

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DUNJA GORIŠEK

**VNETNI IN ADHEZIJSKI ODZIVI HUMANIH
ENDOTELIJSKIH CELIC NA FRAKCIJE IgG PACIENTOV
Z ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DUNJA GORIŠEK

**VNETNI IN ADHEZIJSKI ODZIVI HUMANIH
ENDOTELIJSKIH CELIC NA FRAKCIJE IgG PACIENTOV
Z ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

**INFLAMMATORY AND ADHESIVE RESPONSE OF HUMAN
ENDOTHELIAL CELLS ON IgG FRACTIONS OF PATIENTS
WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, na Kliničnem oddelku za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra, Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Boflija in doc. dr. Snežne Sodin-Mrl. V laboratoriju so tudi opravili laboratorijske teste krvi za nadaljno analizo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Bofliju in somentorici doc. dr. Snežni Sodin-Mrl, ki sta me tekom raziskovalnega dela in pisanja diplomske naloge spretno usmerjala in mi prijazno svetovala. Hvala tudi Andreju Artnjaku in vsem ostalim zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, ki so mi velikodušno pomagali pri izvedbi laboratorijskega dela.

Iskrena hvala staršem, Tajdi, Iztoku in ostalim najbližjim za vso podporo in spodbudne besede, ki so mi jih namenili tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Boruta Boflija in doc. dr. Snežne Sodin-Mrl.

Dunja Gorišek

prof. dr. Stane Srnič, predsednik komisije

doc. dr. Iztok Grabnar, član komisije

Vsebina

Vsebina.....	III
Povzetek	1
Abstract	3
Seznam okraj-av	5
Uvod.....	7
Antifosfolipidni sindrom	7
β_2 -glikoprotein I.....	10
Nastanek protiteles in aktivacija celic	12
Ateroskleroza	13
Vnetne molekule, vpletene v aterogenezo ó interlevkini	14
Stik med monociti in endotelijem	16
Nadaljevanje aterogeneze	18
Namen dela.....	19
Materiali in metode	20
Biolo-ki material.....	20
Reagenti.....	20
Analizni kompleti.....	22
Aparature in pripomo ki	24
Drobni laboratorijski material.....	25
Metode.....	27
Priprava vzorcev in pacienti	28
Izolacija frakcij IgG	29
Razsoljevanje z dializno membrano.....	30
Sterilna filtracija.....	31

Določanje koncentracije protiteles.....	31
Koncentriranje raztopine protiteles	32
Preverjanje prisotnosti endotoksina	32
Endotelijska celi na kultura.....	33
Določanje izražanja mRNA	36
Verifna reakcija s polimerazo.....	38
Encimsko-immunska metoda: ELISA.....	40
Rezultati in razprava	43
Obdelava celic s serumi.....	43
Poskus 1: Primerjava odzivov na serume bolnikov in zdravih krvodajalcev	44
Poskus 2: Odziv celic na različne koncentracije seruma.....	44
Odziv celic na serume ob dodatku β 2GPI.....	47
Izolacija IgG	47
Obdelava celic s frakcijami IgG	50
Poskusa 3 in 4: Odziv celic na frakcije IgG nizkih koncentracij brez in z dodatkom β 2GPI	50
Poskusa 5 in 6: Odziv celic na frakcije IgG višjih koncentracij brez in z dodatkom β 2GPI	52
Primerjava odzivov celic na tretmaje in drugi vplivi nanje.....	56
Vpliv β 2GPI.....	56
Vpliv ostalih protiteles	58
Poskus 7: Aktivacija celic z LPS	59
Aktivacija celic preko ostalih mehanizmov.....	61
Sklep.....	63
Literatura	65
Priloga	71

Povzetek

Vnetje in adhezija levkocitov sta lahko posledica po-kodbe endotelija in lahko vodita v razvoj ateroskleroze, ki ji sledijo ostali srno-filni zapleti. Med dejavnike tveganja, ki so povezani z aktivacijo endotelijskih celic, sodijo tudi bolezni imunskega sistema. V naši raziskavi smo prouevali, ali protitelesa bolnikov z antifosfolipidnim sindromom sprofljijo povečano izraflanje in izločanje vnetnih in adhezijskih molekul v humanih endotelijskih celicah koronarnih arterij.

S predhodnimi testi odziva celic na serume pacientov smo pokazali, da vzorci bolnih v primerjavi z vzorci zdravih krvodajalcev spodbudijo celice k izločanju interleukina 6. Da bi zmanjšali vpliv drugih aktivirajočih dejavnikov, smo se v naslednjem koraku lotili izolacije protiteles razreda G. Protitelesa smo na celice nanjali v koncentracijah 25, 100, 500 ali 1000 mg/l ter spremljali izraflanje in izločanje interleukina 6 in interleukina 8 ter izraflanje medcelične adhezijske molekule 1 in filno-celične adhezijske molekule 1. Dodatno smo preverjali tudi vpliv prisotnosti β_2 -glikoproteina I v koncentracijah 10 in 100 mg/l.

Na proučevanih celih in kulturi smo pokazali, da tako frakcije IgG kot serumi bolnikov z antifosfolipidnim sindromom spodbudijo izraflanje vseh proučevanih molekul ter izločanje interleukinov 6 oziroma 8. Dodatek β_2 -glikoproteina I, razen z enim vzorcem protiteles, ne izzove večjega izločanja proučevanih proteinov.

Rezultati nakazujejo vpliv antifosfolipidnega sindroma in prisotnosti antifosfolipidnih protiteles na možen razvoj ateroskleroze preko stimulacije endotelija. Potrebne bodo nadaljnje preiskave, ki bodo potrdile povezavo ter razjasnile aktivacijo in njene mehanizme.

Abstract

Inflammation and adhesion of leukocytes can be the consequence of endothelial damage leading to the development of atherosclerosis followed by other cardio-vascular implications. One of the risk factors which correlates with endothelial cell damage is an impairment of the immune system. In this study we examined, if antibodies isolated from patients with antiphospholipid syndrome stimulate the expression and secretion of inflammatory and adhesive molecules in human coronary artery endothelial cells.

Preliminary cellular responses to patients' sera showed a stimulation of interleukin 6 secretion as compared to blood donor samples. In order to eliminate other activating factors, the next step was the isolation of class G antibodies. Antibodies were introduced into the cell culture in concentrations of 25, 100, 500 and 1000 mg/l. The expression and secretion of interleukin 6 and interleukin 8 and the expression of intercellular and vascular cell adhesion molecules were monitored. Additionally, the influence of β_2 -glycoprotein I in concentrations of 10 and 100 mg/l, was observed.

We demonstrated that patients' IgG fractions, just like patients' sera, increase expression of all examined molecules and secretion of interleukin 6 and 8 from human coronary artery endothelial cells. The addition of β_2 -glycoprotein I does not generate an increase in the secretion of the analysed proteins with the exception of one patient's sample. On the basis of our own assessment and the data from preceding examinations the influence of lipopolysaccharid was neglected.

The results indicate the influence of antiphospholipid syndrome and accompanying autoantibodies on the potential development of atherosclerosis through the activation of the endothelium. Additional investigations are needed to confirm the correlation and to elucidate the activation and its mechanisms.

Seznam okraj-av

β 2GPI	β ₂ -glikoprotein I
aCL	antikardiolipinska protitelesa
ANA	protijedrna protitelesa
anti- β 2GPI	protitelesa proti β 2 glikoproteinu I
aPL	antifosfolipidna protitelesa
Apo	apolipoprotein
APS	antifosfolipidni sindrom
CAPS	katastrofi ni antifosfolipidni sindrom
cDNA	komplementarna DNA
CL	kardiolipin
CRP	C reaktivni protein
DPBS	fosfatna raztopina za celi no kulturo
EBM-2MV	rastno goji- e (endothelial growth medium for microvascular cells)
ELISA	encimsko-immunska metoda
FBS	plodov serum goveda
HCAEC	humane endotelijske celice koronarne arterije
HDL	lipoproteini visoke gostote
HRP	hrenova peroksidaza
HUVEC	humane endotelijske celice popkovne vene
ICAM	medceli na adhezijska molekula
IL-1	interlevkin 1
IL-1 β	interlevkin 1 β
IL-1R	receptor za interlevkin 1 β
IL-6	interlevkin 6
IL-6R	receptor za interlevkin 6
IL-8	interlevkin 8
INR	mednarodno normalizirano razmerje
LA	lupusni antikoagulanti
LAL	lizat ameri-kega ostvarja
LDL	lipoproteini nizke gostote
LPS	lipopolisaharid, gramnegativni bakterijski endotoksin
mRNA	informacijska RNA
PAPS	primarni antifosfolipidni sindrom
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PCR	veriflna reakcija s polimerazo
PS	fosfatidilserin
SAPS	sekundarni antifosfolipidni sindrom
sICAM	topna oblika medceli ne adhezijske molekule
SJS	Sjörge-ov sindrom
SLE	sistemski lupus eritematosus
sVCAM	topna oblika filno celi ne adhezijske molekule
TG	trigliceridi
TLR	"toll-like receptor"
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF α	tumorje-nekrotizirajo i faktor α
VCAM	filna celi na adhezijska molekula

Uvod

Srnožilni zapleti so najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu. Med njimi prevladuje ishemična bolezen srca (1), ki je največkrat posledica zmanjšane pretoka krvi v srčno mišico. Optimalno perfuzijo srca preprečujejo trombotični ali aterosklerotični plaki, ki zožijo lumen žile. V zadnjem času mnogo raziskav prikazuje debeljenje stene (medije) arterij tudi kot posledico antifosfolipidnega sindroma (2). Preučevani mehanizmi zajemajo predvsem vpliv serumskih sestavin bolnikov s to boleznijo na oksidirane lipoproteine (2,3). Vloga bolezni pri profljenju vnetja na arterijskih endotelijskih celicah, ki je primarni korak pri aterosklerozi (4), ostaja še neraziskana.

Antifosfolipidni sindrom

Antifosfolipidni sindrom (APS) je avtoimunska bolezen, ki jo po svojem odkritju imenujemo tudi Hughesov sindrom (5). Zanj je značilno nastajanje antifosfolipidnih protiteles (aPL) proti antigenom na membranah celic. Klinične manifestacije bolezni so kompleksne in navidez nepovezane. Bolnike najpogosteje prizadenejo venske in arterijske tromboze ter nosečnostni zapleti (70-80%), kot so spontan splav, mrtvorojenost in preeklampsija (5-7). Manj pogoste posledice delovanja patoloških aPL so trombocitopenija, kožne spremembe, kot je livedo retikularis, prizadetost srčne zaklopke in centralnega živčevja (5,6), pospešena ateroskleroza in druge. Skoraj dve tretjini bolnikov razvijeta APS brez sočasne druge avtoimunske bolezni (6). Tako obliko imenujemo primarni APS (PAPS). Pogosto sindrom spremlja druga sistemska vezivno- tkivna bolezen, na primer sistemski lupus eritematosus (SLE) ali Sjörgenov sindrom (SJS), kar uvrstimo v skupino sekundarnih APS (SAPS) (5). Tretjo obliko, katastrofični APS (CAPS), je leta 1998 izpostavil Asherson. Prekomerna aktivacija endotelijskih celic ali faktorjev strjevanja krvi izjemno hitro pripelje do trombotične mikroangiopatije, ki lahko prizadane več organov in se kljub zdravljenju pogosto konča s smrtjo (5,7).

Za APS značilna aPL niso usmerjena neposredno na fosfolipide, ampak na proteinske kofaktorje (8), kot so β_2 -glikoprotein I (β_2 GPI), protrombin, aneksin A5, protein C, protein S, tkivni aktivator plazminogena, faktor X, kininogeni in drugi (9,10). Pri bolezni so v serumu bolnika najpogosteje prisotna antikardiolipinska protitelesa (aCL), lupusni antikoagulantni in/ali protitelesa proti β_2 -glikoproteinu I (anti- β_2 GPI) (5,7). Nastali lastni

imunski kompleksi sprofljo aktivacijo endotelijskih celic, trombocitov in levkocitov, spodbudijo sintezo in spro– anje adhezijskih molekul, citokinov in kemokinov, izpodrivajo aneksin A5 iz membran, inhibirajo antikoagulantni protein C ter tako spodbudijo protromboti no in vnetno dogajanje (5,7,9).

Bolnik z APS lahko razvije tako venske kot arterijske tromboze (5). Pogostej–e so venske, ki prizadenejo okoli 40 % pacientov (6). Klini na slika je odvisna od lege prizadete file. Tako se bolezen lahko manifestira kot globoka venska tromboza v spodnjih okon inah, tromboembolija in z njo povezana plju na hipertenzija ali kot ledvi ni zapleti. Arterijske tromboze prizadenejo predvsem centralni fliv ni sistem ter koronarne in renalne arterije (5,6). Predvsem za CAPS so zna ilne tromboze malega filja v ledvicah, plju ih, srcu, fliv evju in prebavilih (5). Zapleti v nose nosti so lahko usodni za mater ali za plod (5). Okoli 9 % nose nic z APS razvije preeklampsijo, okoli 4 % eklampsijo. Kar 35 % nose nosti se kon a s splavom v prvih 10 tednih (6). Pomemben klini ni znak APS je tudi trombocitopenija, ki je prisotna pri skoraj tretjini bolnikov (5,6). S PAPS se najve krat pojavlja livedo retikularis, ki nastane zaradi motenj v prekrvavitvi zgornjega sloja kofe. Dolgotrajna bolezen povzro i zadebelitev sr nih zaklopk in sterilne vegetacije, kar vodi v sr no popu– anje. Pogost pojav so tudi epilepsije, migrene, motnje kognitivnih funkcij. Slednje ne nastanejo le zaradi ishemi ne prizadetosti moflanov, ampak so verjetno posledica odlaganja imunskih kompleksov v centralnem fliv evju (5).

Preglednica I: Preliminarni diagnosti ni kriteriji za dolo itev APS. Le-ti zajemajo laboratorijske kriterije (aCL, anti-β2GPI in LA) ter najpogostej–a klini na znaka.

	Klini ni kriteriji	Laboratorijski kriteriji
1	filne tromboze	antikardiolipinska protitelesa
2	zapleti v nose nosti	lupusni antikoagulantni
3	/	anti-β2-glikoprotein I protitelesa

Tudi zdravi ljudje brez klini nih manifestacij APS imajo lahko v serumu prisotna aPL (10). Pojavljajo se pri drugih bolezenskih stanjih, kot so virusne in bakterijske infekcije, maligne bolezni, patolo–ka hematolo–ka stanja, druge sistemske in lokalne avtoimunske bolezni, ali pri terapiji z dolo enimi zdravilnimi u inkovinami (5,7). Prevalenca aPL je tako v celotni populaciji med 1 in 5 %. Le 40650 na 100.000 ljudi boleha za APS. Na novo obolelih je vsako leto 5 na 100.000 ljudi. Ve ja prevalenca APS se pojavlja pri bolnikih s SLE (30 %), globoko vensko trombozo in kapjo pred 50. letom starosti (11). Ve aPL so odkrili pri

starejših. Skoraj 80 % pacientov je flensk (5). CAPS na milijon prizadane manj kot 5 ljudi (7).

Diagnostični kriteriji za določitev APS so bili osnovani leta 1999 v Sapporu na Japonskem (7). Leta 2006 so jih revalidirali in dopolnili v Sydneyu (7,12). Preliminarni klasifikacijski kriteriji (Preglednica I) imajo dobro zadovoljivo občutljivost (0,71) in dobro specifičnost (0,98) ter pozitivno (0,95) in negativno (0,88) napovedno vrednost (5). Za postavitev diagnoze zado- a dokazan vsaj en klinični in en laboratorijski kriterij (5,7,12). Slednje morajo potrditi vsaj dvakrat v razmiku vsaj 12 mesecev. Poleg rutinskih laboratorijskih testov (Preglednica II) se pogosto opravljajo tudi testi drugih proteinov, ki –e niso vključeni med diagnostična merila (5).

Preglednica II: Pomen vrednosti titrov aCL in anti-β2GPI, ki jih po standardizirani metodi določajo v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, na KO za revmatologijo UKC, Ljubljana, ter ovrednotenje vrednosti normaliziranega razmerja pri LA.

aCL	anti-β2GPI	Pomen vrednosti titrov	LA	Pomen vrednosti normaliziranega razmerja
< 5	< 2	negativni	< 1,2	LA niso prisotni
5-10	2-3	obkrog pozitivni	1,2-1,5	obkrog prisotnost LA
10-30	4-7	srednje pozitivni	1,5-2,0	zmerna prisotnost LA
> 30	8-16	visoko pozitivni	> 2,0	izrazita prisotnost LA
/	> 16	zelo visoko pozitivni	/	/

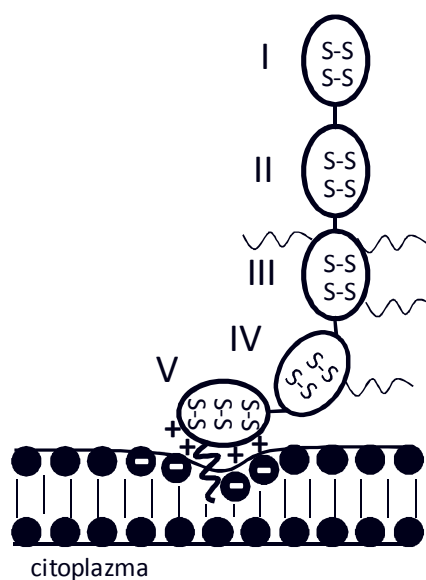
Pri zdravljenju APS se največkrat uporablja varfarin ali drugi antikoagulant v odmerku, ki zagotavlja vrednosti mednarodnega normaliziranega razmerja (INR) med 3 in 3,5. Delež flivorejenih otrok se je ob terapiji nosečnic z acetilsalicilno kislino v kombinaciji z nizkomolekularnim heparinom dvignil z 10-20 % na 70-80 %. Zdravljenje z glukokortikoidi in drugimi imunosupresivi je manj uspešno in se izvaja le pri hematoloških znakih APS, pri CAPS in sočasnem SLE (5). Posamezni primeri CAPS zahtevajo tudi zamenjavo plazme (5,7).

Tveganje za nastanek APS pri zdravih s srednjimi do visokimi titri aCL je osemkrat večje, kot pri zdravih iste starosti brez aCL. Predvsem prognoza bolnikov s CAPS je slaba, saj jih kljub zdravljenju preživijo le 50 % (5). Zato bi si morali pacienti z aCL, ki –e nikoli niso imeli trombotičnega zapleta, prizadevati za zmanjševanje dejavnikov tveganja (kajenje, peroralni kontraceptivi) ter po oceni zdravnika prejemati ustrezno preventivno terapijo, na primer antihipertenzive in zdravilne učinkovine za zmanjševanje holesterola v krvi (7).

β_2 -glikoprotein I

β_2 GPI uvr-amo v skupino β_2 globulinov (13). V plazmi se nahaja v koncentracijah med 150 in 300 mg/l (14). V ve jem obsegu je prisoten v prosti obliki, preostalih 30640 % ga je vgrajenega v lipoproteine, kar je bila osnova prvotnega poimenovanja ó apolipoprotein H (Apo H) (13,15,16). Njegova fiziolo-ka vloga je manj znana in -e ne popolnoma razjasnjena. Struktura mu omogo a vezavo na negativno nabite fosfolipide, kar pomeni, da verjetno med drugim sodeluje tudi pri nevtralizaciji apoptoznega procesa (14). Protein β_2 GPI predstavlja najpomembnej-i antigen za aPL pri APS, saj se nanj vežejo aCL in anti- β_2 GPI (8).

Sinteza enoverifnega, 50 kDa oziroma 326 aminokislin velikega proteina poteka v jetrih (13,14). Pod vplivom razli nih mediatorjev ga lahko izlo ajo tudi ostale celice (17,18). Sestavlja ga pet zaporednih homolognih segmentov, ki vsebujejo kratke ponovitve, "sushi predele", zna ilne za družfno proteinov, ki uravnavaajo delovanje komplementa (13,14). Prve -tiri domene s po 60 aminokislinami so razporejene zaporedno druga za drugo (Slika 1). V vsaki najdemo po dve disulfidni vezi in specifi na aminokislinska zaporedja. Nekoliko ve ji (82 aminokislin) peti segment sestavljajo tri disulfidne



Slika 1: Shematski prikaz strukture β_2 GPI in njegove vezave na celi no membrano.

vezi. Vsebuje -e dodatno zanko na C-koncu, ki je bogata z lizinom in zato pozitivno nabita, ter hidrofobno zanko (13,14). Vsi trije predeli so klju nega pomena za vezavo β_2 GPI na amfifilne molekule. Tiri lizinske enote so nujne za vzpostavitev ionskih interakcij z negativnimi deli molekul (19), hidrofobna zanka pa daje proteinu upogljivost in omogo a njegovo sidranje v fosfolipidni dvosloj (13,14). Poleg omenjenih delov vsebuje domena -e dva α heliksa, ki verjetno pomagata pri avtoinhibiciji prostega proteina (15). Peti segment daje proteinu tudi obliko rke J (14). Tekom postranslacijskih sprememb se β_2 GPI glikozilira na -tirih mestih domen III in IV (13,14).

Kationsko mesto na zanki in drugi predeli pete domene predstavljajo mesta interakcij za negativno nabite fosfolipide, kot so kardiolipin, fosfatidilserin in fosfatidilinozitol, na

membranah aktiviranih celic ali mikroveziklov (9). Poleg tega se β 2GPI veđe tudi na proteine in nekatere druge vrste molekul. Do danes so predstavili naslednje kandidate celi nih receptorjev za β 2GPI: membranski protein aneksin A2, "toll-like receptorja" 2 in 4 (TLR 2 in TLR 4), receptor 2 Apo E, trombocitni adhezivni receptor GP Iba (7,20,21) in receptor Ro60 (22). Med preostale molekule, ki tvorijo interakcije z glikoproteinom, sodijo heparan sulfat (21,15), DNA in druge (7,10). Pogosto je za vezavo nanje potrebna predhodna sprememba konformacije, ki jo omogo i tudi stik proteina z anti- β 2GPI (21).

Gen za β 2GPI se nahaja na 17. kromosomu. Sestavljen je iz osmih eksonov z vmesnimi dolgimi introni (23). Na izraflanje gena vplivajo –tevilni dejavniki: od mo no aktivnega promotorja, drugih predelov zapisa na DNA in transkripcijskih faktorjev do vnetnih mediatorjev ter razli nih bolezni. Poznani so –tirje aleli: Apo H164. Od njih je odvisna verjetnost nastanka protiteles, saj se v primerjavi z ostalimi z Apo H3 in Apo H4 pojavlja ve aPL. Ugotovljenih je bilo ve to kovnih mutacij, med katerimi je tudi premik bralnega okvirja, ki povzro i pomanjkanje β 2GPI, in ve nesmiselnih mutacij. Zamenjava Val247 z Leu povzro i nastanek anti- β 2GPI in razvoj PAPS. Do vi–jega titra aPL pripeljejo tudi spremembe na kriпти nih epitopih domene IV in V. Med 151 odkritimi malimi jedrnimi polimorfizmi jih je 26 pokazalo vpliv na funkcijo gena (14).

