

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA TRČEK

**MIKROVEZIKLI KOT POKAZATELJI VNETNEGA IN
KOAGULANTNEGA ODZIVA ČLOVEŠKIH
ENDOTELIJSKIH CELIC KORONARNIH ARTERIJ NA
SERUMSKI AMILOID A**

**MICROVESICLES AS INFLAMMATORY AND
COAGULANT MARKERS OF HUMAN CORONARY
ARTERY ENDOTHELIAL CELLS FOLLOWING THEIR
STIMULATION WITH SERUM AMYLOID A**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij Farmacije

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl in delovnim vodstvom dr. Mojce Frank. Analize na pretočnem citometru smo opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v sodelovanju s prof. dr. Alojzom Ihanom in asist. dr. Andrejo Natašo Kopitar.

Za strokovno pomoč in prijazno svetovanje pri izdelavi in pisanju diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču in somentorici doc. dr. Snežni Sodin-Šemrl. Posebna in iskrena zahvala delovni mentorici dr. Mojci Frank, ki me je usmerjala pri raziskovalnem delu in pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Katji Lakota in ostalim zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma za pomoč pri eksperimentalnem delu.

Hvala tudi Andreju ter mami, atiju, Maji in Janezu za vašo podporo v času študija in izdelave diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl in delovnim vodstvom dr. Mojce Frank.

Janja Trček

izr. prof. dr. Marija Bogataj, predsednica komisije

doc. dr. Mitja Kos, član komisije

VSEBINA

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1 Ateroskleroza	4
1.1.1 Začetek aterogeneze – endotelijska disfunkcija	5
1.1.2 Nadaljevanje aterogeneze (na primeru oksidirane LDL)	7
1.2 Vloga vnetja pri aterosklerozi	7
1.2.1 Interlevkin-6	8
1.2.2 Interlevkin-8	9
1.2.3 Interlevkin-1	9
1.2.4 Serumski amiloid A	10
1.3 Tromboza – zaplet na aterosklerotični lehi – ter proces koagulacije	11
1.3.1 Koagulacija	12
1.3.2 Tkivni faktor	13
1.4 Mikrovezikli	14
1.4.1 Nastanek, sestava in analiza mikroveziklov	14
1.4.2 Vloga mikroveziklov	16
1.5 Mikrovezikli in ateroskleroza	17
1.5.1 Endotelijski mikrovezikli	17
2 NAMEN DELA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL	20
3.1.2 ANALIZNI KOMPLETI	21
3.1.3 REAGENTI	23
3.1.4 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL	24
3.2 METODE	26
3.2.1 METODOLOŠKI PRISTOP	27

3.2.2	CELIČNA KULTURA	29
3.2.3	IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV	31
3.2.4	ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM.....	33
3.2.5	ENCIMSKOIMUNSKI TEST.....	35
3.2.6	ANALIZA RNA	36
3.2.7	DOLOČANJE AKTIVNOSTI TKIVNEGA FAKTORJA	39
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	41
4.1	Merjenje vnetnih parametrov in števila mikroveziklov po stimulaciji HCAEC z IL-1 β .	42
4.2	Mikrovezikli kot pokazatelji vnetnega odziva celic	44
4.2.1	Vnetni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA	45
4.2.2	Mikrovezikli kot pokazatelji vnetnega odziva HCAEC	47
4.2.3	Površinski označevalci endotelijskih mikroveziklov	49
4.3	Mikrovezikli kot pokazatelji koagulantnega odziva celic.....	54
4.3.1	Koagulantni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA	55
4.3.2	Mikrovezikli kot pokazatelji koagulantnega odziva HCAEC	56
4.4	Vpliv protiteles proti SAA na mikrovezikulacijo.....	58
5	SKLEP.....	60
	LITERATURA	61

POVZETEK

Ateroskleroza je vnetna bolezen arterij, ki predstavlja vodilni vzrok za razvoj številnih srčno-žilnih bolezni. Akutno-fazni protein serumski amiloid A (SAA) je napovedni dejavnik akutnih srčno-žilnih dogodkov, povečane vrednosti SAA pa so značilne za bolnike z aterosklerozo in so povezane z disfunkcijo endotelija. Endotelijski mikrovezikli so pokazatelji endotelijske disfunkcije pri srčno-žilnih boleznih in se kopičijo v aterosklerotičnih lezah. Naš namen je bil raziskati, kako SAA vpliva na izločanje mikroveziklov v endotelijskih celicah. Ker je za mikrovezikle znano, da sodelujejo pri vnetju in koagulaciji, nas je zanimalo, ali so endotelijski mikrovezikli pokazatelji vnetne in koagulantne aktivnosti endotelijskih celic po stimulaciji s SAA. Koncentracija protiteles proti SAA v serumu je znižana pri arterijski trombozi in nekaterih avtoimunskih boleznih s pospešeno aterosklerozo, zato smo raziskali tudi vpliv protiteles proti SAA na izločanje mikroveziklov.

Človeške endotelijske celice koronarnih arterij smo stimulirali s človeškim rekombinantnim SAA in po različnih časih stimulacije izolirali mikrovezikle z metodo diferencialnega centrifugiranja. S pretočno citometrijo smo določili število mikroveziklov, vezavo aneksina A5 in prisotnost CD31, CD62E in tkivnega faktorja na mikroveziklih. Vzporedno smo določili vnetno aktivnost celic z določanjem interlevkina-6 in interlevkina-8 ter koagulantno aktivnost celic z določanjem izražanja in aktivnosti tkivnega faktorja.

Rezultati so pokazali, da stimulacija endotelijskih celic s SAA povzroči izločanje mikroveziklov. Število mikroveziklov je naraščalo s časom stimulacije celic in se je povečevalo vzporedno s količino interlevkina-6 in interlevkina-8. Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, CD31 in CD62E, ki so zvišani v različnih srčno-žilnih boleznih, kot je na primer koronarna arterijska bolezen, je naraščalo s časom stimulacije endotelijskih celic s SAA. SAA je sprožil tudi izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih. Izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih je bilo največje po 4 urah stimulacije in je sledilo izražanju in aktivnosti tkivnega faktorja na endotelijskih celicah.

Pokazali smo, da SAA sproži mikrovezikulacijo endotelijskih celic, ki sledi vnetni in koagulantni aktivnosti celic. Protitelesa proti SAA so močno zmanjšala izločanje mikroveziklov tako po 4 kot po 24 urah stimulacije endotelijskih celic s SAA. Endotelijski mikrovezikli so tako lahko pokazatelji in/ali sodejavniki pri endotelijski disfunkciji, ki jo povzroči SAA.

ABSTRACT

Atherosclerosis is an inflammatory arterial disease, which is the leading cause of several cardiovascular diseases. Elevated serum amyloid A (SAA), a positive acute-phase reactant, predicts future acute cardiovascular events and is associated with increased progression of atherosclerosis and endothelial dysfunction. Endothelial microvesicles are biomarkers of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases and accumulate in atherosclerotic lesions. The aim of our study was to investigate the influence of SAA on microvesicle release in endothelial cells. Because microvesicles are known to participate in inflammation and coagulation, we determined, whether endothelial microvesicles could reflect SAA-induced proinflammatory and procoagulant response in endothelial cells. Since serum levels of anti-SAA antibodies are significantly lower in arterial thrombosis and some autoimmune diseases with accelerated atherosclerosis than in healthy blood donors, we investigated the influence of anti-SAA antibodies on endothelial microvesicle release.

Human coronary artery endothelial cells were stimulated with human recombinant SAA and microvesicles were isolated by differential centrifugation following different times of stimulation. Flow cytometry was used to measure endothelial microvesicle number, annexin A5 binding and CD31, CD62E and tissue factor exposure. The inflammatory response was measured using interleukin-6 and interleukin-8 protein levels and the procoagulant response was measured with tissue factor exposure and activity.

We demonstrated that SAA stimulation causes microvesicle release from endothelial cells. A time-dependent rise in microvesicle number correlated with interleukin-6 and interleukin-8 levels. The number of annexin A5, CD31 and CD62E-positive microvesicles (elevated in different cardiovascular diseases, such as coronary artery disease) increased with the time of stimulation. SAA caused tissue factor expression on microvesicles to peak at 4 hours and this increase correlated with tissue factor expression and activity in endothelial cells.

Altogether, we showed that SAA causes microvesiculation that reflects inflammatory and procoagulant responses in endothelial cells. Anti-SAA antibodies decreased SAA-induced microvesicle release following 4 hour and 24 hour stimulation. Endothelial microvesicles may serve as biomarkers and/or mediators of SAA-induced changes of endothelial function.

SEZNAM OKRAJŠAV

APC – alofikocianin (fluorokrom)
CA-PM 0 % FBS – popolno gojišče za HCAEC z 0 % FBS
CA-PM 5 % FBS – popolno gojišče za HCAEC s 5 % FBS
cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina
DNA – deoksiribonukleinska kislina
ELISA – encimsko imunski test na trdnem nosilcu
FBS – plodov serum goveda
FITC – fluorescein izotiocianat (fluorokrom)
HCAEC – humane endotelijske celice koronarnih arterij
HDL – lipoproteini visoke gostote
HUVEC – človeške endotelijske celice popkovne vene
Ig – imunoglobulin
IL-1 β – interlevkin 1 β
IL-6 – interlevkin 6
IL-8 – interlevkin 8
LDL – lipoproteini nizke gostote
PCR – verižna reakcija s polimerazo
PE – fikoeritrin (fluorokrom)
RNA – ribonukleinska kislina
RT – reverzna transkripcija
SAA – serumski amiloid A
TF – tkivni faktor
TNF – dejavnik tumorske nekroze

1 UVOD

Srčno-žilne bolezni so vodilni vzrok smrti v razvitem svetu (1) in predstavljajo 50,2 % vseh smrti bolnikov v Evropi (SZO, 2) ter 39,9 % vseh smrti bolnikov v Sloveniji (Zdravstveni statistični letopis Slovenije, 3). Skupni imenovalec teh nevarnih bolezni je v večini primerov ateroskleroza. Ateroskleroza je napredujoča bolezen arterij, ki zaradi nastanka ateroma v steni arterij običajno privede do zoženja svetline žile, ob pretrganju ateroma pa do nastanka krvnega strdka. Značilne posledice so lahko angina pectoris, srčni infarkt in možganska kap. V zadnjih letih se vedno bolj raziskuje vloga mikroveziklov pri aterosklerozi, saj so študije dokazale zvečano količino mikroveziklov v krvi srčno-žilnih bolnikov in prisotnost mikroveziklov znotraj ateroma (4, 5, 6).

Mikrovezikli so majhni membranski vezikli, ki jih izločajo številne celice, med drugimi tudi endotelijske celice, ob aktivaciji ali apoptozi. Do nedavnega njihova vloga ni bila poznana, v zadnjih nekaj letih pa so odkrili številne funkcije mikroveziklov v patoloških stanjih kot so vnetje, tromboza, kancerogeneza in druga. Endotelijski mikrovezikli postajajo vse pomembnejši sodejavniki pri endotelijski disfunkciji, ki pomeni začetek razvoja ateroskleroze, pri vnetju, ki je osrednji mehanizem aterogeneze, in pri trombozi, ki je lahko vzrok za številne akutne zaplete ateroskleroze (7).

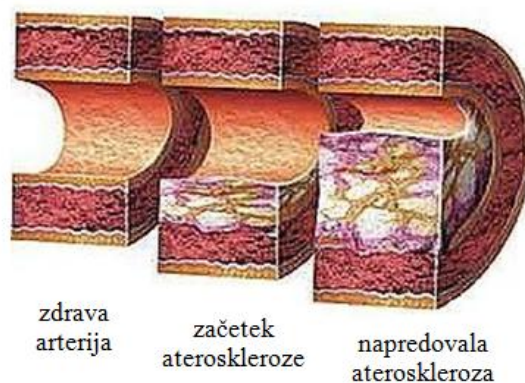
1.1 Ateroskleroza

Izraz ateroskleroza izhaja iz grških besed "athere" (kaša) in "scleros" (trd), z njim pa so želeli opisati kopičenje maščob v otrdelih žilah. Ateroskleroza je kronična napredujoča bolezen arterij in je najbolj razširjena žilna bolezen. Danes aterosklerozo razumemo kot kronično bolezen arterij mišičnega in elastičnega tipa, za katero je značilno napredujoče kopičenje lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi, ter spremljajoče vnetje, ki poleg intime zajame tudi medijo in adventicijo arterijske stene (8, 9).

Ateroskleroza je bolezen, ki se lahko začne že v mladosti, njen potek pa se med posamezniki močno razlikuje. Pri nekaterih se klinična slika nikoli ne izrazi, pri drugih lahko že zelo zgodaj. Klinično se ateroskleroza lahko kaže kronično ali akutno. Kronični

sindromi, kot so na primer stabilna angina pectoris ali intermitentne klavdikacije, so posledica zožitve svetline arterije zaradi ateroma. Velika večina akutnih sindromov pa je posledica nenadne zamašitve arterije zaradi tromboze na mestu okvare arterije ali oddaljene tromboembolije. Akutna zapora arterije lahko vodi v srčni infarkt ali možgansko kap (8).

Značilne patomorfološke spremembe pri aterosklerozi so aterosklerotične lehe ali ateromi (slika 1). Aterosklerotične lehe lahko klasificiramo od tipa I do tipa VI (Ameriško združenje za srce, American Heart Association). Te klasifikacije pa ne smemo razumeti kot linearno napredovanje aterogeneze. Proces nastajanja



aterosklerotične lehe je namreč zelo kompleksen, zgodnje obdobje ateroskleroze je do neke mere tudi reverzibilno (8, 11).

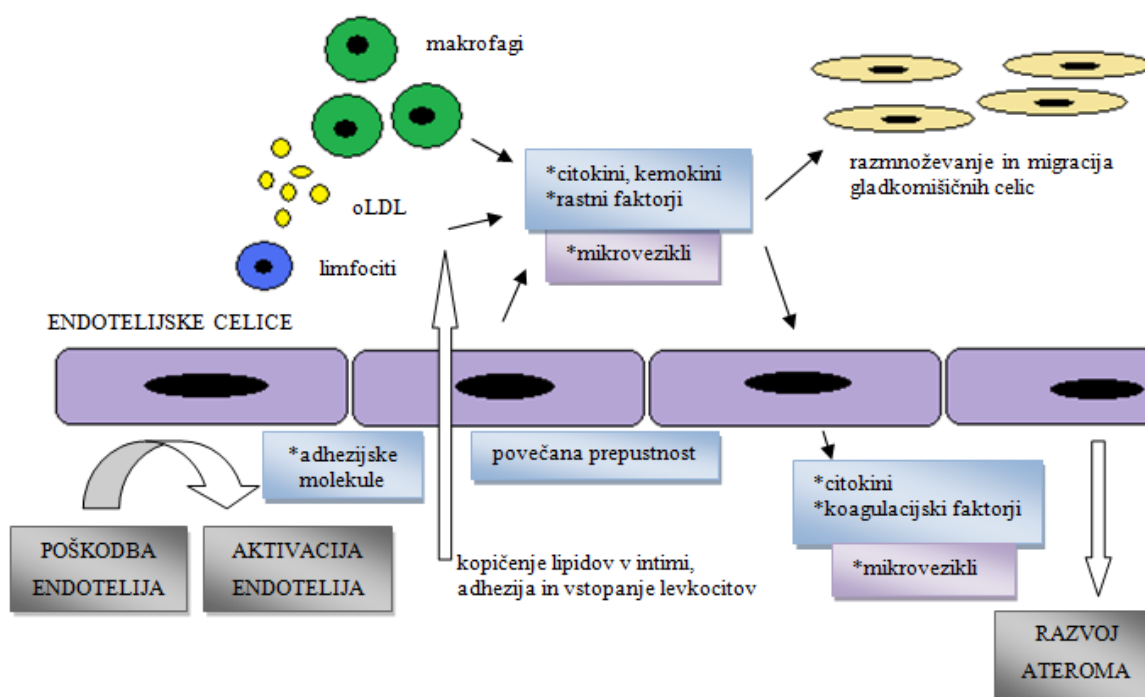
Slika 1: Prikaz razvoja aterosklerotične lehe v steni arterije (10).

1.1.1 Začetek aterogeneze – endotelijska disfunkcija

Endotelij žil ni le fizična meja med krvjo in žilno steno, temveč aktivno sodeluje v fizioloških procesih. Endotelijske celice preko uravnavanja funkcij gladkomišičnih celic medije vzdržujejo ravnovesje med vazodilatacijo in vazokonstrikcijo ter tako uravnavajo žilni tonus (9). Preprečujejo pritrjevanje monocitov in njihov vstop v arterijsko steno. Delujejo antitrombotično, saj preprečujejo agregacijo trombocitov, in izločajo dejavnike, ki vplivajo na strjevanje krvi in fibrinolizo. Uravnavajo tudi izmenjavo snovi med krvjo in medijo žil (8).

Marsikaj v razvoju ateroskleroze še ni popolnoma pojasnjeno, raziskovalci pa se strinjajo, da je začetek aterosklerotičnega procesa povezan z disfunkcijo endotelijskih celic, kar je lahko posledica poškodbe, okužbe ali vnetja. Najverjetneje je vzrok aterogeneze kombinacija teh in drugih dejavnikov. Nadaljevanje aterogeneze je nato odvisno od regeneracijskih procesov na eni in prisotnosti rizičnih dejavnikov na drugi strani (8, 9).

Številni dejavniki lahko privedejo do disfunkcije endotelija. Delimo jih na fizikalne (povišan krvi tlak, turbulentni tok krvi), kemične (ogljikov monoksid, nikotin), presnovne (holesterol) in biološke (bakterije, virusi, kompleksi antigen-protitelo, aktivirani trombociti in levkociti) (9). Poškodovane endotelijske celice ne morejo več opravljati svojih regulatornih funkcij in hkrati niso več učinkovita pregrada med plazmo in subendotelijem (slika 2). Tako lahko začnejo na primer lipoproteini nizke gostote (LDL) prehajati v intimo, kjer lahko poteče oksidativna pretvorba LDL. Oksidativni stres aktivira endotelijske celice, ki začnejo izražati različne adhezijske molekule in kemokine. Ti omogočajo prilepljanje monocitov in limfocitov ter njihovo prehajanje v subendotelni prostor (8, 9).



Slika 2: Proces ateroskleroze. Disfunkcija endotelijskih celic vodi v številne dogodke, ki v končni fazi vodijo v razvoj aterosklerotične lehe. oLDL – oksidirani lipoproteini nizke gostote.

Sprožilni dejavnik disfunkcije endotelija povzroči prvi val izločanja citokinov in sproži vnetno reakcijo v endoteliju žile. Za vzdrževanje vnetja in kronično nastajanje vnetnih citokinov pa so odgovorni različni dejavniki znotraj vnetišča. Eden od teh dejavnikov so lahko mikrovezikli, ki jih izločajo vse celice, ki sodelujejo v nastanku aterosklerotične lehe, tudi endotelijske celice. Mikrovezikli prenašajo številne provnetne in prokoagulantne molekule in predstavljajo komunikacijsko povezavo med vnetjem, trombozo in aterosklerozo. Število mikroveziklov je povečano v krvi bolnikov s koronarno arterijsko boleznijo. Prisotni so tudi znotraj aterosklerotične lehe ter imajo zelo verjetno pomembno vlogo v disfunkciji endotelija (12).

1.1.2 Nadaljevanje aterogeneze (na primeru oksidirane LDL)

Monociti se v intimi diferencirajo v makrofage, ki pospešeno fagocitirajo oksidirane delce LDL. Pri razgradnji oksidiranih delcev LDL nastaja holesterol in se v obliki kapljic kopiči v citosolu makrofagov, ki jih zato imenujemo penaste celice. Gladkomišične celice medije se aktivirajo pod vplivom citokinov in ravnih dejavnikov, ki se izločajo iz makrofagov in endotelijskih celic, ter se začnejo razmnoževati in potovati v intimo. Tudi majhen del gladkomišičnih celic se transformira v penaste celice (8). Penaste celice kasneje v procesu aterogeneze propadajo, kar vodi do nastanka maščobne lehe (8, 9).

Proteini zunajceličnega matriksa (predvsem intersticijski kolagen in proteoglikani), ki jih izločajo gladkomišične celice pod vplivom ravnih dejavnikov, omogočajo nastanek vezivnega pokrova. Maščobna leha se postopoma spremeni v kompleksnejšo leho. Z nadaljevanjem procesa nastane vezivna aterosklerotična leha, v kateri se lahko začnejo kopičiti tudi kalcijeve soli maščobnih kislin, zato postane taka arterijska stena trda in neelastična (8, 9).

Vezivne lehe brez zapletov so škodljive le v manjših arterijah, kjer ovirajo pretok krvi in povzročajo ishemijo tkiva. Vedno pa so zelo nevarni zapleti na lehah, med katerimi je najnevarnejši zaplet tromboza. Nestabilne lehe vsebujejo veliko maščobe in levkocitov, imajo pa tanek vezivni pokrov. Zato se rade pretrgajo, pri čemer pridejo trombociti v stik s tkivnim faktorjem ali subendotelnim kolagenom, kar sproži proces strjevanja krvi s posledičnima trombozo ali tromboembolijo (8, 9).

1.2 Vloga vnetja pri aterosklerozi

Raziskave v zadnjih letih so pokazale, da je vnetje ključni proces v vseh fazah ateroskleroze. Vnetni dejavniki sodelujejo že na začetku ateroskleroze pri poškodbi endotelijske celice, pri stopnjevanju razvoja aterosklerotične lehe in tudi pri trombotičnih zapletih ateroskleroze (12, 13).

Akutna reakcija vnetja se začne z lokalnim odzivom tkiva na poškodbo. Vnetje je zaščitni odziv organizma, katerega namen je povrniti strukturo in funkcijo tkiva. Kadar škodljivega dejavnika ne moremo dokončno odstraniti in se mu kontinuitetno pridružujejo še drugi škodljivi dejavniki, se akutno vnetje lahko spremeni v kronično (8, 14). Tudi v primeru

ateroskleroze poškodba endotelija lahko vodi v kronično vnetje, ki še pospešuje napredovanje bolezni.

Vsi vnetni pojavi so odvisni od sproščanja vnetnih mediatorjev. To so molekule, ki so lahko prisotne v plazmi v neaktivni obliki, so lahko shranjene v sekretornih zrnih različnih celic ali pa se sintetizirajo v aktiviranih celicah (8). Elemente vnetja, ki jih posredujejo prav vnetni mediatorji, opazimo v vseh fazah ateroskleroze. V stanju vnetja endotelijske celice začnejo izražati žilno-celične adhezijske molekule (VCAM-1) in znotrajcelične adhezijske molekule (ICAM-1), ki omogočajo pritrjevanje levkocitov. Provnetni citokini (interlevkin-1, interlevkin-6) in kemokini (interlevkin-8), ki se sproščajo iz endotelija, povzročijo infiltracijo levkocitov v intimo. Vnetni mediatorji spodbujajo fagocitozo lipoproteinskih delcev in hitrejšo delitev makrofagov. Kasneje v razvoju ateroma se makrofagom pridružijo še limfociti T, ki skupaj z endotelijskimi celicami izločajo dodatne citokine in rastne faktorje, ki spodbujajo prehajanje gladkomišičnih celic v intimo in njihovo hitrejšo delitev. Vnetni mediatorji povečajo ekspresijo zunaj-celičnih encimov, ki razgrajujejo vezivni pokrov v tanjšo plast, in tako lahko nastane nestabilna aterosklerotična leha. Vnetni mediatorji so odgovorni tudi za povečano izražanje tkivnega faktorja znotraj ateroma, ki pri pretrganju aterosklerotične lehe pride v stik s krvjo in lahko povzroči nastanek krvnega strdka (13).

