE.

V raziskavo smo za primerjavo k vplivu seruma otrok vključili tudi serume odraslih obolelih, pri katerih je bil pomemben faktor izbora vzorcev, postavitve diagnoze v odrasli dobi. Na ta način smo se izognili dejavnikom, ki se pojavijo ob dolgotrajnemu poteku bolezni in so neodvisni od osnovne motnje (npr. poškodba tkiv zaradi kortikosteroidov in drugih zdravil) (29). To je bil tudi razlog, zakaj v raziskavo nismo vključili odraslih obolelih za AD, saj je pojav le-tega v odrasli dobi zelo redek in nam ustreznih vzorcev ni uspelo pridobiti. Primerjavo med otroci in odraslimi smo tako naredili le pri PAPS in SLE. Opazili smo, da je bila koncentracija IL-6 pri odraslih kontrolah večja ( $3,3 \pm 0,6$  ng/L) kot pri otroških ( $1,7 \pm 0,6$  ng/L), kar pripisujemo večjemu oksidativnemu stresu pri odraslih, ki ima za posledico tudi višje serumske vrednosti IL-6 (21).

Rezultati so pokazali, da so HCAEC stimulirane s serumii otrok s PAPS v primerjavi s tistimi, ki smo jih stimulirali s serumii odraslih s PAPS, v supernatant izločile statistično večje količine proteina IL-6 in sICAM-1. Morda to dokazuje večjo aktivacijo - specifično arterijskih endotelijskih celic, na provnetne dejavnike iz seruma otrok. Poročali so namreč o pogostejšem pojavu arterijskih tromboz pri otrocih, kot pri odraslih (53). Mehanizem patogeneze pri otrocih še ni podrobno raziskan, predvideva pa se, da je podoben kot pri odraslih (40). Serumska koncentracija izmerjenega IL-6 je bila sicer v obeh starostnih skupinah primerljiva ( $4$  ng/L pri otrocih vs  $5$  ng/L pri odraslih).

Po stimulaciji celic s serumii obolelih za SLE pa smo pri vseh treh, na proteinskem nivoju preiskovanih parametrov (IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1) opazili, da je bila sekrecija

HCAEC po stimulaciji s serumi odraslih višja, kot v primerjavi s serumi otrok. Razlike sicer niso bile statistično značilne, bi jih pa lahko razlagali z ugotovitvami poročil o večji endotelijski disfunkciji pri odraslih (25) ter o večji frekvenci pojava kardiovaskularnih obolenj pri pacientih s pričetkom SLE v odrasli dobi (33). Večje koncentracije izločenih adhezijskih molekul pri odraslih bi lahko pripisali tudi aktivnejši obliki bolezni, ki naj bi bila soodvisna s serumsko koncentracijo sICAM-1 in sVCAM-1 (13). Ker smo pri odraslih obolelih izmerili večje serumske koncentracije IL-6 ( $4,7 \pm 2,3$  ng/L) kot pri otrocih (1 ng/L), je teorija o aktivnejši obliki bolezni možna. Poleg tega smo v okviru naše raziskave opazili tudi, da imajo otroci višje serumske koncentracije anti-dsDNA protiteles kot odrasli (Tabela 21, stran 74) in s tem potrdili ugotovitve že narejenih študij (33).

