

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA OREŠNIK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA OREŠNIK

**OPTIMIZACIJA MODELA CELJENJA POŠKODBE MONOPLASTNE
KULTURE PRIMARNIH HUMANIH PLJUČNIH FIBROBLASTOV**

**OPTIMIZATION OF THE WOUND HEALING MODEL FOR PRIMARY
HUMAN LUNG FIBROBLAST MONOLAYER CULTURE**

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, UKC Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Zahvala

Zahvaljujem sem mentorici doc. dr. Saši Čučnik in somentorici doc. dr. Snežni Sodin-Šemrl za strokovno pomoč in usmerjanje pri nastajanju magistrske naloge. Hvala tudi delovni mentorici Katjuši Mrak-Poljšak za učenje in pomoč pri eksperimentalnem delu naloge. Posebna zahvala gre tudi družini in fantu za moralno podporo v času študija in v času nastajanja magistrskega dela.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

VSEBINA

VSEBINA.....	1
POVZETEK	4
ABSTRACT	5
OKRAJŠAVE.....	6
1 UVOD	8
1.1 SISTEMSKA SKLEROZA.....	8
1.1.1 Intersticijska pljučna bolezen	9
1.2 FIBROBLASTI IN NASTANEK FIBROZE.....	10
1.3 VNETJE	11
1.3.1 Serumski amiloid A	12
1.4 CELJENJE RAN	15
1.4.1 Molekule vključene v celjenje ran.....	15
1.5 KONTROLNE MOLEKULE IN INHIBITORJI	17
1.5.1 Epidermalni rastni faktor	17
1.5.2 Hidrokortizon	17
1.5.3 Citotoksin kolhicin	18
1.6 <i>In vitro</i> »SCRATCH« METODA.....	18
1.7 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU	19
1.8 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	19
2 NAMEN, HIPOTEZE IN CILJI.....	21
3 METODE	23
3.1 NASAJANJE IN GOJENJE CELIC	23
3.2 DELO S CELICAMI.....	24
3.2.1 Preliminarni, pilotni del.....	24
3.2.2 Potrditveni poskusi	27

3.3	IL-6 ELISA.....	30
3.4	IZOLACIJA RNA	31
3.4.1	Spektrofotometrično določanje čistosti in izkoristka RNA	31
3.5	REVERZNA TRANSKRIPCIJA	32
3.6	KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	33
3.7	StellARray	35
3.8	OBDELAVA MIKROGRAFOV	36
4	MATERIALI	37
4.1	Reagenti.....	37
4.2	BIOLOŠKI MATERIALI	39
4.3	APARATURE IN OSTALI MATERIALI.....	39
5	REZULTATI.....	41
5.1	VPLIV SAA NA PRIMARNE ČLOVEŠKE PLJUČNE FIBROBLASTE	41
5.1.1	Vpliv SAA na pljučne fibroblaste po stimulaciji s kolhicingom.....	42
5.1.2	Vpliv SAA v kombinaciji z EGF/ hidrokortizonom na pljučne fibroblaste in vpliv SAA na ekspresijo različnih genov.....	43
5.2	MODEL CELJENJA RAN V CELIČNI KULTURI PLJUČNIH FIBROBLASTOV	46
5.2.1	Vpliv EGF na poškodovane pljučne fibroblaste.....	46
5.2.2	Vpliv SAA na poškodovane pljučne fibroblaste	48
5.2.3	Vpliv kolhicina na poškodovane pljučne fibroblaste	50
5.2.4	Vpliv SAA na poškodovane pljučne fibroblaste po stimulaciji s kolhicingom	52
5.3	STELLARRAY – Primerjava nepoškodovanih / poškodovanih pljučnih fibroblastov v prisotnosti ali odsotnosti SAA	56
5.4	VPLIV SAA NA PLJUČNE FIBROBLASTE PRED IN PO POŠKODBI.....	57

5.4.1	Vpliv SAA na pljučne fibroblaste pred in po poškodbi na izločanje IL-6 na proteinском nivoju.....	57
5.4.2	Vpliv SAA na pljučne fibroblaste pred in po poškodbi na mRNA nivoju s QPCR	60
6	RAZPRAVA	62
6.1	Vpliv SAA na pljučne fibroblaste	62
6.2	Vpliv kolhicina na pljučne fibroblaste, delovanje kolhicina v kombinaciji s SAA ..	
	63
6.3	Celični model celjenja ran	64
6.3.1	<i>In vitro</i> »scratch« metoda	64
6.3.2	Morfološke spremembe pljučnih fibroblastov.....	64
6.3.3	Spremembe na proteinском nivoju	65
6.3.4	Spremembe na mRNA nivoju	66
6.4	Razlike med pljučnimi fibroblasti iz zdravih tkiv in pljučnimi fibroblasti iz fibrotičnih tkiv.....	66
7	SKLEPI	68
8	LITERATURA.....	69

POVZETEK

Sistemska skleroza (SSc) je kronična avtoimunska bolezen, ki se kaže s fibrozo kože in notranjih organov. Fibroza nastane zaradi trajne aktivacije fibroblastov, ki prekomerno sintetizirajo in izločajo zunajcelični matriks, kar vodi do preoblikovanja strukture tkiv. Vzrok nastanka fiboze so lahko tudi okvare pri celjenju ran. Med najbolj resnimi kliničnimi parametri so fibrotične spremembe pljuč, ki veljajo za enega glavnih vzrokov smrti pri bolnikih s SSc. Serumski amiloid A (SAA) je protein akutne faze in pokazatelj vnetja pri ljudeh. Povišan je pri bolnikih s SSc in povišane koncentracije SAA sovpadajo s poslabšanjem pljučnih funkcij.

Namen našega dela je postavitev in optimizacija celičnega modela celjenja ran na primarnih humanih pljučnih fibroblastih. Zanimalo nas je, ali SAA stimulira pljučne fibroblaste, ali poviša ekspresijo vnetnega citokina interlevkina-6 (IL-6) in njegovo sodelovanje pri celjenju poškodb pljučnih fibroblastov v prisotnosti citotoksina kolhicina. Celični model celjenja ran smo preučevali na morfološkem nivoju z analizo fotografiranih celic pred in po inkubaciji, kjer smo tudi določali število in viabilnost celic. Določili smo nivoje izločenega IL-6 na proteinskem nivoju z encimsko imunsko metodo na trdem nosilcu ter ekspresije izbranih genov, med njimi IL-6 in IL-8, z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času na mRNA nivoju.

SAA je stimuliral pljučne fibroblaste in v odvisnosti od odmerka povišal tako ekspresijo kakor tudi izločanje IL-6. Povišal je tudi ekspresijo vnetnega kemokina IL-8 in matriks metaloproteinaze-12. Na delovanje SAA je močno vplivalo mikrookolje, saj je le-ta pokazal izrazito sinergistični učinek pri izločanju IL-6 v kombinaciji SAA z epidermalnim rastnim faktorjem ali interlevkinom-1 β . Kolhacin je močno inhibiral rast celic in prekinil zaraščanje celic v prostor poškodbe. Rezultati nakazujejo, da bi lahko SAA do določene mere obnovil s kolhicinom inhibirane in okvarjene pljučne fibroblaste. Do sedaj se je domnevalo, da je SAA možen kazalec fiboze pri intersticijski pljučni bolezni, vendar naši rezultati kažejo, da bi SAA kot stimulator izločanja IL-6, lahko tudi doprinesel k razvoju fiboze.

ABSTRACT

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic autoimmune disease characterized by fibrosis of the skin and internal organs. Fibrosis is caused by persistent activation of fibroblasts, which leads to excessive synthesis and secretion of extracellular matrix and tissue restructuring. One of the causes of fibrosis development may also be defects in wound healing. Among the most serious clinical parameters in patients with SSc are lung fibrotic changes which represent one of the leading causes of mortality. Serum amyloid A (SAA) is an acute phase protein and a marker of inflammation in humans. SAA is elevated in patients with SSc and its increased levels coincide with pulmonary function deterioration.

The purpose of our work is to establish and optimize a wound healing model in primary human lung fibroblasts. We were interested in knowing whether SAA stimulates lung fibroblasts and promotes the expression of the inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6). We also wondered whether SAA participated in healing of damaged lung fibroblasts in the presence of the cytotoxin colchicine. The cellular model of wound healing was studied at the morphological level with analysis of photographed cells before and after incubation and determination of cell number and viability. We determined the levels of released IL-6 at the protein level with the enzyme-linked immunosorbent assay and expression of selected genes, such as IL-6 and IL-8 with real time polymerase chain reaction at the mRNA level.

SAA stimulated lung fibroblasts and elevated both the expression and secretion of IL-6 in a dose-dependent manner. It also elevated the expression of the inflammatory chemokine IL-8, as well as matrix metalloproteinase-12. SAA was strongly influenced by the microenvironment, since it showed a distinct synergistic effect on IL-6 secretion in combination with epidermal growth factor or interleukin-1 β . Colchicine severely inhibited cell growth and prevented cells growing into the damaged area. Our results indicate that SAA could restore colchicine-damaged lung fibroblasts to some extent. Until now, it was assumed that SAA could be a possible marker of fibrosis in interstitial lung disease, however our results show that SAA can also act as an inducer of IL-6 secretion, which could contribute to the development of fibrosis.

OKRAJŠAVE

B	kontrola ozadja, celice brez dodanih učinkovin, (angl. background control)
cDNA	komplementarna veriga mRNA, (angl. complementary DNA)
CRP	C-reaktivni protein, (angl. C - reactive protein)
CTGF	rastni faktor vezivnega tkiva, (angl. connective tissue growth factor)
DMSO	dimetil žveplov oksid, (angl. dimethylsulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina, (angl. deoxyribonucleic acid)
EGF	epidermalni rastni faktor, (angl. epidermal growth factor)
EGFR	receptor za epidermalni rastni faktor, (angl. epidermal growth factor receptor)
ELISA	encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu, (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EtOH	etanol, (angl. ethanol)
FBM	bazalni medij za fibroblaste, (angl. fibroblast basal medium)
FBS	goveji fetalni serum, (angl. fetal bovine serum)
HC	hidrokortizon, (angl. hydrocortisone)
HDL	visokogostotni lipoprotein, (angl. high-density lipoprotein)
IPF	idiopatska pljučna fibroza, (angl. idiopathic pulmonary fibrosis)
IL	interlevkin, (angl. interleukin)
KOL	kolhicin, (angl. colchicine)
LPA	lizofosfatidna kislina, (angl. lysophosphatidic acid)
MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein-1, (angl. monocyte chemoattractant protein-1)
MMP	matriks metaloproteinaze, (angl. matrix metalloproteinases)
MMP-12	matriks metaloproteinaza 12/ makrofagna metaloelastaza, (angl. matrix metalloproteinase-12)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina, (angl. messenger ribonucleic acid)
NHLF	normalni humani pljučni fibroblasti, (angl. normal human lung fibroblasts)
NTC	PCR kontrola brez cDNA, (angl. »no template control«)
PAI-1	inhibitor plazminogenskega aktivatorja-1, (angl. plasminogen activator inhibitor-1)
PBS	s fosfatom pufrana fiziološka raztopina, (angl. phosphate-buffered saline)

PCR	verižna reakcija s polimerazo, (angl. polymerase chain reaction)
PDGF	trombocitni rastni faktor, (angl. platelet-derived growth factor)
PF	pljučni fibroblasti, (angl. pulmonary fibroblasts)
RNA	ribonukleinska kislina, (angl. ribonucleic acid)
RPM	število obratov na minuto, (angl. revolutions/rotations per minute)
SAA	serumski amiloid A, (angl. serum amyloid A)
SSc	sistemska skleroza, (angl. systemic sclerosis)
TGF- β	transformirajoči rastni faktor beta, (angl. transforming growth factor- β)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa, (angl. tumor necrosis factor- α)
QPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času, (angl. quantitative PCR)

1 UVOD

1.1 SISTEMSKA SKLEROZA

Sistemska skleroza (SSc) je kronična sistemska avtoimunska bolezen veziva, za katero so značilni aktivacija imunskega sistema, fibroza tkiv in difuzna sklerotična prizadetost predvsem drobnega arterijskega žilja. Je redka bolezen, saj je letna pojavnost vseh kliničnih oblik bolezni v Sloveniji ocenjena na 26 primerov na milijon prebivalcev, starejših od 18 let. Najpogosteje se pojavlja med 30. in 60. letom starosti, ženske zbolevajo štirikrat pogosteje kot moški (1). Pojavlja se sporadično, opisani so tudi primeri družinskega pojavljanja, ki kažejo na možen vpliv dednosti pri nastanku bolezni. Bolezen etiološko ni opredeljena. Za potencialne vzroke nastanka bolezni veljajo okužba s humanim citomegalovirusom, skupaj z izpostavljenostjo določenim zunanjim dejavnikom kot so vinilklorid, epoksismole, silikon, kirurški vsadki, zaviralci apetita in drugi (1). Patogeneza bolezni je kombinacija poškodbe žilnega endotelija, vnetja, aktivacije imunskega sistema in progresivne fibroze. Začne se s poškodbo drobnega žilja, ki povzroči aktivacijo endotelnih celic, adhezijo levkocitov, kar vodi do vnetja in avtoimunskega odziva. Med vnetjem aktivirani limfociti in druge mononuklearne celice izločajo številne citokine in kemokine, ki povzročajo trajno aktivacijo fibroblastov. Aktivirani fibroblasti so odgovorni za sintezo in prekomerno nalaganje zunajceličnega matriksa ter preoblikovanje strukture matriksa, kar vodi v fibrozo. Glede na hitrost napredovanja bolezenskih znakov in glede na obseg ter stopnjo prizadetosti kože in notranjih organov ločimo 4 klinične oblike: presklerodermo, difuzno kožno obliko, omejeno kožno obliko in obliko brez prizadetosti kože (1). Najpogosteje se pojavljata omejena kožna oblika in difuzna kožna oblika bolezni. Omejena oblika se kaže z žilnimi manifestacijami, fibroza kože in organov pa je omejena in počasi napredujoča (2). Difuzna oblika SSc, za katero zboli manj kot 40% vseh bolnikov s SSc, se kaže s hitrim napredovanjem kožnih sprememb, ki dosežejo vrh v prvih 3 letih bolezni in z zgodnjo prizadetostjo notranjih organov (1). Klinični znaki so Raynaudov fenomen (epizodične spremembe vezane na temperaturne razlike, odrevenelost, mravljinčenje ter žgoča bolečina distalnih delov okončin), otekline rok, podlahti, stopal, goleni in obraza, jutranja okorelost, bolečine v sklepih in mišicah, težave s požiranjem, splošna utrujenost in hujšanje, kožne spremembe. Najpogosteje prizadeti notranji organi so prebavila, pogosto pa so prizadeta tudi pljuča, srce in ledvica (1). Krivec za prizadetost tako kože kot notranjih organov je fibroza, najbolj karakteristični patološki

znak SSc, posebno pri difuzni obliki bolezni. Koža s podkožjem postaja trda in zadebeljena, s predeli hiper- in hipopigmentacij. Pri napredovalih oblikah pride do atrofičnega stadija kože, ki se kaže z zmanjšano zmožnostjo gibljivosti okončin, razgradnjo kostnine v prstnih členkih, ptičjim videzom obraza in zmanjšano ustno odprtino (1). Postopna zamenjava tkivne strukture z zunajceličnim matriksom, bogatim s kolagenom, se kaže v oslabljeni funkciji prizadetih tkiv in organov. Fibroza je najbolj izrazita v koži, pljučih, srcu, prebavilih, kitah, ligamentih in endokrinih žlezah in je največji krivec za obolenost ter smrtnost pri SSc (2).

Diagnostika SSc je zahtevna zaradi heterogene klinične slike bolezni. Potrebno je upoštevati tako klinične znake bolezni kot tudi laboratorijske parametre. Glavno merilo za postavitev diagnoze je klinično vidno sklerodermično spremenjena koža dlani in narti. Pomožna merila so trofične brazgotinice na blazinicah prstov rok, pljučna fibroza in sklerodaktilija, ki je oblika sklerodermije na prstih rok in nog, ki se kaže z napetostjo kože, togostjo prstov, atrofijo mehkega tkiva in osteoporozo kosti v prstnih členkih (1). Določa se tudi hitrost sedimentacije eritrocitov, ki je vnetni laboratorijski parameter vključen v izračun indeksa dejavnost bolezni. 90% bolnikov ima povišan titer protiteles proti antigenom jedra. 20-30% bolnikov z difuzno obliko ima protitelesa proti antigenu Scl-70, 50-90% bolnikov z omejeno kožno obliko bolezni pa ima anticentromerna protitelesa (1). Najvišjo smrtnost pri bolnikih povzroča intersticijska pljučna bolezen, ki se kaže s pljučno fibrozo. To vodi v intenziven razvoj raziskav, ki so usmerjene v poglobljeno razumevanje vlog posameznih tipov celic in njihovih topnih mediatorjev ter terapij, ki bi fibrozo prekinile ali vsaj upočasnile.

1.1.1 Intersticijska pljučna bolezen

Intersticijska pljučna bolezen pri bolnikih s SSc predstavlja pešter spekter kliničnih znakov, ki lahko povzročijo preoblikovanje tkiva pljuč, strukturne poškodbe pljučnega parenhima in oslabitev dihalnih funkcij (3). V pulmonarni fiziologiji velja za restriktivno (omejujočo) pljučno bolezen, ki povzroča zmanjšano podajnost pljuč (sprememba volumna pljuč na enoto spremembe transpulmonaryega tlaka) in vitalno kapaciteto pljuč. Vzrok za njen nastanek še ni v celoti poznan. Patogeneza intersticijske pljučne bolezni je zapletena in vključuje porušenje homeostaze obtočilnega in imunskega sistema (3). To porušenje se kaže v poškodbah drobnega žilja, ki vodijo do aktivacije fibroblastov, prekomernega nalaganja zunajceličnega matriksa in fibroze pljuč ter povečanja vnetnega odziva. Fibroza

in kronično vnetje prizadeneta strukturo tkiva in funkcijo izmenjave plinov. V zdravih pljučih je program celjenja poškodb z aktivacijo fibroblastov samoomejujoč, do fibroze pa privede trajna in ojačana aktivacija fibroblastov (2).

Intersticijska pljučna bolezen velja za enega glavnih povzročiteljev smrti pri bolnikih s SSc, saj se pojavi pri 4 od 10 bolnikov s SSc. Zasledimo jo lahko tudi pri drugih avtoimunskih boleznih kot sta revmatoidni artritis in sistemski lupus eritematozus, a ima pri SSc največjo smrtnost med vsemi revmatskimi boleznimi. Učinkovite terapije za intersticijsko pljučno bolezen še ni. V zgodnjih stadijih bolezni se uporablajo protivnetna zdravila, v poznih stadijih pa pride v poštev le presaditev pljuč. Pljučno prizadetost ocenjujemo s testi pljučnih funkcij, kot sta forsirana vitalna kapaciteta in difuzijska kapaciteta ogljikovega monoksida ter z visoko ločljivo računalniško tomografijo.

Nezadovoljiv klinični izid in prognoza intersticijske pljučne bolezni sta vodilo za intenzivno raziskovanje in iskanje novih terapevtskih strategij. Raziskave so usmerjene v upočasnitev endogenih mehanizmov v procesu fibroze in vključujejo zavrtje prekomerne sinteze zunajceličnega matriksa, zavrtje proliferacije fibroblastov in njihove diferenciacije v miofibroblaste ter zavrtje signalnih poti za citokine in rastne faktorje. V raziskave so vključene tudi različne nove učinkovine kot so biološka zdravila rituksimab, inhibitorji angiotenzina II, inhibitorji tirozin kinaze, biološke tarče signalnih poti kemokinov, citokinov in rastnih faktorjev ter terapije z matičnimi celicami (3,4).

1.2 FIBROBLASTI IN NASTANEK FIBROZE

Morfološko so fibroblasti podolgovate, vretenaste ali zvezdaste celice s številnimi citoplazemskimi izrastki, imajo ovalno jedro in več jedrc. Ključna vloga fibroblastov je sinteza za organ in za tkivo specifičnih komponent zunajceličnega matriksa kot so kolageni, elastične niti, različni strukturni glikoproteini, glikozaminoglikani in proteoglikani. Poleg tega vzdržujejo natančno ravnotežje med sintezo in razgradnjo zunajceličnega matriksa, ki je potrebno pri različnih fizioloških procesih kot so razvoj in diferenciacija (5). Fibroblasti imajo ključno vlogo tako pri obnavljanju normalnega tkiva, kot tudi pri nastanku fibroze. Topni mediatorji, kot so interleukin 1 (IL-1), transformirajoči rastni faktor beta (TGF- β) in rastni faktor vezivnega tkiva (CTGF), ki jih ob poškodbi drobnega žilja v lokalnem mikrookolju sproščajo trombociti, endotelne, epitelne ter vnetne celice, aktivirajo fibroblaste. Ti nato izločajo komponente zunajceličnega matriksa, ki vzdržujejo, skrčijo, organizirajo in preoblikujejo vezivno tkivo.

Največji del, izmed komponent zunajceličnega matriksa, so kolageni, družina proteinov, ki je sestavljena iz preko dva ducata strukturnih proteinov. Ob aktivaciji se fibroblasti transdiferencirajo v miofibroblaste. Miofibroblasti so specializirani fibroblasti, ki se lahko krčijo in imajo podobne lastnosti kot celice gladkih mišic. Prav tako sintetizirajo komponente zunajceličnega matriksa in so glavni vir TGF- β med nastankom fiboze. Pri procesu celjenja poškodovanega tkiva, so miofibroblasti le prehodne celice, ki se nato odstranijo z apoptozo. V fibrozirajočem tkivu so miofibroblasti prisotni trajno in v večjem številu, kar vodi v prekomerno nalaganje komponent zunajceličnega matriksa in s tem v kronično rano tkiva (2).

Fibroblasti izločajo citokine in rastne faktorje, med njimi so tudi taki, ki ob povečanju sproščanja spodbujajo nastanek fiboze kot so TGF- β , CTGF, trombocitni rastni faktor (PDGF), monocitni kemoatraktantni protein 1 (MCP1) ter lizofosfatidna kislina (LPA). Proizvajajo tudi matriks metaloproteinaze (MMP) in njihove inhibitorje, ki regulirajo proteolitsko razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa, kot je kolagen in s tem kontrolirajo strukturo in preoblikovanje matriksa.

Pljuča so dinamičen organ in fibroblasti s proizvajanjem zunajceličnega matriksa zagotavljajo ogrodje za celice in mediatorje, da so se sposobne odzvati na hitre spremembe v strižnih silah (6). V pljučih so fibroblasti najštevilčnejši v subepitelni plasti prevodnih dihalnih poti in v intersticiju pljučnega parenhima, kar jih postavlja na mesto zraven epitelnih in endotelijskih celic (6), kjer se ob sproščanju topnih mediatorjev lahko hitro aktivirajo.

Normalni, primarni humani pljučni fibroblasti so celična kultura zdravih pljučnih fibroblastov izoliranih iz odraslega pljučnega tkiva. Uporabljajo se predvsem za raziskovanje stimulacije in odzivov pri vnetju in fibrozi pljučnega tkiva (7).