1.2.1 Interlevkin-6

Interlevkin-6 (IL-6) je 184 aminokislin dolg glikoprotein, ki ga izločajo različni celični tipi v odgovor na vnetne molekule, kot sta dejavnik tumorske nekroze (TNF) in interlevkin-1 (IL-1). Receptor za IL-6 spada v skupino citokinskih receptorjev tipa I. Počivajoče celice ne izražajo receptorja za IL-6, ampak se ta izpostavi na površini šele, ko se celica aktivira. Ob vezavi IL-6 z njegovim receptorjem, se aktivirajo tirozinove kinaze, ki prenesejo signale v notranjost celice (15, 16).

IL-6 izločajo predvsem aktivirani makrofagi, endotelijske celice in limfociti T. Je izrazit pleiotropni citokin, kar pomeni, da ima v različnih celicah različne učinke. Je eden pglavitnih mediatorjev reakcije akutne faze (skupaj s TNF in IL-1) in sproži sintezo beljakovin akutne faze v jetrnih celicah. Aktivira limfocite B in skupaj z rastnimi faktorji pospešuje razvoj nevtrofilcev iz predhodnikov v kostnem mozgu (15, 16). Med mnogimi

provnetnimi učinki IL-6 so tudi nekateri protivnetni učinki, na primer sproženje sinteze antagonista receptorja za interleukin-1 (IL-1RA) (12).

IL-6 je multifunkcionalen citokin, ki ni vpleten le v imunski odziv, ampak tudi v vnetje, hematopoezo, presnovo kosti in uravnavanje delovanja živčnega sistema. Znana je njegova vloga v avtoimunskih in vnetnih boleznih. IL-6 je dobro znan dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni, povezane z debelostjo, sladkorno boleznijo tipa II in miokardnim infarktom (17). Količina IL-6 je tudi samostojen pokazatelj subkliničnih aterosklerotičnih lezij in napovedni dejavnik za ishemične dogodke (17).

1.2.2 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) je najboljše opredeljen citokin iz skupine kemokinov. Kemokini so molekule, ki privlačijo levkocite ter sprožijo in uravnavajo prehajanje levkocitov iz krvi v tkivo. IL-8 izzove močne odgovore preko svojega receptorja, ki ga najdemo med drugim tudi na nevtrofilcih in makrofagih (15, 16). IL-8 izdelujejo monociti, limfociti, granulociti in endotelijske celice. Je močno kemotaktičen in povzroča vdor predvsem nevtrofilcev, monocitov in limfocitov v vnetišče. IL-8 aktivira celice, sproži respirativni izbruh v nevtrofilcih ter sproščanje histamina in levkotrienov iz bazofilcev. Je tudi angiogeni dejavnik in prispeva k povečani ožiljenosti nekaterih tumorjev (15).

Količine IL-8 v telesnih tekočinah so povečane v različnih vnetnih stanjih in so povezane tudi z aterosklerozo. Makrofagi v aterosklerotični leziji izražajo receptor za IL-8, kar se je izkazalo kot proaterogeno v živalskih modelih. Povečane vrednosti IL-8 so povezane s povečanim tveganjem za koronarno arterijsko bolezen (17).

1.2.3 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) je protein z molekularno maso 17000 in je ključni vnetni citokin. Poznamo dve obliki proteina, IL-1 α in IL-1 β . Večina v krvi prisotnega proteina predstavlja IL-1 β . Izloča se v obliki pro-proteina (predhodnika proteina), ki ga encim kaspaza-1 proteolitično pretvori v aktivno obliko. Obe obliki se vežeta na iste receptorje in posredujeta podobne učinke. Določena sta bila dva receptorja za IL-1, ki spadata v imunoglobulinsko superdružino. Receptorji tipa I so izraženi na skoraj vseh celicah in so glavni receptorji, ki posredujejo učinke IL-1. Receptorji tipa II se izražajo le ob indukciji in

ne posredujejo učinkov IL-1. Najverjetneje tekmujejo z receptorji tipa I za vezavo IL-1 in delujejo kot kompetitivni zaviralci učinkov IL-1. Telo še na drug način nadzoruje učinke IL-1. Makrofagi proizvajajo naravni kompetitivni inhibitor IL-1 in sicer IL-1RA (receptorski antagonist IL-1). Ta se veže na receptorje za IL-1, vendar ne posreduje učinkov (15, 16, 18).

IL-1 izločajo predvsem makrofagi in endotelijske celice ter tudi monociti in nevtrofilci. Njegova glavna naloga je uravnavanje vnetnega odziva. Biološki učinki so odvisni od količine IL-1. V manjših koncentracijah deluje kot mediator lokalnega vnetja. Sproži izražanje adhezijskih molekul, pospešuje sintezo kemokinov in citokinov v endotelijskih celicah in makrofagih ter tudi sam deluje kemotaktično. Številni naštetni učinki IL-1 β prispevajo k razvoju in napredovanju ateroskleroze (8, 16, 18). Študije so pokazale, da IL-1 sproži tudi nastanek mikroveziklov v različnih celicah, med drugim tudi v endotelijskih celicah (19). Kadar se izloča v velikih količinah, IL-1 vstopi v krvnožilni sistem in posreduje endokrine učinke. Sistemski učinki so vročina, sinteza beljakovin akutne faze v jetrnih celicah in kaheksija (16).

1.2.4 Serumski amiloid A

Lokalno vnetno reakcijo spremlja tudi sistemski odziv organizma ali reakcija akutne faze vnetja. Ta se med drugim kaže s sproščanjem akutno-faznih proteinov iz jeter. Med njimi so na primer beljakovine sistema komplementa, prenašalne beljakovine za kovinske ione (haptoglobin, ceruloplazmin), zaviralci proteaz (α_1 -antitripsin) in koagulacijske beljakovine (fibrinogen). Med poglavitne beljakovine akutne faze pa spadata C-reaktivni protein in serumski amiloid A (SAA) (8, 14).

Z izrazom serumski amiloid A imenujemo družino majhnih apolipoproteinov, ki se po krvi prenašajo večinoma vezani na lipoproteine visoke gostote (HDL). Družina genov za SAA se nahaja na kromosomu 11 in je sestavljena iz 4 genov. SAA1 in SAA2 se inducibilno izražata v akutni fazi vnetja, SAA3 je psevdogen, SAA4 pa se izraža konstitutivno. V akutni fazi vnetja se nastajanje SAA1/2 tudi do 1000-krat poveča in v krvi lahko doseže koncentracijo 1 mg/ml. Med najmočnejše aktivatorje nastajanja SAA spadajo TNF, IL-1 in IL-6. Velika večina SAA1/2 se sintetizira v jetrih, obstajajo pa tudi ekstrahepatični viri humanih SAA1/2 in SAA4. Med drugim so informacijsko RNA za SAA našli v vseh pomembnejših celicah, ki sodelujejo v razvoju ateroskleroze (8, 20–23).

Povečane vrednosti SAA v krvi so v številnih študijah povezali s srčno-žilnimi boleznimi in aterosklerozo. Zvečane vrednosti SAA so dokazali pri nestabilni angini pectoris (24). Pri akutnem koronarnem sindromu SAA zasleduje bolezensko stanje (25) in napoveduje umrljivost. SAA je neodvisni napovedni dejavnik smrtnosti po miokardnem infarktu (26). Vrednosti SAA so povezane z angiografsko sliko koronarne arterijske bolezni ter s 3-letnim tveganjem srčno-žilnih dogodkov (27). Vrednosti SAA so zvečane tudi pri stanjih s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni, na primer pri debelosti, odpornosti na inzulin, metaboličnem sindromu, sladkorni bolezni in revmatoidnem artritisu (22).

S študijami je dokazano, da je SAA neposredno vpleten v razvoj ateroskleroze (22). Med aterogene učinke SAA spada na primer stimulacija nastajanja citokinov in kemokinov ter kemotaktično delovanje na krvne in imunske celice kot so monociti in limfociti T, kar lahko prispeva k infiltraciji levkocitov v arterijsko steno. SAA lahko tudi sproži izražanje proteinaz, na primer kolagenaz in matriksnih metaloproteinaz. Ti encimi razgrajujejo zunajcelični matriks, kar lahko prispeva k nestabilnosti aterosklerotične lehe in pretrganju ateroma. Poleg tega pa domnevajo, da ima lahko SAA zaradi vezave na lipoproteine pomembno vlogo pri prenosu holesterola in bi lahko vplival na povečan prenos lipidov in holesterola v celice arterijske stene (22). SAA poveča tudi izražanje tkivnega faktorja, ki je močan aktivator strjevanja krvi in lahko prispeva k trombotičnim zapletom ateroskleroze (24).

Študije torej nakazujejo, da je SAA pomemben sodejavniki ateroskleroze, saj neposredno vpliva na proces aterogeneze, in hkrati tudi pokazatelj ateroskleroze, saj so povečane vrednosti SAA povezane z različnimi srčno-žilnimi boleznimi (22).

1.3 Tromboza – zaplet na aterosklerotični lehi – ter proces koagulacije

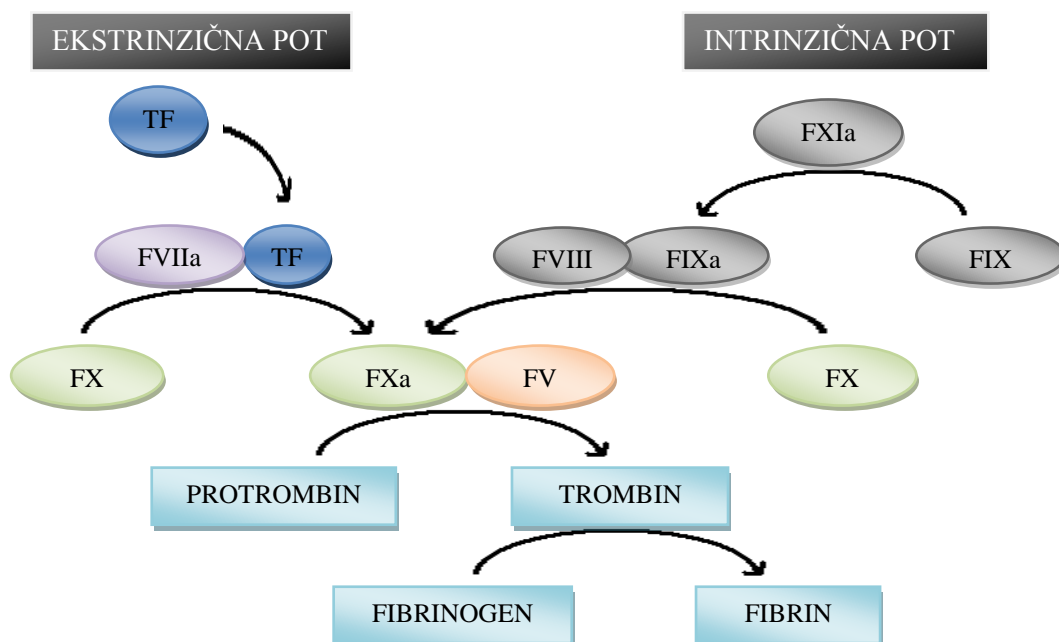
Raziskovanje mehanizmov ateroskleroze v zadnjih letih je vodilo do spoznanja, da glavne nevarnosti ateroskleroze ne predstavlja napredujoče zoženje svetline arterije, ampak zapleti na nestabilnih aterosklerotičnih lehah. Nenadno pretrganje ali erozija aterosklerotične lehe vodita v aktivacijo trombocitov in koagulacijske kaskade, kar privede do nastanka krvnega strdka. Aterotromboza je zaplet ob pretrganju aterosklerotične lehe, ki je lahko vzrok za

srčni infarkt ali možgansko kap. Prav tromboze in embolizacije so vzrok večine akutnih zapletov ateroskeroze, ki se lahko končajo tudi s smrtjo (28).

Aterosklerotične lehe so po strukturi zelo heterogene. Najbolj nevarne so nestabilne lehe, ki imajo velike maščobne vložke ali kalcinacije, tanek vezivni pokrov, malo gladkomišičnih celic ter vsebujejo večje število vnetnih celic. Aktivirane celice izločajo proteolitične encime, ki razgrajujejo vezivno ogrodje aterosklerotične lehe. Posledično postane taka aterosklerotična leha zelo občutljiva za poškodbe ali erozijo. Ob stiku trombocitov in koagulacijskih faktorjev iz krvi s subendotelnim kolagenom ali tkivnim faktorjem se sproži proces nastajanja krvnega strdka (8, 9, 14, 24).

1.3.1 Koagulacija

Koagulacija krvi je proces nastajanja krvnega strdka, v katerem sodelujejo številni koagulacijski faktorji. Obstajata dve glavni poti koagulacije (slika 3). Pri intrinzični poti je za začetek koagulacijske kaskade potreben stik s kolagenom. Bolj pomembna v *in vivo* sistemih pa je ekstrinzična pot koagulacije, ki jo sproži tkivni faktor (TF). Po poškodbi žilne stene tkivni faktor veže faktor VII (FVII), ki je prisoten v krvi. Ob prisotnosti kalcijevih ionov se FVII aktivira v FVIIa. Komplex TF-FVIIa aktivira faktorja IX in X. FXa vodi v aktivacijo protrombina v trombin, ki pretvori fibrinogen v fibrin, ta pa tvori fibrinsko mrežo, v katero se ujamejo še krvne celice (8, 14).



Slika 3: Shema koagulacijske kaskade. Ekstrinzična pot koagulacije, ki jo aktivira tkivni faktor, je najpomembnejši način strjevanja krvi *in vivo*.

Omenjeni koagulacijski faktorji aktivirajo še druge proteine, med katerimi so tudi taki, ki omejujejo koagulacijo na mesto poškodbe. Pri koagulaciji sodelujejo tudi nabiti fosfolipidi (fosfatidilserin), ki delujejo kot katalitična površina za aktivacijo koagulacijskih faktorjev. To negativno nabito površino omogočajo aktivirani trombociti in tudi mikrovezikli. Pomembno vlogo v nadzoru koagulacije ima tudi endotelij. Endotelijske celice izločajo dejavnike, ki pospešujejo (tkivni faktor, von Willebrandov faktor) ali omejujejo (prostaciklin, antitrombin III, aktivacija proteina C) koagulacijo. Sintetizirajo tudi tkivni aktivator plazminogena (tPA), ki aktivira fibrinolizo, in inhibitor aktivatorja plazminogena (PAI), ki omejuje fibrinolizo (14). Nedavne študije so pokazale tudi izražanje tkivnega faktorja v endotelijskih celicah (24).

1.3.2 Tkivni faktor

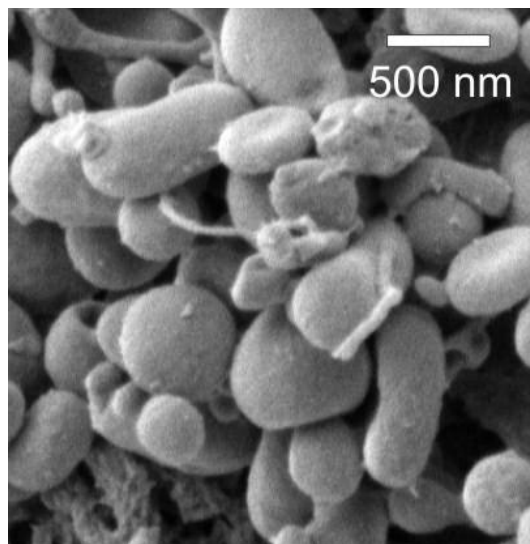
Tkivni faktor (TF), imenovan tudi CD142, je transmembranski glikoprotein z molekulsko maso 47000 in je najpomembnejši aktivator koagulacije po ekstrinzični poti *in vivo*. Bistvena vloga tkivnega faktorja v krvni koagulaciji je široko priznana, saj zaviranje tkivnega faktorja v različnih modelih zmanjša nastajanje krvnega strdka. Vendar pa so v različnih okoliščinah lahko vpletene različne oblike in viri tkivnega faktorja (29). Do nedavnega je veljalo, da se tkivni faktor izraža samo v subendoteliju in pride v stik s krvjo šele ob poškodbi žilne stene (30). Nedo dolgo nazaj pa so odkrili, da tkivni faktor v majhnih količinah kroži tudi v krvnem obtoku. Najpomembnejši vir krvnega tkivnega faktorja so celični mikrovezikli (30). Študije na živalskih modelih nakazujejo pomembno vlogo mikroveziklov, ki na svoji površini izražajo tkivni faktor, pri nastanku krvnega strdka, kar potrjujejo tudi *in vitro* študije (31).

Tkivni faktor se v zdravih žilah izraža v zelo majhnih količinah, v vseh fazah ateroskleroze pa je njegovo izražanje povečano (24). Poročali so o prisotnosti tkivnega faktorja v celicah in izvenceličnem prostoru znotraj aterosklerotične lehe, kjer je lahko prisoten tudi na mikroveziklih (31, 32, 33). *In vitro* študije so pokazale, da nekateri dejavniki tveganja za akutne koronarne dogodke sprožijo nastajanje tkivnega faktorja v različnih celičnih tipih. Ti dejavniki so na primer oksidirani LDL, TNF- α , C-reaktivni protein in SAA. Vnetni dejavniki aktivirajo tudi endotelijske celice, ki začnejo izražati tkivni faktor. Pokazana je bila tudi že povečana ekspresija tkivnega faktorja v človeških endotelijskih celicah koronarnih arterij (HCAEC) *in vitro* po stimulaciji s SAA (24).

1.4 Mikrovezikli

Prva omemba mikroveziklov sega v leto 1967, ko je Wolf v plazmi opisal prisotnost delcev, ki izvirajo iz trombocitov. Analiza je pokazala, da gre za majhne membranske vezikle. V tistem času so verjeli, da so ti vezikli le ostanek ali stranski produkt aktivacije trombocitov (tako imenovani »celični prah«). Nadaljnje študije pa so odkrile, da imajo že sami mikrovezikli, tako kot celica, iz katere izvirajo, prokoagulantno aktivnost in torej niso inertni. Kasneje so ugotovili, da tudi številne druge celice izločajo mikrovezikle, na primer celice imunskega sistema, endotelijske, epiteljske in tudi tumorske celice. Razširjenost mikroveziklov je nakazovala veliko bolj splošno vlogo teh delcev v celični regulaciji (31).

Mikrovezikli so heterogena populacija majhnih s fosfolipidno membrano obdanih veziklov s premerom 0,1 – 1 μm (slika 4) in predstavljajo subcelične strukture za celično signaliziranje in medcelično komunikacijo med vnetjem. Sproščajo jih številne celice med aktivacijo ali apoptozo, vendar se glede na celico, iz katere izvirajo, mikrovezikli razlikujejo po velikosti, biokemijski sestavi in bioloških učinkih. Pomembna značilnost mikroveziklov je tudi to, da na svoji površini vedno izražajo antigene, značilne za materinsko celico (34, 36, 37).



Slika 4: Mikrovezikli, slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom (35). Mikrovezikli so bili izolirani iz periferne krvi zdravih prostovoljcev.

1.4.1 Nastanek, sestava in analiza mikroveziklov

Celice sprostitjo mikrovezikle med aktivacijo ali apoptozo, vendar do danes natančen mehanizem mikrovezikulacije še ni raziskan. Med celično aktivacijo porastu znotrajceličnega kalcija sledi reorganizacija citoskeleta in preureditev membranskih lipidov. Pri tem se na površini membrane izpostavi fosfatidilserin in izoblikujejo se brsti, ki vodijo v nastanek mikroveziklov. Mikrovezikli v času nastajanja v svojo membrano vgradijo površinske proteine celice in zajamejo del njene vsebine. O mikrovezikulaciji med apoptozo še ni veliko znanega, verjetno pa mikrovezikli nastajajo v fazi nagubanja celične

membrane. Zaradi razlik v mehanizmu mikrovezikulacije med aktivacijo in apoptozo se mikrovezikli, nastali po eni ali drugi poti, med seboj razlikujejo v velikosti in biokemijski sestavi (4, 5).

Mikrovezikli imajo značilne lastnosti, zaradi katerih se ločijo od ostalih vezikularnih struktur, ki jih proizvajajo celice. Apoptotska telesca se za razliko od mikroveziklov, ki se sproščajo zgodaj v apoptozi, tvorijo v zadnjih fazah apoptoze. Razlikujejo se tudi po velikosti, saj so veliko večja od mikroveziklov ($> 1.5 \mu\text{m}$). Celice lahko spontano ali v času aktivacije tvorijo še eno vrsto veziklov in sicer eksosome. Tudi ti se razlikujejo od mikroveziklov. Eksosomi se skladiščijo znotrajcelično in so veliko manjši od mikroveziklov (50 – 90 nm). V zunajcelični prostor se izločajo z eksocitozo multivezikularnih telesc. Še ena pomembna razlika je v sestavi proteinov, saj eksosomi in mikrovezikli izražajo različne celične membranske antigene (4, 34, 38).

Sestava mikroveziklov je odvisna od materinske celice, mehanizma nastanka mikroveziklov in dejavnika, ki sproži mikrovezikulacijo. Membrana mikroveziklov izvira iz celične membrane in je večidel sestavljena iz lipidov in proteinov. Med predstavniki lipidov je tudi fosfatidilserin, ki se običajno nahaja na notranji strani membrane celic. Pri nastajanju mikroveziklov se asimetrija membrane spremeni in fosfatidilserin se izpostavi na zunanji površini mikroveziklov. To lastnost mikroveziklov izkoriščamo za označevanje mikroveziklov z vezavo aneksina A5. Med proteini v membrani mikroveziklov so nekateri taki, ki so značilni za membrano materinske celice. Na podlagi teh proteinov lahko določimo, iz katere celice mikrovezikli izvirajo. Na primer proteina CD31 in CD62E sta značilna za mikrovezike iz endotelijskih celic. Sestava proteinov v membrani mikroveziklov pa je odvisna tudi od načina stimulacije in stopnje aktivacije celice (34).

Površina mikroveziklov je že dobro raziskana, kar pa v manjši meri velja za njihovo notranjost. Posamezne raziskave so pokazale, da različni mikrovezikli na primer vsebujejo različne proteine (IL-1 β), histone, DNA, informacijsko RNA ali mikro RNA (39). Tudi notranje molekule mikroveziklov lahko pomembno prispevajo k njihovemu biološkemu učinku, kar je v zadnjem času predmet številnih raziskav (34).