Za pozitivno kontrolo pri aktivaciji endotelijskih celic smo uporabili vnetni citokin IL-1 $\beta$ , ki je znan aktivator venskih in arterijskih EC. Kot je bilo domnevano, smo z njim dosegli največjo aktivacijo HCAEC, saj so celice tretirane z omenjenim modulatorjem izkazale daleč največjo ekspresijo mRNA IL-6 in IL-8 ter povečano sekrecijo IL-6 v supernatant. Pričakovali smo tudi zvišane koncentracije izločenih topnih adhezijskih molekul – sICAM-1 in sVCAM-1, vendar je bila z metodo ELISA izmerjena količina omenjenih molekul v območju vrednosti zdravih preiskovancev. Zaradi dejstva, da je IL-1 $\beta$  močan stimulator, ki dokazano povzroča povečano sekrecijo omenjenih adhezijskih molekul smo preverili, če je meritev moč pripisati analiznemu kompletu za sICAM-1 ELISA-o. Ker je v navodilu za uporabo sICAM-1 ELISA-e navedeno, da celični supernatanti brez sestavin seruma niso primerni za določevanje koncentracije sICAM-1 smo naredili eksperiment, kjer smo supernatantu, z IL-1 $\beta$  testiranih celic, dodali fetalni goveji serum (FBS), torej domnevno manjkajočo komponento in ponovno izmerili. Vendar pa je bila meritev praktično enaka, neodvisna od prisotnosti FBS. Tako jasnega odgovora na nizko izmerjeno vrednost sICAM-1 in sVCAM-1 nismo dobili, saj v nam znani literaturi podobnega problema nismo zasledili. Kljub nizkim meritvam, je bila sekrecija molekule sICAM-1 po stimulaciji z IL-1 $\beta$ , v povprečju 4x večja, kot pri nestimuliranih celicah. Glede na raziskavo na HAEC, kjer je bila sekrecija sICAM-1 po stimulaciji celic z 10x bolj koncentriranim IL-1 $\beta$ , le 1,8x večja kot v primeru nestimuliranih celic (74) sklepamo, da so celice HCAEC veliko bolj občutljive, kot celice HAEC. Možni razlog za znižane vrednosti sVCAM-1 in sICAM-1 po stimulaciji z IL-1 $\beta$ , bi bilo lahko tudi dejstvo, da je bil uporabljen IL-1 $\beta$  že nekajkrat odmrznjen in bi tako lahko izgubil svojo aktivnost.

Zaključimo lahko, da smo (na podlagi do sedaj zbranih podatkov) dokazali obstoj razlik med aktivacijo endotelija pri otrocih z AD in aktivacijo endotelija pri otrocih s PAPS in SLE. Ugotovili smo namreč, da so celice, stimulirane s serumu otrok z AD izločile statistično večjo količino IL-6, kot v primeru stimulacije s serumu PAPS in SLE. Dobljeni rezultati so tako odgovorili na prvi del naše zastavljene hipoteze, ki temelji na razliki v vnetnem odzivu HCAEC na nivoju citokina IL-6. Ugotovili smo tudi pomembne razlike med otroci obolelimi za AD in zdravimi otroci, saj smo izmerili statistično značilne razlike med odzivom HCAEC na nivoju molekul IL-6 in sICAM-1. Pri AD je tako aktivacija endotelija lahko pomemben patološki mehanizem nastanka kožnih izpuščajev. Pri tem je glavna funkcija vnetnih mediatorjev v serumu atopikov lokalna in ne sistemska aktivacija EC, ki preko površinskih adhezijskih molekul omogočajo vstop levkocitom v kožo, kjer se vnetni proces atopikov odvija. Pri tem vloge povišane koncentracije anti- $\beta_2$ -protiteles v serumu obolelih še nismo v celoti pojasnili. Eksperiment bi sicer morali ponoviti na večjemu številu pacientov, saj mnogih nakazanih razlik morda zaradi majhnega števila preiskovancev in posledično prevelikega standardnega odklona nismo mogli dokazati. Podobnih eksperimentov v literaturi še nismo zasledili in primerjava rezultatov tako zaenkrat ni bila mogoča.

## 10 SKLEPI

Namen diplomske naloge je bil razumeti vlogo otroškega seruma, s povišano koncentracijo anti- $\beta_2$ -protiteles, na vnetni odziv endotelijskih celic. Naša hipoteza, da serumi otrok z AD povzročijo v primerjavi s serumi otrok s PAPS in SLE drugačen vnetni odziv HCAEC, je bila potrjena z vidika proteina IL-6. Zaključki na podlagi celotnega eksperimentalnega dela pa so sledeči:

### **Primerjava vpliva serumov otrok z AD, PAPS in SLE:**

1. EC, stimulirane s serumi otrok z AD, so sprostile značilno večje količine proteina IL-6 v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi otrok s PAPS in SLE
2. Razlik v ekspresiji IL-6, IL-8 in IL-8R $\beta$  na mRNA nivoju po stimulaciji EC s serumi obolelih otrok nismo dokazali
3. Razlik v sproščanju sICAM-1 in sVCAM-1 po stimulaciji EC s serumi otrok z AD, v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi otrok s PAPS in SLE, nismo dokazali
4. EC, stimulirane s serumi otrok s PAPS, so sprostile značilno večje količine proteina sICAM-1 v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi otrok z SLE

### **Primerjava vpliva serumov otrok z AD, PAPS in SLE s serumi zdravih otrok:**

1. EC, stimulirane s serumi otrok z AD, so sprostile značilno večje količine IL-6 v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi zdravih otrok. Razlik pri IL-6, med celicami testiranimi s serumi otrok s PAPS/SLE in serumi zdravih otrok nismo ugotovili
2. EC, stimulirane s serumi obolelih otrok, so sprostile značilno večje količine sICAM-1 v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi zdravih otrok.
3. Razlik v sproščanju sVCAM-1 po stimulaciji HCAEC s serumi obolelih otrok in serumi zdravih otrok nismo dokazali
4. Razlik v ekspresiji mRNA IL-6, IL-8 in IL-8R $\beta$  po stimulaciji HCAEC s serumi obolelih otrok in serumi zdravih otrok nismo dokazali

### **Primerjava vpliva serumov otrok s PAPS in SLE s serumi odraslih obolelih :**

1. EC, stimulirane s serumi otrok s PAPS, so sprostile značilno večje količine IL-6 in sICAM-1, v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi odraslih s PAPS



2. Razlik v sproščanju sVCAM-1 po stimulaciji HCAEC s serumi otrok s PAPS v primerjavi s celicami, stimuliranimi s serumi odraslih s PAPS, nismo dokazali.
3. Razlik v sproščanju IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1 po stimulaciji HCAEC s serumi otrok z SLE in serumi odraslih z SLE nismo dokazali.

S študijo nam je uspelo dokazati pomembno razliko v vnetnem odzivu HCAEC na serume otrok z AD, PAPS in SLE na nivoju citokina IL-6, pomembnega pri razvoju vnetja. S to ugotovitvijo smo morda korak bližje k razumevanju razlik v patofiziologiji omenjenih bolezni.

## 11 REFERENCE

1. Vozelj M. Temelji imunologije. Prva izdaja. Ljubljana; DZS, 2000
2. Ribarič S. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. Izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2005
3. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3): 514-25
4. Abbas A.K., Lichtnam A.H. Cellular and Molecular Immunology, Updated Edition, 5. Izdaja, Saunders, 2003
5. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005; 7(2): 122-33
6. Smith RE, Hogaboam CM, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Cell-to-cell and cell-to-matrix interactions mediate chemokine expression: an important component of the inflammatory lesion. *J Leukoc Biol.* 1997; 62(5): 612-9
7. Isoda K, Ohsuzu F. The effect of interleukin-1 receptor antagonist on arteries and cholesterol metabolism. *J Atheroscler Thromb.* 2006; 13(1): 21-30
8. Cronstein BN. Interleukin-6 - a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007; 65: S11-5
9. Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280(6): L1094-103
10. Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules-update. *Vet Pathol.* 1997; 34(1): 61-73
11. Zhang X, Wu D, Jiang X. ICAM-1 and acute pancreatitis complicated by acute lung injury. *JOP.* 2009; 10(1): 8-14
12. Heemann UW, Tullius SG, Azuma H, Kupiec-Weglinsky J, Tilney NL. Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg.* 1994; 219(1): 4-12
13. Sfikakis PP, Tsokos GC. Clinical use of the measurement of soluble cell adhesion molecules in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4(3): 241-6
14. Wu TC. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Res.* 2007; 67(13): 6003-6
15. Lasne D, Jude B, Susen S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth.* 2006; 53(6 Suppl): S2-11
16. Howard EL, Becker KC, Rusconi CP, Becker RC. Factor IXa inhibitors as novel anticoagulants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(4):722-7
17. Schmaier AH. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest.* 2008; 118(9): 3006-9
18. Stegnar M. Prepoznavnje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Ljubljana; Klinični center Ljubljana, Interna klinika, 2004
19. Britansko zdravniško združenje. Družinska zdravstvena enciklopedija. Ljubljana; DZS, 1992
20. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *Eur Heart J.* 2005; 26(1): 3-4
21. Poredos P, Jezovnik MK. The role of inflammation in venous thromboembolism and the link between arterial and venous thrombosis. *Int Angiol.* 2007; 26(4): 306-11
22. Mary E. Gerritsen and Colin M. Bloor. Endothelial cell gene expression in response to injury. *The FASEB Journal*, 1993; Vol 7, 523-532

