

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NASTJA JURSINOVIČ

**VPLIVI PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA ČLOVEŠKE
ENDOTELIJSKE CELICE KORONARNE ARTERIJE**

EFFECTS OF ANTI-PROTHROMBIN ANTIBODIES ON HUMAN
CORONARY ENDOTHELIAL CELLS

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo, ki predstavlja zaključek Enovitega magistrskega študija farmacije na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, spec. med. biokem., ter dr. Polone Žigon, univ. dipl. mikrobiol.

Zahvale

Zahvaljujem se svoji mentorici, doc. dr. Saši Čučnik, ter somentorici, dr. Poloni Žigon, za vodenje in strokovne nasvete od začetnega raziskovalnega dela pa do končnega oblikovanja magistrske naloge.

Za vso nesebično pomoč pri raziskovalnem delu bi se rada zahvalila tudi drugim sodelavkam v Laboratoriju za imunologijo revmatizma.

Iskreno se zahvaljujem tudi staršema, fantu in prijateljem za vso podporo, ki so mi jo nudili tekom celotnega študija in pri nastajanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik, spec. med. biokem., ter dr. Polone Žigon, univ. dipl. mikrobiol.

Ljubljana, november 2017

Nastja Jursinovič

Komisija za oceno in zagovor:

Mentor: doc. dr. Saša Čučnik, spec. med. biokem.

Somentor: dr. Polona Žigon, univ. dipl. mikrobiol.

Predsednik komisije za zagovor magistrske naloge: prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član komisije za zagovor magistrske naloge: doc. dr. Urša Pečar Fonovič, univ. dipl. biol.

KAZALO VSEBINE

<u>KAZALO VSEBINE</u>	I
<u>KAZALO SLIK</u>	IV
<u>KAZALO PREGLEDNIC</u>	IV
<u>POVZETEK</u>	V
<u>ABSTRACT</u>	VII
<u>SEZNAM OKRAJŠAV</u>	IX
<u>1 UVOD</u>	- 1 -
1.1. ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA	- 1 -
1.2. PROTROMBIN	- 2 -
1.3. PROTITELESA PROTI PROTROMBINU	- 2 -
1.4. PATOGENI MEHANIZMI PROTITELES PROTI PROTROMBINU	- 4 -
1.4.1. IZPOSTAVITEV FOSFATIDILSERINA IN VEZAVA PROTROMBINA	- 6 -
1.4.2. VEZAVA PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA CELICE	- 6 -
1.4.3. IZLOČANJE MOLEKUL IZ ENDOTELIJSKIH CELIC PO STIMULACIJI Z APS/PT	- 7 -
1.5. ENDOTELIJ	- 7 -
1.6. SERUMSKI AMILOID A	- 8 -
<u>2 NAMEN DELA</u>	- 9 -
2.1. HIPOTEZE	- 9 -
2.2. CILJI	- 9 -
<u>3 MATERIALI IN METODE</u>	- 11 -
3.1. MATERIAL	- 11 -



3.1.1. BIOLOŠKI MATERIAL	- 11 -
a) Humani serumi	- 11 -
b) Mišja protitelesa	- 11 -
c) Celična linija	- 12 -
3.1.2. REAGENTI	- 12 -
3.1.3. PUFRI IN RAZTOPINE	- 17 -
a) Za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim proteinom G	- 17 -
b) Za pripravo kolone z vezanim protrombinom	- 17 -
c) Za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom	- 17 -
d) Za test aPS/PT ELISA	- 18 -
e) Za delo s celicami	- 19 -
f) Za denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE)	- 20 -
3.1.4. APARATURE IN PRIBOR	- 21 -
3.2. METODE	- 23 -
3.2.1. IZOLACIJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	- 23 -
a) Izdelava kolone z vezanim protrombinom	- 23 -
b) Izolacija frakcije IgG na koloni z vezanim proteinom G	- 24 -
c) Razsoljevanje vzorcev in zamenjava pufra	- 24 -
d) Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom	- 25 -
e) Koncentriranje vzorca in zamenjava pufra	- 26 -
3.2.2. DOLOČANJE KONCENTRACIJE, AVIDNOSTI IN ČISTOSTI APS/PT	- 26 -
a) Test aPS/PT ELISA	- 27 -
b) Test kaotropna aPS/PT ELISA	- 27 -
c) SDS-PAGE	- 28 -
3.2.3. STIMULACIJA ENDOTELIJSKIH CELIC IN MERJENJE S PRETOČNIM CITOMETROM	- 29 -
a) Nasaditev in precepljanje	- 29 -
b) Stimulacija celic HCAEC	- 30 -
c) Meritve površinske vezave s pretočno citometrijo oz. fluorescenčno aktiviranim celičnim sortiranjem (FACS)	- 31 -
d) Določanje vezave protiteles na površino celic z indirektno imunofluorescenco	- 31 -
e) Merjenje v celično okolje izloženih molekul po stimulaciji HCAEC	- 32 -
3.3. EKSPERIMENTALNO DELO	- 35 -
4 REZULTATI	- 36 -

4.1. IZOLACIJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU IZ SERUMA BOLNIKA	- 36 -
4.1.1. DOLOČITEV AVIDNOSTI POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU	- 36 -
4.1.2. IZOLACIJA IgG IN PROTITELES PROTI PROTROMBINU	- 36 -
4.1.3. PREVERJANJE ČISTOSTI IZOLIRANIH POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU	- 38 -
4.2. VEZAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC	- 40 -
4.2.1. POMEN HKRATNE PRISOTNOSTI PROTROMBINA IN PROTITELES	- 42 -
4.2.2. VPLIV ČASA INKUBACIJE NA DELEŽ VEZAVE MOPT 231D	- 42 -
4.2.3. VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ SERUMSKEGA AMILOIDA A	- 43 -
4.2.4. VPLIV REDČITVE SEKUNDARNEGA PROTITELESA	- 43 -
4.3. VEZAVA POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC	- 44 -
4.3.1. VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU	- 45 -
4.3.2. VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ PROTROMBINA NA VEZAVO POLIKLONSKIH PROTITELES NA POVRŠINO HCAEC	- 45 -
4.3.3. VPLIV SAA NA VEZAVO POLIKLONSKIH PROTITELES NA POVRŠINO HCAEC	- 46 -
4.4. TESTIRANJE SUPERNATANTOV NA IZLOČENE MOLEKULE IZ AKTIVIRANIH HCAEC	- 47 -

5 RAZPRAVA - 50 -

5.1. IZOLACIJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU IN NJIHOVO DOLOČANJE Z IMUNSKO METODO NA TRDNEM NOSILCU (TEST ELISA)	- 50 -
5.2. DELO S CELIČNIMI KULTURAMI	- 52 -
5.3. VEZAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC	- 53 -
5.4. VEZAVA POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC	- 56 -
5.5. TESTIRANJE SUPERNATANTOV NA IZLOČENE MOLEKULE IZ AKTIVIRANIH CELIC	- 58 -

6 SKLEP - 61 -

7 LITERATURA - 62 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema aktivacije protrombina s protrombinaznim kompleksom	- 2 -
Slika 2: Patogeni mehanizmi delovanja aPS/PT na endoteljske celice	- 5 -
Slika 3: Potek eksperimentalnega dela	- 35 -
Slika 4: Delež vezave izoliranih protiteles pri različnih koncentracijah NaCl	- 36 -
Slika 5: Prikaz rezultatov reducirajoče SDS PAGE.....	- 38 -
Slika 6: Potek eksperimentalnega dela z rezultati izolacije protiteles.....	- 39 -
Slika 7: Celice inkubirane z moPt 231D brez prisotnosti protrombina (levo) in ob prisotnosti protrombina (desno). Vezava protiteles je določena s sekundarnimi protititelesi konjugiranimi z barvilm FITC, DNA v jedru pa s fluorescenčnim barvilm DAPI.	- 40 -
Slika 8: Merjenje vezave protiteles proti protrombinu s pretočnim citometrom.. ..	- 41 -
Slika 9: Vezava moPt 231D na površino HCAEC ob dodatku protrombina in Ca^{2+} hkrati s protitelesi ter dodatku protrombina in Ca^{2+} 16 ur pred dodatkom protiteles (predstimulacija).	- 42 -
Slika 10: Vezava moPt 231D in IgG miši na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina. Celice so bile stimulirane z različnimi koncentracijami SAA (0, 100, 200 in 1000 nM).	- 43 -
Slika 11: Vezava moPt 231D in IgG miši na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina. Testirali smo 3 različne redčitve sekundarnega protitelesa (1:50, 1:100 in 1:400).	- 44 -
Slika 12: Vezava poPt VZ1 na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina in SAA. Celice so bile inkubirane z različnimi koncentracijami poPt VZ1 (0, 10, 20, 50 in 100 mg/L).....	- 45 -
Slika 13: Vezava poPt VZ1 in IgG KRV na površino HCAEC ob odsotnosti/prisotnosti protrombina v različnih koncentracijah (0, 20, 50 in 100 mg/L).....	- 46 -
Slika 14: Vezava poPt VZ1 in IgG KRV na površino HCAEC ob odsotnosti/prisotnosti SAA.	- 46 -
Slika 15: Razlika v količini izločenih molekul po stimulaciji HCAEC z moPt 231D v primerjavi z IgG miši in po stimulaciji HCAEC s poPt VZ1 v primerjavi z IgG KRV.....	- 49 -

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Potek izolacije protiteles proti protrombinu iz seruma izbranega bolnika	- 37 -
Preglednica II: Vezava moPt 231D na površino HCAEC ob prisotnosti protrombina pri različnih časih inkubacije.	- 43 -
Preglednica III: Koncentracije izločenih IL-6, GRO α in MIF pri celicah, stimuliranih z moPt 231D, IgG miši, poPt VZ1 in IgG KRV ob sočasni prisotnosti protrombina.	- 47 -
Preglednica IV: Koncentracije izločenih citokinov in kemokinov pri celicah, stimuliranih z moPt 231D, IgG miši, poPt VZ1 in IgG KRV ob sočasni prisotnosti protrombina.. ..	- 48 -

POVZETEK

Antifosfolipidni sindrom je avtoimunska bolezen, za katero so značilne venske ali arterijske tromboze, zapleti v nosečnosti in prisotnost antifosfolipidnih protiteles, med katere spadajo tudi protiteesa proti protrombinu. Bolniki s tem sindromom imajo visoko tveganje za aterosklerotične srčno-žilne dogodke. Več *in vitro* ter *in vivo* študij je pokazalo, da antifosfolipidna protiteesa, predvsem protiteesa proti β_2 glikoproteinu I, stimulirajo endotelijske celice, da le-te izražajo adhezijske molekule, sproščajo citokine in vnetne molekule. Protiteesa proti protrombinu so druga podskupina antifosfolipidnih protiteles, značilno povezana z antifosfolipidnim sindromom, katerih patogeno delovanje je slabše raziskano.

Namen raziskovalnega dela je bil najprej izolirati specifična poliklonska protiteesa proti protrombinu in nato z njimi stimulirati človeške endotelijske celice koronarne arterije. Iz seruma bolnika z antifosfolipidnim sindromom smo izolirali frakcije imunoglobulinov razreda G, iz teh pa smo v nadaljevanju izolirali protiteesa proti protrombinu. Določili smo količino, čistost ter imunsko reaktivnost izoliranih poliklonskih protiteles. Pokazali smo, da so izolirana poliklonska protiteesa pretežno visoko avidna in potrdili, da nimajo dodanih primesi.

Človeške endotelijske celice koronarne arterije smo stimulirali z monoklonskimi in poliklonskimi protitelesi proti protrombinu ob prisotnosti protrombina in serumskega amiloida A. Vezavo na površino celic smo opredelili s pretočno citometrijo in indirektno imunofluorescenco. Z različnimi encimsko imunskimi testi smo določili tudi koncentracijo izločenih molekul v celičnem okolju stimuliranih celic.

Na površino celic so se monoklonska protiteesa 231D specifično vezala le ob prisotnosti protrombina. Največjo vezavo na površino celic smo izmerili pri hkratni inkubaciji protrombina, kalcijevih ionov in protiteles po 6-ih urah stimulacije. Dodatek serumskega amiloida A in predstimulacija celic s kalcijevimi ioni in protrombinom ni povečala vezave monoklonskih protiteles proti protrombinu na površino celic. V nadaljevanju smo pri enakih pogojih pokazali tudi vezavo izoliranih poliklonskih protiteles proti protrombinu na površino celic človeške endotelijske koronarne arterije.

Slednja je vplivala na povečano izločanje interlevkinov 5, 6 in 8, dejavnika tumorske nekroze α ter kolonije stimulirajočega dejavnika za makrofage v celično okolje. Večina teh molekul spodbuja razvoj ateroskleroze. Izsledki naše raziskave tako potrjujejo večje

tveganje za razvoj te bolezni pri bolniku z antifosfolipidnim sindromom, kot posledica aktivacije endotelijskih celic s protitelesi proti protrombinu.

Ključne besede:

- antifosfolipidni sindrom,
- antifosfolipidna protitelesa,
- protitelesa proti protrombinu,
- protrombin,
- človeške endotelijske celice koronarne arterije.

ABSTRACT

Antiphospholipid syndrome is an autoimmune disease, characterized by venous or arterial thrombosis, pregnancy complications and the presence of antiphospholipid antibodies, which include anti-prothrombin antibodies. Patients with this syndrome are at high risk of developing atherosclerotic cardiovascular events. Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that antiphospholipid antibodies, specifically anti- β_2 glycoprotein I, stimulate endothelial cells to express adhesion molecules, cytokines and inflammatory molecules. Antiprothrombin antibodies are another subgroup of antiphospholipid antibodies associated with antiphospholipid syndrome, however their pathogenic role is less investigated.

The primary aim of our work was to isolate specific polyclonal anti-prothrombin antibodies, followed by stimulation of human coronary artery endothelial cells. First, IgG fractions from serum of a patient with the antiphospholipid syndrome were isolated with further isolation and purification of anti-prothrombin antibodies. We determined the quantity, purity and immune reactivity of the isolated polyclonal antibodies. We have shown that the isolated polyclonal antibodies were predominantly of highly avidity and we confirmed they contained no impurities. We stimulated human coronary artery endothelial cells with monoclonal and polyclonal anti-prothrombin antibodies in the presence of prothrombin and serum amyloid A. Cellular surface binding was determined by flow cytometry and indirect immunofluorescence. In addition, we examined, using different enzyme immunoassays, the concentration of excreted molecules in the cellular environment of the stimulated cells.

231D monoclonal antibodies specifically bound to the surface of the cells only in presence of prothrombin. Highest binding to the cell surface was measured when prothrombin, calcium ions and antibodies were co-incubated for 6 hours. The addition of serum amyloid A and the pre-stimulation of cells with calcium ions and prothrombin did not increase the binding of monoclonal anti-prothrombin antibodies to the cell surface. Similarly, binding of isolated polyclonal anti-prothrombin antibodies to the surface of human coronary artery endothelial cells was demonstrated under the same conditions.

The latter increased excretion of interleukin 5, 6, and 8, tumor necrosis factor α and macrophage colony-stimulating factor in the cellular environment. Most of these molecules promote development of atherosclerosis, thus our findings potentially confirm the greater risk of developing this disease in patients with antiphospholipid syndrome, consequently as a result of activation of endothelial cells with anti-prothrombin antibodies.

Key words:

- antiphospholipid syndrome,
- antiphospholipid antibodies,
- anti-prothrombin antibodies,
- prothrombin,
- human coronary artery endothelial cells.