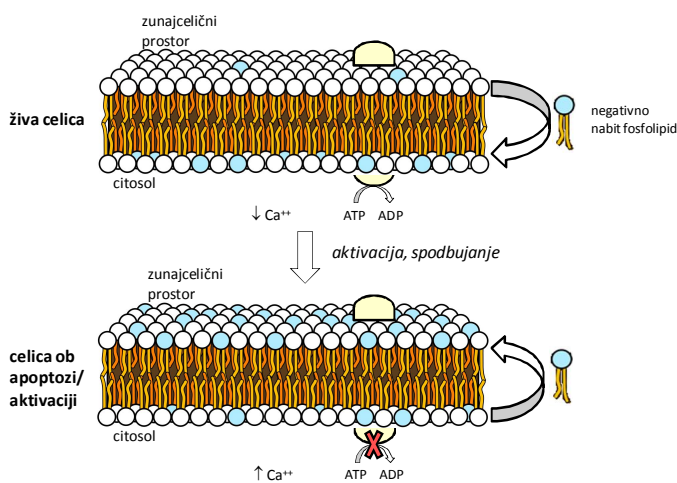
Homologija humanega β 2GPI z ostalimi vrstami sesalcev nakazuje visoko konservativno aminokislinsko zaporedje. Ostali primati izlo ajo prakti no identni nega, podganji je s humanim podoben v 84 %. Od druffine proteinov, ki uravnava jo delovanje komplementa, se β 2GPI razlikuje po legi gena, saj le-ta ne leffi na 1. kromosomu. Podobnost v strukturi s kratkimi ponovitvami najdemo pri drugih endogenih in eksogenih proteinih, kot so protein virusa vaccinia, membranski protein CD 46, fragmenti faktorja H ter protein Hikaru genki. Pomembna je podobnost s proteinom, ki inhibira antikoagulantni love–ki aktivirani protein C. Klasi nim apolipoproteinom (Apo A1, -A2, -C, -E) je manj podoben (15).

V telesu je prisotnih ve razli ic β 2GPI. Inhibicija glikozilacije povzro i napa no zvijanje proteina in izgubo biolo–ke aktivnosti ter pove a afiniteto za aPL. Na vezavo protiteles in fosfolipide vpliva tudi oksidacija glikoproteina, ki v nekaterih primerih zmanj–a interakcije, v drugih pa privede do APS. Biotiniliran in dimeriziran β 2GPI tvorita mo nej–e interakcije s fosfolipidi (15).

Nastanek protiteles in aktivacija celic

Protitelesa nastala pri APS niso usmerjena proti fosfolipidom, ampak proti njihovim kofaktorjem ó proteinom, ki se vežejo nanje. V telesu se lahko sprofi nastajanje aPL pod vplivom ve dejavnikov. Bakterijski ali virusni antigeni, ki opona-ajo orgnizmu lastne antigene, lahko izzovejo nastajanje avtoprotiteles. Genska predispozicija pove a dovzetnost za njihov nastanek. V telesu lahko nastajajo normalno prisotna nevtralizacijska avtoprotitelesa z regulatorno funkcijo, ki lahko ob oksidativnem stresu zaradi pove anja avidnosti postanejo patogena (7).

Fosfolipidna membrana celic v normalnih pogojih izkazuje dolo eno stopnjo asimetrije (Slika 2). Zunanji del dvosloja sestavljajo pretefno holinfosfolipidi, medtem ko aminofosfolipidi zasedajo citosolno stran, kjer najdemo tudi negativno nabite fosfolipide, kot je fosfatidilserin (PS). Pri APS igra pomembno vlogo tudi kardiolipin (CL),



Slika 2: Poenostavljen prikaz asimetrije membrane in poru-enja le-te. Del slike je dobljen iz prostodostopnega internetnega vira (24).

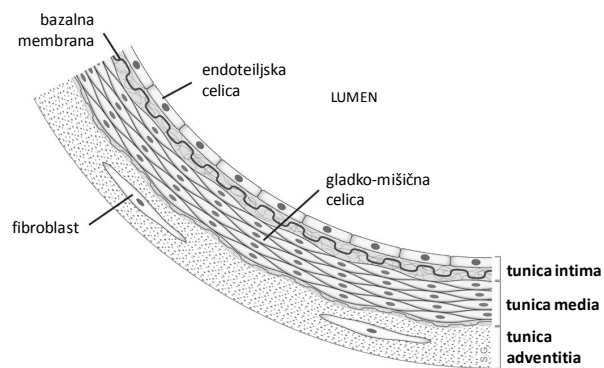
fosfolipid, ki se v fiziolo-kih pogojih nahaja v notranji membrani mitohondrijev, a je v manj-i meri prisoten tudi v notranjem sloju celi ne membrane. Ob nizkih koncentracijah kalcijevih ionov v celici encima flopaza in flipaza z vloflkom energije vzdrflujeta naravno asimetrijo membrane. Pove an vdor kalcijevih ionov ob apoptozi ali aktivaciji celice zavre delovanje teh encimov in hkrati aktivira skramblazo, ki lahko prena-a fosfolipide v obe smeri. Asimetri nost se izgubi. Na zunanji strani membrane se pove a pojavnost negativno nabitih fosfolipidov. Monociti in makrofagi tako prepoznajo in odstranijo po-kodovane celice. V kolikor je njihovo delo neuspe-no, se lahko pojavi vnetje ali razvoj avtoimunske bolezni (15).

Omenili smo, da β 2GPI izkazuje visoko afiniteto do PS in CL. Na nevtralne fosfolipide se ne veže. e makrofagi ne zmorejo kontrolirati apoptotskega procesa, se na membrane ob pomo i aneksina A2 veže β 2GPI. Ob vezavi pride do spremembe konformacije,

izpostavitve kripti nega epitopa in asociacije s TLR 4. Na glikoprotein se sedaj veže protitelo anti-β2GPI, ki spodbudi njegovo dimerizacijo ter stabilizacijo celotnega imunskega kompleksa. Preko membrane se sprofi signal, ki s fosforilacijo stimulira p38 MAP kinazo. Jedrni faktor NF-κB se tekom kaskade prenese v jedro in spodbudi transkripcijo koagulacijskih faktorjev, tumorje-nekrotizirajočega faktorja α (TNFα) in endotelina 1, ki sprofi izločenje drugih vnetnih molekul (7,21,25,26).

Ateroskleroza

Če arterijo prečno prerefemo, lahko steno razdelimo na tri segmente (Slika 3). Na zunanji strani je plast imenovana tunica externa (tudi tunica adventitia), ki zajema vezivno tkivo. V osrednji plasti, tunici mediji, najdemo gladke mišične celice. Najbolj notranjo plast imenujemo tunica intima. Sestavlja jo obilica elastičnih vlaken in bazalna



Slika 3: Prikaz anatomske zgradbe arterijske stene. Sliko smo pridobili, spremenili in uporabili v skladu z avtorskimi pravicami, ki jih določa avtor (27).

membrana in endotelijske celice. Ker je poglavitna naloga arterij dovajanje krvi, so tesni stiki med slednjimi močni, pore pa zelo majhne. Majhna propustnost ne dopušta prehoda velikim molekulam. Obrambna sposobnost odstranjevanja tujkov je zelo šibka, saj arterije za razliko od ostalih tkiv ne vsebujejo lastnega fagocitnega sistema. Znanilno za arterije je tudi, da imajo omejen lastni dovod krvi in vasa vasorum. Vzrok temu je močan kompresijski tlak krvi v lumnu stene. Ta se izenači s hidrostatskim tlakom v vasi vasorum –ele v zunanji tretjini medije. Kisik in hrano dobi notranja polovica stene le s perfuzijo preko endotelija. Zaradi omenjenih značilnosti je arterijska celična stena najbolj dovzetnih tkiv za bolezni. Dogodki, ki vodijo do ateroskleroze, se lahko začnejo v zgodnjem otroštvu (4).

Z izrazom aterogeneza poimenujemo razvoj aterosklerotične lezije v arterijski intimi (28). Da se proces začne, je po danes uveljavljenih teorijah potrebna poškodba endotelija, ki jo lahko povzročijo različni mehanski, kemični ali biološki dejavniki. Za razvoj bolezni razgalitev endotelija ni nujna, zadošča pa izguba njegovih fizioloških funkcij. Kot odgovor

na vsako po-kodbo se tudi v arterijskih endotelijskih celicah sprofi vnetje. Za ta patofiziolo-ki proces je zna ilna veriga dogodkov, ki jih vodijo vnetni mediatorji. Med njimi imajo velik pomen citokini, ki z vezavo na celice spodbudijo izlo anje drugih molekul. Tako se v vneti- u pove a koncentracija kemotakti nih agensov in adhezijskih molekul, ki spodbudijo gibanje levkocitov v smeri po-kodbe in njihovo adhezijo na po-kodovane celice. Citokina z mo nim proinflatornim delovanjem sta interleukin 1 (IL-1) in $TNF\alpha$ (4), dober vnetni kazalec je tudi interleukin 6 (29). Kemokin interleukin 8 je pomemben element migracije levkocitov proti stimuliranim endotelijskim celicam (11), ki ob vnetju na svojo povr-ino izpostavijo filno-celi no adhezijsko molekulo (VCAM) in pove ajo izraflanje medceli ne adhezijske molekule (ICAM).

Vnetne molekule, vpletene v aterogenezo ó interleukini

Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) je pleiotropni citokin, katerega povi-ane koncentracije najdemo v krvnem obtoku ob infekciji z gramnegativnimi bakterijami (30), po-kodbi tkiva ali odpovedi organa. V najve jem obsegu ta 184 aminokislin dolg glikoprotein izlo ajo celice monocitno-makrofagne vrste, endotelijske celice in fibroblasti, vendar se lahko z indukcijo spro- a tudi iz mnogih drugih vrst celic. Izlo anje spodbudita predvsem citokina $TNF\alpha$ in IL-1, vendar se pove a tudi ob trombocite stimulirajo em faktorju, interferonih, razli nih rastnih faktorjih, bradikininu, reaktivnih kisikovih spojinah in nekaterih eksogenih dejavnikih. Izlo anje nadzorujejo kortikosteroidi, nekateri interleukini, du-ikov oksid in prostaglandin E_2 . Po vstopu v krvni obtok se IL-6 lahko veffe na plazemske proteine (albumin, α_2 -glikoprotein, C-reaktivni protein (CRP)) in sestavine komplemента (C3b, C4b). Na ta na in je njegova razpolovna doba v cirkulaciji podalj-ana (29).

Receptor za IL-6 sestavljata dve podenoti. Vezavno mesto na celicah je α veriga receptorja (IL-6R). Ob njej preko membrane leffi β veriga glikoproteina 130, ki se veffe na heterodimer IL-6-IL-6R. Afiniteta IL-6 do α verige receptorja je relativno nizka, vendar z vezavo glikoproteina 130 nastane kompleks z visoko afiniteto, ki prenese signal v celico (31).

V razli nih celicah izzove IL-6 razli ne aktivnosti. Je pglavitni mediator reakcije akutne faze in deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo CRP, komponente komplemента in

druge vnetne proteine (30). Veliko vlogo igra njegovo spodbujanje celic imunskega sistema pri vnetju; morfološko in funkcionalno diferencira monocite v makrofage, spodbudi oksidativni izbruh v nevtrofilcih in monocitih, pospeši proliferacijo multipotentne matične celice ter vpliva na zorenje in aktivacijo aktiviranih limfocitov B in limfocitov T. Poleg omenjenega spodbudi rast osteoblastov in osteoklastov ter sprožanje hormonov iz adenohipofize. Kljub širokemu proinflamatornemu delovanju s spodbujanjem sinteze glukokortikoidov, z ekspresijo inhibitorjev proteaz ter z direktno inhibicijo TNF α in IL-1 v manjši meri tudi zavira vnetje (31,32).

Kemotaktični dejavnik interleukin 8

Migracijo levkocitov skozi endotelij usklajuje velika družina zunajceličnih ligandov, kemokinov. Bele krvničke v *in vitro* sistemih sicer potujejo v smeri koncentracijskega gradienta kemokinov, vendar celice *in vivo* usmerjajo ligandi, ujeti na luminalni površini endotelija (33). Interleukin 8 (IL-8) uvrstimo v poddružino izredno aktivnih kemokinov CXC (30,34), ki ga pri akutnem vnetju proizvajajo monociti, makrofagi, nevtrofilci, fibroblasti, epiteljske in endoteljske celice (34,35). Običajno se iz celic izloča kot 72 aminokislinski dolg protein, a ga v telesu najdemo tudi v drugačnih velikostih (34,35). V endoteljskih celicah se tako nahaja IL-8 s 77 aminokisljinami (34). Ob visokih koncentracijah dimerizira in tvori po tri antiparalelne β prepognjene liste na vsakem monomeru z α vijaknicami na C-koncu (35).

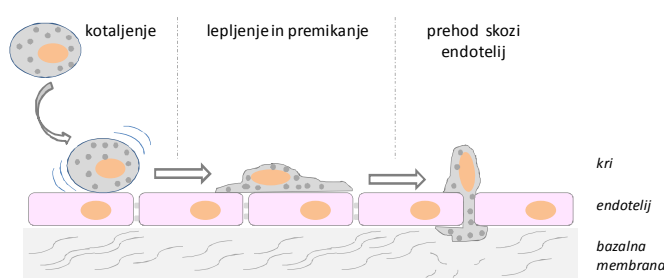
Z različno afiniteto se IL-8 lahko veže na različne receptorje, kar je značilnost večine kemokinov (34). Najmožnejše interakcije tvori z receptorjema CXCR1 in CXCR2, ki spadata v superdružino z G-proteinom sklopljenih transmembranskih receptorjev (34). Vezavo IL-8 na receptor preko inhibicije cAMP ali drugih signalnih poti omogoča migracijo nevtrofilcev v smeri koncentracijskega gradienta IL-8 ter njihovo aktivacijo (34,35). Za kemotakso nevtrofilcev je IL-8 nujen (35). Pomembno vlogo igra tudi pri sprožitvi oksidacijskega izbruha v nevtrofilcih (30), izločanju histamina iz bazofilcev (30,34) in supresiji hematopoeze (34). V *in vitro* sistemih deluje kemotaktično tudi na bazofilce, limfocite T in stimulirane eozinofilce, poveča adhezijo neaktiviranih nevtrofilcev na endoteljske celice in njihovo migracijo preko endotelija, spodbuja angiogenezo ter preko inhibicije protivirusno aktivnega interferona α omogoča razmnoževanje nekaterih virusov (35).

Interlevkin 1 β

Interlevkin 1 β (IL-1 β) je spodbujevalec odgovora akutne faze vnetja in najmonejši endogeni pirogen. Molekula postane aktivna v celici ali zunaj nje s proteaznim cepitjem prekursorskega proteina brez signalnega peptida (36). Najpomembnejši vir IL-1 β so monociti, makrofagi in dendriti ne celice, v manjši meri ga izločajo limfociti B in celice naravne ubijalke (30,36). Med dražljaji, ki sprožajo IL-1 β , so najmonejši endotoksini gramnegativnih bakterij, celi na steni grampozitivnih bakterij, eksotoksini, aktivirane celice T, imunski kompleksi, delci iz silicijevega dioksida in acetat (30); v manjši meri izražanje spodbudijo tudi hipoksija, strjevanje krvi, histamin, sestavine komplementa (C5a) in retinojska kislina. Z visoko afiniteto se IL-1 β veže na receptor IL-1RI, kar povzroča povezavo s pomembnim proteinom receptorja. Nastali heterodimerni kompleks sproži signal, ki povzroča sprožanje citokinov (tudi IL-6), kemokinov (med drugim IL-8), izražanje adhezijskih molekul (ICAM-1, VCAM-1), ciklooksigenaze 2, dušikovega oksida, endotelina-1, jetrnih reaktantov akutne faze in drugih proteinov, ki so prisotni pri vnetju. S svojim delovanjem neposredno ali posredno preko vnetnih molekul povzroča vročino, kaheksijo, resorpcijo kosti, proteolizo mišic in stimulacijo vnetja (36).

Stik med monociti in endotelijem

Adhezijske molekule so proteini, ki jih celica izrazi na svoji površini, s čimer omogoči lastno adhezijo na druge celice ali zunajcelični matriks (37). So bistvenega pomena pri regulaciji



migracije celic v tkiva. Ta poteka v več fazah (Slika 4). Sprva se levkociti, ki potujejo po krvi,

Slika 4: Premikanje levkocitov ob in skozi endotelijsko pregrado. Da lahko levkocit preide v intimo, se s pomočjo različnih adhezijskih molekul najprej kotali po membrani endotelijskih celic. Temu sledi psevdopodno premikanje in lepljenje ter konični paracelularni prehod skozi endotelij.

zaustavljajo in zadržujejo ter kotalijo po endoteliju (30). Kotaljenje omogočajo interakcije med adhezijskimi molekulami na endotelijskih celicah, selektini, in njihovimi receptorji na belih krvniakah (33). Povezovanje celic sproži povečano izražanje integrinov na površini levkocitov (38), ki se povežejo z adhezijskimi molekulami na endotelijski celici ali zunajceličnem matriksu (30). Posledica novih, monejših vezi je monejše

lepljenje in splošne ter lamelipodno premikanje levkocitov po endoteliju (33) proti idealnemu mestu za migracijo preko pregrade (39,40). Tam se odprejo medcelni tesni stiki endotelija, kar olajša paracelularni prehod v intimno fialo (33). Levkociti lahko prehajajo endotelij tudi skozi posamezno celico, transcelularno (39). Prehodu levkocita skozi endotelij sledi sprošanje glikolitičnih encimov in razgradnja bazalne membrane ter pomik celic naprej v tkivo (30).

Adhezijski molekuli ICAM-1 in VCAM-1

Glede na podobnost v zgradbi adhezijske molekule razdelimo v štiri družine: integrini, selektini, molekule, ki vsebujejo ogljikove hidrate, in imunoglobulinska superdružina (30). V slednjo sodita ICAM in VCAM (30,37). V ICAM skupino razvrstimo 5 molekul. Najbolj razširjena, ICAM-1, je sestavljena iz ene polipeptidne transmembranske velige in ima pet imunoglobulinskih segmentov (30). Na površini celice jo najdemo tudi v normalnih, fizioloških pogojih, vendar se njeno izražanje na filnem endoteliju ali levkocitih močno poveča ob vnetnih citokinih (38). Nanjo se vežejo $\beta 2$ integrini na površini levkocitov (30,37,38). Na eno adhezijsko molekulo se lahko veže več ligandov, kar omogoča nastanek multimerov in poveča afiniteto vezave (37). V času vnetja v plazmi najdemo tudi topno obliko ICAM (sICAM-1), katere vloga ostaja še nerazjasnjena (38).

S svojimi sedmimi imunoglobulinskimi odseki (30) se VCAM-1 nahaja na makrofagih, mieloblastih, dendritih in celicah drugih levkocitov (37). Na endotelijskih celicah je navadno v fizioloških pogojih ni (38). Indukcijo izražanja lahko v *in vitro* sistemih opazimo s $TNF\alpha$ ali interferonom γ ($INF\gamma$) (30,40). VCAM-1 se povezuje z vezavi na integrin $\alpha 4\beta 1$, ki se nahaja na površini limfocitov in monocitov (37,30). Po vezavi se v endoteliju sproži signal, ki spodbudi spreminjanje oblike endotelijske celice in tako omogoča migracijo levkocita v bazalno membrano (37). Opazili so, da so nekateri integrini skupine $\beta 1$ pomembni pri uravnavanju prehoda skozi endotelij, medtem ko integrini $\beta 2$ sodelujejo predvsem pri vezavi na matriks (30). VCAM-1 in ICAM-1 sta eni najpomembnejših molekul pri adheziji in migraciji monocitov, kar je osnovni dokaz, da so adhezijske molekule potrebne za začetek in napredovanje ateroskleroze (39,41,42).

Nadaljevanje aterogeneze

Plast endotelija po po-kodbi ni več uinkovita prepreka med plazmo in subendotelijskim prostorom. Posledica je zbiranje in adhezija monocitov ob endoteliju ter njihov prehod v intimo, kjer se diferencirajo v makrofage. Spremenjeno delovanje endotelijske celice omogoči prehod plazemskim lipoproteinom nizke gostote (LDL) v intimo arterije s transcitozo, od koder jih s fagocitozo poskušajo odstraniti makrofagi. Ker je migracija LDL pri aterosklerozi nemogoča, je obrambni mehanizem makrofagov prenehal. Tvorijo se za neje oksidirani produkti LDL, ki jih zaradi večje afinitete makrofagni receptorji več lažje fagocitirajo. Kopiranje LDL v makrofagih povzroči nastanek gobastih celic. Hkrati se odvija povečana adhezija trombocitov in sproščanje trombocitnih dejavnikov, ki vplivajo na agregacijo trombocitov in dodatno spremenijo funkcijo endotelija. Sproščanje mediatorjev vnetja, tvorjenje oksidiranih lipidov in hipoksija, ki nastane v lehi, spodbudijo razmnoževanje gladkih mišičnih celic v mediji in njihovo migracijo v intimo. Tam pospešeno izdelujejo kolagen, elastična vlakna in proteoglikane. Tudi v njih se vrši kopiranje in transformacija v gobaste celice. Ob napredovanju procesa zaradi nezmožnosti opravljanja nativnih funkcij gobaste celice propadejo, kar privede do nastanka ateroma. Slednje več dodatno spodbudi razmnoževanje gladkih mišičnih celic, kopiranje veziva in zadebelitev lehe, v katero se veže kalcij. Zapleti, ki jih povzročijo nastanek aterosklerozi nega plaka, zajemajo ulceracijo, trombozo in anevrizmo. Ti so za bolnika lahko usodni, posebno, če je do po-kodbe prišlo na endoteliju aortne ali koronarnih arterij (4,43).

Namen dela

Srno-filni zapleti so najpogostejši vzrok smrti bolnikov z APS. Pri pacientih so ugotavljali zgodnje debeljenje intime v koronarnih arterijah in nastanek aterosklerotičnih plakov. Ker je najzgodnejši dogodek v razvoju ateroskleroze poškodba endotelija, smo se v raziskovalnem delu osredotočili na proučevanje učinkov avtoimunskih kompleksov na endotelijske celice. Za etne stadije ateroskleroze in aktivacije endotelija označujejo vnetni citokini, kemokini in adhezijske molekule.

Hipoteza:

"Izolirana protitelesa razreda G pacientov z APS bodo povzročila aktivacijo humanih endotelijskih celic koronarnih arterij (HCAEC) v primerjavi s frakcijami IgG zdravih."

Z afinitetno kromatografijo nameravamo iz serumov krvodajalcev izolirati frakcije IgG. V primeru pacientov z APS bo izolat zajemal tudi protitelesa proti β 2GPI. Frakcije zdravih bodo služile kot negativna kontrola. Predvidevamo, da bodo avtoprotitelesa v kompleksu z β 2GPI spodbudila aktivacijo primarnih humanih endotelijskih celic, kar bomo izsledili kot povečanje izražanja in izločanja citokina IL-6, kemokina IL-8 ter adhezijskih molekul sICAM-1 in sVCAM-1.

Specifični cilji:

1. Izolacija frakcij IgG iz serumov bolnikov z APS.
2. Izolacija frakcij IgG iz serumov zdravih krvodajalcev.
3. Pregled vplivov frakcij IgG na izločanje IL-6 in IL-8 iz HCAEC.
4. Pregled vplivov frakcij IgG na izražanje IL-6, IL-8 in adhezijskih molekul sICAM-1 in sVCAM-1 na nivoju mRNA v HCAEC.

Potrditveni dokaz hipoteze bi bila dobra osnova za nadaljnja proučevanja mehanizmov ateroskleroze pri APS ter terapije bolezni v smeri zmanjševanja tveganja usodnih dogodkov.