23. Jeremy D. Pearson. Endothelial cell biology. *Radiology*, 1991; 179 (1): 9-14
24. 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): 3527-61
25. M McMahon. Inflammation and the pathogenesis of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2006; 15(11): 59-69
26. Donald Y.M. Leung, Mark Boguniewicz, Michael D. Howell, Ichiro Nomura and Qutayba A. Hamid. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(5): 651-657
27. Wollenberg A., Kraft S., Opiel T., Bieber T. Atopic dermatitis: pathogenetic mechanisms. *Clinical&Experimental Dermatology*, 2000; 25(7), 530-534
28. Vida Feizy, Arefeh Ghobadi. Atopic dermatitis and systemic autoimmune diseases: A descriptive cross-sectional study. *Dermatology Online Journal* 12 (3): 3
29. C C Mok, C S Lau. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56:481-490
30. Manson J. J., Isenberg D. A. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Netherlands journal of medicine*. 2003; 61(11):343-346
31. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. *Interna medicina*. Tomšič M, Kveder T, Božič B, Leštan B, Logar D, Rainer S, Jevtič V, Praprotnik S, Hočevar A, Plešivčnik-Novljan M, Golja M, Strle F, Ambrožič A, Rozman B, Šipek-Dolničar A, Gašperšič N: *Revmatične Bolezni*. Ljubljana; 3. Izdaja, Littera picta, 2005: 1400-1412
32. Klippel, J.H.; Stone, J.H.; Crofford, L.e.J.; White, P.H. *Primer on the Rheumatic Diseases*, 13th ed., Springer New York. 2008; 319-326
33. Samy Fenniche MD, Sana Triki MD, Rym Benmously MD, Hayet Marrak, MD Feiza Ben Ammar MD, Insaf Mokhtar MD. Lupus erythematosus in children: report of six cases. *Dermatology Online Journal*. 2005; 11 (2): 11
34. John G. Hanly. Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ*, June 24, 2003; 168 (13)
35. Bas de Laat, Koen Mertens and Philip G de Groot. Mechanisms of Disease: antiphospholipid antibodies—from clinical association to pathologic mechanism. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2008; 4, 192-199
36. Ricard Cervera and Ronald A. Asherson. Antiphospholipid syndrome. Y. Shoenfeld et al. (eds.): *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases*, 2008; DOI: 10.1007/978-1-60327-285-8\_2
37. Sodin-Šemrl S, Rozman B. Beta2-glycoprotein I and its clinical significance: from gene sequence to protein levels. *Autoimmun Rev*. 2007; 6(8): 547-552
38. P.G. de Groot , R.H.W.M. Derksen. Pathophysiology of antiphospholipid antibodies. *Neth J Med.*, 2004; 62(8): 267-72
39. Božič B. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome. V: Topić E. (ur.). *New trends in classification, monitoring and management of neurological diseases : handbook*. Zagreb: Medicinska naklada, 2003, str. 19-25
40. Avcin T, Silverman ED. Antiphospholipid antibodies in pediatric systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2007; 16(8):627-33
41. 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 Aug; 66(8):1000-7