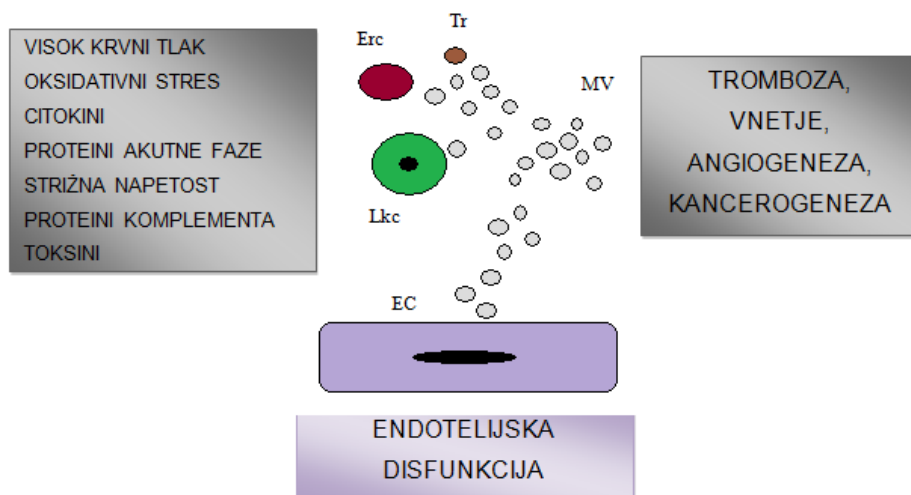
Z metodo diferencialnega centrifugiranja lahko izoliramo mikrovezikle in jih ločimo od celic in topnih makromolekul. Pomemben vpliv na učinkovitost izolacije mikroveziklov imajo parametri izolacije kot sta temperatura in hitrost centrifugiranja, pri izolaciji iz krvi pa med drugim tudi vrsta in koncentracija antikoagulantov. Za identifikacijo in določanje števila izoliranih mikroveziklov se najpogosteje uporabljata pretočna citometrija ali vezava

mikroveziklov na mikrotitrsko ploščo. Obe metodi temeljita na uporabi označenih protiteles proti površinskim antigenom na mikroveziklih in vezavi aneksina A5 na fosfatidilserin na površini mikroveziklov. Na končni rezultat pomembno vplivajo priprava in shranjevanje vzorca, način in parametri izolacije ter metoda, uporabljena za določanje mikroveziklov. Na mednarodni ravni že poteka postopek standardizacije analize mikroveziklov (Consortium for MV standardization), katerega član je tudi Klinični oddelek za revmatologijo, UKC Ljubljana. S tem bo omogočena lažja medsebojna primerjava rezultatov analiz mikroveziklov in v prihodnosti tudi uporaba mikroveziklov v diagnostične in terapevtske namene (4, 5, 34, 40).

1.4.2 Vloga mikroveziklov

V zadnjem desetletju je postalo jasno, da so mikrovezikli veliko več kot le »celični prah«. Danes jim pripisujejo vlogo prenašalcev medcelične komunikacije, ki uravnavajo celične procese, ključne v patogenezi različnih bolezni. Mikrovezikli vplivajo na tarčne celice na različne načine in pri tem pospešujejo medcelične interakcije ter sprožijo celično signaliziranje. Ker so majhni, lahko prosto krožijo po krvnožilnem sistemu in sodelujejo tako pri lokalnem kot tudi sistemskem signaliziranju. Mikrovezikli lahko prenašajo signale preko stika liganda na površini mikroveziklov z receptorjem na površini celic. Lahko se tudi zlijejo z membrano tarčne celice in tako predstavljajo povsem nov način prenosa membranskih receptorjev na tarčno celico. Mikrovezikli lahko izmenjujejo membranske in citoplazemske proteine ter tudi genetsko informacijo v obliki DNA oziroma RNA med celicami (5, 34, 38).

Mikrovezikli so prisotni v krvi v normalnih fizioloških pogojih, njihovo število pa se pomembno zveča pri različnih boleznih, kot so srčno-žilne, vnetne in avtoimunske bolezni, okužbe ter rak. Sodelujejo pri vnetju, hemostazi, trombozi, kancerogenezi, angiogenezi in disfunkciji endotelija (slika 5) (5, 38), ki so ključni patogenetski procesi pri teh boleznih. Mikrovezikle so najprej opazili kot produkt trombocitov, zato je velik del raziskav usmerjenih v njihovo vlogo pri hemostazi in trombozi ter posledično aterosklerozi. Kljub temu pa že obstaja veliko raziskav, ki proučujejo vpliv mikroveziklov na primer pri napredovanju raka, multipli sklerozi, revmatoidnem artritisu, hipertenziji, debelosti in celo okužbah z virusom HIV (5, 41, 42).



Slika 5: Vloga mikroveziklov – mikrovezikli so hkrati lahko vzrok in posledica endotelijske disfunkcije. Različni stresorji povzročijo izločanje mikroveziklov iz krvnih in endotelijskih celic. Sproščeni mikrovezikli sodelujejo pri številnih procesih. MV – mikrovezikli, EC – endotelijske celice, Tr – trombociti, Erc – eritrociti, Lkc – levkociti.

1.5 Mikrovezikli in ateroskleroza

In vitro ter *in vivo* poskusi so pokazali povezavo med mikrovezikli in aterosklerozo. Mikrovezikli v krvi izvirajo iz trombocitov, levkocitov, eritrocitov in endotelijskih celic, njihovo število pa je povečano pri bolnikih s srčno-žilnimi boleznimi, na primer pri koronarni arterijski bolezni (5, 6). Povečano število mikroveziklov v krvi je značilno tudi za posameznike z dejavniki tveganja za srčno-žilne dogodke kot so hipertenzija, debelost in povečane vrednosti holesterola (4). Poleg tega marsikatere srčno-žilne učinkovine zmanjšajo število mikroveziklov, na primer fluvastatin zmanjša število endotelijskih mikroveziklov (4).

Mikrovezikli se kopičijo v aterosklerotičnih lehah (6). Številne študije so že pokazale vpletenost mikroveziklov v vnetje, koagulacijo in uravnavanje žilnega tonusa. Zato se vedno bolj proučuje vloga mikroveziklov v razvoju ateroskleroze in njenih zapletov kot tudi možna napovedna vrednost mikroveziklov pri spremljanju srčno-žilnih dogodkov (6).

1.5.1 Endotelijski mikrovezikli

Mikrovezikle, ki jih izločajo aktivirane ali apoptotske endotelijske celice, imenujemo endotelijski mikrovezikli. Njihovo število je povečano pri različnih žilnih boleznih, zato jih različni avtorji omenjajo kot pokazatelje endotelijske disfunkcije (6). Endotelijski

mikrovezikli so prisotni tudi v krvi bolnikov s koronarno arterijsko boleznijo in trombotičnimi zapleti (43).

Mikrovezikle lahko določamo na podlagi več parametrov. Glede na velikost so to delci premera 0,1 – 1 μm . Poleg tega jih bolj specifično definiramo z vezavo aneksina A5 na fosfatidilserin na njihovi površini. Celični izvor mikroveziklov določimo z vezavo specifičnih monoklonskih protiteles proti površinskim proteinom materinske celice, ki so prisotni na mikroveziklih. V primeru endotelijskih mikroveziklov sta to trombocitna-endotelijska adhezijska molekula-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, CD31) in selektin E (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1, CD62E), uporabljajo pa se lahko še nekatere druge endotelijske molekule.

Aneksin A5, imenovan tudi aneksin V, je celični protein iz skupine aneksinov. Skupna lastnost aneksinov je, da se v prisotnosti kalcijevih ionov vežejo na negativne površine fosfolipidov. Vezava aneksina A5 na fosfatidilserin prepreči stik koagulacijskih faktorjev s površino fosfatidilserina in zato deluje antikoagulantno. Njegova lastnost, da v prisotnosti kalcijevih ionov veže fosfatidilserin, pa se uporablja tudi v laboratorijski analitiki. Z označenim aneksinom A5 lahko na primer določimo apoptotske celice in tudi mikrovezikle, ki na zunanji strani svoje membrane prenašajo fosfatidilserin (44).

Adhezijska molekula CD31 je glikoprotein z molekulsko maso 130000, ki se izraža na trombocitih, monocitih, granulocitih in v velikih količinah na endotelijskih celicah, zato se v *in vitro* sistemih lahko uporablja kot pokazatelj endotelijskih mikroveziklov. Sodeluje pri obnavljanju žilnega tkiva in angiogenezi, poleg tega pa tudi pri prehajanju levkocitov skozi endotelij pri vnetju (45). Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31 in aneksin A5, je povečano pri boleznih s poškodbo endotelija, kot je na primer ateroskleroza (46). Pri koronarni arterijski bolezni je število mikroveziklov, pozitivnih na CD31 in aneksin A5, pokazatelj endotelijske disfunkcije (46).

CD62E, bolj znan kot selektin E, je 546 aminokislin dolg površinski glikoprotein in posreduje interakcije med levkociti in vnetim endotelijem. Na nepoškodovanih endotelijskih celicah se le minimalno izraža, njegovo izražanje pa se poveča po stimulaciji endotelijskih celic s citokini, zato je pokazatelj aktivacije endotelija (47, 48). Vsebnost selektina E v krvi je povečana pri akutnem miokardnem infarktu in nestabilni angini pectoris (48). Obe bolezni imata izvor v aterosklerozi. Selektin E se izraža tudi na endotelijskih mikroveziklih. Število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, je povečano na primer pri pljučni hipertenziji in nekaterih oblikah možganske kapi (49, 50).

2 NAMEN DELA

Ateroskleroza je kronična bolezen arterij, ki se začne z disfunkcijo žilnega endotelija, njene posledice pa so najpogosteje povezane s trombozo ali tromboembolijo. Osrednji mehanizem, ki je vpleten v razvoj ateroskleroze, je vnetje. Med mnogimi vnetnimi dejavniki, ki sodelujejo v aterogenezi, je tudi akutno-fazni protein serumski amiloid A (SAA). Povečane vrednosti serumskega amiloida A so značilne za bolnike z aterosklerozo in so povezane z disfunkcijo endotelija. Endotelijski mikrovezikli so pokazatelji endotelijske disfunkcije pri srčno-žilnih boleznih in se kopičijo v aterosklerotičnih lehah.

Namen diplomske naloge je raziskati, ali SAA sproži izločanje mikroveziklov iz endotelijskih celic. Ker se ateroskleroza najpogosteje razvije v koronarnih arterijah, bomo raziskali vpliv serumskega amiloida A na mikrovezikulacijo v človeških endotelijskih celicah koronarnih arterij. Mikrovezikli sodelujejo v vnetju in koagulaciji, zato nas zanima, ali bo število sproščenih mikroveziklov izražalo vnetno aktivnost celic ter ali bodo endotelijski mikrovezikli prenašali tkivni faktor, ki je močan aktivator koagulacije *in vivo*. Nedolgo nazaj so odkrili tudi protitelesa proti SAA v krvi zdravih prostovoljcev in srčno-žilnih bolnikov. Količina protiteles proti SAA je znižana v krvi bolnikov z arterijsko trombozo, zato bomo raziskali tudi vpliv protiteles proti SAA na nastanek mikroveziklov. Mikrovezikle bomo izolirali z metodo diferencialnega centrifugiranja in s pretočno citometrijo določili njihove lastnosti.

Naše hipoteze so:

- Stimulacija človeških endotelijskih celic koronarnih arterij s serumskim amiloidom A sproži izločanje mikroveziklov. Število mikroveziklov narašča sorazmerno s časom stimulacije celic.
- Število sproščenih mikroveziklov po stimulaciji endotelijskih celic s serumskim amiloidom A narašča sorazmerno s količino vnetnih pokazateljev IL-6 in IL-8.
- Stimulacija endotelijskih celic s serumskim amiloidom A sproži izražanje tkivnega faktorja na površini mikroveziklov. Izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih je sorazmerno izražanju tkivnega faktorja na celicah.
- Protitelesa proti serumskemu amiloidu A zmanjšajo mikrovezikulacijo endotelijskih celic, povzročeno s serumskim amiloidom A.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL

- človeške endotelijske celice koronarnih arterij (human coronary artery endothelial cells, HCAEC), Lonza, Walkersville, MD, ZDA
- gojišče za HCAEC, Lonza, Walkersville, MD, ZDA, preglednica I

Preglednica I: Sestava gojišča za človeške endotelijske celice koronarnih arterij (HCAEC).

IME GOJIŠČA		SESTAVINA	KOLIČINA
popolno gojišče za HCAEC s 5 % FBS	popolno gojišče za HCAEC z 0 % FBS	osnovno gojišče EBM-2 (Endothelium growth medium-2)	500 mL
		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 žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF)	0,5 mL
		dolgi R3 rekombinantni insulinu podobni rastni dejavnik 1 (R3-IGF-1)	0,5 mL
		askorbinska kislina	0,5 mL
	x	plodov serum goveda (Fetal Bovine Sera, FBS)	25 mL

- rekombinantni človeški interlevkin-1 β , 0,1 g/L, Biosource TM, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- rekombinantni človeški apo-serumski amiloid A, 1 mg/mL, PreproTech, New Jersey, ZDA
- mišje monoklonsko protitelo IgG₁ proti človeškemu SAA (SAA (Reu86.1): sc-52723), 100 μ g, Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, California, ZDA
- aneksin A5, konjugiran z barvilom fikoeritrin (PE) (PE Annexin V), BD Pharmingen, BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- aneksin A5, konjugiran z barvilom fluorescein izotiocianat (FITC) (Annexin V, FITC conjugate), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA

- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu CD62E, označeno z barvilom alofikocianin (APC) (APC Mouse Anti-Human CD62E), BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mišji IgG1 kappa, označen z barvilom APC (APC Mouse IgG1 kappa isotype control), BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu CD31, označeno z barvilom fluorescein izotiocianat (FITC) (FITC Mouse Anti-Human CD31), BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mišji IgG1 kappa, označen z barvilom FITC (FITC Mouse IgG1 kappa isotype control), BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mišje monoklonsko protitelo proti človeškemu CD142, označeno z barvilom PE (PE Mouse Anti-Human CD142), BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mišji IgG1 kappa, označen z barvilom PE (PE Mouse IgG1 kappa isotype control), BD Biosciences, New Jersey, ZDA

3.1.2 ANALIZNI KOMPLETI

- analizni komplet za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay kit human IL-6), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - standard rekombinantnega humanega IL-6, 3474 pg/vialo
 - pufer za redčenje standarda
 - mikrotitrna plošča, prekrita z rekombinantnimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu IL-6
 - rekombinantno monoklonsko protitelo proti človeškemu IL-6, konjugirano z biotinom
 - kompleks streptavidin – peroksidaza (horseradish peroxidase - HRP), 100x koncentrirana raztopina
 - pufer za redčenje kompleksa streptavidin - peroksidaza (HRP)
 - koncentrirani pufer za spiranje, 25x koncentrat
 - stabilizirani kromogen tetrametilbenzidin (TMB)
 - raztopina za zaustavitev reakcije (H₂SO₄)

- analizni komplet za določanje človeškega IL-8 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human IL-8), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - standard rekombinantnega človeškega IL-8
 - pufer za redčenje standarda
 - mikrotitrna plošča, prekrita z rekombinantnimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu IL-8
 - rekombinantno monoklonsko protitelo proti človeškemu IL-8, konjugirano z biotinom
 - kompleks streptavidin – peroksidaza (HRP), 100x koncentrirana raztopina
 - pufer za redčenje kompleksa streptavidin – hrenova peroksidaza
 - koncentrirani pufer za spiranje, 25x koncentrat
 - stabiliziran kromogen tetrametilbenzidin (TMB)
 - raztopina za zaustavitev reakcije (H₂SO₄)
- analizni komplet za določanje aktivnosti tkivnega faktorja (Actichrome TF), American Diagnostica Inc, Stamford, Connecticut, ZDA
 - pufer za redčenje standardov in vzorcev
 - plazma brez tkivnega faktorja in inhibitorja poti tkivnega faktorja (tissue factor/tissue factor pathway inhibitor)
 - standard lipidiranega tkivnega faktorja v liofilizirani obliki
 - človeški faktor VIIa v liofilizirani obliki
 - človeški faktor X v liofilizirani obliki
 - kromogeni substrat Spectrozyme FXa v liofilizirani obliki
- komplet za izolacijo RNK (PureLink™ RNA MiniKit), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
 - lizirajoči pufer (Lysis Buffer)
 - pufer za spiranje I
 - pufer za spiranje II
 - voda brez RNaz
 - kolone z membrano (Spin Cartridges)
 - zbiralne epruvetke (Recovery Tubes, Collection Tubes)
- komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System), Promega, Madison, WI, ZDA

- reverzna transkriptaza AMV
 - rekombinantni ribonukleazni inhibitor
 - oligonukleotidni začetniki (oligo(dT))
 - heksamerni naključni začetniki
 - kanamicin – pozitivna kontrola
 - mešanica deoksiribonukleotidtrifosfatov
 - pufer za reverzno transkripcijo, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1% Triton X-100
 - magnezijev klorid (MgCl₂)
 - voda brez nukleaz
- komplet za verižno reakcijo s polimerazo Power SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix), Applied Biosystems, Warrington, VB
 - oligonukleotidni začetniki v liofilizirani obliki (Small Sequence, Detection Primers), Applied Biosystems, Warrington, VB, preglednica II

Preglednica II: Nukleotidno zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za prepis posameznega gena. T – temperatura prileganja.

gen	Zaporedje oligonukleotidnega začetnika	T (°C)
IL-6	F: 5'-ATGAACTCCTCCTCCACAAGCGC-3' R: 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'	51 °C
IL-8	F: 5'-CAAGGAGTGCTAAAGAACT-3' R: 5'-AACCCCTCTGCACCCAGTT-3'	37 °C
SAA	F: 5'-CGAAGCTTCTTTTCGTTTCCTT-3' R: 5'-CAGGCCAGCAGGTCGGAAGTG-3'	50 °C
TF	F: 5'-ACTACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTC-3' R: 5'-ATTCAGTGGGGAGTTCTCCTTCCCAGCTCTG-3'	52 °C
Beta-aktin	F: 5'-ATCTGGCACCCACCTCCTACAATGAGCTGCG-3' R: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	59 °C

3.1.3 REAGENTI

- tripansko modrilo (Trypan Blue Stain), Bio Whittaker™, Cambrex, Walkersville, Maryland, ZDA
- umeritvene kroglice Megamix, Biocytex, Marseille, Francija
- fluorescenčne umeritvene kroglice Flow Count Fluorospheres, Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, ZDA

- tripsin 10x raztopina (Trypsine/Versene EDTA), Cambrex, East Rutherford, New Jersey, ZDA
- raztopina za nevtralizacijo tripsina (Trypsine neutralising solution, TNS), Clonetics™, Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA
- fosfatni pufer PBS in PBS-citrat (pH=7.4), preglednica III

Preglednica III: Sestava pufrov PBS in PBS-citrat.

IME PUFRA		SESTAVINA	KOLIČINA
PBS-citrat	PBS	NaCl	0,137M
		KCl	0,0027 M
		Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,0065 M
		KH ₂ PO ₄	0,0015 M
		H ₂ O	do 1L
		Na ₃ citrat x 2H ₂ O	0,0109 M

- pufer HEPES z in brez CaCl₂ (pH= 7.4), preglednica IV

Preglednica IV: Sestava pufrov HEPES s CaCl₂ in HEPES brez CaCl₂.

IME PUFRA		SESTAVINA	KOLIČINA
HEPES s CaCl ₂	HEPES brez CaCl ₂	HEPES-BSS (HEPES Buffered saline solution), Cambrex, Walkersville, Maryland, ZDA	0,01 M
		NaCl	0,14 M
		H ₂ O	1 L
	x	CaCl ₂	0,025 M

- pufer Tris-HCl
- Triton X-100
- β-merkaptetoetanol
- formaldehid
- absolutni etanol
- brezvodna očetna kislina

3.1.4 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL

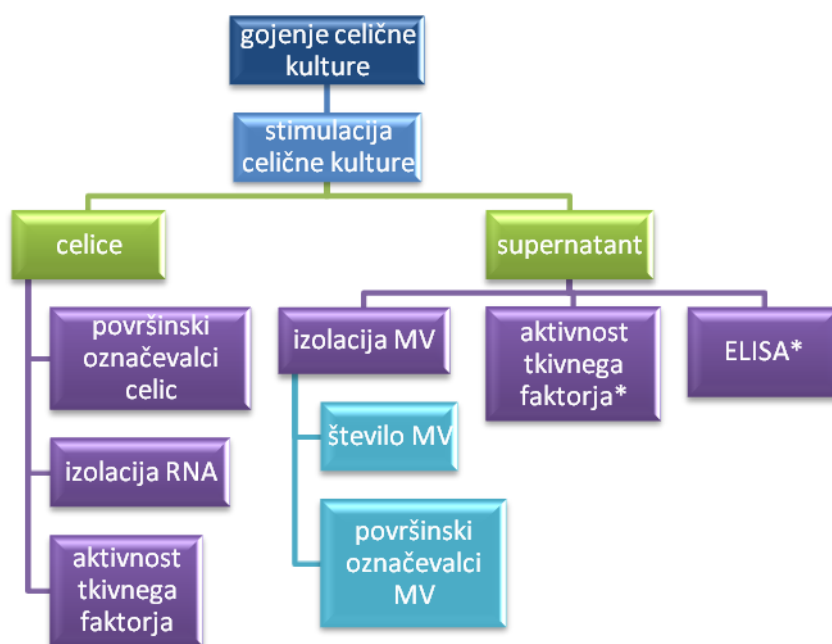
- Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- Centrifuga 5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija

- Centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- UV/VIS enožarkovni spektrofotometer M501, Camspec, Leeds, Velika Britanija
- čitalec mikrotitrskih plošč, Sunrise, Tecan, Männedorf, Švica
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, LaminAir scan 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- celični inkubator, Heto-Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- inkubator za PCR, 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Cambridge, Velika Britanija
- aparatura za PCR v realnem času, Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cambridge, Velika Britanija
- pretočni citometer FACS Canto I, BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- avtoklav A-11, Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- inverzni mikroskop, Eclipse TS100, Nikon, Japonska
- vakuumska črpalka, Vacuum Pump XF54 230 50, Millipore, Francija
- vodna kopel, Water Bath TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- vibracijski mešalnik, vrtnčnik, Vortex, Assister, Sondheim, Nemčija
- pH meter, Mettler Toledo SevenEasy, Corning Science Products, New York, ZDA
- platenke za tkivne kulture 25, 75, 150 cm², TPP, Trasadingen, Švica
- plošče s 6 vdolbinicami TPP, Trasadingen, Švica
- multipipete (100 µL, 300 µL), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtomatske pipete (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- nastavki za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 300 µL, 1000 µL), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- epruvetke 1,5 mL, Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- epruvetke 250 µL, PCR Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifugirne epruvete (15 mL, 50 mL), TPP, Trasadingen, Švica
- plastične epruvete za pretočno citometrijo, BD Biosciences, New Jersey, ZDA
- mikrotitrsko plošče Costar 3591 polysytrene medium binding, Corning Inc, New York, ZDA
- zamrzovalne stekleničke

3.2 METODE

Eksperimentalno delo je zajemalo pripravo in stimulacijo celičnih kultur, izolacijo mikroveziklov ter analize mikroveziklov, celic in supernatanta. Pregled vseh metod je predstavljen na sliki 6. Najprej smo v celičnem inkubatorju razmnožili kulturo endotelijskih celic (HCAEC). Pri ustrezni konfluentnosti smo jih stimulirali z IL-1 β ali SAA. V preliminarnih poskusih smo uporabili IL-1 β , ki je že poznan aktivator mikrovezikulacije, v nadaljnih poskusih pa smo celice stimulirali s SAA, da bi preverili, ali tudi ta protein sproži mikrovezikulacijo endotelijskih celic. Po določenem času stimulacije (4h, 8h, 16h ali 24h) smo odpipetirali supernatant nad celicami v epruvetke ter posebej shranili še celice, ki smo jih uporabili za različne namene.