Materiali in metode

Biološki material

- humane endotelijske celice koronarnih arterij (human coronary artery endothelial cells (HCAEC)), Lonza, Walkersville, MD, ZDA
- goji- e za HCAEC, Lonza, Walkersville, MD, ZDA
 - osnovno goji- e EBM-2 (Endothelium Growth Medium-2), 500 ml
 - dopolnila za goji- e (EGM-2-MV SingleQuots)
 - rekombinantni humani epidermalni rastni dejavnik (hEGF), 0,5 ml
 - hidrokortizon, 0,2 ml
 - gentamicinijev sulfat in amfotericin B (GA-1000), 0,5 ml
 - rekombinantni humani fibroblastni rastni dejavnik (hFGF-B), 2 ml
 - rekombinantni humani filni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), 0,5 ml
 - dolgi R3 rekombinantni insulinu podobni rastni dejavnik 1 (R3-IGF-1), 0,5 ml
 - askorbinska kislina
 - plodov serum goveda (Fetal Bovine Sera, FBS), 25 ml
- rekombinantni humani interlevkin 1 , koncentracije 0,1 g/l (Biosource™), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- 3 serumi bolnikov z APS
- 5 serumov zdravih krvodajalcev

Reagenti

- pufri za afinitetno kromatografijo (Ab Buffer Kit), GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska
 - vezavni pufer, 20 mM Na₂HPO₄ v 20 % etanolu, pH 7,0
 - elucijski pufer, 0,1 M glicin-HCl, pH 2,7
 - nevtralizirajo i pufer, 1 M Tris-HCl, pH 9
- fosfatni pufer z NaCl pH 7,4
 - NaCl p. a, 80 g
 - Na₂HPO₄ × 2H₂O p.a., 11,5 g
 - KCl p.a., 2 g

- KH₂PO₄ p.a., 2 g
- destilirana voda, ad 10 l
- barvilo za določanje koncentracije proteinov, Coomassie Brilliant Blue G-250, BioRad
- standard IgG
- voda za celične kulture (WFI), 500 ml, Lonza, Walkersville, MD, ZDA
- fosfatna puferna raztopina za celično kulturo (BioWhittaker DPBS (Dulbecco's PBS brez Ca in Mg)), 500 ml, Lonza, Verviers, Belgija
- tripsin, EDTA (Trypsin ó Versene), 100 ml, Lonza, Walkersville, MD, ZDA
 - glukoza, 1000 mg/l
 - KCl, 400 mg/l
 - NaCl, 8000 mg/l
 - NaHCO₃, 580 mg/l
 - fenol rdeča, 2 mg/l
 - tripsin, 500 mg/l
 - EDTA, 200 mg/l
- tripsinsko modnilo (Trypan Blue Stain 0,4 %), 100 ml, Lonza, Walkersville, MD, ZDA
 - tripsinsko modnilo, 4,0 mg/l
 - NaCl, 8,5 mg/l
- raztopina za zaščitno celic ob zmrzovanju (Chryoprotective Medium), Lonza, Walkersville, MD, ZDA
 - Hanks' BSS
 - dimetilsulfoksid, 15 %
- β-merkaptoetanol
- reakcijski pufer za verifno reakcijo s polimerazo (PCR Master Mix), Promega, Madison, WI, ZDA
 - DNA-polimeraza Taq (Taq DNA Polimerase), 50.000 U/l
 - -tirni vrste nukleotidov (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 4 x 400 mM
 - MgCl₂, 3 mM
- oligonukleotidni za etniki (F in R)
- reakcijski pufer z dodanimi barvili za agarozno gelsko elektroforezo (Blue Juice Gel Loading Buffer), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - saharoza, 65 % (m/v)

- Tris-HCl, 10 mM
- EDTA, 10 mM
- bromofenolmodro, 0,3 % (m/v)
- označevalci velikosti DNA fragmentov (Low Range DNA marker), 20 ó 1000 bp, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- 70 % etanol
- razkuffilo

Analizni kompleti

- analizni komplet za test na bakterijski endotoksin (Limulus Amebocyte Lysate), PYROGENT Plus, Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, ZDA
 - liofiliziran lizat amebocitov ameri-kega ostvarja (Limulus Polyphemus Lysate (LAL)), 1,8 ml
 - liofiliziran endotoksin 055: B5 iz bakterije E.Coli, 10 ng, 5 ml, 10 EU/ml
- analizni komplet encimsko-immunske metode (ELISA) IL-6 (Immunoassay Kit Human IL-6), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - rekombinantni humani IL-6 (hu IL-6 Standard), 3474 pg/vialo ó 1,4 ml
 - pufer za red enje standarda (Standard Diluent Buffer), 25 ml
 - rekombinantno protitelo proti IL-6, konjugirano z biotinom, (hu IL-6 Biotin Conjugate), 6 ml
 - mikrotitrna plo- a prekrita z rekombinantnimi protitelesi proti love-kem IL-6 (hu IL-6 Antibody-Coated Wells (96 WP))
 - kompleks streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidaze (HRP)), 100-kratni koncentrat
 - pufer za red enje kompleksa streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidaze (HRP) Diluent)
 - koncentrirani spiralni pufer (Wash Buffer Concentrate)
 - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) (Stabilized Chromogen (tetramethylbenzidine))
 - raztopina za zaustavitev reakcije (Stop Solution (H₂SO₄))
- analizni komplet za ELISA IL-8 (Immunoassay Kit Human IL-8), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - rekombinantni humani IL-8 (hu IL-8 Standard)

- pufer za red enje standarda (Standard Diluent Buffer)
- rekombinantno protitelo proti IL-8, konjugirano z biotinom, (hu IL-8 Biotin Conjugate), 6 ml
- mikrotitrna ploča prekrita z rekombinantnimi protitelesi proti love-kem IL-8 (hu IL-8 Antibody-Coated Wells (96 WP))
- kompleks streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidaze (HRP)), 100-krat koncentrirana raztopina
- pufer za red enje kompleksa streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidaze (HRP) Diluent)
- koncentrirani spiralni pufer (Wash Buffer Concentrate)
- TMB (Stabilized Chromogen (tetramethylbenzidine))
- raztopina za zaustavitev reakcije (Stop Solution (H₂SO₄))
- analizni komplet za ELISA sICAM-1 (Immunoassay Kit Human sICAM-1), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - mikrotitrna ploča prekrita z monoklonskimi protitelesi proti love-ki sICAM-1
 - monoklonsko protitelo proti sICAM-1 konjugirano s hrenovo peroksidazo (HRP-Conjugated anti-sICAM-1 moAb (murine) to hu sICAM-1) 60X koncentrirana raztopina
 - standard sICAM-1 (sICAM-1 Standard), 10 µg/l
 - spiralni pufer (Wash Buffer), PBS, 1 % Tween 20
 - raztopina za red enje vzorcev (Sample Diluent)
 - analizni pufer (Assay Buffer 20X), PBS, 1 % Tween 20, 10 % BSA
 - raztopina substrata (Substrate Solution), TMB
 - raztopina za zaustavitev reakcije (Stop Solution (H₃PO₄)), 1M
- komplet za izolacijo RNA (PureLink™ RNA MiniKit), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - lizirajoči pufer (Lysis Buffer)
 - spiralni pufer I (Wash Buffer I)
 - spiralni pufer II (Wash Buffer II)
 - voda brez RNAz (RNase-Free Water)
 - epruvetke z membrano (Spin Cartridges)
 - zbiralne epruvetke (Collection Tubes, Recovery Tubes)

- komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System), Promega, Madison, WI, ZDA
 - reverzna transkriptaza AMV (AMV Reverse Transcriptase)
 - rekombinantni ribonukleazni inhibitor (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor)
 - za etniki oligo(dT) (Oligo(dT) Primer), 0,5 g/l
 - heksamerni naključni za etniki (Random Primers), 0,5 g/l
 - kanamicin ó pozitivna kontrola (1,2 kb Kanamycin Positive Control RNA), 0,5 g/l
 - mešanica deoksiribonukleodid trifosfatov (dNTP Mixture)
 - pufer za reverzno transkripcijo (RT 10X Buffer), 100 mM TrisHCl, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100
 - magnezijev klorid (MgCl₂), 25 mM
 - voda brez nukleaz (Nuclease-Free Water)
- komplet za ELISA β2GPI (Zymutest β2GPI), Hyphen BioMed
 - mikrotitrna plošča s poliklonskimi protitelesi proti humanem β2GPI
 - raztopina za redenje vzorcev (Sample Diluent)
 - standard β2GPI (β2GPI Calibrator), 160 μg/l
 - kontrola I (β2GPI Control I ó High), 78 μg/l
 - kontrola II (β2GPI Control II ó Low), 44 μg/l
 - spiralni pufer (Wash Solution)
 - protitelo proti β2GPI konjugirano s hrenovo peroksidazo (anti-(h)-β2GPI-HRP immunoconjugate)
 - raztopina za redenje konjugata (β2GPI Conjugate Diluent)
 - raztopina substrata (Substrate Solution), TMB
 - raztopina za zaustavitev reakcije (Stop Solution (H₃PO₄)), 0,45 M

Aparature in pripomočki

- vibracijski mešalnik, vrtnik, Vortex, Assister, Sondheim, Nemčija
- kolona za afinitetno kromatografijo, HiTrap Protein G HP, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska
- UV/VIS enofarkovni spektrofotometer M501, Camspec, Leeds, Velika Britanija

- magnetno mešalo, RTC basic IKAMAG safety control, IKA, Staufen, Nemirja
- pH meter, Mettler Toledo SevenEasy, Corning Science Products, New York, ZDA
- centrifuga, Universal 32R, Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Nemirja
- stresalnik, Promax 1020, Heidolph Instruments, Schwabach, Nemirja
- italec mikrotitrskih plošč, Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska
- centrifugirne epruvete s filtrom iz regenerirane celuloze (30 kDa), Amicon Ultra 4, Millipore, Billerica, MA, ZDA
- avtoklav A-11, Kambi Laboratorijska oprema, Semi, Slovenija
- aseptična komora z laminarnim pretokom zaka, LaminAir, Holten, Allerød, Danska
- vodna kopel, Water Bath TW8, Julabo, Seelbach, Nemirja
- inverzni mikroskop, Eclipse TS100, Nikon, Japonska
- celični inkubator, Heto-Holten cellhouse 154, Astel, Francija
- vakuumska črpalka, Vacuum Pump XF54 230 50, Millipore, Francija
- centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- inkubator za PCR, 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Cambridge, Velika Britanija
- 2 % agarozni gel, E-Gel 2 % Agarose (GP), Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- kasetna za agarozni gel, E-Gel PowerBase Version 4, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
- UV transluminator (aparatus za slikanje gelov), G:BOX, Syngene Applied Bioscience, Cambridge, Velika Britanija

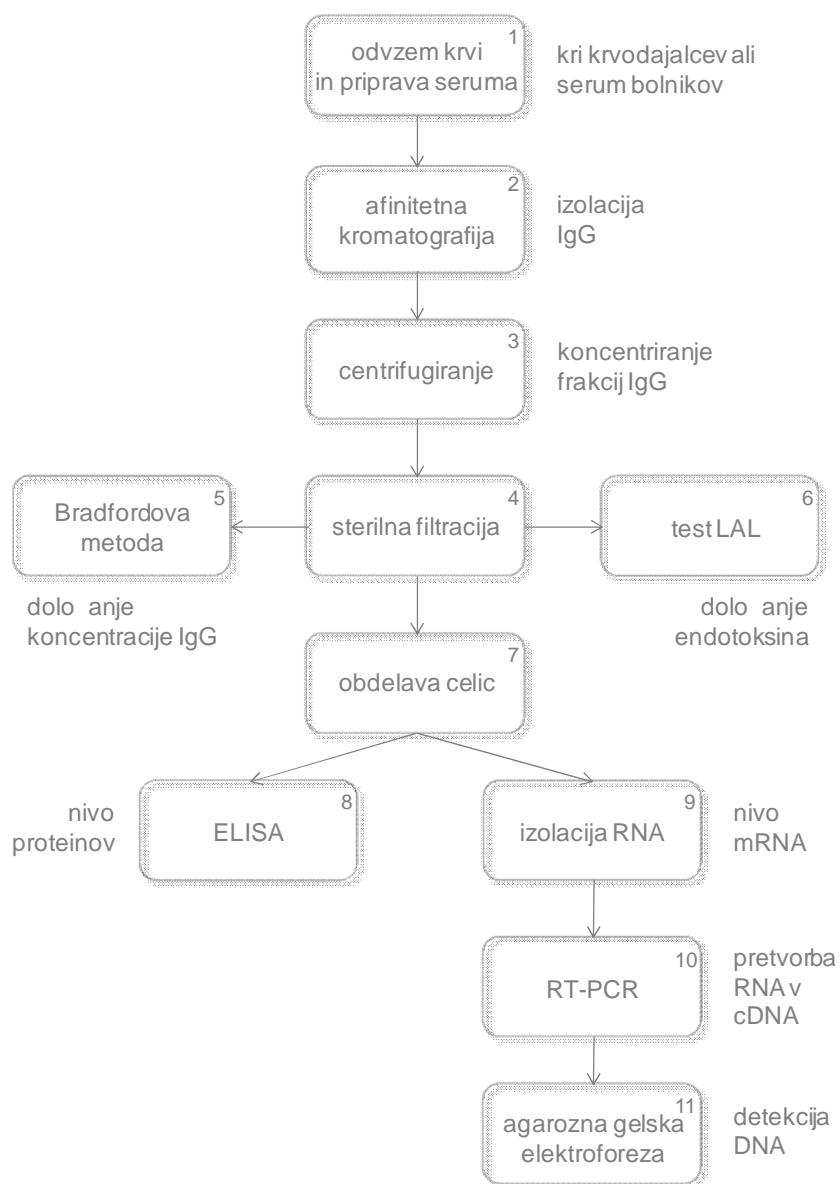
Drobni laboratorijski material

- sterilni, nepirogeni filter 0,45 mm za enkratno uporabo, Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemirja
- sterilni, nepirogeni filter 0,20 mm za enkratno uporabo, Minisart, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemirja
- dializna vrečka iz celulozne membrane, Dialysis tubing cellulose membrane, Sigma-Aldrich
- zapiralca dializne vrečke, Dialysis tubing closures, Sigma-Aldrich
- 70 ml kvarčni kvartec, QS 10,00 mm, Camspec, Cambridge, Velika Britanija
- plastenke za tkivne kulture 75 cm², Tissue Culture Flask 75 cm², TPP, Trasadingen, Švicarska

- testne 24-prekatne ploče, Test Plate 24, TPP, Trasadingen, TMVica
- testne 6-prekatne ploče, Test Plate 6, TPP, Trasadingen, TMVica
- mikrotitrna ploča s 96 prostorov, Costar 96-Well Microplate, Medium Binding,
- merilne pipete (5 ml, 10 ml, 25 ml), Biohit Mechanical Pipettes, Biohit, Helsinki, Finska
- multipipete (100 µl, 300 µl), Research, Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- avtomatske pipete (0,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl), Research, Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- nastavki za pipetiranje (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl, 5000 µl), Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- sterilni nastavki za pipetiranje s filtrom (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- epruvetke 1,5 ml, Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- epruvetke 0,2 ml, PCR Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nem ija
- centrifugirne epruvete (15 ml, 50 ml), Centrifuge Tubes, TPP, Trasadingen, TMVica
- steklene epruvete 5 ml
- steklene bačve (50 ml, 2000 ml, 3000 ml, 5000 ml)
- steklene merilne bučke (50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)
- brizge (3 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml), SOFT-JECT, Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Nem ija
- igle
- papirski indikatorji za merjenje pH
- gorilnik
- parafilm

Metode

Pri delu v Laboratoriju za imunologijo revmatizma smo uporabljali raznovrstne biološke eksperimentalne metode. Le-te so zajemale različne tehnike priprave vzorca, izolacije protiteles ter detekcije in kvantitativne določitve proteinov in mRNA. Potek zastavljenega dela, ki ga prikazuje Slika 5, se je začel z odvzgom krvi krvodajalcem in pridobivanjem serumov bolnikov, iz katerih smo nato izolirali protitelesa. Ta smo v naslednjih korakih pripravili za nanos na celice. Po obdelavi HCAEC smo določevali izločanje vnetnih in adhezijskih molekul ter izražanje njihovih genov.



Slika 5: Shema poteka eksperimentalnega dela.

Priprava vzorcev in pacienti

Laboratorij za imunologijo revmatizma nam je posredoval polno kri petih zdravih krvodajalcev (K16K5) ter serume treh bolnikov z APS (B16B3). Predhodno so bili preverjeni na prisotnost protiteles anti- β 2GPI in aCL ter ostale laboratorijske teste, ki jih rutinsko izvajajo v laboratoriju. Bolnikovim serumom so preverili tudi avidnost IgG anti- β 2GPI. Po dvourni koagulaciji so vzorce krvi centrifugirali 15 min pri 520 g (21 °C). Serume zdravih smo s pipeto prenesli v označene plastične epruvete ter tako od vsakega dobili okoli 11 ml za etnega vzorca. Zaprte epruvete s serumom smo hranili v zamrzovalniku pri -40 °C.

Preglednica III: Bolezensko stanje pacientov. Pri vseh bolnikih je bila diagnoza postavljena na osnovi kriterijev za določitev APS. Mejne vrednosti laboratorijskih testov za anti- β 2GPI, aCL in LA so opisane v Preglednici II. Klasične vrednosti povišanega LDL in trigliceridov (TG) pomenijo njuno koncentracijo nad 4,5 mmol/l oziroma 5 mmol/l. Mejna vrednost lipoproteinov z visoko gostoto (HDL) je 1 mmol/l. ČeS ó centralni živčni sistem, d* zmanjšana ledvična funkcija.

Pacient		B1	B2	B3	
Spol		ž	M	ž	
Starost		55	31	66	
Diagnoza		APS, SLE, SJS	APS, SLE, SJS	APS	
Klinični znaki	tromboza	venska	venska	arterijska	
	nose . zapleti	✓	×	✓	
	simpt. ČŽS	×	✓	×	
Laboratorijski izvidi	a β 2GPI	IgG	5	45	280
		IgM	30	25	0
		IgA	< 2	10	0
	aCL	IgG	58	112	75
		IgM	77	69	3
		IgA	1	20	-1
	LA		1,21	2,36	3,21
	ostalo		↑ LDL, ↓ HDL, ↑ TG, ↑ Glc, d*	↓ HDL	
Starost serumov za izolacijo		17.11.2000 - 28.10.2005	27.09.2004 - 04.08.2006	14.06.2007 - 08.09.2009	
		14.12.2006 - 09.11.2009			
		14.12.2006 - 09.11.2009			
Odvzem krvi za diagnozo		11.9.2006, 30.8.2007	4.8.2006	14.6.2007, 29.10.2009	

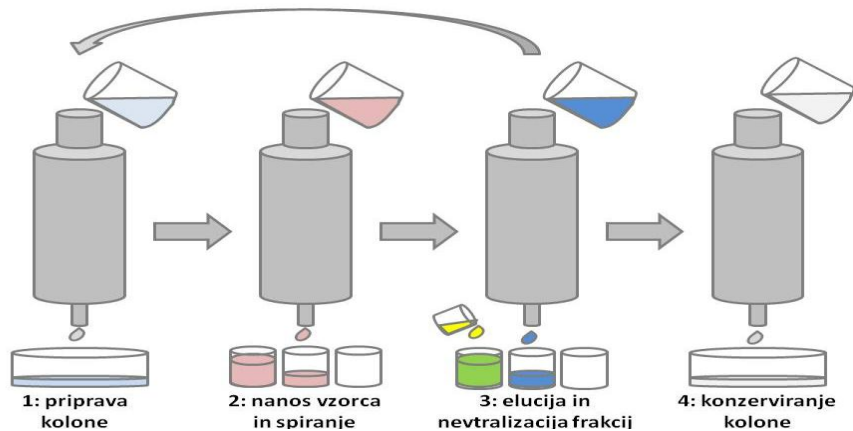
Serume treh pacientov, katerih bolezensko stanje prikazuje Preglednica III, smo združili glede na velikost titrov anti- β 2GPI in avidnost protiteles. Dobili smo pet različnih serumskih vzorcev, saj so serumi B1 iz različnih obdobjev odvzemov izkazovali rahlo različne titre in avidnosti:

- B1a: heterogeno-avidna anti- β 2GPI IgG, srednje visoki titri
- B1b: visoko-avidna anti- β 2GPI IgG, srednje visoki titri
- B1c: visoko-avidna anti- β 2GPI IgG, visoki titri

Izolacija frakcij IgG

Afinitetna kromatografija je najmožnejša analiza na metoda izoliranja proteinov (44,45). Pri njej se molekule ločujejo glede na sposobnost običajno nekovalentne in reverzibilne specifične vezave na adsorbent. Zato je posebej primerna za izolacijo točno določenega proteina, ki je prisoten v kompleksni mešanici makromolekul (45,46). Zaradi velike specifičnosti lahko z metodo dosežemo tudi do 10.000-kratno očiščenje (46).

Za izolacijo frakcij IgG smo uporabili 5-mililitrsko kolono z imobiliziranim proteinom G na visoko premreženi 6 % agarozni. Postopek smo izvajali v skladu z navodili proizvajalca. Pufre in kolono smo segreti na sobno temperaturo. Koncentrirani vezavni in elucijski puffer smo desetkrat redčili ali ter filtrirali skozi filter z 0,40 μ m velikimi porami. S pripravljenim vezavnim pufrom smo redčili ali enakomerno filtrirane serume v razmerju 1:1, tako da smo dobili končni volumen 3 ml. Kolono smo s pretokom 5 ml/min s pomočjo brizge spirali zaporedno s 25 ml destilirane vode in s 25 ml vezavnega pufra (Slika 6, 1). Na vrh kolone smo nanесли pripravljen vzorec. Sočasno smo ob izhodu kolone v epruvetko začeli zbirati 1,5-mililitrske frakcije izpiranega seruma (Slika 6, 2). Zbranim raztopinam smo merili absorbanco pri 280 nm in nadaljevali s spiranjem, dokler ni dosegla vrednosti pod 0,010 glede na vezavni puffer. Vezane proteine IgG smo v isti smeri nespecifično eluirali z elucijskim pufrom, ki z nizkim pH omogoča prekinitev interakcij med protitelesi in proteinom G. Zbirali smo frakcije po 1 ml, v katere smo takoj dodali predhodno določeno količino (25650 μ l) nevtralizacijskega pufra, s katerim smo normirali pH eluiranih frakcij na vrednosti med 7 in 8 ter s tem preprečili denaturacijo proteinov (Slika 6, 3). Zbranim frakcijam smo izmerili absorbance ter končali z elucijo, ko so glede na vezavni puffer vrednosti padle na 0,010. Frakcije, ki so imele absorbanco nad 0,100, smo združili v epruvete za centrifugiranje ter nadaljevali z razsoljevanjem z dializno membrano. Kolono smo sprali s 25 ml vezavnega pufra (Slika 6, 1). Zadnjemu ml frakcij smo izmerili pH, ki je moral biti okoli 6, ter nadaljevali z novim nanosom vzorca. V primeru, ko smo naslednjo izolacijo protiteles natovali več kot dva dni, smo skozi kolono spustili 25 ml 20 % etanola ter tako preprečili kontaminacijo tekom shranjevanja pri 268 °C (Slika 6, 4).