SEZNAM OKRAJŠAV

aPL → antifosfolipidna protitelesa (*antiphospholipid antibodies*)

APS → antifosfolipidni sindrom¹ (*antiphospholipid syndrome*)

aPS/PT → od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu

aPS/PT ELISA → test ELISA za določanje od fosfatidilserina odvisnih protiteles proti protrombinu

AUG → arbitrarne enote za imunoglobuline razreda G (*arbitrary units for IgG*)

BSA → goveji serumski albumin (*bovine serum albumin*)

DPBS → Dulbeccov fosfatni pufer (*Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca⁺² and Mg⁺²*)

ELISA → encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

FITC → fluorescein izotiocianat

FBS → serum govejega ploda (*fetal bovine serum*)

GROα → od rasti odvisen onkogen α

HCAEC → človeške endotelijske celice koronarne arterije (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*)

HUVEC → človeške endotelijske celice umbilikalne vene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

IgG → imunoglobulini razreda G

IgG KRV → frakcija protiteles razreda G, izolirana iz seruma zdravega krvodajalca

IgG miši → frakcija protiteles razreda G, izolirana iz seruma zdrave miši

IL-1, IL-5, IL-6, IL-8 → interlevkin 1, interlevkin 5, interlevkin 6, interlevkin 8

mCSF → kolonije stimulirajoči dejavnik za makrofage

MIF → inhibitorni dejavnik migracije makrofagov

moPt 231D → monoklonsko protitelo proti protrombinu 231D

PBS → pufrana fiziološka raztopina (*phosphate buffered saline*)

poPt VZ1 → izolirana poliklonska protitelesa proti protrombinu

SAA → serumski amiloid A (*Serum amyloid A*)

SLE → sistemski lupus eritematozus (*systemic lupus erythematosus*)

¹ Okrajšave dogovorjene na 4. Mednarodnem simpoziju o antifosfolipidih protitelesih (Sirmione, Italija, april 1990)

TBS → Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) pufrana fiziološka raztopina
(*tris buffered saline*)

TNF α → dejavnik tumorske nekroze α



1 UVOD

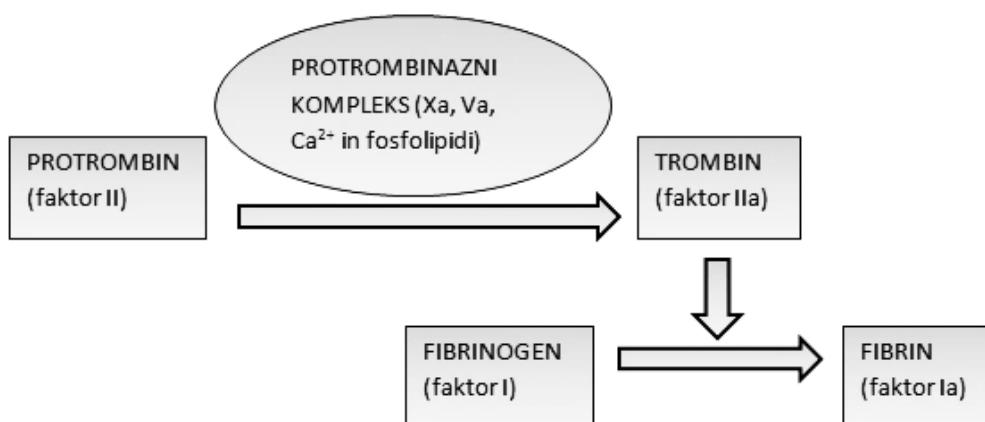
1.1. ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM IN ANTIFOSFOLIPIDNA PROTITELESA

Antifosfolipidni sindrom (APS) je sistemski avtoimunska bolezen, prvič omenjena leta 1983 (1), za katero so značilne ponavljajoče se venske ali arterijske tromboze, zapleti v nosečnosti in prisotnost antifosfolipidnih protiteles (aPL). Mednarodno sprejete smernice natančno določajo pogoje za postavitev diagnoze APS. Sindrom opredeljujeta prisotnost vsaj enega kliničnega in enega laboratorijskega merila. Klinična merila vključujejo pojav žilnih tromboz in/ali zapletov v nosečnosti, laboratorijska pa zajemajo prisotnost lupusnih antikoagulantov, protiteles proti kardiolipinu ali protiteles proti β_2 glikoproteinu I, v serumu ali plazmi, dokazanih v razmiku vsaj 12 tednov (2). APS lahko prizadene kateri koli organ v telesu. Pojavijo se lahko tudi trombocitopenija, hemolitična anemija, bolezni srčnih zaklopk, pljučna hipertenzija, livedo retikularis, ateroskleroza in druge manifestacije, ki niso vključene v klasifikacijska diagnostična merila (3). Primarni APS je tisti, ki se pojavi brez prisotnosti ostalih avtoimunskih bolezni, če pa ga spremljajo sistemske vezivno-tkivne bolezni, najpogosteje sistemska lupus eritematozus (SLE), ga opredelimo kot sekundarnega (4). Najpogostejši zaplet sindroma je venska tromboza, ki se pojavi pri več kot 30 % pacientov (5). Na izražanje in razvoj bolezni vplivajo spol in starost pacienta ter sindromu pridružen SLE (3).

Antifosfolipidna protitelesa (aPL) so velika in heterogena skupina krožečih imunoglobulinov razreda G (IgG), M in redkeje A, ki se pojavijo idiopatsko ali pri različnih infekcijskih in avtoimunskih boleznih (6, 7). Velika heterogenost teh protiteles naj bi bila povezana z zelo raznolikimi mehanizmi delovanja (8). V zdravi populaciji pojavnost aPL varira med 1 in 5 % in se povečuje s starostjo in prisotnostjo kroničnih bolezni (9). Sprva so mislili, da so aPL usmerjena proti anionskim fosfolipidom, a so kasneje ugotovili, da so usmerjena predvsem proti različnim proteinom, ki se vežejo na negativno nabite fosfolipide na celični površini (10). Ključna antigena, ki ju prepoznajo aPL sta plazemska proteina β_2 glikoprotein I in protrombin, ki se izražata na membranah različnih celic in sodelujeta v procesu hemostaze (11).

1.2. PROTROMBIN

Protrombin oz. faktor strjevanja krvi II je od vitamina K odvisen glikoprotein, ki nastaja v hepatocitih, kjer se tudi sekundarno modificira (12). V plazmi je normalno prisoten v koncentraciji približno 100 mg/L, njegov gen pa se nahaja na kromosomu 11 in je dolg 21000 baznih parov (13). Zrel človeški protrombin, ki kroži po krvi, je sestavljen iz 579 aminokislinskih ostankov z molekulsko maso 72 kDa (14). Sestavlja ga 3 domene: domena "kringel", domena Gla in katalitična domena (15). Ima ključno vlogo v verižni reakciji strjevanja krvi. Med njegovo biosintezo v jetrih poteče γ -karboksilacija na domeni Gla protrombina (12), ki je nujna za od Ca^{2+} odvisno vezavo fosfolipidov na protrombin (15). Protrombin se fiziološko aktivira s protrombinaznim kompleksom, ki vključuje aktivirana faktorja X in V, Ca^{2+} in fosfolipide. Ko negativno nabiti fosfolipidi vežejo protrombin, omenjeni kompleks pretvori protrombin v serinsko proteazo trombin (faktor IIa), ki sproži polimerizacijo fibrinogena v fibrin (12, 15). Kot zelo močan encim α -trombin pretvarja fibrinogen v fibrin, deluje pa tudi na faktorje strjevanja krvi V, VIII, XIII, na proteina C in S ter na trombocite in endotelijske celice (16) (Slika 1).



Slika 1: Shema aktivacije protrombina s protrombinaznim kompleksom

1.3. PROTITELESA PROTI PROTROMBINU

Protitelesa proti protrombinu so del heterogene skupine aPL, ki vključuje protitelesa proti fosfolipidom, kompleksom fosfolipidov s plazemskimi proteini in nekaterim plazemskim proteinom (17). Med pogostejšimi aPL so poleg protiteles proti β_2 glikoproteinu I tudi protitelesa proti protrombinu, ki zaenkrat še niso vključena v mednarodno sprejeta

klasifikacijska laboratorijska merila za diagnozo APS (2), a je že več študij pokazalo, da so pomembno in značilno povezana s kliničnimi znaki APS. Protrombin je bil prvič predlagan kot kofaktor za aktivnost lupusnih antikoagulantov leta 1959 (18). Wu in Lentz pa sta že leta 1994 pokazala, da se protrombin po vezavi na fosfatidilserin konformacijsko spremeni (19).

Prvo encimsko imunsko metodo za določanje protiteles proti protrombinu je razvil Arvieux s sodelavci 1995, kjer je bil protrombin kot antigen nanešen na mikrotitrsko ploščo z visoko afiniteto vezave. Ugotovili so, da se protitelesa proti protrombinu vežejo le na protrombin, ki je imobiliziran na anionski površini ali izpostavljen imobiliziranim anionskim fosfolipidom (20). Kasneje so drugi raziskovalci pokazali, da se lahko protitelesa proti protrombinu ob prisotnosti Ca^{2+} določijo tudi s testom aPS/PT ELISA, kjer je na mikrotitrsko ploščo vezan fosfolipid fosfatidilserin. Ta so bila poimenovana od fosfatidilserina odvisna protitelesa proti protrombinu (aPS/PT) (21). Kasnejše raziskave, objavljene v literaturi, so pokazale, da se s testom aPS/PT ELISA določajo protitelesa proti protrombinu z večjo diagnostično uporabnostjo v primerjavi z metodo, ki za antigen uporabi čisti protrombin. Pokazali so, da je protrombin v testu ELISA boljše prepoznan, če je vezan na fosfatidilserin, saj naj bi bil bolj nakopičen in pravilno usmerjen. Druga razлага pa je bila, da aPS/PT reagirajo z neoepitopi, ki se pojavi na protrombinu, ko se le ta veže na fosfatidilserin (22). Atsumi s sodelavci je pokazal, da so aPS/PT, in ne protitelesa proti samemu protrombinu, povezana s kliničnimi znaki APS in z lupusnimi antikoagulantmi in bi lahko služila kot dodatni diagnostični označevalec (23). V eni izmed študij so bila aPS/PT v primerjavi z drugimi aPL najmočnejši dejavnik tveganja tako za arterijsko kot vensko trombozo (24).

Študija Žigon in sodelavcev je pokazala, da so aPS/PT najmočnejši neodvisni dejavnik tveganja za obstetrične zaplete izmed vseh aPL, poleg tega so se izkazala kot neodvisni dejavnik tveganja za prisotnost venske tromboze. Pokazali so tudi močno povezano med aPS/PT in aktivnostjo lupusnih antikoagulantov (25).

Nedavno so Sciascia in sodelavci v svojem preglednem članku povzeli več kot desetletje objavljenih študij o protitelesih proti protrombinu in potrdili, da so IgG aPS/PT nedvomno povezana s trombozami, še posebej venskimi. Zaradi visokega tveganja za ponovno trombozo rutinsko testiranje aPS/PT priporočajo predvsem za bolnike s predhodnimi trombozami in/ali pridruženim SLE ter bolnicam z zapleti v nosečnosti, značilnimi za APS, pri katerih so določena klasifikacijska aPL negativna (26). Leta 2010 je bila prvič

predlagana vključitev aPS/PT med laboratorijske kriterije za postavitev diagnoze APS, vendar se laboratorijska merila v tem času še niso spremenila. Odločitev, o določanju aPS/PT, je tako v rokah zdravnika, ki lahko v okviru bolniku prijazne medicine pri posamezniku z dovolj velikim tveganjem preveri tudi nivoje aPS/PT (27). Pozitiven rezultat preiskave ob hkratni prisotnosti drugih aPL namreč poveča tveganje za ponovitev tromboz, saj je potrjeno, da se tveganje povečuje s številom pozitivnih aPL (28). Po drugi strani je tveganje za trombozo nizko, če ima bolnik z negativnimi aPL, ki so opredeljena v klasifikacijskih merilih, tudi negativna aPS/PT. V nekaterih primerih pa so aPS/PT edina povisana aPL, kar lahko vodi zdravnika, da se odloči za zdravljenje, za katerega se sicer ne bi odločil.

1.4. PATOGENI MEHANIZMI PROTITELES PROTI PROTROMBINU

Ateroskleroza je poglavitni patološki proces nekaterih srčno-žilnih bolezni. Visoko tveganje za aterosklerotične srčno-žilne dogodke imajo tudi bolniki z APS in SLE (29), poleg tega je pospešena ateroskleroza poglavitni vzrok smrtnosti pri bolnikih s SLE (30). Vendar pa pospešene ateroskleroze pri SLE in APS ne moremo razložiti le s tradicionalnimi dejavniki tveganja (29). Pri patogenezi ateroskleroze imajo vlogo lahko tudi dodatni dejavniki, kot so avtoprotitelesa in imunski kompleksi protiteles in fosfolipidov (31). Znanstvene objave kažejo na možno vplettenost aPL (32), ki naj bi predstavljala netradicionalen dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni z aterosklerotičnim ozadjem (33). Prisotnost visokih nivojev aPL predstavlja tudi neodvisni dejavnik tveganja za miokardni infarkt in nenadno srčno smrt (34). Z aterosklerozo so aPL povezali tudi na osnovi poskusov *in vivo* na živalih, kjer so pokazali povečano tvorbo aterosklerotičnih lezij ob njihovi prisotnosti v serumu (35).

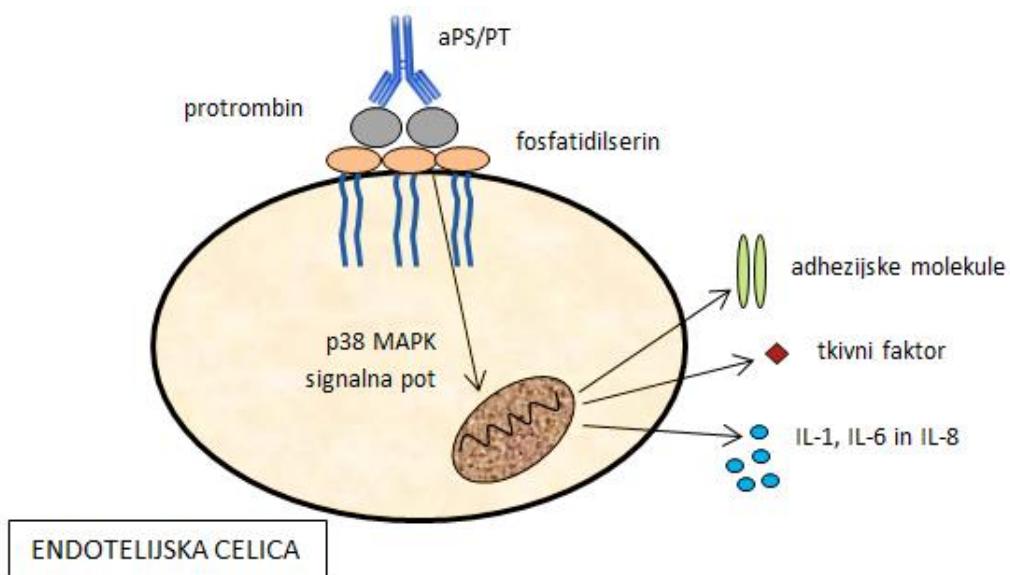
Mehanizmi nastanka tromboze pri pacientih z APS še niso natančno razjasnjeni. Trombotično stanje, povzročeno s prisotnostjo protiteles proti protrombinu, nastane s prepletanjem različnih mehanizmov delovanja (36). Ključne komponente, ki so vpletene v razvoj tromboz pri APS, so (37):

- celične komponente ožilja (endotelijalne celice, monociti in trombociti),
- humoralne komponente, ki regulirajo hemostazo (faktorji strjevanja krvi, naravni antikoagulanti in fibrinolitični sistem),
- vnetje (vnetne celice, topni vnetni posredniki in okužbe) (37, 38).

To kaže na zapletene interakcije aPL s celičnimi in humoralnimi dejavniki, ki spodbujajo vnetje, kar je nujno za razvoj trombotičnih zapletov (38). Interakcija med endotelijskimi celicami, trombociti in aPL pa ima morebiti vlogo tudi pri pospešeni aterosklerozi pri APS (29).

Antigeni v plazmi ali na celični površini, ki je izpostavljena plazmi, so dostopni za krožeca protitelesa. Predlaganih je bilo nekaj učinkov protiteles proti protrombinu na endotelijske celice (23, 39):

- inhibicija s protrombinom posredovanega sproščanja prostaciklina iz endotelijskih celic in s tem vpliv na aktivacijo proteina C (17),
- povečanje afinitete protrombina za negativno nabite fosfolipide (40),
- prepoznavanje kompleksa protrombina z anionskimi fosfolipidi na membrani endotelijskih celic in aktivacija celic, da sprostijo prokoagulantne molekule (41) (Slika 2).