Celice smo v različnih ponovitvah poskusov uporabili za določanje površinskih označevalcev celic, za izolacijo RNA in za določanje aktivnosti tkivnega faktorja v celičnih lizatih. RNA smo pretvorili v cDNA in z metodo PCR v realnem času določili izražanje različnih genov. Iz supernatanta celičnih kultur smo izolirali mikrovezikle z diferencialnim centrifugiranjem. Število in površinske označevalce (CD31, CD62E ter CD142) izoliranih mikroveziklov smo določili na pretočnem citometru. Preostanek supernatanta smo shranili na -20 °C za kasnejše analize, in sicer za določanje količine IL-6 in IL-8 (z metodo ELISA) ter aktivnosti tkivnega faktorja. Seznam in kratek opis poskusov je prikazan v preglednici V.



Slika 6: Shematičen prikaz eksperimentalnega dela. MV – mikrovezikli, ELISA – encimskoimunska metoda.

* Pred izvedbo analiz smo iz supernatanta s centrifugiranjem odstranili ostanke celic (postopek je prikazan na sliki 8).

Preglednica V: Seznam in kratek opis poskusov. MV – mikrovezikli, TF – tkivni faktor, ELISA – encimskoimunska metoda.

* Pred izvedbo analiz smo iz supernatanta s centrifugiranjem odstranili ostanke celic (postopek je prikazan na sliki 8).

Številka poskusa	Stimulacija (in negativna kontrola)	Analize na celicah	Analize supernatanta*	Analize mikroveziklov
Preliminarni poskus	IL-1 β , 350-2100 pg/mL 24h		IL-6 in IL-8 ELISA (2 ponovitvi)	Število MV (3 ponovitve)
Poskus 1	SAA, 1000 nM 4h, 8h, 16h, 24h	Analiza RNA	IL-6 in IL-8 ELISA (2 ponovitvi)	Število MV Vezava aneksina A5 (3 ponovitve)
Poskus 2	SAA, 1000 nM 8h, 16h, 24h	Označevanje CD31 Označevanje CD62E		Označevanje CD31 Označevanje CD62E
Poskus 3	SAA, 1000 nM 4h, 8h, 24h	Označevanje CD142		Označevanje CD142
Poskus 4	SAA, 1000 nM 4h, 8h, 24h	Aktivnost TF	Aktivnost TF	
Poskus 5	SAA, 1000 nM Anti-SAA Reu 86, 2 μ g/mL 4h, 24h			Število MV (2 ponovitvi)

3.2.1 METODOLOŠKI PRISTOP

V naši diplomski nalogi smo iskali odgovore na vprašanja v zvezi s pojavnostjo mikrovezikulacije po stimulaciji celic. Zanimalo nas je, ali SAA lahko sproži izločanje celičnih mikroveziklov, saj to še ni bilo raziskano na nobenem tipu celic. Odločili smo se za uporabo endotelijskih celic, ker imajo endotelijske celice in endotelijski mikrovezikli prav tako kot SAA pomembno vlogo v razvoju ateroskleroze.

Ker smo raziskovali pojavnost, smo analizirali relativno malo eksperimentalnih točk (največ štiri časovne točke) in naredili največ tri ponovitve poskusa. Zato rezultatov nismo statistično analizirali. S statističnimi orodji smo si pomagali le v primeru določanja povezave med številom mikroveziklov in vnetnimi parametri, IL-6 in IL-8, vendar tudi tukaj zelo omejeno. Izračunali smo Pearsonov koeficient, ki je merilo linearnosti povezave. Nismo pa določali statistične značilnosti linearnosti povezave, saj imamo na voljo premalo eksperimentalnih točk. Naši poskusi so osnova za nadaljne raziskave na večjih vzorcih, kjer bi lahko raziskali značilnosti povezave med številom mikroveziklov ter vnetnimi ali koagulacijskimi pokazatelji.

Z našimi poskusi smo raziskali, ali SAA sproži izločanje endotelijskih mikroveziklov, določili število in lastnosti mikroveziklov, preverili morebitno povezavo z vnetnim in koagulantnim odzivom celic in vpliv protiteles proti SAA na mikrovezikulacijo. Vzgojili smo kulturo človeških endotelijskih celic koronarnih arterij. Celice smo stimulirali s SAA in po različnih časih stimulacije analizirali celice in supernatant nad celicami. Najprej smo preverili, ali SAA sproži izločanje mikroveziklov iz endotelijskih celic. Iz supernatanta nad celicami smo z metodo diferencialnega centrifugiranja izolirali mikrovezikle in določili njihovo število s pomočjo pretočne citometrije.

Vnetni odziv celic smo določali na nivoju RNA in proteinov. Iz nestimuliranih celic in celic, stimuliranih s SAA, smo izolirali celično RNA in jo pretvorili v cDNA, nato pa z metodo PCR v realnem času določili izražanje genov za IL-6, IL-8 in SAA po različnih časih stimulacije. Z encimskoimunsko metodo na trdnem nosilcu (ELISA) smo določili količino IL-6 in IL-8 v supernatantih nad celicami. Količino IL-6 in IL-8 smo nato primerjali s številom mikroveziklov.

Površinske lastnosti mikroveziklov smo določali s pretočno citometrijo. Določali smo vezavo aneksina A5 na fosfatidilserin na površini mikroveziklov in s pomočjo monoklonskih protiteles preverjali prisotnost membranskih molekul CD31 in CD62E na endotelijskih celicah in mikroveziklih.

Koagulantni odziv celic smo določali preko določanja izražanja tkivnega faktorja na nivoju RNA in proteinov. S pomočjo PCR v realnem času smo določili izražanje gena za tkivni faktor po različnih časih stimulacije celic. S pretočno citometrijo smo preverjali prisotnost tkivnega faktorja na membranah nestimuliranih in stimuliranih celic ter mikroveziklih, sproščenih iz teh celic. S spektrofotometričnim testom aktivnosti tkivnega faktorja smo določali aktivnost tkivnega faktorja v celičnih lizatih nestimuliranih in stimuliranih celic ter mikroveziklih. Tako smo lahko medsebojno primerjali izražanje tkivnega faktorja na celicah in mikroveziklih po različnih časih stimulacije celic.

Preverili smo tudi vpliv protiteles proti SAA na sproščanje mikroveziklov. Celice smo v tem primeru stimulirali s SAA, protitelesom proti SAA in mešanico obeh. Nato smo na enak način kot v prejšnjih poskusih izolirali mikrovezikle in s pretočno citometrijo določili njihovo število.

3.2.2 CELIČNA KULTURA

Delo s celicami je potekalo pod aseptičnimi pogoji v celičnem laboratoriju, ki je sterilen prostor z aseptično komoro z laminarnim pretokom zraka. V aseptičen prostor smo vstopali z ustrezno zaščitno opremo, ki zagotavlja sterilnost čistih prostorov in nas hkrati zaščiti pred možnimi nevarnimi snovmi. Pred pričetkom in ob koncu dela smo očistili površino v aseptični komori z razkužilom in 70 % etanolom. Pri pripravi reagentov in rokovanju s celicami smo uporabljali sterilne nastavke za pipete s filtrom, sterilne plastenke in plošče za gojenje celic ter sterilne epruvete. Vse nesterilne predmete, ki smo jih uporabljali v aseptični komori, smo pred uporabo očistili s 70 % etanolom.

Sterilno rastno gojišče za celice smo pripravili tako, da smo v osnovno gojišče dodali ustrezno količino dopolnil in dobili t.i. popolno gojišče za HCAEC z 0 % FBS (CA-PM 0 % FBS). Temu gojišču smo dodali še plodov serum goveda in dobili popolno gojišče za HCAEC s 5 % FBS (CA-PM 5 % FBS). Podrobna sestava je prikazana v preglednici I (stran 20). Tako pripravljeno gojišče smo v aseptični komori prepipetirali v označene plastenke ali plošče s 6 vdolbinicami za gojenje celic. Pred nasaditvijo celic smo jih segreli v inkubatorju na 37 °C.

Celice shranjujemo v tekočem dušiku v zamrzovalnih stekleničkah, na katerih so označeni vrsta in pasaža celic, datum zamrznitve in število celic. Celice smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jih 1–2 minuti segrevali v vodni kopeli na 37 °C, da so se odtalile. Nato smo vsebino rahlo premešali s pipeto in nanесли ustrezno prostornino celic v plošče s 6 vdolbinicami, ki so bile napolnjene z gojiščem CA-PM 5 % FBS, segretim na 37 °C. Prostornino suspenzije celic smo izračunali glede na koncentracijo celic v zamrzovalni steklenički in želeno nasaditveno gostoto celic po enačbi:

$$\text{Prostornina (mL)} = \frac{\text{nasaditvena gostota } \left(\frac{\text{celice}}{\text{cm}^2}\right) \times \text{površina (cm}^2\text{)}}{\text{koncentracija } \left(\frac{\text{celice}}{\text{mL}}\right)}$$

Enačba 1: Izračun prostornine suspenzije celic

Ploščo s 6 vdolbinicami smo rahlo pretresli in dali v inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 100 % relativna vlažnost) ter pustili, da so se celice razmnožile do 80–90 % konfluentnosti. Celicam smo vsak drugi dan zamenjali gojišče (segret CA-PM 5 % FBS, 2 mL/vdolbinico).

3.2.2.1 Stimulacija celic

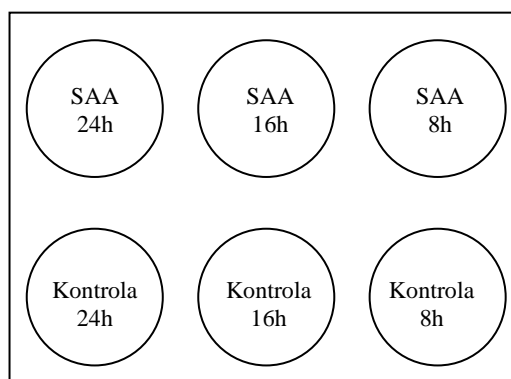
Poskusi so potekali v ploščah s 6 vdolbinicami za gojenje celic. Izvajali smo jih na kulturi HCAEC 5. ali 6. pasaže. Pri stimulaciji smo sledili načrtu, ki smo ga predhodno določili. Primer takega načrta je predstavljen na sliki 7.

Dve uri pred stimulacijo smo vsem celicam zamenjali gojišče in jim dodali predhodno segreto popolno gojišče CA-PM z 0 % FBS (2 mL/vdolbinico). Neposredno pred stimulacijo smo ponovno zamenjali gojišče in spet dodali

popolno gojišče CA-PM z 0 % FBS (1 mL/vdolbinico). Nato smo celicam dodali izračunano prostornino IL-1 β ali SAA, da smo dobili ustrezno koncentracijo v gojišču. Osnovni raztopini IL-1 β (c = 0,1 mg/mL) in SAA (c = 1,0 mg/mL) smo predhodno pripravili po navodilih proizvajalca. Celicam, ki so bile določene za negativno kontrolo, nismo v gojišče dodali ničesar. Protitelesa proti SAA smo pred stimulacijo celic 1 uro inkubirali skupaj s SAA v popolnem gojišču CA-PM 0 % FBS (1 mL). Plošče s celicami smo po dodatku IL-1 β oziroma SAA vrnili v inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 100 % relativna vlažnost) za 4, 8, 16 ali 24 ur, odvisno od načrta poskusa.

Po določenem času stimulacije smo plošče s celicami vzeli iz inkubatorja. Supernatant nad celicami smo s pipeto prenesli v 1,5 mL epruvetke in ga uporabili za izolacijo mikroveziklov. Celice smo porabili v različne namene.

a) Označevanje površinskih molekul. Po odvzemu supernatanta smo celice sprali s pufrom HEPES (300 μ L/vdolbinico) in jim dodali raztopino tripsina (400 μ L/vdolbinico). Plošče smo 1 minuto grel v inkubatorju in nato pretresli. Pri tem so celice odstopile od podlage in se zaokrožile, kar smo preverili pod mikroskopom na 40-kratni povečavi. Dodali smo raztopino za nevtralizacijo tripsina (800 μ L/vdolbinico), ki zaustavi delovanje tripsina, da ta ne poškoduje celic. Suspenzijo celic smo odpipetirali v plastično epruveto za pretočno citometrijo. Dno vdolbinice smo še dodatno sprali s pufrom HEPES (300 μ L/vdolbinico). Celice smo posedli s centrifugiranjem (5 minut, 300 g, 24 °C). Supernatant smo odstranili in celicam dodali pufer PBS (100 μ L/epruveto). Suspenzijo celic smo nato 30 minut v



Slika 7: Primer načrta poskusa v plošči s 6 vdolbinicami.

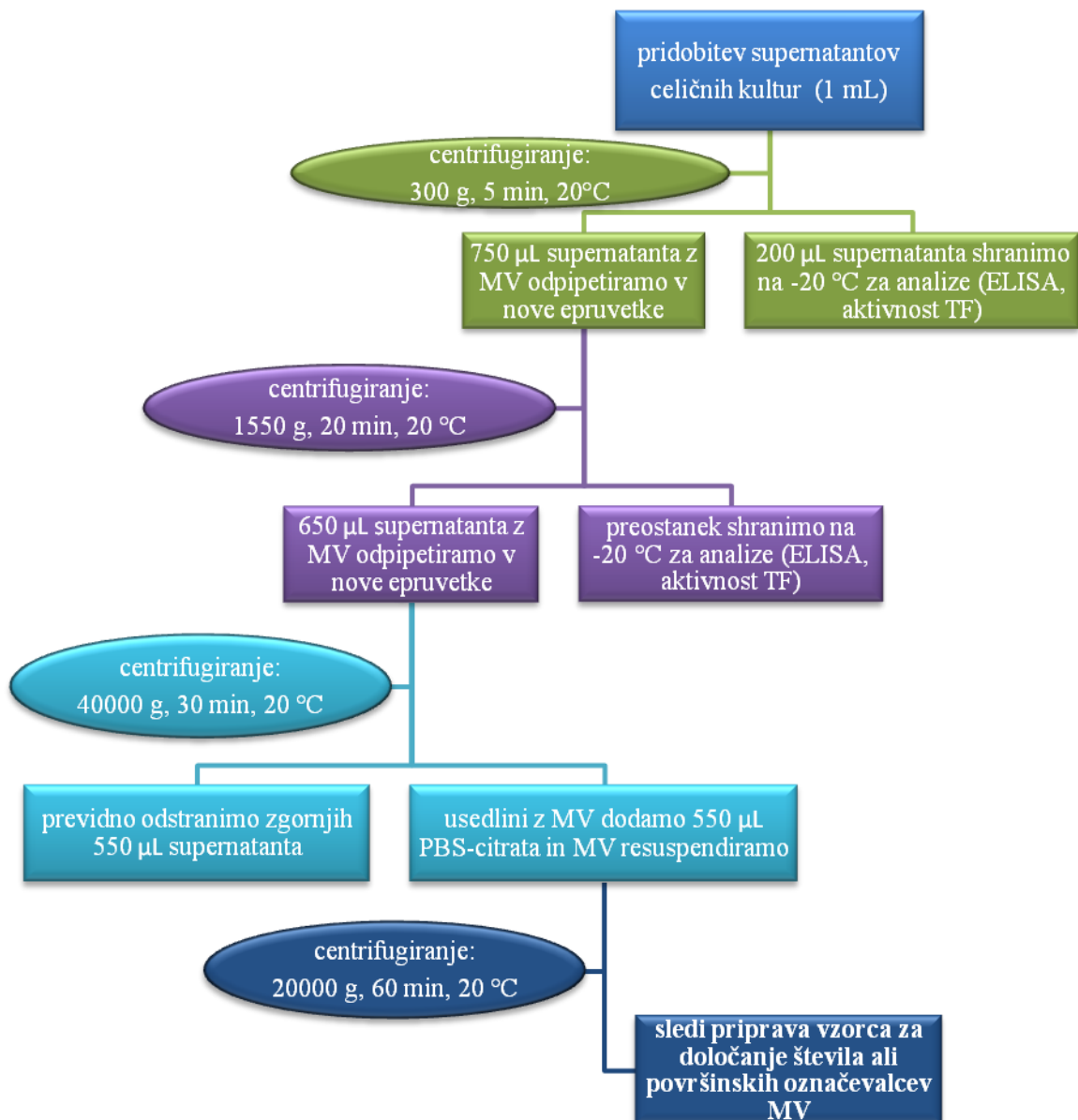
temi inkubirali z želenimi specifičnimi (anti-CD31-FITC in anti-CD142-PE) ali izotipskimi (IgG-FITC, IgG-PE) monoklonskimi protitelesi (15 μ L raztopine protitelesa/epruveto). Po inkubaciji smo dodali PBS z 1,2 % formaldehidom (900 μ L/epruveto), s čimer smo celice fiksirali. Ponovno smo celice posedli s centrifugiranjem (5 minut, 300 g, 24 °C), odstranili 900 μ L supernatanta in celice analizirali na pretočnem citometru znotraj 24 ur.

- b) Izolacija RNA iz celic. Pritrjene celice smo po odstranitvi supernatanta prelili z lizirajočim pufrom (300 μ L/vdolbinico) z 1 % β -merkaptetanolom. Puffer smo pripravili iz lizirajočega pufra iz analiznega kompleta za izolacijo RNA in β -merkaptetanola. Beta-merkaptetanol cepi disulfidne vezi in prepreči delovanje encimov RNaz ter tako zaščiti RNA pred razgradnjo. Celice smo postrgali s strgalom za celice in jih prenesli v označeno epruvetko ter nadaljevali po postopku za izolacijo RNA.
- c) Določanje aktivnosti tkivnega faktorja. Pritrjene celice smo prelili s 50 mM Tris pufrom z 0,1 % Tritonom X-100 (300 μ L/vdolbinico). Rahlo smo premešali, da je nastala viskozna tekočina in plošče označili ter do analize zamrznili na -80 °C.

3.2.3 IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV

Po predvidenem času stimulacije celic smo supernatant nad celicami prenesli v označene 1,5 mL epruvetke in izolirali mikrovezikle. Izolacija je potekala izven aseptičnega prostora s postopkom diferencialnega centrifugiranja. Kot lahko vidimo na sliki 8, smo vzorec z dvakratnim centrifugiranjem najprej očistili ostankov celic, nato pa s centrifugiranjem pri 40000 g izolirali mikrovezikle v usedlini. Nato smo mikrovezikle še sprali s pufrom PBS-citrat. Pred centrifugiranjem smo uravnotežili centrifugirko.

Če smo želeli določiti število mikroveziklov v vzorcu, smo po zadnjem centrifugiranju (20000 g, 60 minut, 20 °C) s pipeto odstranili 550 μ L supernatanta, mikrovezikle v usedlini pa dobro resuspendirali v preostalih 100 μ L supernatanta in kvantitativno prenesli v plastično epruveto za pretočno citometrijo. Epruvetko smo sprali s 100 μ L pufra PBS-citrat, tako da smo na koncu dobili 200 μ L suspenzije mikroveziklov. Vzorcju smo tik pred meritvijo na pretočnem citometru dodali 20 μ L fluorescenčnih umeritvenih kroglic Flow Count Fluorospheres z znano koncentracijo, s pomočjo katerih smo izračunali število mikroveziklov v vzorcu.



Slika 8: Shema izolacije mikroveziklov. MV – mikrovezikli, ELISA – encimskoimunska metoda, TF – tkivni faktor.

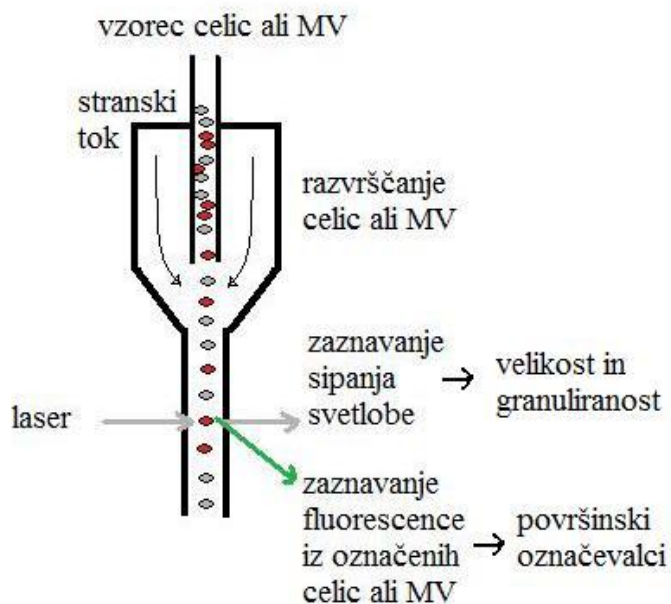
Poleg števila mikroveziklov smo želeli določiti tudi njihove površinske lastnosti. To smo naredili tako, da smo mikrovezikle označili z aneksinom A5 in ustreznimi protitelesi, konjugiranimi s fluorokromi, ter s pretočnim citometrom določili njihovo vezavo na mikrovezikle. Uporabljali smo aneksin A5, konjugiran s FITC (3,5 µL/vzorec) ali PE (3,5 µL/vzorec), ter specifična monoklonska protitelesa anti-CD31-FITC (5 µL/vzorec), anti-CD62E-APC (6 µL/vzorec) in anti-CD142-PE (3 µL/vzorec). Za izključitev nespecifične vezave protiteles na Fc receptorje mikroveziklov smo uporabili kontrolna izotipska

protitelesa (IgG-FITC, IgG-APC, IgG-PE), ki imajo enak izotip in podizotip težke verige, enako vrsto lahke verige, enak fluorokrom in so usmerjena proti antigenu, ki se ne izraža na človeških celicah. Iz vzorca izoliranih mikroveziklov smo po zadnjem centrifugiranju odstranili zgornjih 610 μL supernatanta in mikrovezikle resuspendirali v preostalih 40 μL . Nato smo dodali 100 μL pufru HEPES z ali brez CaCl_2 , aneksin A5 ter specifično ali izotipsko protitelo. Vzorec smo inkubirali 15 minut v temi in nato dodali še 100 μL pufru HEPES z ali brez CaCl_2 . Kalcijevi ioni v pufru so omogočili vezavo aneksina A5 na fosfatidilserin v membrani mikroveziklov. Vzorce s pufrom HEPES brez CaCl_2 smo uporabili kot negativno kontrolo za nespecifično vezavo aneksina A5 na mikrovezikle. Sledila je izolacija označenih mikroveziklov s centrifugiranjem pri 20000 g (30 minut, 20°C). Supernatant smo odstranili, mikrovezikle pa kvantitativno prenesli v plastično epruveto za pretočno citometrijo. Epruvetko smo usteržno sprali s pufrom HEPES z oziroma brez CaCl_2 .

Vse vzorce smo do meritve na pretočnem citometru shranili na temnem v hladni sobi in jih analizirali v roku 24 ur.

3.2.4 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM

Pretočna citometrija je metoda za merjenje lastnosti posameznih celic ali drugih delcev v tekočih vzorcih in je primerna tudi za določanje mikroveziklov (36). Poenostavljena shema delovanja pretočnega citometra je predstavljena na sliki 9. Vzorec se v pretočnem citometru oblikuje v zelo tanek curek tekočine, ki omogoča, da celice ali mikrovezikli posamezno eden za drugim tečejo skozi šobo. V šobo je usmerjena laserska svetloba, na drugi strani pa z različnimi detektorji zaznavamo sipanje svetlobe ali oddano fluorescenco, kar nam da



Slika 9: Shema delovanja pretočnega citometra. MV – mikrovezikli.

informacije o velikosti, granuliranosti in fenotipu posamezne celice ali mikrovezikla.