1.3 VNETJE

Vnetna reakcija je odgovor organizma na okužbe, poškodbe tkiva ali vnos škodljivih snovi. Ne glede na vzrok, se vnetje *in vivo* začne s spremembami drobnega žilja, ki jim sledi migracija fagocitov v smeri koncentracijskega gradiента, odstranjevanje škodljivih snovi in nazadnje obnova prizadetega tkiva. Kaže se kot otekлина, rdečina, bolečina, lokalno zvišana telesna temperatura in omejena funkcija prizadetega predela ali organa (8). Vnetje lahko poteka akutno ali kronično.

Lokalno akutno vnetje lahko spremi sistemski odziv, imenovan reakcija akutne faze (8). Gre za temeljni zaščitni mehanizem prirojene imunosti, ki se kaže s povišano telesno temperaturo, povečanim nastajanjem levkocitov in s spremenjenim profilom akutno faznih proteinov, kot so serumski amiloid A (SAA), C reaktivni protein (CRP), fibrinogen, haptoglobin in drugi. Povišana telesna temperatura preprečuje razmnoževanje patogenov in okrepi imunski odziv nanje. Trajanje in jakost lokalnega akutnega vnetja morata biti skrbno nadzorovana, saj nakopičeni fagociti v tkivu sproščajo litične encime, ki okvarijo tudi sosednje zdrave celice. Ob nadzorovanem akutnem vnetju se omeji okvara tkiva in omogoči obnova prizadetega tkiva, ki je potrebna, da se rana zaceli. Po koncu akutne vnetne reakcije je potrebna odstranitev mrtvih celic in levkocitov, ki so sodelovali v akutni fazi vnetja. Če je ta faza okvarjena, lahko pride do kroničnega vnetja, vnetni infiltrat vztraja, pride do tkivne hiperplazije in navsezadnje do uničenja in brazgotinjenja tkiva (9). Za kronično vnetje je značilno nakopičenje in aktivacija makrofagov, ki veliko prispevajo k okvari tkiva, saj te celice sproščajo hidrolitične encime in reaktivne kisikove ter dušikove presnovke, kar povzroči okvaro okoljskega tkiva (8). Makrofagi s sproščanjem citokinov tudi pospešujejo razmnoževanje in aktivacijo fibroblastov in posledično se na kraju kroničnega vnetja razvije fibroza. Nedolgo nazaj so fibroblasti veljali kot pasivni igralci v imunskejem odzivu. Mnoge raziskave kažejo, da aktivirani fibroblasti skupaj s tkivnimi makrofagi določajo strukturo tkivnega mikrookolja in uravnavajo odzive imunskeih celic. Tkvno mikrookolje določajo s produkcijo kemokinov in zunajceličnega matriksa ter igrajo pomembno vlogo pri prehodu iz akutnega vnetja v pridobljeno imunost. Neprimerna proizvodnja imunoregulatornih molekul sproščenih iz fibroblastov ima učinke na celice pridobljenega imunskega sistema, ovira zaključek akutnega vnetja in lahko posledično vodi v kronično vnetje (9).

1.3.1 Serumski amiloid A

SAA je poleg CRP glavni akutno fazni protein in pokazatelj vnetja pri ljudeh. Akutno fazni odziv se odraža s spremenjenim profilom akutno faznih proteinov, ki postanejo nekontrolirano izraženi pri kroničnih boleznih, kot je SSc. SAA je eden glavnih pozitivnih reaktantov akutne faze vnetja. Njegova serumska koncentracija se lahko med vnetjem, infekcijo ali poškodbo tkiva poveča do 1000x in preseže vrednost 1 mg/ml v krvnem obtoku. Družina genov SAA se pri človeku nahaja na kromosому 11 in jo sestavljajo 3 funkcionalni geni SAA (SAA1, 2 in 4) ter psevdogen SAA3, ki je bil najden prepisan do

sedaj le v mlečnih žlezah. Primarno mesto sinteze obeh SAA so hepatociti, vendar pa je bila sinteza pri človeku odkrita tudi v monocitih/makrofagih, v celicah aterosklerotičnih lezij (makrofagi, endotelijalne in gladke mišične celice), v adipocitih in mnogih drugih celicah (10). Glavni citokini, ki sprožijo prepisovanje genov SAA so IL-1, IL-6 in dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α).

Informacijska RNA (mRNA) ali proteini SAA, ki so bili najdeni v vseh vretenčarjih, so evolucijsko zelo ohranjeni in to skupaj s pospešenim prepisovanjem genov SAA kot odgovor na potencialno življensko nevarna stanja, kaže na kritično zaščitno vlogo proteinov SAA pri akutno faznem odgovoru (10). Funkcije proteinov SAA lahko razdelimo v tri skupine: imunsko delovanje, vpletene v transport oz. metabolizem lipidov in vnetno delovanje. Proteini SAA sprožijo ekspresijo encimov zunajceličnega matriksa kot so proteinaze, kolegenaze, ki so pomembne za obnovo poškodovanega tkiva. SAA lahko deluje kot kemotaktični agens za imunske celice kot so monociti, polimorfonuklearni levkociti in limfociti T, saj se veže na iste receptorje kot kemokin in kemoatraktanti kot je N-formil-metionin-leucin-fenilalanin (N-formil-Met-Leu-Phe). S tem lahko ojača lokalno vnetje, saj lokalna produkcija SAA povzroči kopičenje teh celic na mestu vnetja. Ko se SAA sprosti v krvni obtok, nadomesti apolipoprotein A-I v visokogostotnem lipoproteinu (HDL). S to vezavo SAA spremeni metabolizem HDL. Pospešuje regeneracijo tkiva na mestu vnetja tako, da poveča transport lipidov, predvsem holesterola perifernim celicam, ki imajo povečane potrebe po holesterolu. Nasprotno lahko sodeluje pri odtoku holesterola iz celic in pospeši odstranitev velikih količin holesterola sproščenega na mestu tkivne poškodbe med vnetjem. Protivnetno vpliva SAA na interakcije med limfociti in makrofagi ter na funkcijo limfocitov T- pomagalk in tako zavira imunski odziv na antigene. SAA ima mnoge obrambne funkcije in hitro povišanje koncentracije med akutno fazo vnetja je za organizem ugodno. Če vnetje vztraja, kot na primer pri kroničnih vnetnih boleznih kot so revmatoidni artritis, metabolni sindrom ali ateroskleroza, podaljšano zvišanje koncentracije SAA vpliva degenerativno na tkiva (11). Kronično zvišane koncentracije SAA so tudi pogoj za razvoj sekundarne AA amilidoze, ki je progresivna in smrtna bolezen pri kateri se protein amiloid A (proteolitični fragment SAA) odlaga v glavnih telesnih organih v obliki netopnih leh. Nastale netopne lehe lahko prispevajo tudi k fiziološkim procesom pri nastanku ateroskleroze (12). Zato obstajajo tako pozitivni kot negativni mehanizmi kontrole ekspresije SAA, ki omogočajo povišanje ekspresije SAA, vse dokler SAA ne izvrši svoje zaščitne funkcije in nato zavrtje ekspresije, da se lahko koncentracija SAA

zniža nazaj na bazalni nivo (12). Ti mehanizmi vključujejo transkripcijske faktorje, ki vplivajo na potek transkripcije in post-transkripcijsko regulacijo mRNA SAA. Ni še popolnoma jasno, zakaj ti kontrolni mehanizmi včasih ne zadostujejo ali pa odpovejo in tako lahko pride do zgoraj naštetih bolezni (12). Lakota in sodelavci (13) so pokazali, da je SAA lociran v neposredni bližini mikrotubulov v primarnih humanih koronarno arterijskih endotelijskih celicah, ki niso bile izpostavljene nobenim učinkovinam. Znotrajcelično so dokazali prisotnost SAA tako z imunofluorescenčno mikroskopijo, kakor tudi z metodo »In Situ Proximity Ligation Assay«, ki je pokazala tesno kolokalizacijo obarvanih proteinov.

Poročila o SAA pri SSc so redka. Hitrost sedimentacije eritrocitov, kot vnetni parameter, velja za napovedni dejavnik umrljivosti pri SSc in je vključen v izračunu indeksa dejavnosti bolezni. Raziskave kažejo korelacijo vnetnega pokazatelja CRP z aktivnostjo bolezni, pljučno funkcijo in preživetjem bolnikov s SSc. SAA je v primerjavi s CRP občutljivejši biološki označevalcev, posebno pomemben v območju majhnih vnetnih zvišanj, kaže pa tudi večji obseg odziva (11). Lakota in sodelavci (11) so raziskovali serološke ravni SAA pri 129 pacientih s SSc in jih primerjali s kliničnimi znaki in laboratorijskimi parametri. Poročajo o značilnem povišanju ravni SAA pri bolnikih s SSc z najvišjo mediano ravni pri zgodnji fazi difuzne oblike bolezni. Še pomembnejšo ugotovitev predstavlja številne zmerne korelacije ravni SAA z označevalci pljučne prizadetosti (intersticijska pljučna bolezen, pljučna hipertenzija). Glavna ugotovitev raziskave je, da raven SAA značilno sovpada s funkcijskimi testi pljuč (forsirana vitalna kapaciteta, difuzijska kapaciteta ogljikovega monoksida) in raven SAA je spremenjena pri pacientih z različnimi vzorci visoko ločljive računalniške tomografije pljuč. Korelacija SAA s povišanim povprečjem pljučne arterijske hipertenzije (merjene s srčno katetrizacijo) je bila statistično značilna pri bolnikih z difuzno SSc ali bolnikih, ki so bili pozitivni na Scl-70. Te ugotovitve kažejo, da je SAA občutljiv biološki označevalec obeh patoloških procesov v pljučih pri bolnikih s SSc, možen kazalec fibroze pri intersticijski pljučni bolezni in poškodbe krvnih žil pri pljučni hipertenziji (11).

Če povežemo ugotovitve, je SAA povišan pri bolnikih s SSc in povišane vrednosti SAA sovpadajo s poslabšanjem pljučnih funkcij (12,14). Zaenkrat še ne poznamo vpliva SAA na pljučne fibroblaste in je še nepojasnjeno ali lahko SAA stimulira pljučne fibroblaste ter kako vpliva na izražanje vnetnih citokinov, kemokinov ter razgradnih encimov. Ker so fibroblasti ključne celice pri nastanku pljučne fibroze in so vključeni v nastanek kroničnega vnetja, je pomembno raziskati vpliv SAA na pljučne fibroblaste.

1.4 CELJENJE RAN

Celjenje ran je dinamičen proces, ki vključuje 4 prekrivajoče se glavne faze: fazo hemostaze, vnetja, proliferacije in preoblikovanja. Faza hemostaze se začne vzpostavljati takoj po nastanku rane z vazokonstrikcijo in tvorbo fibrinskega čepa. Trombociti iz čepa sproščajo rastne faktorje, ki povzročajo kemotakso in proliferacijo nevtrofilcev in makrofagov, ki odstranjujejo nekrotično tkivo in bakterije iz rane. Makrofagi so ključne celice faze vnetja, saj sproščajo rastne faktorje in vnetne citokine, stimulirajo keratinocite, fibroblaste in pospešujejo angiogenezo novih kapilar. V fazi proliferacije so ključne celice fibroblasti. Proizvajajo kolagen, glikozaminoglikane in proteoglikane, glavne komponente zunajceličnega matriksa, ki zagotavljajo strukturo rane in nadomeščajo fibronektinsko mrežo. Nato se prične faza preoblikovanja, v kateri se komponente zunajceličnega matriksa preoblikujejo tako, da so čim bolj podobne strukturi normalnega tkiva (15). Proces celjenja ran je zapleten in podvržen mnogim zunanjim dejavnikom. Okvara katerekoli faze celjenja lahko vodi v nastanek kronične rane ali patološkega brazgotinjenja - fibrose.

Celjenje ran v pljučih je prav tako homeostazni mehanizem, ki omogoča celjenje in ohranjanje integritete pljuč. V zdravih pljučih se po celjenju vzpostavi normalna arhitektura tkiva, fibroza pa se lahko razvije pri hudih ranah, ko tkivna poškodba vztraja in ko so okvarjeni mehanizmi celjenja ran. Fibroza se kaže s prekomernim nalaganjem komponent zunajceličnega matriksa, ki se nalagajo na obstoječe celice in matriks tkiva ter s tem močno vplivajo na celične funkcije. Povečano nalaganje matriksa vodi k zmanjšani zmožnosti izmenjave plinov in komponente zunajceličnega matriksa lahko dodatno poslabšajo vnetje in prispevajo k napredovanju bolezni (6).

1.4.1 Molekule vključene v celjenje ran

Ker je celjenje ran sestavljeno iz faz hemostaze, vnetja, proliferacije in preoblikovanja, lahko v celicah med celjenjem pričakujemo povečano ekspresijo adhezijskih molekul, vnetnih citokinov (kot je IL-6) in kemokinov (kot je IL-8), akutno faznih proteinov, razgradnih encimov (inhibitor plazminogenskega aktivatorja 1 (PAI-1)), komponent zunajceličnega matriksa (kolagen) in molekul vključenih v celično preoblikovanje (MMP-12). Zaenkrat še ni podatkov v literaturi o vplivu SAA na izražanje teh molekul v pljučnih fibroblastih.

IL-6 je pleiotropni vnetni citokin, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji imunskega odziva, vnetju in hematopoezi. Izločajo ga lahko mononuklearni fagociti, fibroblasti, celice žilnega endotelija in drugi. Ima mnogo različnih vlog. Pospešuje razmnoževanje in zorenje limfocitov B in s tem okrepi izločanje imunoglobulinov. Je poglavitni mediator reakcije akutne faze in deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo SAA, CRP in druge proteine akutne faze ter komponente komplementa (16). Znano je, da SAA spodbuja produkcijo in izločanje IL-6 pri sinovijalnih celicah pri revmatoidnem artritisu (17) in pri zdravih dermalnih fibroblastih (18), vendar še ni znano kako SAA vpliva na izločanje IL-6 v pljučnih fibroblastih.

IL-8 je vnetni kemokin, ki pospešuje migracijo nevtrofilcev na mesto vnetja. Izločajo ga aktivirani mononuklearni limfociti, megakariociti in fibroblasti. V študiji so He Rong in sodelavci pokazali, da SAA spodbuja hitro in močno izločanje IL-8 v nevtrofilnih celicah (19). Ravno tako še ni znano ali SAA, podobno kot v nevtrofilcih, spodbuja tudi izločanje IL-8 v pljučnih fibroblastih.

PAI-1 je član družine genov inhibitorjev serinskih proteaz in glavni fiziološki inhibitor serinskih proteinaz, in plazminogenskega aktivatorja (PA). Sintetizirajo ga fibroblasti, endotelne celice, adipociti, makrofagi in kardiomiociti (20). Nalaganje prekomernega kolagena in drugih komponent zunajceličnega matriksa v fibrozirajočem tkivu je odvisno tako od prekomerne sinteze zunajceličnega matriksa kot tudi od zmanjšane razgradnje kolagena preko celičnih proteolitičnih mehanizmov. PA in plazminogen igrata ključno vlogo pri proteolitični razgradnji proteinov zunajceličnega matriksa in vzdrževanju tkivne homeostaze. Njuna aktivnost je odvisna od PAI-1. Pod normalnimi fiziološkimi razmerami PAI-1 kontrolira proteolitično aktivnost PA in plazminogena. Med procesom celjenja ran povišana raven PAI-1 zavira aktivnost PA in plazminogena in tako pospešuje celjenje ran. Pri patoloških razmerah pa se sprošča pretirana koncentracija PAI-1, ki prispeva k čezmernemu kopiranju kolagena in drugih komponent zunajceličnega matriksa v območju rane in tako vodi do brazgotinjenja (20). PAI-1 spodbuja proliferacijo fibroblastov in njihovo diferenciacijo v miofibroblaste, spodbuja sintezo kolagena in zavira apoptozo pljučnih fibroblastov. Znižanje ekspresije PAI-1 bi lahko pripomoglo k preprečevanju napredovanja pljučne fiboze (21).

Gen COL1A2 kodira kolagen tipa I, ki ga najdemo v večini vezivnih tkiv. Je tudi glavna komponenta zunajceličnega matriksa, ki lahko ob prekomerjem nalaganju v tkivih vodi do fiboze. Izločajo ga aktivirani fibroblasti, tudi pljučni fibroblasti.

Fibroblasti proizvajajo tudi matriks metaloproteinaze (MMP) in njihove inhibitorje. MMP regulirajo proteolitično razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa kot je kolagen in s tem kontrolirajo strukturo in preoblikovanje matriksa. Matriks metaloproteinaza-12 ali drugače makrofagna metaloelastaza-12 je encim, ki je izražen v alveolarnih makrofagih, epitelnih celicah in celicah gladkih mišic v bronhijih pljuč. Ekspresija MMP-12 je pozitivno regulirana s komponentami matriksa (hialuronska kislina), citokini in rastnimi faktorji, kot so TGF- β , interferon gama (INF- γ) in epidermalni rastni faktor (EGF). *In vitro* je bila najdena široka paleta potencialnih substratov za MMP-12 kot so kolagen IV, fibronektin in drugi. *In vivo* ni bil opisan še noben substrat (22).

Vpliva SAA na ekspresijo PAI-1, COL1A2 ali MMP-12 v pljučnih fibroblastih še ne poznamo.

1.5 KONTROLNE MOLEKULE IN INHIBITORJI

1.5.1 Epidermalni rastni faktor

EGF je rastni faktor, ki stimulira proliferacijo in diferenciacijo celic. Dokazano je bilo, da stimulira rast epitelnih celic *in vivo* in v kulturi. Kot mitogen, ki sproži mitozo in transformacijo celic, deluje na humane fibroblaste *in vitro*, spodbuja proliferacijo fibroblastov, stimulira produkcijo kolagena ter celjenje ran (23). Z visoko afiniteto se veže na receptor epidermalnega rastnega faktorja (EGFR) na celični površini in stimulira intrinzični protein tirozin kinazo. Ta sproži signalno transdukциjo, ki povzroči zvišanje znotrajceličnega kalcija, pospešeno glikolizo, sintezo proteinov in pospešeno ekspresijo genov, kar vodi v sintezo DNA in celično proliferacijo. EGFR se nahaja tudi na površini fibroblastov.

1.5.2 Hidrokortizon

Druge ime za hidrokortizon je kortizol. Je glukokortikoid, ki ga sprošča skorja nadledvične žleze in ima mnoge učinke kot so spodbujanje nastajanja ogljikovih hidratov iz beljakovin, zvišuje raven sladkorja v krvi, zavira vnetne procese in vpliva na osrednje živčevje. Na celičnem nivoju pa zavira proliferacijo fibroblastov, sintezo DNA in sintezo proteinov kot je kolagen. Harvey in sodelavci (24) so raziskovali učinke steroidnih hormonov na fibroblaste *in vitro* in ugotovili, da HC pri koncentraciji 10 pg/ml zmanjša proliferacijo fibroblastov za 20-40% in sintezo DNA za 40-85% v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi.

Sinteza proteinov je bila ob izpostavitvi celic hidrokortizonu s koncentracijo 50 pg/ml, zmanjšana za 30% v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi (24).

1.5.3 Citotoksin kolhicin

Citoskelet daje celicam obliko, ima pomen pri gibanju, mitozi, znotrajceličnem transportu, ekso- in endocitozi in pri komunikaciji med celicami. Ob okvarah citoskeleta so okvarjene tudi njegove funkcije, posledično se celice ne morejo več deliti in propadejo.

Kolhicin je alkaloid jesenskega podleska *Colchicum autumnale*. Že leta 1930 so ga opisali kotstrup, ki prizadene nastanek delitvenega vretena in inhibira metafazo. Z veliko afiniteto se veže na tubulin in tako zaustavi nastanek mikrotubulov. Zaradi okvarjenih mikrotubulov se posledično okvari nastanek delitvenega vretena in celice se ne morejo več deliti.

Ujihara in sodelavci (25) so s pomočjo konfokalnega laserskega mikroskopa preiskovali spremembo morfoloških parametrov citoskeleta fibroblastov, ki so jih tretirali s kolhicinom. Celice so imele močno okvarjene mikrotubule, sama oblika celic pa se ni veliko spremenila (25).

1.6 IN VITRO »SCRATCH« METODA

In vitro »scratch« metoda, ki je preprosta, poceni in dobro razvita metoda za merjenje celične migracije *in vitro* (26), se pogosto uporablja v raziskovanju celičnega modela celjenja ran. Metoda temelji na ugotovitvi, da bodo celice na robu na novo narejene umetne poškodbe migrirale v prazen prostor in zapolnile poškodbo. Ključni koraki so tvorba poškodbe (»scratch«) preko monoplastne celične kulture ter fotografiranje poškodbe. Ponuja možnosti različnih pristopov, ki jih raziskovalci prilagodijo glede na vrsto celic in glede na pojav, ki ga opazujejo. Prilagodimo lahko razsežnost poškodbe tako, da naredimo ozko/široko poškodbo ali celice zraven mehanične poškodbe še dodatno kemično poškodujemo. Celice po poškodbi izpostavimo različnim stimulatorjem/inhibitorjem in spremljamo odzive. Glede na pojav, ki ga spremljamo, lahko prilagodimo tudi čas inkubacije celic po poškodbi. Celice lahko fotografiramo takoj po poškodbi in po koncu inkubacije ali v časovnih intervalih. Sledi primerjava mikrografov, ki dajo podatke o stopnji migracije celic v prostor poškodbe. Ena glavnih prednosti metode je primerljivost migracije celic v celični kulturi z migracijo celic *in vivo*.

1.7 ENCIMSKO IMUNSKA METODA NA TRDNEM NOSILCU

Encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA) je metoda s katero lahko kvalitativno in kvantitativno določamo protitelesa ali antigene v vzorcu. Ključno vlogo igra encim, konjugiran s protitelesom, ki reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Poznamo številne variante ELISA, ena izmed njih je sendvič ELISA, pri kateri lahko kvantitativno določamo antigene, ki imajo več epitopov. Monoklonska protitelesa, specifična za iskane antigene (humani IL-6) so vezana na dno vdolbinic mikrotitrskih ploščic. S temi protitelesi reagirajo antigeni iz vzorca in standardi znanih koncentracij antigena. Sledi nanos biotiniliranih sekundarnih protiteles in inkubacija. Med prvo inkubacijo se antigen veže z enim epitopom na vezano monoklonsko protitelo, z drugim epitopom pa na sekundarno biotinilirano protitelo. Sledi spiranje, s katerim odstranimo nevezana sekundarna protitelesa. Nato dodamo encim hrenovo peroksidazo konjugirano s streptavidinom. V drugi inkubaciji se hrenova peroksidaza preko streptavidina veže na biotinilirana sekundarna protitelesa. Sledi spiranje nevezanih encimov in nato dodajanje substrata kromogena, ki ga hrenova peroksidaza oksidira, pri čemer kromogen spremeni barvo. S pomočjo standardov pripravimo umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami antigena, iz katere lahko razberemo neznano koncentracijo v vzorcu. Intenziteta obarvanja je sorazmerna koncentraciji antigena v vzorcu (16, 27).

1.8 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (QPCR) predstavlja nadgradnjo konvencionalne metode PCR in temelji na sprotnem določanju in vizualizaciji pomnoženega odseka nukleinske kisline na podlagi fluorescence. Največkrat se uporablja za analizo izražanja genov, za določanje kvantitativnih razlik v izražanju genov, za analize informacijske RNA (mRNA). mRNA s pomočjo reverzne transkripcije prepišemo v komplementarno DNA (cDNA), ki se uporablja kot matrika pri QPCR za detekcijo in kvantifikacijo genov.