Slika 6 Potek izolacije protiteles z afinitetno kromatografijo. Na začetku kolono spiramo s 1, sledi nanos vzorca in odstranjevanje odvečnih snovi s 2; postopek nadaljujemo z elucijo v prejetem koraku vezanih protiteles s 3; končno s shranjevanjem kolone v 20 % etanolu s 4 ali ponovimo postopek.

Razsoljevanje z dializno membrano

Proteine lahko ločimo od manjših molekul z dializo skozi polprepustno membrano, kakršna je celulozna. Veje molekule ostajajo znotraj raztopine v dializni vrečki, medtem ko manjše s pasivno difuzijo prehajajo skozi membrano v okolni medij, dokler se koncentraciji v njem in v vrečki ne izenačita. Tehnika je uporabna za razsoljevanje vzorca in doseganje željenega pH v njem (47).

Okoli 10 cm (za 15 ml frakcij IgG) celulozne dializne vrečke s porami, ki ne prepustijo delcev večjih od 12 kDa, smo namakali 364 ure v tekoči vodi. S tem korakom smo odstranili glicerol, ki tekom shranjevanja služi kot vlažilec membrane, vendar pri dializi lahko vodi do neželjenega obarjanja proteinov. Za dializni postopek smo pripravili 10 l fosfatnega pufera z NaCl (PBS) s pH 7,4, ki smo ga korigirali z 1M NaOH ali 1M HCl. Po namakanju smo membrano na eni strani zatisnili z zapiralci dializne vrečke ter jo po kromatografiji napolnili s približno 15 ml frakcij IgG. Zapiralce smo pripeli tudi na drugo stran ter napolnjeno vrečko najprej 2 uri in po menjavi pufera ne zamakali v 3 l PBS pri temperaturi 5 °C ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom pri 200 rpm. Po končan dializi smo vzorce zbrali v svežih centrifugirnih epruvetah, le-te označili in hranili do uporabe na temperaturi -20 °C.

Z izolacijo smo dobili več frakcij IgG istega seruma. Vsem so v Laboratoriju za imunologijo revmatizma določili prisotnost anti- β 2GPI po "hitri" metodi z encimsko-imunsko metodo, saj bi se vezava protiteles na β 2GPI tekom izolacije zaradi ostrih pogojev

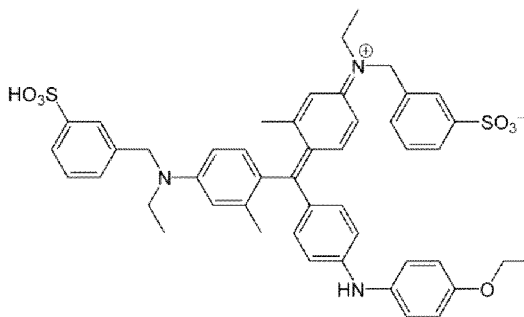
lahko spremenila. Frakcije smo na osnovi rezultatov in pripadnosti posamezniku združili (Preglednica X).

Sterilna filtracija

Pred nanosom vzorcev na celice je potrebno zagotoviti im večjo sterilnost vseh raztopin, ki bodo v neposrednem stiku s celično kulturo. Odmrznjene frakcije IgG vsakega posameznika smo centrifugirali s pospeškom 1500 g 15 min pri 4 °C. V aseptičnih pogojih smo jih nato preko filtra z velikostjo por 0,20 µm filtrirali v označene sterilne centrifugirne epruvete. Sterilno filtrirane frakcije IgG smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Določanje koncentracije protiteles

Ena izmed kolorimetričnih metod določanja koncentracije proteinov je Bradfordova metoda, ki za določevanje uporablja barvilo Coomassie Brilliant Blue (Slika 7). Ta se v kislem mediju z elektrostatskimi interakcijami veže na proteinske arginine, v manjši meri tudi lizine in histidine. Hkrati se med



Slika 7: Coomassie Brilliant Blue G 250. Povzeto po prosto dostopnem medmrežnem viru (48).

aromatskimi aminokislinami in barvilom tvorijo hidrofobne interakcije. Najvišjo absorbanco kompleks doseže pri valovni dolžini 595 nm, barvilo samo pa pri 465 nm (47).

Pred izvedbo testa smo ocenili koncentracijo protiteles v izoliranih frakcijah. Oceno smo osnovali na referenčnih vrednostih γ globulinov v serumu (okoli 15 g/l) in rednjenju le-teh tekom postopka izolacije. Za izvedbo testa smo potrebovali koncentracije med 0,05 in 0,5 g/l, zato smo vzorce redili ali 5-krat s PBS. Vzoredno s pripravo vzorcev smo z destilirano vodo redili tudi barvilo v skladu s proizvajalčevimi navodili ter sestavili standarde IgG koncentracij med 0,12 in 1,44 g/l. Na mikrotitrsko ploščo s srednjo sposobnostjo vezave smo nanесли 10 µl vzorcev, standardov in negativne kontrole v dveh paralelnih ter takoj nato še 200 µl barvila. Ploščo smo po nanosu postavili v temen inkubator ter jo rahlo stresali. Po petih in desetih minutah smo izmerili absorbanco pri 595 nm ter obdelali podatke s pomočjo umeritvenih premice.

Koncentriranje raztopine protiteles

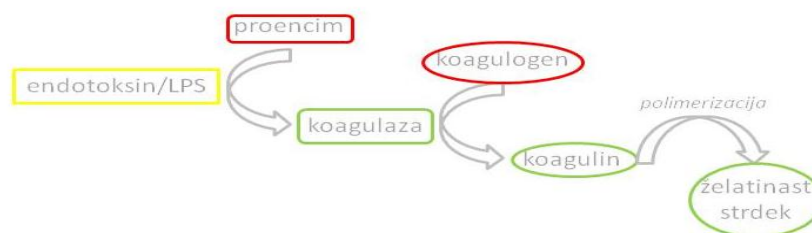
Za nanos višjih koncentracij na HCAEC smo frakcije IgG koncentrirali. Manjši volumen raztopine IgG (okoli 2,5 ml) smo prenesli v centrifugirno epruveto s filtrom ó koncentradorjem. Velikost filtrnih por je značala 30 kDa. Koncentriranje je potekalo v centrifugi pri 4 °C s 360 g. Vzorci so bili v odvisnosti od začetne koncentracije različno dolgo in z različnim številom stopenj izpostavljeni centrifugalni sili (Preglednica IV). Po centrifugiranju smo z Bradfordovo metodo ponovno določili koncentracijo.

Preglednica IV: čas in število stopenj centrifugiranja posameznega vzorca.

vzorec	t ₁ [min]	t ₂ [min]	t ₃ [min]	t ₄ [min]	t ₅ [min]	t ₆ [min]
K2	5	7	4	/	/	/
K3	5	7	4	5	5	/
B1c	5	7	4	5	5	/
B2	5	7	4	5	5	/
B3	/	/	/	5	5	5

Preverjanje prisotnosti endotoksina

Endotoksin gramnegativnih bakterij oziroma lipopolisaharid (LPS) v vzorcu preverjamo s testom lizata, pridobljenega iz krvi severnoameriškega atlantskega ostvarja, *Limulus Polyphemus* (Limulus amebocyte lysate test, test LAL). Test so razvili na osnovi opafljanj koagulacije v krvi ostvarja, ki je bil okužen z endotoksinom. Lizat ob stiku z vzorcem, v katerem je endotoksin, tvori gel, ki kvalitativno potrди prisotnost toksina (Slika 8).



Slika 8: Shema reakcije med endotoksinom in amebocitnim lizatom. Lizat vsebuje proencim koagulaze in koagulogen. Strdek je posledica polimerizacije amebocitnega strjevalnega proteina, koagulina, preko dvostopenjske encimske reakcije, ki jo endotoksin inducira.

Test smo izvajali v skladu z navodili proizvajalca. Postopek smo opravili v asepticnih pogojih. Kot topilo smo uporabili vodo brez endotoksina; epruvete, nastavke za pipetiranje in ostali material smo predhodno sterilizirali. Pra-kast, bel liofiliziran amebocitni lizat smo

raztopili v 1,8 ml vode in raztopino rahlo me–ali 30 s. Endotoksinski standard smo pripravili iz 10 ng liofilizata, kateremu smo v viali dodali 5 ml vode ter me–ali z vrtin nikom 15 min. Standard z aktivnostjo endotoksina 10 EU/ml smo razred ili z vodo do aktivnosti 1 EU/ml in ponovno me–ali 60 s. Nato smo 1 ml pripravljene raztopine dvakratno razred ili in ponovno me–ali 60 s ter ponovili postopek z vsako naslednjo red itvijo do aktivnosti 0,125 EU/ml. Okufenost z endotoksinom smo preverjali na frakcijah IgG ter serumih bolnikov in zdravih krvodajalcev. Serume smo predhodno centrifugirali 30 s pri 1500 g, bolnikove –e dodatnih 30 s z 2000 g. K 0,1 ml standarda LPS, vzorca ali vode, ki je sluffila kot negativna kontrola, smo v epruveto dodali 0,1 ml pripravljenega reagenta LAL. Vsako epruveto smo pokrili s parafilmom, dobro preme–ali in vse namestili v vodno kopel s 37 °C za to no 60 minut. Po inkubaciji smo epruvete rahlo pretresli in ovrednotili rezultate kot pozitivne ali negativne glede na pojavnost gela.

Endotelijska celi na kultura

Celi ne kulture predstavljajo homogeno populacijo celic. Ohranjajo precej lastnosti *in vivo* celic, zato so primerne za –tudij mehanizmov, ki jih v flivem organizmu ne bi mogli prou evati. Gojenje v platenkah omogo a so asno spremljanje kulture pod mikroskopom, biokemijsko analizo celic, izolacijo sekrecijskih materialov in spremljanje interakcij med dvema celicama razli ne vrste (46).

Preglednica V: Ovrednotenje uporabe celi nih kultur. Celi ne kulture izkazujejo vrsto pozitivnih lastnosti, zaradi katerih so –iroko uporabna metoda biomedicinskih znanosti. Vendar je hkrati potrebno upo–tevat, da popolnoma enakega odziva kot v flivih organizmih ne moremo dose i (46,49,50).

Dobre strani primarne celi ne kulture	Slabe strani primarne celi ne kulture
<ul style="list-style-type: none"> • laflji na in izolacije v primerjavi s celotnim organom • nadzorovano okolje in fiziolo–ki pogoji • vzorec je homogen • so asno spremljanje rasti in biokemijskih mehanizmov • nastanek velikega –tevila celic • medsebojna skladnost in ponovljivost rezultatov 	<ul style="list-style-type: none"> • ni neomejene delitve nemodificiranih celic • odsotnost drugih organskih sistemov (fliv evje, endokrini sistem) • mofna sprememba lastnosti celic in njihove funkcije, npr. proliferacije • sprememba strukture tkiva in interakcij med celicami • druga en odziv encimov in drugih biolo–ko aktivnih molekul na celicah zaradi spremenjenega okolja

Celi no kulturo humanih endotelijskih celic koronarne arterije, ki smo jo uporabili, so izolirali iz 57-letnega moškega bele rase brez filnih bolezni. Po podatkih dobavitelja so bile to celice 3. pasafe. Fivost kulture je znašala 84 % pri gostoti 861.000 celic/ml. Certifikat analize zagotavlja močnost 16-kratnega pomnoževanja celic. Uporabljali smo 4. ali 5. pasaflo.

Gojenje celic

S celicami rokujemo v aseptičnih pogojih. Pred vsako uporabo smo aseptično komoro z laminarnim pretokom zraka oistili z razkužilom in 70 % etanolom. Vse naprave, embalažo, stojala in druge pripomočke, ki smo jih potrebovali v komori, smo pred vnosom vanjo prav tako obrisali s 70 % etanolom. Medij za gojenje, EBM-2MV, ki smo ga hranili v hladilniku na temperaturi 4 °C, smo pred pripravo segrevali v vodni kopeli na 37 °C. V 500 ml osnovnega gojenega medija smo odpipetirali dodatke (Single Quots) razen plodovega seruma goveda (fetal bovine sera, FBS). 200 ml tako pripravljene medija smo shranili kot gojenje z 0 % FBS pri 4 °C. V preostanek smo dodali 15 ml FBS in tako pripravili gojenje s 5 % koncentracijo FBS. Po 15 ml gojenega medija smo dolili v dve označeni plastenki za gojenje celic s površino dna 75 cm². Plastenki smo zaprli in ju nekaj minut inkubirali v celi nem inkubatorju (37 °C, 5% CO₂, nasičena vlažnost).

Kultura 4. ali 5. pasafe z $1,6 \cdot 10^5$ celicami je bila shranjena v 1,8 ml zamrzovalnega medija. Kriovial smo odprli do ene tretjine ter potopili v vodno kopel s 37 °C za največ 162 min. S 1000-mikrolitrsko pipeto smo vsebino previdno in po asi 5-krat premešali. 900 µl smo prenesli v vsako izmed pripravljenih plastenk ter jim zatesnili zamašek. Z rahlim premikanjem plastenke smo celice enakomerno razporedili po površini dna. Po 24-urni inkubaciji (37 °C, 5% CO₂, nasičena vlažnost) smo jim zamenjali gojenje. Gojenje smo nato menjali vsak drugi dan. Njihovo rast smo spremljali pod invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TS 100) na 40-kratni povečavi. Celice smo hranili do 90 % konfluente.

Tripsinizacija

Za vsako plastenko smo na sobno temperaturo segreli 6 ml reagenta tripsin/EDTA, 15 ml fosfatne pufrske raztopine za celi no kulturo (DPBS) in 12 ml nevtralizatorja tripsina. Ob 80-90% konfluenci smo iz plastenk s površino dna 75 cm² izsesali gojenje. Zaostanek medija smo sprali s 15 ml DPBS. Celice smo nato prekrili s 6 ml reagenta tripsin/EDTA, zaprli posodo in spremljali pod inverznim mikroskopom. Po 266 min se je odločilo okoli

90 % celic. Z dlanjo smo udarili po spodnji strani plastenke in to ponavljali vsakih 30 s, dokler se niso odlu– ile vse celice. V platenki smo suspenzijo nevtralizirali z 12 ml nevtralizatorja tripsina in jo prenesli v sterilno centrifugirno epruveto. Platenko smo splaknili s –e 6 ml DPBS in ga dodali suspenziji celic v epruveto. Platenko smo po spiranju pogledali pod mikroskopom in se prepri ali, da so bile celice uspe–no odstranjene. Suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 220 g. Odstranili smo 969,5 ml supernatanta. Celice smo raztopili v 12615 ml rastnega goji– a. Na celice, ki smo jih gojili v platenkah s 6- in 24-prekatnimi plo– ami, smo sorazmerno zmanj–ali volumne reagentov.

Obdelava celic

Celice v 24- oziroma 6-prekatnih plo– ah so dosegle 90 % konflueno. Goji– e s 5 % FBS v prostor kih smo zamenjali za goji– e brez FBS ter platenko za 2 uri postavili v celi ni inkubator. Nato smo celice za 18 ur izpostavili serumom, samim frakcijam IgG z razli nimi koncentracijami protiteles, frakcijam IgG ob prisotnosti β 2GPI ali raztopinam endotoksina razli nih koncentracij. Kot pozitivno kontrolo smo pri poskusih 1, 3, 4, 5 in 6 nanegli IL-1 β , ki smo ga pred nanosom razred ili do koncentracije 500 ng/l (pri poskusih 5 in 6) oziroma do 1000 ng/l (ostali poskusi) z DPBS. Poskusili smo tudi s predhodnim 6-urnim spodbujanjem celic z IL-1 β . Eksperiment smo kon ali z zbiranjem supernatantov v epruvete ter shranjevanjem le-teh in celic, ki so ostale v vdolbinicah, pri -80 °C.

Preglednica VI: Namen poskusov in na in obdelave HCAEC.

Poskus 1:	Vpliv serumov zdravih krvodajalcev in bolnikov z APS 5 % serum; 24-prekatne plo– e; 300 ml supernatanta
Poskus 2:	Vpliv razli nih koncentracij seruma zdravega in bolnega 5 ali 10 % serum zdravega ter z 1, 5 ali 10 % serum bolnika z APS; 6-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta
Poskus 3:	Vpliv IgG v nifljem koncentracijskem obmo ju IgG zdravih in bolnikov v koncentracijah 25 ali 100 mg/l; 24-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta
Poskus 4:	Vpliv IgG v nifljem koncentracijskem obmo ju z dodatkom β 2GPI IgG koncentracije 100 mg/l; β 2GPI koncentracij 10 ali 100 mg/l; 24-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta
Poskus 5:	Vpliv vi–jih koncentracij IgG IgG koncentracij 25, 100, 500 ali 1000 mg/l; 24-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta
Poskus 6:	Vpliv vi–jih koncentracij IgG ob dodatku β 2GPI Konc. IgG: 25, 100, 500 ali 1000 mg/l; konc. β 2GPI: 10 mg/l; 24-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta
Poskus 7:	Vpliv LPS na HCAEC Endotoksin koncentracij: 0,00125, 0,0025, 0,0500, 0,100 ali 0,200 EU/ml; 6-prekatne plo– e; 500 ml supernatanta

Zmrzovanje in shranjevanje celic za ekspanzijo kulture

Krioprotektivni medij (10 % dimetilsulfoksid, 80 % rastno goji- e, 10 % FBS), s katerim prepre ujem rast kristalov v celicah in s tem po- kodbe membrane, smo prefiltrirali skozi 0,20 μm filter in ga ohladili. V njem smo homogenizirali suspenzijo tripsiniziranih in s 5 % FBS goji- em ustrezno razred enih celic, tako da smo dobili koncentracijo $5 \cdot 10^5$ do $2 \cdot 10^6$ celic/ml. 1 ml pripravka smo odpipetirali v zmrzovalne vialne ali ampule ter ga postopno (1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ohladili na -30 $^{\circ}\text{C}$, nato na -70 $^{\circ}\text{C}$ ter ga pustili stati preko no i. Po ekvibraciji smo ga postavili v pare teko ega du- ika, s temperaturo okoli -180 $^{\circ}\text{C}$. as med zdruffitvijo celic s krioprotektivnim medijem in zmrzovanjem ni bil dalj- i od 1 h, saj bi medij v nasprotnem primeru po- kodoval celice.

Dolo anje izraflanja mRNA

Sposobnost izraflanja gena ali kombinacije razli nih genov se mo no razlikuje od celice do celice. Celo znotraj iste se nivo izraflanja spreminja v odvisnosti od pogojev, katerim je celica izpostavljena. Izraflanje genov spremljamo posredno preko prisotnosti informacijske RNA (mRNA), ki je eden izmed posrednikov med DNA in proteini (47). Za njeno dolo itev je potrebnih ve korakov: liza celic, izolacija RNA, obratna transkripcija, veriflka reakcija s polimerazo in agarozna gelska elektroforeza.

Izolacija RNA

V digestoriju smo pripravili 1 % raztopino β -merkptoetanolu v lizirajo em pufu analiznega kompleta za izolacijo RNA, ki vsebuje me- anico reagentov za raztapljanje fosfolipidnega dvosloja in odstranitev proteinov (tris-HCl, EDTA, EGTA, natrijev dodecilsulfat, deoksiholat in tritonX 100) (45). Dodatek β -merkptoetanolu, ki cepi disulfidne vezi, povzro i denaturacijo in izgubo aktivnosti RNaze, prepre uje razgradnjo RNA (45). V vdolbinice s celicami brez supernatanta smo nanegli 300 μl pripravljene raztopine. Po rahlem tresenju smo celice s pipetnim nastavkom postrgali v sterilne epruvete, ki smo jim dodali 70 % etanol za oboritev RNA. Vsak vzorec smo dvakrat po 10 s mo no me- ali z vrtin nikom.

Ena izmed izredno hitrih metod izolacije nukleinskih kislin je podobna kromatografiji na trdnem nosilcu. V kolono je vstavljena epruveta z membrano, ki predstavlja trdno fazo. Tekom tristopenjskega postopka po nanosu raztopin razli ne sestave v epruveto s

centrifugiranjem vzorec spiramo. Na epruvete z membrano, pod katere smo postavili kolekcijske epruvete, smo nanegli celi ni homogenat in centrifugirali z 12.000 g 15 s pri sobni temperaturi. Izostanek v kolekcijski epruveti smo zavrgli. Na membrano smo nanegli 700 µl spiralnega pufra I ter pod enakimi pogoji kot nazadnje zopet centrifugirali. Membrana je vezala RNA. Kolekcijsko epruveto in njeno vsebino smo zavrgli in pod membrano nastavili sveflo. Na membrano smo nanegli 500 µl spiralnega pufra II, ki spere ostale ne istote v vzorcu, ter ponovno centrifugirali. Spiranje s spiralnim pufrom II smo ponovili. Kolekcijsko epruveto smo izpraznili in centrifugirali z 12.000 g 2 min, da se je membrana osušila. Nato smo epruveto zamenjali z navadno sterilizirano. Nadalje smo to no na sredino membrane nanegli 30 µl vode brez nukleaz, ki raztopi RNA in jo eluira z membrane. Inkubirali smo eno minuto in –e zadnji centrifugirali z 12.000 g 2 min. Del tako dobljene raztopine RNA smo z vodo brez nukleaz 35-krat red ili do volumna 70 µl. Preostali del vzorcev RNA, ki je bil namenjen prihodnjim analizam, smo shranili v zamrzovalnik na -80 °C. istost in koli ino RNA v vzorcu smo preverili spektrofotometr no z merjenjem absorbance razred enih raztopin pri valovnih dolfinah 260, 280 in 360 nm v primerjavi z absorbanco vode brez nukleaz.

Obratna transkripcija

Za izvedbo verifne reakcije s polimerazo je potrebno pretvoriti mRNA v komplementarno DNA (cDNA). Klju te preobrazbe je encim reverzna transkriptaza (47). Vzorce izolirane RNA smo prenesli na sobno temperaturo. V ozna ene 0,2-mililitrske epruvete smo odpipetirali prera unano (iz absorbanc pri 260 nm) koli ino vzorca in vode brez nukleaz ter 14,4 µl reakcijske me–anice, katere sestavo prikazuje Preglednica VII. Skupni volumen vsebine epruvete je zna–al 30 µl. V vsako epruveto smo tako nanegli 0,5 µg (pri poskusih 5 in 6) oziroma 1 µg RNA (pri poskusih 2 in 7). Pred inkubacijo smo epruvete kratko centrifugirali in preverili, da so dobro zaprte.

Inkubacija je zajemala tri stopnje: 30 min pri 43 °C, 30 min pri 53 °C in 5 min pri 90°C. Tekom postopka se nukleotidni za etnik brez hidroksilne skupine na 3' koncu zdruffi z RNA. Reverzna transkriptaza ga prepozna in za ne pretvarjati RNA v DNA. Poleg pretvorbe ima encim –e dve drugi aktivnosti: presnavlja RNA in sintetizira drugo verigo DNA, da nastane dvojna vija nica (45). Novonastale vzorce DNA smo do njihovega dolo anja hranili pri -20 °C.

Preglednica VII: Sestava reakcijske mešanice pri metodi obratne transkripcije. V vsi premerov so vzoredno potekali poskusi na 12 vzorcih, zato je mešanica vsebovala (12+1)-krat več količin reagentov, kot je opisano.