Sipanje zaradi uklona svetlobe na robovih celice ali mikrovezikla zaznava prednji detektor sipanja (FSC), ki nam da informacijo o njihovi velikosti. Sipanje zaradi odboja svetlobe meri stranski detektor sipanja (SSC), ta pa nam da informacijo o granuliranosti. Če celice ali mikrovezikle predhodno označimo s protitelesi, na katera so vezani fluorokromi, lahko merimo tudi fluorescenco pri različnih valovnih dolžinah (51).

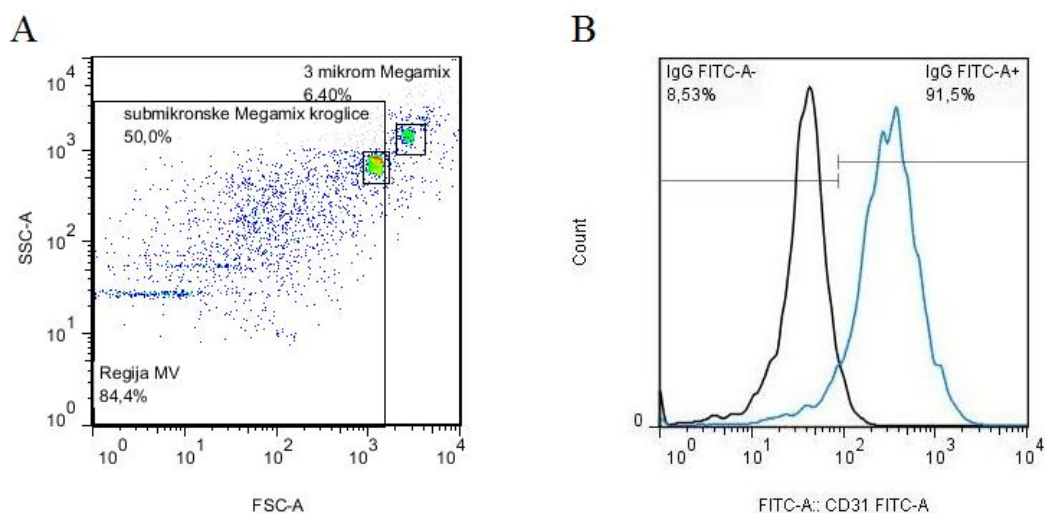
S pretočno citometrijo smo določali število mikroveziklov ter površinske označevalce celic in mikroveziklov. Podatke smo analizirali z uporabo programskega paketa Flow Jo (Tree Star, Ashland, Oregon, ZDA).

Za določitev območja, v katerem se nahajajo mikrovezikli, smo uporabljali točkovni diagram signala prednjega in stranskega sipanja – diagram FSC/SSC (slika 10/A). Zgornjo velikostno mejo območja mikroveziklov na diagramu FSC/SSC smo določili z uporabo umeritvenih kroglic Megamix treh različnih velikosti (0,5; 0,9 in 3 μm), ki so bile razvite za velikostno določanje območja trombocitnih mikroveziklov, izoliranih iz periferne krvi (52). Kot mikrovezikle smo opredelili dogodke v območju $\leq 1 \mu\text{m}$. Absolutno število izoliranih mikroveziklov smo določili z uporabo fluorescenčnih umeritvenih kroglic Flow Count Fluorospheres s premerom 10 μm in koncentracijo $1,01 \cdot 10^6$ kroglic/mL. Za analizo podatkov smo izmerili najmanj 2000 dogodkov znotraj regije mikroveziklov in najmanj 1000 dogodkov znotraj regije umeritvenih kroglic Flow Count Fluorospheres. Iz razmerja prešteti dogodkov v regiji mikroveziklov in kroglic ter poznanega števila kroglic v celotnem vzorcu smo nato izračunali število mikroveziklov v celotnem vzorcu po enačbi:

$$N(MV) = \frac{N(MV)_{izm.}}{N(FS)_{izm.}} \times c(FS) \times V(FS)$$

Enačba 2: Izračun števila mikroveziklov v celotnem vzorcu. ($N(MV)$ – število mikroveziklov v celotnem vzorcu, $N(MV)_{izm.}$ – izmerjeno število mikroveziklov, $N(FS)_{izm.}$ – izmerjeno število kroglic, $c(FS)$ – koncentracija dodane suspenzije kroglic, $V(FS)$ – prostornina dodane suspenzije kroglic).

Za analizo prisotnosti površinskih molekul na mikroveziklih in celicah smo uporabljali histograme porazdelitve fluorescentnega signala, ki primerja število delcev na y osi z intenziteto fluorescence monoklonskega protitelesa, vezanega na površini mikroveziklov oziroma celic na x osi (slika 10/B). Delež celic oziroma mikroveziklov, ki na svoji površini izražajo posamezne endotelijske molekule oziroma imajo vezan aneksin A5, smo določili tako, da smo na histogramih izmerili odstotek delcev z večjo intenziteto fluorescence kot jo imajo delci, označeni z ustreznim kontrolnim izotipskim protitelesom oziroma aneksinom A5 v odsotnosti kalcija.



Slika 10: A; Diagram prednjega in stranskega sipanja (FSC/SSC) – določitev območja mikroveziklov (velik kvadrat-območje mikroveziklov).

B; Primer histograma, ki prikazuje odvisnost števila delcev od intenzitete fluorescence monoklonskega protitelesa (stimulacija HCAEC z SAA, 4h, črna krivulja – histogram celic, označenih z izotipskim protitelesom IgG-FITC, modra krivulja – histogram celic, označenih s specifičnim monoklonskim protitelesom anti-CD31-FITC).

3.2.5 ENCIMSKOIMUNSKI TEST

Encimskoimunski test (ELISA) je biokemijska metoda določanja protiteles ali antigenov v vzorcu. S pomočjo sendvič ELISE smo v supernatantu, ki smo ga shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, določali prisotnost dveh različnih proteinov, citokina IL-6 in kemokina IL-8, ki sta nam služila kot pokazatelja vnetnega odziva celic. Vse analize smo izvedli z analiznimi kompleti po navodilih proizvajalcev. Natančen postopek je predstavljen v preglednici VI. Vzorce smo odmrznili, premešali in pred nanosom po potrebi redčili z ustreznim pufrom iz analiznega kompleta.

Princip metode je v vseh primerih enak. Iskani protein iz vzorca oziroma standarda se veže na specifična monoklonska protitelesa, ki so pritrjena na dno mikrotitrne plošče. Drugo specifično monoklonsko protitelo proti iskanemu proteinu je označeno z biotinom. Na biotin se veže še kompleks streptavidin – peroksidaza. Encim peroksidaza nato kvantitativno pretvori substrat, ki ga dodamo, v obarvan produkt, ki ga spektrofotometrično določimo.

Iz poznanih koncentracij standardov in njihovih izmerjenih absorbanč smo naredili umeritveno krivuljo. S pomočjo umeritvene krivulje smo na koncu izračunali koncentracijo iskanega proteina v vzorcih.

Preglednica VI: Pregled postopka pri encimskoimunskem testu na trden nosilcu za določanje koncentracije IL-6 in IL-8.

Postopek	IL-6 ELISA	IL-8 ELISA
nanos standardov ali vzorcev na mikrotitrsko ploščo	100 μ L	50 μ L
spiranje	/	/
nanos biotiniliranega protitelesa	50 μ L	50 μ L
inkubacija	120 min	90 min
spiranje	4-krat	4-krat
nanos kompleksa streptavidin-HRP	100 μ L	100 μ L
inkubacija	30 min	30 min
spiranje	4-krat	4-krat
nanos substrata	100 μ L	100 μ L
inkubacija v temi	30 min	30 min
nanos STOP raztopine	100 μ L	100 μ L
merjenje absorbance	450 nm	450 nm

3.2.6 ANALIZA RNA

Vpliv stimulacije celic s SAA smo preverili tudi na nivoju informacijske RNA (mRNA). RNA iz celic smo izolirali s pomočjo kompleta za izolacijo RNA Invitrogen. Količino in čistost izolirane RNA smo določili spektrofotometrično. Sledila je reverzna transkripcija, s čimer smo RNA pretvorili v komplementarno DNA (cDNA), ki smo jo nato uporabili v kvantitativni reakciji s polimerazo (PCR) v realnem času, da bi določili izražanje tarčnih genov v celicah. Pri delu z nukleinskimi kislinami smo uporabljali rokavice ter avtoklavirane epruvete in nastavke za pipete, reagente in vzorce pa smo med delom hladili na ledu.

3.2.6.1 Izolacija RNA

RNA smo izolirali iz celic z analiznim kompletom za izolacijo RNA po navodilih proizvajalca. Komplet vsebuje kolono z membrano, ki veže RNA, proteine in druge nečistote pa speremo iz vzorca. Na koncu z dodatkom vode brez RNaz eluiramo RNA iz membrane.

Lizat celic, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (stran 29), smo centrifugirali (5 minut, 2600 g, sobna temperatura). Supernatant z RNA smo prenesli v novo epruveto brez RNaz in mu dodali enako prostornino 70 % etanola. Z vibracijskim mešalnikom smo

vsebino epruvete dobro premešali in jo prenesli v kolono z membrano za izolacijo RNA, ki je bila vstavljena v zbiralno epruvetko. Sledilo je centrifugiranje (15 s, 12000 g, sobna temperatura). Vsebino v zbiralni epruvetki smo zavrgli. V kolono z membrano smo nato nanegli najprej Spiralni pufer I in zatem dvakrat Spiralni pufer II ter po vsakem koraku centrifugirali (15 s, 12000 g, sobna temperatura) in zavrgli vsebino v zbiralni epruvetki. Na koncu smo še enkrat centrifugirali (1–2 minuti, 12000g, sobna temperatura). Staro zbiralno epruvetko smo zavrgli, kolono z membrano pa vstavili v novo označeno zbiralno epruvetko za izolacijo RNA. V kolono z membrano smo nazadnje nanegli še 30 µL vode brez RNaz, 2 minuti inkubirali na sobni temperaturi in centrifugirali (2 minuti, 12000 g, sobna temperatura), pri čemer se je RNA, vezana na membrani, eluirala v označeno epruvetko. Izolirano RNA smo shranili na -80 °C ali neposredno nadaljevali s pretvorbo RNA v cDNA. Del vzorca RNA smo uporabili za določanje količine RNA.

Količino RNA smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 nm. Vzorec, ki vsebuje 40 µg/mL RNA, ima pri 260 nm vrednost absorbance 1. Da bi določili količino izolirane RNA, smo 2,3 µL vzorca RNA redčili z 67,7 µL vode brez RNaz (30,4-kratna redčitev). Iz izmerjene absorbance in ustrezne redčitve smo izračunali količino RNA v vzorcu po enačbi:

$$\text{količina RNA v vzorcu} = 40 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{faktor redčenja} \times \text{prostornina vzorca v mL}$$

Enačba 3: Izračun količine RNA v vzorcu na podlagi izmerjene absorbance. A_{260} -izmerjena absorbanca vzorca pri 260 nm.

Vzorec RNA smo glede na izračunano količino RNA redčili z vodo brez RNaz, da smo dobili 15,6 µL mešanice, ki vsebuje 1 µg RNA. Teh 15,6 µL smo nato uporabili v reakciji reverzne transkripcije.

Čistost RNA smo približno ocenili iz razmerja absorbanc vzorca RNA pri 260 in 280 nm. S tem lahko ocenimo prisotnost nečistot, ki absorbirajo v UV spektru, kot so na primer proteini. Po izkušnjah laboratorija razmerje nad 1,5 pomeni relativno dobro čistost RNA, izolirane po izbrani poti.

3.2.6.2 Reverzna transkripcija RNA v cDNA

Z reverzno transkripcijo (RT) smo pretvorili zelo občutljivo enoverižno RNA v bolj stabilno dvoverižno komplementarno DNA (cDNA). Encim reverzna transkriptaza najprej

prepiše verigo RNA v cDNA, nato razgradi RNA in na koncu sintetizira še drugo verigo DNA.

Reakcijsko mešanico za RT (14,4 μL), ki je predstavljena v preglednici VII, smo dodali 15,6 μL vzorca RNA, ki vsebuje 1 μg RNA in tako pripravljen vzorec uporabili v reakciji RT. Reakcija RT je potekala pod naslednjimi pogoji: 30 minut pri 43 $^{\circ}\text{C}$, 30 minut pri 53 $^{\circ}\text{C}$ in 5 minut pri 94 $^{\circ}\text{C}$. cDNA smo shranili na -20 $^{\circ}\text{C}$ ali pa takoj nadaljevali s PCR v realnem času.

Preglednica VII: Sestava in pomen reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo. dNTP – deoksiribonukleotidtrifosfati, AMV RT – encim reverzna transkriptaza.

sestavina	Količina za 1 vzorec	pomen
10x RT pufer	3 μL	vzdržuje pH
dNTP	3 μL	gradniki nove verige
MgCl ₂	6 μL	Mg ²⁺ je kofaktor encima AMV RT
oligo dT	1 μL	oligonukleotidni začetniki
Inhibitor RNaz	0,75 μL	zaviranje RNaz
AMV RT	0,6 μL	encim, odgovoren za izgradnjo cDNA
voda brez nukleaz	0,05 μL	dopolni prostornino reakcijske mešanice

3.2.6.3 Kvantitativna reakcija s polimerazo v realnem času

Kvantitativna reakcija s polimerazo (PCR) v realnem času nam omogoča pomnoževanje in hkrati spremljanje količine DNA v vzorcu. Uporabili smo jo za določitev izražanja naslednjih genov v celicah: IL-6, IL-8, tkivni faktor, SAA in selektin E (CD62E).

Po navodilu v preglednici VIII smo pripravili reakcijsko mešanico. Power Sybr Green PCR Master Mix vsebuje vse potrebne elemente za potek reakcije: encim DNA-polimerazo za pomnoževanje, gradnike deoksiribonukleotidtrifosfate (dNTP) in barvilo Sybr green I za detekcijo v ustrezen pufru. Mešanici smo dodali še oligonukleotidne začetnike in vodo brez nukleaz. Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo nanесли v vdolbinice na ploščici (24 μL /vdolbinico) in ji dodali cDNA (1 μL /vdolbinico), v primeru slepe kontrole pa 1 μL vode brez nukleaz.

Preglednica VIII: Sestava reakcijske mešanice za qPCR. (Navedene so količine za en vzorec.)

sestavina	količina
Power Sybr Green PCR Master Mix	12,5 μL
oligonukleotidni začetnik F (10 pmolov/ μL)	0,5 μL
oligonukleotidni začetnik R (10 pmolov/ μL)	0,5 μL
voda brez nukleaz	10,5 μL

S pomočjo računalniškega programa StepOne (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, ZDA) smo določili razporeditev vzorcev in slepih kontrol na ploščici ter pogoje reakcije in nato zagnali program. Reakcija se je začela s segrevanjem 10 minut na 95 °C. Sledilo je 40 ciklov, od katerih je bil vsak cikel sestavljen iz treh korakov. V prvem koraku (15 sekund, 95 °C) se cDNA denaturira, v drugem koraku (1 minuta, temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov) se oligonukleotidni začetniki prilegajo na odsek cDNA, v tretjem koraku (1 minuta, 60 °C) pa se veriga cDNA pomnoži. Računalniški program je v vsakem ciklu izmeril jakost fluorescence vzorca in izrisal krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescentnega signala posameznega vzorca od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje smo določili linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto jakost fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Za vsak vzorec smo nato določili tisti cikel (Ct), v katerem je fluorescenca vzorca presegla linijo fluorescenčnega praga. Vrednosti Ct so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij tarčne cDNA.

Podatke, ki smo jih dobili, smo obdelali s pomočjo računalniškega programa QGENE. V tabele smo vnesli podatke o tarčnem genu in referenčnem genu, program pa je izračunal normalizirano izražanje tarčnih genov v nestimuliranih celicah in celicah, stimuliranih z SAA, po metodi dCt (enačba 4):

$$dCt = Ct(\text{tarčni gen v (ne)stimuliranih celicah}) - Ct(\text{referenčni gen v (ne)stimuliranih celicah})$$

Enačba 4: Izračun izražanja tarčnega gena po metodi dCt.

in z upoštevanjem 100 % učinkovitosti pomnoževanja tarčne cDNA. Kot referenčni gen za normalizacijo izražanja tarčnih genov med posameznimi vzorci celic smo uporabili beta-aktin, za katerega je značilno, da se v endotelijskih celicah izraža enakomerno ne glede na stimulacijo. Končni rezultat je bil graf, ki prikazuje povprečno normalizirano izražanje tarčnega gena glede na izražanje beta aktina v vsakem vzorcu.

3.2.7 DOLOČANJE AKTIVNOSTI TKIVNEGA FAKTORJA

Topni tkivni faktor ima v primerjavi z lipidiranim tkivnim faktorjem zanemarljivo encimsko aktivnost. Zato smo v vzorcih celic in mikroveziklov določali tudi koncentracijo aktivnega tkivnega faktorja. Delali smo po navodilu proizvajalca.

Princip metode temelji na tvorbi kompleksa tkivnega faktorja s faktorjem VIIa (TF/VIIa). Ta kompleks aktivira faktor X v faktor Xa, ki reagira s kromogenim substratom Spectrozyme Xa. Spectrozyme Xa je zelo specifičen reagent za faktor Xa. Pri tej reakciji se sprosti derivat para-nitroanilina, ki ga kvantitativno določimo z merjenjem absorbanca pri 405 nm.

Celice smo po odstranitvi supernatanta prelili s 50 mM Tris pufrom z 0,1 % Tritonom X-100, ki olajša lizo celic, in jih zamrznili (stran 29). Celični lizat smo pripravili s trikratnim odmrzovanjem (37 °C, 10 minut) in zamrzovanjem (-80 °C, 15 minut) vzorca. Na koncu smo celice inkubirali 30 minut na 37 °C in jih postrgali s plastičnim strgalnikom ter prepipetirali v epruvetke. Vzorec smo pred analizo po potrebi redčili s pufrom za redčenje vzorcev glede na pričakovane vrednosti koncentracije aktivnega tkivnega faktorja.

Aktivnost tkivnega faktorja na mikroveziklih smo določali v supernatantu (po odstranitvi odmrzlih celic, glej sliko 8), ki smo ga shranili na -20 °C. Supernatant smo odmrznili, dobro premešali in nanegli vzorce brez redčenja.

Pufer za redčenje (vzorcev in standardov) smo pripravili, tako da smo 1 prostorninski enoti pufru dodali 9 prostorninskih enot hladne sterilno filtrirane deionizirane vode in dobro premešali. Liofiliziranim reagentom (človeški faktor VIIa, človeški faktor X, Spectrozyme Xa) smo dodali predpisano količino sterilno filtrirane deionizirane vode, dobro premešali in jih shranili do uporabe na ledu. Liofiliziranemu standardu tkivnega faktorja smo dodali 2,3 mL pufru za redčenje in dobili raztopino tkivnega faktorja s koncentracijo 500 pM. Presežek tako pripravljenega standarda smo shranili na -20 °C. Z redčenjem te osnovne raztopine s pufrom za redčenje standarda smo pripravili 30; 15; 7,5; 3,75 in 1,88 pM raztopine standarda.

Na mikrotitrsko ploščico (Costar 3591 polystyrene medium binding) smo nanegli 50 µL pufru za redčenje (pH 8.4), 25 µL standardov tkivnega faktorja ali vzorcev, 25 µL človeškega faktorja VIIa in 25 µL človeškega faktorja X. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili in inkubirali 15 minut v inkubatorju na 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 25 µL substrata Spectrozyme Xa in ponovno inkubirali 20 minut na 37 °C. Po 20 minutah smo reakcijo ustavili z dodatkom 50 µL brezvodne očetne kisline in izmerili absorbanco pri 405 nm.

Iz absorbanc standardov tkivnega faktorja smo narisali umeritveno krivuljo. Iz enačbe umeritvene krivulje in z upoštevanjem redčitve vzorcev smo nato iz absorbanc vzorcev izračunali koncentracijo aktivnega tkivnega faktorja v vzorcih.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Ateroskleroza je bila prvič opisana že v začetku 20. stoletja, kljub temu pa še vedno ne poznamo vseh podrobnosti razvoja in napredovanja te bolezni. Pojavile so se različne hipoteze o nastanku ateroskleroze, danes pa vemo, da je to multikomponentna bolezen z vnetjem kot eno glavnih komponent, ki se začne z disfunkcijo endotelija.

Endotelij različnih žil je zelo heterogen zaradi izpostavljenosti različnim pogojem in opravljanja specifičnih funkcij. Endotelijske celice različnih tkiv se različno odzivajo na spremembe v okolju. Lakota in sodelavci (20) so proučevali odzive različnih tipov endotelijskih celic na stimulacijo z vnetnimi molekulami, kot sta IL-1 β in serumski amiloid A (SAA). Pokazali so, da se človeške endotelijske celice koronarnih arterij (HCAEC) močneje odzivajo na SAA v primerjavi z ostalimi endotelijskimi celicami in izražajo večjo vnetno aktivnost. To bi lahko bil tudi eden od vzrokov za večjo občutljivost endotelija koronarnih arterij za razvoj ateroskleroze. Zato smo tudi v naših poskusih proučevali odzive človeških endotelijskih celic koronarnih arterij.

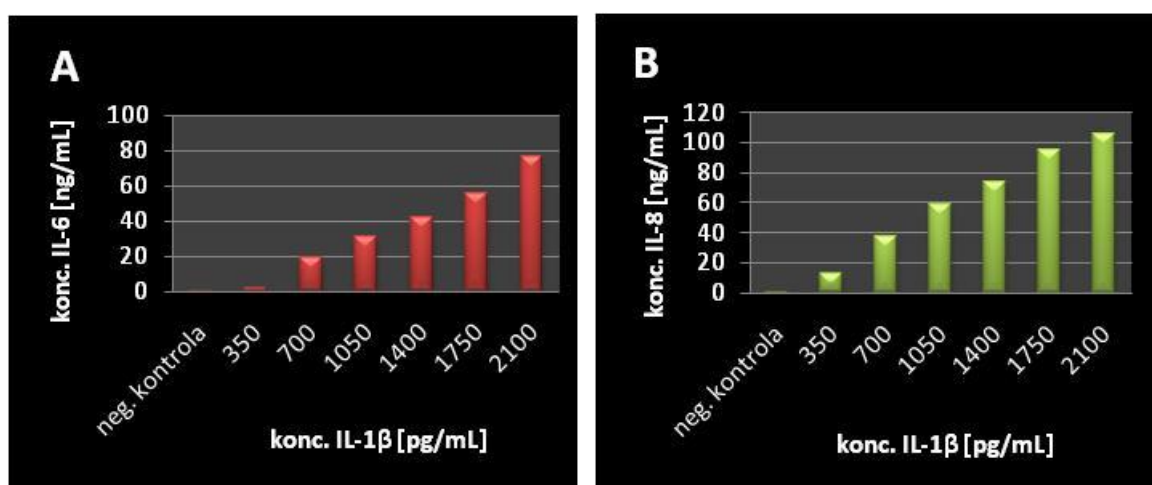
SAA ima dokazano vlogo v razvoju ateroskleroze, vendar so mehanizmi delovanja SAA v procesu aterogeneze še slabo raziskani (20). Nekaj študij je pokazalo, da SAA sproži vnetni odziv med drugim tudi v endotelijskih celicah. Zhao in sodelavci so pokazali tudi koagulantni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA preko izražanja tkivnega faktorja (24). Nas pa je zanimalo, ali SAA sproži tudi izločanje mikroveziklov iz HCAEC in kakšne so lastnosti sproščenih mikroveziklov. Številni avtorji endotelijske mikrovezikle vse bolj povezujejo z endotelijsko disfunkcijo, ki je zelo pomemben dejavnik v patologiji ateroskleroze (32). Poleg tega so klinične študije pokazale povečano število endotelijskih mikroveziklov pri koronarni arterijski bolezni (53) in kopičenje endotelijskih mikroveziklov v aterosklerotični lehi (54). Ker mikrovezikle povezujejo tudi z vnetnimi stanji in trombotičnimi zapleti, nas je zanimalo, ali so endotelijski mikrovezikli lahko pokazatelji vnetne in koagulantne aktivnosti endotelijskih celic. Pri odločanju glede koncentracije IL-1 β ali SAA za stimulacijo celic smo se oprli na študije Lakote in sodelavcev (20, 33). Uporabili smo tisti razpon koncentracij IL-1 β , kjer se je količina IL-6, izločenega iz HCAEC, povečevala vzporedno s koncentracijo IL-1 β . Za stimulacijo celic s SAA smo uporabili tisto koncentracijo SAA, ki je patološko pomembna in je pokazala znaten vnetni odziv HCAEC, merjen s količino izločenega IL-6.