Pri QPCR lahko pride do napak zaradi manjših razlik v začetni količini in kvaliteti RNA, razlik in učinkovitosti cDNA sinteze in PCR pomnoževanja. Da bi čim bolj zmanjšali njihov vpliv ter vpliv razlik med vzorcji na sam potek QPCR, uporabljamo t.i. hišne gene. Ti so pomnoženi skupaj z vzorcem, in služijo kot notranja referenca, na podlagi katerih je mogoče normalizirati vrednosti ostalih cDNA. Največkrat se za hišne gene uporablja gen

za podenoto 18S ribosomalne RNA (rRNA), gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH) ali β -aktin (28).

Za določanje pomnoženega dela nukleinske kisline se pogosto uporablja TaqMan sonda, ki se specifično veže na tarčno zaporedje. Temelji na $5' \rightarrow 3'$ eksonukleazni aktivnosti Taq polimeraze, encima, ki v reakciji služi za pomnoževanje odsekov nukleinske kisline. TaqMan je fluorescentna oligonukleotidna sonda, ki ima vezani 2 fluorescentni barvili. Na 5' koncu je vezano reportersko barvilo, na 3' koncu pa dušilec, ki duši oddano fluorescenco reporterskega barvila. Med podaljševanjem verige s Taq polimerazo pride tudi do razgradnje sonde, reportersko barvilo in dušilec se ločita in posledica je oddajanje fluorescence reporterskega barvila. V vsakem ciklu pomnoževanja računalniški program zabeleži jakost fluorescentnega signala in izriše krivuljo pomnoževanja, ki predstavlja odvisnost spremembe jakosti fluorescence od števila ciklov (29).

2 NAMEN, HIPOTEZE IN CILJI

SSc je neozdravljiva avtoimunska bolezen, zaznamovana s fibrozo, ki lahko vodi do hudih pljučnih sprememb. Ker je fibroza lahko posledica okvar pri celjenju ran, je širši namen magistrske naloge postavitev in optimizacija celičnega modela celjenja poškodbe monoplastne kulture primarnih humanih pljučnih fibroblastov.

Protein akutne faze SAA je povišan pri bolnikih s SSc, in povišane vrednosti SAA korelirajo s poslabšanjem pljučnih funkcij. Zaenkrat še ni znano, ali SAA lahko stimulira aktivacijo pljučnih fibroblastov, kako vpliva na izražanje vnetnih citokinov, kemokinov, adhezivnih molekul, razgradnih encimov ter ali igra vlogo v modelu celjenja ran na celičnem nivoju. V nalogi bomo preliminarno ocenili primernost SAA kot stimulatorja aktivacije pljučnih fibroblastov. Prav tako nas zanima, ali SAA lahko vpliva na inhibicijo migracije pljučnih fibroblastov s kolhicinom, v celičnem modelu celjenja ran.

Preverjali bomo naslednje hipoteze:

- I. SAA stimulira pljučne fibroblaste in pospešuje ekspresijo vnetnih citokinov, vključno z IL-6,
- II. SAA sodeluje pri celjenju ran pljučnih fibroblastov po aplikaciji citotoksina kolhicina

Preliminarni del naloge

V okviru raziskave bodo vzpostavljeni pogoji gojenja pljučnih fibroblastov in induciranje poškodb celic. Preliminarno se bodo izvajali poskusi, s katerimi bodo določeni optimalni pogoji dela, pozitivne/negativne kontrole, koncentracije stimulatornih/inhibitornih molekul pri stimuliranih/nestimuliranih ter poškodovanih/nepoškodovanih pljučnih fibroblastih. Poškodbe na gojenih pljučnih fibroblastih bodo izvedene po »Scratch« protokolu.

SPECIFIČNI CILJI naloge so DOLOČITI:

1. vpliv SAA v naraščajočih koncentracijah na IL-6 v pljučnih fibroblastih
2. spremembe na celičnem nivoju pred in po poškodbi pljučnih fibroblastov z
 - a) analizo fotografiranih celic in obdelavo mikrografov,
 - b) grafi zapolnitve poškodbe,

- c) štetje celic, ki rastejo v prostor po poškodbi,
 - d) viabilnost celic
3. najprimernejše molekule za zasledovanje vrednotenja poškodbe in primerjati različne kazalce stanja (kot so citokini, kemokini, adhezivne molekule, proteolitični encimi) na mRNA nivoju z določanjem različnih izraženih molekul s StellArray
 4. vpliv SAA pred in po poškodbi pljučnih fibroblastov na
 - a) izločeni IL-6 na proteinskem nivoju, ki bo določen v supernatantih pljučnih fibroblastov z ELISA),
 - b) IL-6 ter IL-8 na mRNA nivoju z QPCR

Rezultati nam bodo služili za razvoj celičnega modela celjenja ran na pljučnih fibroblastih, v katerem želimo postaviti okvir za nadaljnje raziskave.

3 METODE

3.1 NASAJANJE IN GOJENJE CELIC

Nasajanje celic

Glede na število zamrznjenih celic in izbrano nasaditveno gostoto smo izračunali volumen suspenzije celic, ki ga bomo nasadili v vsako vdolbinico plošče. Pred nasaditvijo celic smo v plošče za gojenje celic z 12 ali 6 vdolbinicami napipetirali hranilni bazalni medij za fibroblaste (FMB) z 10% govejim fetalnim serumom (FBS) (FMB - 10% FBS) in jih za 30 min postavili v inkubator (5% CO₂, 37 °C, 100% relativna vlažnost). Iz tekočega dušika smo vzeli zamrzovalno posodico s celicami in jo prenesli v vodno kopel na 37 °C za 2 min, da so se celice odtalile. Vsebino zamrzovalne posodice smo rahlo premešali s stresanjem, obrisali s 70% etanolom in prenesli v aseptično komoro. Z 1 ml pipeto smo prenesli celice v suspenziji (1,8 ml) v večjo 15 ml epruveto in dodali še preračunan volumen medija. Vsebino 15 ml epruvete smo rahlo premešali s pipeto. Plošče z vdolbinicami za gojenje celic smo prenesli iz inkubatorja ter odpipetirali v vsako preračunan volumen suspenzije s celicami. Po 4 h smo zamenjali popolni hranilni medij.

Izračun volumna suspenzije celic, ki jih nasadimo v vdolbinice plošč za gojenje celic

Celice nasajamo v plošče s 6 in 12 vdolbinicami. Plošče s 6 vdolbinicami imajo površino 8,96 cm², plošče z 12 vdolbinicami 3,59 cm². Glede na število celic, ki smo jih imeli na razpolago, smo izbrali nasaditveno gostoto. S pomočjo križnega računa smo izračunali volumen medija, ki smo ga dodali suspenziji celic. V plošče z 12 vdolbinicami smo v vdolbinice odpipetirali 500 µl skupnega volumna celic in hranilnega medija, v plošče s 6 vdolbinicami pa 1000 µl skupnega volumna.

Enačba 1: Izračun volumna suspenzije celic

$$\text{izbrana nasaditvena gostota} \times \text{površina vdolbinice} = \text{število celic na vdolbinico}$$

$$\text{število celic na vdolbinico} \rightarrow 500 \mu\text{l ali } 1000 \mu\text{l}$$

$$\text{število celic v zamrzovalni posodici} \rightarrow X$$

Menjava hranilnega medija

Hranilni medij FBM - 10% FBS smo najprej segreli v vodni kopeli na 37 °C in ga prenesli v aseptično komoro. Celicam smo prvič zamenjali medij 4-5 h po nasajanju, nato pa vsak

drugi dan vse dokler celice niso dosegle ustrezne konfluentnosti (80-90% prekrivnost vdolbinic v ploščah). Dve uri pred izpostavitvijo celic različnim učinkovinam smo zamenjali hranilni medij FMB - 10% FBS z FMB - 0% FBS. Z vakuumsko črpalko smo previdno odsesali staro gojišče in s sterilnim pipetnim nastavkom dodali ustrezen volumen svežega gojišča. Pri menjavi gojišča smo pazili, da je bil curek majhen in ni bil usmerjen na površino s celicami.

Precepljanje in štetje celic

Tripsin, s fosfatom pufrano fiziološko raztopino (PBS, pH=7,2), hranilni medij (FBM - 10% FBS) in nevtralizacijsko raztopino za tripsin smo segreli v vodni kopeli na 37 °C. Ploščico s celicami smo prenesli v aseptično komoro. Medij smo zavrgli in celice sprali s 5 ml pufra PBS. Dodali smo 2 ml (plošče s 6 vdolbinicami) ali 1 ml (plošče z 12 vdolbinicami) tripsina, ki odcepi pritrjene celice od podlage in inkubirali 2 min. Po inkubaciji smo celice pogledali pod mikroskopom in preverili, če so se odlepile od podlage. Nato smo dodali še dvakratni volumen nevtralizacijske raztopine za tripsin, ki je prekinila delovanje tripsina. Na krovno stekelce smo kanili 10 µl dobro premešane celične suspenzije in ji dodali 10 µl barvila TripanBlue. Kapljico smo dobro premešali s pipetiranjem gor in dol ter nanesli 10 µl na objektno stekelce v aparatu Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA). Aparat je preštel celice in določil njihovo viabilnost.

3.2 DELO S CELICAMI

Poskuse smo opravili v dveh delih. V prvem delu smo naredili pilotne poskuse, pri katerih smo določili pogoje dela, koncentracije in volumne učinkovin, ki smo jih kasneje uporabili pri potrditvenih poskusih.

3.2.1 Preliminarni, pilotni del

Poskus smo izvedli na celicah normalnih humanih pljučnih fibroblastih (NHLF) tretje pasaže, ki smo jih gojili v ploščah z 12 vdolbinicami. Celice so bile pripravljene za eksperiment, ko so dosegle 80 - 90% konfluentnost. Pred eksperimentom smo celicam zamenjali gojišče z FBM - 0% FBS. Nato smo v aseptično komori s 100 µl pipetnimi nastavki naredili vodoravno in navpično poškodbo preko vsake vdolbinice na plošči. Na spodnji strani plošče z vdolbinicami smo na presečišču navpične in vodoravne poškodbe označili referenčno točko, ki nam je kasneje služila pri fotografiranju. Fotografirali smo vidno polje pod referenčno točko in sicer tako, da je bil del referenčne točke še viden.

Fotografirali smo pri 4x in 10x povečavi. Nato smo celice stimulirali z različnimi koncentracijami EGF, SAA, HC, KOL ter IL-1 β (preglednice I-V). Po 24 h inkubaciji smo isto vidno polje z referenčno točko ponovno fotografirali pri 4x in 10x povečavi kot pred stimulacijo in tako smo lahko primerjali, kako se je prostor poškodbe zapolnil.

Supernatante iz posamezne vdolbinice smo prenesli v 1,5 ml epice, jih centrifugirali 5 min na 5000 RPM. Po centrifugiranju smo supernatant prenesli v novo 1,5 ml epico ter shranili na -20 °C za določitev IL-6 z metodo ELISA. Celice pritrjene na podlago plošče smo po obdelavi in nanosu na objektno stekelce prešteli s pomočjo aparata Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA), ki nam je podal število in viabilnost celic.

Preglednica I: Od odmeka odvisen odgovor pozitivne in negativne kontrole za celični model celjenja ran

(B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, FBM - bazalni medij za fibroblaste)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	500 µl FBM
EGF (2,5 µg/500 µl H ₂ O)	2,5 nM	1,58 µl/500 µl
EGF	5 nM	3,16 µl/500 µl
EGF	10 nM	6,33 µl/500 µl
EGF	15 nM	9,5 µl/500 µl
EGF	30 nM	19 µl/500 µl
HC (100 µg/500 µl)	1 nM	0,9 µl(1:1000) /500 µl
HC	10 nM	9 µl(1:1000)/500 µl
HC	50 nM	4,5 µl(1:100)/500 µl
HC	100 nM	9 µl(1:100)/500 µl
HC	200 nM	1,8 µl(1:10)/500 µl

Preglednica II: Od odmerka odvisen odgovor SAA

(B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, SAA – serumski amiloid A, FBM - bazalni medij za fibroblaste)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	500 µl FBM
EGF	10 nM	6,33 µl/500 µl
HC	200 nM	1,8 µl(1:10)/500 µl
SAA (1 g/l)	1 nM	6 µl(1:1000)/500 µl
SAA	10 nM	60 µl(1:1000)/500 µl
SAA	100 nM	60 µl(1:100)/500 µl
SAA	500 nM	3 µl/500 µl
SAA	1000 nM	6 µl/500 µl

Preglednica III: Kombinacija inkubacije SAA in IL-1 β

Celice smo nasadili kot pri ostalih poskusih, le da smo jim tokrat v vdolbinicah 4,5 in 6 najprej dodali IL-1 β in jih inkubirali 3 h, nato pa v istih vdolbinicah zamenjali gojišče, ki smo mu dodali SAA. (B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, SAA – serumski amiloid A, IL-1 β – interlevkin – 1 beta, FBM - bazalni medij za fibroblaste)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen	Dodatek SAA po 3 h
B	/	500 µl FBM	
EGF	5 nM	3,16 µl/500 µl	
HC	200 nM	18 µl(1:100)/500 µl	
IL-1 β (25 µg/250 µl H ₂ O)+SAA	100 pg/ml IL-1 β + 1000 nM SAA	0,5 µl IL-1 β /500 µl	6 µl SAA/500 µl
IL-1 β +SAA	500 pg/ml IL-1 β + 1000 nM SAA	2,5 µl IL-1 β /500 µl	6 µl SAA/500 µl
IL-1 β +SAA	1000 pg/ml IL-1 β + 1000 nM SAA	5 µl IL-1 β /500 µl	6 µl SAA/500 µl

Preglednica IV: Od odmerka odvisen odgovor inhibitorja kolhicina

Celicam smo v gojišče dodali različne koncentracije citotoksina kolhicina, jih inkubirali 3 h, nato pa zamenjali gojišče z FBM - 0% FBS in inkubirali 24 h. (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, KOL – kolhicin, FBM - bazalni medij za fibroblaste*)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	500 µl FBM
EGF	5 nM	3,16 µl/500 µl
KOL (100 ng/2,2 ml H ₂ O)	0,3 nM	1,3 µl (1:10 ⁶)/500 µl
KOL	3 nM	13 µl (1:10 ⁶)/500 µl
KOL	30 nM	1,3 µl (1:10 ⁴)/500 µl
KOL	100 nM	4,4 µl (1:10 ⁴)/500 µl
KOL	300 nM	1,3 µl (1:1000)/500 µl

Preglednica V: Kombinacije različnih koncentracij kolhicina in SAA

Celicam smo najprej v gojišče dodali različne koncentracije kolhicina, jih inkubirali 3 h, nato zamenjali gojišča, ki smo jim dodali določene koncentracije SAA. (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, KOL – kolhicin, SAA – serumski amiloid A, FBM - bazalni medij za fibroblaste*)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen	Dodatek SAA po 3 h
B	/	500 µl FBM	
EGF	5 nM	3,16 µl/500 µl	
KOL + SAA	30 nM KOL+500 nM SAA	1,3 µl (1:10 ⁴) KOL/500 µl	3 µl/500 µl
KOL + SAA	30 nM KOL+1000 nM SAA	1,3 µl (1:10 ⁴) KOL/500 µl	6 µl/500 µl
KOL + SAA	100 nM KOL+ 500 nM SAA	4,4 µl (1:10 ⁴) KOL/500 µl	3 µl/500 µl
KOL + SAA	100 nM KOL+1000 nM SAA	4,4 µl (1:10 ⁴) KOL/500 µl	6 µl/500 µl
KOL + SAA	300 nM KOL+1000 nM SAA	1,3 µl (1:10 ³) KOL/500 µl	6 µl/500 µl

3.2.2 Potrditveni poskusi

Po končanem preliminarnem delu smo določili pogoje dela in koncentracije stimulatorjev/inhibitorjev, ki so bili najbolj optimalni in pri katerih je bila sprememba celičnega celjenja najvidnejša. Celice smo nasadili v dveh serijah plošč. V prvi seriji smo

naredili navpično poškodbo čez vdolbinico, v drugi seriji pa poškodb nismo naredili. S tem smo želeli preveriti, če sama poškodba vpliva na izločanje določenih citokinov, kemokinov in drugih vnetnih dejavnikov, kar smo kasneje preverjali z ELISA in QPCR.

Poskuse smo izvedli na celicah NHLF tretje pasaže, ki smo jih gojili v ploščah s 6 vdolbinicami. Celice smo nasadili v skupno 1000 µl medija na vdolbinico. 2 h pred eksperimentom smo celicam zamenjali gojišče s FBM - 0% FBS. Nato smo pri prvi seriji plošč v aseptični komori s 100 µl pipetnimi nastavki naredili navpično poškodbo preko vsake vdolbinice. Ploščo smo kot pri preliminarnih poskusih označili na spodnji strani, da smo lahko fotografirali enako vidno polje na začetku poskusa in po 24 h inkubaciji. Druge serije plošč z vdolbinicami nismo poškodovali. Nato smo celicam obeh serij plošč dodali prej preračunane volumne učinkovin (preglednice VI - IX). Po 24 h inkubaciji smo celice v prvi seriji plošč fotografirali, celice v drugi seriji plošč pa le pregledali, če je prišlo do morfoloških razlik. Supernatante iz posameznih vdolbinic smo odpipetirali v 1,5 ml epice, jih centrifugirali 5 min na 5000 RPM, supernatante prenesli v novo 1,5 ml epico ter shranili na -20 °C za določitev IL-6. Celice pritrjene na podlago smo lizirali s 350 µl Buffer RLT Plus (Qiagen, Hilden, Nemčija), izolirali mRNA, z reverzno transkripcijo mRNA prepisali v cDNA in z QPCR določali spremembe na genskem nivoju.

Preglednica VI: Kombinacije SAA z EGF in hidrokortizonom

(B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, pozitivna kontrola, HC – hidrokortizon, negativna kontrola, SAA – serumski amiloid A, FBM – bazalni medij za fibroblaste)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	1000 µl FBM
EGF	5 nM	6,3 µl/1000 µl
EGF + SAA	5 nM EGF+ 1000 nM SAA	6,3 µl EGF + 12 µl SAA /1000 µl
SAA	1000 nM	12 µl/1000 µl
HC	200 nM	36 µl (1:100)/1000 µl
HC + SAA	200 nM HC + 1000 nM SAA	36 µl HC(1:100)+12 µl SAA/1000 µl

Preglednica VII: Od odmerka odvisen odgovor SAA

(*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, pozitivna kontrola, HC – hidrokortizon, negativna kontrola, SAA – serumski amiloid A, FBM - bazalni medij za fibroblaste*)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	1000 µl FBM
EGF	5 nM	6,3 µl/1000 µl
HC	500 nM	45 µl(1:100)/1000 µl
SAA	50 nM	0,6 µl/1000 µl
SAA	500 nM	6 µl/1000 µl
SAA	1000 nM	12 µl/1000 µl

Preglednica VIII: Naraščajoče koncentracije citotoksina kolhicina

Celice smo kot v preliminarnih poskusih 3 h inkubirali s kolhicingom, nato smo zamenjali gojišče za FBM - 0% FBS in celice inkubirali še 24 h. (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, pozitivna kontrola, HC – hidrokortizon, negativna kontrola, KOL - kolhycin, FBM - bazalni medij za fibroblaste*)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen
B	/	1000 µl FBM
EGF	5 nM	6,3 µl/1000 µl
HC	500 nM	45 µl(1:100)/1000 µl
KOL	30 nM	2,6 µl(1:10 ⁴)/1000 µl
KOL	100 nM	8,8 µl(1:10 ⁴)/1000 µl
KOL	300 nM	2,6 µl(1:1000)/1000 µl

Preglednica IX: Inhibitor kolhicin v prisotnosti in odsotnosti naraščajočih koncentracij SAA

V vdolbinice 4 – 9 smo v gojišče dodali kolhycin, po 3 h stimulacije s kolhicingom smo vdolbinicam 4, 5, 6 in 7 zamenjali gojišče z FBM - 0% FBS, ki smo mu dodali SAA. Vdolbinicam 8 in 9 smo po 3 h prav tako zamenjali gojišče z FBM - 0% FBS. (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, pozitivna*

kontrola, HC – hidrokortizon, negativna kontrola, KOL - kolhicin, SAA – serumski amiloid A, FBM - bazalni medij za fibroblaste)

Učinkovine	Končna koncentracija	Volumen	Dodatek SAA po 3 h
B	/	1000 µl FBM	
EGF	5 nM	6,3 µl/1000 µl	
HC	500 nM	45 µl(1:100)/1000 µl	
KOL + SAA	100 nM KOL+ 500 nM SAA	8,8 µl (1:10 ⁴)KOL/1000 µl)	6 µl
KOL + SAA	100 nM KOL+ 1000 nM SAA	8,8 µl(1:10 ⁴) KOL/1000 µl)	12 µl
KOL + SAA	300 nM KOL+ 500 nM SAA	2,6 µl(1:1000) KOL/1000 µl)	6 µl
KOL + SAA	300 nM KOL+1000 nM SAA	2,6 µl(1:1000) KOL/1000 µl)	12 µl
KOL	100 nM	8,8 µl (1:10 ⁴)/1000 µl	
KOL	300 nM	2,6 µl (1:1000)/ 1000 µl	
SAA	500 nM	6 µl/1000 µl	
SAA	1000 nM	12 µl/1000 µl	
EGF+SAA	5 nM + 1000 nM SAA	6,3 µl EGF+12 µl SAA/1000 µl	

3.3 IL-6 ELISA

Najprej smo, glede na število testiranih vzorcev, določili ustrezeno število vrstic mikrotitrske ploščice. Pripravili smo tabelo z vrstnim redom nanašanja vzorcev in standardov ter dodatne epice za redčenje tistih vzorcev, kjer smo pričakovali visoke koncentracije IL-6.

Spiralni pufer, standarde IL-6 in delovno raztopino Streptavidin-HRP (Streptavidin-HRP working solution) smo pripravili po navodilih proizvajalca (BioSource, Nivelles, Belgija). Na ploščico smo nanesli po 100 µl pripravljenih standardov in vzorcev po vrsti kot smo pripravili načrt. V vse vdolbinice plošče smo poleg vzorcev in standardov nanesli po 50 µl biotiniliranega sekundarnega protitelesa proti humanem IL-6, ploščo rahlo potresli in inkubirali 2 h v temi. Po inkubaciji je sledilo spiranje s spiralnim pufrom. Po spiranju smo v vse vdolbinice dodali po 100 µl delovne raztopine Streptavidin-HRP, ploščico rahlo potresali ter inkubirali v temi 30 min. Po inkubaciji smo ploščico ponovno sprali s spiralnim pufrom in jo močno otresli na staničevini. Nato smo v vse vdolbinice dodali po 100 µl stabilizacijskega kromogena. Po končani 30 min inkubaciji smo v vdolbinice dodali

po 100 µl raztopine za ustavitev reakcije in na UV spektrofotometru Tecan SUNRISE (Tecan Group AG, Männedorf, Švica) pomerili absorbanco pri 450 nm. Na osnovi izmerjene absorbance standardov z znano koncentracijo smo s pomočjo umeritvene krivulje določili koncentracijo IL-6 v vzorcih. Vzorce, pri katerih je bila izmerjena absorbanca višja od najvišjega standarda, smo dodatno redčili in ponovno analizirali.