Reagent v mešanici	V [μ l]/vzorec
10-krat koncentrirani pufer za obratno transkripcijo	3,0
deoksinukleotidi	3,0
MgCl ₂	6,0
oligonukleotidni za etnik (dT)	1,0
RNazni inhibitor	0,75
reverzna transkriptaza	0,6
voda brez nukleaz	0,05

Verifna reakcija s polimerazo

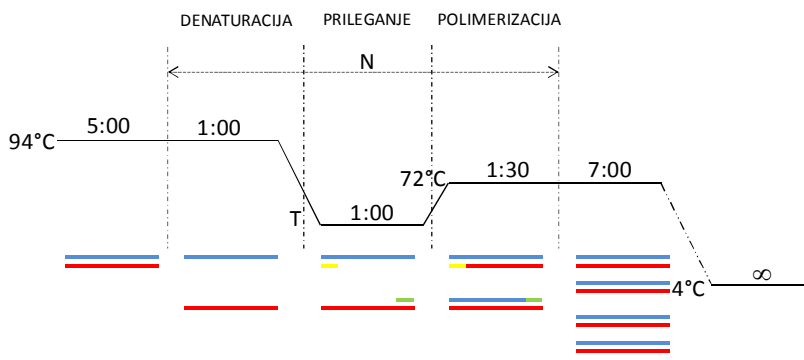
Specifično zaporedje dvovijane DNA podvajamo z verifno reakcijo s polimerazo (Polymerase Chain Reaction, PCR). PCR izvajamo s termostabilno polimerazo DNA ob dodatku vseh vrst deoksinukleotidov in para nukleotidnih za etnikov. Z današnjim naborom za etnikov lahko uspešno podvajamo šteje milijonov odsekov DNA (47), med njimi tudi v naših poskusih preiskovane cDNA (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Zaporedje nukleotidov v oligonukleotidnem za etniku za prepis posameznega gena. T_ó temperatura prileganja, N_ó število ciklov pri PCR. F in R_ó za etnika za za etni oziroma končni del gena.

mRNA	vrsta nukleotidnega za etnika	T ^o C	N
β -aktin	F 5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'	59	22
	R 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'		
IL-6	F 5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	51	30
	R 5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3'		
IL-8	F 5'-CAA GGA GTG CTA AAG AAC T-3'	37	30
	R 5'-AAC CCT CTG ACA CCA GTT-3'		
ICAM-1	F 5'-GGC AAG AAC CTT ACC CTA-3'	56	30
	R 5'-CAT TCA GCG TCA CCT TGG-3'		
VCAM-1	F 5'-GGA TTC TGT GCC CAC AGT A-3'	60	30
	R 5'-CCT GGC TCA AGC ATG TCA TA-3'		

Za vsak vzorec smo pripravili reakcijsko mešanico iz 12,5 μ l PCR Master Mix, 1,25 μ l vsakega za etnega oligonukleotida (F in R) ter 7 μ l vode brez nukleaz. V 0,2-mililitrsko epruveto smo dodali 22 μ l mešanice in 3 μ l reakcijske zmesi po obratni transkripciji. Po kratkem centrifugiranju smo inkubirali v inkubatorju za PCR po programu, nastavljenem

za vsako DNA posebej (Preglednica VIII, Slika 9). Za etek postopka zajema segrevanje na 94 °C, kjer se dvovija nica denaturira, verigi se lo ita. Ob zniflanju temperature pod vrednost lastno za vsako posamezno DNA se za etnika prilefta na komplementarni mesti. Raztopino nato segrejemo na 72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje termostabilne polimeraze Taq in polimerizacijo nove dvovija ne DNK. Na-tete tri faze sestavljajo en cikel, ki se nadaljuje v naslednjega s ponovnim segrevanjem na 94 °C. Za vsako pomnofevano molekulo DNA je dolo eno optimalno -tevilo ciklov (45,47).



Slika 9: Shema verifne reakcije polimeraze. N ó -tevilo ciklov podvajanja, T ó temperatura, pri kateri se oligonukleotidni za etniki prileftejo na DNA, na rtah so ozna eni asi trajanja vsake faze v min.

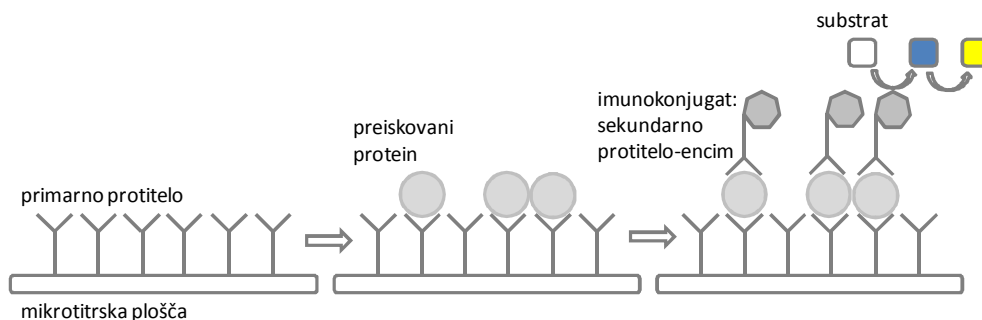
Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo lahko zaznamo zelo majhne razlike v velikosti in obliki molekul DNA vse do velikosti 20 kbp (47). Molekule se lo ujejo glede na sposobnost gibanja v elektri nem polju, ki ga ustvari razlika potencialov med elektrodama. Metodo identifikacije DNA izvajamo horizontalno (45).

2 % agarozni gel z etidijevim bromidom smo segreti na sobno temperaturo ter po proizvajal evih navodilih pripravili reakcijsko me-anico; 2 µl pufra z bromofenol modrim, ki sluffi kot indikator potovanja molekul v elektri nem polju, in saharozo, ki omogo i laffje usedanje vzorca v flepke, smo razred ili s 5,5 µl sterilno filtrirane vode. V 0,2-mililitrskih epruветah smo zme-ali 7,5 µl gelske me-anice in 12,5 µl vzorca po PCR. Enako smo postopali tudi pri pripravi markerjev ter pozitivnih in negativnih kontrol. Vsebinsko epruвет smo kratko centrifugirali. Pred nanosom vzorcev v flepke smo gel vstavili v kaseto in izvedli pred-elektroforezo. V vsak flepek smo nanесли 20 µl vzorca oziroma markerja in kontrole. Po razvijanju smo gel slikali z UV transluminatorjem.

Encimsko-immunska metoda: ELISA

Danes poznamo mnogo metod vezanja ligandov, s katerimi določimo koncentracijo analita. Najbolj raznolik je sistem, ki za kvantifikacijo uporablja protitelesa, saj lahko le-ta vzgojimo proti praktično kateremukoli proteinu. Za merjenje antigenov, kot so citokini iz seruma in celičnih kultur, zelo pogosto uporabljamo encimsko-immunsko metodo (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA). Poznamo več izvedb analize, ki so odvisne od tega, kaj merimo. V primeru določanja antigena je najbolj uporabna direktna sendvič ELISA (51), ki jo opisuje Slika 10.



Slika 10: Shema poteka direktne sendvič ELISE v četrh korakih. Imobilizirano primarno protitelo na mikrotitrski plošči in večje preiskovani protein v vzorcu. Po spiranju nanj nanesemo protitelo z nanj konjugiranim encimom. Sledi nanos substrata, ki ga encim pretvori v obarvan produkt. Reakcijo končamo z raztopino za zaustavitev reakcije.

Določanje IL-6

Reagente smo segreli na sobno temperaturo ter določili ali tevilno mikrotitrskih trakov. Koncentriran spiralni pufer smo v 1000-mililitrski buki 25-krat razredili ali z destilirano vodo ter ga do uporabe hranili v hladilniku na 2-8 °C. V vialo s standardom smo odpipetirali 1,4 ml pufera za redčenje standarda, da smo dobili koncentracijo standarda 2,5 µg/l. Nadaljnja redčenja opisuje Preglednica IX. Vzorce s supernatanti celic, ki so bile obdelane z IL-1β, smo 200-krat razredili ali s puferom za redčenje standarda, medtem ko smo preostale supernatante pustili v prvotnih koncentracijah. V dveh paralelkah smo na mikrotitrski plošči, prekrivane s protitelesi anti-IL-6, nanесли vzorce, standarde in kromogeno slepo kontrolo v volumnih 100 µl ter vsakemu dodali 50 µl raztopine biotiniliranega sekundarnega protitelesa anti-IL-6. Inkubirali smo 2 h pri sobni temperaturi. S samolepilno folijo smo preprečili izhlapevanje vzorca. 22 ml topila za konjugat streptavidin-HRP smo rahlo primeli ali 220 µl imunokonjugata, kar je ustrezalo 176 vdolbinicam na mikrotitrski plošči. V primerih, ko smo imeli manj vzorcev, smo pripravili sorazmerno manjšo količino

konjugata. Po inkubaciji smo ploščo trikrat spirali s 300 µl spiralnega pufra in v vse vdolbinice, razen v kromogeno slepo, nanесли pripravljen konjugat. Inkubacijo smo ponovili. 30 min kasneje smo vsebino vdolbinic zopet spirali. V vse smo dodali 100 µl kromogena in pustili ploščo stati v temi 14616 min, ko smo reakcijo ustavili s 100 µl raztopine za zaustavitev reakcije. V 10 min smo z UV spektrofotometrom dvakrat izmerili absorbanco pri 450 nm (referenčna valovna dolžina: 680 nm).

Določanje IL-8

Metodo ELISA za določanje kemokina IL-8 smo izvedli identično določanju IL-6. Razlika je bila v redčenju standardov (Preglednica IX) v času prve inkubacije, ki je znašal 1,5 h, v obsegu spiranja šestkrat s 400 µl spiralnega pufra ter v inkubaciji pred nanosom raztopine za zaustavitev reakcije, ki je tokrat trajala 20 min.

Določanje sICAM-1

Pri sobni temperaturi smo po navodilih proizvajalca previdno pripravili 500 ml 20-krat redčenega spiralnega pufra, ki smo mu umerili pH na 7,4. Standardne raztopine za umeritveno krivuljo ustreznih koncentracij prikazuje Preglednica IX. Vzorce smo redili trikrat. Za razliko od prejšnjih ELIS smo tokrat predhodno pripravili raztopino sekundarnega protitelesa, ki je fiksno imelo konjugiran encim hrenovo peroksidazo. Za 12 vrstic smo 0,1 ml koncentriranega konjugata dodali 5,9 ml pripravljenega testnega pufra. Mikrotitrsko ploščo s pritrjenimi poliklonskimi protitelesi proti sICAM-1 smo dvakrat spirali s 300 µl spiralnega pufra. V vsako vdolbinico smo nanесли 100 µl vzorca, standarda ali kromogene slepe, sledil nanos konjugata protitelo-HRP in dvourni inkubacija s folijo pokrite plošče ob stresanju s stresalnikom pri 70 rpm pri sobni temperaturi. Nato smo vdolbinice trikrat spirali s 300 µl spiralnega pufra ter vanje dodali 100 µl kromogena. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 10 min v temi pri sobni temperaturi ob stresanju s 100 rpm. Reakcijo smo spremljali z opazovanjem intenzitete modre barve. Ob pojavu temno modre smo nanесли 100 µl raztopine za zaustavitev reakcije in takoj po nanosu zmerili absorbanco pri 450 nm (referenčna absorbanca: 620 nm).

Določanje β2GPI

Postopek smo začeli s segrevanjem reagentov na sobno temperaturo in določevanjem tevil trakov mikrotitrsko ploščo, na katero so bila pritrjena poliklonska protitelesa

anti- β 2GPI. Pripravili smo obe kontroli in standardno raztopino red ili z raztopino za red enje vzorcev, da smo dobili koncentracije, ki so prikazane v tabeli. Vzorce serumov smo red ili 4000-krat. Na mikrotitrsko plo- o, razen v vdolbinico za kromogeno slepo, smo nanegli 200 μ l imunokonjugat monoklonsega protitelesa proti β 2GPI s HRP. V roku 10 min smo dodali 50 μ l standardnih raztopin, kontrol in vzorcev. Vdolinico za kromogeno slepo smo napolnili s 250 μ l raztopine za red enje vzorcev. Tako pripravljeno plo- o smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi 1 h ter jo nato petkrat spirali s 300 μ l raztopine za spiranje. Spiranju sta sledila nanos 200 μ l kromogena in ponovna inkubacija v temi, ki je trajala to no 5 min. Nato smo dodali 50 μ l raztopine za zaustavitev reakcije ter po 10 min merili absorbanco pri 450 nm (referen na valonva dolflina 690 nm).

Preglednica IX: Koncentracije standardov, nane-enih na mikrotitrsko plo- o za umeritveno krivuljo. Za etno koncentracijo (pod zaporedno -tevilko 0) smo ustrezno red ili z raztopino za red enje standardov, da smo dobili naslednjo. Nato smo enako ponovili za pridobitev vseh naslednjih standardnih raztopin.

№	c (IL-6) [ng/l]	c (IL-8) [ng/l]	c (sICAM-1) [μ g/l]	c (β 2GPI) [μ g/l]
0	2000	10 000	30	160
1	500	1000	10	160
2	250	500	5	80
3	125	250	2,5	40
4	62,5	125	1,25	16
5	31,2	62,5	0,625	8
6	15,6	31,2	0	0
7	7,8	15,6	/	/
8	0	0	/	/

Rezultati in razprava

Pred za etkom eksperimentalnega dela smo se osredoto ili na pregled izbrane literature, ki opisuje raziskovanje vpliva APS na endotelijskih celi nih kulturah (Priloga). Vse raziskovalne skupine so poskuse zasnovale v smeri prou evanja tromboti nih zapletov, ki so pri APS najpogostej-i (11). Preiskave citokinskega, kemotakti nega ali adhezijskiga odziva so izvajali na kulturah humanih endotelijskih celicah popkovne vene (HUVEC) in tako prou evali mo flne molekularne mehanizme venskih tromboz. Danes vemo, da se pri bolnikih z APS pojavlja tudi ateroskleroza (11) in da aPL pospe-ujejo ateroskleroti ni proces (2,52). Najve raziskav je usmerjenih v prou evanje vpliva aPL na oksidativni izbruh ter delovanje LDL in HDL (2,3). Proces kopi enja lipoproteinov v intimi arterije je znak napredovane bolezni, pomemben pa je tudi za etek ateroskleroze, ki se odrafla kot po-kodba endotelijskih celic (4). Zato smo za smer na-ih -tudij izbrali prou evanje vnetnega in adhezijskega odziva z izpostavljanjem HCAEC serumom in frakcijam IgG bolnikov s PAPS in SAPS.

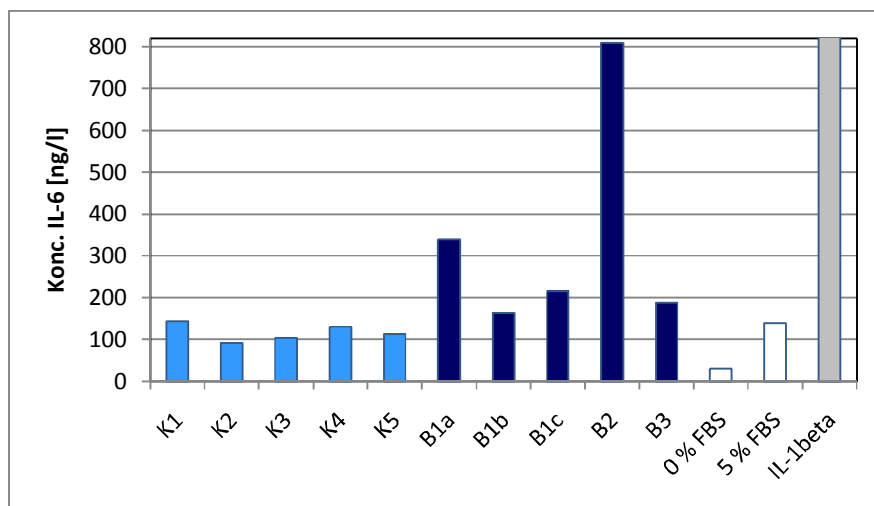
Endotelijske celice izkazujejo veliko fenotipsko heterogenost, ki je posledica izpostavljenosti razli nim pogojem in opravljanja razli nih funkcij. Odrafla se v razli ni jakosti tesnih stikov med celicami (53), v razli nih odzivih na isti drafljaj (54) in drugem. Znano je, da so HCAEC bolj odzivne na vnetni stimulus kot HUVEC. e so bile raziskave vnetnega procesa ob obdelavi celic z aPL na venskih endotelijskih celicah pozitivne, obstaja velika verjetnost, da se tudi koronarni arterijski endotelij odziva na vzorce bolnikov z APS. Na osnovi tega védenja smo se pri izbiranju pogojev, ki jim je bila celi na kultura HCAEC izpostavljena (koncentracija protiteles, seruma, β 2GPI in endotoksina, as izpostavitve in predhodna stimulacija z IL-1 β), lahko oprli na omenjene predhodne raziskave, ki so uporabljale kulturo HUVEC.

Obdelava celic s serumi

eprav je namen na-ega dela prou evanje vpliva IgG, smo najprej opravili nekaj preliminarnih poskusov s serumi bolnikov z APS in zdravih krvodajalcev. Na ta na in smo ocenili odzive celic ter izbrali vzorce, ki dajejo najprimernej-e odzive, za nadaljnjo obdelavo celic.

Poskus 1: Primerjava odzivov na serume bolnikov in zdravih krvodajalcev

V prvem delu smo se osredotočili na odzive celic, ki so bile izpostavljene serumom. Na celične kulture v 24-prekatnih ploščah smo nanесли 5 % serume bolnikov in zdravih krvodajalcev, razredene v 0 % FBS gojišču (Slika 11). Za pozitivno kontrolo smo vzeli stimulacijo z IL-1 β , ki dokazano povzroča izločanje preiskovanih molekul (55).



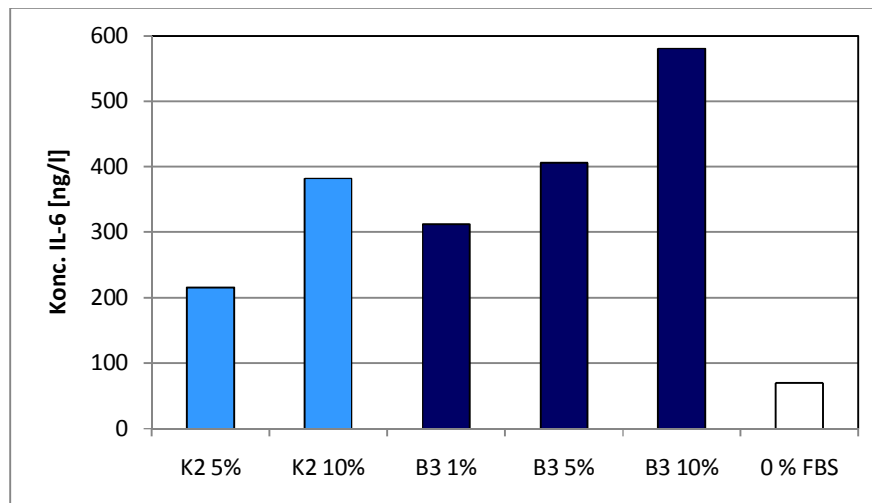
Slika 11: Sprožanje IL-6 iz celic pod vplivom 5 % serumov bolnikov (B1-B3) in zdravih krvodajalcev (K1-K5). Kontrole: negativni gojišču z 0 % in 5 % FBS (bela), pozitivna s IL-1 β v koncentraciji 1000 ng/l.

Po 18 urah so koncentracije IL-6 pokazale, da so celice, izpostavljene serumom bolnikov, med 5,5- in 27-krat bolj stimulirane od celic, ki so rasle v 0 % FBS gojišču. Koncentracija izločenega IL-6 iz celic, stimuliranih s serumi zdravih bolnikov, je relativno konstantna (RSD = 17,6 %) in v povprečju znaša 116 ng/l, tako da je primerljiva odzivu celic na 5 % FBS (139 ng/l). V primerjavi s povprečjem zdravih bolnikov serumi spodbudijo od 1,4- do 7,0-krat večje izločanje IL-6 v celični supernatant. Vsi serumi razen B1b spodbudijo odzive, ki se od povprečja odzivov na zdrave serume razlikujejo za vsaj tri standardne odklone. Daleč najbolj stimulirajoče serum B2, ki ima v primerjavi z naslednjim 2,5-krat večji vpliv. Trdimo lahko, da bolnikovi serumi stimulirajo HCAEC, čeprav v primerjavi z normalami stimulacija ni značilno povzročena pri vseh vzorcih bolnikov.

Poskus 2: Odziv celic na različne koncentracije seruma

V naslednjem koraku nas je zanimalo, kako se celice odzivajo na različne koncentracije seruma v gojišču. Kljub relativno nizkim odzivom celic na serum B3 smo le-tega izbrali za stimulacijo. Odločitev je bila osnovana na visokih titrih IgG anti- β 2GPI, ki jih je dosegal

bolnikov serum (Preglednica III). HCAEC v 6-prekatnih ploščah smo stimulirali z 1 %, 5 % oziroma 10 % serumom B3. Za negativno kontrolo smo izbrali serum K2 v koncentracijah 5 % in 10 % ter po 18 h spremljali koncentracijo IL-6 v supernatantu. S koncentracijo seruma odziv celic narašča tako pri izpostavitvi vzorcu zdravega kot bolnega (Slika 12). Razmerje med količino supernatanta in rastno površino celic v prekatu je bilo pri tem poskusu nižje ($500 \text{ ml}/9,6 \text{ cm}^2$) kot pri poskusu 1 ($300 \text{ ml}/2,0 \text{ cm}^2$), kar pomeni, da se je precej večja količina IL-6 iz celic sprošala v le nekoliko večjo količino supernatanta. Le zato so koncentracije sprošene IL-6 pri tem poskusu višje. Prav je B3 pri prejemanju poskusu med vzorci bolnikov izzval razmeroma nizek odziv celic, je pri tem poskusu odziv v primerjavi z odzivi na zdravega opazno višji. Vsaka koncentracija B3 predstavlja večji dražljaj za celice kot 5 % serum K2. Količnik povprečja med 5 % serumom bolnega in zdravega znaša 1,9, med 10 % serumoma pa 1,5. Pri Poskusu 1 je razmerje med K2 in B3 2,0. Povišanje pripisujemo patološkim sestavinam seruma bolnika, med drugim tudi aPL. Za raziskave morebitne funkcijske odvisnosti celic od koncentracije seruma bi bilo potrebno opazovati odzive pri več koncentracijah.

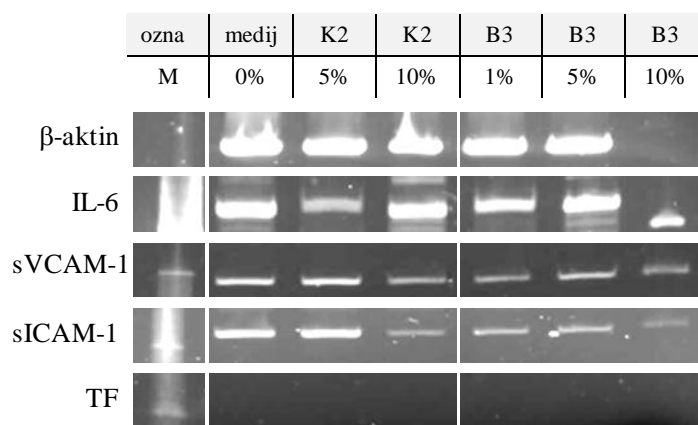


Slika 12: Preverjanje odvisnosti citokinskega (IL-6) odziva HCAEC na različne koncentracije serumov zdravega (K2 (svetlo modri stolpci) in bolnika s PAPS (B3) (temno modri stolpci). Negativna kontrola je 0 % FBS gojišče (belo). Pri poskusu na 6-prekatni plošči patološki serum B3 v različnih koncentracijah bolj spodbudi celice od 5 % seruma K2.