Mikrovezikle smo izolirali z metodo diferencialnega centrifugiranja in jih analizirali s pretočno citometrijo. Pred začetkom dela smo pregledali literaturo o različnih metodah izolacije mikroveziklov in razvili prilagojeno metodo, ki je ustrezala načrtovanim poskusom in možnostim analize. Da bi preverili metodi izolacije in določanja mikroveziklov, smo v preliminarnih poskusih celice stimulirali z IL-1 β , ki dokazano sproži mikrovezikulacijo v endotelijskih celicah (19).

4.1 Merjenje vnetnih parametrov in števila mikroveziklov po stimulaciji HCAEC z IL-1 β

IL-1 β je ključni vnetni citokin, ki sproži vnetje v različnih celičnih tipih. IL-1 β povzroči tudi izločanje mikroveziklov v različnih celicah, med drugim tudi v endotelijskih celicah (19). Nismo pa zasledili študije, ki bi povezala mikrovezikulacijo v *in vitro* poskusih z značilnimi pokazatelji vnetja kot sta na primer citokin IL-6 in kemokin IL-8.

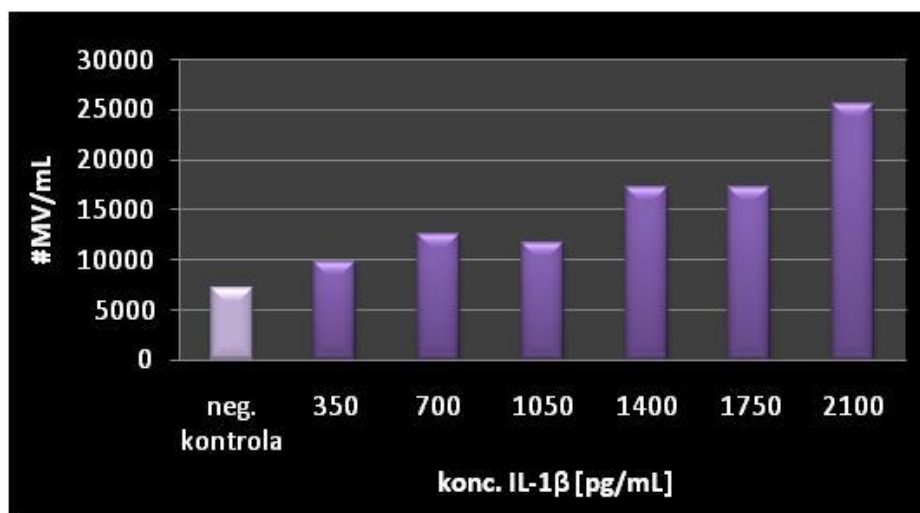
Izvedli smo tri ponovitve poskusa, pri čemer smo celice stimulirali z naraščajočimi koncentracijami IL-1 β . Pri izbiri ustreznih koncentracij so nam bili v pomoč predhodni poskusi na istem tipu endotelijskih celic (Lakota in sodelavci, 33). Vnetni odziv celic smo določali preko prisotnosti vnetnih pokazateljev IL-6 in IL-8 v supernatantu z metodo ELISA. Rezultati so prikazani na sliki 11. Količini obeh proteinov sta naraščali z naraščajočo koncentracijo IL-1 β , kar potrjuje rezultate predhodnih poskusov (33).



Slika 11: Odvisnost koncentracij IL-6 (A) oziroma IL-8 (B) od koncentracije IL-1 β (350-2100 pg/mL). Koncentraciji IL-6 in IL-8 (določeni z metodo ELISA) naraščata z naraščajočo koncentracijo IL-1 β . Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. Prikazane so povprečne vrednosti dveh poskusov. neg. kontrola – negativna kontrola.

Različni avtorji navajajo, da IL-1 β sproži izločanje mikroveziklov iz različnih celičnih tipov, na primer iz monocitov, gladkomišičnih celic, hepatocitov (4) ter tudi iz endotelijskih celic. Collier in sodelavci (19) so kulturo človeških endotelijskih celic popkovne vene (HUVEC) stimulirali z IL-1 β in dokazali izločanje mikroveziklov, zato smo sklepali, da bo tudi stimulacija HCAEC z IL-1 β sprožila mikrovezikulacijo.

Mikrovezikle smo izolirali po protokolu in jih analizirali s pretočno citometrijo. Število mikroveziklov je naraščalo z naraščajočo koncentracijo IL-1 β (slika 12). Tudi v vzorcu negativne kontrole smo zaznali manjše število mikroveziklov, kar se sklada z rezultati podobnih študij (55). Razlog bi lahko bil v nespecifični aktivaciji ali apoptozi celic, saj so le te 24 ur izpostavljene gojišču, ki ne vsebuje FBS. Variabilnost naraščanja števila mikroveziklov je lahko posledica nekoliko različnega števila celic v posamezni vdolbinici, kar lahko vpliva na končno število mikroveziklov, ki jih celice izločijo v supernatant.



Slika 12: Odvisnost števila mikroveziklov od koncentracije IL-1 β (350-2100 pg/mL). Število mikroveziklov narašča z naraščajočo koncentracijo IL-1 β . Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. Število mikroveziklov je podano kot število v 1 mL supernatanta. Prikazan je reprezentativen graf treh ponovitev poskusa. #MV – število mikroveziklov, neg. kontrola – negativna kontrola.

Mikrovezikle smo določali v supernatantu po odstranitvi celičnih ostankov in jih definirali kot delce, ki so manjši od 1 μ m. Podobno so na osnovi velikosti mikrovezikle definirali tudi številni drugi avtorji (35, 56). V številnih študijah so mikrovezikli definirani z dodatnim merilom, in sicer kot delci, manjši od 1 μ m in pozitivni na aneksin A5. Vendar pa del mikroveziklov, predvsem tistih netrombocitnega izvora, ne izraža fosfatidilserina na svoji površini in zato ne vežejo aneksina A5 na svojo površino. Zato smo celotno število mikroveziklov v naših poskusih določili na osnovi velikosti kot število vseh delcev, manjših od 1 μ m. Na pretočnem citometru smo izmerili tudi število delcev, manjših od

1 μm , v samem pufu (PBS citrat) in v supernatantu brez mikroveziklov. V obeh primerih je bilo število delcev znotraj regije mikroveziklov zanemarljivo (manj kot 5 % vseh delcev).

Zaključimo lahko, da je mikrovezikulacija endotelijskih celic odvisna od koncentracije IL-1 β . Celotno število mikroveziklov narašča z naraščajočo koncentracijo IL-1 β in sledi vnetnim pokazateljem aktivacije celic, količini IL-6 in IL-8. Poskusi so pokazali, da je prilagojena metoda primerna za izolacijo mikroveziklov iz endotelijskih celičnih kultur in smo jo uporabili tudi v nadaljnjih poskusih.

4.2 Mikrovezikli kot pokazatelji vnetnega odziva celic

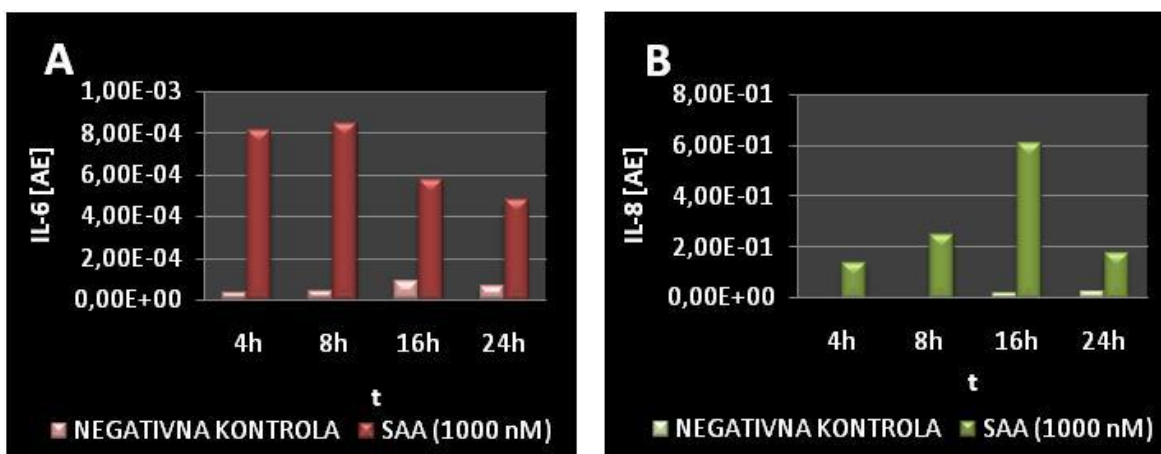
Akutno-fazni protein SAA preko različnih mehanizmov sodeluje v procesu ateroskleroze, vendar do sedaj še ni bilo raziskano, ali vpliva tudi na izločanje mikroveziklov, za katere je znano, da se kopičijo v aterosklerotičnih lehah in prispevajo k razvoju ateroskleroze. V prvem delu poskusov s SAA smo zato preverili, ali stimulacija endotelijskih celic koronarnih arterij s SAA sproži mikrovezikulacijo in kako je ta odvisna od časa stimulacije celic. Zanimalo pa nas je tudi, ali mikrovezikulacija sledi vnetnemu odzivu in aktivaciji celic. Vnetni odziv celic smo preverili z določanjem IL-6 in IL-8 na nivoju mRNA in proteinov, aktivacijo celic pa preko izražanja CD62E na nivoju mRNA in izločanja mikroveziklov, pozitivnih na CD62E.

Za stimulacijo celic smo uporabljali rekombinantni človeški SAA, ki izvira iz *E.coli* in zato lahko vsebuje endotoksine, ki bi lahko vplivali na stimulacijo celic. Zato smo v enem od poskusov SAA pred nanosom segrevali 30 minut na 100 °C. S tem smo inaktivirali SAA, zato bi pozitiven rezultat mikrovezikulacije v tem primeru pomenil, da SAA vsebuje sledi endotoksinov, ki povzročajo nastanek mikroveziklov. Število mikroveziklov smo določali po 4 in 24 urah stimulacije endotelijskih celic s temperaturno inaktiviranim SAA. Rezultat števila mikroveziklov je bil primerljiv z negativno kontrolo - pri 4 urah je bilo število mikroveziklov 1,3-krat večje od negativne kontrole, pri 24 urah pa 0,7-krat manjše od negativne kontrole. V vzorcu, stimuliranem z neobdelanim SAA, je bilo število mikroveziklov pri 4 urah 4,6-krat in pri 24 urah 1,9-krat večje od števila mikroveziklov v negativni kontroli. Iz tega lahko sklepamo, da je mikrovezikulacija v primeru stimulacije celic s SAA res posledica delovanja SAA in ne endotoksina.

4.2.1 Vnetni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA

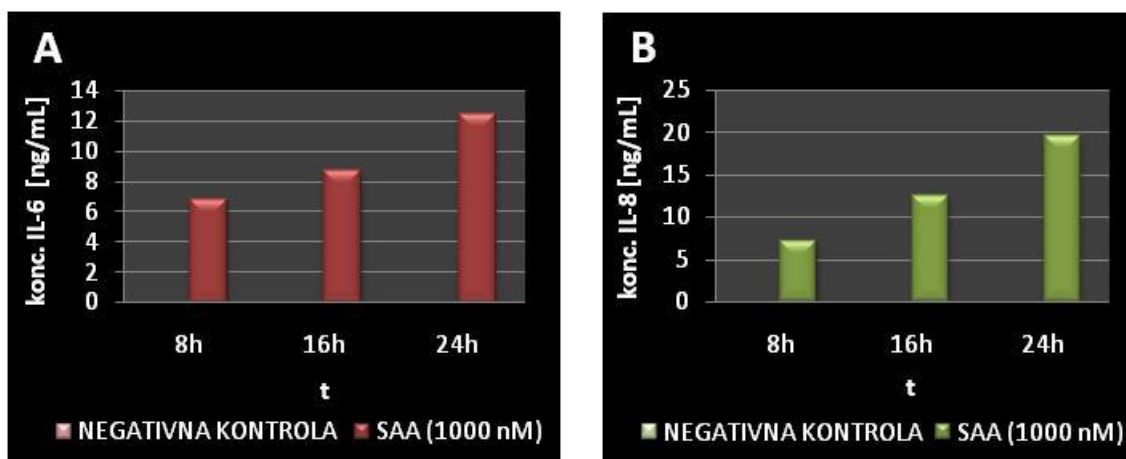
Vnetni odziv celic lahko ovrednotimo na različne načine. Najpogosteje ga določamo preko izločanja molekul, za katere je znano, da sodelujejo v vnetju. Različni avtorji so vnetni odziv v endotelijskih celicah določali preko povečanega izražanja adhezijskih molekul (žilno-celična adhezijska molekula, znotrajcelična adhezijska molekula), selektina E, SAA, različnih interleukinov (IL-1, IL-6, IL-8), prostaglandinov in drugih dejavnikov (20, 57). V naših poskusih smo vnetni odziv endotelijskih celic ovrednotili z izločanjem citokina IL-6 in kemokina IL-8.

S PCR v realnem času smo primerjali izražanje genov za citokin IL-6 in kemokin IL-8 v celicah, stimuliranih s SAA, relativno glede na negativno kontrolo. Analiza izražanja genov je pokazala, da sta se oba gena povečano izražala v celicah, stimuliranih s SAA, v primerjavi s celicami, ki niso bile stimulirane (slika 13). Gen za IL-6 se je močno izražal že po 4 urah stimulacije in dosegel najvišjo raven po 8 urah stimulacije. Gen za IL-8 je dosegel maksimalno izražanje po 16 urah stimulacije.



Slika 13: Izražanje gena za **IL-6** (A) oz. **IL-8** (B) v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). V celicah, stimuliranih s SAA, se gena za IL-6 in IL-8 povečano izražata v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v gojišču CA-PM 0 % FBS. AE – arbitrarne enote (povprečna normalizirana ekspresija glede na beta aktin), t – čas stimulacije.

Da bi določili vnetni odziv celic v odvisnosti od časa stimulacije endotelijskih celic s SAA, smo izmerili količini IL-6 in IL-8 v supernatantih z metodo ELISA. Celice, stimulirane s SAA, so v primerjavi z nestimuliranimi celicami izločale velike količine obeh proteinov (slika 14). Količina IL-6 in IL-8 je enakomerno naraščala s časom stimulacije celic. Vnetni odziv celic na stimulacijo s SAA je torej relativno pozen, saj smo največje koncentracije vnetnih proteinov zaznali po 24 urah stimulacije.



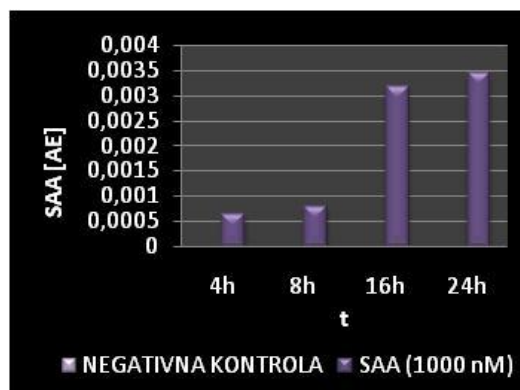
Slika 14: Odvisnost koncentracije izločenega IL-6 (A) oz. IL-8 (B) od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). Količina obeh vnetnih proteinov narašča s časom stimulacije celic s SAA. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v gojišču CA-PM 0 % FBS. Prikazana sta reprezentativna grafa analiz dveh poskusov. t – čas stimulacije.

Yang in sodelavci (58) so pokazali, da je izločanje IL-6 in IL-8 iz aktiviranih HCAEC po stimulaciji s SAA povezano z metaboličnimi zapletmi pri debelosti. Lakota in sodelavci (20) so raziskali vpliv koncentracije SAA na vnetni odziv v HCAEC in pokazali, da je izločanje IL-6 in IL-8 odvisno od koncentracije SAA. Z našimi poskusi pa smo raziskali še časovni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA in pokazali, da vnetni odziv narašča s časom stimulacije celic z SAA.

IL-6 in IL-8 imata pomembno vlogo tudi pri aterosklerozi. Kemokin IL-8 poveča infiltracijo levkocitov v intimo arterije, citokin IL-6 pa stimulira aktivacijo in vnetno aktivnost različnih celic. Povišane vrednosti IL-8 v serumu so povezane s koronarno arterijsko boleznijo, IL-6 v serumu pa je samostojen napovedni dejavnik za ishemične dogodke (17). Sproščanje IL-6 in IL-8 iz endotelijskih celic je tako lahko eden od mehanizmov delovanja SAA pri pospeševanju aterogeneze.

Pomemben učinek SAA na endotelijske celice, ki tudi spodbuja vnetje, je aktivacija izražanja lastne mRNA. Meek in sodelavci so prvi poročali o izražanju gena za SAA v endotelijskih celicah (20). Lakota in sodelavci (20) pa so prvič pokazali izražanje gena za SAA v HCAEC po stimulaciji s SAA in tako nakazali prisotnost pozitivne povratne zanke. Izražanje gena za SAA je naraščalo z naraščajočo koncentracijo SAA. V naših poskusih smo analizirali še časovno odvisnost izražanja gena za SAA. Pokazali smo, da celice, stimulirane s SAA, v primerjavi z nestimuliranimi celicami izražajo gen za SAA, kar je v skladu s prejšnjimi študijami (slika 15). Izražanje gena za SAA je bilo večje od negativne kontrole že po 4 urah stimulacije, velik porast pa smo zaznali po 16 urah stimulacije celic z SAA.

Z naraščanjem izražanja gena za SAA lahko narašča tudi izločanje SAA iz celic. Izločen SAA lahko prispeva k aktivaciji celic s SAA, kar lahko vodi v kronični ireverzibilni krog vnetja in aktivacije endotelijskih celic in s tem k razvoju in pospeševanju ateroskleroze. Količino tako izločenega SAA bi lahko določili v celičnih supernatantih z metodo ELISA, ki omogoča določitev SAA v območju koncentracij od 5 do 600 ng/mL. V naših poskusih to ni bilo možno, saj bi določanje novo izločenega proteina motila prisotnost SAA (12 µg/mL), ki smo ga dodali za stimulacijo celic. Zato količine SAA v supernatantu nismo določali.



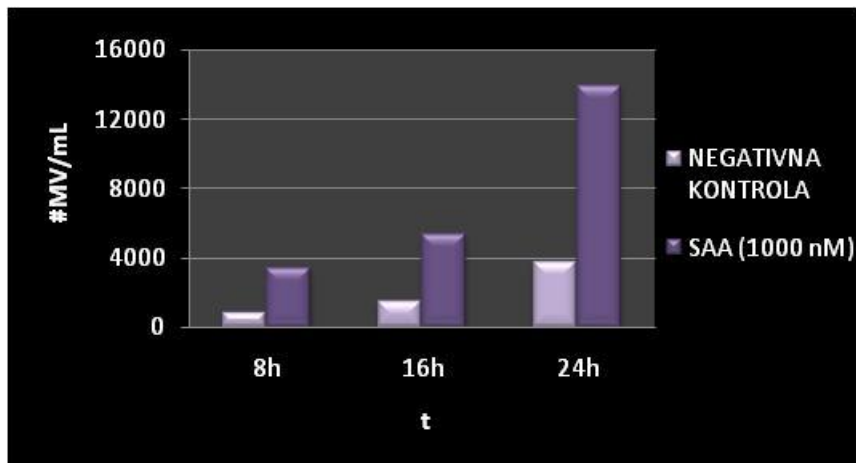
Slika 15: Izražanje gena za SAA v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM) v primerjavi z negativno kontrolo. Izražanje gena za SAA je prisotno samo v celicah, stimuliranih s SAA, in narašča s časom stimulacije celic. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. AE – arbitrarne enote (povprečna normalizirana ekspresija). t – čas stimulacije.

4.2.2 Mikrovezikli kot pokazatelji vnetnega odziva HCAEC

Kot nov pristop k določanju vnetnega odziva celic smo v naši študiji določali število mikroveziklov. Mnoge *in vivo* študije so pokazale povečano število mikroveziklov v vnetnih stanjih, na primer pri sladkorni bolezni tipa I, multipli sklerozi, sepsi, revmatoidnem artritisu in koronarni arterijski bolezni (34). Tako so mikrovezikli po eni strani pokazatelji vnetnega stanja, po drugi strani pa lahko delujejo kot sodejavniki vnetja, saj so *in vitro* študije dokazale njihovo vlogo na primer pri adheziji levkocitov na endotelij ter sproščanju citokinov in novih mikroveziklov iz različnih celičnih tipov (34). Da bi ocenili, ali so mikrovezikli pokazatelji vnetnega odziva HCAEC po stimulaciji s SAA, smo primerjali celotno število izločenih mikroveziklov s količino IL-6 in IL-8.

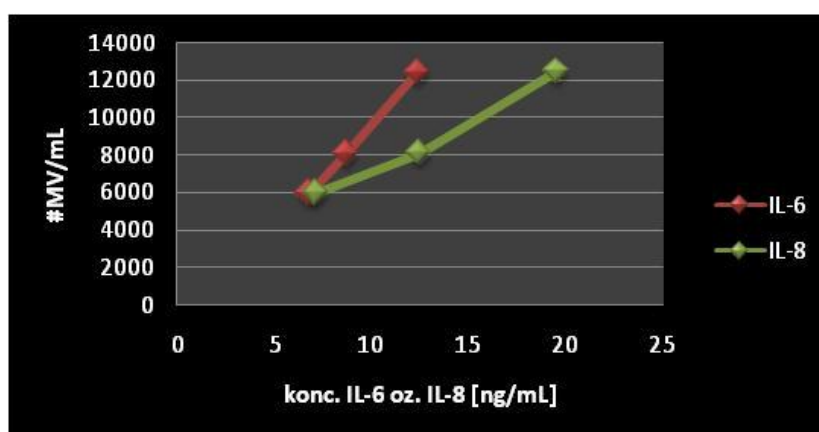
Slika 16 prikazuje število mikroveziklov v 1 mL vzorca glede na čas stimulacije HCAEC s SAA. Število mikroveziklov je bilo v vzorcih, stimuliranih s SAA, od 3,6 do 3,8-krat večje od števila mikroveziklov v nestimuliranih vzorcih pri vseh časih stimulacije. Število mikroveziklov v vzorcih negativne kontrole je naraščalo s časom podobno kot v preliminarnih poskusih, kar lahko potrjuje domnevo, da se mikrovezikli sproščajo tudi po nespecifični aktivaciji ali apoptozi celic zaradi pomanjkanja FBS v rastnem gojišču. Tudi drugi avtorji so pokazali, da gojenje celičnih kultur v odsotnosti FBS lahko privede do aktivacije različnih celičnih tipov (60) in do mikrovezikulacije. Do sedaj pa v literaturi še

nismo zasledili podatka, ali odvzem FBS vpliva tudi na mikrovezikulacijo HCAEC, zato smo v vsakem poskusu obseg mikrovezikulacije preverili tudi v nestimuliranih celicah. Ugotovili smo, da se mikrovezikli sproščajo tudi v vzorcih negativne kontrole, vendar pa je prispevek tega majhen v primerjavi s stimulacijo celic s SAA.