3.4 IZOLACIJA RNA

Za izolacijo RNA smo uporabili komplet reagentov RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Reagente in ploščice s celicami smo ogreli na sobno temperaturo. Predhodno lizirane celice v vdolbinicah ploščice smo postrgali s strgalci, da smo pobrali čim več celic, nato smo 350 µl raztopine za liziranje skupaj s celicami prenesli v naprej pripravljene epice. Epice smo močno premešali in prenesli lizat na kolono za odstranjevanje DNA iz vzorca (gDNA Eliminator spin column). Gre za kolono z 2 ml zbirno epico. Na koloni se zadrži DNA, preostanek pa se po 30 s centrifugiraju pri več kot 10000 RPM prefiltira preko kolone v zbirno epico. Nato smo zavrgli kolono in se s tem znebili DNA iz vzorca. Vzorcu smo dodali 350 µl 70% EtOH, ga dobro premešali in vzorec nato prenesli na kolono za odstranjevanje RNA iz vzorca (Rneasy MinElute spin column) ter centrifugirali 15 s pri več kot 10000 RPM. Gre za kolono, ki zadrži RNA, preostanek se po centrifugiraju zadrži v zbirni epici pod kolono. Zbirno epico s tekočino smo zavrgli, kolono pa smo prenesli v novo serijo zbirnih epic. Na kolono smo najprej nanesli 700 µl pufra RW1 in centrifugirali 15 s pri več kot 10000 RPM, nato še 500 µl pufra RPE in centrifugirali 15 s pri več kot 10000 RPM. Nato smo na kolono nanesli 80% EtOH ter centrifugirali 2 min pri več kot 10000 RPM. Kolono smo prenesli v novo zbirno epico in jo odprtto centrifugirali pri maksimalni hitrosti (14000 RPM) 2 min. Zbirno epico smo zavrgli in kolono prenesli v prej pripravljeno in označeno serijo epic za RNA. Direktno na sredino membrane smo dodali 14 µl vode brez nukleaz in centrifugirali 1 min pri maksimalni hitrosti. Tako smo sprali RNA iz kolone in jo prenesli v epico. Tako je bil vzorec pripravljen na ugotavljanje čistosti ter izkoristka RNA.

3.4.1 Spektrofotometrično določanje čistosti in izkoristka RNA

Koncentracijo in čistost izolirane RNA smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbanc pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm z napravo Nanodrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, ZDA). Razmerje A₂₆₀/A₂₈₀ nam poda rezultat čistosti produkta v vzorcu. Primerno razmerje je med 1,8 in 2,0. Če je rezultat v

tem območju, pomeni, da je vzorec čist in ne vsebuje primesi in/ali proteinov. Nižje vrednosti kažejo na prisotnost proteinov in DNA v vzorcu. Pomembno je, da imamo pred analizo PCR koncentracijo RNA $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ v vseh vzorcih. S tem normaliziramo postopek, saj tako pri vseh vzorcih začnemo analizo PCR z enako koncentracijo. Izmerjeno absorbanco RNA pomnožimo s faktorjem 40.

Enačba 2: Izračun koncentracije RNA

$$c_{RNA} = A_{260} \times 40$$

3.5 REVERZNA TRANSKRIPCIJA

S pomočjo reverzne transkripcije smo izolirano mRNA prepisali v komplementarno enoverižno DNA (cDNA). Skupen volumen v epici mora biti $30 \mu\text{l}$ in sestoji iz $14,4 \mu\text{l}$ reakcijske mešanice, preračunanega volumna vzorca in vode brez nukleaz.

Preglednica X: Sestava reakcijske mešanice za reverzno transkripcijo

(*RT pufer – pufer za reverzno transkripcijo, dNTP – nukleotidi, oligo dT – timidinski nukleotidi, AMV RT – encim reverzna transkriptaza virusa ptičje mieloblastoze (Avian Myeloblastosis Virus)*)

Reagenti	1x
10x RT pufer	$3 \mu\text{l}$
dNTP (10mM)	$3 \mu\text{l}$
MgCl_2 (25mM)	$6 \mu\text{l}$
Oligo dT ($500 \mu\text{l}/\text{ml}$)	$1 \mu\text{l}$
RNAzni inhibitor ($40 \text{U}/\mu\text{l}$)	$0,75 \mu\text{l}$
AMV RT ($25 \text{U}/\mu\text{l}$)	$0,6 \mu\text{l}$
H_2O brez nukleaz	$0,05 \mu\text{l}$
Skupni volumen	$14,4 \mu\text{l}$

Epice smo centrifugirali 1 min na 10000 RPM, nato smo jih postavili v aparaturo Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) in nastavili program za reverzno transkripcijo, ki je sestavljen iz 30 min inkubacije pri 43°C , 30 min inkubacije pri 53°C in 5 min inkubacije pri 94°C . Po končani reakciji smo dobljene produkte shranili na -20°C .

3.6 KVANTITATIVNA VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Vzorce in reagente za analizo smo ogreli na sobno temperaturo. Vzorce smo redčili z vodo brez nukleaz z redčitvijo 1:4 (20 µl vzorca in 60 µl H₂O brez nukleaz). Ostanek vseh vzorcev smo združili v eni epici in jo označili kot »pool vzorec«. »Pool vzorec« smo uporabili pri pripravi standardov - s tem smo dosegli, da so bili vsi vzorci v dinamičnem območju standardne krivulje. Pri pripravi standardov smo za prvi standard uporabili »pool vzorca«, nato pa smo vsak naslednji standard pripravili z redčitvijo predhodnega standarda 1:10 (preglednica XI). Če je bila ekspresija gena nizka, smo standarde pripravili z redčitvijo 1:5.

Preglednica XI: Priprava standardov z redčitvijo 1:10

(ST – standard)

Priprava standardne krivulje		
ST 1	1,92 µl »pool vzorca« direktno na ploščico za PCR	
ST 2	2 µl »pool vzorca«	18 µl vode brez nukleaz
ST 3	2 µl ST2	18 µl vode brez nukleaz
ST 4	2 µl ST3	18 µl vode brez nukleaz
ST 5	2 µl ST4	18 µl vode brez nukleaz

Nato smo pripravili reakcijsko mešanico za QPCR. Najprej smo naredili QPCR za hišni gen 18S, kateri nam je služil za normalizacijo, nato smo naredili QPCR za izbrane-tarčne gene.

Preglednica XII: Reakcijska mešanica za referenčni gen 18S

Priprava reakcijske mešanice za QPCR 18S	1x
Reakcijska mešanica (Master Mix 2x)	10 µl
20x18S kontrolnih oligonukleotidnih začetnikov	1 µl
H ₂ O brez nukleaz	7,08 µl
Skupni volumen	18,08 µl

Preglednica XIII: Reakcijska mešanica za QPCR ($F - F$ (»forward«) oligonukleotidni začetnik, $R - R$ (»reverse«) oligonukleotidni začetnik)

	KAPPA 1x
KAPPA fast	6 µl
F (+R) oligonukleotidni začetnik (200 nM)	0,24 µl
(R oligonukleotidni začetnik (200 nM))	0,24 µl
ROX High	0,24 µl
H ₂ O brez nukleaz	3,6 µl (3,36 µl)
Skupni volumen	10,08 µl

*v primeru, da sta F in R ločena: 0,24 µl F in 0,24 µl R oligonukleotidna začetnika ter 3,6 µl H₂O; če sta oligonukleotidna začetnika R in F skupaj: 0,24 µl R+F in 3,36 µl H₂O.

Pripravili smo si načrt nanašanja vzorcev, standardov in PCR kontrole brez cDNA (NTC) na ploščico (Preglednica XIV). Najprej smo v vdolbinice nanesli reakcijsko mešanico, nato pa vzorce in standarde v dvojnikih. Pri QPCR 18S smo v vsako vdolbinico nanesli po 18,08 µl reakcijske mešanice, 1,92 µl vzorcev/1,92 µl standardov/1,92 µl NTC. Pri QPCR za posamezen gen smo v vdolbinice nanesli po 10,08 µl reakcijske mešanice in 1,92 µl vzorca/1,92 µl standarda/1,92 µl NTC.

Preglednica XIV: Načrt nanašanja vzorcev, standardov in NTC na PCR ploščico
(NTC - PCR kontrola brez cDNA (angl. »No Template Control«), ST – standard, VZ – vzorec)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	NTC	NTC	ST1	ST1	ST2	ST2	ST3	ST3
B	ST4	ST4	ST5	ST5	VZ1	VZ1	VZ2	VZ2
C	VZ3	VZ3	VZ4	VZ4	VZ5	VZ5	VZ6	VZ6
D	VZ7	VZ7	VZ8	VZ8	VZ9	VZ9	VZ10	VZ10
E	VZ11	VZ11	VZ12	VZ12	VZ13	VZ13	VZ14	VZ14

Ploščico smo prelepili s folijo in centrifugirali 5 min pri 1800 RPM. Ploščico smo položili v aparat za PCR (Applied Biosystems, Step One Real-Time PCR System, Foster City, ZDA) in zagnali program za QPCR.

3.7 STELLARRAY

StellARray je PCR ploščica z vdolbinicami, v katerih so naneseni oligonukleotidni začetniki za različne gene. Služi sočasnemu preverjanju ekspresije različnih genov na istem vzorcu. V našem primeru smo sicer analizirali ekspresijo 48 različnih genov, vendar bodo za naš namen predstavljeni le geni, ki so najbolj vpleteni v celični model celjenja ran. Opis reakcijske mešanice za StellARray je predstavljen v preglednici XV.

Preglednica XV: Reakcijska mešanica za StellARray

(cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina)

	1x
KAPPA fast	6 µl
H ₂ O brez nukleaz	4,8 µl
cDNA	1,2 µl
Skupni volumen	12 µl

Ploščico z nanesenimi oligonukleotidnimi začetniki (Preglednica XVI), reagente in vzorce smo odtalili. KAPPA fast smo zmešali z H₂O brez nukleaz in cDNA vzorca ter po 12 µl nanašali v vsako vdolbinico na ploščici. Ploščico smo prelepili s folijo in centrifugirali 2 min na 1800 RPM. Nato smo ploščico pustili stati 30 min na sobni temperaturi, da se je vsebina v vdolbinici dobro raztopila in premešala. Ploščico smo položili v aparat za PCR (Applied Biosystems, Step One Real-Time PCR System) in zagnali program. Program sestoji iz 1 min inkubacije na 50 °C, 3 min na 95 °C; in nato 3 s na 95 °C in 20 s na 60 °C, kar se 40x ponovi.

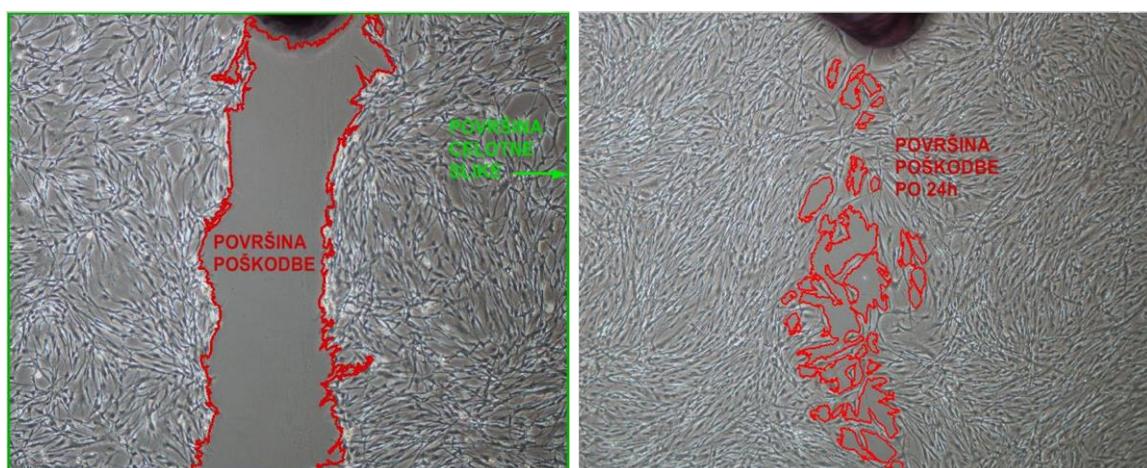
Preglednica XVI: Ploščica za StellARray z oligonukleotidnimi začetniki

(GAPDH - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GS genomic - humana genomska DNA, CTGF - rastni faktor vezivnega tkiva, IL - interlevkin, MMP - matriks metaloproteinaza, COL1A2 - kolagen tipa 2, alfa 2, COL1A2 - kolagen tipa 1, alfa 1, SERPINH1 - serpin peptidazni inhibitor, »clade« H, PAI-1 - inhibitor peptidaznega aktivatorja 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	GAPDH	HSGenomic	CTGF	IL-1B	IL-6	IL-8	MMP-1	MMP-9
B	MMP-12	COL-1-A2	COL-1-A1	SERPIN H1	PAI-1			

3.8 OBDELAVA MIKROGRAFOV

Vsako ploščico s celicami smo označili in fotografirali takoj po stimulaciji, nato pa še po končani 24 h inkubaciji. V dolbinice ploščic smo označili z referenčnimi točkami, da smo obakrat fotografirali enako vidno polje. Fotografirali smo vidno polje pod točko tako, da je bil del točke še viden (Slika 1). Po končanih eksperimentih smo s pomočjo obdelave mikrografov s programom Nikon NIS ELEMENTS D preračunali površino poškodbe (brez celic) na začetku in po koncu inkubacije. Uporabili smo mikrografe fotografirane pri 4x povečavi. S pomočjo programa smo najprej zajeli površino celotnega mikrograфа in rezultat podali v procentih - 100%. Nato smo zajeli površino poškodbe na mikrografu pred inkubacijo in podali površino poškodbe v procentih glede na celotni mikrograf (100%). Enako smo naredili pri mikrografu po inkubaciji (Slika 1). Razlika v površini poškodbe med mikrografom pred inkubacijo in mikrografom po inkubaciji nam je podala rezultat celjenja poškodbe.



Slika 1: Prikaz obdelave mikrografov celic NHLF, brez dodanih učinkovin, pred in po inkubaciji. Levi panel – mikrograf celic pred inkubacijo, zeleno: površina celotnega mikrograфа, rdeče: površina »poškodbe«. Desni panel – mikrograf celic po inkubaciji, rdeče: površina poškodbe po 24 h inkubaciji. (*celice NHLF – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

4 MATERIALI

4.1 REAGENTI

- 96% etanol (raztopina 70% etanola); Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Nemčija
- razkužilo (Kohrsolin FF); Bode Chemie, Nemčija
- 10x DPBS, Dulbeccov fosfatni pufer (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺); Bio WhittakerTM, Cambrex, Verviers, Belgija
- voda za mešanje pufrov in redčenje etanola (BiowaterTM distilled water for cells); Cambrex, Verviers, Belgija
- tripsin 10x raztopina (Trypsin/Versene EDTA); Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- raztopina za nevtralizacijo tripsina (Trypsin Neutralising Solution); CloneticsTM, Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- tripansko modrilo (Trypan Blue Stain 0.4% 100 ml); Bio WhittakerTM, Cambrex, Walkersville, MD, ZDA
- krioprotektant (Lonza, Basel, Švica)
- reagenti za encimsko imunsko metodo na trdnem nosilcu za IL-6 (BioSource Immunoassay Kit Human Interleukin-6 (Hu IL-6) ELISA); BioSource, Nivelles, Belgija
- reagenti za izolacijo RNA (RNeasy[®] Plus Micro Kit (50)); QIAGEN, Hilden, Nemčija
- reagenti za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System); Promega, Madison, WI, ZDA
- reagenti za verižno reakcijo s polimerazo
 - reakcijska mešanica za 18S (Applied Biosystems, TaqMan Universal PCR Master Mix)
 - reakcijska mešanica za posamezne gene (Kappa Biosystems, KAPPA SYBR FAST Universal qPCR Kit):
 - ploščica za PCR
 - voda brez nukleaz
- reagenti za StellARray (Custom 48 StellARray, Gene Expression System, Bar Harbor BioTechnology, ZDA, Trenton)
- ploščica za PCR z nanesenimi oligonukleotidnimi začetniki (Bar Harbor BioTechnology)

- voda brez nukleaz
- SAA (Peprotech, London, UK)
- EGF (Promocell, Heidelberg, Nemčija)
- HC (Promocell, Heidelberg, Nemčija)
- IL-1 β (GIBCO®, Life Technologies, Kalifornija, ZDA)
- KOL (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Nemčija)

Preglednica XVII: Oligonukleotidni začetniki genov

Temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov je bila pri oligonukleotidnem začetniku za IL-6 62 °C, pri vseh ostalih oligonukleotidnih začetnikih pa 60 °C; (*MMP – matriks metaloproteinaza, VCAM – vaskularna celična adhezijska molekula, IL – interlevkin, PAI - inhibitor plazminskega aktivatorja, CRP – C reaktivni protein, F – F (»forward«) oligonukleotidni začetnik, R – R (»reverse«) oligonukleotidni začetnik*)

Gen		bazno zaporedje oligonukleotidnega začetnika
MMP12	F	5' – AAC CAA CGC TTG CCA AAT CC -3'
	R	5' – TTT CCC ACG GTA GTG ACA GC - 3'
VCAM-1	F	5' – CTC AAG CAT GTC ATA TTC ACA GAA C -3'
	R	5' – AAC CCA AAC AAA GGC AGA GTA -3'
IL-6	F	5' – CTC TTC AGA ACG AAT TGA CAA ACA A -3'
	R	5'- GAG ATG CCG TCG AGG ATG TAC -3'
IL-8	F	5'- ACA CAG AGC TGC AGA AAT CAG -3'
	R	5' – TTT CAG AGA CAG CAG AGC AC - 3'
IL-17A	F	5' – CTG TCC CCA TCC AGC AAG AG -3'
	R	5' – AGG CCA CAT GGT GGA CAA TC -3'
IL-27	F	5' – CCT GGT TCA AGC TGG TGT CT -3'
	R	5' – CTC CTG GCA GGT GAG ATT CC -3'
PAI-1	F	5' – CAC AAA GAG GAA GGG TCT GTC -3'
	R	5' – GCA GAA AGT GAA GAT CGA GGT-3'
CRP	F	5' – GTT TGG GTC CAG AGT GCT CA -3'
	R	5' – GCT CTG CTG GGG CAA TTC TA -3'
COL1A2	F	5' – GCT GGT GTG ATG GGA TTC - 3'
	R	5' – GGG AAC ACC TCG CTC T -3'

4.2 BIOLOŠKI MATERIALI

- celična kultura primarnih humanih pljučnih fibroblastov, NHLF (Lonza, Basel, Švica)
- hranilni medij FBM (Lonza, Basel, Švica)
- goveji fetalni serum (Lonza, Basel, Švica)

4.3 APARATURE IN OSTALI MATERIALI

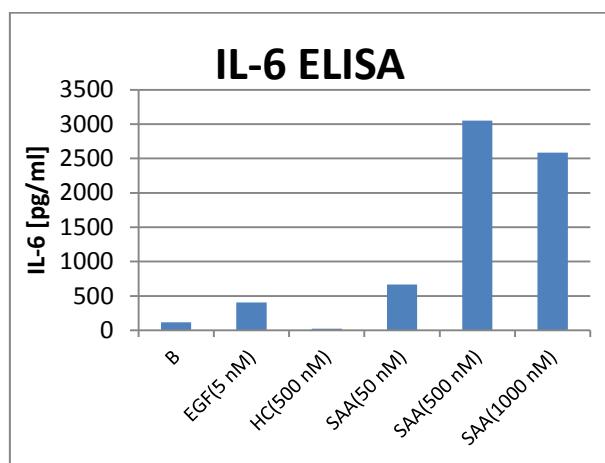
- aseptična komora s sterilnim pretokom zraka, LaminAir scan 1.2, Heto Holten, Allerod, Danska
- avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- centrifuga – minifuge T, Sepatech, Beijerland, Nizozemska
- centrifuga, Mini spin plus, Eppendorf, HQ, Hamburg, Nemčija
- Nanodrop 2000 C Spectrophotometer; Thermo Scientific, Waltham, ZDA
- aparat za reverzno transkripcijo, Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA
- aparat za PCR, Applied Biosystems, Step One Real-Time PCR System, Foster City, CA, ZDA
- mikroskop Nikon ECLIPSE TS100 (Nikon Instruments, NY, ZDA)
- fotoaparat Nikon (Nikon Instruments, NY, ZDA)
- programska oprema Nikon NIS-Elements (Nikon Instruments, NY, ZDA)
- inkubator, Heto-Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- UV spektrofotometer Tecan SUNRISE (Tecan Group AG, Männedorf, Švica)
- aparat za štetje celic CountessTM automated cell counter (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)
- objektna stekelca za štetje celic za aparat CountessTM
- 1,5 ml epruvete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- 200 µl epruvete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipeta Biohit, Biohit, Helsinki, Finska
- pipete, Eppendorf; Hamburg, Nemčija
- pipetni nastavki – stekleni, sterilni (1 ml, 10 ml, 25 ml); TPP, Trasadingen, Švica
- pipetni nastavki – sterilni s/brez filtra (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Eppendorf HQ, Hamburg, Nemčija

- plošče s 6 vdolbinicami, Tissue culture test plates: $8,96 \text{ cm}^2$, TPP, Trasadingen, Švica
- plošče z 12 vdolbinicami, Tissue culture test plates: $3,59 \text{ cm}^2$, TPP, Trasadingen, Švica
- vakumska črpalka, Vacum Pump XF54 230 50, Millipore, Schwalbach, Nemčija
- vodna kopel tip 1003, GFL, Burgwedel, Nemčija
- vodna kopel TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- shranjevalna plastenka s tekočim dušikom: Thermo Electron Corporation, Waltham, ZDA

5 REZULTATI

5.1 VPLIV SAA NA PRIMARNE ČLOVEŠKE PLJUČNE FIBROBLASTE

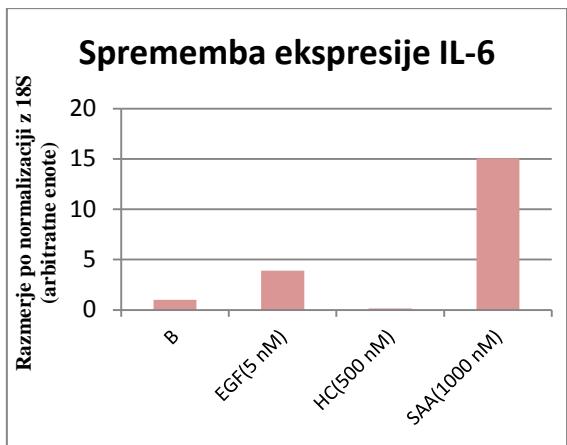
SAA v odvisnosti od koncentracije vpliva na izločanje IL-6 v pljučnih fibroblastih. Izločanje IL-6 je bilo v primerjavi s kontrolo ozadja brez dodanih učinkovin (B) povišano za 6 krat že pri 50 nM SAA, pri 500 nM SAA je bilo izločanje IL-6 najvišje (30 krat više kot B) in je doseglo vrh, pri 1000 nM se je izločanje znižalo v primerjavi s 500 nM (Slika 2).



Slika 2: Vpliv naraščajočih koncentracij SAA na izločanje IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Merjeno z IL-6 ELISA v supernatantih. NHLF p3 so bili izpostavljeni 5 nM EGF, 500 nM HC, 50 nM, 500 nM in 1000 nM SAA; (B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, SAA – serumski amiloid A)

Rezultati QPCR sovpadajo z rezultati ELISA, SAA je zvišal ekspresijo IL-6 tudi na nivoju mRNA (Slika 3).