Slika 2: Patogeni mehanizmi delovanja aPS/PT na endotelijske celice

Aktivacija endotelijskih celic in vnetna poškodba žilne stene pri sistemskih avtoimunskih boleznih ob hkratni prisotnosti aPL lahko vodi v disfukcijo endotelija (42), kar je zgodnji dogodek ateroskleroze v arterijski intimi in spodbuja izločanje citokinov in kemokinov, odgovornih za aktivacijo levkocitov (43).

Tudi na živalskih modelih so pokazali, da človeška poliklonska in monoklonska aPL aktivirajo endotelij in spodbujajo tvorbo strdka *in vivo* (44, 45). Nekateri dokazi kažejo tudi na to, da aPL preprečujejo odstranitev apoptotičnih endotelijskih celic, kar lahko spodbudi vnetne in protrombotične spremembe v fagocitnih celicah ožilja (46).

1.4.1. Izpostavitev fosfatidilserina in vezava protrombina

Fosfatidilserin, anionski fosfolipid, na katerega se veže protrombin v testu aPS/PT ELISA in eden izmed štirih ključnih fosfolipidov celične membrane, se v fizioloških pogojih nahaja izključno na notranji citoplazemski strani celične membrane in je kot tak nedostopen za protrombin in prosta protitelesa proti protrombinu (47). Asimetrična porazdelitev membranskih fosfolipidov se vzdržuje s specifičnimi encimi (flipaze, flopaze in skramblaze), ki regulirajo premikanje teh fosfolipidov (48). Do aktivacije celične membrane in izpostavitve fosfatidilserina na zunanji strani pride v primeru aktivacije, poškodbe ali apoptoze celic (49). Nespecifični transportni encimi skramblaze se aktivirajo v prisotnosti Ca^{2+} , kar privede fosfatidilserin na površino celic (50). V kaskadni reakciji strjevanja krvi fosfatidilserin deluje kot katalitična površina faktorjev strjevanja krvi (12). Poškodbe, ki vodijo do aktivacije strjevanja krvi, vključujejo njegovo izpostavitev na zunanji strani membrane, kjer lahko reagira s faktorji strjevanja krvi, spodbuja nastajanje trombina in privede do strjevanja krvi (51). Žigon in sodelavci v svojem preglednem članku povzemajo več razlag vezave protrombina na fosfolipidno površino. Protrombin se ob prisotnosti Ca^{2+} veže na negativno nabite fosfolipide, kar povzroči bodisi njegovo konformacijsko spremembo bodisi kovalentno vezavo dveh molekul protrombina (dimerizacija). Ob tem se pojavijo neoepitopi in takrat je omogočena vezava protiteles proti protrombinu (36).

1.4.2. Vezava protiteles proti protrombinu na celice

Sprva je bilo sprejeto, da se protitelesa proti protrombinu vežejo le na apoptotične celice (52). Kasneje so Chen in sodelavci predpostavljeni, da je za vezavo protiteles na površino celic potreben neodvisen sprožilni dogodek, ki endotelijsko celico stimulira, da se aPL lahko vežejo nanje in sprožijo trombogeni proces (53). Rezultati poskusov *in vivo* so pokazali, da aPL povečajo velikost strdka, ki je nastal zaradi poškodbe žil, kar kaže na to, da aPL spodbujajo prokoagulantne učinke nekega drugega sprožilca (45, 54). Kljub stalni

prisotnosti aPL v krvnem obtoku, pa se tromboze pri pacientih z APS pojavijo le občasno (55). Na podlagi teh dejstev je bila oblikovana hipoteza dveh sprožilcev, ki poskuša razložiti mehanizme delovanja aPL. Po tej teoriji aPL predstavljajo primarni sprožilec, ki povzroči začetno trombofilno stanje in potencira delovanje sekundarnega dražljaja, ki kasneje povzroči oblikovanje strdkov (56). Sekundarni dražljaj je ponavadi nek vnetni dogodek (11). V poskusih *ex vivo* to ponazorijo z dodatkom lipopolisaharida (44, 56, 57) ali pa serumskega amiloida A (SAA) (58, 59). Vnetje pa ne predstavlja le sprožilnega dogodka za razvoj tromboze pri pacientu, ampak je ključno tudi za spremembe v konformaciji antigena in aktivnosti imunskih celic (38).

1.4.3. Izločanje molekul iz endotelijskih celic po stimulaciji z aPS/PT

Pri endotelijskih celicah, trombocitih in monocitih sprožijo aPL vnetni in prokoagulacijski fenotip (60). Več študij *in vitro* ter *in vivo* je pokazalo, da aPL, predvsem protitelesa proti β_2 glikoproteinu I, stimulirajo endotelijske celice, da le-te izražajo adhezijske molekule, sproščajo citokine in vnetne molekule (61). Z aPL aktivirane endotelijske celice začnejo izražati adhezijske molekule, najpogosteje VCAM-1, ICAM-1 (62) in E-selektin (57, 63). S signalno potjo p38-MAPK posredovana aktivacija endotelijskih celic se kaže tudi z izražanjem interlevkina 1 (IL-1), interlevkina 6 (IL-6), interlevkina 8 (IL-8) in tkivnega faktorja, kar spremeni fenotip endotelijskih celic v vnetnega in prokoagulantnega (44, 60). Več študij je pokazalo, da aPL sprožijo izražanje tkivnega faktorja na monocitni celični liniji (35, 64, 65) in na endotelijskih celicah, kar sproži začetek ekstrinzičnega dela koagulacije (35). V nasprotju s protitelesi proti β_2 glikoproteinu I pa so patogeni vplivi protiteles proti protrombinu na celice zelo redko proučevani. Objavljena je bila samo ena študija, kjer so pokazali, da stimulacija monocitov in endotelijskih celic z aPS/PT sproži izražanje tkivnega faktorja, ki je ključni protein pri kaskadi strjevanja krvi (66).

1.5. ENDOTELIJ

Endotelij predstavlja eno izmed tkiv, ki imajo ključno vlogo tako pri APS kot pri aterosklerozi (67). Endotelij poteka preko celotnega žilnega sistema in je sestavljen iz ene plasti endotelijskih celic, ki predstavljajo/tvorijo notranjo površino žil. Regulira trombozo in trombolizo, krvni tlak in žilni tonus, s kontroliranjem premikanja levkocitov, monocitov in limfocitov regulira vnetne in imunske odgovore (68). Endotelijske celice imajo tako

parakrine kot endokrine funkcije. V fizioloških pogojih vzdržujejo netrombogeno okolje in predstavljajo negativno povratno zanko pri strjevanju krvi. Z izločanjem prostaciklina in dušikovega oksida ter s površinskimi molekulami, ki aktivirajo antikoagulacijske poti, preprečijo širjenje hemostaze. Preprečujejo adhezijo in aktivacijo trombocitov, izločajo pa tudi snovi, ki sprožijo fibrinolizo (12). Pod vplivom različnih dražljajev, kot je npr. trombin, pa se lahko aktivirajo in začnejo delovati trombogeno, proliferativno in vazokonstriktorno. Med različnimi vrstami endotelijskih celic obstajajo fenotipske variacije, tudi med arterijskimi in venskimi, zato te celice izražajo različne označevalce in se drugače odzovejo na isti dražljaj (69). Vnetje spremeni fenotip endotelijskih celic, in sicer pride do aktivacije celic ter povečanega izražanja adhezijskih molekul, kemokinov in vnetnih citokinov (70). Citokini, ki se med tem sprostijo, med drugim IL-1 in IL-6, imajo pomembne učinke na endotelijske celice: povišanje prepustnosti, spodbuditev sinteze tkivnega faktorja, spodbuditev izražanja adhezijskih molekul, ki vežejo levkocite in monocite. Aktivirane endotelijske celice izražajo IL-8, ki spodbuja kemotakso nevtrofilcev in degranulacijo. Adhezijski molekuli ICAM-1 in VCAM-1 se le minimalno izražata na površini neaktiviranih celic, njuno izražanje se poveča pod vplivom citokinov (68). Endotelijske celice imajo pomembno vlogo tudi pri angiogenezi in vaskulogenezi (71).

1.6. SERUMSKI AMILOID A

SAA spada med pozitivne proteine akutne faze vnetja, ki se izloča iz jeter pri vnetju in infekcijah. Sinteza beljakovin akutne faze se v hepatocitih v stresnih razmerah poveča tudi do 1000 krat nad normalno raven, tudi do 1 g/L (12, 72). Njegova serumska koncentracija pa je rahlo povišana tudi pri pacientih s SLE (10-100 mg/L) (72). Sintezo in izločanje SAA regulirajo vnetni citokini IL-1, IL-6 in dejavnik tumorske nekroze α (TNF α) (12). SAA kodirajo 4 geni, ki se nahajajo na 11. kromosому. Glede na to ločujemo SAA1 in SAA2, ki se inducibilno izražata le v akutni fazi vnetja; SAA3 kot psevdogen ter SAA4, ki se izraža konstantno (73). SAA se vgradi v lipoproteine z visoko gostoto (HDL) in je verjetno pomemben pri prenosu holesterola iz membran propadlih celic. Na mestu vnetja se lahko sprosti iz kompleksa s HDL in privablja ter aktivira levkocite (12). SAA spodbuja kemotakso, fagocitozo in adhezijo levkocitov na endotelijske celice (74). Na mesto vnetja lahko privablja imunske celice kot so monociti, levkociti, mastociti in limfociti T (73).

2 NAMEN DELA

Nasprotno od protiteles proti β_2 glikoproteinu I je patogeno delovanje protiteles proti protrombinu manj raziskano. Več študij je sicer potrdilo, da so protitelesa proti protrombinu pomembno in značilno povezana z venskimi trombozami in zapleti v nosečnosti (23, 25, 26), vendar pa so samo v eni do sedaj objavljeni študji pokazali, da aktivirane prokoagulantne endotelijalne celice, izpostavljene protitelesom proti protrombinu, izločajo trombofilne molekule, predvsem tkivni faktor (66).

V naši raziskavi bomo najprej izolirali specifična poliklonska protitelesa proti protrombinu iz seruma bolnika z APS, nato pa opredelili njihovo vezavo na človeške endotelijalne celice koronarne arterije (HCAEC) v primerjavi z monoklonskim protitelesom 231D. Delež vezave poliklonskih in monoklonskih protiteles proti protrombinu na HCAEC bomo merili s pretočno citometrijo. Posledice odziva celic na površinsko vezavo protiteles bomo ovrednotili še z merjenjem izločenih molekul v celično okolje z metodo hkratnega določanja analitov (multipleks).

2.1. HIPOTEZE

1. Izolirali bomo poliklonska protitelesa proti protrombinu iz seruma bolnika z APS ustrezne koncentracije, čistosti in imunske specifičnosti.
2. S pretočno citometrijo in indirektno imunofluorescenco bomo pokazali specifično vezavo monoklonskih in poliklonskih protiteles proti protrombinu na površino HCEAC ob prisotnosti protrombina.
3. SAA bo vplival na intenziteto vezave protiteles na površino HCEAC.
4. Stimulacija HCAEC s protitelesi proti protrombinu bo vplivala na izražanje določenih molekul.

2.2. CILJI

1. Izdelati afinitetno kolono z vezanim protrombinom na agarazi, aktivirani s CNBr.
2. Izolirati poliklonska protitelesa proti protrombinu iz seruma izbranega bolnika z APS z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom.
3. Določiti količino, čistost ter imunsko reaktivnost izoliranih poliklonskih protiteles proti protrombinu.

4. Stimulirati HCAEC z monoklonskimi in poliklonskimi protitelesi proti protrombinu ob prisotnosti protrombina in SAA.
5. Določiti vezavo protiteles proti protrombinu na površino HCAEC s pretočnim citometrom in indirektno imunofluorescenco.
6. Določiti koncentracijo izločenih molekul v celičnem okolju stimuliranih HCAEC z različnimi encimsko imunskimi testi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIAL

3.1.1. Biološki material

a) *Humani serumi*

Izolirana humana poliklonska protitelesa proti protrombinu

Serum bolnika moškega spola, starosti 41 let z APS in SLE, smo pridobili iz obstoječih bank Laboratorija za imunologijo revmatizma, Kliničnega oddelka za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Izbrani bolnik je predhodno prebolel vensko trombozo kot zaplet APS in je imel izmerjene visoke vrednosti IgG aPS/PT (več kot 100 arbitrarih enot za protitelesa IgG – AUG). V serumu, odvzetem 4. 8. 2006, so bile določene pozitivne vrednosti protiteles proti kardiolipinu, protiteles proti β_2 glikoproteinu I, aPS/PT (vsi trije izotipi IgG, IgM in IgA) ter lupusnih antikoagulantov. Bolnik je ob sprejemu pisno potrdil, da ne nasprotuje uporabi preostanka seruma v raziskovalne namene. Izolirana protitelesa smo označili kot poPt VZ1.

Izolirana humana poliklonska frakcija IgG zdravega krvodajalca

Iz seruma zdravega krvodajalca ženskega spola, starosti 24 let, z negativnimi vrednostmi aPL, smo izolirali IgG. Vzorec izoliranih protiteles smo označili kot IgG KRV.

b) *Mišja protitelesa*

Monoklonska mišja protitelesa

Uporabili smo mišje monoklonsko protitelo aPS/PT 231D (moPt 231D) (MBL, Woburn, ZDA) izotipa IgG1 κ, ki veže kompleks fosfatidilserin-protrombin in ima aktivnost lupusnih antikoagulantov. MoPt 231D ne veže oziroma zelo šibko veže čisti protrombin imobiliziran na γ -obsevanih ali na mikrotitrskih ploščah PVC. Protitelo je bilo shranjeno v koncentraciji 1 g/L, v pufru PBS/50 % glicerol pH 7,2 (75).

Poliklonska mišja frakcija IgG

Kontrolni mišji IgG (IgG miši).

c) Celična linija

Človeške endotelijske celice koronarne arterije (**HCAEC** – Human Coronary Artery Endothelial Cells), Cambrex, Wakersville, MD, ZDA.