Izrafljenje adhezijskih molekul smo pri poskusu 2 spremljali na nivoju mRNA (Slika 13). Prav tako smo preverili izrafljenje citokina IL-6 in tkivnega faktorja. Lege pomnoženih fragmentov smo določili s pomočjo označevalcev velikosti (markerjev). Opazimo, da se pri vseh celičnih tretmajih molekule povečano izrafljajo. V primerjamo intenzitete transluminiscence fragmentov 1- in 5-odstotnega seruma B3, vidimo, da se izrafljenje vseh

preiskovanih molekul (IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1) s koncentracijo poviša. Morda bi se podoben trend izkazoval tudi pri bolnikovem serumu koncentracije 10 %, če ne bi prišlo do tehničnih težav, ki so verjetno oslabile svetilnost lis.

Elektroforezna slika ne prikazuje povečanja izražanja molekul ob izpostavitvi celic bolnikovim serumom v primerjavi z izpostavitvijo serumom K2. Vzrok bi lahko bilo izhlapevanje topila iz nekaterih epruvetk med reverzno transkripcijo in PCR, saj se je ovojna pod pogoji v inkubatorju pokodovala in omogočila izhod param. Zato je raztopina postala bolj koncentrirana, višje in neznane koncentracije reagentov pa pripeljejo do nenapovedljivosti reakcije. V nadaljnjem rokovanju z epruvetkami za PCR smo vedno preverili zaprtost epruvetk in morebitno deformacijo plastike.



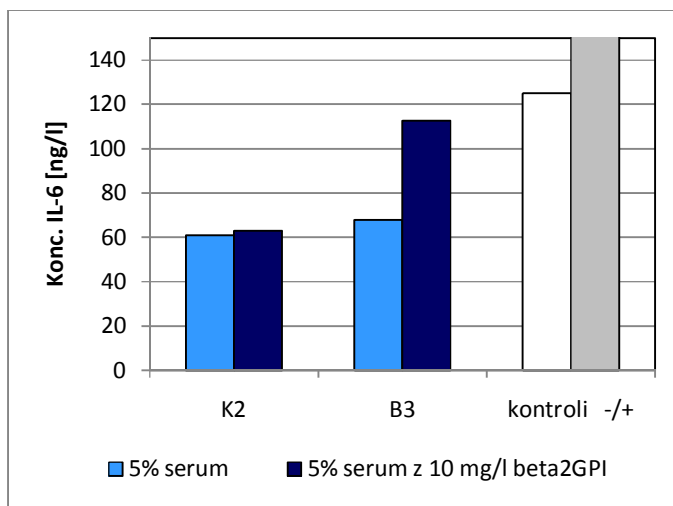
Slika 13 Opazovanje vnetnega in adhezijskega odziva HCAEC na nivoju mRNA. Celice smo obdelovali s serumoma zdravega (K2) in bolnika (B3) v koncentracijah 1 %, 5 % in 10 %. Negativna kontrola poskusa je bilo gojišče brez FBS. Označevalci (M) so markerji, ki omogočajo določitev velikosti fragmenta, saj vsebujejo fragmente med 20 in 1000 bp.

Tkivni faktor se iz HCAEC pod danimi pogoji ni izražal, kar je nekoliko nenavadno, saj so za APS značilne tudi arterijske tromboze. Morda ta patološki proces z aPL poteka po drugem mehanizmu. Pri določanju cDNA za IL-6 je prišlo do nespecifične vezave za etnikove, kar se odraža v več prisotnih lisah. V nadaljnjih preiskavah smo zato zmanjšali število ciklov in povečali temperaturo prileganja. Metoda PCR ni kvantitativna. Z njo lahko le ocenimo prepis genov. Za kvantitativen obseg izražanja bo potrebno izvesti verifilno reakcijo s polimerazo v realnem času.

Odziv celic na serume ob dodatku β 2GPI

Membranski protein β 2GPI se s svojim z lizini bogatim delom veffe na negativno nabite fosfolipide na membrani celice (14). Pred kratkim objavljeno delo de Grootove skupine je potrdilo, da se anti- β 2GPI na protein veffejo le, e je β 2GPI fle usidran na membrano (56), ter tako sproflijo odziv celice. Tako smo v enem izmed naslednjih poskusov na 24-prekatne plo– e poleg 5 % serumov K2 in B3 na celice hkrati nanegli 10 mg/l β 2GPI.

Presenetljiv je visok vnetni odziv celic na goji– e z 0 % FBS ó negativna kontrola, ki presega odziv na serume brez ali z β 2GPI (Slika 14). Morda so bile celice v tem prekatu izpostavljene nepredvidenemu stresu ali drugim nenadzorovanim vplivom. e ne upo–tevamo odziva negativne kontrole, koncentracija IL-6 v goji– u z bolnikovim serumom nakazuje vi–jo stimulacijo ob dodatku β 2GPI. Medtem celice, tretirane s serumom K2, po dodatku lipidnega kofaktorja ne izkazuje sprememb. Opaflanja so skladna s hipoteti nim mehanizmom aktivacije endotelijskih celic z aPL in β 2GPI preko membrane, a povi–anega odziva ob prisotnosti β 2GPI brez ponovitev poskusa ne moremo dokazati.



Slika 14: Citokinski odziv HCAEC na 5 % serume brez (svetlo modri stolpci) in z dodanim 10 mg/l β 2GPI (temno modri stolpci). Izlo anje IL-6 se ob dodatku β 2GPI povi-a, vendar ne glede na nenavadno visoko negativno kontrolo. Negativno in pozitivno kontrolo predstavljata stimulaciji z 0 % FBS goji– em oziroma IL-1 β koncentracije 1000 ng/l. K2 ó serum zdravega krvodajalca, B3 ó serum bolnika z APS.

Izolacija IgG

Na osnovi rezultatov, ki smo jih dobili z obdelavo celic s serumi, se fle sluti vpliv APS na HCAEC. Ker je v serumih mnogo sestavin, ki lahko stimulirajo endotelijske celice, smo

celice fieleli izpostaviti samim frakcijam IgG. Naslednji korak je bila izolacija protiteles razreda G iz serumov zdravih krvodajalcev in bolnikov.

Protitelesa smo pridobili z afinitetno kromatografijo s proteinom G. Da so bili IgG v eluiranih frakcijah res prisotni, smo potrdili z merjenjem absorbance pri 280 nm. Pri delu smo kolono vsaki dobro spirali in odsotnost protiteles v njej po izolaciji preverili spektrofotometrično; absorbanca elucijskih frakcij je dosegla vrednosti vezavnega pufrja. S tem smo se izognili kontaminaciji s predhodnimi protitelesi. Predpostavljamo tudi, da je izkoristek izvedene kromatografske ločnice dober ter da so dobljene frakcije čiste. Nedavno so namreč proučevali izolacijo IgG ob različnih pogojih in z različnimi kolonami. Ugotovili so, da afinitetne kolone in njim pripadajoče pufrske raztopine, ki smo jih uporabili tudi mi, dajejo med proučevanimi pogoji največji izkoristek izolacije (57).

Doseganje zadostnih količin in IgG ni edini fielelji cilj izolacije. Poleg omenjenega morajo izolirani proteini izkazovati enako aktivnost, kot so jo imeli pred nanosom na kolono. Predvsem nizek pH, ionska moč in morebitne kaotropne soli lahko spremenijo konformacijo proteinov, ki se nato odraža v spremenjenem delovanju. Raziskave vpliva na spremembo imunske reaktivnosti protiteles so pokazale, da nizek pH, ki je prisoten pri eluciji IgG iz kolone, poveča (navidezno) prisotnost aPL v primerjavi s serumi. Vendar v primeru uporabe izvornih pufrskih raztopin povišanih laboratorijskih testov niso opazili (57). Čeprav smo sami uporabljali originalne pufrje, smo pred združitvijo frakcij IgG vseeno preverili prisotnost anti-β2GPI z ELISO. Povišane vrednosti (titri vrednosti nad 2) so se pojavile pri prvih dveh frakcijah IgG K1 in pri eni izmed frakcij K2 (v skupnem prikazu so oseneni rofhnato), kljub temu da serumi le-teh niso izkazovali prisotnosti aPL. Izolacijo smo izvajali skladno z navodili proizvajalca, katerega pufrske raztopine smo pri postopku uporabili, zato lahko trdimo, da ionska moč in pH pufrjev nista po-kodovala aktivnosti protiteles. Razlog za spremenjene vrednosti tako pripisujemo slabo regenerirani koloni. Predhodno so na kolono namreč nanašali serume z nizko avidnimi aPL, ki so se tekom n-je izolacije verjetno spirala v vzorce zdravih krvodajalcev.

Na osnovi vrednosti metode ELISA za anti-β2GPI smo frakcije IgG združili, kot prikazuje Preglednica X; spojili smo raztopine protiteles dobljenih iz istega seruma. Ena izmed frakcij, B1b4, je glede na ostale frakcije B1b izkazovala višjo vsebnost anti-β2GPI, zato smo jo predstavili v skupino protiteles z visokimi titri tega pacienta ó B1c. Frakcije zdravih

krvodajalcev, ki so pokazale prisotnost anti- β 2GPI, smo združili in shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nadalje jih nismo uporabili.

Preglednica X: Pregled izolacije protiteles in združevanje pri izolaciji dobljenih frakcij. K, B ó serumski vzorci zdravih krvodajalcev oziroma bolnikov, V₁ ó prostornina dobljenih frakcij, anti- β 2GPI ó rezultati ELISE za prisotnost anti- β 2GPI v frakcijah IgG, V₂ ó prostornina združenih frakcij IgG (fK, fB) na osnovi rezultatov ELISE, c IgG ó koncentracija IgG v združenih frakcijah po sterilni filtraciji, * - frakcije so izolirane na 1-mililitrski koloni; ostale na 5-mililitrski. Z rofnato so označeni vzorci zdravih, ki so izkazovali povišane vrednosti titrov.

Vzorci serum	Frakcije	V1 [ml]	anti- β 2GPI	Vzorci frakcije	V2 [ml]	c IgG [g/l]
K1	1	5,0	3	fK1a	10,0	1,5
	2	5,5	4			
	3	13,5	1	fK1b		
	4					
	5	11,0	1			
	6					
	7	11,5	1			
K2	1	21,5	2	fK2	45,5	2,1
	2					
	3					
	4	10,0	1*			
	5	6,0	2			
	6	10,0	2			
	7	8,0	2			
K3	1	8,2	0	fK3	50,0	1,0
	2	6,0	0			
	3	8,0	0			
	4	8,0	0			
	5	9,0	1			
	6	7,0	0			
	7	8,0	0			
K4	1	12,5	0	fK4	60,0	2,0
	2					
	3	10,0	0			
	4	3,0	0			
	5	14,0	0			
	6					
	7	10,5	0			
	8					
	9					
	10					
K5	1	9,0	0	fK5	55,0	0,9
	2					
	3	11,0	0			
	4					
	5	11,0	0			
	6					
	7	12,5	0			
	9	11,5	0			
	10					
	B1	a1	10,5			
a2		18,0	9			
a3						
a4		12,0	13	fB1b		
b1		8,5	10			
b2		19,5	12			
b2						
b4		9,5	25	fB1c		
c1		9,5	35			
c2		16,5	28			
c3						
c4		10,2	23			
B2	1	12,5	35	fB2	47,5	2,6
	2	21,0	61			
	3					
	4	14,0	44			
B3	1	25,5	83	fB3	53,5	1,4
	2					
	3	28,0	97			
	4					

Iz podatkov opazimo, da dajo različni serumski vzorci različne volumene združenih frakcij IgG, ki ni povsod obratno sorazmeren s koncentracijo. Morda je razlog takšnih rezultatov večja avidnost fizioloških ali drugih patoloških IgG pri nekaterih krvodajalcih in bolnikih. Zato je bila za spiranje v tem primeru potrebna večja količina elucijskega pufra.

Premislek zahteva nastanek kosmičev iz izoliranih proteinov v raztopini po izolaciji pri vseh vzorcih, ki se po stresanju niso vrnila v stanje molekulske disperzije. Protitelesa so se obarjala že takoj po izolaciji, verjetno zaradi sestave in pH elucijskega in nevtralizacijskega pufra. Pod dializnimi pogoji so oblikovala kosmiče, kljub temu da smo dializno vrečko spirali po predpisih in uporabljali ustrezen puferski sistem s PBS s pH 7,4. Vzrok je bila morebiti nizka temperatura dialize okoli 5 °C. Pred ELISO za anti-β2GPI, merjenjem koncentracije protiteles in nadaljevanjem poskusov na celicah smo raztopine z IgG sterilno prefiltrirali in tako odstranili nastale kosmiče.

Obdelava celic s frakcijami IgG

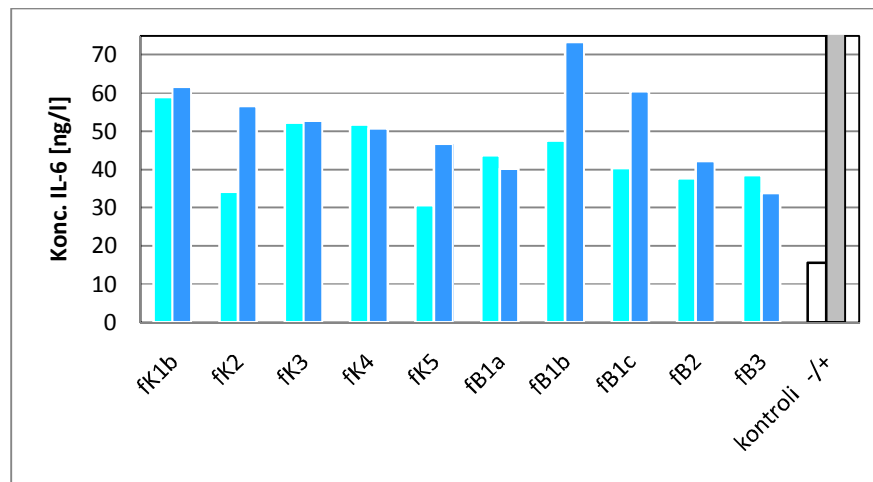
Z izoliranimi protitelesi razreda G smo nadaljevali s poskusi na celicah. Sprva smo nanašali frakcije IgG vsakega preiskovanca na celične kulture v koncentracijah 25 mg/l in 100 mg/l. Vzporedno smo na sosednji 24-prekatni ploščici celice izpostavljali 100 mg/l IgG z dvema različnima koncentracijama β2GPI.

Poskusa 3 in 4: Odziv celic na frakcije IgG nizkih koncentracij brez in z dodatkom β2GPI

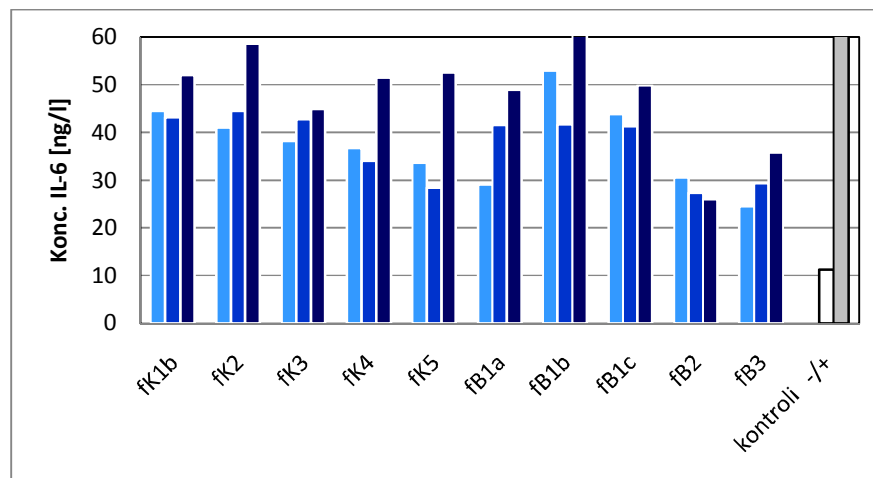
Po 18-urni inkubaciji spremljanje koncentracije IL-6 v supernatantu pri prvem poskusu ne prikazuje povečanja odziva, ki bi ga povzročila IgG bolnikov (Slika 15). Zanimivo je, da bolnikovi vzorci vzbujajo okoli z izjemo frakcije B1b v večji koncentraciji okoli primerljiv odziv na celicah kot frakcije zdravih. Odvisnosti izločanja IL-6 od koncentracije IgG nam pridobljeni podatki ne prikazujejo. Variabilnost odzivov na bolnikove imunoglobuline G pri nižjih koncentracijah je nizka (RSD = 10 %), medtem ko se pri večjih koncentracijah nakazujejo raznoliki odzivi (RSD = 33 %). Posledice spodbujanja s frakcijami zdravih so ravno obratne; pri nizkih koncentracijah so odzivi raznovrstni, pri visokih so si relativno podobni.

Zanimalo nas je, če dodatek β2GPI, ki je posrednik med protitelesi in membrano, spodbudi celice k drugačnemu izločanju IL-6. Pri poskusu obdelave celic z dvema različnima

koncentracijama β 2GPI ob konstantni koncentraciji IgG je nakazano povečanje vnetnega odziva pri višji koncentraciji β 2GPI (Slika 16), vendar ta ni značilno višja pri zdravih frakcijah niti pri patoloških. Poleg tega patološka protitelesa ne izkazujejo signifikantno višje stimulacije celic kot protitelesa zdravih. Prikazano je sicer večje izločanje citokina pod vplivom višjih koncentracij β 2GPI, ki bi pri bolnikovih IgG sicer lahko bilo posledica interakcije med membrano, lipidnim kofaktorjem in avtoprotelesi, vendar podobna slika pod vplivom IgG zdravih krvodajalcev preusmerja pozornost na druge načine stimulacije. Mednje bi lahko šteli LPS, druga protitelesa in podobno.



Slika 15: Izražanje IL-6 iz HCAEC ob izpostavitvi različnim koncentracijam IgG: 25 mg/l in 100 mg/l. Kot kontroli smo uporabili gojišče brez FBS (bela) ter IL-1 β v koncentraciji 1000 ng/l (siva). fk β frakcije IgG petih zdravih krvodajalcev, fb β frakcije IgG bolnikov z APS.



Slika 16: Tretja celica z IgG zdravih (fk1 β fk5) in bolnikov (fb1 β fb3) koncentracije 100 mg/l ter β 2GPI koncentracij 10 mg/l in 100 mg/l. Svetlo modri stolpci prikazujejo izločanje IL-6 iz celic, ki so bile izpostavljene protitelesom brez dodanega β 2GPI (poskus 3). Vrednosti so normirane glede na odzivnost celic na 0% FBS gojišče pri poskusu 3 in 4. Višja koncentracija β 2GPI v gojišču poveča odziv HCAEC na nivoju IL-6, vendar ta ni pogojen s patološkimi protitelesi. Kontroli sta enaki kot pri sliki 15.

Z dosedanjimi informacijami iz poskusov z IgG ne moremo potrditi vpliva bolezni na ve jo vnetno aktivacijo celic, ki smo jo opazili pri obdelavi s serumi. Dodatek β 2GPI se je izkazal za spodbujajo ega, a pri bolnih ni opaziti vi-jega odziva kot pri zdravih.

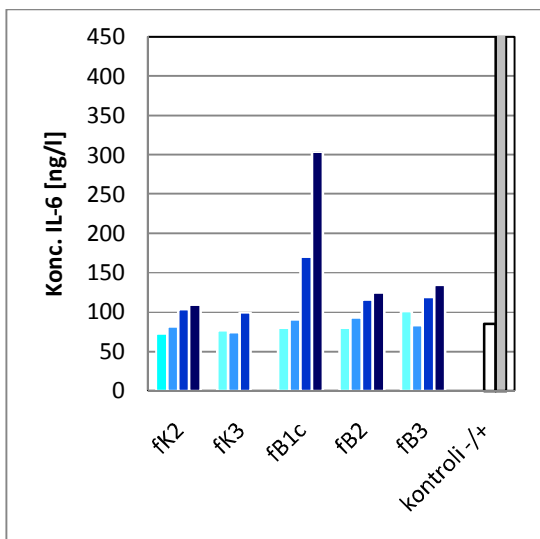
Poskusa 5 in 6: Odziv celic na frakcije IgG vi-jih koncentracij brez in z dodatkom β 2GPI

V preteklih objavah preiskovanega podro ja zasledimo obdelavo celic s poliklonskimi in/ali monoklonskimi protitelesi anti- β 2GPI v koncentracijah med 0,1 in 100 mg/l (58-60), kar smo testirali v predhodnih poskusih. Pri nadaljevanju smo se odlo ili, da spremljamo koncentracijsko odvisnost odziva celic, pri emer smo celice izpostavljali IgG koncentracij do 1000 mg/l. Vzporedno smo na drugi in tretji testni plo- i z enakimi koncentracijami protiteles spremljali odziv celic ob prisotnosti β 2GPI ter odziv s predhodno dvournno stimulacijo celic z IL-1 β . Slednja raziskava je pokazala preveliko odzivnost celic na stimulirajo i faktor, ki je zakrila vplive preiskovanih dejavnikov, zato poskus na tem mestu le omenjamo, rezultatov pa v nadaljevanju je prikazujemo.

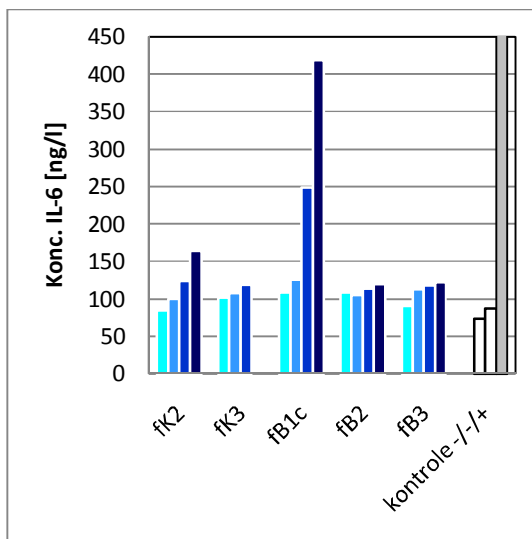
Poskuse smo zasnovali tako, da so vsi prekati s celicami vsebovali enako koli ino 0 % FBS goji- a in koli ino celotnega volumna, ne glede na to, kateri poskus smo izvajali. Za doseganje visokih koncentracij protiteles smo frakcije IgG centrifugirali na membrani z velikostjo por 30 kDa. Po postopku koncentriranja in ponovni sterilni filtraciji so bili vzorci pripravljeni za nanos na celice.