42. Božič B, Čučnik S, Kveder T, Rozman B. Avidity of anti-beta-2-glycoprotein I antibodies. *Autoimmun Rev*, 2005; 4: 303-308
43. Batista U. Gojenje sesalskih celic v *in vitro* pogojih, Študentska založba, Ljubljana, 2005
44. Arko B. Tehnologija PCR v realnem času in možnost uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farm Vestn* 2005; 55: 215-220
45. Kuhelj R. Biokemija v praksi: načela in tehnike. 3. Izdaja, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2003
46. Cambrex. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT® Plus, Cambrex Bio Science, Walkersville, ZDA
47. Ambrožič A, Avčin T, Ichikawa K, Kveder T, Matsuura E, Hojnik M, Atsumi T, Rozman B, Koike T. Anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies in children with atopic dermatitis. *Int Immunol*. 2002; 14(7): 823-30
48. Steck S. Endotoxin Removal: New Solution for Protein Purification. *Cambrex LAL Review*, Cambrex Bio Science 2005; 105(2)
49. Pivarsci A, Homey B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005; 5(4): 284-90
50. Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol*. 2002; 27(3):225-9
51. Kimata H, Lindley I. Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis. *Arch Dis Child*. 1994; 70(2):119-22
52. Sandor S. Laboratory standards in the diagnosis and therapy monitoring of systemic lupu erythematosus.. V: Topić E. (ur.). *New trends in classification, monitoring and management of autoimmune diseases : handbook*. Zagreb: Medicinska naklada, 2005, 59-66
53. Berkun Y, Kenet G. Pediatric Antiphospholipid Syndrome. *IMAJ* 2008; 10: 45-47
54. M. Hatzistilianou, C. Aggouridakī, D. Catriu, F. Athanassiadou. IL-4 and sCD23 in children with atopic dermatitis. *Eur J Pediatr* (1996) 155 : 521-526
55. Aleksza M, Lukács A, Antal-Szalmás P, Hunyadi J, Szegedi A. Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2002; 147(6): 1135-41
56. Raap U, Wichmann K, Bruder M, Ständer S, Wedi B, Kapp A, Werfel T. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(2): 421-3
57. B. Wüthrich, M. K. Kägi1, H. Joller-Jemelka. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 1992; 284: 339-342
58. Yong W L, Won H L. IL-4 induces interleukin-6 (IL-6) expression in human aortic endothelial cells. *FASEB Journal*. 2008; 22: 964.3
59. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol*. 2003; 73(2): 213-24
60. Ip WK, Wong CK, Li ML, Li PW, Cheung PF, Lam CW. Interleukin-31 induces cytokine and chemokine production from human bronchial epithelial cells through activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways: implications for the allergic response. *Immunology*. 2007; 122(4): 532-41