3.1.2. Reagenti

- 10× DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca in Mg), BioWhittaker™, Lonza, Verviers, Belgija
- 2-merkaptotanol, OHCH₂CH₂SH, elektroforezna čistost, Merck, Darmstadt, Nemčija
- agaroza, aktivirana s CNBr (Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B C9142-5G), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- bromfenolmodro, Riedel de Haen
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad, ZDA
- DAPI Nucleic Acid Stain (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboksamidin), Invitrogen®, Carlsbad, CA, ZDA
- dietanolamin (NH(C₂H₅OH)₂), analitske čistoče, Sigma, St. Louis, ZDA
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat, Na₂HPO₄ × 2H₂O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- etanol, 96 %, CH₃CH₂OH, LEX, Portorož, Slovenija
- formaldehid, 36 %, analitske čistoče, Lexchem, Koper, Slovenija
- fosfatidilserin (2 g/L), Sigma, St. Louis, ZDA
- glicin (H₂NCH₂COOH), analitske čistoče, Sigma, St. Louis, ZDA
- gojišče za HCAEC, ki vsebuje:
 - osnovno gojišče (EBM-2: Endothelial Cell Basal Medium-2, serum free, 500 mL Clonetics®, Cambrex, Wakersville, MD, ZDA)
 - dopolnila za gojišče (EGM™-2 MV Single Quots®, Clonetics®, Cambrex, Wakersville, MD, ZDA), ki vsebuje:
 - * goveji fetalni serum, (angl. fetal bovine serum), 25 mL
 - * hidrokortizon (Hydrocortisone), 0,2 mL
 - * rekombinantni človeški fibroblastni rastni dejavnik-B (hFGF-B), 2 mL
 - * rekombinantni človeški žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), 0,5 mL
 - * rekombinantni človeški epidermalni rastni dejavnik-B (hEGF-B), 0,5 mL
 - * dolgi R³ rekombinantni inzulinu podobni rastni dejavnik-1(R³-IGF-1), 0,5 mL

- * askorbinsko kislino (Ascorbic acid), 0,5 mL
- * gentamicinijev sulfat in amfotericin (GA-1000), 0,5 mL
- goveji serumski albumin brez maščobnih kislin, Sigma, St. Louis, ZDA
- humani protrombin (activity: n/a) [0,9 g/L], Enzyme Research Laboratories, Swansea, Velika Britanija
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), analitske čistoče, E. Merck, Darmstadt, Nemčija
- kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), analitske čistoče, Mercks, Darmstadt, Nemčija
- kalijev klorid (KCl), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvaška
- analizni komplet za izolacijo IgG, Mab TrapTM Kit, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska, ki vsebuje:
 - elucijski pufer (0,1 M glicin-HCl, pH 2,7), 10× koncentriran, 15 mL
 - nevtralizacijski pufer (1 M Tris-HCl v 20 % etanolu, pH 9), 25 mL
 - vezavni pufer (20 mM Na-fosfat v 20 % etanolu, pH 7,0), 10× koncentriran, 50 mL
- analizni komplet za določanje koncentracije IL-6 (Immunoassay Kit Human IL-6), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
 - rekombinantni človeški IL-6 (Hu IL-6 Standard); 3,8 pg/1,51 mL
 - pufer za redčenje standarda (Standard Diluent Buffer), 25 mL
 - rekombinantne človeške anti-IL-6, konjugirane z biotinom (Hu IL-6 Biotin Conjugate), 6 mL
 - mikrotitrsko ploščo, prekrito z rekombinantnim človeškim anti-IL-6 (Hu IL-6 Antibody-Coated Wells (96 WP))
 - kompleks streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidase (HRP)), 100× koncentrirana; 0,125 mL
 - pufer za redčenje kompleksa streptavidin-hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent), 25 mL
 - spiralni pufer, 25× koncentriran (Wash Buffer Concentrate), 100 mL
 - kromogen tetrametilbenzidin (Stabilised Chromogen tetramethylbenzidine), 25 mL
 - raztopino za zaustavitev reakcije (Stop Solution), H_2SO_4 , 25 mL
- analizni komplet za določanje koncentracije MIF (Human MIF Immunoassay), R&D Systems Europe, Abingdon, Velika Britanija, ki vsebuje:
 - mikrotitrsko ploščo, prekrito z monoklonskim protitelesi anti-MIF (Hu MIF Antibody-Coated Wells (96 WP))
 - rekombinantni liofiliziran človeški MIF (Hu MIF Standard), 100 ng

- pufer za redčenje standarda (Calibrator Diluent RD5-20), 21 mL
 - poliklonska protitelesa anti-MIF, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Hu MIF Horseradish Peroxidase Conjugate), 21 mL
 - pufer za redčenje vzorcev (Assay Diluent RD1-53), 21 mL
 - spiralni pufer, 25× koncentriran (Wash Buffer Concentrate), 21 mL
 - vodikov peroksid (Color Reagent A: stabilised hydrogen peroxide), 12,5 mL
 - kromogen tetrametilbenzidin (Color Reagent B: stabilised chromogen tetramethylbenzidine), 12,5 mL
 - raztopino za zaustavitev reakcije (Stop Solution), H₂SO₄, 6 mL
 - samolepilno folijo
- analizni komplet za določanje koncentracije GRO α (Human CXCL1/GRO α Immunoassay), R&D Systems Europe , Abingdon, Velika Britanija, ki vsebuje:
- mikrotitrsko ploščo, prekrito z mišjim monoklonskim protitelesom anti-GRO α (Hu GRO α Antibody-Coated Wells (96 WP))
 - rekombinantni liofiliziran človeški GRO α (Hu GRO α Standard), 5 ng
 - pufer za redčenje standarda (Calibrator Diluent RD5K in RD6A), 2 × 21 mL
 - poliklonska protitelesa anti-GRO α , konjugirana s hrenovo peroksidazo (Hu GRO α Horseradish Peroxidase Conjugate), 21 mL
 - pufer za redčenje vzorcev (Assay Diluent RD1U), 6 mL
 - spiralni pufer, 25× koncentriran (Wash Buffer Concentrate), 21 mL
 - vodikov peroksid (Color Reagent A: stabilised hydrogen peroxide), 12,5 mL
 - kromogen tetrametilbenzidin (Color Reagent B: stabilised chromogen tetramethylbenzidine), 12,5 mL
 - raztopino za zaustavitev reakcije (Stop Solution), H₂SO₄ , 6 mL
 - samolepilno folijo
- analizni komplet za Luminex (Magnetic Luminex® Screening Assay - Human Premixed Multi-Analyte Kit), R&D Systems Europe, Abingdon, Velika Britanija:
- mikroploščica s filtrom (96 luknjic)
 - polistirenske mikrokroglice, na katere so vezana človeška primarna protitelesa (Human Magnetic Premixed Microparticle Coctail), 0,6 mL
 - mešanica standardov, ki vsebuje liofilizirane rekombinatne človeške biološke kazalnike (Standard Coctail A-J)
 - pufer za redčenje standardov (Calibrator Diluent RD6-52), 2 × 21 mL

- sekundarna protitelesa, označena z biotinom, 0,6 mL
- koncentrat streptavidina, konjugiran s fikoeritrim, 0,25 mL
- pufer za redčenje (Diluent RD2-1), 11 mL
- spiralni pufer, 25× koncentriran (Wash Buffer Concentrate), 21 mL
- kloroform (CHCl_3), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- klorovodikova kislina (HCl), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ledocetna kislina (CH_3COOH), 100 %, brezvodna, Merck, Darmstadt, Nemčija
- magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- metanol (CH_3OH), analitske čistoče, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Nemčija
- natrijev acetat brezvodni (CH_3COONa), analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev azid (NaN_3) ekstra čist, Merck, Darmstadt, Nemčija
- natrijev dodecilsulfat (SDS), 10 %, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Bio-Rad, ZDA
- natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev hidroksid (NaOH), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- natrijev klorid (NaCl), analitske čistoče, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- para-nitrofenil-fosfat (pNPP) 5mg tablete, Sigma, St. Louis, ZDA
- razkužilo (Kohrsolin FF), Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- raztopina za zaščito celic ob zamrzovanju (Cytoprotective medium), Lonza, Wakersville, MD, ZDA
- rekombinantni človeški Serumski amiloid A, Peprotech, Rocky Hill, NY, ZDA
- SeeBlue® Plus2 Prestained Standard, Novex ®, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG in IgM, konjugirana z alkalno fosfatazo, Accurate Chemical & Scientific Corporation (ACSC), Westbury, ZDA
- sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena kozja protitelesa, usmerjena proti mišjim IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom (FITC), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemčija
- sekundarna protitelesa: afinitetno prečiščena mišja protitelesa, usmerjena proti humanim IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom (FITC), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija

- SlowFade® Diamond Antifade Mountant, Life Technologies, Oregon, ZDA
- tekoči dušik (N_2), 200 bar, Linde Gas
- tripansko modrilo (Trypan Blue Stain), Bio Whittaker, Cambrex, Wakersville, MD, ZDA
- trypsin 10× (Trypsin/Versene EDTA), Lonza, Wakersville, MD, ZDA
- Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol), $C_4H_{11}NO_3$, analitske čistoče, Merck, Darmstadt, Nemčija
- Tris-HCl, $NH_2C(CH_2OH)_3\text{-HCl}$, Sigma-Aldrich, Nemčija
- Triton X-100, Sigma, St. Louis, ZDA
- Tween-20 (polioksietilen sorbitan monolavrat) EIA čist, Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA
- visoko prečiščena voda brez DNaz in RNaz (Ultra PURE™ destilled water DNAes, RNAse free), Gibco™, Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA

3.1.3. Pufri in raztopine

a) Za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim proteinom G

- za shranjevanje kolone: 20 % etanol
- nevtralizirajoči pufer (pH 9): 1 M Tris-HCl v 20 % etanolu
- vezavni pufer (pH 7,0): 10× koncentrirani 20 mM natrijev fosfat v 20 % etanolu
- izpiralni pufer (pH 2,7): 10× koncentrirani 0,1 M glicin-HCl

(Nevtralizirajoči, vezavni in izpiralni pufer so priloženi analiznemu kompletu.)

- razsoljevalni pufer (pH 7,4): pufrana fiziološka raztopina (TBS)

	<i>molarnost</i>
<i>natrijev klorid</i>	136 mM
<i>kalijev klorid</i>	2,7 mM
<i>Tris</i>	25 mM
<i>destilirana voda</i>	do 1 L
<i>pH uravnnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.</i>	

b) Za pripravo kolone z vezanim protrombinom

- za nabrekanje agaroze: 1 mM klorovodikova kislina
- vezavni pufer (pH 8,3): 0,1 M NaHCO₃ z 0,5 M NaCl
- blokirni pufer (pH 8): 0,1 M Tris-HCl
 - blokirni pufer (pH 8) z 0,5 M NaCl
- 0,1 M acetatni pufer z 0,5 M NaCl (pH 4):

<i>raztopina A:</i>	0,1 M ocetna kislina
<i>raztopina B:</i>	0,1 M brezvodni natrijev acetat
<i>Raztopini A dodajamo raztopino B do pH 4. Glede na volumen raztopine dodamo toliko NaCl, da dobimo 0,5 M NaCl.</i>	

c) Za afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim protrombinom

- nevtralizacijski pufer: 1 M Tris baza
- vezavni pufer (pH 7,4): pufrana fiziološka raztopina (TBS) z 0,1 % Tween 20

	<i>molarnost</i>
<i>natrijev klorid</i>	<i>136 mM</i>
<i>kalijev klorid</i>	<i>2,7 mM</i>
<i>Tris</i>	<i>25 mM</i>
<i>destilirana voda</i>	<i>do 1 L</i>
<i>pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.</i>	
<i>Tween 20</i>	<i>0,1 %</i>

- raztopina za shranjevanje kolone: *20 % etanolna raztopina*
- izpiralni pufer za nizko avidna protitelesa (pH 7,4): *TBS z 0,5 M NaCl z dodatkom 0,1 % Tween 20*
- izpiralni pufer za visoko avidna protitelesa (pH 2,5): *4 M NaCl v 0,1 M glicinu z dodatkom 0,1 % Tween 20*

	<i>molarnost</i>
<i>glicin</i>	<i>0,1 M</i>
<i>destilirana voda</i>	<i>do 1 L</i>
<i>pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.</i>	
<i>natrijev klorid</i>	<i>4 M</i>
<i>Tween 20</i>	<i>0,1 %</i>

d) Za test aPS/PT ELISA

- vezavni pufer za fosfatidilserin: *metanol/kloroform (4:1)*
- TBS (pH 7,4): *pufrana fiziološka raztopina*

	<i>Molarnost</i>
<i>natrijev klorid</i>	<i>136 mM</i>
<i>kalijev klorid</i>	<i>2,7 mM</i>
<i>Tris</i>	<i>25 mM</i>
<i>destilirana voda</i>	<i>do 1 L</i>
<i>pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.</i>	

- spiralni pufer (pH 7,4): 0,05 % Tween 20 v pufrani fiziološki raztopini s 5 mM $CaCl_2$ (0,05 % Tween/TBS-Ca)
- pufer za blokado, pripravo vzorcev (pH 7,4): 1 % goveji serumski albumin v pufrani fiziološki raztopini s 5mM $CaCl_2$ (1 % BSA/TBS-Ca)
- pufer za raztopljanje substrata (pH 9,8): dietanolaminski pufer (DEA)

	<i>molarnost</i>
<i>dietanolamin</i>	970 mM
<i>magnezijev klorid</i>	0,49 mM
<i>natrijev azid</i>	3,1 mM
<i>destilirana voda</i>	do 1 L
<i>pH uravnavamo z 2 M klorovodikovo kislino.</i>	

e) Za delo s celicami

- 0,1 M $CaCl_2$
- pufer FACS: 1 % BSA v PBS z 0,02 % NaN_3
- PBS (pH 7,4): pufrana fiziološka raztopina

	<i>molarnost</i>
<i>natrijev klorid</i>	137 mM
<i>kalijev klorid</i>	2,7 mM
<i>dinatrijev hidrogenfosfat</i>	6,5 mM
<i>kalijev dihidrogenfosfat</i>	1,5 mM
<i>destilirana voda</i>	do 1 L
<i>pH uravnavamo z 1 M klorovodikovo kislino.</i>	

f) Za denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE)

- spodnji pufer za elektroforezo (pH 8,3): 10× koncentrirani

	<i>količine</i>
25 mM Tris	30 g
192 mM glicin	145 g
destilirana voda	do 1 L

- zgornji pufer za elektroforezo: 1× koncentrirani spodnji pufer z 10 % natrijevim dodecilsulfatom do koncentracije 0,1 %
- pufer za vzorce: 4× koncentrirani

	<i>količine</i>
1M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL
natrijev dodecilsulfat	0,4 g
glicerol	2 mL
2-merkaptoetanol	1 mL
bromfenol modro	1 mg
destilirana voda	15,75 mL

- barvilo:

	<i>količine</i>
Coomassie brilliant blue	1,0 g
ledocetna kislina	100 ml
96 % etanol	450 mL
destilirana voda	do 1 L

- raztopina za razbarvanje:

	<i>količine</i>
ledocetna kislina	100 ml
96 % etanol	250 mL
destilirana voda	do 1 L

3.1.4. Aparature in pribor

- 15 in 50 mL-centrifugirne epruvete (centrifuge tubes), TPP, Trasadingen, Švica
- 6 in 12-prekatne plošče (Tissue cultured test plates), TPP, Trasadingen, Švica
- aparatura Luminex za hkratno analizo več različnih analitov v serumu (Luminex xMAP® Technology, Luminex® Corporation, Austin, Texas, ZDA)
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka: model S2010, 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- avtoklav A-11, Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- avtomatski spiralnik mikrotitrskih plošč, ELx405, BioTek, Bad Friedrichshall, Nemčija
- celica za vertikalno elektroforezo, Bio-Rad Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Hercules, Kalifornija, ZDA
- centrifugi, Universal 32 R in Mikro 120, Hettich, Tuttlingen, Nemčija
- centrifuga 5430, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- droben laboratorijski material in oprema: nastavki za pipete (z in brez filtrov), steklovina, plastične kadičke, ipd.
- elektroforezni geli, Bio-Rad Mini-Protean TGX Precast gels, Hercules, Kalifornija, ZDA
- epruvete 1,5 mL in 2 mL, Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- filtrirni sistem, Vacum filtration 250, 500, 1000 'rapid'-Filtermax, TPP, Trasadingen, Švica
- grelec, 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, ZDA
- hemocitometer, Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen®, Carlsbad, CA, ZDA
- indikatorski pH lističi, Merck, Darmstadt, Nemčija
- injekcijske brizge (1, 3, 5, 10 mL), Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Nemčija
- inkubator, Sanyo, Japonska
- kolona z imobiliziranim G proteinom, Hi Trap™ Protein G HP, 1 mL, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
- kolona za afinitetno kromatografijo (Econo-Column®); 1,5 × 20 cm, Bio-Rad, Richmond, ZDA
- komora za slikanje elektroforeznega gela, G:BOX Chemi HR, Syngene International, Cambridge, Velika Britanija
- koncentratorji Amicon® Ultra-4 in Amicon® Ultra-15, Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA

- magnetno mešalo, IKA® RCF basic, Staufen, Nemčija
- membranski filtri za enkratno uporabo, Minisart®, velikost por 0,45 µm in 0,20 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija
- mikroskop, Eclipse TS100 in Eclipse E400, Nikon, Dunaj, Avstrija
- oprema za nizkotlačno kolonsko kromatografijo, Bio-Logic LP, Richmond, ZDA
- pH meter, SevenEasy, Mettler Toledo, Švica
- pipete, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- plastenke za tkivne kulture 75 cm² (Tissue cultured flask), TPP, Trasadingen, Švica
- polistirenske mikrotitrskie plošče, Costar® medium binding EIA/RIA plates, Cambridge, ZDA
- pretočni citometer, MACSQuant® 10 Analyzer 10, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Nemčija
- razsoljevalne kolone PD-10 Columns (Sephadex™ G-25M) GE Healthcare (UK Limited Little Chalfont), Buckinghamshire, UK
- rotacijsko mešalo Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija
- spektrofotometer za mikrotitrskie plošče, Tecan Sunrise, Remote, Grödig, Avstrija
- sterilni pipetni nastavki s filtri (10 µL, 100 µL, 1000 µL), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- stresalnik, Promax 1020, Heidolph Zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- sušilec, Gel dryer model 543, Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, ZDA
- tehtnica, Mettler Toledo, PM2500, Mettler Toledo AG, Greifensee, Švica
- usmernik električnega toka, Bio-Rad Power Pac Basic Power Supply, Hercules, Kalifornija, ZDA
- UV-VIS spektrofotometer NanoDrop 2000, Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, DE, ZDA
- vakumska črpalka za odsesavanje gojišča: Millivac™ Miniature Vacuum pump XF54 230 50, Millipore, Schwalbach, Nemčija
- vakumska črpalka, 220V, KNF Neuberger GmbH, Freiburg-Munzingen, Nemčija
- vodna kopel TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- vrtinčnik, Assister, Nemčija