Slika 16: Število izoliranih mikroveziklov v odvisnosti od časa stimulacije celic s SAA (1000 nM). Število mikroveziklov narašča s časom stimulacije celic. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. Število mikroveziklov je podano kot število v 1 mL supernatanta. Graf predstavlja povprečje in standardni odklon treh ponovitev poskusa. #MV – število mikroveziklov, t – čas stimulacije.

Celotno število mikroveziklov v vzorcih, stimuliranih s SAA, je naraščalo s časom stimulacije celic podobno kot količina IL-6 in IL-8. Slika 17 prikazuje skoraj linearno povezavo med količino vnetnih pokazateljev IL-6 oziroma IL-8 in številom mikroveziklov. Pearsonov koeficient za IL-6 je 1,000, za IL-8 pa 0,993. Da bi lahko definirali statistično značilnost povezave, bi potrebovali več meritev. Sklepamo lahko, da so mikrovezikli eden od pokazateljev vnetnega odziva HCAEC skupaj z IL-6 in IL-8.



Slika 17: Povezava med številom mikroveziklov v vzorcih, stimuliranih s SAA, in količino vnetnih pokazateljev, IL-6 (rdeča) oziroma IL-8 (zeleni). Predstavljeni so rezultati reprezentativnega poskusa dveh ponovitev. #MV – število mikroveziklov.

4.2.3 Površinski označevalci endotelijskih mikroveziklov

Ker je za učinkovanje mikroveziklov poleg njihovega števila pomembna tudi njihova sestava, nas je zanimalo, katere molekule se izražajo na površini mikroveziklov in ali je izražanje teh molekul na mikroveziklih povezano z vnetnim odzivom endotelijskih celic po stimulaciji s SAA.

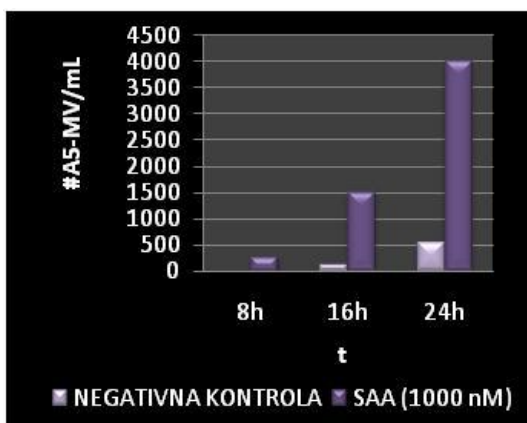
Mikrovezikli na svoji površini prenašajo številne molekule, preko katerih lahko sklepamo, iz katerih celic izvirajo in kakšne so njihove možne funkcije. V naših poskusih smo mikrovezikle označili s proteinom aneksinom A5, da bi določili prisotnost fosfatidilserina na površini mikroveziklov, merili pa smo tudi prisotnost dveh endotelijskih površinskih molekul, ki so značilne za endotelijske mikrovezikle, in sicer CD62E in CD31.

4.2.3.1 Mikrovezikli, pozitivni na aneksin A5

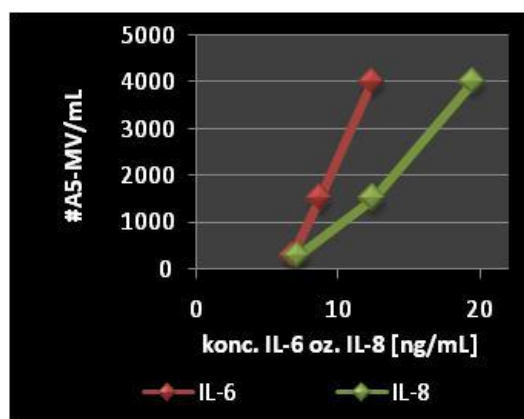
Vezava aneksina A5 na površino mikroveziklov je posledica izpostavljanja fosfatidilserina v zunanji plasti njihove membrane. Fosfatidilserin je anionski fosfolipid, ki predstavlja katalitično površino za aktivacijo koagulacijske kaskade preko tkivnega faktorja. Da bi določili izražanje fosfatidilserina na membrani mikroveziklov, smo določali vezavo aneksina A5 na mikrovezikle.

Delež mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, je naraščal s časom stimulacije endotelijskih celic s SAA (podatki niso prikazani). Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, je prav tako naraščalo s časom stimulacije celic (slika 18) in je bilo v vzorcih, stimuliranih s SAA, od 7,3 do 11,6-krat večje kot v vzorcih negativne kontrole. Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, narašča tudi vzporedno s količino IL-6 in IL-8 (slika 19).

Zaključimo lahko, da stimulacija HCAEC s SAA sproži časovno odvisno izločanje endotelijskih mikroveziklov, ki na zunanji strani svoje membrane izražajo fosfatidilserin in zato lahko pospešujejo koagulacijo. Število teh mikroveziklov narašča s časom stimulacije celic z SAA in sledi vnetnemu odzivu HCAEC.



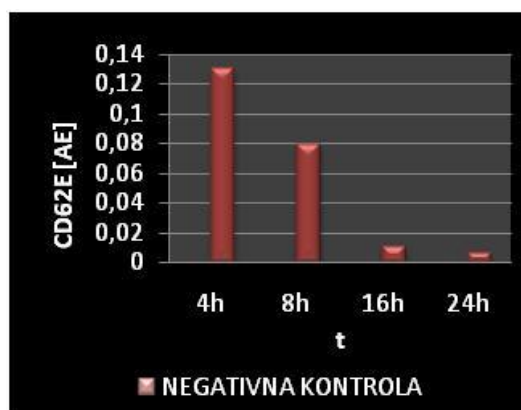
Slika 18: Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, narašča s časom stimulacije celic. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. #A5-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, t – čas stimulacije.



Slika 19: Povezava med številom mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, in količino IL-6 (rdeča) oz. IL-8 (zeleni). #A5-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5.

4.2.3.2 Mikrovezikli, pozitivni na CD62E

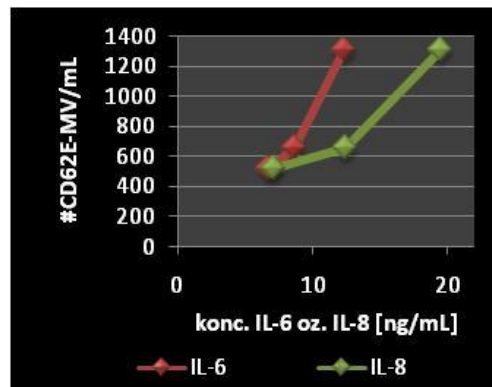
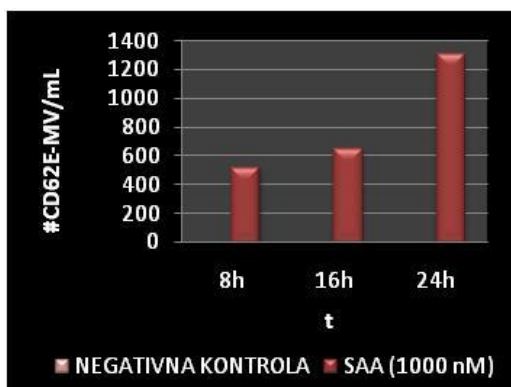
Mikrovezikli so odraz aktivacije ali apoptoze celic, iz katerih izvirajo. Pokazatelj aktivacije endotelijskih celic je selektin E ali CD62E. Da bi določili aktivacijo celic, stimuliranih s SAA, v primerjavi z negativno kontrolo, smo določali izražanje gena za CD62E v endotelijskih celicah in prisotnost proteina CD62E na mikroveziklih. Analiza izražanja gena je prikazana na sliki 20, kjer vidimo, da je bilo izražanje gena za CD62E v celicah, stimuliranih s SAA, zelo izrazito v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Izražanje je bilo največje po 4 urah stimulacije in je padalo s časom stimulacije celic.



Slika 20: Izražanje gena za CD62E v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM) v primerjavi z negativno kontrolo. Izražanje CD62E je prisotno samo v stimuliranih celicah. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v gojišču CA-PM 0 % FBS. AE – arbitrarne enote (povprečna normalizirana ekspresija), t – čas stimulacije.

Da bi določili, ali so mikrovezikli lahko pokazatelji aktivacije endotelijskih celic po stimulaciji s SAA, smo s pomočjo specifičnih monoklonskih protiteles in pretočne citometrije določili delež mikroveziklov, ki na svoji površini izražajo CD62E. Delež mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, je nekoliko padel s časom stimulacije (podatki niso

prikazani), kar lahko odraža zmanjšano časovno odvisno izražanje gena za CD62E v celicah. Absolutno število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, pa je naraščalo s časom stimulacije (slika 21). V vzorcih negativne kontrole nismo zaznali mikroveziklov, pozitivnih na CD62E. Število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, iz celic, stimuliranih s SAA, je naraščalo vzporedno s količino IL-6 in IL-8 (slika 22). Zaključimo lahko, da je število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, pokazatelj aktivacije endotelijskih celic s SAA in da sledi vnetnemu odzivu HCAEC, stimuliranih s SAA.



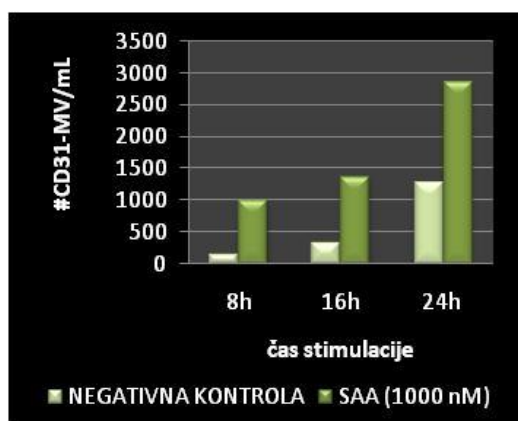
Slika 21: Število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). Število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, narašča s časom stimulacije celic. V vzorcih negativne kontrole ne zaznamo mikroveziklov, pozitivnih na CD62E. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. #CD62E-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, t – čas stimulacije.

Slika 22: Povezava med številom mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, in količino IL-6 (rdeča) oziroma IL-8 (zelena). #CD62E-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E.

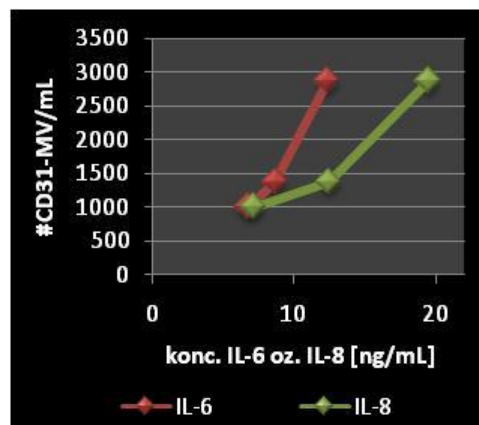
Jimenez in sodelavci (59) so proučevali fenotipske razlike med endotelijskimi mikrovezikli, nastalimi po aktivaciji ali apoptozi endotelijskih celic. Pokazali so, da so mikrovezikli, pozitivni na CD62E, značilni za aktivacijo celic. Podobne rezultate so pokazali tudi Garcia in sodelavci (61). Tudi rezultati naših poskusov kažejo, da se CD62E izraža le na mikroveziklih, ki jih sproščajo celice, aktivirane s SAA, na mikroveziklih iz celic, ki niso stimulirane, pa se ne izraža. Pokazali smo torej, da SAA sproži aktivacijo endotelijskih celic, kar se odraža tudi na mikroveziklih. SAA torej aktivira endotelijske celice, aktivacija endotelija s sproščanjem mikroveziklov pa lahko vodi v endotelijsko disfunkcijo, ki je temeljni proces za začetek aterogeneze.

4.2.3.3 Mikrovezikli, pozitivni na CD31

CD31 ali trombocitna-endotelijska adhezijska molekula (PECAM-1) se na endoteliju izraža konstitutivno in neodvisno od stimulacije. Zato pričakujemo, da se bo enako izražala tako na endotelijskih celicah, stimuliranih s SAA, kot tudi na nestimuliranih endotelijskih celicah, kar smo potrdili v naših poskusih (podatki niso prikazani). Tudi razlika v deležu mikroveziklov, pozitivnih na CD31, med vzorci, stimuliranimi s SAA, in negativno kontrolo je bila zelo majhna. Delež mikroveziklov, pozitivnih na CD31, se je v obeh primerih gibal med 20 in 30 % (podatki niso prikazani). CD62E je bil torej prisoten le na mikroveziklih iz celic, stimuliranih s SAA, CD31 pa se je izražal tako na mikroveziklih iz celic, stimuliranih s SAA, kot tudi na mikroveziklih iz vzorcev negativne kontrole. Zato se CD31 v *in vitro* sistemih pogosto uporablja kot splošni pokazatelj endotelijskih mikroveziklov. Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, je naraščalo s časom stimulacije endotelijskih celic s SAA (slika 23) in je bilo sorazmerno količini IL-6 in IL-8 (slika 24). Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, je bilo v vzorcih, stimuliranih s SAA, od 2,4 do 5,7-krat večje kot v vzorcih negativne kontrole.



Slika 23: Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, narašča s časom stimulacije celic in je v stimuliranih vzorcih veliko večje kot v vzorcih negativne kontrole. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. #CD31-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, t – čas stimulacije.



Slika 24: Povezava med številom mikroveziklov, pozitivnih na CD31, in koncentracijo IL-6 (rdeča) in IL-8 (zelena). #CD31-MV – število mikroveziklov, pozitivnih na CD31.

Endotelijski mikrovezikli, pozitivni na CD62E ali CD31, so povezani s srčno-žilnimi boleznimi. Garcia in sodelavci (61) so pokazali, da imajo bolniki z odpovedjo srca v periferni krvi povečano število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, v primerjavi z

zdravimi prostovoljci. Povečane vrednosti mikroveziklov, pozitivnih na CD62E, so bile pri bolnikih s pljučno hipertenzijo povezane s kliničnimi zapleti bolezni (Amabile in sodelavci, 49). Werner in sodelavci (46) so pokazali da je število mikroveziklov, pozitivnih na CD31 in aneksin A5, pokazatelj endotelijske disfunkcije pri koronarni arterijski bolezni. Garcia in sodelavci (61) so določili statistično značilno povečano število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, pri bolnikih s srčno odpovedjo.

Celični mikrovezikli lahko preko različnih mehanizmov vplivajo na okvaro endotelija in aterosklerozo. Trombocitni mikrovezikli lahko aktivirajo endotelij in vplivajo na izražanje tromboksana A₂, ciklooksigenaze-2 in prostaglandina I₂ in s tem modulirajo tonus žil. Levkocitni mikrovezikli stimulirajo izločanje IL-6 iz endotelija in zmanjšajo sintezo endotelijske sintaze dušikovega monoksida (NO). Tudi endotelijski mikrovezikli vplivajo na disfunkcijo endotelija, med drugim preko regulacije sinteze NO (5, 62). Mikrovezikli lahko tudi pospešujejo koagulacijo (34) in prispevajo k zapletom ateroskleroze.

Kronično povečane vrednosti SAA prav tako lahko prispevajo k procesom, ki vodijo v aterosklerozo, med drugim SAA vpliva tudi na disfunkcijo endotelija. Wang in sodelavci (63) so pokazali, da SAA vpliva na sintezo NO v HCAEC preko zmanjšanja delovanja endotelijske sintaze NO in povečanja reaktivnih kisikovih spojin v HCAEC. SAA vpliva tudi na sintezo tkivnega faktorja in citokinov v endoteliskih celicah (24). SAA torej preko različnih mehanizmov povzroča disfunkcijo endotelija, prav tako tudi mikrovezikli. V naših poskusih smo pokazali, da SAA sproži izločanje endotelijskih mikrovezikov, kar je lahko eden od patoloških mehanizmov delovanja SAA poleg sproščanja citokinov in kemokinov ter aktivacije izražanja lastne mRNA.

V okviru proučevanja vnetnega odziva HCAEC po stimulaciji s SAA smo prišli do naslednjih zaključkov: SAA sproži vnetni odziv HCAEC, ki je odvisen od časa stimulacije celic. Vnetni odziv HCAEC, ki smo ga določali preko izločanja citokina IL-6 in kemokina IL-8, narašča s časom stimulacije celic s SAA. Poleg tega SAA sproži mikrovezikulacijo v HCAEC, kar je lahko eden od možnih mehanizmov delovanja SAA. Primerjava citokinskega in kemokinskega odziva s številom mikroveziklov je pokazala, da so endotelijski mikrovezikli lahko pokazatelji vnetne aktivacije HCAEC skupaj z IL-6 in IL-8. Pokazali smo tudi, da število mikroveziklov, pozitivnih na CD62E ali CD31, ki so povišani v različnih srčno-žilnih boleznih, narašča s časom stimulacije HCAEC s SAA.

4.3 Mikrovezikli kot pokazatelji koagulantnega odziva celic

Klinične manifestacije ateroskleroze, kot je akutni koronarni sindrom, so večinoma posledica pretrganja aterosklerotične lehe, kar sproži nastanek krvnega strdka s posledično zaporo žile (32). Vloga mikroveziklov v strjevanju krvi je bila potrjena z mnogimi študijami. Mikrovezikli, izolirani iz krvi bolnikov s trombotičnimi zapleti, delujejo prokoagulantno (5). Njihova prokoagulantna aktivnost bi lahko bila klinično pomembna v stanjih, ko je število mikroveziklov v krvi povečano, na primer pri akutnem koronarnem sindromu, venski trombozi, vaskulitisu in trombotični trombocitopenični purpuri (5).

Endotelijski mikrovezikli so lahko vpleteni v trombogenezo preko izražanja fosfatidilserina, tkivnega faktorja, številnih adhezijskih molekul, ki omogočajo vezavo na različne aktivirane celice in drugih molekul, ki sodelujejo v koagulaciji (43). Z vezavo aneksina A5 na mikrovezikle smo v naših poskusih pokazali, da se fosfatidilserin izraža tudi na površini mikroveziklov, ki jih izločajo endotelijske celice po stimulaciji s SAA (stran 48). Število mikroveziklov, pozitivnih na aneksin A5, je naraščalo s časom stimulacije celic s SAA. Fosfatidilserin predstavlja katalitično površino za aktivacijo različnih koagulacijskih faktorjev, pomembno pa prispeva tudi k aktivnosti tkivnega faktorja, saj poveča katalitično učinkovitost kompleksa TF/FVIIa.

Tkivni faktor je najpomembnejši aktivator koagulacije *in vivo*. Znano je, da se tkivni faktor kopiči v aterosklerotičnih lehah, tudi v obliki mikroveziklov (26, 30). Povečane količine mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, ki izvirajo iz različnih tipov celic, so značilne za mnoge vnetne in srčno-žilne bolezni, med drugim tudi za aterosklerozo (29).

Zhao in sodelavci (24) so v nedavni študiji pokazali, da SAA stimulira izražanje gena za tkivni faktor v HCAEC ter poveča ekspresijo in aktivnost tkivnega faktorja v HUVEC. Podrobnejša analiza je pokazala, da je povečanje izražanja in aktivnosti tkivnega faktorja izrazito po 2 do 8 urah stimulacije celic s SAA in pada s časom stimulacije.

Vloga SAA v aterosklerozi je že potrjena, manj pa je raziskana povezava med SAA in trombozo. Lakota in sodelavci (23) so izmerili povišane vrednosti SAA v serumu bolnikov z avtoimunskimi boleznimi, za katere so značilni trombotični zapleti, v primerjavi s serumi zdravih prostovoljcev. Opisana so bila tudi avtoprotitelesa proti SAA in povezava med količino protiteles proti SAA in globoko vensko ter arterijsko trombozo (23, 66). Kljub temu pa so mehanizmi delovanja SAA pri trombozi še slabo pojasnjeni.

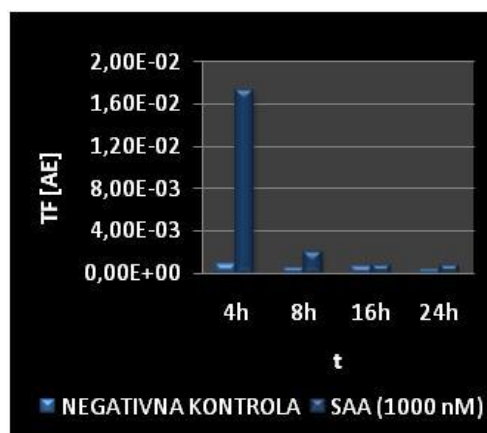
Ker so tako SAA kot tudi mikrovezikli, pozitivni na tkivni faktor, povezani s trombozo, smo preverili, ali stimulacija HCAEC s SAA sproži tudi izločanje mikroveziklov, ki izražajo tkivni faktor na svoji površini, in kako izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih sledi izražanju tkivnega faktorja na HCAEC.

4.3.1 Koagulantni odziv HCAEC po stimulaciji s SAA

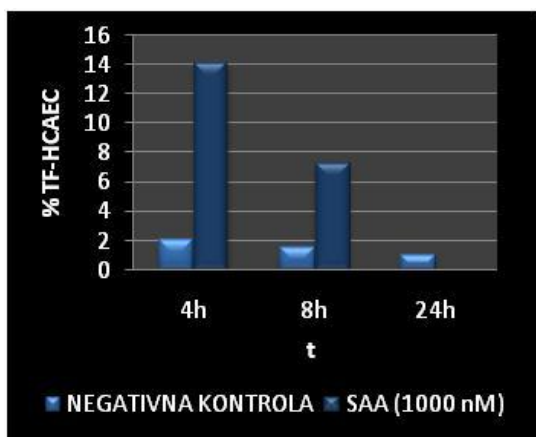
Analiza izražanja gena za tkivni faktor je potrdila rezultate prejšnjih študij (slika 25). Sinteza tkivnega faktorja v HCAEC se je močno povečala po 4 urah stimulacije s SAA v primerjavi z negativno kontrolo, že po 8 urah pa je močno padla in je bila po 16 urah že primerljiva z vzorci negativne kontrole.