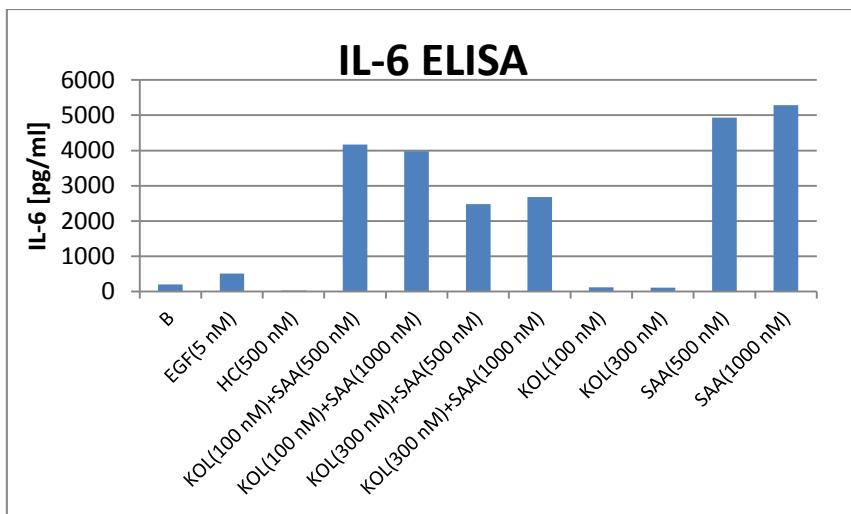


Slika 3: Vpliv kontrol in SAA na mRNA ekspresijo IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Analiza mRNA; NHLF p3 so bili izpostavljeni 5 nM EGF, 500 nM HC, 1000 nM SAA; (*B* - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin; *EGF* – epidermalni rastni faktor, *HC* – hidrokortizon, *SAA* – serumski amiloid A, *NHLF, p3* – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

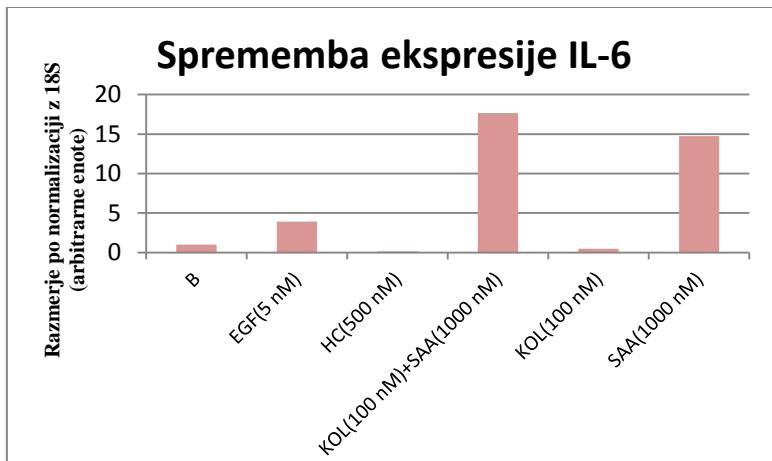
5.1.1 Vpliv SAA na pljučne fibroblaste po stimulaciji s kolhicinom

Nivoji IL-6 so bili povisani pri samem SAA in pri kombinaciji SAA s kolhicinom tako na proteinskem (Slika 4), kakor tudi na mRNA nivoju (Slika 5). Koncentracija izločenega proteina IL-6 je bila najvišja pri samem SAA.



Slika 4: Vpliv kolhicina, SAA in kombinacij kolhicina s SAA na izločanje IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Merjeno z IL-6 ELISA v supernatantih. NHLF p3 so bili izpostavljeni 5 nM EGF, 500 nM HC, 100 in 300 nM KOL, 500 in 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, KOL – kolhycin, SAA – serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

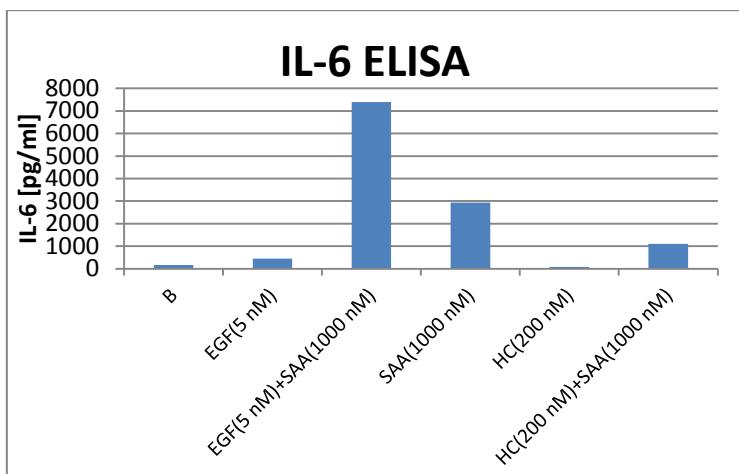


Slika 5: Vpliv SAA in SAA v kombinaciji s kolhycinom na ekspresijo IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Analiza mRNA; NHLF p3, 5 nM EGF, 500 nM HC, 100 nM KOL, 1000 nM SAA, (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, KOL – kolhycin, SAA – serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.1.2 Vpliv SAA v kombinaciji z EGF/ hidrokortizonom na pljučne fibroblaste in vpliv SAA na ekspresijo različnih genov

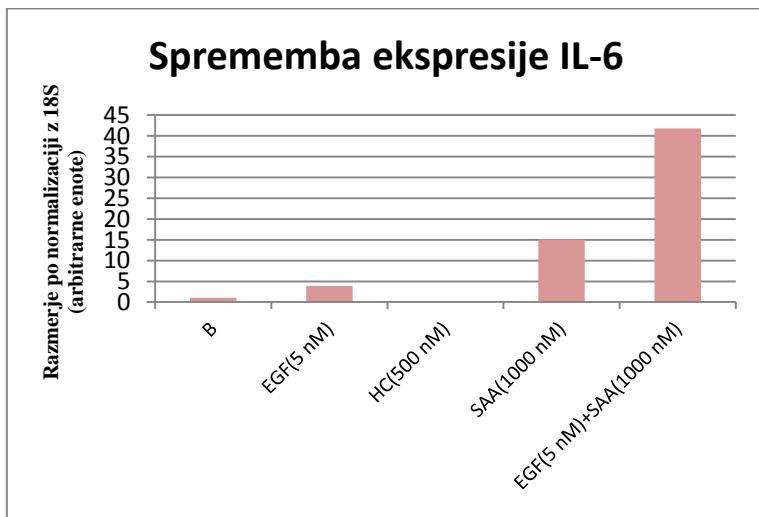
EGF je rahlo povišal izločanje IL-6, EGF v kombinaciji s SAA je deloval sinergistično in močno povišal izločanje IL-6. Sam hidrokortizon ni imel vpliva na izločanje IL-6, skupaj s SAA se je izločanje IL-6 povišalo, vendar manj kot pri samem SAA (Slika 6).



Slika 6: Vpliv SAA v kombinaciji z EGF/HC na izločanje IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Nivoji IL-6, izločeni iz NHLF p3 po izpostavitevi 5 nM EGF, 200 nM HC, 500 in 1000 nM SAA, so bili izmerjeni z ELISA; (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, SAA – serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

EGF in SAA sta posamično povisala ekspresijo IL-6 nad ozadjem, kombinacija EGF in SAA je sinergistično povisala mRNA ekspresijo IL-6 (Slika 7).

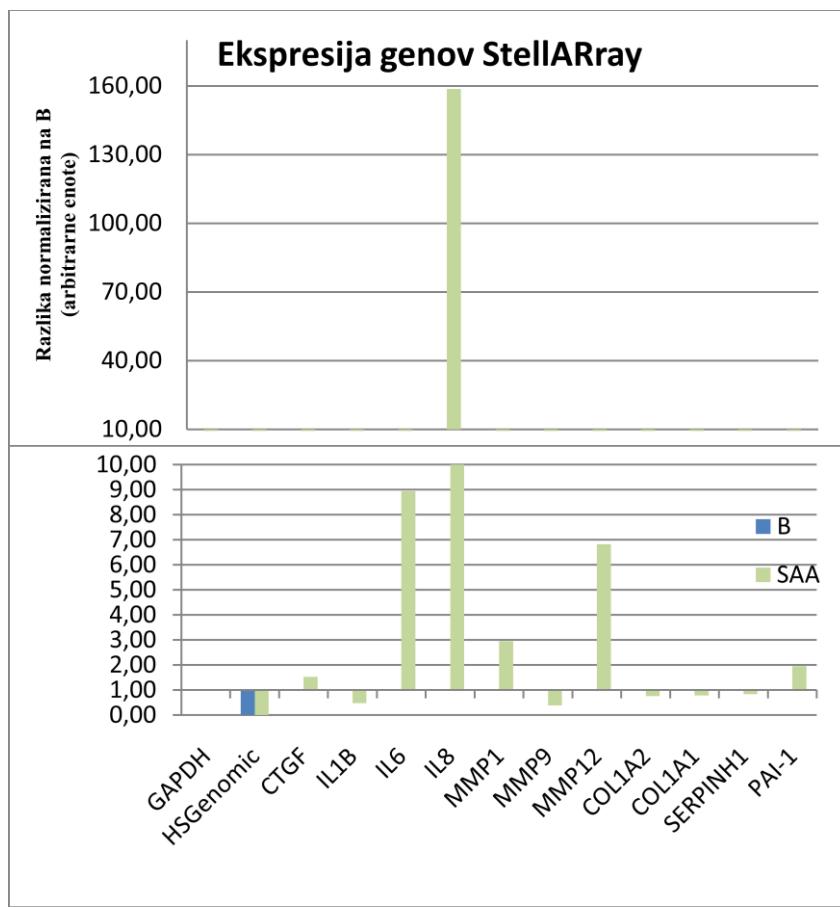


Slika 7: Vpliv SAA v kombinaciji z EGF na ekspresijo IL-6 v nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

Analiza mRNA; NHLF p3, 5 nM EGF, 500 nM HC, 1000 nM SAA, (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, KOL –*

kolticin, SAA - serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

Ko smo testirali NHLF za ekspresijo genov s StellARRay (Slika 8), ni bila zaznana ekspresija gena SH Genomic, kar pomeni, da v vzorcih ni bilo genomske DNA. SAA je povišal ekspresijo gena za IL-6 in zelo močno povišal ekspresijo gena za IL-8 (Slika 8, stolpec 6). Povišane so bile tudi ekspresije genov za MMP-1, MMP-12 in PAI-1. Ekspresija genov za IL-1 β , MMP-9, COL1A2, COL1A1 in SERPINH1 je bila ob dodatku SAA znižana.



Slika 8: Ekspresija genov za določene citokine, kemokine, rastne faktorje, encime in kolagen s StellARRay ob prisotnosti 1000 nM SAA

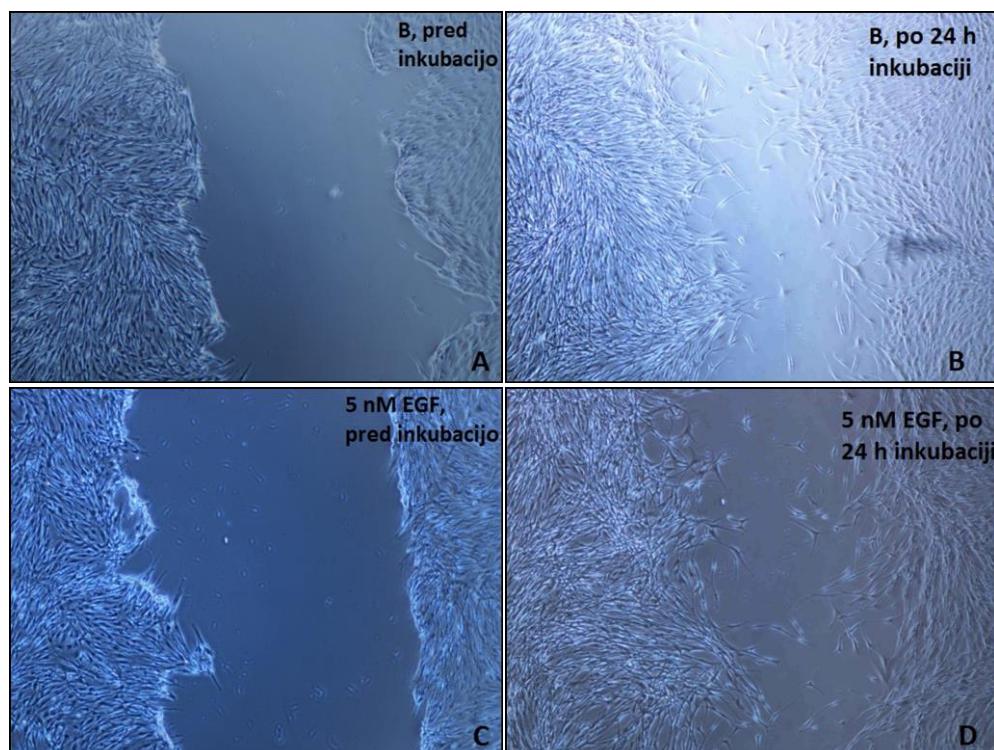
(B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, SAA - serumski amiloid A, GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GS genomic – humana genomska DNA, CTGF – rastni faktor vezivnega tkiva, IL – interlevkin, MMP – matriks metaloproteinaza, COL1A2 – kolagen tipa 2, alfa 2, COL1A2 – kolagen tipa 1, alfa 1, SERPINH1 – serpin peptidazni inhibitor, »clade« H, PAI-1 – inhibitor peptidaznega aktivatorja 1)

5.2 MODEL CELJENJA RAN V CELIČNI KULTURI PLJUČNIH FIBROBLASTOV

Celice so po 24 h inkubaciji rasle v prostor poškodbe in so jo, odvisno od učinkovin dodanih v gojišče, različno gosto zarasle. NHLF so se izkazali kot močno regenerativne celice, saj so prostor poškodbe v veliki meri zarasli tudi pri kontroli ozadja.

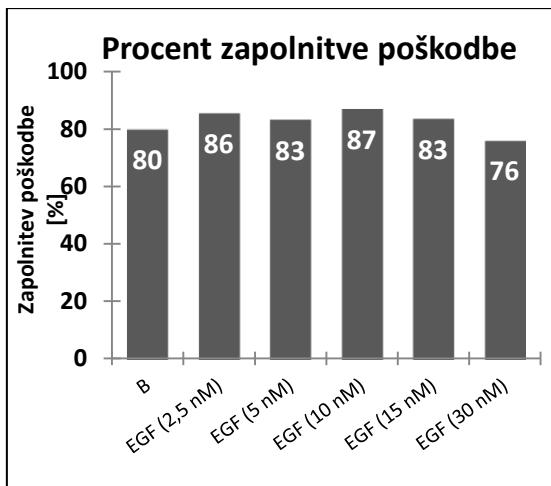
5.2.1 Vpliv EGF na poškodovane pljučne fibroblaste

Celice so zapolnile prostor poškodbe primerljivo s kontrolo ozadja, procent zapolnitve poškodbe se tudi v naraščajočih koncentracijah EGF ni bistveno povišal v primerjavi s kontrolo ozadja (Slika 9, Slika 10).



Slika 9: Mikrografi pljučnih fibroblastov pred in po 24 h inkubaciji v odsotnosti/prisotnosti EGF

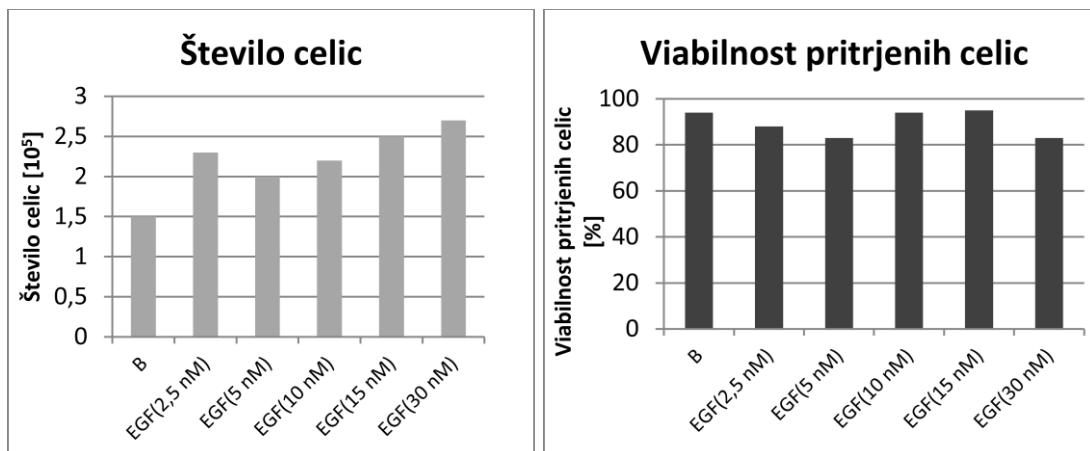
A – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin takoj po poškodbi, B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin po 24 h inkubaciji, C – NHLF izpostavljene 5 nM EGF, fotografirane takoj po poškodbi, D – NHLF izpostavljene 5 nM EGF, fotografirane po 24 h (*EGF – epidermalni rastni faktor, NHLF – normalni humani pljučni fibroblasti*)



Slika 10: Zapolnitev poškodbe v prisotnosti naraščajočih koncentracij EGF

Obdelava mikrografov z Nikon NIS ELEMENTS D; NHLF p3, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM, 30 nM EGF; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

Število celic je bilo ob dodatku EGF višje kot pri kontroli ozadja, z naraščanjem koncentracije (2,5 nM – 30 nM) EGF je naraščalo tudi število celic. Viabilnost pritrjenih celic je bila po dodatku EGF primerljiva viabilnosti celic kontrole ozadja (Slika 11).

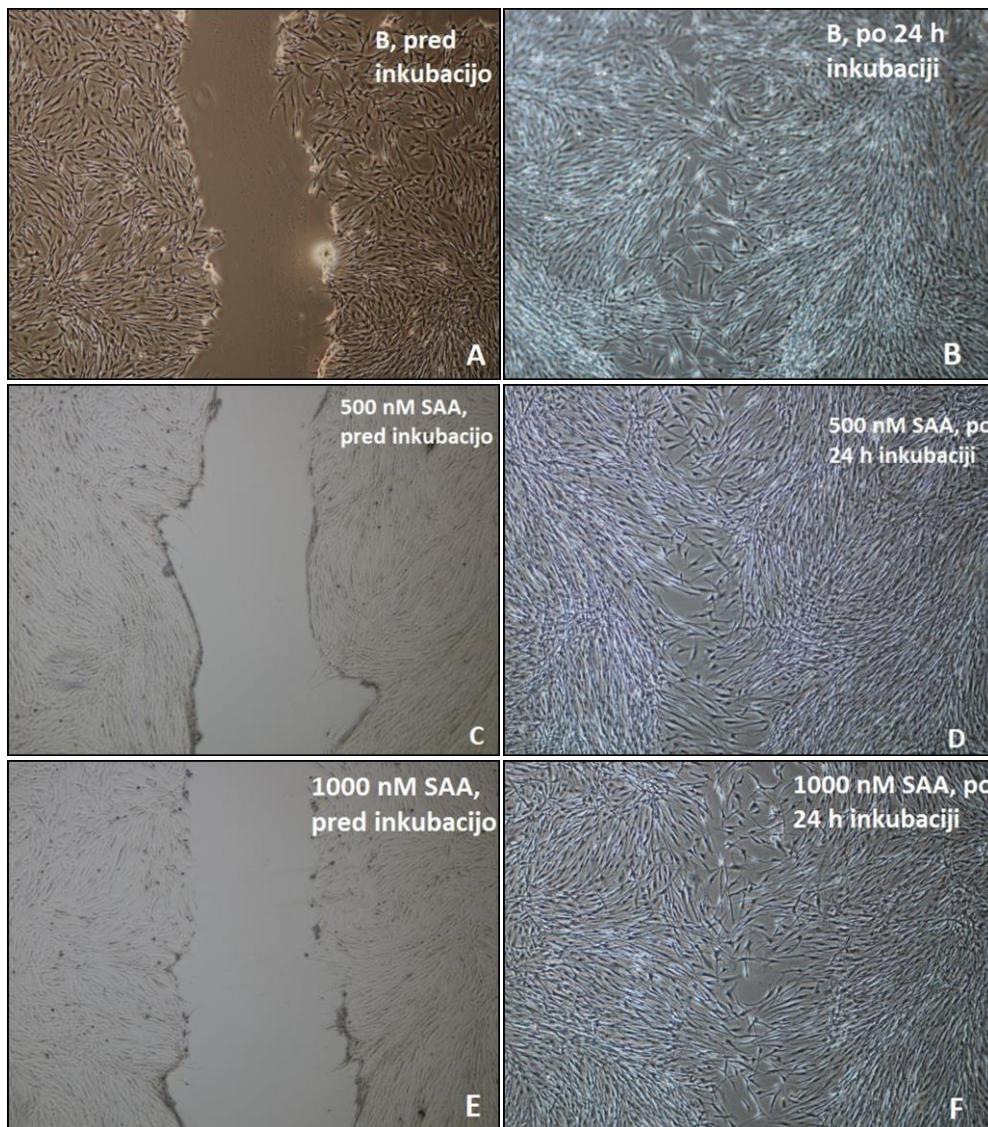


Slika 11: Koncentracijski vpliv EGF na število in viabilnost pritrjenih poškodovanih pljučnih fibroblastov

Število in viabilnost pritrjenih celic sta bili določeni z aparatom Countess, NHLF p3, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 15 nM in 30 nM EGF; (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.2.2 Vpliv SAA na poškodovane pljučne fibroblaste

Celice so po 24 h inkubaciji ob dodatku SAA (Slika 12, D in F) poškodbo zarasle primerljivo kontroli ozadja brez dodanih učinkovin (Slika 12, B).