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija protiteles proti protrombinu z afinitetno kromatografijo

Afinitetna kromatografija temelji na ločevanju makromolekul s pomočjo specifičnih interakcij med biološkimi molekulami (npr. antigen-protitelo). Na trdnem nosilcu je kovalentno vezan afinitetni ligand, v našem primeru protrombin. Nanj se med procesom ločevanja adsorbirajo tarčne molekule iz vzorca, v našem primeru protitelesa proti protrombinu, ki potujejo z mobilno fazo. Komponente brez afinitete do liganda se iz kolone sperejo z mobilno fazo. Nekovalentno vezana protitelesa iz kolone izperemo s spremembom pH in ionske moči mobilne faze ali s spremembom temperature, z ultrazvokom ali z denaturanti. Lahko pa tudi ločeno izperemo najprej nizko avidna protitelesa (s pufrom nizke molarnosti) in nato še visoko avidna protitelesa (s pufrom visoke molarnosti in spremembom pH) (76, 77).

a) Izdelava kolone z vezanim protrombinom

27 mg liofiliziranega protrombina (Enzyme Research) smo raztopili v 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3 (vezavni pufer) do koncentracije 1,93 mg /mL agaroze. 5 g agaroze, aktivirane s CNBr, smo 30 minut nabrekali s 62,5 mL 1 mM HCl na sobni temperaturi in nastali gel prenesli v avtoklavirano in na stojalo vpeto kolono Bio-Rad (1,5 × 20 cm) do višine 8 cm, kar je približno 14 mL gela. Kolono smo najprej spirali s 500 mL 1 mM HCl in spodaj odsesavali z vodno črpalko (povprečni tok 200 mL/h), potem pa še z 25 mL vezavnega pufra. Raztopino protrombina smo nanesli na kolono z agarozo (1,93 mg protrombina/mL agaroze), jo zaprli in rahlo pretresli. Kolono smo čez noč na +4 °C vrteli diagonalno na vrtalniku, jo naslednji dan vpeli v stojalo in s prostim padom odsesavali raztopino nevezanega protrombina. Raztopino smo shranili na -80 °C. Kolono smo spirali še s 70 mL vezavnega pufra. Mesta na nosilcu, ki so ostala nevezana, smo blokirali z 20 mL 0,1 M Tris-HCl pH 8 in gel iz kolone prenesli v 50 mL centrifugirno epruveto ter jo vertikalno vrteli na krožilniku 2 uri na sobni temperaturi. Nato smo prelili gel nazaj v vpeto kolono ter centrifugirno epruveto sprali z 0,1 M Tris-HCl pH 8 in vse ponovno nanesli na kolono, ki smo jo spodaj odsesavali s prostim padom. Kolono smo postavili v hladno sobo na +4 °C in spodaj priklopili rotacijsko črpalko. S hitrostjo pretoka 150 mL/h smo odsesali preostalo raztopino 0,1 M Tris-HCl pH 8 iz kolone. Gel v koloni smo spirali z 2-kratnim volumnom kolone (30 mL), in sicer izmenično vezavni pufer pH 8,3/acetatni pufer

pH 4/vezavni pufer pH 8,3. Nato smo kolono izmenično spirali še s 30 mL acetatni pufer pH 4/blokirni pufer 0,1 M Tris-HCl z 0,5 M NaCl pH 8/acetatni pufer pH 4.

b) Izolacija frakcije IgG na koloni z vezanim proteinom G

Frakcije IgG smo izolirali z afinitetno kromatografijo z upoštevanjem navodil proizvajalca na koloni iz visoko premrežene agaroze z vezanim proteinom G velikosti 1 mL. Pred začetkom dela smo kolono, pufre in vzorec ogreli na sobno temperaturo ter pripravili delovne raztopine pufrov. Vzorec smo razredčili z vezavnim pufrom (20 mM Na-fosfat, pH 7,0 v 20 % EtOH) v razmerju 1:1. Vse pufre in vzorec smo na kolono nanašali preko filtra z velikostjo por 0,45 µm, s čimer smo preprečili kontaminacijo in podaljšali rok uporabe kolon. S hitrostjo pretoka 1 kapljica/s (5 mL/min) smo spirali kolono najprej z 10 mL destilirane vode, nato pa še z vsaj 10 mL vezavnega pufra. Sledil je nanos 2 mL razredčenega vzorca, ki smo ga nato še spirali z vsaj 10 mL vezavnega pufra, dokler nismo sprali vseh nevezanih proteinov. To smo dokazali z merjenjem koncentracije proteina v izpirku, ko se je absorbanca izpirka izenačila z absorbenco vezavnega pufra. Posamezne frakcije izpirka po koloni smo zbirali in shranili ter kasneje preverili koncentracijo proteinov spektrofotometrično na aparatu Nanodrop. Vezane proteine oziroma frakcijo IgG smo izprali iz kolone z vsaj 5 mL izpiralnega pufra (0,1 M glicin-HCl, pH 2,7) in zbirali 0,5 mL frakcije v vnaprej pripravljene epruvete Eppendorf z nevtralizirajočim pufrom (1 M Tris-HCl, pH 9 v 20 % EtOH). Z indikatorskimi lističi smo sproti preverjali pH v izpirkih in po potrebi z nevtralizirajočim pufrom uravnavali pH na 6-8.

Koncentracijo IgG v posameznih izpirkih smo sproti merili spektrofotometrično. Na koncu smo kolono sprali z 10 mL vezavnega pufra in po potrebi shranili v 10 mL 20 % etanola. Kolone smo po izolaciji shranili pri +4 °C. Eluate, pri katerih smo pri 280 nm izmerili koncentracijo, višjo od 0,1 g/L, smo združili in razsolili na razsoljevalnih kolonah.

c) Razsoljevanje vzorcev in zamenjava pufra

Razsoljevanje vzorcev po izolaciji frakcij IgG z afinitetno kromatografijo je potekalo na razsoljevalnih kolonah PD-10 Desalting column po navodilih proizvajalca. S to izključitveno kromatografijo smo zamenjali pufer izoliranim frakcijam IgG s pufrom TBS pH 7,4, ki je bližje fiziološkim pogojem. Največji volumen vzorca, ki smo ga lahko nanesli na kolono je bil 2 ml, zato smo hkrati razsoljevali na dveh kolonah. Iz nove kolone smo

izlili konzervacijsko raztopino ter kolono spirali s 25 mL TBS. Nato smo nanesli vzorec in takoj zbirali frakcije, velikosti 1 mL. Zatem smo spirali še s 15 mL TBS pH 7,4. Kolono smo regenerirali z 20 mL destilirane vode in konzervirali z 20 mL 20 % etanola. Na koloni smo označili število uporab in jo shranili pri +4 °C. Zbranim eluatom smo izmerili koncentracijo IgG na aparatu Nanodrop pri valovni dolžini 280 nm. Frakcije z najvišjimi koncentracijami smo združili, označili ter shranili pri -20 °C.

d) Izolacija protiteles proti protrombinu na koloni z vezanim protrombinom

Izolacijo protiteles proti protrombinu smo izvajali v hladni sobi pri temperaturi +4 °C na koloni z vezanim protrombinom. S kolono smo delali pazljivo in vzdrževali konstanten tlak črpalke. Pazili smo, da zrak ni prišel v stik s stacionarno fazo v koloni. Najprej smo pripravili črpalko BioRad za črpanje raztopin, kjer smo nastavili pretok na 2 mL/min. Uporabili smo cevke s premerom 3,1 mm. Kolono smo vpeli v stojalo in jo s cevkami povezali s črpalko. Kolono smo najprej sprali s 100 mL 136 mM TBS 0,1 % Tween 20 pH 7,4. Pretok smo zmanjšali na 0,8 mL/min in nanesli mikrobiološko filtriran (0,45 µm filter) vzorec izolirane frakcije IgG v TBS pH 7,4, ki smo ga čez noč pustili krožiti na koloni.

Naslednje jutro smo kolono sprali s 100 mL 136 mM TBS 0,1 % Tween 20 pH 7,4 s pretokom 2 mL/min. Med tem smo shranjevali frakcije velikosti 15 mL in merili koncentracijo proteinov pri 280 nm na Nanodropu. Pripravili smo aparat za avtomatsko zbiranje frakcij z oštevilčenimi epruvetami ter ga povezali z računalnikom in črpalko. Na črpalki smo izbrali računalniški program s predhodno vnešenimi nastavtvami. Pretok na črpalki smo nastavili na 1 mL/min. Čas zbiranja frakcij smo nastavili tako, da je bila velikost izpirkov približno 2 mL. Nizko avidna protitelesa smo izpirali s TBS 0,5 M NaCl 0,1 % Tween 20 pH 7,4, visoko avidna protitelesa pa s 4 M NaCl 0,1 M glicin 0,1 % Tween 20 pH 2,5. Na računalniku smo spremljali spremembo prevodnosti in UV svetlobe. Ves čas smo zbranim frakcijam uravnnavali pH na 6-8 z 1 M TRIS bazo in merili količino IgG na Nanodropu pri 280 nm. Ločeno smo združevali frakcije, ki so vsebovale nizko avidna in visoko avidna protitelesa proti protrombinu. Po končanem izpiranju specifično vezanih protiteles smo izvajali še program regeneracije s po 30 mL blokirnega pufra z 0,5 M NaCl pH 8 in acetatnega pufra pH 4, izmenjaje 3× s pretokom 1,5 mL/min. Na koncu smo vse cevke sprali s programom Spiranje z destilirano vodo, kolono shranili v 20 % etanolu in odklopili od črpalke.

e) Koncentriranje vzorca in zamenjava pufra

Uporabili smo centrifugirke s filtrom Amicon Ultra-4 (in Ultra-15 30K), ki vsebujejo membrano, ki zadrži molekule nad specifično molekulsko maso. V našem primeru so pore membrane, velikosti 30K, zadržale več kot 100 kDa velike IgG, vse ostalo je šlo skozi membrano. Združene frakcije smo v volumnu 3,5 mL nanesli v centrifugirki Amicon Ultra-4 in ju centrifugirali pri 7197 g 5 min do volumna 500 μ L, in nato dodali novih 3,5 mL vzorca, dokler nismo skoncentrirali celotnega volumna izoliranih protiteles proti protrombinu. V zadnjem koraku smo na filter s koncentriranim vzorcem nanesli še pufer TBS in ponovno centrifugirali, s čimer smo zamenjali pufer vzorca. S spektrofotometrom Nanodrop smo izmerili končno koncentracijo protiteles v vzorcu, ga označili in zamrznili na -20 °C.

3.2.2. Določanje koncentracije, avidnosti in čistosti aPS/PT

Encimsko-imunske metode na trdnem nosilcu (test ELISA) so danes najbolj uporabljane tehnike določanja protiteles proti protrombinu, saj omogočajo hitro določitev koncentracije in izotipa protiteles (36). Test ELISA uporabljamamo za določanje prisotnosti antigena ali protiteles v vzorcu in za določanje koncentracije z uporabo standarda ter umeritvene krivulje. S testom indirektna ELISA se meri koncentracija protiteles v vzorcu. V tem primeru se površina mikrotitrskih ploščice prekrije z antigenom, ki ga nato izpostavimo vzorcu, ki vsebuje specifična protitelesa. Nevezana protitelesa speremo, nastale komplekse antigen-primarno protitelo pa zaznamo s konjugatom sekundarno protitelo-encim široke specifičnosti. Količino vzorčnih protiteles določimo po dodatku substrata, ki ga encim pretvori v produkt. Količina obarvanega produkta je sorazmerna količini protiteles iz vzorca (76, 77).

Določanje aPS/PT je potekalo s testom indirektna ELISA, kjer se je primarno protitelo, katerega koncentracijo smo želeli določiti, vezalo na protrombin, nanešen na ploščo tik pred vzorci. Na spektrofotometrskem čitalcu mikrotitrskih plošč smo v več zaporednih ciklih izmerili absorpcije, dokler nismo dosegli najboljšega približka prej določenim absorpcijam internega standarda. Njihove predhodno določene referenčne vrednosti smo uporabili za izračun korekcijskega faktorja (korekcijski faktor = izmerjena absorpcija/ocenjena referenčna absorpcija). Absorbcije vzorcev smo nato pomnožili s

korekcijskim faktorjem analize, ki je bil povprečje vseh korekcijskih faktorjev posameznih internih standardov.

a) Test aPS/PT ELISA

Metoda se izvaja v laboratoriju za Imunologijo revmatizma za rutinsko določanje aPS/PT v serumu bolnikov (78). Prvi dan smo v vdolbinice polistirenske mikrotitrskie plošče (Costar medium binding EIA/RIA plates) nanesli po 40 µL fosfatidilserina koncentracije 50 mg/L v raztopini kloroform: metanol (1:4) in nepokrite plošče inkubirali čez noč na +4 °C, da je raztopina kloroform: metanol izhlapela. Naslednji dan smo nanesli 1 % BSA/TBS CaCl₂ pH 7,4, inkubirali pokrite ploščice 1 uro na sobni temperaturi, plošče spirali s TBS CaCl₂ 0,05 % Tween 20 in jih otresli. Med tem smo pripravili ustrezne redčitve standardov, kontrol in vzorcev. Nato smo v vdolbinice nanesli 25 µL protrombina (Enzyme Research) [20 mg/L v 1 % BSA/TBS CaCl₂ pH 7,4] ter takoj zatem še 25 µL standardov in vzorcev, redčenih 1:50 v 1 % BSA/TBS CaCl₂ pH 7,4. V vdolbinici je bila končna redčitev vzorca 1:100, koncentracija protrombina pa 10 mg/L. Inkubirali smo 1 uro na sobni temperaturi, plošče spirali s TBS CaCl₂ 0,05 % Tween 20 in jih otresli. Nanesli smo po 50 µL sekundarnih protiteles (afinitetno prečiščena kunčja protitelesa proti človeškim IgG, označena z alkalno fosfatazo), redčenih 1: 3000 v 1 % BSA/TBS CaCl₂ pH 7,4. Inkubirali smo 1 uro na sobni temperaturi, plošče spirali s TBS CaCl₂ 0,05 % Tween 20 in jih otresli. V vsako vdolbinico smo nanesli po 100 µL substrata para-nitrofenil fosfat v dietanolaminskem pufru pH 9,8 s koncentracijo 1 g/L. Absorbcijo smo merili s spektrofotometrskim čitalcem mikrotitrskih plošč pri 405 nm, dokler nismo dosegli najboljšega približka absorbcijam internega standarda.

b) Test kaotropna aPS/PT ELISA

Za določitev avidnosti smo v fazi vezave protiteles zagotovili kaotropne pogoje po predhodno objavljenem postopku (79). Vzorce smo redčili v 1 % BSA/TBS CaCl₂ pH 7,4 z naraščajočimi koncentracijami NaCl: 136 mM, 250 mM, 500 mM, 1000 mM in 2000 mM NaCl. Vsi ostali pogoji so bili enaki kot pri testu aPS/PT ELISA.

c) SDS-PAGE

Za določanje čistosti izolata po Pt VZ1 smo uporabili separacijsko metodo SDS-PAGE, kjer nabite molekule pod vplivom električnega polja potujejo skozi porozni gel proti elektrodi z nasprotnim nabojem. Vzorcem smo dodali reducirajoči pufer, ki vsebuje natrijev dodecilsulfat (SDS) in 2-merkaptoetanol. SDS je anionska površinsko aktivna snov, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira/linearizira. Popolno denaturacijo dosežemo z dodatkom reducenta, 2-merkaptoetanola v vzorec, ki prekine disulfidne vezi v molekuli protitelesa. Reducirajoči pufer vsebuje tudi glicerol, ki poveča gostoto in viskoznost vzorcev, da se ti lažje vsedejo v žepke in barvilo bromfenol modro, ki po gelu potuje hitreje kot proteini in služi kot indikator za elektroforezno fronto.