V naslednjem koraku smo določali prisotnost in aktivnost tkivnega faktorja na endotelijskih celicah. Na sliki 26 vidimo, da je bil delež HCAEC, ki na svoji membrani izražajo tkivni faktor, največji po 4 urah stimulacije celic s SAA. Tudi po 8 urah je bil delež HCAEC, pozitivnih na tkivni faktor, večji od negativne kontrole, po 24 urah pa nismo več opazili razlike med celicami, stimuliranimi z SAA in negativno kontrolo. Ker tkivni faktor, ki ga zaznamo s protitelesi, ni nujno tudi encimsko aktiven, smo naredili tudi analizo aktivnosti tkivnega faktorja. Aktivnost tkivnega faktorja v celičnih lizatih HCAEC je bila največja

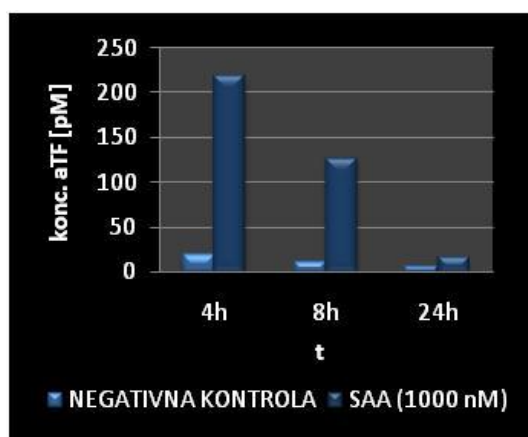
po 4 urah stimulacije celic s SAA in je s časom stimulacije padala (slika 27). Po 24 urah praktično nismo več zaznali aktivnosti tkivnega faktorja na celicah. Koagulantni odziv celic po stimulaciji s SAA je torej relativno zgoden in pada s časom stimulacije. Rezultati naših meritev so primerljivi z rezultati študije Zhao in sodelavcev. SAA torej stimulira izražanje tkivnega faktorja na endoteliju *in vitro*, kar smo pokazali na nivoju RNA, proteinov in aktivnosti tkivnega faktorja.



Slika 25: Izražanje gena za tkivni faktor (TF) v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM) Izražanje gena je izrazito po 4 urah stimulacije in že po 8 urah stimulacije močno pade. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v ravnem gojišču CA-PM 0 % FBS. AE – arbitrarne enote (povprečna normalizirana ekspresija), t – čas stimulacije.



Slika 26: Odstotek HCAEC, pozitivnih na tkivni faktor (TF), v odvisnosti od časa stimulacije celic s SAA (1000 nM). Po 4 urah stimulacije s SAA je delež HCAEC, pozitivnih na TF, največji in pada s časom stimulacije. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. % TF-HCAEC – odstotek HCAEC, pozitivnih na tkivni faktor, t – čas stimulacije.

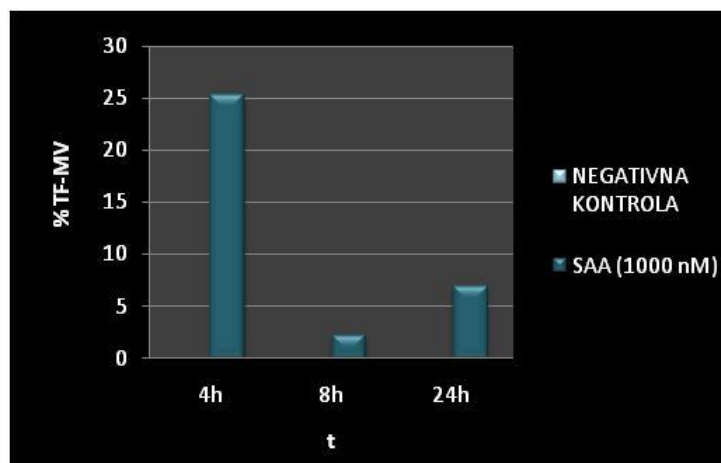


Slika 27: Koncentracija aktivne oblike TF na celicah v odvisnosti od časa stimulacije celic s SAA (1000 nM). Aktivnost tkivnega faktorja na HCAEC je največja po 4 urah stimulacije in pada s časom stimulacije. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. konc. aTF – koncentracija aktivne oblike tkivnega faktorja, t – čas stimulacije.

4.3.2 Mikrovezikli kot pokazatelji koagulantnega odziva HCAEC

Da bi določili, ali so mikrovezikli pokazatelji koagulantne aktivnosti endotelijskih celic, smo v zadnjem koraku preverili prisotnost in aktivnost tkivnega faktorja na mikroveziklih. Slika 28 prikazuje delež mikroveziklov, ki na svoji površini izražajo tkivni faktor, v vzorcih po različnih časih stimulacije celic s SAA. Izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih je sledilo izražanju tkivnega faktorja na celicah. Delež mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, je bil največji po 4 urah stimulacije in je močno padel že po 8 urah stimulacije. V vzorcih negativne kontrole nismo zaznali mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor. Po 24 urah stimulacije celic s SAA nismo več zaznali tkivnega faktorja na celicah, kljub temu pa smo določili majhen delež mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor. Najverjetneje ta del mikroveziklov predstavljajo akumulirani mikrovezikli, pozitivni na tkivni faktor, ki so nastali zgodaj po stimulaciji celic s SAA.

Naredili smo tudi test aktivnosti tkivnega faktorja na mikroveziklih, ki je pokazal znatno povečano aktivnost tkivnega faktorja na mikroveziklih po 4 urah stimulacije celic s SAA v primerjavi z negativno kontrolo. Ker pa so bili rezultati meritev na meji detekcije metode, jih tukaj ne bomo objavili.



Slika 28: Odstotek mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, v odvisnosti od časa stimulacije celic s SAA (1000 nM). Opazimo izrazito povečan delež mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, po 4 urah stimulacije. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0% FBS. % TF-MV – odstotek mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, t – čas stimulacije.

V okviru koagulantnega odziva HCAEC na SAA smo pokazali, da stimulacija endotelijskih celic z SAA *in vitro* sproži izražanje in aktivnost tkivnega faktorja na celicah. Koagulantni odziv je relativno zgoden in je maksimalen po 4 urah stimulacije ter pada s časom stimulacije, kar je v skladu s prejšnjimi študijami (21). Prvič pa smo pokazali, da stimulacija endotelijskih celic s SAA *in vitro* sproži tudi izločanje mikroveziklov, ki izražajo tkivni faktor. Delež mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, sledi deležu HCAEC, ki izražajo tkivni faktor, zato lahko rečemo, da so mikrovezikli, pozitivni na tkivni faktor, pokazatelji zgodnjega koagulantnega odziva endotelijskih celic.

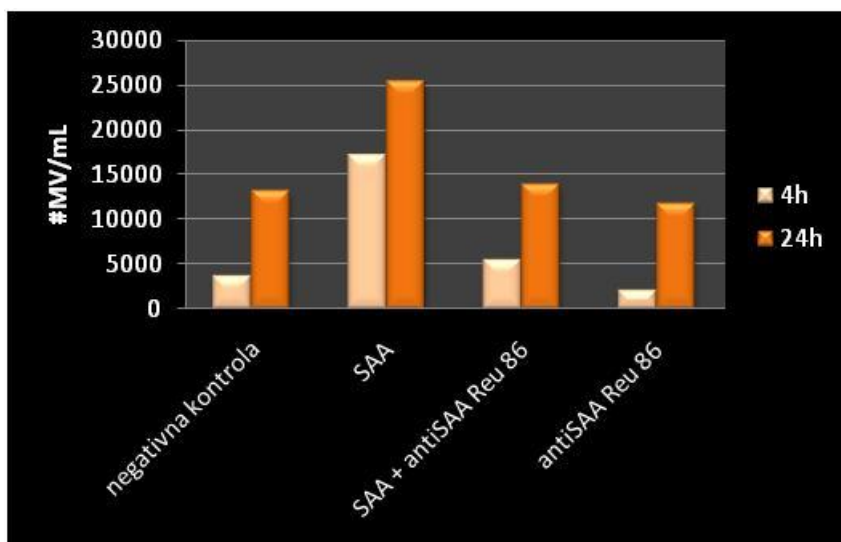
Naši poskusi so prvič pokazali izražanje tkivnega faktorja na endotelijskih mikroveziklih *in vitro* po stimulaciji s SAA. Druge *in vitro* študije so pokazale izražanje tkivnega faktorja na endoteliju in endotelijskih mikroveziklih po stimulaciji z različnimi drugimi citokini in rastnimi faktorji. Vlogo endotelijskega tkivnega faktorja in endotelijskih mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, v *in vivo* sistemih pa bo potrebno še raziskati. Rezultati naših poskusov pomenijo v tem pogledu pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave, ki bi potrdile povezavo med SAA in endotelijskimi mikrovezikli, ki prenašajo tkivni faktor, v *in vivo* sistemih. Zanimivo bi bilo raziskati število endotelijskih mikroveziklov, pozitivnih na tkivni faktor, pri bolnikih s povečano količino SAA v serumu v primerjavi z zdravimi prostovoljci in preučiti, ali ti mikrovezikli skupaj s SAA lahko predstavljajo nov pokazatelj oziroma napovedni dejavnik endotelijske disfunkcije in tveganja za srčno-žilne zaplete.

Rezultati naših poskusov bodo tudi objavljeni v obliki povzetka na 10. svetovnem kongresu na temo vnetja (10th world congress on inflammation, Translating Basic Research to Patient Care), ki bo potekal v Parizu od 25. do 29. junija 2011 (67).

4.4 Vpliv protiteles proti SAA na mikrovezikulacijo

Prisotnost naravnih (fizioloških) avtoprotiteles v telesu zdravih oseb je prvič pokazal Besredka skoraj 100 let nazaj, vendar se šele zadnja desetletja podrobneje raziskuje njihova vloga v homeostazi. Do danes so našli avtoprotitelesa proti različnim telesu lastnim molekulam, kot so na primer hormoni, receptorji, znotrajcelični proteini, DNA, histoni in encimi (65). Avtoprotitelesa proti SAA so bila prvič omenjena leta 2004 (66). Rosenau in sodelavci so količno protiteles proti SAA v serumu povezali z različnimi srčno-žilnimi in avtoimunskimi boleznimi, za katere je značilno vnetje. Lakota in sodelavci (23) so pokazali prisotnost protiteles proti SAA v krvi zdravih prostovoljcev, medtem ko je bila njihova količina statistično značilno znižana pri bolnikih z arterijsko trombozo in avtoimunskimi boleznimi, za katere je značilna pospešena ateroskleroza (revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematozus). Rezultati nakazujejo možnost, da protitelesa proti SAA vplivajo na potek različnih srčno-žilnih in vnetnih bolezni ter lahko delujejo zaščitno s pospeševanjem očistka SAA med resolucijo akutno-faznega odziva. Zato smo raziskali, ali protitelesa proti SAA zmanjšajo tudi mikrovezikulacijo endotelijskih celic, povzročeno s SAA, in s tem delujejo potencialno zaščitno.

Da bi preverili vpliv protiteles na mikrovezikulacijo, smo celice stimulirali z mešanico SAA in protitelesa proti SAA (antiSAA Reu 86) ter s samim protitelesom proti SAA. Kot pozitivno kontrolo mikrovezikulacije smo uporabili SAA, kot negativno kontrolo pa enako kot v prejšnjih poskusih nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. Rezultati so prikazani na sliki 29. Endotelijske celice, ki smo jim dodali SAA in hkrati še protitelesa proti SAA, so izločile manjše število mikroveziklov kot endotelijske celice, ki smo jih stimulirali samo s SAA. Protitelesa proti SAA so močno zmanjšala mikrovezikulacijo, povzročeno s SAA, tako po 4 kot tudi po 24 urah stimulacije celic. Število mikroveziklov se je zmanjšalo za 1,8-krat (24 ur) oz. za 3,1-krat (4 ure). Število mikroveziklov v vzorcu, ki smo ga stimulirali s SAA z dodatkom protitelesa, je bilo primerljivo s številom mikroveziklov v vzorcu negativne kontrole. Samo protitelo ni vplivalo na mikrovezikulacijo, saj je bilo število mikroveziklov v tem primeru prav tako primerljivo z negativno kontrolo.



Slika 29: Vpliv protiteles proti SAA na vezikulacijo endotelijskih celic, povzročeno s SAA. Protitelo proti SAA (antiSAA Reu 86) je močno zmanjšalo mikrovezikulacijo, povzročeno s SAA, tako po 4 urah (svetlo oranžno) in 24 urah (temno oranžno) stimulacije. Število mikroveziklov pri dodatku protitelesa proti SAA samega ali skupaj z SAA (1000 nM) je primerljivo s številom mikroveziklov v negativni kontroli. Graf predstavlja povprečje dveh ponovitev poskusa. Negativno kontrolo predstavljajo nestimulirane celice v rastnem gojišču CA-PM 0 % FBS. #MV – število mikroveziklov.

Z našimi poskusi smo prvič pokazali, da protitelesa proti SAA vplivajo na izločanje mikroveziklov iz endotelijskih celic po stimulaciji s SAA. Rezultat, da protitelesa proti SAA zmanjšajo mikrovezikulacijo v endotelijskih celicah, podpira hipotezo o zaščitni vlogi protiteles proti SAA v našem organizmu. Rezultat predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave vloge protiteles proti SAA *in vivo* pri bolnikih s srčno-žilnimi ter avtoimunskimi boleznimi, pri katerih je raven SAA v serumu povečana.

5 SKLEP

Tako serumski amiloid A kot tudi endotelijski mikrovezikli imajo pomembno vlogo v razvoju ateroskleroze, z našimi poskusi pa smo potrdili tudi povezavo med obema dejavnikoma. Rezultati so nas pripeljali do naslednjih ugotovitev:

- Serumski amiloid A sproži izločanje mikroveziklov iz človeških endotelijskih celic koronarnih arterij.
- Vnetni odziv endotelijskih celic po stimulaciji s SAA, ki smo ga določali preko izločanja citokina interlevkina-6 in kemokina interlevkina-8, narašča s časom stimulacije. Število mikroveziklov narašča vzporedno s pokazatelji vnetne aktivnosti endotelijskih celic, interlevkinom-6 in interlevkinom-8.
- Mikrovezikli, pozitivni na CD62E, so pokazatelji aktivacije endotelija in se sproščajo samo iz celic, stimuliranih s SAA. Njihovo število narašča s časom stimulacije endotelijskih celic s SAA.
- Število mikroveziklov, pozitivnih na CD31, ki je pokazatelj endotelijske disfunkcije v srčno-žilnih boleznih, narašča s časom stimulacije endotelijskih celic s SAA.
- Koagulantni odziv endotelijskih celic po stimulaciji s SAA, ki smo ga določali preko tkivnega faktorja, je v primerjavi z vnetnim odzivom relativno zgođen. SAA sproži izražanje tkivnega faktorja na endotelijskih mikroveziklih. Izražanje tkivnega faktorja na mikroveziklih je največje po 4 urah stimulacije in sledi izražanju tkivnega faktorja na endotelijskih celicah.
- Protitelesa proti SAA zmanjšajo izločanje mikroveziklov iz endotelijskih celic po stimulaciji s SAA, kar potrjuje hipotezo o možni zaščitni vlogi protiteles proti SAA v našem organizmu.

Pokazali smo, da so endotelijski mikrovezikli pokazatelji poznega vnetnega in zgodnjega koagulantnega odziva človeških endotelijskih celic koronarnih arterij po stimulaciji s SAA ter da protitelesa proti SAA zmanjšajo izločanje mikroveziklov. Endotelijski mikrovezikli so tako lahko pokazatelji in/ali sodejavniki pri endotelijski disfunkciji, ki jo povzroča SAA (67).

LITERATURA

1. Gersh BJ, Sliwa K, Mayosi BM, Yusuf S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *Eur Heart J*. 2010; 31(6): 642-648.
2. <https://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx?l=&Group1=RBTCntyByRg&DDLCntyByRg=EUR&DDLCntyName=1004&DDLYear=2004&TextBoxImgName=go.html> (april, 2011)
3. Zdravstveni statistični letopis 2009, Inštitut za varovanja zdravja Republike Slovenije. http://ivz.si/Mp.aspx?ni=0&pi=7&_7_id=1339&_7_PageIndex=0&_7_groupId=228&_7_newsCategory=&_7_action=ShowNewsFull&pl=0-7.0. (april, 2011)
4. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: A potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006; 48: 180-186.
5. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; 66: 159-165.
6. Amabile N, Rautou PE, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin Thromb Haemost*. 2010; 36(8): 907-916.
7. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacological Reports*. 2008; 60: 75-84.
8. Ribarič S, Mavrin V, ur. *Temelji patološke fiziologije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2009.
9. Lunder M, Kuhar P, Drevenšek G. Ateroskleroza – dejavniki tveganja in zapleti. *Med Mes*. 2007; 3: 235-240.
10. <http://www.zdravstveni.com/srce.php> (april, 2011)
11. Sary HC, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 1995; 92: 1355-1374.
12. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006; 86(2): 515-581.
13. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135-1143.

14. Rang HP, Dale MM. Pharmacology. 6. izd. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2007.
15. Vozelj M. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana: DZS; 2000.
16. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5. izd. Philadelphia: Saunders; 2003.
17. Abbasi SH, Boroumand MA. Expanded network of inflammatory markers of atherogenesis: where are we now? *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4: 38-44.
18. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/IL1BID40950ch2q13.html> (april, 2011)
19. Collier MEW, Ettelaie C. Regulation of incorporation of tissue factor into microparticles by serine phosphorylation of the cytoplasmic domain of tissue factor. *The Journal of Biological Chemistry.* 2011; 286: 11977-11984.
20. Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Kveder T, Tomšič M, Sodin-Šemrl S. Serum amyloid A activation of inflammatory and adhesion molecules in human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *European Journal of Inflammation.* 2007; 5(2): 73-81.
21. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999; 265(2): 501-523.
22. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 2005; 46(3): 389-403.
23. Lakota K, Thallinger GG, Cucnik S, Božič B, Mrak-Poljšak K, Ambrožič A, Rozman B, Blinc A, Tomšič M in Sodin-Šemrl S. Could antibodies against serum amyloid A function as physiological regulators in humans? *Autoimmunity.* 2011; 44(2): 149-158.
24. Zhao Y, Zhou S, Heng CK. Impact of serum amyloid A on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression and activity in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007; 27: 1645-1650.
25. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: A TIMI 11A substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35(2): 358-362.
26. Katayama T, Nakashima H, Takagi C, Honda Y, Suzuki S, Iwasaki Y, Yano K. Prognostic value of serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 2005; 69(10): 1186-1191.

27. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, Pepine CJ, Sharaf B, Bairey Merz CN, Sopko G, Olson MB, Reis SE. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation*. 2004; 109(6): 726-32.
28. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: A widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 2004; 25(14): 1197-1207.
29. Breitenstein A, Tanner FC, Lüscher TF. Tissue factor and cardiovascular disease. *Circ J*. 2010; 74: 3-12.
30. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27: 1687-1693.
31. Dursun I, Poyrazoglu HM, Gunduz Z, Ulger H, Ykyilmaz A, Dusunsel R, Patyroglu T, Gurgoze M. The relationship between circulating endothelial microparticles and arterial stiffness and atherosclerosis in children with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24(8): 2511-2518.
32. Tedgui A, Mallat Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 420-426.
33. Lakota K, Mrak-Poljsak K, Rozman B, Sodin-Semrl S. Increased responsiveness of human coronary artery endothelial cells in inflammation and coagulation. *Mediators of inflammation*. 2009; 146872.
34. Distler JHW, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation. *Arthritis & Rheumatism*. 2005; 52(11): 3337-3348.
35. Sustar V, Bedina-Zavec A, Stukelj R, Frank M, Ogorevc E, Jansa R, Mam K, Veranic P, Kralj-Iglic V. Post-prandial rise of microvesicles in peripheral blood of healthy human donors. *Lipids Health Dis*. 2011; 10: 47.
36. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med*. 2004; 53(4): 210-230.
37. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev*. 2006; 20: 1-26.

38. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2008; 100: 878-885.
39. Reich CF, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp Cell Res.* 2009; 315(5): 760-768.
40. Shah MD, Bergeron AL, Dong J, Lopez JA. Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications. *Platelets.* 2008; 19(5): 365-372.
41. Raymond AD, Campbell-Sims TC, Khan M, Lang M, Huang MB, Bond VC, Powell MD. HIV Type 1 Nef is released from infected cells in CD45+ microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS res and hum retroviruses.* 2011; 27(2): 167-178.
42. Castellana D, Toti F, Freyssinet JM. Membrane microvesicles: macromessengers in cancer disease and progression. *Thromb Res.* 2010; 125(2): S84-S88.
43. Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia MV; El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 320(1): 34-38.
44. Hendrikus H, et al. Past, present and future of Annexin A5: From Protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med.* 2005; 46(12): 2035-2050.
45. Technical Data Sheet. FITC Mouse Anti-Human CD31. BD Pharmingen, BD Biosciences, New Jersey, ZDA, 2008.
46. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/Annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2006; 26: 112-116.
47. Technical Data Sheet. APC Mouse Anti-Human CD62E. BD Pharmingen, BD Biosciences, New Jersey, ZDA, 2006.
48. Hui-he L, Zheng-giang S, Yi W, Li Z. Levels of soluble adhesion molecules in patients with various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Chinese Medical Journal.* 2010; 123(21): 3123-3126.

49. Amabile N, et al. Increased CD62E(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28(10): 1081-1086.
50. Jung KH, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol*. 2009; 66(2): 191-199.
51. Bizjak V. Uporaba pretočne citometrije za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprosesih. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2006.
52. Robert P, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *Thromb Haemost*. 2009; 7(1): 190-197.
53. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci*. 2004; 9: 1118-1135.
54. Mayr M, et al. Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009; 2(4): 379-388.
55. Brodsky SV, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*. 2002; 106: 2372-2378.
56. Jansa R, Sustar V, Frank M, Susanj P, Bester J, Mancek-Keber M, Krzan M, Igljic A. Number of microvesicles in peripheral blood and ability of plasma to induce adhesion between phospholipid membranes in 19 patients with gastrointestinal diseases. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 41(1): 124-132.
57. Chen CC, Chyau CC, Liao CC, Hu TJ, Kuo CF. Enhanced anti-inflammatory activities of *Monascus pilosus* fermented products by addition of ginger to the medium. *J Agric Food Chem*. 2010; 58(22): 12006-12013.
58. Yang RZ, et al. Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med*. 2006; 2(6): e287.
59. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thrombosis Research*. 2003; 109: 175-180.

60. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D and Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(20): 7248–7259.
61. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Del Carpio Munoz F, Canoniero M, Jy W, Jimenez J, Horstman L, Ahn Y. Phenotypic assesment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(12): 2184-2189.
62. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1004-H1009.
63. Wang X, Chai H, Wang Z, Lin PH, Yao Q, Chen C. Serum amyloid A induces endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 295(6): H2399– H2408.
64. Sodin-Semrl S, Zigon P, Cucnik S, Kveder T, Blinc A, Tomsic M, Rozman B. Serum amyloid A in autoimmune thrombosis. *Autoimmun Rev.* 2006; 6: 21.
65. Poletaev AB. The immunological homunculus (immunculus) in normal state and pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67(5): 600-608.
66. Rosenau BJ, Schur PH. Antibody to serum amyloid A. *Journal of autoimmunity.* 2004; 23: 179-182.
67. Frank M, Trček J, Kopitar AN, Mrak-Poljšak K, Lakota K, Ihan A, Rozman B, Sodin-Šemrl S. Serum amyloid A stimulates the release of endothelial microparticles, which reflect early procoagulant and late proinflammatory responses of human coronary endothelial cells. 10th world congress on inflammation, Translating Basic Research to Patient Care. Pariz, 2011.