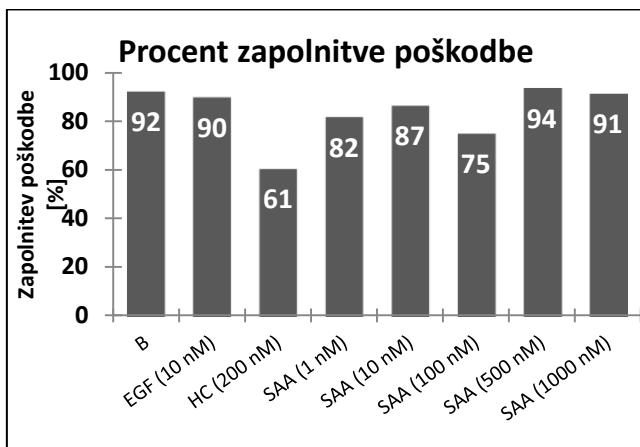


Slika 12: Mikroografi pljučnih fibroblastov pred in po 24 h inkubaciji v odsotnosti/prisotnosti SAA

A - mikrograf kontrole ozadja brez dodanih učinkovin takoj po poškodbi, B – mikrograf kontrole ozadja brez dodanih učinkovin po 24 h inkubaciji, C - mikrograf NHLF izpostavljenih 500 nM SAA takoj po poškodbi, D – mikrograf NHLF izpostavljenih 500 nM SAA po 24 h inkubaciji, E - mikrograf NHLF izpostavljenih 1000 nM SAA takoj po poškodbi, F - mikrograf NHLF izpostavljenih 1000 nM SAA po 24 h inkubaciji. (B -

kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, SAA - serumski amiloid A, NHLF – normalni humani pljučni fibroblasti)

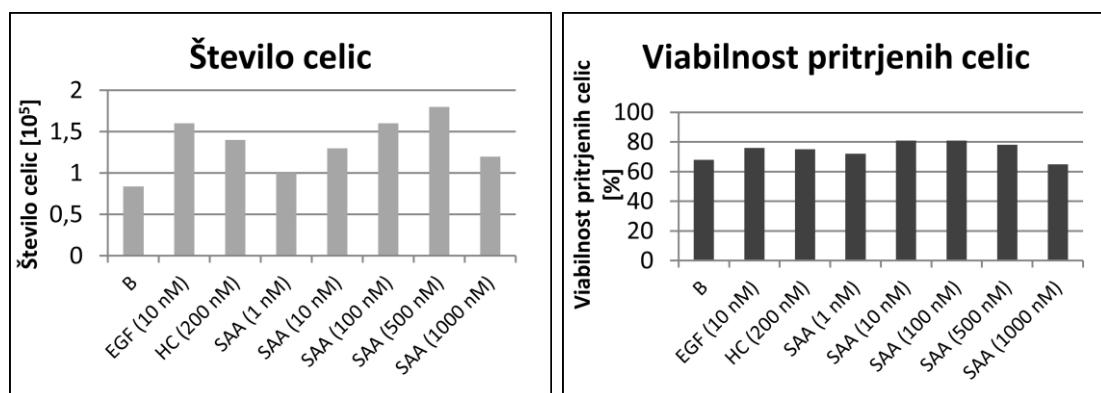
Celice so poškodbo močno zarasle že pri kontroli ozadja brez dodanih učinkovin. Pri koncentracijah 1 nM, 10 nM in 100 nM SAA je bil procent zapolnitve rane nižji kot pri kontroli ozadja, pri koncentraciji 500 nM rahlo višji in pri 1000 nM SAA spet rahlo nižji (Slika 13).



Slika 13: Zapolnитеv poškodbe v prisotnosti naraščajočih koncentracij SAA

Obdelava mikrografov z Nikon NIS ELEMENTS D; NHLF p3, 10 nM EGF, 200 nM HC, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, HC - hidrokortizon, SAA - serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

Število celic je naraščalo z naraščajočimi koncentracijami do 500 nM SAA (1 nM, 10 nM, 100 nM in 500 nM), pri 1000 nM koncentraciji pa se je število celic znižalo. Viabilnost pritrjenih celic je bila primerljiva kontroli ozadja brez dodanih učinkovin (Slika 14).

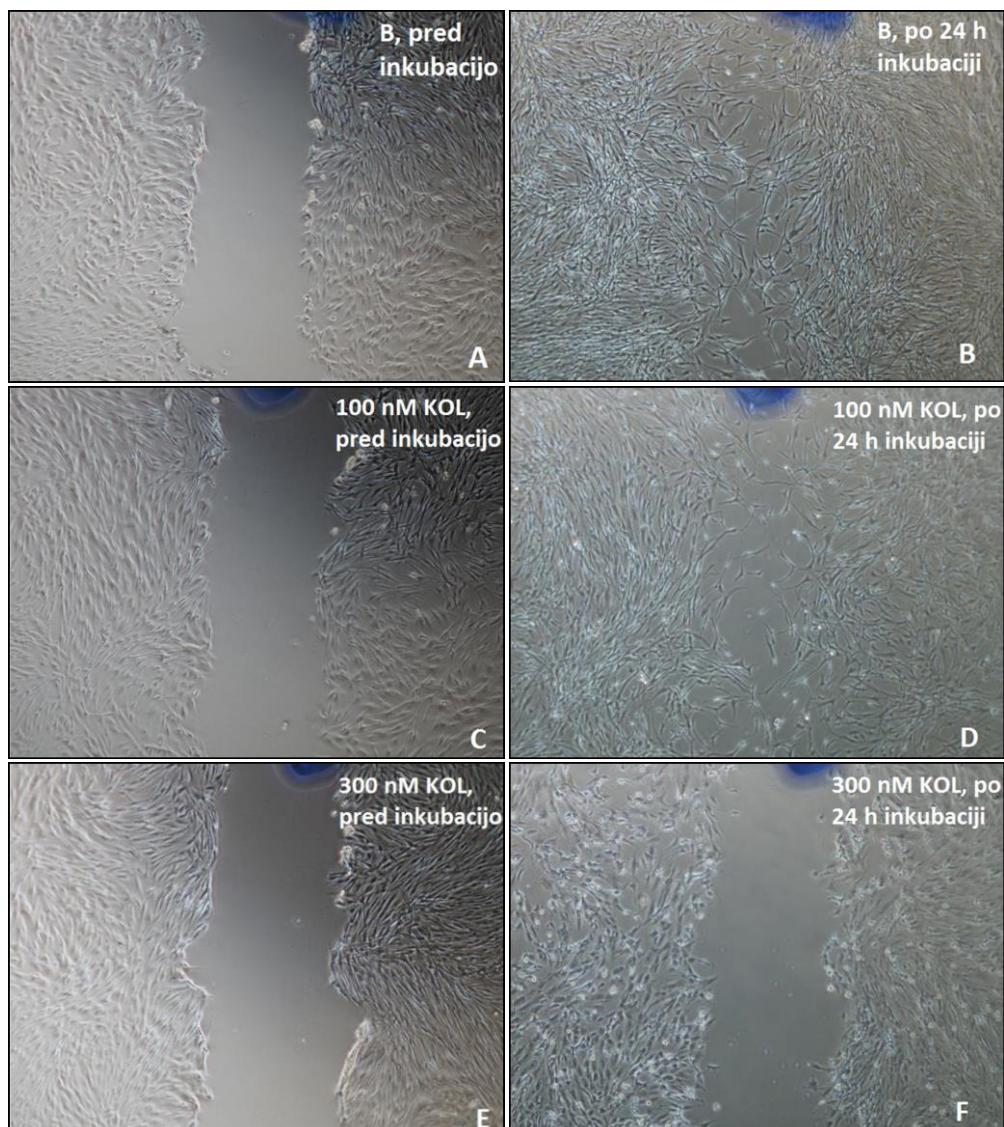


Slika 14: Koncentračijski vpliv SAA na število in viabilnost pritrjenih poškodovanih pljučnih fibroblastov

Število in viabilnost pritrjenih celic sta bili določeni z aparatom Countess, NHLF p3; 10 nM EGF, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM in 5000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, SAA - serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.2.3 Vpliv kolhicina na poškodovane pljučne fibroblaste

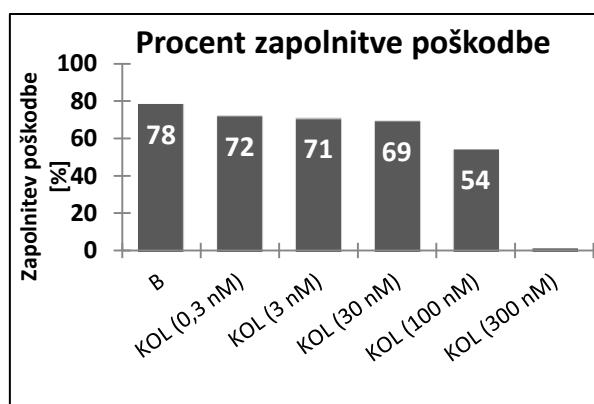
Kolhicin je poškodoval celice in zaviral rast celic v prostor poškodbe. Pri 100 nM koncentraciji so celice poškodbo še delno zarasle (Slika 15, D), a mnogo slabše kot pri kontroli ozadja (Slika 15, B). Pri 300 nM koncentraciji kolhicina celice poškodbe niso več zarasle (Slika 15, F), vidne so bile tudi mnoge mrtve celice, odlepljene od podlage.



Slika 15: Mikroografi pljučnih fibroblastov pred in po 24 h inkubaciji v odsotnosti/prisotnosti kolhicina

A - mikrograf kontrole ozadja brez dodanih učinkovin takoj po poškodbi, B – mikrograf kontrole ozadja brez dodanih učinkovin po 24 h inkubaciji, C - mikrograf NHLF izpostavljenih 100 nM KOL takoj po poškodbi, D - mikrograf NHLF izpostavljenih 100 nM KOL po 24 h inkubaciji, E - mikrograf NHLF izpostavljenih 300 nM KOL takoj po poškodbi, F - mikrograf NHLF izpostavljenih 300 nM KOL po 24 h inkubaciji; (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL – kolhicin, NHLF – normalni humani pljučni fibroblasti*)

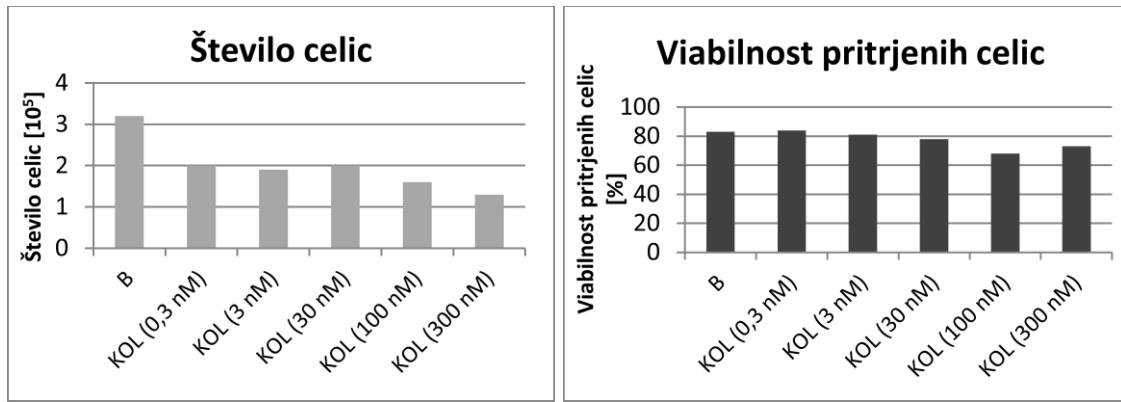
Procent zapolnitve poškodbe je že pri najnižji koncentraciji kolhicina (0,3 nM) nižji od kontrole ozadja brez dodanih učinkovin in pada z naraščanjem koncentracije kolhicina (Slika 16).



Slika 16: Zapolnitev poškodbe v prisotnosti naraščajočih koncentracij kolhicina

Obdelava mikrografov z Nikon NIS ELEMENTS D; NHLF p3, 0,3 nM, 3 nM, 30 nM, 100 nM in 300 nM KOL; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL – kolhicin, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

Število celic pada z naraščanjem koncentracije kolhicina. Viabilnost pritrjenih celic je primerljiva kontroli ozadja, a z naraščanjem koncentracije kolhicina rahlo pada. Kolhicin v odvisnosti od koncentracije inhibira število celic in njihovo rast v prostor poškodbe (Slika 17).

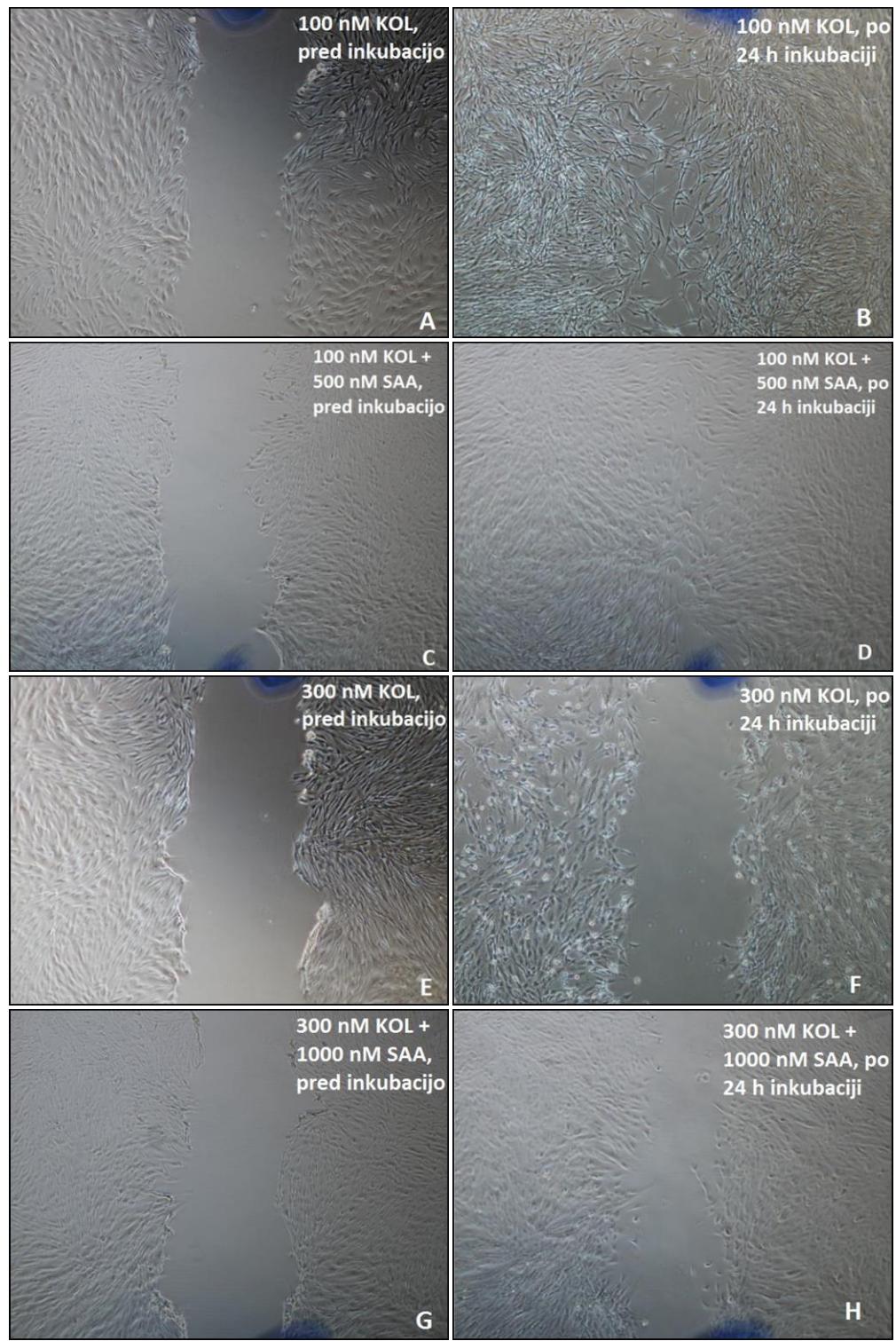


Slika 17: Koncentračijski vpliv kolhicina na število in viabilnost pritrjenih poškodovanih pljučnih fibroblastov

Število in viabilnost pritrjenih celic sta bili določeni z aparatom Countess; NHLF p3; 0,3 nM, 3 nM, 30 nM, 100 nM in 300 nM KOL (*B – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL - kolhacin, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.2.4 Vpliv SAA na poškodovane pljučne fibroblaste po stimulaciji s kolhacinom

Da bi dobili vpogled vpliva SAA na inhibicijo rasti celic v prostor poškodbe v prisotnosti kolhicina, smo celice izpostavili obema učinkovinama. Celice so poškodbo zarasle hitreje v prisotnosti SAA in kolhicina (Slika 18, D) kot pri samem kolhacinu (Slika 18, B). Enak trend smo zasledili tako pri 100 nM (Slika 18, A – D) kot tudi pri 300 nM koncentraciji kolhicina (Slika 18, E – H). Celice poškodbe v prisotnosti 300 nM koncentracije kolhicina niso več zarasle (Slika 18, F), po dodatku SAA k NHLF, ki so bili predhodno izpostavljeni 300 nM koncentraciji kolhicina, se je poškodba delno zarasla (Slika 18, H).

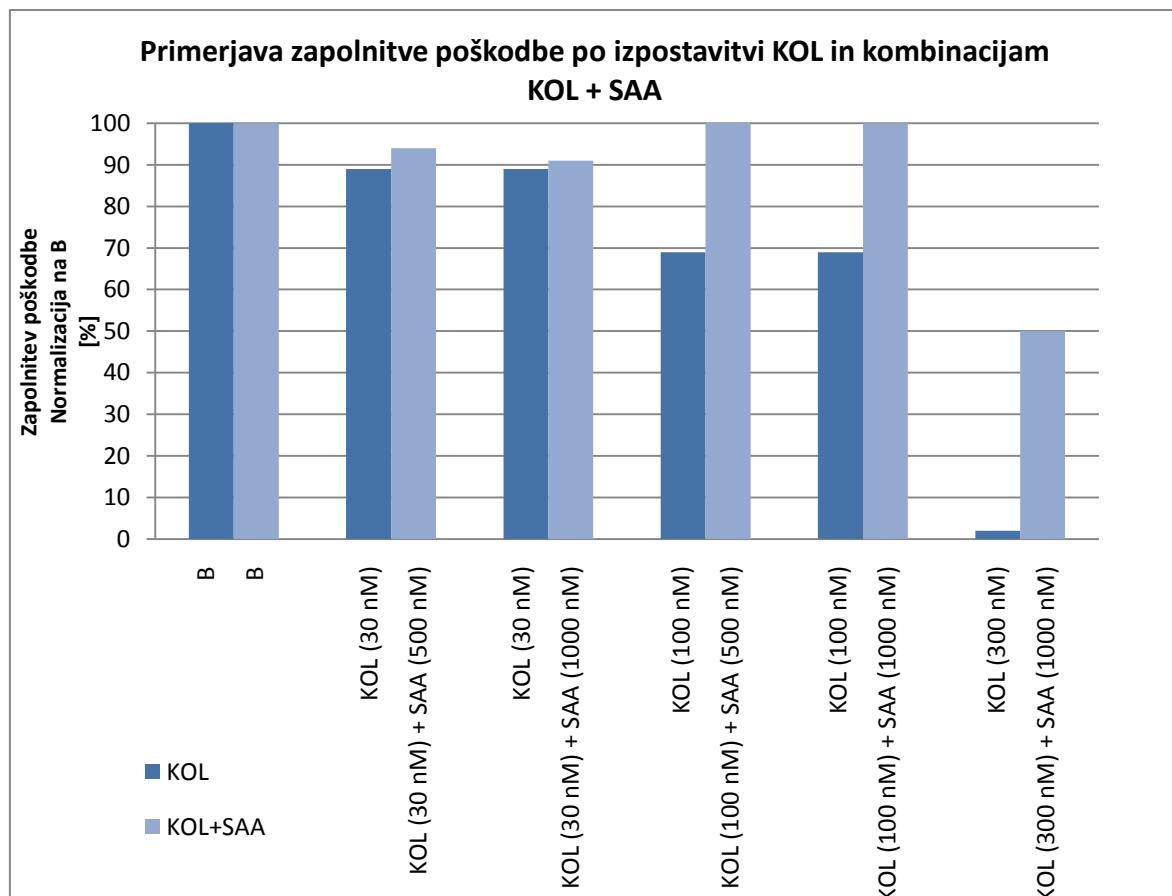


Slika 18: Mikroografi pljučnih fibroblastov predhodno izpostavljeni kolhicinu, pred in po 24 h inkubaciji v odsotnosti/prisotnosti SAA

A – NHLF z dodanim 100 nM KOL, fotografirani pred inkubacijo, B – NHLF z dodanim 100 nM KOL, fotografirani po 24 h inkubaciji, C – NHLF z dodano kombinacijo 100 nM KOL + 500 nM SAA, fotografirani pred inkubacijo, D - NHLF z dodano kombinacijo 100

nM KOL + 500 nM SAA, fotografirani po 24 h inkubaciji, E - NHLF z dodanim 300 nM KOL, fotografirani pred inkubacijo, F - NHLF z dodanim 300 nM KOL, fotografirani po 24 h inkubaciji, G - NHLF z dodano kombinacijo 300 nM KOL + 1000 nM SAA, fotografirani pred inkubacijo, H - NHLF z dodano kombinacijo 300 nM KOL + 1000 nM SAA, fotografirani po 24 h inkubaciji; (*KOL – kolhicin, SAA – serumski amiloid A, NHLF – normalni humani pljučni fibroblasti*)

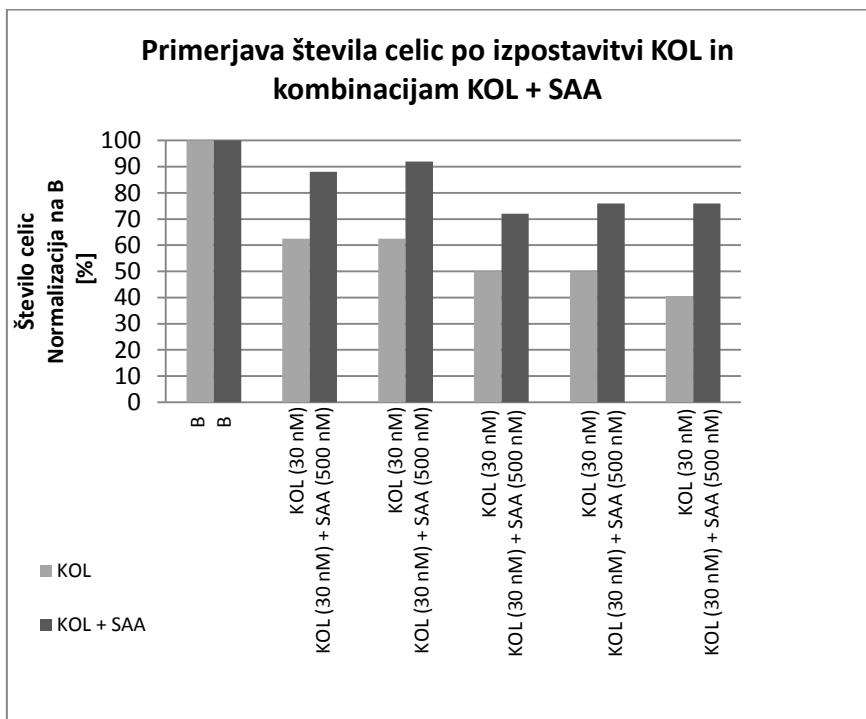
Prostor poškodbe se zapolni hitreje pri vseh kombinacijah kolhicina in SAA v primerjavi z enakimi koncentracijami kolhicina v odsotnosti SAA (Slika 19). Največje spremembe smo zaznali pri 100 nM koncentraciji kolhicina s 500 nM koncentracijo SAA, 100 nM koncentracije kolhicina s 1000 nM koncentracijo SAA in pri 300 nM koncentraciji kolhicina s 1000 nM koncentracijo SAA (Slika 19, stolpci 4, 5, 6). Pri vseh omenjenih kombinacijah kolhicina s SAA se je prostor poškodbe zarasel vsaj 30% bolj učinkovito kot le v prisotnosti samega kolhicina (Slika 19).