Pripravljene vzorce smo v mikrocentrifugirkah 5 minut segrevali v PCR Cycler-ju na 95 °C, s čimer smo pospešili popolno denaturacijo protiteles v vzorcu. Uporabili smo komercialno pripravljen 7,5 % zamrežen poliakrilamidni gel Mini-Protean TGX™. Pri SDS PAGE se vrši ločevanje molekul izključno na osnovi velikosti. Velike molekule se skozi gelsko rešetko prebijejo počasi, majhne pa hitro, ne glede na nabolj, ki bi ga imele v nativnem stanju.

Gel smo vstavili med dve plošči v kadičko in vanjo nalili zgornji elektroforezni pufer. Kadičko smo umestili v celico za vertikalno elektroforezo, v katero smo vlinili spodnji elektroforezni pufer. Elektroforezni pufer ima pH običajno 8-9, kjer je večina proteinov negativno nabitih, zato potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Pred nanosom vzorcev in standarda smo previdno izvlekli glavnik iz gela in žepke sprali z zgornjim pufrom s pomočjo Hamiltonove brizge. V žepke gela smo nato s Hamiltonovo brizgo nanesli po 30 µL vsakega vzorca in 7,5 µL standarda; to je zmes proteinov z znano molekulsko maso, ki služi kot označevalec velikosti.

Celico smo priključili na električni napajalnik, nastavili ustrezne pogoje in pognali elektroforezo pri toku 12,5 mA, ki smo ga po 15 minutah povišali na 25,0 mA. Na začetku, ko so proteini komaj vstopali v gel, je elektroforeza potekala počasneje pri nižji napetosti 80 V, nato pa smo ločevanje pospešili z višjo napetostjo 120 V. Elektroforezo smo prekinili, ko je bila fronta 1 cm pred koncem gela, in takoj začeli z nadaljnjo obdelavo. Gel smo po končani elektroforezi prenesli v plastično kadičko s Coomassiejevim brillantno modrim barvilom, barvali preko noči na +4 °C in gel razbarvali z raztopino za razbarvanje 30 minut na sobni temperaturi. Sledilo je slikanje v komori G-box in sušenje elektroforeznega gela na 80 °C.

3.2.3. Stimulacija endotelijskih celic in merjenje s pretočnim citometrom

a) Nasaditev in precepljanje

Delo smo izvajali v aseptični komori z laminarnim pretokom zraka. Gojišče smo pred uporabo vedno segreli na 37 °C v vodni kopeli. Celice smo gojili pri pogojih 37 °C, 5 % CO₂ atmosferi in 100 % relativni vlažnosti, ki smo jih zagotovili v inkubatorju. Stopnjo razraščenosti, konfluentnost, živost in kontaminacijo celic smo opazovali pod inverznim mikroskopom. Uporabljali smo celično kulturo HCAEC, izolirano iz 57-letne ženske, kavkajske rase. Po podatkih dobavitelja so bile to celice 3. pasaže, živost kulture pa je bila 97 % pri gostoti 859.500 celic/mL. Eksperimente smo izvedli na celicah 5. pasaže. Pred nasaditvijo smo določili želeno nasaditveno gostoto in izračunali koliko celic potrebujemo. Za celice HCAEC se priporoča nasaditvena gostota 2500-5000 celic/cm². Izbrali smo nasaditveno gostoto 4000 celic/cm².

V 500 mL osnovnega gojišča EBM-2 smo odpipetirali vsa dopolnila in ga shranili na +4 °C kot gojišče z 0 % FBS. Manjši količini (40 mL) pripravljenega gojišča smo dodali serum govejega plodu (FBS) in tako pripravili gojišče s 5 % FBS. Gojišče, ogreto na 37 °C, smo odpipetirali v pripravljene plastenke za tkivne kulture s površino 75 cm² ter 30 minut inkubirali v inkubatorju. V gojišče smo nato dodali ustrezен volumen celic, zamrznjenih v tekočem N₂, ki smo jih predhodno na hitro odmrznili v vodni kopeli 37 °C. Pritrjenim celicam smo po 4-ih urah inkubacije prvič zamenjali gojišče, nato pa vsak drugi dan. Ko smo z opazovanjem pod mikroskopom določili, da so celice zasedle 80-90 % površine plastenke, je sledilo precepljanje.

Plastenkam s celicami smo najprej odvzeli staro gojišče in jih sprali s 5 mL fosfatnega pufra Dulbeccov (DPBS), ki smo ga zatem odstranili. Dodali smo po 4 mL raztopine tripsin/EDTA in inkubirali 5 minut. Ko je bila pod mikroskopom večina celic zaokrožena in odlepilna od podlage, smo dodali še 8 mL tripsin nevtralizacijske raztopine. Celoten volumen smo iz plastenke prenesli v centrifugirno epruveto, plastenko ponovno sprali z DPBS in izprik dodali v centrifugirno epruveto. Centrifugirali smo 5 minut pri 300 × g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in celični usedlini dodali 5-10 mL ogretega svežega gojišča ter določili število celic. Vzeli smo 10 µL celične suspenzije, ki smo ji dodali 10 µL barvila Tripan blue. S hemocitometrom smo prešteli število živih neobarvanih celic. Poškodovane in mrtve celice se namreč zaradi porušene membranske integritete z barvilom barvajo modro. Del celic smo nasadili v 6 ali 12

prekatne plošče z različnimi nasaditvenimi gostotami. Preostanek pa smo shranili v parah tekočega dušika skupaj s krioprotективnim medijem in jih uporabili kasneje pri nadaljnjih eksperimentih.

b) Stimulacija celic HCAEC

V posameznih poskusih, izvedenih na celični liniji HCAEC, smo spremajali pogoje in preverjali vplive različnih dejavnikov na vezavo moPt 231D na površino celic. Po večkratnih ponovitvah smo vzpostavili optimalne pogoje in poskuse izvedli še na poliklonskih protitelesih, izoliranih iz seruma bolnika. Vzorca IgG miši ter IgG KRV smo uporabili za negativno kontrolo.

Šestnajst ur pred izvedbo poskusa smo celicam, ki so dosegle stopnjo razraščenosti 80-90 %, gojišče zamenjali z gojiščem brez FBS. Po 16-ih urah inkubacije smo z uporabo vakumske črpalke iz posameznega prekata odstranili gojišče in ga zamenjali s svežim gojiščem brez FBS (0,5 mL pri 12 prekatnih ploščah ali 1 mL pri 6 prekatnih). Celicam smo potem dodali različne količine Ca²⁺ in/ali protrombina in/ali SAA in/ali protiteles glede na pogoje poskusa. Po 6-ih urah inkubacije smo izvedli zbiranje gojišč in celic. Gojišče smo iz prekatov odpipetirali v označene epruvetke in jih kasneje centrifugirali 5 minut pri 300 × g na sobni temperaturi, da smo se znebili ostankov celic. Supernatante smo odpipetirali v nove označene epruvetke in shranili na -80 °C.

Celice, ki so ostale v prekatih plošč, smo sprali z DPBS, nato pa nanesli tripsin/EDTA ogret na 37 °C. Plošče smo rahlo pretresli in par minut inkubirali pri 37 °C, da so se odlepile vse celice. Za inaktivacijo delovanja tripsina smo dodali tripsin nevtralizirajočo raztopino in vse skupaj prenesli v centrifugirno epruveto. Plošče smo ponovno sprali z DPBS in zopet vse prenesli v centrifugirno epruveto. Centrifugirali smo 5 minut pri 300 × g na sobni temperaturi. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v hladnem 1 % BSA/ PBS z 0,02 % NaN₃ (FACS pufer) in prenesli v mikrotitrsko ploščico z 96 vdolbinicami z V dnom.

c) Meritve površinske vezave s pretočno citometrijo oz. fluorescenčno aktiviranim celičnim sortiranjem (FACS)

Za to vrsto analize moramo imeti celice v suspenziji. V pretočni celici citometra pride do prehoda vzorca s počasnim tokom v hitrejšo nosilno tekočino. Celice mimo vira svetlobe (laserski žarek) prehajajo posamično (hidrodinamsko fokusiranje). Količino razpršene svetlobe, ki jo oddaja posamezna obsevana celica, merita 2 fotodetektorja. Z detektorjem FALS v ravnini poti laserskega žarka pridobimo parameter prednjega sisanja FSC, ki je sorazmeren velikosti celice. Drugi fotodetektor RALS, pa se nahaja pravokotno od poti žarka in podaja parameter stranskega sisanja SSC, ki je sorazmeren kompleksnosti celice. Pretočni citometer ima tudi fluorescenčne detektorje, ki prejemajo emitirano fluorescenčno svetlubo določene valovne dolžine, s čimer merijo signale, ki jih oddajajo posamezna fluorescenčna barvila (76, 77).

V naših poskusih smo HCAEC v mikrotitrski ploščici z V dnom $2\times$ spirali s pufrom FACS in vmesnim centrifugiranjem 1 minuto pri $300 \times g$ na $+4^\circ C$ in končno resuspendirali celice v hladnem pufru FACS. Sledila je inkubacija s sekundarnimi protitelesi (afinitetno prečiščena kozja/mišja protitelesa, usmerjena proti mišjim/humanim IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom - FITC) 30 minut na $+4^\circ C$. Po barvanju s sekundarnimi protitelesi smo celice ponovno $2\times$ sprali po enakem postopku kot prej. Na koncu smo vezavo protiteles na površino celic merili s pretočnim citometrom, ki po prej nastavljenem programu vzorce še avtomatsko barva s propidijevim jodidom, kar omogoča izločitev mrtvih celic pri kasnejši analizi rezultatov.

d) Določanje vezave protiteles na površino celic z indirektno imunofluorescenco

V ta namen smo pri nasaditvi celic v šestprekatno ploščo v vsak prekat dodali krovno stekelce, na katerem so se namnožile celice. Pri doseženi $> 80\%$ stopnji razščlenosti celic smo krovna stekelca prenesli v novo šestprekatno ploščo in celice obarvali za mikroskopiranje. Celice v prekatih smo spirali z ogretim pufrom PBS $2\times$ po 3 minute in jih nato fiksirali s 3,7 % formaldehidom 10 minut na sobni temperaturi. Po $3\times$ spiranju smo celicam dodali 0,1 % Triton X-100 za 4 minute na sobni temperaturi. V vsak prekat smo dali $750 \mu L$ sekundarnih protiteles redčenih 1:100 (afinitetno prečiščena kozja protitelesa usmerjena proti mišjim IgG konjugirana s FITC) in inkubirali 30 minut na sobni temperaturi. Sledilo je $3\times$ spiranje s PBS. Nato smo celicam dodali fluorescenčno barvilo

DAPI, ki se veže na DNA in obarva jedra celic modro. Inkubirali smo 1-5 minut in spiralni s PBS-om 3 minute. Na koncu smo celice prekrili s kapljico reagenta SlowFade, ki fluorescenčne signale označenih celic ohrani dlje časa. Celice smo si ogledali pod mikroskopom in posneli slike preparatov.

e) Merjenje v celično okolje izločenih molekul po stimulaciji HCAEC

Test IL-6 ELISA

IL-6 smo merili z analiznim kompletom v skladu z navodili proizvajalca. Liofiliziran človeški standard IL-6 za umeritveno krivuljo smo pripravili po navodilih proizvajalca, rahlo premešali ter pustili 10 minut. Sledila je redčitev standarda s pufrom za redčenje standarda za potrebe umeritvene krivulje (500, 250, 125, 62,5, 31,5, 15,6, 7,8, 0 pg/mL). Na ploščo z vezanimi protitelesi anti-IL-6 smo najprej nanesli po 100 µL standardov in vzorcev. Sledil je nanos 50 µL z biotinom označenih sekundarnih protiteles anti-IL-6. Ploščo smo rahlo potresli, prelepili s samolepilno folijo in inkubirali 2 uri na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ploščo 4× sprali s 300 µL spiralnega pufra. Sledil je nanos 100 µL delovne raztopine streptavidin-HRP in ponovno 30 minut inkubacije. Ploščo smo ponovno 4× spirali s 300 µL spiralnega pufra in nanjo nanesli po 100 µL kromogena (tetrametilbenzidin, TMB) ter 30 minut inkubirali v temi na sobni temperaturi. Sledil je nanos 100 µL raztopine za zaustavitev reakcije. Absorpcijo smo izmerili pri 450 nm.

Test MIF ELISA

Reagente smo ogreli na sobno temperaturo. Z redčenjem 5× koncentriranega pufra za redčitev standardov in vzorcev smo pripravili 1× koncentriranega (Calibrator Diluent). Pripravili smo tudi spiralni pufer (20 mL 25× koncentriranega pufra smo redčili z destilirano vodo do 500 mL). Liofiliziran standard smo redčili po navodilih proizvajalca, rahlo premešali ter pustili 15 minut. Sledila je redčitev standardov, tako da smo dobili naslednje koncentracije: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 in 0 ng/mL. Na ploščo prekrito z anti-MIF smo najprej nanesli 100 µL analiznega pufra (Assay Diluent), za tem pa po 50 µL vzorcev in standardov v paralelkah. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in inkubirali na stresalniku 2 uri pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ploščo 4× spirali s 400 µL spiralnega pufra. Sledil je nanos 200 µL sekundarnega anti-MIF, konjugiranega s

hrenovo peroksidazo. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in ponovno inkubirali na stresalniku 2 uri. Po inkubaciji smo ploščo 4× spirali s 400 µL spiralnega pufra. Nanesli smo 200 µL raztopine substrata, ki smo jo pripravili 15 minut pred uporabo z mešanjem enakih volumnov reagenta A (vodikov peroksid) in B (TMB). Ploščo smo nato inkubirali v temi 30 minut ter spremljali reakcijo. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50 µL raztopine za zaustavitev reakcije. Izmerili smo absorpcijo pri 450 nm.

Test GRO α ELISA

Reagente smo ogreli na sobno temperaturo. Pripravili smo spiralni pufer (20 mL 25× koncentriranega pufra smo redčili z destilirano vodo do 500 mL). Liofiliziran standard smo redčili po navodilih proizvajalca, rahlo premešali ter pustili 15 minut. Sledila je redčitev standardov s Calibrator Diluent RD5K, da smo dobili naslednje koncentracije: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 in 0 pg/mL. Na ploščo prekrito z anti-GRO α smo nanesli po 200 µL vzorcev in standardov v paralelkah. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in inkubirali uro in pol na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ploščo 3× spirali s 400 µL spiralnega pufra. Sledil je nanos 200 µL sekundarnega anti-GRO α , konjugiranega s hrenovo peroksidazo. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in inkubirali 1 uro pri temperaturi 2–8 °C. Po inkubaciji smo ploščo 3× spirali s 400 µL spiralnega pufra. Nanesli smo 200 µL raztopine substrata, ki smo jo pripravili 15 minut pred uporabo z mešanjem enakih volumnov reagenta A (vodikov peroksid) in B (TMB). Ploščo smo nato inkubirali v temi na sobni temperaturi 15 minut ter spremljali reakcijo. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50 µL raztopine za zaustavitev reakcije. Izmerili smo absorpcijo pri 450 nm.

Metoda hkratne analize več različnih analitov - MULTIPLEX

V supernatantih smo koncentracijo analitov določali z metodo hkratne analize več različnih analitov (Luminex xMAP® Technology, Luminex® Corporation, Texas, ZDA), rezultate pa obdelali in grafično prikazali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel. Določali smo koncentracijo 23-ih različnih analitov: TNF- α , IL-8, MMP-1, hitinaza, VEGF, IL-1 β , IFN- γ , tenascin C, IL-31, IL-17A, IL-9, resistin, IL-5, VCAM-1, TNF R, IL-23, IL-18, IL-10, IL-27, IL-2, IL-13, mCSF in α -fetoprotein.