61. Chen L, Marble DJ, Agha R, Peterson JD, Becker RP, Jin T, Li J, Chan LS. The progression of inflammation parallels the dermal angiogenesis in a keratin 14 IL-4-transgenic model of atopic dermatitis. *Microcirculation*. 2008; 15(1): 49-64
62. Mandron M, Ariès MF, Boralevi F, Martin H, Charveron M, Taieb A, Davrinche C. Age-related differences in sensitivity of peripheral blood monocytes to lipopolysaccharide and Staphylococcus aureus toxin B in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(4): 882-9
63. Selander C, Engblom C, Nilsson G, Scheynius A, Andersson CL. TLR2/MyD88-dependent and -independent activation of mast cell IgE responses by the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis*. *J Immunol*. 2009; 182(7): 4208-16
64. Bender BG, Ballard R, Canono B, Murphy JR, Leung DY. Disease severity, scratching, and sleep quality in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2008; 58(3): 415-20
65. Soltesz P, Der H, Veres K, Laczik R, Sipka S, Szegedi G, Szodoray P. Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with endothelial dysfunction. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; 47 (11): 1628-34
66. Forastiero RR, Martinuzzo ME, de Larrañaga GF. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2005; 14(2): 129-36
67. Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T, Stepień H, Woźniacka A, Waszczykowski E. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6) and their soluble receptors (sTNF-alpha-Rp55 and sIL-6R) serum levels in systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm*. 1996; 5(6): 435-41
68. Mathsson L, Ahlin E, Sjöwall C, Skogh T, Rönnelid J. Cytokine induction by circulating immune complexes and signs of in-vivo complement activation in systemic lupus erythematosus are associated with the occurrence of anti-Sjögren's syndrome A antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2007; 147(3): 513-20
69. Papa ND, Raschi E, Moroni G, Panzeri P, Borghi MO, Ponticelli C, Tincani A, Balestrieri G, Meroni PL. Anti-endothelial cell IgG fractions from systemic lupus erythematosus patients bind to human endothelial cells and induce a pro-adhesive and a pro-inflammatory phenotype in vitro. *Lupus*. 1999; 8(6): 423-429
70. Omersel J, Jurgec I, Čučnik S, Kveder T, Rozman B, Sodin-Šemrl S, Božič B. Autoimmune and proinflammatory activity of oxidized immunoglobulins. *Autoimmun Rev*. 2008; 7(7): 523-9
71. Halmerbauer G, Frischer T, Koller DY. Monitoring of disease activity by measurement of inflammatory markers in atopic dermatitis in childhood. *Allergy*. 1997; 52(7):765-9
72. Gresele P, Page C, Fuster V, Vermylen J. Platelets in Thrombotic and Nonthrombotic Disorders. Cambridge University Press, 2002: 852-861
73. Kasperska-Zaj C A, Nowakowski M, Rogala B. Enhanced platelet activation in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Inflammation*. 2004; 28(5): 299-302
74. Szekanecz Z, Shah MR, Pearce WH, Koch AE. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and soluble ICAM-1 (sICAM-1) production by cytokine-activated human aortic endothelial cells: a possible role for ICAM-1 and sICAM-1 in atherosclerotic aortic aneurysms. *Clin Exp Immunol*. 1994; 98(2): 337-43

## 12 PRILOGA

Tabela 21: Pregledna tabela podatkov za vzorce pediatričnih in odraslih pacientov

	Vzorec	Diagnoza	Leto odvzema	Spol	Starost (leta)	Anti- $\beta_2$ -GPI			Anti-kardiolipin			Anti-DNA	IL-6 (ng/L)	LPS
						IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA			
OTROCI	S475	PAPS	2008	M	17,2	> 16	<2	<2	> 30	<5	/	/	4	neg
	R733	PAPS	2007	M	16,1	> 16	<2	<2	> 30	<5	<5	<0,35	4	neg
	S594	PAPS	2008	Ž	17,4	> 16	<2	<2	> 30	8	/	/	4	neg
	S136	SLE	2007	Ž	16,1	2	2	9	6	5	5	0,35	1	neg
	S326	SLE	2007	Ž	17,5	<2	<2	3	<5	7	<5	0,4	1	neg
	S299	SLE	2007	Ž	15,9	2	3	2	5	10	/	0,35	1	neg
	G488	AD	2001	M	0,5	5	0	1	/	/	/	/	5	neg
	H103	AD	2001	M	2,0	7	6	0	/	/	/	/	6	neg
	G828	AD	2001	Ž	0,5	> 16	/	/	/	/	/	/	3	neg
	E1172	normala	1999	Ž	4,9	/	/	/	/	/	/	/	2	neg
	E1179	normala	1999	M	5,0	/	/	/	/	/	/	/	1	neg
E1176	normala	1999	M	4,9	/	/	/	/	/	/	/	2	neg	
ODRASLI	P372	PAPS	2006	Ž	38	7	0	3	5	5	/	/	5	neg
	P54	PAPS	2007	M	61	> 16	<2	<2	> 30	5	5	/	5	neg
	Q927	SLE	2007	Ž	45	4	2	3	11	23	/	<0,35	6	neg
	O495	SLE	2005	Ž	30	> 16	4	9	> 30	16	/	<0,35	6	neg
	M566	SLE	2004	Ž	36	1	4	1	0	5	0	<0,35	2	neg
	1440626	normala	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	neg
	1440624	normala	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3	neg
1440594	normala	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	4	neg	

/ ni meritve