Slika 19: Primerjava zapolnitve poškodbe po izpostavitvi pljučnih fibroblastov kolhicinu in kombinacijam kolhicina s SAA

Obdelava mikrografov z Nikon NIS ELEMENTS D; NHLF p3, 30 nM, 100 nM in 300 nM KOL, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL – kolhicin, SAA – serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

Število celic je bilo tako pri kolhicinu kot pri kombinaciji kolhicina s SAA nižje od kontrole ozadja. Število celic je bilo pri vseh kombinacijah kolhicina s SAA večje vsaj za 20% v primerjavi z enakimi koncentracijami samega kolhicina (Slika 20). Največjo razliko, ki je znašala kar 35%, smo zaznali pri 300 nM koncentraciji kolhicina s 1000 nM koncentracijo SAA v primerjavi s 300 nM koncentracijo samega kolhicina (Slika 20, stolpec 6)

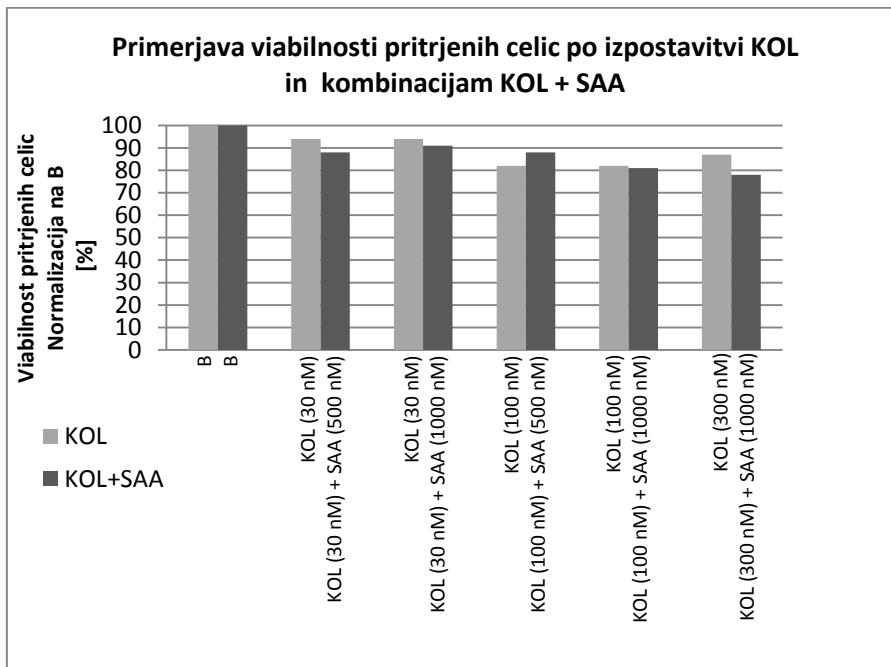


Slika 20: Primerjava števila celic po izpostavitvi kolhicinu in kombinacijam kolhicina s SAA

Število celic je bilo določeno z aparatom Countess; NHLF p3; 30 nM, 100 nM in 300 nM KOL, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL – kolhicin, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

Viabilnost je bila tako kot število celic pri vseh izpostavitvah kolhicinu in kolhicina s SAA nižja od kontrole ozadja. Viabilnost pritrjenih celic izpostavljenih le kolhicinu je bila

primerljiva viabilnosti pritjenih celic izpostavljenih kombinacijam kolhicina s SAA (Slika 21).



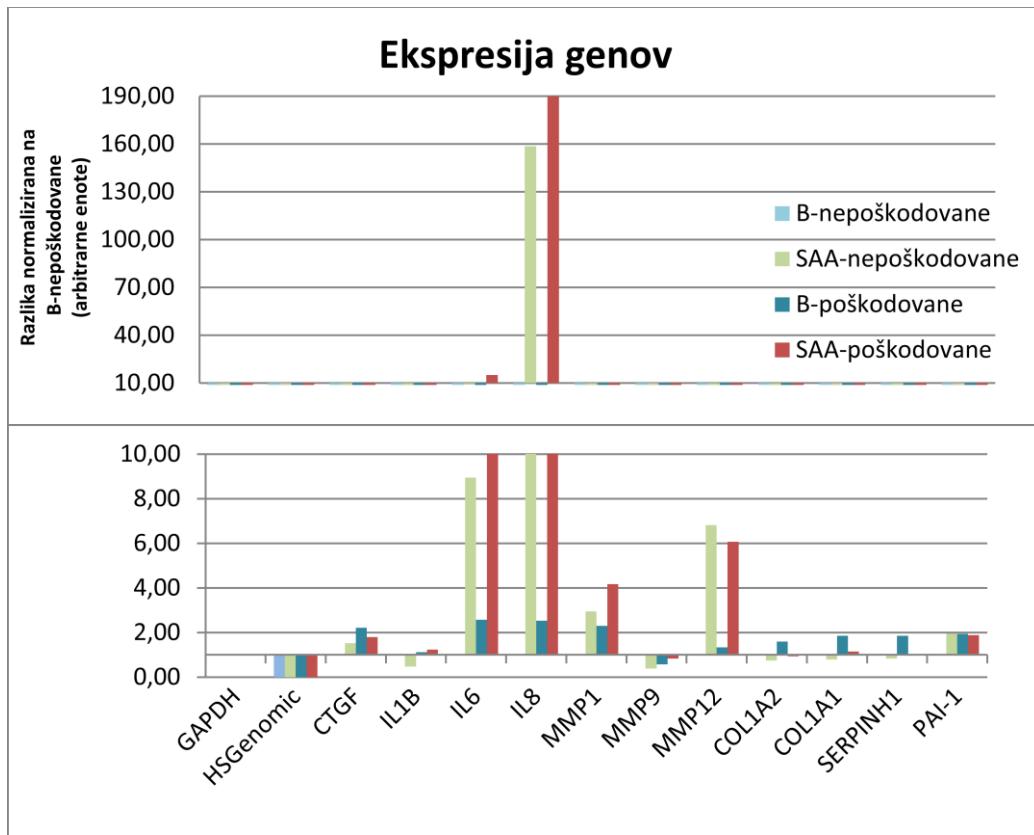
Slika 21: Primerjava viabilnosti po izpostavitvi kolhicinu in kombinacijam kolhicina s SAA

Viabilnost celic je bila določena z aparatom Countess; NHLF p3; 30 nM, 100 nM in 300 nM KOL, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, KOL - kolhicin, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.3 STELLARRAY – PRIMERJAVA NEPOŠKODOVANIH / POŠKODOVANIH PLJUČNIH FIBROBLASTOV V PRISOTNOSTI ALI ODSOTNOSTI SAA

SAA zviša ekspresijo gena za IL-6 pri nepoškodovanih NHLF, pri poškodovanih celicah pa je ekspresija še višja. Prav tako SAA močno poviša ekspresijo gena za IL-8 pri nepoškodovanih, še bolj pa pri poškodovanih celicah. Ekspresiji genov za CTGF in IL-1 β sta ob poškodbi celic in dodatku SAA minimalni. SAA je povišal ekspresijo gena za MMP-1 pri nepoškodovanih celicah bolj kot pri poškodovanih celicah. Ekspresijo gena za MMP-12 je SAA povišal podobno pri nepoškodovanih in poškodovanih celicah, vendar pa je bila ekspresija višja pri nepoškodovanih celicah. Ekspresija mRNA MMP-9 je znižana tako pri poškodbi kot pri dodatku SAA. Ekspresijo genov za COL1A2, COL1A1 in

SERPINH1 je zvišala sama poškodba, SAA ni imel vpliva na ekspresijo. Ekspresija gena za PAI-1 je minimalno zvišana tako pri poškodbi kot pri dodatku SAA (Slika 22).



Slika 22: Ekspresija genov za določene citokine, kemokine, rastne faktorje, encime in kolagen določena s StellARray

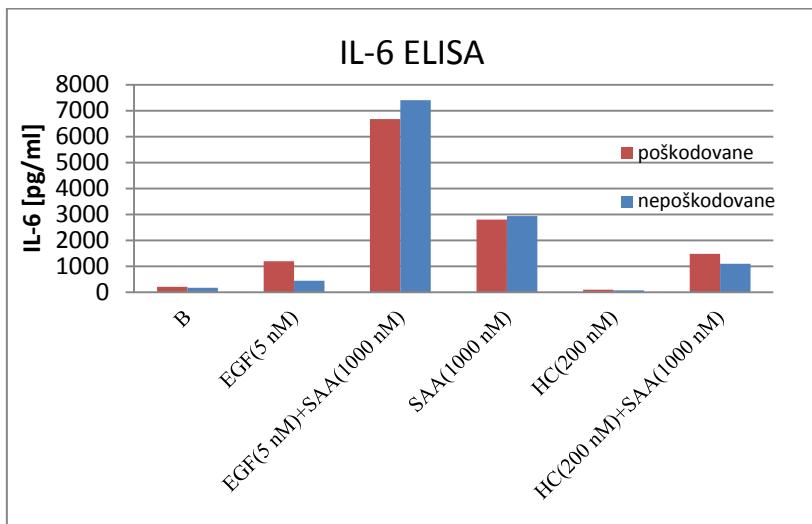
NHLF p3, 1000 nM SAA; (*B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, SAA - serumski amiloid A, GAPDH - gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GS genomic - humana genomska DNA, CTGF - rastni faktor vezivnega tkiva, IL - interlevkin, MMP - matriks metaloproteinaza, COL1A2 - kolagen tipa 2, alfa 2, COL1A1 - kolagen tipa 1, alfa 1, SERPINH1 - serpin peptidazni inhibitor, »clade« H, PAI-1 - inhibitor peptidaznega aktivatorja 1, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža*)

5.4 VPLIV SAA NA PLJUČNE FIBROBLASTE PRED IN PO POŠKODBI

5.4.1 Vpliv SAA na pljučne fibroblaste pred in po poškodbi na izločanje IL-6 na proteinskem nivoju

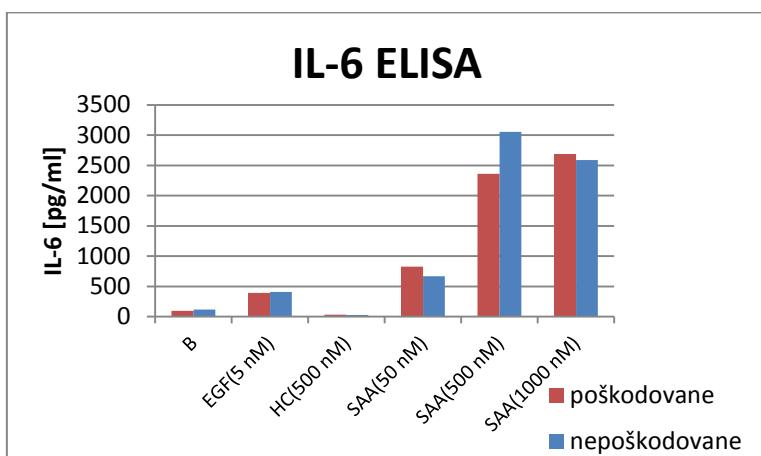
IL-6 se izloča v prisotnosti samega SAA ali v kombinaciji hidrokortizona z EGF. Pljučni fibroblasti izločijo največ IL-6 ob sočasni prisotnosti EGF in SAA (Slika 23, stolpec 3).

Med količino izločenega IL-6 pri poškodovanih/nepoškodovanih celicah ni bistvenih razlik.



Slika 23: Vpliv EGF in hidrokortizona ter njune kombinacije s SAA na izločanje IL-6
IL-6 ELISA supernatantov; NHLF p3, 5 nM EGF, 200 nM HC, 500 nM in 1000 nM SAA;
(B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF - epidermalni rastni faktor, HC - hidrokortizon, SAA - serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

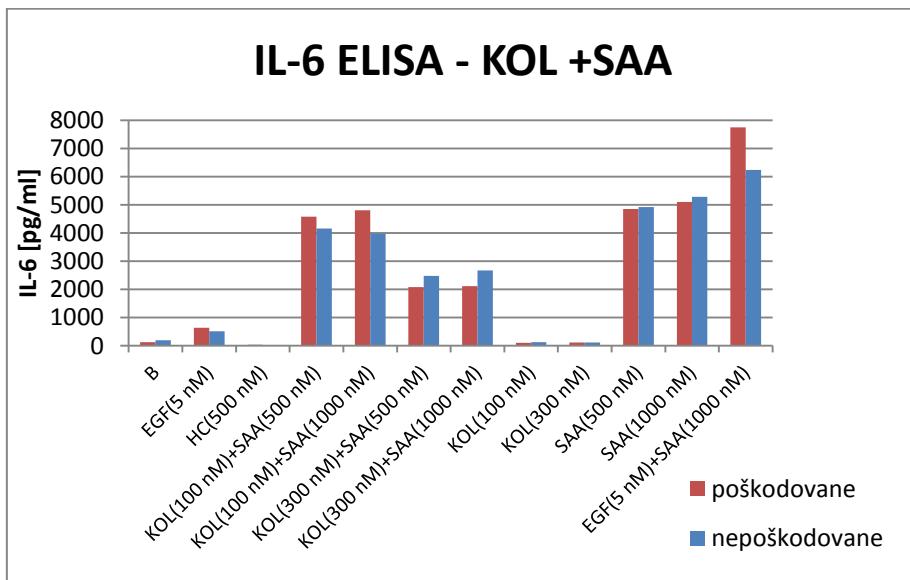
Z naraščanjem koncentracije SAA se povečujejo tudi nivoji izločenega proteina IL-6. Pri 500 nM SAA je izločanje višje pri nepoškodovanih celicah, pri 1000 nM SAA pa je izločanje višje pri poškodovanih celicah, vendar so razlike med poškodovanimi in nepoškodovanimi celicami majhne (Slika 24).



Slika 24: Vpliv naraščajočih koncentracij SAA na izločanje IL-6 pri poškodovanih/nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

IL-6 ELISA supernatantov; NHLF p3, 5 nM EGF, 500 nM HC, 50 nM, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B* – kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, *EGF* - epidermalni rastni faktor, *HC* – hidrokortizon, *SAA* – serumski amiloid A, *NHLF p3* – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

IL-6 je bil povišan vedno ob prisotnosti samega SAA ali SAA v kombinaciji s kolhicinom ali EGF. Najvišje povišanje pa smo zaznali ob sočasni prisotnosti EGF in SAA (Slika 25).

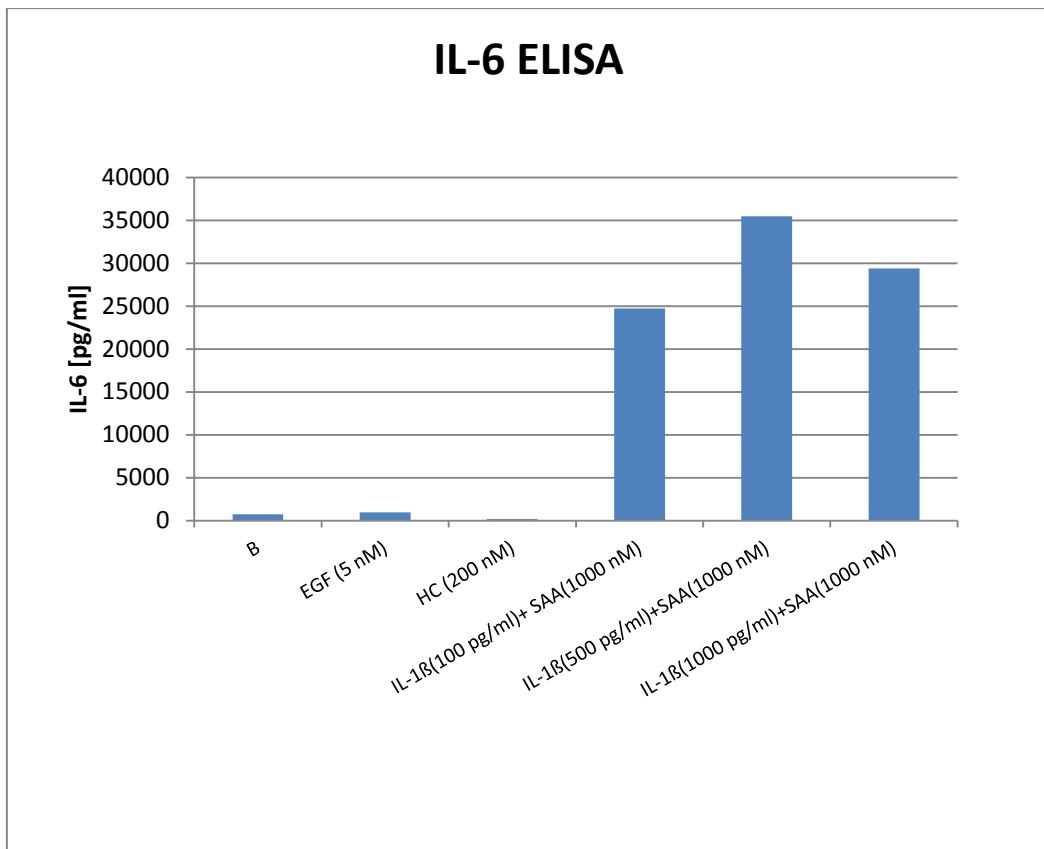


Slika 25: Vpliv kombinacij kolhicina s SAA na izločanje IL-6 pri poškodovanih / nepoškodovanih pljučnih fibroblastih

IL-6 ELISA supernatantov; NHLF p3, 5 nM EGF, 500 nM HC, 100 nM in 300 nM KOL, 500 nM in 1000 nM SAA; (*B* - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, *EGF* – epidermalni rastni faktor, *HC* – hidrokortizon, *KOL* – kolhicin, *SAA* – serumski amiloid A, *NHLF p3* – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

Po hkratni izpostavitvi NHLF IL-1 β in SAA, so se nivoji IL-6 izrazito in sinergistično povečali (

Slika 26).



Slika 26: Vpliv kombinacije SAA in IL-1 β na izločanje IL-6

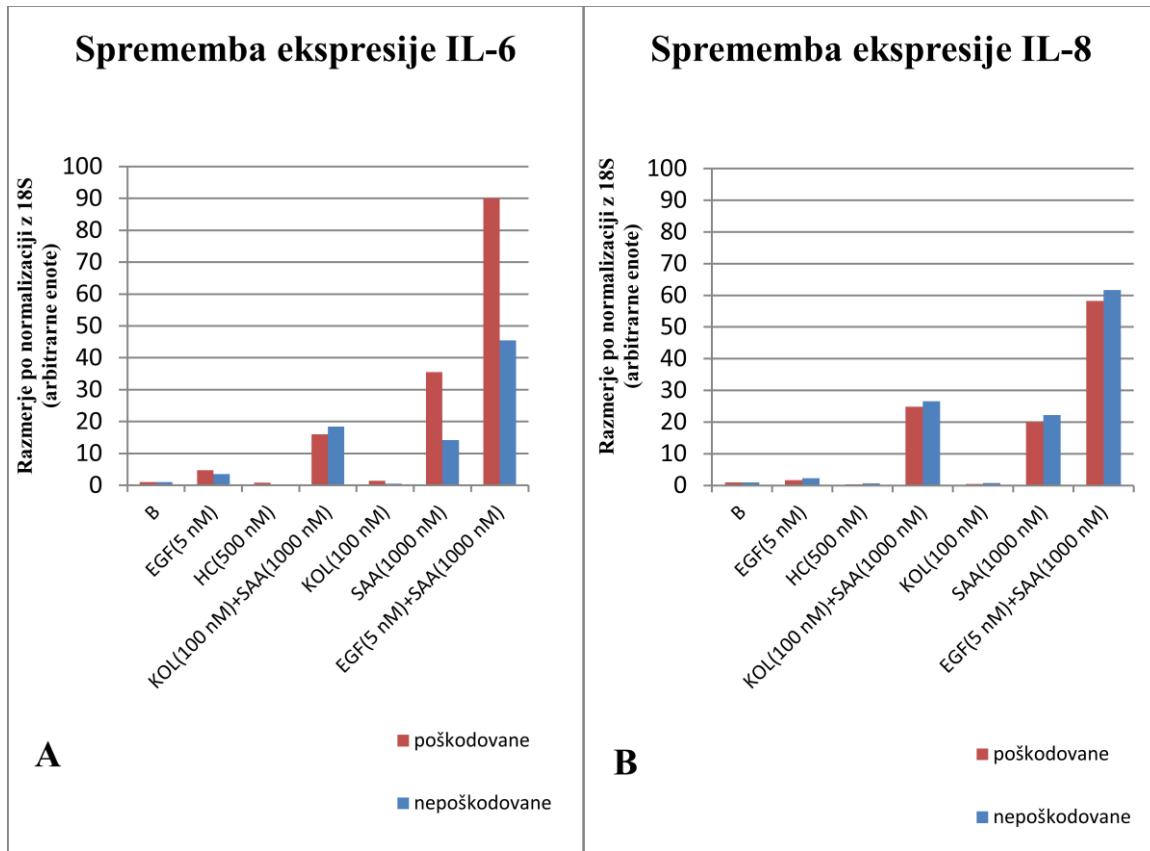
IL-ELISA supernatantov; NHLF p3, 5 nM EGF, 200 nM HC, 1000 nM SAA, 100 pg/ml, 500 pg/ml in 1000 pg/ml IL-1 β ; (B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, SAA- serumski amiloid A, IL-1 β – interlevkin 1 beta, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

5.4.2 Vpliv SAA na pljučne fibroblaste pred in po poškodbi na mRNA nivoju s QPCR

Genska ekspresija IL-6 sovpada z rezultati IL-6 ELISA, saj je ekspresija povečana vedno v prisotnosti samega SAA ali SAA v kombinaciji s kolhicinom ali EGF. Razlika v ekspresiji IL-6 med poškodovanimi/nepoškodovanimi celicami je vidna tako v prisotnosti samega SAA kot tudi ob sočasni prisotnosti SAA in EGF (

Slika 27-A, stolpca 6 in 7). Sam SAA kot tudi SAA v kombinaciji bodisi z EGF, bodisi s kolhicinom tudi poviša ekspresijo IL-8 (

Slika 27-B, stolpci 4, 6 in 7). Razlik v ekspresiji IL-8 med poškodovanimi / nepoškodovanimi celicami ni oz. so minimalne.



Slika 27: Vpliv kolhicina in SAA na ekspresijo IL-6 (A) in IL-8 (B) na mRNA nivoju Analiza mRNA; NHLF p3, 5 nM EGF, 500 nM HC, 100 nM KOL, 1000 nM SAA, (B - kontrola ozadja brez dodanih učinkovin, EGF – epidermalni rastni faktor, HC – hidrokortizon, KOL – kolhacin, SAA - serumski amiloid A, NHLF p3 – normalni humani pljučni fibroblasti, tretja pasaža)

6 RAZPRAVA

SSc je neozdravljiva avtoimunska bolezen, pri kateri je eden glavnih krivcev smrtnosti intersticijska pljučna bolezen, ki se kaže s pljučno fibrozo. Fibroza povzroči strukturne poškodbe pljučnega parenhima in oslabitve dihalnih funkcij. Mnoge raziskave preučujejo možnost prekinitev ali vsaj upočasnitve procesa fibroze. Pri nalogi smo izhajali iz raziskovalnega dela Laboratorija za imunologijo revmatizma, Oddelka za revmatologijo, UKC-Ljubljana, ki se tudi ukvarja s proučevanjem SSc ter pomembnosti SAA pri bolnikih s SSc. Ker povišane vrednosti SAA korelirajo s poslabšanjem pljučnih funkcij, smo želeli preveriti, če in kako SAA vpliva na pljučne fibroblaste na celičnem nivoju.

6.1 VPLIV SAA NA PLJUČNE FIBROBLASTE

SAA je akutno fazni protein, ki je lahko povišan od 1 do 2000-krat med poškodbo ali vnetjem. Ima mnoge funkcije, kot so transport holesterola iz mesta vnetja, metabolizem visokogostotnih lipoproteinov, indukcija vnetnih citokinov, kemotaksa nevtrofilcev, indukcija proliferacije fibroblastov in proliferacije regulatornih celic T (10, 12 in 18). Koncentracije SAA so povišane pri boleznih, kot so SSc (11 in 14), revmatoidni artritis, sekundarni antifosfolipidni sindrom, sekundarni sistemski lupus eritematosus (30) ter pri sekundarni amilidozi (31). SAA je uporabljen kot označevalec mnogih vnetnih kroničnih bolezni (18, 32).