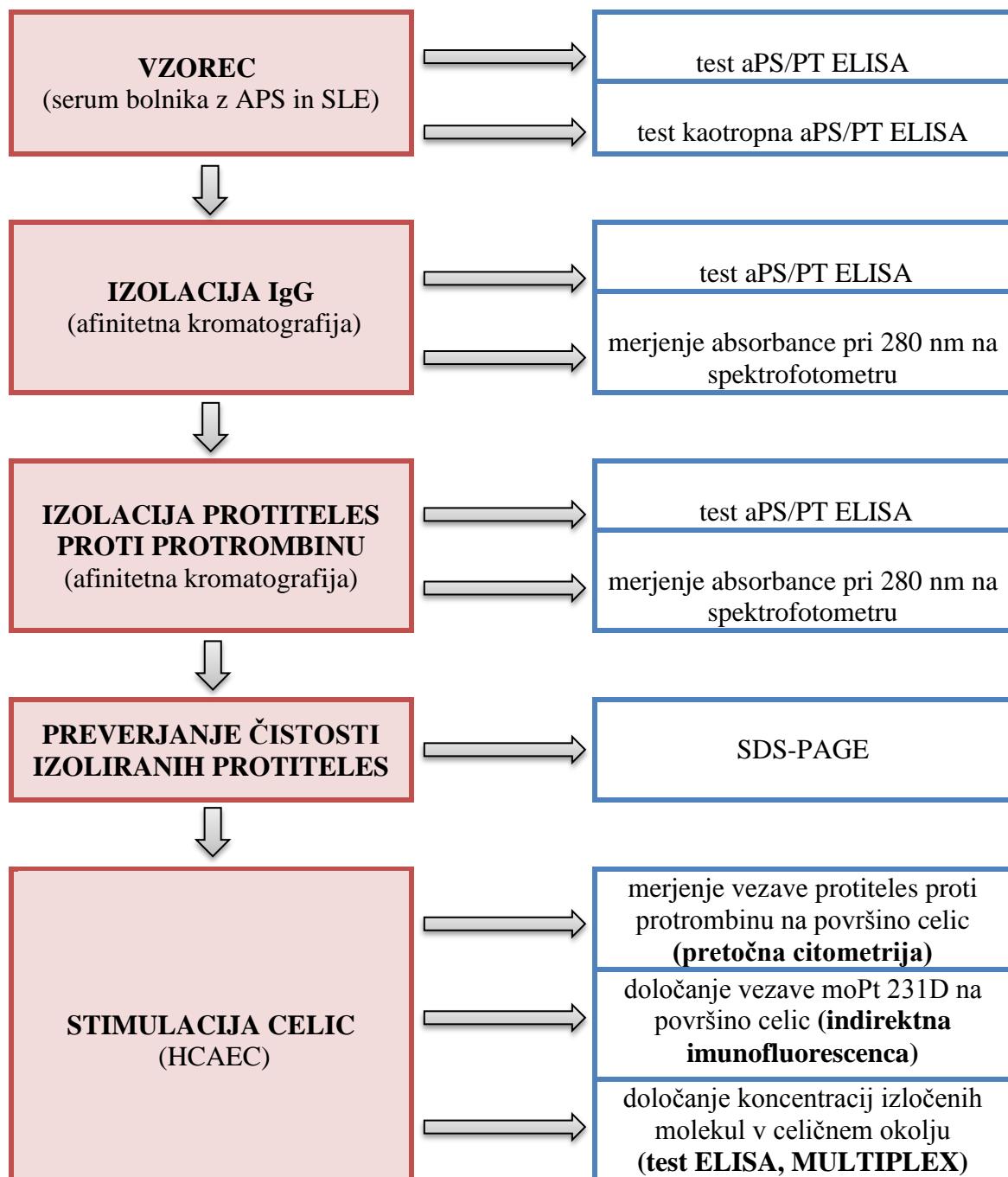
Metodo smo uporabili za določitev koncentracije različnih proteinov v celičnih supernatantih izvedenih poskusov. Na različno obarvanih polistirenskih mikrokroglicah so

vezana specifična primarna protitelesa, ki prepozna določen tarčni analit. Po nanosu vzorcev oziroma standardov se specifičen analit (antigen) veže s primarnim protitelesom na posameznih mikrokroglicah. Sledi dodatek sekundarnih protiteles z vezanim biotinom, ki se specifično vežejo na tarčni analit, ki ga določamo v vzorcu. Nato dodamo streptavidin, konjugiran s fikoeritrinom, ki se z biotinom veže z močno nekovalentno vezavo. Na koncu sledi še optična detekcija s pomočjo dveh laserjev: prvi prepozna barvo mikrokroglice in identificira ustrezen analit, drugi pa zazna jakost signala fikoeritrina, ki je premosorazmeren z vezano količino analita v vzorcu.

Vzorce supernatantov, ki smo jih prej redčili v razmerju 1:2, kot je priporočeno s strani proizvajalca (R&D Systems, Abingdon, VB), smo na ploščo nanesli skupaj s kontrolo ozadja in standardi. Iz standardov z znano koncentracijo analitov smo pripravili serijo redčitev s faktorjem 3. S pomočjo računalniškega programa Luminex 100 Integrated system 2,3 smo vnesli podatke o redčitvah, določili mesto nanosa standardov, vzorcev in kontrole ozadja na ploščici ter določili pogoje poteka reakcije (priporočene s strani proizvajalca - R&D Systems, Abingdon, VB). Računalniški program je na podlagi standardov izrisal standardno krivuljo in izračunal koncentracije tarčnih analitov v vzorcih supernatantov.

3.3. EKSPERIMENTALNO DELO

Naš prvotni namen je bil pridobitev zadostne količine protiteles za izvedbo poskusov na HCAEC. Iz seruma bolnika z APS in SLE smo najprej izolirali IgG, iz pridobljene frakcije IgG pa smo v nadaljevanju izolirali protiteesa proti protrombinu. Po preverjanju čistosti izolatov smo celice tretirali z moPt 231D ter poPt VZ1. Merili in določali smo vezavo protiteles na površino celic ter določali koncentracije izločenih molekul v celično okolje po tretiranju celic. Potek eksperimentalnega dela prikazuje Slika 3.



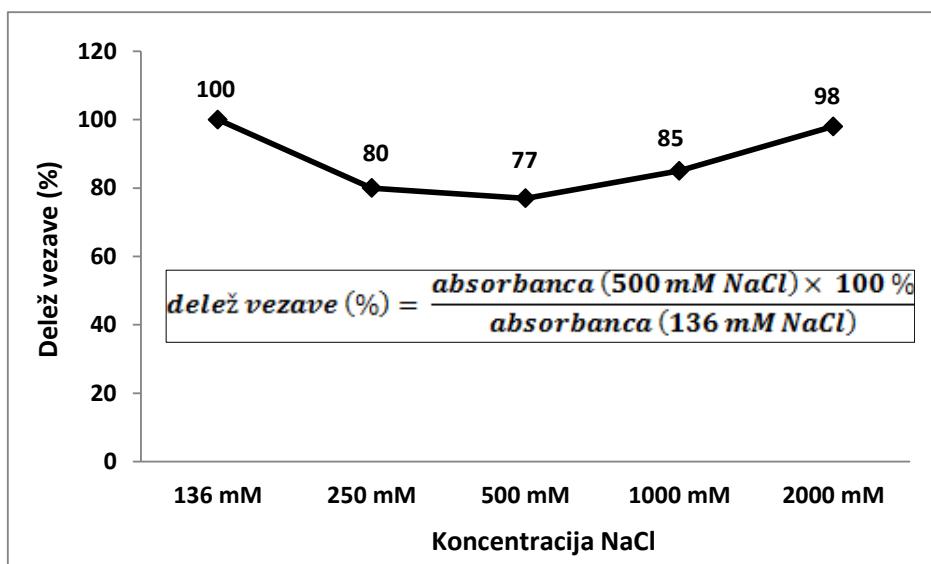
Slika 3: Potek eksperimentalnega dela

4 REZULTATI

4.1. IZOLACIJA PROTITELES PROTI PROTROMBINU IZ SERUMA BOLNIKA

4.1.1. Določitev avidnosti poliklonskih protiteles proti protrombinu

Vezavo protiteles pri fizioloških pogojih (136 mM NaCl), ki velja za 100 % vezavo vzorca, smo primerjali z vezavo, izmerjeno pri 500 mM NaCl. V serumu vzorca poPt VZ1 smo pri 500 mM NaCl izmerili 77 % vezave pri fizioloških pogojih. V predhodni študiji (79) so določili, da se visoko avidna protitelesa pri 500 mM NaCl vežejo z več kot 70 % vezave, izmerjene pri fizioloških pogojih, nizko avidna pa z manj kot 25 %. Vzorci z vmesnim deležem vezave imajo heterogeno avidna protitelesa. Serum bolnika, iz katerega smo kasneje izolirali poPt VZ1, ima tako pretežno visoko avidna protitelesa (Slika 4).



Slika 4: Delež vezave izoliranih protiteles pri različnih koncentracijah NaCl

4.1.2. Izolacija IgG in protiteles proti protrombinu

Izhodiščni serum z V=10,5 mL, odvzet 4. 8. 2006, je imel vsebnost IgG aPS/PT več kot 100 AUG glede na interni standard, ki se ga uporablja pri testu aPS/PT ELISA. Najprej smo z afinitetno kromatografijo na koloni z vezanim proteinom G izolirali celokupno frakcijo IgG. Združili smo tri izolirane frakcije, ki so vsebovale največ protiteles IgG aPS/PT, določenih s testom aPS/PT ELISA, ter jih dializirali v pufru TBS. Dobili smo

14,5 mL vzorca s koncentracijo 1,080 g/L (določeno na spektrofotometru Nanodrop pri valovni dolžini 280 nm), kar predstavlja 15,66 mg celokupnih protiteles IgG.

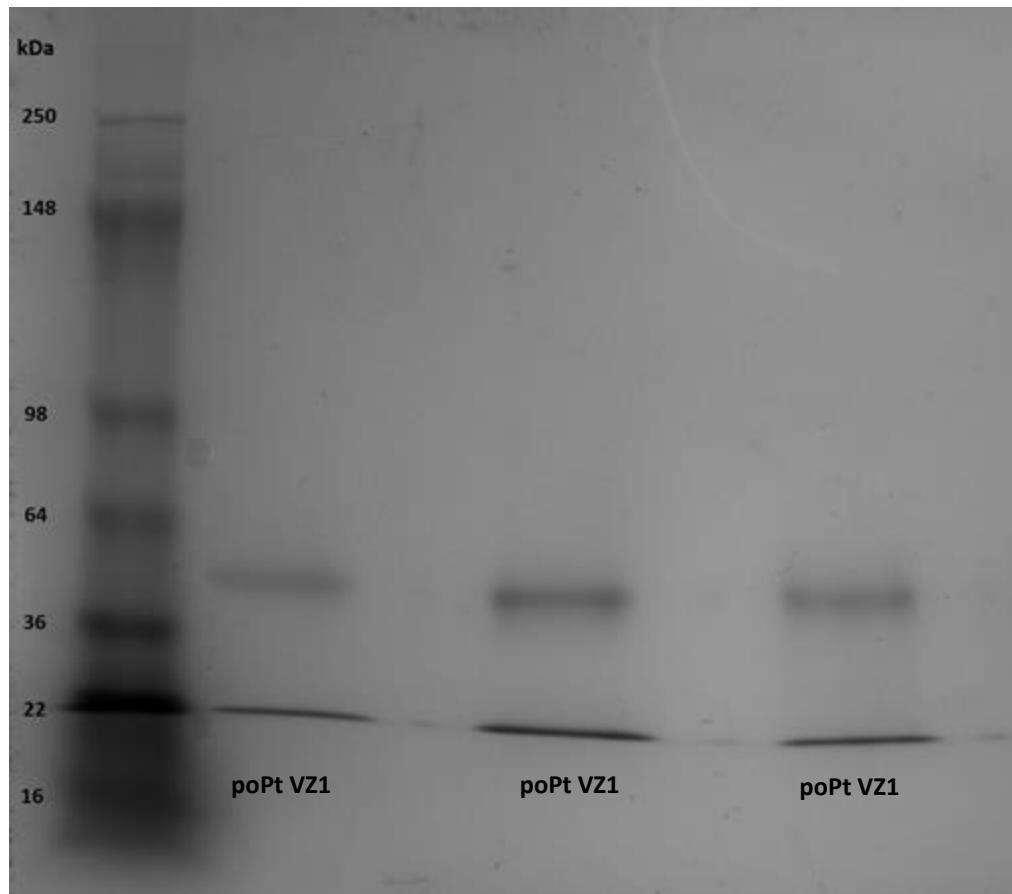
V drugi stopnji smo iz izolirane frakcije IgG z afinitetno kromatografijo na koloni z imobiliziranim protrombinom izolirali protiteesa proti protrombinu. Ostanku po kroženju na koloni smo izmerili koncentracijo 1,000 g/L IgG, torej se je na kolono vezalo približno 0,080 g/L protiteles proti protrombinu. Količina koncentriranih in v TBS dializiranih združenih frakcij izoliranih protiteles proti protrombinu je bila približno 1,5 mL s koncentracijo 1,43 g/L in vsebnostjo 37 AUG. Ob upoštevanju volumna in koncentracije smo torej dobili 2,145 mg protiteles proti protrombinu, kar znese 13,70 % od celotne količine izoliranih IgG (Preglednica I).

Preglednica I: Potek izolacije protiteles proti protrombinu iz seruma izbranega bolnika

Izhodiščni vzorec:	V = 10,5 mL IgG aPS/PT > 100 AUG		
Izolacija IgG	frakcija IgG 1:	V = 5 mL	IgG aPS/PT > 100 AUG
	frakcija IgG 2:	V = 4,5 mL	IgG aPS/PT > 100 AUG
	frakcija IgG 3:	V = 5 mL	IgG aPS/PT > 100 AUG
			↓
Izolacija protiteles proti protrombinu			
zdržene frakcije IgG	V = 14,5 mL	konz. = 1,080 g/L	m = 15,66 mg
vezano na kolono:		konz. = 0,080 g/L	
ostanek po koloni:		konz. = 1,000 g/L	
razsoljen in koncentriran vzorec po koloni:	V = 1,5 mL	konz. = 1,43 g/L IgG aPS/PT 37 AUG	m = 2,145 mg protiteles proti protrombinu
izkoristek:	$\eta = 2,145 \text{ mg} / 15,66 \text{ mg} = 13,70 \%$		

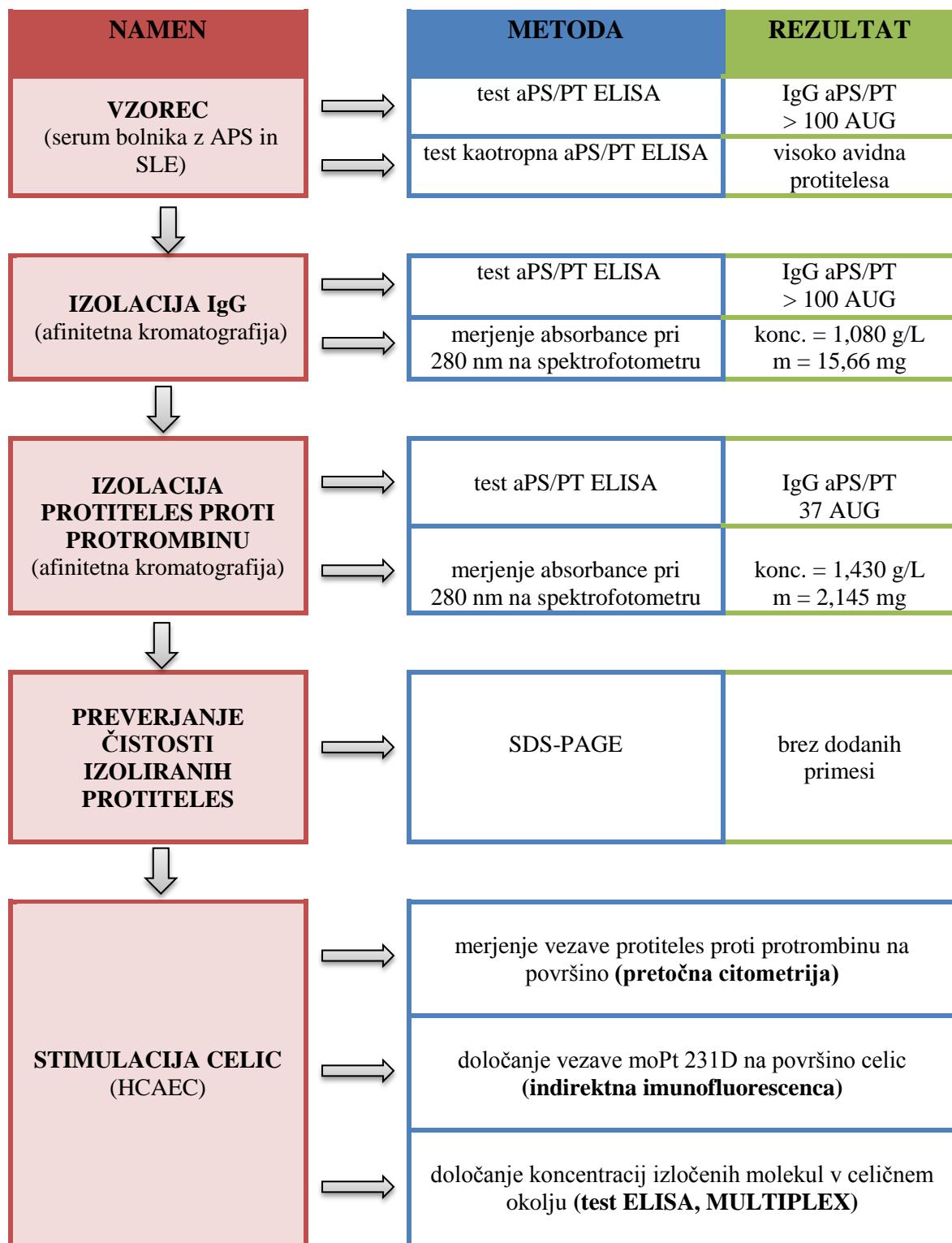
4.1.3. Preverjanje čistosti izoliranih poliklonskih protiteles proti protrombinu

Pred poskusi na celicah smo preverili še čistost poPt VZ1 z reducirajočo SDS PAGE. Z merkaptoetanolom razbijemo disulfidne vezi in protitelesa razpadejo na 2 lahki in 2 težki verigi. To opazimo kot dve lisi velikosti 50 in 25 kDa. S poskusom smo potrdili, da poPt VZ1 nima dodanih primesi (Slika 5). Vidni sta ustrezni lisi pri 50 in 25 kDa glede na marker molekulske mase, medtem ko drugih lis ni opaziti.