Kot je pokazala ELISA za IL-6, odzivnost celic pri obdelavi s protitelesi bolnikov in zdravih krvodajalcev nara- a s koncentracijo IgG (Slika 17). To pomeni, da vsa protitelesa, ne glede na vzorec, v vi-jih koncentracijah aktivirajo celice. Aktivacija med vzorci se razlikuje po svoji jakosti. Frakcije B1c pri koncentracijah 500 mg/l in 1000 mg/l 1,8- oziroma 2,7-krat bolj spodbudijo izraflanje vnetnih molekul v primerjavi s povpre nim odzivom zdravih. Pri ostalih vzorcih bolnikov povi-anje odzivov ni tako izrazito. Vendar iz primerjave izlo anja IL-6 pri koncentraciji IgG 500 mg/l vidimo, da je odziv bolnikovih protiteles za vsaj 4 SD vi-ji od odziva protiteles zdravih. Poskus sicer kafe dobro ponovljivost rezultatov tovrstnih preiskovanj, saj so odzivi v obliki koncentracije IL-6 na protitelesa nifjih dveh koncentracij podobni kot pri zgoraj opisanem poskusu 3 (Slika 15). Vendar bi bilo za bolj-e statisti no ovrednotenje potrebno izvesti ve ponovitev. Spodbujenost celic pri najnifjih dveh koncentracijah se ne razlikuje od negativne kontrole,

0 %FBS goji- a. S poskusom smo potrdili, da frakcije IgG, ki vsebujejo aPL, sproflijo vnetni odgovor celic, le da so za to potrebne vi-je koncentracije.



Slika 17: Izraflanje IL-6 iz HCAEC pod vplivom razli nih koncentracij IgG zdravih (fk2 in fk3) in bolnih (fb1c, fb2 in fb3): 25 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l. Kontrolni sta enaki kot na predhodnih slikah. Z vi-anjem koncentracije protiteles se pove uje izlo anje IL-6, ki je najbolj izrazito pri patolo-kem vzorcu fb1c, kar nakazuje vpliv aPL pri vnetnem odzivu celic.

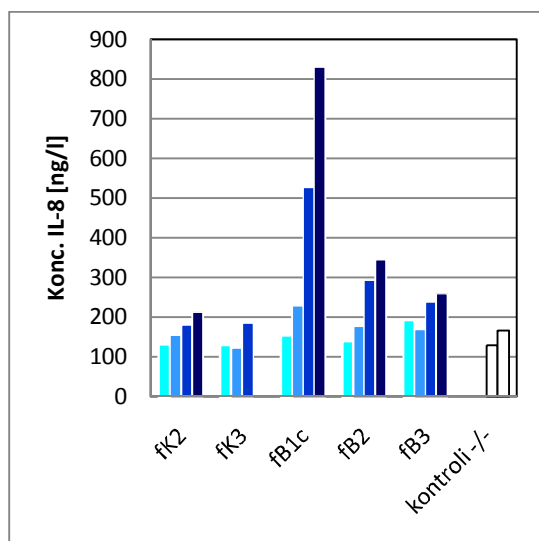


Slika 18: Odgovor celic z izlo anjem IL-6 na ve koncentracij IgG zdravih o FK in bolnih o FB (25 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l) ob prisotnosti 10 mg/l β 2GPI je v primerjavi s tretmajem brez glikoproteina nekoliko pove-an. Negativni kontrolni (bela) sta 0 % FBS goji- e in 0 % FBS goji- e s 10 mg/l β 2GPI. Pozitivno predstavlja IL-1 β .

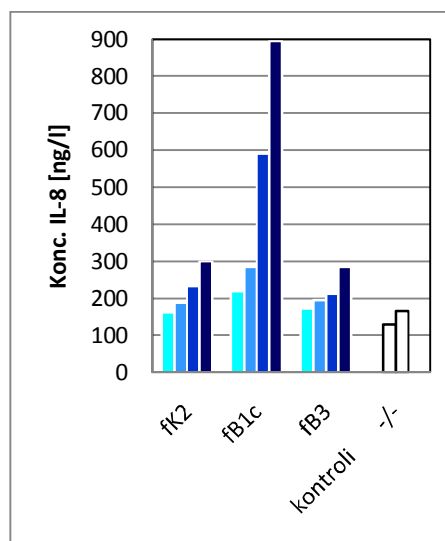
V nadaljevanju smo zadnji poskus ponovili z dodatkom β 2GPI (Slika 18) in primerjali proteinski nivo izraflanja IL-6 s prej-njim. Podobno kot prej izlo anje IL-6 tudi ob dodatku β 2GPI nara- a s koncentracijo protiteles. Najvi-je spremembe glede na prej-nji poskus opazimo pri tretmajih z IgG B1c v koncentraciji 500 mg/l in 1000 mg/l (1,5- in 1,4-kratno pove-anje v primerjavi s samimi IgG). Hkrati tudi protitelesa K2 bolj aktivirajo celice ob prisotnosti β 2GPI, a ker je odziv fb1c 2,5-krat vi-ji od odziva fk2, lahko verjetno velik del pove-anja odgovora pripimo interakcijam med β 2GPI, aPL in celi no membrano. Ostala dva vzorca bolnikov bolj spodbudita celice k izlo anju citokina kot negativni kontrolni, 0 % FBS goji- e in 0 % FBS goji- e z 10 mg/l β 2GPI, vendar je njuna stimulacija enaka ali manj-a od stimulacije s protitelesi zdravih.

Odzive celic na razli ne koncentracije IgG ob od- in prisotnosti β 2GPI smo preverjali tudi na nivoju IL-8, kar prikazujeta Slika 19 in Slika 20. Relativne razlike izraflanja IL-8 med s protitelesi bolnikov stimuliranimi celicami in celicami, ki so bile izpostavljene goji- u z 0 % FBS oziroma frakcijam zdravih, so ve je in izrazitej-e kot pri izraflanju IL-6. Povi-ano

izlo anje kemokina pri IgG bolnikov je bolj poudarjeno. Morda je prepisovanje gena za IL-8 v HCAEC bolj ali hitreje stimulirano kot prepisovanje gena za IL-6 in je zato detekcija IL-8 bolj ob utljiv pokazatelj vnetja. TM posebej mo an kemotakti en odgovor zopet spodbudijo protitelesa fB1c, sledi mu odziv na vzorec fB2, ki je pri koncentraciji 500 mg/l za 1,6-krat vi-ji od povpre ja normal. Odgovor celic na fB3 je nekoliko nifji od ostalih patolo-kih, vendar primerjava s protitelesi zdravih nakazuje vi-je izlo anje IL-8. Rezultati prikazujejo, da so odzivi IgG bolnikov s SAPS vi-ji od bolnika s PAPS. Najnifji koncentraciji protiteles izkazujeta fle omenjen trend nesignifikantne razlike med zdravimi in bolnimi, le vzorec fB1c tudi v koncentracijah IgG 100 mg/l povi-a izlo anje IL-8.



Slika 19: Z vi-anjem koncentracije IgG zdravih ó FK in bolnih ó fB (25 mg/l, 100 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l) spro-anje IL-8 v celi ni supernatant nara-a. Veliko ve ji je vpliv protiteles bolnikov z APS. Bela stolpca sta negativni kontroli: nepopolno goji-e brez/z β 2GPI.

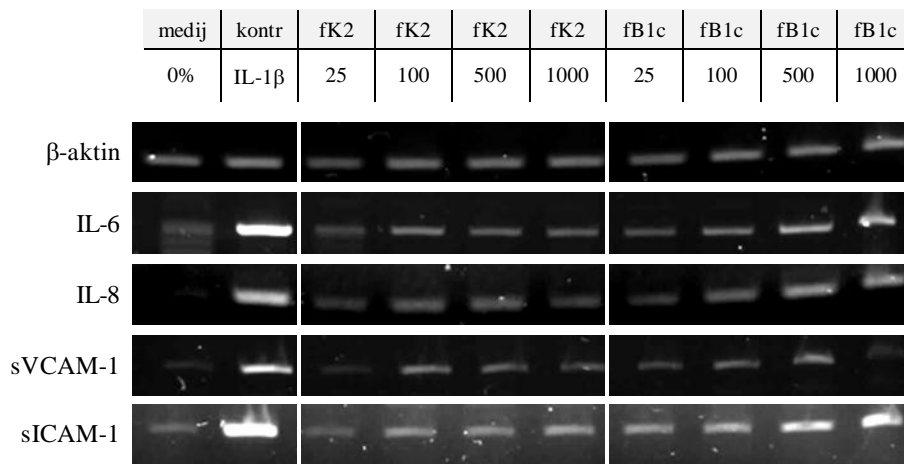


Slika 20: Koli ina spro- enega IL-8 v suernatantu nad kulturo HCAEC, izpostavljeni razli nim koncentracijam protiteles zdravega (fk2) in bolnikov (fB1c, fB3) ob prisotnosti 10 mg/l β GPI. Izlo anje je povi-ano v primerjavi s poskusom brez dodatka β 2GPI pod vplivom vzorca bolnika s SAPS in zdravega krvodajalca, ne pa pod vplivom vzorca bolnika s PAPS.

Izlo anje proteina IL-8 pod vplivom β 2GPI smo spremljali pri vzorcih fk2, fB1c in fB3. Prisotnost β 2GPI povi-a koncentracijo izlo enega kemokina za okoli 60 ng/l pri vseh koncentracijah IgG B1c. Enak pojav zasledimo pri fk2 koncentracij 1000 mg/l, zato ne moremo trditi, da je povi-anje odziva na fB1c z β 2GPI posledica delovanja glikoproteina po predvidenem mehanizmu. Ostale obdelave ne kafejo razlik v spodbujanju celic.

Prou evali smo tudi adhezijski odziv celic na nivoju proteinov, a zaradi slab-e ob utljivosti metode ELISA nismo dosegli koncentracij sICAM-1 nad mejo kvantifikacije. V naslednjih

korakov bi lahko preverili spreminjanje izlo anja te adhezijske molekule v supernatant s asom, saj je znano, da je njeno izlo anje pri nekaterih celi nih tipih visoko fle po 4 h (59). Izraflanje adhezijskih molekul smo prou evali na nivoju mRNA. Metoda je sicer kvalitativna, vendar lahko s pomo jo primerjave intenzivnosti obarvanja lis na agaroznem gelu ocenimo obseg izraflanja dolo enega gena. V ta namen moramo predhodno med seboj primerjati izrafleno koli ino β -aktina. Slika 21 prikazuje enake intenzitete transluminiscence cDNA za β -aktin pri vseh vzorcih razen najnifljih koncentracij fB1c in fK2, kar je potrebno upo-tevati pri nadaljnjih ocenjevanjih.



Slika 21 Osvetlitve na elektroforeznem gelu prikazujejo izraflanje vnetnih in adhezijskih molekul (IL-6, IL-8, sVCAM-1 in sICAM-1) na nivoju mRNA iz HCAEC, ki so bile izpostavljene frakcijam IgG v koncentracijah 25, 100, 500 in 1000 mg/l (IgG zdravega krvodajalca (fK2), IgG bolnika (fB1c)). Izraflanje genov je vi-je pod vplivom frakcij, ki vsebujejo aPL. Goji-e z 0 % FBS predstavlja negativno, IL-1 β pa pozitivno kontrolo obdelave HCAEC.

Primerjava intenzitete lis cDNA IL-6, IL-8, sICAM-1 in sVCAM-1 nakazuje na povi-ano izraflanje tako citokina in kemokina kot obeh adhezijskih molekul predvsem pri zgornjih dveh koncentracijah bolnikovih IgG. Odstopa le prikaz izraflanja sVCAM-1 pod protitelesi B1c koncentracije 1000 mg/l, kar je lahko posledica robnega efekta, slabe elektroforezne lo be ali tehni ne napake. Rezultati prou evanja izraflanja genov so skladni z rezultati na proteinskem nivoju. Zanimivo bi bilo preveriti dejanske koncentracije cDNA z metodo PCR v realnem asu. Nem-ka raziskovalna skupina z Natascho Clemens na elu je namre pokazala, da monoklonska aPL (HL-5B) signifikantno povi-ajo izraflanje IL-8 na nivoju mRNA, ne pa tudi na proteinskem nivoju (61). Kljub temu da so pri na-ih poskusih frakcije IgG vsebovale poliklonska protitelesa, bi se na nivoju mRNA (v nasprotju s proteinskim nivojem) morda pokazalo povi-ano izraflanje molekul fle pri obdelavi celic z nifljimi koncentracijami protiteles.

Rezultati na elektroforeznem gelu nam prikazujejo pomembno razliko v izražanju ICAM in VCAM. Znano je, da se medceli na adhezijska molekula izraža le v fizioloških pogojih, medtem ko je filno-celi na le inducibilna (38). Ta pojav je dobro viden na gelu pri goji – u z 0 % FBS, ki služi kot negativna kontrola. Pri ICAM je transluminiscenca vidna, pri VCAM pa ne.

Primerjava odzivov celic na tretmaje in drugi vplivi nanje

Vpliv β 2GPI

Da protitelesa, prisotna pri APS, lahko aktivirajo celice, je po dosedanjih prepi anjih potreben fosfolipidni kofaktor α β 2GPI, ki se veže na membrano in proti kateremu so protitelesa dejansko usmerjena (8). V mnogih do sedaj objavljenih publikacijah dokazujejo povišane stimulacije celic z dodajanjem β 2GPI (59,60,62,63). Pri naših poskusih nanos β 2GPI v preiskovanih koncentracijah v večini primerov ni pokazal večjega odziva na citokinski ali kemokinski odgovor HCAEC. Tako pri frakcijah IgG kot pri serumih je njihova stimulacija ostala na nivoju brez dodatka β 2GPI ali primerljiva z odzivi normal, razen pri višjih koncentracijah IgG fB1c.

Del Papa v enem izmed svojih člankov opisuje uinek anti- β 2GPI ob različnih koncentracijah β 2GPI. Dokazali so, da anti- β 2GPI v kombinaciji z β 2GPI v koncentracijah pod 0,3 mg/l ni sposoben stimulacije HUVEC in do koncentracije 2,5 mg/l še doseže vrh α plato (4). Ker so HCAEC celice navadno občutljivejše in se hitreje odzivajo na dražljaje, je mogoče, da je plato odziva pri njih dosežen še pri nižjih koncentracijah. V kolikor je naših celicah pred tretmajem ostala majhna količina β 2GPI iz 5 % FBS, ki smo ga uporabili za gojenje celic, je morda ta zadošala za stimulacijo. Z ELISO za β 2GPI smo preverili, da ga 100 % FBS vsebuje 21 mg/l (Preglednica XI). To pomeni, da smo ga tekom gojenja na celice nanесли okoli 1 mg/l. Če je na njih po spiranju pred obdelavo še vedno prisoten v dovolj velikih količinah, njegov dodatek ne pripomore k večji stimulaciji. Da bi ga popolnoma odstranili in nato proučevali njegov vpliv, bi morali tako kot nekatere raziskovalne skupine (59) celice pred obdelavo večkrat temeljito sprati z ustreznimi puframi in za dlje kot 2 h pustiti v 0 % FBS goji – u.

Z ELISO za β 2GPI smo ugotavljali tudi koncentracije tega proteina v nekaterih serumih. Preglednica XI prikazuje dobljene vrednosti. Serum bolnika s SAPS ga vsebuje največ, a

ne prekora i zgornje meje fiziološkega območja. Tudi bolnik s PAPS ne izkazuje povišanih vrednosti, vendar so te višje od zdravega krvodajalca. Glede na to, da smo v celi no goji – e ob obdelavi kulture nanесли 5 % seruma, je goji – e vsebovalo tudi nad 10 mg/l β 2GPI. Od tod lahko sklepamo, da je bilo pri poskusih 1, 2 in 3 fle brez dodajanja eksogenega glikoproteina le-tega dovolj za maksimalne interakcije in aktivacijo. Tako verjetno preseflek dodanega β 2GPI ni mogel –e bolj spodbuditi celic. V nadaljnjih korakih bi bilo zanimivo preveriti koncentracijsko odzivnost HCAEC na β 2GPI ter korelacijo med koli ino β 2GPI v serumu in vrsto APS (PAPS, SAPS, CAPS).

Preglednica XI: Koli ino β 2GPI v serumu. Fiziološke vrednosti β 2GPI v plazmi se gibljejo med 150 mg/l in 300 mg/l. Najve glikoproteina vsebuje serum bolnika B1a, ki boleha za SAPS, bolnik B3 s PAPS ima v serumu nižje koncentracije. $c_{\beta 2GPI}$ – koncentracija β 2GPI v serumu.

Vzorec	$c_{\beta 2GPI}$ [mg/l]
FBS	21
K2	151
B1a	220
B3	167

Frakcije IgG v nasprotju s serumi seveda niso vsebovale β 2GPI, saj smo ga z afinitetno kromatografijo odstranili. Zato bi zadostno koli ino β 2GPI v goji – u celi ne kulture bi lahko razlagali tudi s sintezo proteina v endoteliju. Znano je, da proizvodnja tega plazemskega proteina ni omejena le na jetrne celice. Obstajajo dokazi izraflanja njegovega gena v celicah plancente in tankega revesa (17,18,64). Raziskave ekspresije β 2GPI v endotelijskih celicah bi morda ponudile odgovor na vpra – anje njegovega vpliva pri vezavi aPL.

Pred kratkim je skupina raziskovalke Clemens objavila lanek, v katerem opisujejo aktivacijo endotelijskih celic z monoklonskimi aPL, ki se ne veflejo na β 2GPI (61); slednji naj torej ne bi imel pri akovanega u inka, v kolikor bi bila taka protitelesa prisotna med IgG na –ih bolnikov. Frakcije IgG vsebujejo poliklonska anti- β 2GPI in aCL, kar pomeni, da je ve ina aPL verjetno takih, ki se veflejo na prou evani glikoprotein. Ne nazadnje so laboratorijske preiskave za dolo itev kriterijev osnovane na teh interakcijah.

Vpra – anji, ki – e ostajata, sta 1) "Zakaj je dodatek β 2GPI pri koncentracijah 500 mg/l in 1000 mg/l mo no spodbudil celice k izlo anju IL-6, medtem ko pojava nismo opazili pri ostalih odzivih?" In 2) "Zakaj fB1c mo neje stimulirajo celice na nivoju IL-6 in IL-8 kot

ostali bolniki, eprav ima bolnik B3 bistveno vi-je serumske koncentracije IgG aPL?" Nizozemski raziskovalci so ugotovili, da β 2GPI obstaja v ve komformacijah. Ena izmed oblik je prosta v plazmi, drugo pa protein zasede po vezavi na fosfolipidni dvosloj ali negativno nabito povr-ino. V tej komformacijski obliki je protitelo sposobno prepoznati epitop, ki je sicer zakrit (56). Specifi ni pogoji verjetno botrujejo, da membrana celice veffe β 2GPI. e v vdolbinici ni bilo ustreznih pogojev za spremembo oblike, se protitelo, eprav je bilo v velikih koli inah prisotno, ni vezalo na lipidni kofaktor in s tem ni bilo sposobno aktivirati celice. Predvidevanja zahtevajo razjasnitev mehanizma vezave in proflenja aktivacije.

Vpliv ostalih protiteles

Tako iz rezultatov serumov kot protiteles opazimo raznolikost odzivov celic na vzorce bolnikov. Celi ni odgovori ne odraflajo stanja bolnikov, ki ga opredelimo s koli ino razli nih aPL v serumu (Preglednica III). Serumi in izolirana protitelesa B1a in B1c, ki nimajo najvi-jih titrov aPL, so izzvali zna ilno vi-ji odziv kot normale in nekateri drugi serumi in IgG bolnikov. Pacient s PAPS ó B3, ki ima najvi-je titre IgG anti- β 2GPI in najvi-jo stopnjo LA, izkazuje manj-e vzdraflenje HCAEC kot ostali vzorci bolnikov. Najbolj opazna razlika pri diagnozah sta so asni avtoimunski bolezni pri pacientih B1 in B2. Poleg APS bolnika bolehata tudi za SLE in SJS. To pomeni, da njuni serumi vsebujejo -e druga avtoprotitelesa. Vendar protijedrna protitelesa (ANA) in protitelesa proti dvovija ni DNA (anti-DNA), ki so osnovni imunoserolo-ki kazalci SLE (5), ter protitelesa proti endotelijskim celicam po nekaterih raziskavah ne aktivirajo endotelija (62).

Razli no mo ne odzive na serume lahko razlagamo z razli nim naborom drugih stimulatorjev celic. V serumih so lahko prisotni drugi kofaktorji aPL, ki posredujejo celi ni odziv. Nekatera aPL razreda M aktivirajo endotelijske celice. Serumi B1 in B2 vsebujejo IgM anti- β 2GPI in aCL, ki so lahko vzrok ve jemu spodbujanju celic, kot ga opazimo pri serumu B3. Predvsem serum B2 izkazuje velik odziv na celicah, ki pa se znifla ob stimulaciji le-teh z IgG. To pomeni, da je serumski odziv lahko posledica prisotnih aktivirajo ih IgM ali kofaktorjev in v manj-i meri izoliranih IgG.

Mofno je, da serumi in frakcije bolnikov, ki bolj stimulirajo celice, vsebujejo -e druga patolo-ka protitelesa, ki jih nismo laboratorijsko identificirali. V frakcijah so morebiti IgG proti drugim lipidnim kofaktorjem (protrombin, aneksin A5, tkivni aktivator plazminogena

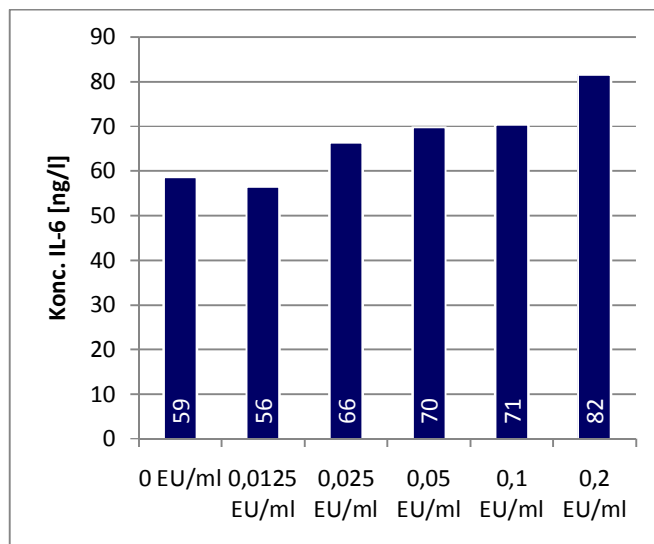
(9,10)), ki se sicer redkeje kot protitelesa proti β 2GPI pojavljajo pri APS. Kljub temu lahko v bolnikih spodbudijo klinične znake (65,66). Na drugi strani bi lahko vzorci bolnikov, ki izkazujejo manjši odziv na celicah, posedovali protitelesa proti TLR 4, kar bi se odrazilo z nesposobnostjo tvorjenja interakcij s kompleksom β 2GPI-anti- β 2GPI in s tem nezmožnostjo aktiviranja celice. V nadaljnjih raziskavah bi bilo tako potrebno proučiti nabor spodbujajočih in zavirajočih protiteles ter izolirati posamezne aPL in določiti njihove učinke.