Poleg tega, da je SAA označevalec vnetja, lahko sproži signale za citokine in preko »Toll-u« podobnih receptorjev (Toll-Like Receptors - TLR) spodbuja vnetje. V pacientih s SSc lahko začetna poškodba v žilju povzroči nekrozo celic endotelija. To povzroči sprostitev SAA, ki deluje na sosednje celice in sproži vnetno kaskado in izločanje vnetnih citokinov. Vnetni citokini vodijo do povečanega vnetnega odziva, ki krepi in ohranja fibrozo tkiva (18). O'Reilly in sodelavci (18) so pokazali, da SAA sproži produkcijo IL-6 v zdravih demalnih fibroblastih, primerljivo z našim delom na pljučnih fibroblastih. Prav tako so pokazali, da dermalni fibroblasti izražajo TLR2, ki so funkcionalno in močno izraženi v fibroblastih pacientov s SSc. Blokada TLR2 z nevtralizacijskim protitelesom je znižala SAA inducirano izločanje IL-6. Skupaj ti podatki kažejo, da SAA sproži IL-6 signalizacijo preko TLR2 receptorja pri bolnikih s SSc (18). TLR2 bi lahko bil nova terapevtska tarča zdravil, kjer bi s terapevtskimi protitelesi prekinili TLR2 delovanje in s tem tudi sproščanje vnetnih citokinov s SAA.

Na miših so z blokado TLR2 pokazali, da je bila zaščitena pred pljučno fibrozo, ki so jo sprožili z bleomicinom (18). Bleomicin je citostatik, ki povzroči prelome DNA in to vodi v apoptozo celic, ko se le-te delijo (33). Glavni stranski učinek bleomicina je pljučna fibroza, zato se na živalskih modelih uporablja za povzročitev pljučne fibrose.

SAA inducira produkcijo IL-6 tudi v sinovijskih fibroblastih bolnikov z revmatoidnim artritisom (18), tako da predvidevamo, da je mehanizem, po katerem deluje SAA, podoben v fibroblastih, pridobljenih iz različnih virov (kože, pljuč ali sinovialne membrane).

Skupno, naši rezultati prvič kažejo, da SAA stimulira pljučne fibroblaste in spodbuja izločanje vnetnega IL-6 na proteinskem nivoju, kakor tudi mRNA ekspresijo.

6.2 VPLIV KOLHICINA NA PLJUČNE FIBROBLASTE, DELOVANJE KOLHICINA V KOMBINACIJI S SAA

Kolhicin je toksin, ki deluje na citoskelet celice. Ta ima v celici mnogo funkcij, kot so pomen pri mitozi, gibanju, znotrajceličnem transportu, komunikaciji med celicami, endo- in eksocitozi. Kolhicin se z veliko afiniteto veže na tubulin in tako zaustavi nastanek mikrotubulov, ki so ključni pri nastanku delitvenega vretena. Delitveno vreteno je odgovorno za potovanje kromosomov med mitozo. Brez delitvenega vretena so faze mitoze inhibirane in celica se ne more deliti. Lakota in sodelavci (13) so pokazali, da je SAA lociran v neposredni bližini mikrotubulov (do 30 nm) in se tako po vsej verjetnosti veže na mikrotubule. Tako so nakazane nove potencialne funkcije SAA tudi znotraj celic. SAA so zaznali tudi v nanocevkah in mikroveziklih, pa tudi v jedru celice, kar nakazuje, da bi SAA lahko imel funkcije tudi tam (13). Pri naših poskusih je sam kolhicin prekinil delitev celic, znižal število celic, ki se niso mogle več zarasti v prostor poškodbe. Pri koncentraciji 300 nM je kolhicin močno poškodoval celice, saj so bile vidne tudi mnoge mrtve celice, odlepljene od podlage. Naši mikrografi kažejo, da so fibroblasti, ki so bili izpostavljeni kolhicinu s SAA, bolj učinkovito zarasli poškodbo kot fibroblasti, ki so bili izpostavljeni le samemu kolhicinu. Enak trend smo zasledili pri dveh različnih koncentracijah kolhicina (100 nM in 300 nM). Ti rezultati so nam odprli vprašanje, ali ima SAA kakšno vlogo pri obnovi mikrotubulov po njihovi okvari s kolhicinom, glede na to, da se SAA povezuje z mikrotubuli. Ker smo opravili le en poskus brez ponovitev, sicer pri različnih koncentracijah kolhicina in/ali SAA, gre le za hipotezo, za potrditev katere bi bilo potrebno narediti več ponovitev poskusa ter nadaljnje raziskave.

Skupaj naši rezultati nakazujejo, da ima izreden pomen tudi mikrookolje, v katerem je SAA. Po pregledu literature lahko zaključimo, da prvič prikazujemo, da SAA skupaj z IL-1 β deluje sinergistično in močno poviša nivo IL-6 v primarnih humanih pljučnih fibroblastih. IL-1 β je pomemben mediator vnetnega odziva, prav tako vključen v celično proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo. Sinergističen učinek na nivo izloženega IL-6 smo zaznali tudi pri kombinaciji SAA z EGF, tako na mRNA kot na proteinskem nivoju.

6.3 CELIČNI MODEL CELJENJA RAN

Ker fibroza nastane mnogokrat zaradi napak pri celjenju ran, smo se omejili na celjenje ran pri pljučnih fibroblastih, ki smo jih poškodovali in s tem posnemali nastanek fizične rane in vrast celic vanj. Za prizadejanje poškodbe smo izbrali »scratch« protokol, ki je pogosto uporabljen med raziskovalci. Za opazovanje celjenja smo zasledovali morfološke spremembe, število in viabilnost celic ter spremembe na proteinskem in mRNA nivoju. Glede na literaturo in predhodna znanja smo izbrali proteine in gene, pri katerih bi lahko pričakovali spremembe med celjenjem ran.

6.3.1 *In vitro* »scratch« metoda

Pri naših poskusih smo uporabili zdrave pljučne fibroblaste, ki smo jih poškodovali, izpostavili stimulatorjem/inhibitorjem in inkubirali 24 h. Enako vidno polje smo fotografirali takoj po poškodbi in po 24 h inkubaciji. Rezultati kažejo, da so NHLF regenerativne celice, ki se po 24 h inkubaciji dobro vrastejo v prostor poškodbe tudi pri kontroli ozadja brez dodanih učinkovin. Vnaprej bi lahko celice močneje poškodovali z dodatno poškodbo, npr. z UV svetlobo. Prav tako bi lahko celice fotografirali v časovnih intervalih nekaj ur in skrajšali inkubacijo, saj smo pri naših poskusih verjetno zamudili časovni razpon potreben za zasledovanje sprememb transkripcijskih faktorjev. Naši pogoji so bili prilagojeni za zasledovanje IL-6 ter IL-8.

6.3.2 Morfološke spremembe pljučnih fibroblastov

Morfološke spremembe smo spremljali z opazovanjem celic pod mikroskopom in s pomočjo mikrografov. Razlika v mikrografih pred in po inkubaciji nam je omogočila podatek o hitrosti zaraščanja prostora poškodbe. Tako smo lahko zaznali spremembe v zaraščanju prostora poškodb glede na učinkovine, ki smo jih dodali v medij. Očitne morfološke spremembe celic so bile vidne po dodajanju kolhicina v gojišče. Z višanjem

koncentracije kolhicina so celice vse manj zarasle prostor poškodbe, vidne so bile tudi mnoge mrtve celice, odlepljene od podlage.

6.3.3 Spremembe na proteinskem nivoju

IL-6 je pleiotropni citokin, ki ga sintetizirajo mnoge različne celice in sodeluje pri nastanku ter vztrajanju različnih bolezni kot sta revmatoidni artritis ali osteoporoza. IL-6 ima vloge pri regulaciji imunskega sistema, diferenciaciji celic T, angiogenezi in formaciji osteoklastov (34). O'Reilly in sodelavci (34) so pokazali, da ima IL-6 ključno vlogo tudi v patogenezi SSc in bolniki s SSc imajo povišane ravni IL-6. Povišana ekspresija IL-6 je bila pokazana v serumu, koži in bronhoalveolarni tekočini pacientov s SSc. Pokazali so, da IL-6 deluje fibrotično, povzroči povečano izražanje kolagena I v dermalnih fibroblastih. V živalskih modelih s srčno fibrozo so blokirali IL-6 signalizacijo in rezultati so pokazali oslabljeno sintezo kolagena I in znižano srčno fibrozo (18). Dokazano je bilo tudi, da IL-6 inducira sintezo kolagena v človeških kitah (34). Pri pacientih s SSc se domneva, da IL-6 pospešuje aktivacijo in proliferacijo fibroblastov, kar vodi do prekomernega nalaganja komponent zunajceličnega matriksa, predvsem kolagenov. Raziskava je pokazala, da stimulacija dermalnih fibroblastov s SAA sproža indukcijo IL-6 v teh celicah preko TLR2 receptorja. Primerjali so tudi dermalne fibroblaste bolnikov s SSc z zdravimi dermalnimi fibroblasti. Rezultati so pokazali, da imajo fibroblasti bolnikov s SSc višjo konstitutivno raven IL-6 in so lahko nadalje inducirani s SAA za proizvodnjo IL-6 (18). IL-6 lahko vpliva na fibrozo preko direktno transkripcijske aktivacije kolagena ali z uravnnavanjem citokinov. Kljub raziskovanju vpletenosti IL-6 v patogenezo SSc, mehanizmov IL-6 na molekulskem nivoju, ki vodijo do fiboze in katere signalne poti vodijo do nalaganja zunajceličnega matriksa še ne poznamo, zato je vsaka nova informacija lahko zelo pomembna. Vsi ti rezultati kažejo na ključno vlogo IL-6, ki lahko predstavlja novo terapevtsko tarčo v zaviranju fiboze pri SSc (34).

Naši rezultati kažejo, da SAA stimulira izločanje IL-6 v pljučnih fibroblastih. To bi se lahko pomembno navezovalo na podatke pridobljene v študiji Lakota s sodelavci 2014 (11), kjer je bilo ugotovljeno, da višji nivoji SAA korelirajo s poslabšanjem pljučne funkcije pri bolnikih s SSc. Povišane koncentracije IL-6 bi torej lahko delovale fibrotično na pljučne fibroblaste podobno kot delujejo fibrotično na dermalne fibroblaste.

6.3.4 Spremembe na mRNA nivoju

IL-6 je poleg IL-1 in TNF- α glavni citokin, ki sproži prepisovanje genov proteinov akutne faze, kot je SAA. Kako vpliva SAA na mRNA ekspresijo IL-6 v pljučnih fibroblastih do sedaj še ni bilo znano. Naši rezultati kažejo, da SAA spodbudi ekspresijo IL-6, v kombinacijah s kolhicinom in EGF pa celo deluje sinergistično. Najvišjo ekspresijo smo zaznali pri kombinaciji SAA z EGF. Pri poškodovanih celicah je bila po dodatku SAA ekspresija IL-6 višja kot pri nepoškodovanih celicah, torej na povišano ekspresijo IL-6 vplivata tako poškodba celic kot SAA.

IL-8 je provnetni kemokin, ki pospešuje migracijo nevtrofilcev na mesto vnetja. V študiji He in sodelavci so pokazali, da SAA spodbuja hitro in močno izločanje IL-8 v nevtrofilcih (19). Ali SAA spodbuja izločanje IL-8 v pljučnih fibroblastih podobno kot v nevtrofilcih do sedaj še ni bilo znano. Naši rezultati kažejo, da SAA močno spodbuja ekspresijo IL-8 v pljučnih fibroblastih. Najvišjo ekspresijo smo zaznali pri kombinaciji SAA z EGF.

SAA povzroča tudi ekspresijo genov MMP-12, in PAI-1 vendar v manjši meri kot pri IL-6 in IL-8. Pri genih CRP, IL-17A, IL-27, VCAM-1 nismo zaznali ekspresije (rezultati niso prikazani). Vzrok je lahko, da nismo ujeli časovnega intervala njihove ekspresije ali so naši postopki premalo občutljivi za pridobitev zadostnih količin mRNA, prepisanih v cDNA za kvantifikacijo s QPCR.

S testom StellARray smo dobili kvalitativne podatke o ekspresiji izbranih genov, ki nam je služil kot pregled oz. panel, katere ekspresije genov bi bilo smiselno naprej kvantitativno ovrednotiti. Ker smo test naredili na koncu naloge, nam je služil kot potrditev testov QPCR za izbrane gene ter podal rezultate, da bi izmed izbranih genov bilo smiselno narediti še QPCR za MMP-1, saj tako poškodba kot SAA vplivata na njegovo ekspresijo.

6.4 RAZLIKE MED PLJUČNIMI FIBROBLASTI IZ ZDRAVIH TKIV IN PLJUČNIMI FIBROBLASTI IZ FIBROTIČNIH TKIV

Pljučni fibroblasti iz zdravih tkiv so se izkazali za regenerativne celice, zato se postavlja vprašanje ali se razlikujejo od pljučnih fibroblastov iz fibrotičnih tkiv in v čem. Kaj doprinese k fibrotičnemu stanju, okolje, ali celice same po sebi, ali oboje? Ramos in sodelavci (35) so raziskovali razlike v stopnji rasti in apoptozi med zdravimi pljučnimi fibroblasti in fibroblasti iz pljučnega tkiva bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo. Pokazali so, da je stopnja rasti pljučnih fibroblastov iz bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo značilno nižja kot stopnja rasti zdravih pljučnih fibroblastov. V tem kontekstu so zaznali

značilno višji procent apoptotičnih celic pri bolnikovih pljučnih fibroblastih v primerjavi z zdravimi pljučnimi fibroblasti. Določali so tudi procent miofibroblastov s pomočjo detekcije alfa-aktina gladkih mišic, ki je značilen le za miofibroblaste in pokazali, da je v vzorcih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo procent miofibroblastov značilno višji. V pljučnih fibroblastih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo sta bila povisana tudi mRNA nivoja za kolagen I in TGF- β . Ti rezultati nakazujejo, da imajo pljučni fibroblasti bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo profibrotični sekretorni fenotip z nižjo stopnjo rasti celic in povisano stopnjo spontane apoptoze (35). Moodley in sodelavci (36) so prav tako raziskovali razlike med zdravimi in fibrotičnimi pljučnimi fibroblasti. Preiskovali so učinke citokina IL-6 in IL-11 na proliferacijo in kinetiko celičnega cikla v primarnih humanih pljučnih fibroblastih zdravih preiskovancev in v pljučnih fibroblastih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo. Pokazali so, da IL-6 zavira proliferacijo zdravih pljučnih fibroblastih, v pljučnih fibroblastih bolnikov z idiopatsko pljučno fibrozo pa deluje mitogeno. IL-11 se je izkazal kot mitogen pri normalnih in fibrotičnih pljučnih fibroblastih. Ti rezultati kažejo na močan dokaz o okvarjenosti signalnih poti citokinov, ki vodijo v spremembe izločanja in tako vpletene v patogenezo pljučne fibroze (36).

Naše poskuse bi bilo zanimivo ponoviti na pljučnih fibroblastih iz fibrotičnega tkiva pljuč bolnikov s SSc. Glede na dosedanje dokaze o razlikah med zdravimi in fibrotičnimi pljučnimi fibroblasti bi lahko pričakovali, da bi ti počasneje zapolnili rano, če jo sploh bi, in da bi več celic zapadlo v apoptozo med poskusi. Model na pljučnih fibroblastih izoliranih iz fibrotičnih pljuč bi še bolje ponazarjal razmere v pljučih bolnika s SSc. Zanimivo bi bilo namreč opazovati učinke SAA na fibrotične pljučne fibroblaste, ali SAA tudi deluje stimulatorno na izločanje IL-6 in v kolikšni meri. Tako bi lahko primerjali, kako se razlikujejo patogeni celični mehanizmi od fizioloških.

7 SKLEPI

V okviru postavitve in optimizacije modela celjenja poškodbe pljučnih fibroblastov in vpliva SAA na pljučne fibroblaste smo ugotovili naslednje:

1. NHLF so regenerativne celice. Prostor poškodbe so v veliki meri zarasle tudi pri kontroli ozadja brez dodanih molekul;
2. SAA je stimuliral pljučne fibroblaste in v odvisnosti od koncentracije povišal ekspresijo in povečal izločanje citokina IL-6;
3. SAA je stimuliral ekspresijo vnetnega kemokina IL-8 ter MMP-12;
4. kolhycin je močno poškodoval celice in prekinil zaraščanje celic v prostor poškodbe. Pri koncentracijah nad 100 nM se poškodba ni več zarasla;
5. na delovanje SAA je močno vplivalo mikrookolje. SAA je v kombinaciji z IL-1 β in v kombinaciji z EGF pokazal sinergistični učinek pri izločanju IL-6;
6. SAA lahko do določene mere obnovi s kolhycinom okvarjene pljučne fibroblaste.

Za potrditev vloge SAA v modelu celjenja ran na celičnem nivoju je potrebna še nadaljnja optimizacija modela. SAA ni le označevalec vnetja, ampak bi lahko kot stimulator izločanja IL-6 tudi doprinesel k razvoju fibrose, ki predstavlja enega največjih problemov pri bolnikih s SSc.

8 LITERATURA

1. Košnik M: **Interna medicina**, 4. Izdaja, Tiskarna Pleško d.o.o, Ljubljana, 2011: 1494-1500.
2. Varga J, Abraham D: **Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder**. J Clin Invest 2007; 117 (3): 557-567.
3. Tan A, Denton CP, Mikhailidis DP, Seifalian AM: **Recent advances in the diagnosis and treatment of interstitial lung disease in systemic sclerosis (scleroderma)**. Clin Exp Rheumatol 2011; 29: 66-74.
4. Castelino FV, Varga J: **Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management**. Arthritis Res Ther 2010; 12: 213.
5. Vozelj M: **Imunologija**, Enciklopedijski priročnik, DZS, Ljubljana, 1996: 95.
6. Clarke DL, Carruthers AM, Mustelin T, Murray LA: **Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes**. Fibrogen Tiss Rep 2013; 6: 20.
7. Clonetics™ Lung Fibroblast Cell Systems, NHLF&DHLF, Lonza Walkersvile 2010; 2
8. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. Izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 347-350.
9. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M: **Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation**. Trends Immunol 2001; 119-204.
10. Uhlar CM, Whitehead AS: **Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant**. Eur J Biochem 1999; 265: 501-523.
11. Lakota K, Carns M, Podluski S, Hinchcliff M, Lee J, Tomsic M, Sodin-Šemrl S, Varga J: **Serum Amyloid A in Systemic Sclerosis, a proposed marker for severity of pulmonary involvement**. Članek v pripravi pred oddajo, 2014.

12. Jensen LE, Whitehead AS: **Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response.** Biochem J 1998; 334: 489-503.
13. Lakota K, Resnik N, Mrak-Poljšak K, Sodin-Šemrl S, Veranič P: **Colocalization of Serum Amyloid A with Microtubules in Human Coronary Artery Endothelial Cells.** J Biomed and Biotechn 2011: 8.
14. Brandwein SR, Medsger TA, Skinner M, Sipe JD, Rodnan GP, Cohen AS: **Serum amyloid A protein concentration in progressive systemic sclerosis (scleroderma).** Ann Rheum Dis 1984; 43: 586-589.
15. Guo S, DiPietro LA: **Factors Affecting Wound Healing.** J Den Res 2010; 89: 219-229.
16. Vozelj M: **Temelji imunologije**, 1. Izdaja, DZS, Ljubljana, 2000: 112-113.
17. Koga T, Torigoshi T, Motokawa S, Miyashita T, Maeda Y: **Serum Amyloid A-induced IL-6 production by rheumatoid synoviocytes.** Febs Lett 2008; 582: 579-585.
18. O'Reilly S, Cant R, Cichomska M, Finnegan J, Oakley F, Hambleton S, van Laar JM: **Serum amyloid A (SAA) induces IL-6 in dermal fibroblasts via TLR2, IRAK4 and NF-κB.** Immunology 2013; 28.
19. He R, Sang H, Ye RD: **Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R.** Blood 2003; 101: 1572-1581.
20. Ghosh AK, Vaughan DE: **PAI-1 in Tissue Fibrosis.** J Cell Physiol 2012; 227: 493-507.
21. Zhang YP, Wang WL, Liu J, Li WB, Bai LL, Yuan YD, Song SX: **Plasminogen activator inhibitor-1 promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of pulmonary fibroblasts by Ca(2+) signaling.** Thromb Res 2013; 103: 64-71.
22. Matute-Bello G, Wurfel MM, Lee JS, Park DR, Frevert CW, Madtes DK, Shapiro SD, Martin TR: **Essential Role of MMP-12 in Fas-induced Lung Fibrosis.** Am J Respir Cell Mol Biol 2007; 37: 210-221.

23. Laato M, Kahari VM, Niinikoski J, Vuaorio E: **Epidermal growth factor increases collagen production in granulation tissue by stimulation of fibroblast proliferation and not by activation of procollagen genes.** Biochem J 1987; 247: 385-388.
24. Harvey W, Grahame R, Panayi GS: **Effects of steroid hormones on human fibroblasts in vitro.** Ann Rheum Dis 1976; 35: 148-151.
25. Ujihara Y, Miyazaki H, Wada S: **Morphological Study of Fibroblasts Treated with Cytochalasin D and Colchicine Using a Confocal Laser Scanning Microscopy.** J Physiol Sci 2008: 499-506.
26. Liang CC, Park AY, Guan JL: **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** Nat Protoc 2007; 2: 329-333.
27. IL-6 Human ELISA Kit, Manuals and Protocols, Invitrogen Corporation, Camarillo, CA. 2012; 24: 4.
28. Valasek MA, Repa JJ: **The Power of Real Time PCR.** Adv Physiol Educ 2005; 29: 151-159.
29. TaqMan Universal PCR Master Mix, Protocol, Applied Biosystems, USA 2010; 60: 2-5.
30. Sodin-Šemrl S, Zigon P, Čučnik S, Kveder T, Blinc A, Tomšič M, Rozman B: **Serum amyloid A in avtoimmune thrombosis.** Avtoimmun Rev 2006; 6 (1): 21-7.
31. Lachmann HJ, Goodman HJ, Gilbertson JA, Gallimore JR, Sabin CA, Gillmore JD, Hawkins PN: **Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis.** N Engl J Med 2007; 356 (23): 2361-71.
32. Malle E, De Beer FC: **Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice.** Eur J Clin Invest 1996; 26 (6): 427-35.

33. Čemažar M: **Protitumorsko delovanje elektrokemoterapije z bleomicinom na tumorskih modelih in vitro in in vivo.** Magistrska naloga 1996; 56.
34. O'Reilly S, Cant R, Cichomska M, van Laar JM: **Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis?** Clin Tran Immun 2013.
35. Ramos C, Montano M: **Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expression.** Am J res Cell Mol Biol 2001: 591-598.
36. Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL: **Fibroblasts Isolated from Normal Lungs and Those with Idiopathic Pulmonary Fibrosis Differ in a Interleukin-6/gp130-Mediated Cell Signaling and Proliferation.** Am J Pathol 2003; 163: 345-354.