Poskus 7: Aktivacija celic z LPS

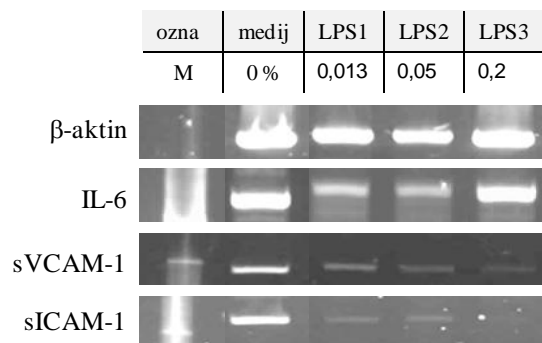
Pomemben premislek o neselektivni aktivaciji celic, ki se ne tiče nabora in mehanizmov delovanja protiteles, zahtevajo ostale sestavine v raztopini IgG, ki stimulirajo vnetni odziv endotelijskih celic. Mednje sodi LPS, ki je poleg IL-1 in TNF α predstavnik najmožnejših spodbujevalcev vnetja (55). Gramnegativni endotoksin na celicah izkazuje povečano izločanje IL-6 in IL-8 (67) ter adhezijskih molekul (55). Ameriška agencija za prehrano in zdravila (FDA) predpisuje LPS v sterilni vodi v količinah med 0,25 in 0,5 EU/ml, saj so le malo povečane vrednosti endotoksina v krvnem obtoku pogosto usodne (68). Da se pri raziskavah na celicah vplivu LPS izognejo, gojičnu pogosto dodajo antibiotik polimiksin B (59), katerega delovanje poleg bakteriocidnega zajema tudi vezavo in deaktivacijo LPS (69,70). V naših poskusih so bile celice zaščitene z gentamicinom, zaviralcem sinteze proteinov v gramnegativnih bakterijah, ki predhodno prisotnemu endotoksinu ne more zmanjšati aktivnosti (69). Ker je upoštevanje vpliva LPS na celice nujno, smo ga kvalitativno določili s testom LAL. Določitev je pokazala, da so vsi serumi, razen B2, negativni. Na drugi strani so vse frakcije IgG vsebovale endotoksin, kar je verjetno posledica kontaminacije kolone ali dializne membrane. Ob uteljivosti testa je značilna 0,125 EU/ml.

Ker smo raztopine protiteles nanosili na celice, smo preverili določiti njihovo odzivnost, če so izpostavljene majhnim količinam LPS. To smo preverili z nivojem izločenega IL-6 iz HCAEC (Slika 22) ter na nivoju izraženih mRNA IL-6, sICAM-1 in sVCAM-1 (Slika 23). Na celice smo nanosili različne koncentracije LPS, kakršne smo predvidevali, da so prisotne v frakcijah IgG, razredjenih z 0 % FBS gojičnem. Zvišanjem koncentracije endotoksina se dviguje stimulacija endotelijskih celic, ki povečajo izločanje in izražanje IL-6 ter izražanje adhezijskih molekul, vendar vidimo, da je odziv nizek in ne bi mogel prekriati ali zasenčiti

vpliva protiteles ali serumov. Nizko aktivacijo HCAEC z LPS je pokazala tudi raziskovalna skupina, ki je celice izpostavljala koncentracijam do 500 $\mu\text{g/l}$ (približno 100 ng/l predstavlja aktivnost 1 EU/ml). S 10 $\mu\text{g/l}$ (\approx 100 EU/ml) je spodbudila izlo anje IL-6 do koncentracije 110 ng/l (67). Ker so predvidene aktivnosti endotoksina v na-ih vzorcih do najve 10 EU/ml, lahko njegov vpliv na osnovi zbranih podatkov zanemarimo. Za natan nej-e preiskave bi ga bilo potrebno kvantitativno dolo iti in odstraniti iz frakcij, kar v nadaljevanju sodelavci v laboratoriju fle na rtujejo.



Slika 22: Odgovor celic z izlo anjem IL-6 na razli ne koncentracije LPS v supernatantu. HCAEC izlo ijo ve IL-6, e so izpostavljene ve ji koli ini endotoksina, vendar povi-anje ni tako veliko, da bi pri ostalih poskuhih prekrilo vpliv preiskovanih dejavnikov ó IgG bolnikov z APS.



Slika 23: Elektroforezna lo ba fragmentov cDNA za IL-6, sVCAM-1 in sICAM-1. Izraflanje molekul v celicah je bilo posledica njihove obdelave z endotoksinom v razli nih koncentracijah, izmed katerih so 0,0125 EU/ml, 0,05 EU/ml in 0,2 EU/ml prikazane na sliki. Ozna evalec je bila skupina fragmentov med 20 in 1000 bp.

Aktivacija celic preko ostalih mehanizmov

Negativno nabiti fosfolipidi, ki vsebujejo β 2GPI, so v fizioloških pogojih na zunanji strani dvosloja prisotni v zelo majhnih koncentracijah in se tja premestijo v času apoptoze ali aktivacije celice (15). V našem primeru stimulacija z IgG poteka tudi brez predhodne aktivacije celic (npr. z IL-1 β). Tako za razvoj *in vivo* nastanka plaka pri APS morda ni potrebne mehanske ali druge poškodbe endotelija, ki bi sprožila izgubo asimetrije membrane. Druga možnost je, da za celice neidealni pogoji v prekatu povzročijo povečan prehod negativno nabitih fosfolipidov na zunanjo stran membrane in s tem omogočijo vezavo β 2GPI.

In vitro razmere so v mnogih segmentih popolnoma drugačne od tistih *in vivo*: ni konstantnega pretoka krvi, celice so izpostavljene sestavinam gojišča, antibiotikom, rekombinantnim rastnim faktorjem, niso v stiku z drugim tkivom ali organskim sistemom. Takšni stresni pogoji sprožijo v celici kulturi manjši vnetni odziv, ki smo ga prikazali z odzivi v prekatih z negativnimi kontrolami. Kljub izločitvi IL-6 in IL-8 iz in izrafljanju sVCAM-1 in sICAM-1 v celicah v teh vdolbinicah, je le-to bistveno nižje od izločitve teh molekul iz celic, ki so bile izpostavljene serumom in frakcijam IgG bolnikov. Zaključimo lahko, da aPL izzovejo dovolj močan celični odziv, ki ga vplivi stresnih pogojev ne prekrijejo.

Pri delu smo se omejili na delovanje anti- β 2GPI preko β 2GPI vezanega na endotelijske celice, vendar se protitelesa navadno vsebujejo preko receptorjev za regijo Fc (FcR), ki ležijo na membranah celic imunskega sistema. Fc γ RI lahko nase vsebuje monomere IgG, ki ob vezavi v celici sprožijo aktivacijo (51). Možna je, da nekatera protitelesa B1 tvorijo vezi s Fc γ R, ki so močnejše kot pri protitelesih B2 in B3, in po tem mehanizmu spodbudijo celice. Prav tako se lahko na FcR vsebujejo druge molekule, ki niso protitelesa, in stimulirajo proces adhezije. Primer takšne aktivacije je CRP, ki z vezavo na Fc γ RI ali Fc γ RII v endotelijskih celicah aorte spodbudi večje izrafljanje ICAM-1, VCAM-1 in IL-8 ter lepljenje monocitov na endotelij (71). Vpliv vezave protiteles na Fc γ R bi lahko preverili s predhodno obdelavo HCAEC s protitelesi proti tem receptorjem, s čimer bi preprečili ali zmanjšali vezavo IgG in drugih molekul na Fc receptor.

Aterosklerotični proces poleg ostalih vnetnih molekul opredeljujejo IL-6, IL-8, sICAM-1 ter sVCAM-1. Omenjene molekule so izjemnega pomena v začetnih stadijih aterogeneze,

kjer igra mo no vlogo kemotaksa in adhezija levkocitov na membrane endotelija. Brez za etne faze se nadaljnji proces ne bi razvil.

Na zdravi celi ni kulturi HCAEC smo pokazali, da tako frakcije IgG kot serumi bolnikov z APS spodbudijo izraflanje vseh omenjenih molekul. Dodatek β 2GPI, posrednika aktivacije, v fiziolo-kih koncentracijah, razen pri enem vzorcu, ne izzove ve jega izlo anja prou evanih proteinov, saj je verjetno fle prisoten v supernatantu ali na povr-ini celic. Odzivi HCAEC na vzorce bolnikov so heterogeni, kar je o itno posledica razli nih sestavin v vzorcih, ki poleg aPL stimulirajo celice. Serumi in frakcije IgG bolnika s PAPS so v manj-i meri aktivirali celice kot vzorci bolnikov s SAPS.

Za popolnej-o sliko bi lahko v nadaljevanju prou evali ponovljivosti rezultatov z vzorci istih bolnikov in z ve jim naborom vzorcev bolnikov z razli nimi oblikami APS. Natan neje bi bilo potrebno dolo iti koncentracijski vpliv β 2GPI ter mehanizem njegovega delovanja. Morda se bo izkazalo, da aPL spodbudijo vnetni odziv po drugem mehanizmu, ki ne vklju uje tega glikoproteina. Zanimivo bo preveriti vpliv drugih protiteles, ki stimulirajo endotelijske celice, kot so avtoprotitelesa proti drugim kofaktorjem lipidov. Prav tako so pomemben dejavnik morebitna nevtralizirajo a avtoprotitelesa, ki bi prepre ila vpliv spodbujajo ih IgG. Ovrednotili bi lahko vpliv nabora ostalih avtoimunskih in neavtoimunskih protiteles razredov G in M ter njihovo vlogo pri aktivaciji ali preu ili mehanizme aktivacije celic preko FcR.

Sklep

Ateroskleroza je bolezen, ki se za ne s po-kodbo endotelija. Kot pri vsaki po-kodbi se tudi tu razvije vnetje, ki ga usmerjajo vnetni mediatorji, med katere sodijo citokini. V nadaljevanju procesa izredno pomembno vlogo igrajo tudi kemotakti ni dejavniki in adhezijske molekule, ki usmerjajo levkocite proti vneti- u in skozi endotelijsko pregrado. Profilci po-kodbe arterijske endotelijske celice so razli ni in zajemajo tudi imunske dejavnike. Primer avtoimunske bolezni, pri kateri bolniki lahko razvijejo zadebelitev arterijske stene, je APS. Predvidenih mehanizmov povezave med boleznima je ve . V na-em primeru smo prou evali vnetni odziv zdravih HCAEC na frakcije IgG in serume bolnikov z APS.

Ugotovili smo, da serumi in izolirana protitelesa razreda G bolnikov z APS, ki smo jih nanegli na HCAEC, v primerjavi s protitelesi zdravih krvodajalcev aktivirajo celice.

- Z afinitetno kromatografijo, ki smo jo uporabili za izolacijo IgG, smo dosegli feline koncentracije protiteles tako pri zdravih krvodajalcih, kot pri bolnikih z APS.
- Serumi bolnih v razli nih koncentracijah sproflijo vnetno reakcijo ter pove-ano izlo anje IL-6 v primerjavi s serumi zdravih krvodajalcev.
- Bolnikove frakcije IgG stimulirajo izlo anje proteinov IL-6 in IL-8 iz celic, a je stimulacija omejena na visoke koncentracije protiteles: 500 mg/l in 1000 mg/l. Protitelesa bolnika s PAPS zelo -ibko nakaflejo vi-jo prisotnost vnetnega procesa kot protitelesa zdravih, medtem ko protitelesa enega izmed bolnikov s SAPS mo no spodbudijo celice.
- Izraflanje IL-6, IL-8, sICAM-1 in sVCAM-1 na nivoju mRNA je bilo vi-je v celicah, ki smo jih izpostavili IgG bolnika, kot v tistih, na katere smo nanegli vzorce zdravega krvodajalca.

Rezultati na-ega eksperimentalnega dela predstavljajo osnovo za nadaljnje preiskave, ki bi pripomogle k jasnej-i sliki celokupnega vpliva APS na ateroskleroza. Ovrednotenje pomena aPL pri aterogenezi bi omogo ilo bolj-e svetovanje pacientom v smeri zmanj-evanja dejavnikov tveganja.

Literatura

1. WHO: Age-standardized mortality rates by cause (per 100.000 population). Estimates of death rates for 2002 by cause for WHO member states. <http://www.who.int/whosis/indicators/compendium/2008/1mst/en/index.html> (12.5.2010)
2. Ames PRJ, Margarita A, Alves JD. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis: insights from systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009; 37(1): 29-35.
3. Kobayashi K, Lopez LR, Matsuura E. Atherogenic antiphospholipid antibodies in antiphospholipid syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1108: 489-96.
4. Ribarič S. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izd. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2001.
5. Tomič M, Kveder T, Boffi B, Leban B, Logar D, Rainer S, et al. Revmatične bolezni. V: *Interna medicina.* 3. izd. Ljubljana: Littera picta; 2005.
6. Cervera R, Boffa M, Khamashta MA, Hughes GRV. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. *Lupus.* 2009; 18(10): 889-93.
7. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(6): 230-9.
8. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; 87(11): 4120-4.
9. Sodini M, Rozman B, Igli A, Kralj-Igli V. Antiphospholipid syndrome: mechanisms revealed in erythrocyte and liposome studies. V: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes.* Amsterdam: Elsevier; 2008. str. 79-88.
10. Teixidó M, Font J, Reverter JC, Cervera R, Tàssies D, Ingelmo M, et al. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies: a useful marker for the antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol.* 1997; 36(1): 113-6.
11. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun.* 2000; 15(2): 145-51.
12. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006; 4(2): 295-306.
13. Čuknik S, Rozman B, Boffi B. Pomen protiteles proti beta2-glikoproteinu I. *Farmacevtski vestnik.* 2004; 55(2): 207-14.

14. Sodin-TMemrl S, Rozman B. Beta2-glycoprotein I and its clinical significance: from gene sequence to protein levels. *Autoimmun Rev.* 2007; 6(8): 547-52.
15. Sodin-TMemrl S, Frank M, Ambroffi A, Pavli J, Vid TM u nik S, et al. Interactions of phospholipid binding proteins with negatively charged membranes: beta2-glycoprotein I as a model mechanism. V: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes.* Amsterdam: Elsevier; 2008. str. 243-54.
16. A ar C, de Groot PG, Levels JHM, Marquart JA, Meijers JCM. Beta2-glycoprotein I is incorrectly named apolipoprotein H. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(1): 235-6.
17. Caronti B, Calderaro C, Alessandri C, Conti F, Tinghino R, Palladini G, et al. Beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115(1): 214-9.
18. Averna M, Paravizzini G, Marino G, Lanteri E, Cavera G, Barbagallo CM, et al. Liver is not the unique site of synthesis of beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H): evidence for an intestinal localization. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1997; 27(3): 207-12.
19. Del Papa N, Sheng YH, Raschi E, Kandiah DA, Tincani A, Khamashta MA, et al. Human beta 2-glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipid binding and offers epitopes for anti-beta 2-glycoprotein I antibodies. *J Immunol.* 1998; 160(11): 5572-8.
20. Frank M, Sodin-TMemrl S, Irman S, Boffi B, Rozman B. Beta2-glycoprotein I and annexin A5 phospholipid interactions: artificial and cell membranes. *Autoimmun Rev.* 2009; 9(1): 5-10.
21. de Groot PG, Derksen RHW. Pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8): 1854-60.
22. Reed J, Giannakopoulos B, Jackson M, Krilis S, Gordon T. Ro 60 functions as a receptor for beta(2)-glycoprotein I on apoptotic cells. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(3): 860-9.
23. Okkels H, Rasmussen TE, Sanghera DK, Kamboh MI, Kristensen T. Structure of the human beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) gene. *Eur J Biochem.* 1999; 259(1-2): 435-40.
24. Wikipedia: Lipid bilayer. Phospholipid aqueous solution structures. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg (20.8.2010)
25. de Laat B, Mertens K, de Groot PG. Mechanisms of disease: antiphospholipid antibodies-from clinical association to pathologic mechanism. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008; 4(4): 192-9.
26. Lambrianides A, Carroll CJ, Pierangeli SS, Pericleous C, Branch W, Rice J, et al. Effects of polyclonal IgG derived from patients with different clinical types of the

antiphospholipid syndrome on monocyte signaling pathways. *J Immunol.* 2010; 184(12): 6622-8.

27. Wikipedia: Artery. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Anatomy_artery.png (20.8.2010)

28. Dorland W. *Atherogenesis. V: Dorland's illustrated medical dictionary.* Philadelphia: Saunders; 2003. str. 172.

29. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265(3): 621-36.

30. Vozelj M. *Temelji imunologije.* 1. izd. Ljubljana: DZS; 2000.

31. Matsuda T, Hirano T. *The IL-6 family, IL-6. V: Cytokine reference, A compedium of cytokines and other mediators of host defense.* San Diego, California: Academic press; 2001. str. 537-64.

32. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg.* 1996; 224(5): 647-64.

33. van Buul J, Hordijk P. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(5): 824-33.

34. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997; 90(3): 909-28.

35. Iizasa H, Matsushima K. *CXC chemokines, IL-8. V: Cytokine reference, A compedium of cytokines and other mediators of host defense.* San Diego, California: Academic press; 2001. str. 1061-8.

36. Feldman M, Dinarello C. *The IL-1 family, IL-1beta. V: Cytokine reference, A compedium of cytokines and other mediators of host defense.* San Diego, California: Academic press; 2001. str. 351-74.

37. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003; 170(2): 191-203.

38. Panés J, Perry M, Granger D. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(3): 537-50.

39. Carman C. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci.* 2009; 122(17): 3025-35.

40. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(11): 2292-301.

41. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.* 2001; 173(1): 35-43.

42. Dansky H, Barlow C, Lominska C, Sikes J, Kao J, Weinsaft J, et al. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent

on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(10): 1662-7.

43. Libbly P. The patogenesis, prevention, and treatment of atherosclerosis. V: *Harrison's principles of internal medicine.* 17. izd. New York: McGraw-Hill Medical; 2008. str. 1501-4

44. Deutscher M. *Methods in Enzymology. Guide to protein purification.* San Diego, California: Academic press; 1990.

45. Kuhelj R. *Biokemija v praksi : načela in tehnike.* 3. izd. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo; 2008.

46. Alberts B. *Molecular biology of the cell.* 5. izd. New York: Garland Science; 2008.

47. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry.* 6. izd. New York: W. H. Freeman & Co Ltd; 2007.

48. Wikipedia: Coomassie Brilliant Blue
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Coomassie_Brilliant_Blue_G-250.svg (20.6.2010)

49. Batista U. *Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih.* Ljubljana: TM študentska založba; 2005.

50. The science creative quarterly: Chaudry A. Cell culture. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture> (20.6.2010)

51. Roitt I. *Roitt's essential immunology.* 11. izd. Malden Mass: Blackwell Pub; 2006.

52. Margarita A, Batuca J, Scenna G, Alves JD, Lopez L, Iannaccone L, et al. Subclinical atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1108: 475-80.

53. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007; 100(2): 158-73.

54. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998; 91(10): 3527-61.

55. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J.* 1993; 7(6): 523-32.

56. Agar C, van Os GMA, Mörgelin M, Sprenger RR, Marquart JA, Urbanus RT, et al. Beta2-Glycoprotein I can exist in two conformations: implications for antigen recognition in the antiphospholipid syndrome. *Blood.* 2010;

57. Omersel J, fiager U, Kveder T, Boffi B. Alteration of antibody specificity during isolation and storage. *J Immunoassay Immunochem.* 2010; 31(1): 45-59.

58. Hamid C, Norgate K, D'Cruz DP, Khamashta MA, Arno M, Pearson JD, et al. Anti-beta2GPI-antibody-induced endothelial cell gene expression profiling reveals induction of novel pro-inflammatory genes potentially involved in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(8): 1000-7.
59. Del Papa N, Raschi E, Catelli L, Khamashta MA, Ichikawa K, Tincani A, et al. Endothelial cells as a target for antiphospholipid antibodies: role of anti-beta 2 glycoprotein I antibodies. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 38(3): 212-17.
60. Chen Q, Stone PR, Woon S, Ching L, Hung S, McCowan LME, et al. Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb. Res.* 2004; 114(2): 101-1.
61. Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, von Landenberg P. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 805-13.
62. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest.* 1995; 96(5): 2211-9.
63. Cho C, Cho M, Chen PP, Min S, Hwang S, Park K, et al. Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol.* 2002; 168(8): 4209-15.
64. Chamley LW, Allen JL, Johnson PM. Synthesis of beta2 glycoprotein 1 by the human placenta. *Placenta.* 1997; 18(5-6): 403-10.
65. Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *Br J Haematol.* 2006; 135(2): 214-9.
66. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(9): 1982-93.
67. Jehle AB, Li Y, Stechschulte AC, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Endotoxin and mast cell granule proteases synergistically activate human coronary artery endothelial cells to generate interleukin-6 and interleukin-8. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(4): 361-8.
68. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 3. izd. New York: Informa Healthcare USA; 2007.
69. Rang H. *Pharmacology.* 5. izd. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.

70. Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacífico LG, Oliveira RR, Oliveira SC. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fract*. 2007; 6 (1)
71. Devaraj S, Davis B, Simon S, Jialal I. CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fcγ receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(3): 1170-6.
72. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 1999; 99(15): 1997-2002

Priloga

bolniki	vzorci	celična kultura/živalski model	količina Ab, pogoji	nivo testiranja	opazovane molekule	odzivi celic	leto objave	ref. nca
PAPS/normale	poliklonska anti-β2GPI/frakcije IgG	HUVEC	50 µg/ml, 4 h, 37 °C	RNA	13 727 genov: pri 101 povečana ekspresija IL-8, E-selektin	↑ICAM, ↑VCAM, ↑IL-6, ↑IL-8 ↑izražanje	2007	58
PAPS/APS/SLE/normale	frakcije humanih IgG z 10 % FBS	HUVEC	100 µg/ml, 15 min - 8 h, 37 °C	monocitov	E-selektin, ICAM-1, VCAM-1	↑adhezija monocitov ni indukcije adhezije ↑adhezija monocitov ni indukcije adhezije ↑adhezija monocitov	1995	62
	frakcije IgG SLE							
PAPS/SAPS/normale	frakcije IgG PAPS/SAPS brez FBS	HUVEC	20 µg/ml	monocitov	E-selektin, ICAM-1, VCAM-1	↑adhezija monocitov ni indukcije adhezije ↑adhezija monocitov	1995	62
	z β2GPI							
	serumi z/brez aPL							
	monoklonska protitelesa IIC5, ID2							
PAPS/SAPS/normale	serumi z/brez aPL	HUVEC	10% serum, 1-20 h, 37 °C	proteinov na celicah	ICAM, E-selektin, vezava	ni vezave na celice	2004	60
	monoklonska protitelesa IIC5, ID2							
	serumi z/brez aPL							
	monoklonska protitelesa IIC5, ID2							
APS	biotiniliran β2GPI	HUVEC	z DMXAA	proteinov	E-selektin, ICAM-1, VCAM-1	3 h: ↑izražanje 1-3 h: ↑izražanje 20 h: nesposobnost vezave 1-3 h: vezava 20 h: izguba sposobnosti vezave	1999	72
	frakcije IgG							
	miši							
	100, 250 ali 500 µg/ml na injekcijo, 0-48 h							
APS/SLE/normale	frakcije IgG	HUVEC	10 - 1000 µg/ml, 24 h	proteinov, mRNA	MCP-1	↑izražanje, koncentracijska odvisnost izražanja	2002	63
	Mab aCL CL15 in S14 vpliv β2GPI							
APS/normale	frakcije IgG	HUVEC	100 µg/ml, 6 h	proteinov, mRNA	MCP-1	↑izražanje	2009	61
	Mab aPL HL-5B							
PAPS/SLE	aβ2GPI/frakcije IgG	HUVEC	1.5-100 µg/ml, 4 ali 20 h 1.5-100 µg/ml, 24 h, 37 °C	proteinov	ICAM-1, E-selektin, VCAM-1	↑izražanje, nesignifikantno	1997	59
	IgM Mab β2GPI TM1G2 in EY1C8 b2GPI							