Slika 5: Prikaz rezultatov reducirajoče SDS PAGE. Glede na marker molekulske mase sta vidni le lisi pri 25 in pri 50 kDa, kar kaže na to, da poPt VZ1 nima dodanih primesi.

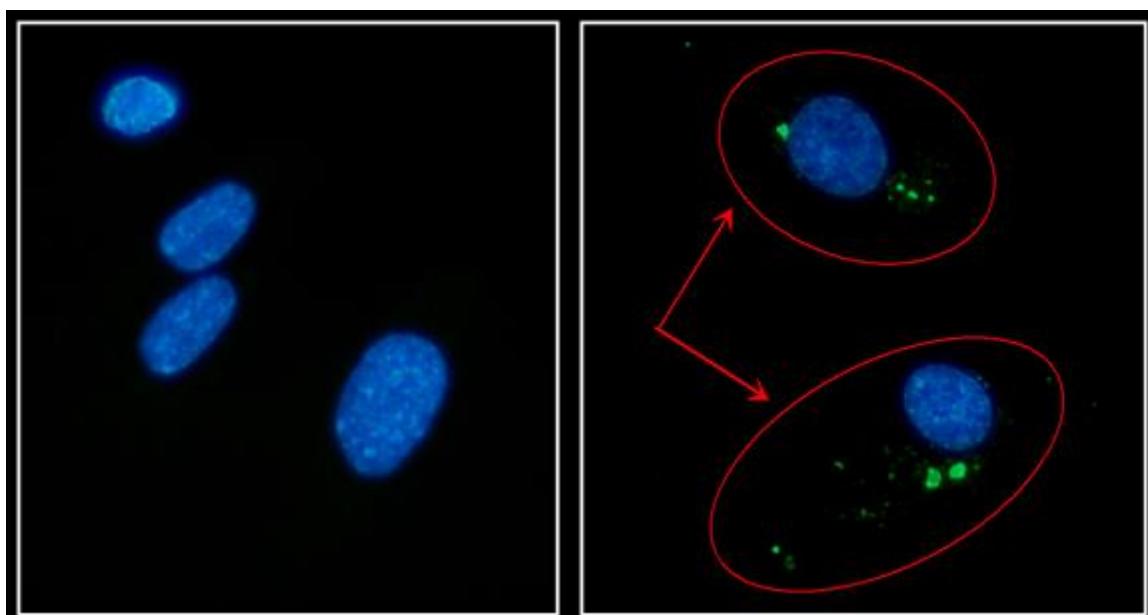
Slika 6 kot nadgradnja Slike 3 prikazuje potek eksperimentalnega dela z dodanimi rezultati pri posamezni metodi.



Slika 6: Potek eksperimentalnega dela z rezultati izolacije protiteles

4.2. VEZAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC

Vezavo moPt 231D na površino celic HCAEC smo najprej potrdili z indirektno imunofluorescenco, kasneje pa s pretočnim citometrom. Za določitev površinske vezave z indirektno imunofluorescenco smo celice 6 ur stimulirali z 2,8 mM CaCl₂, 20 mg/L protrombina in 20 mg/L moPt 231D. Površinsko vezavo smo določili s sekundarnimi protitelesi (kozja protitelesa usmerjena proti mišjim IgG), konjugiranimi s FITC. Celicam smo dodali še fluorescenčno barvilo DAPI, ki se veže na DNA in obarva jedra celic modro, prekrili pa smo jih z reagentom SlowFade, ki signale fluorescenčno označenih celic ohrani dlje časa. Protitelesa so se specifično vezala na površino HCAEC samo ob prisotnosti protrombina, medtem ko do vezave ni prišlo v odsotnosti protrombina (Slika 7).

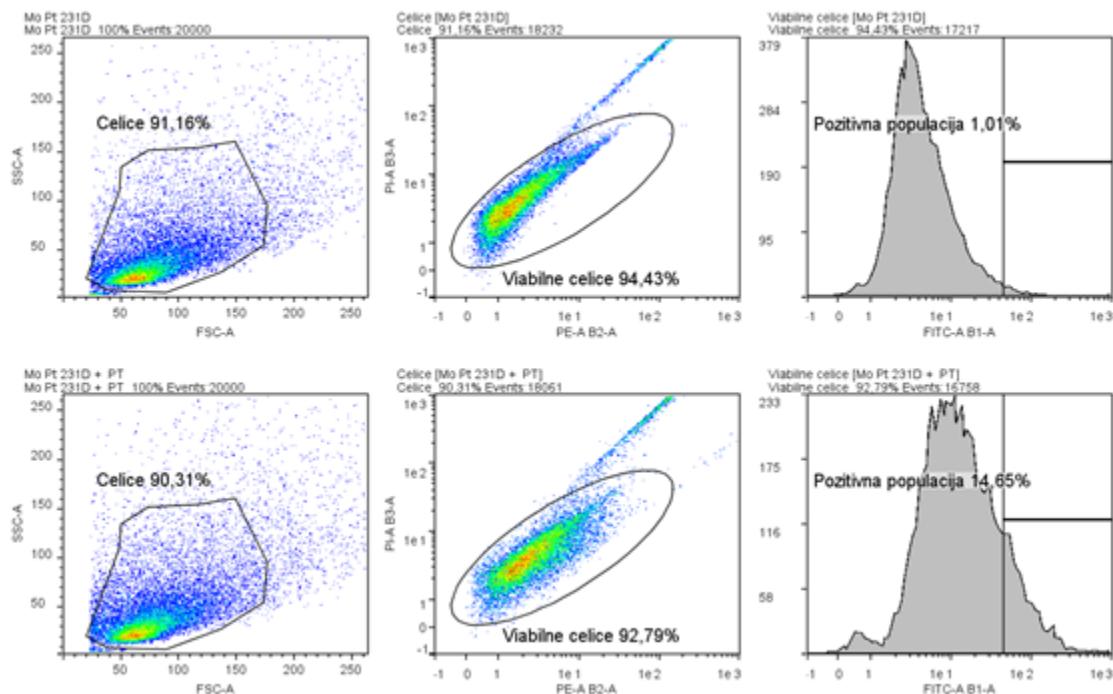


Slika 7: Celice inkubirane z moPt 231D brez prisotnosti protrombina (levo) in ob prisotnosti protrombina (desno). Vezava protiteles je določena s sekundarnimi protititelesi konjugiranimi z barvilm FITC, DNA v jedru pa s fluorescenčnim barvilm DAPI.

V nadaljevanju smo površinsko vezavo protiteles proti protrombinu kvantitativno potrdili še z merjenjem deleža vezave moPt 231D na pretočnem citometru. Celice smo 6 ur stimulirali z 2,8 mM CaCl₂ v prisotnosti in odsotnosti 20 mg/L protrombina in 20 mg/L moPt 231D, pri čemer smo povzeli pogoje, kot so bili objavljeni v studiji Oku in

sodelavcev (66). Površinsko vezavo smo določili s sekundarnimi protitelesi (kozja protitelesa, usmerjena proti mišjim IgG), konjugiranimi s FITC (Slika 8).

MoPt 231D se v odsotnosti protrombina niso vezala na površino celic (pozitivna populacija 1,01 %), medtem ko je 14,65 % celic vezalo moPt 231D ob prisotnosti protrombina.



Slika 8: Merjenje vezave protiteles proti protrombinu s pretočnim citometrom. Celice, inkubirane z moPt 231D brez prisotnosti protrombina (zgornja vrsta) in z moPt 231D ob prisotnosti protrombina (spodnja vrsta). V prvem stolpcu smo označili celice ustrezne velikosti glede na detektor sprednjega in stranskega sisanja. V drugem stolpcu smo označili viabilne celice glede na barvanje s propidijevim jodidom. Vezavo protiteles, določeno s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z barvilkom FITC, smo označili na histogramu v tretjem stolpcu.

V več naslednjih poskusih merjenja intenzitete površinske vezave protiteles na HCAEC s pretočnim citometrom smo spreminjali:

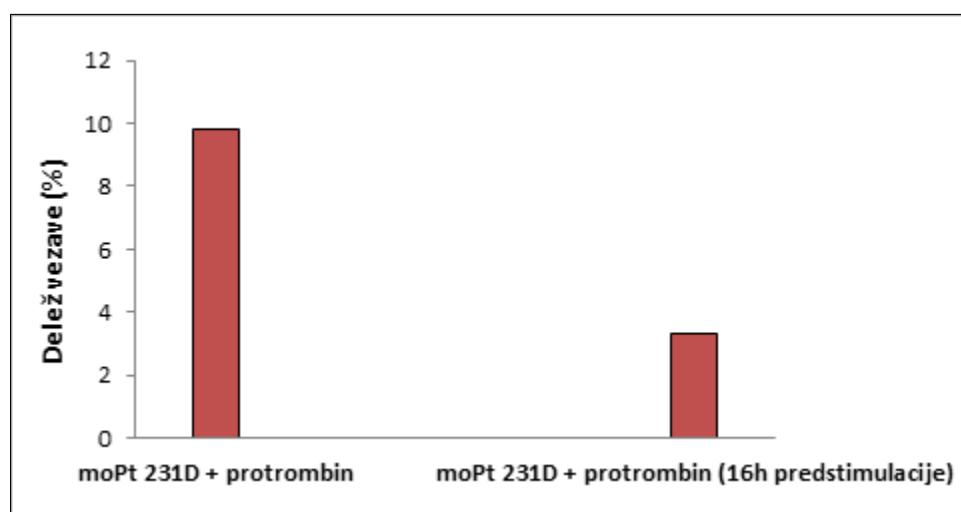
- čas izpostavitve HCAEC posameznim molekulam,
- koncentracijo SAA v vzorcu in
- koncentracijo sekundarnih protiteles pri barvanju celic.

Vezavo ozadja smo vsakokrat merili v vzorcu brez prisotnih protiteles (le celice in Ca^{2+}).

4.2.1. Pomen hkratne prisotnosti protrombina in protiteles

V obeh primerih smo celice inkubirali z 20 mg/L moPt 231D in protrombina ob prisotnosti 2,8 mM Ca²⁺ ter merili vezavo protiteles na površino celic. V prvem primeru smo Ca²⁺, protrombin ter moPt 231D inkubirali hkrati 16 ur. V drugem primeru pa smo celicam najprej dodali Ca²⁺ in protrombin, po 16-ih urah predstimulacije pa še moPt 231D in inkubirali vse skupaj še 2 uri.

Večjo vezavo moPt 231D na površino celic smo izmerili pri hkratni inkubaciji s Ca²⁺ in protrombinom (delež vezave 9,78 %) v primerjavi z zaporedno inkubacijo protrombina in protiteles (delež vezave 3,3 %) (Slika 9).



Slika 9: Vezava moPt 231D na površino HCAEC ob dodatku protrombina in Ca²⁺ hkrati s protitelesi ter dodatku protrombina in Ca²⁺ 16 ur pred dodatkom protiteles (predstimulacija).

4.2.2. Vpliv časa inkubacije na delež vezave moPt 231D

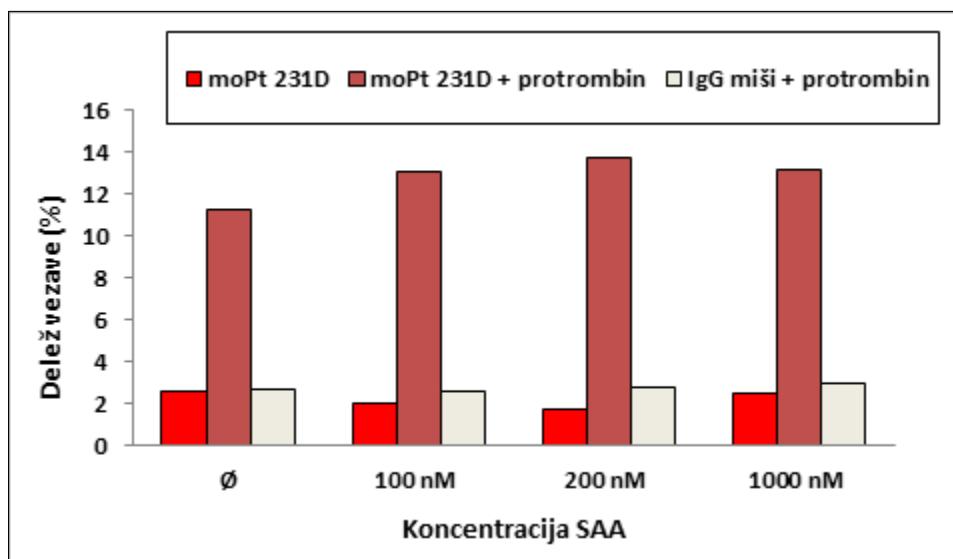
Celice smo v dveh ločenih poskusih (6 in 16 ur) inkubirali z 20 mg/L moPt 231D in protrombina ob prisotnosti 2,8 mM Ca²⁺ ter merili vezavo protiteles na površino celic. Večjo vezavo moPt 231D na površino celic smo dobili po 6-ih urah inkubacije, saj so se protitelesa vezala z 29 % deležem v primerjavi s 16 urami inkubacije, ko so se protitelesa na celice vezala le z 9,78 % deležem vezave (Preglednica II). Ker se je s podaljšanjem časa inkubacije vezava moPt 231D znižala, smo v vseh nadaljnjih poskusih celice inkubirali 6 ur.

Preglednica II: Vezava moPt 231D na površino HCAEC ob prisotnosti protrombina pri različnih časih inkubacije.

Čas inkubacije:	Delež vezave na celice:
6 ur	29,0 %
16 ur	9,78 %

4.2.3. Vpliv različnih koncentracij serumskega amiloida A

Celice HCAEC smo ob prisotnosti $2,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ inkubirali s protrombinom, moPt 231D ali s kontrolnimi IgG miši ob prisotnosti 0, 100, 200 in 1000 nM SAA in merili vezavo protiteles na površino celic. Koncentracija moPt 231D, IgG miši in protrombina je bila 20 mg/L. SAA je minimalno vplival na vezavo moPt 231D in še največjo razliko v vezavi smo zaznali pri 200 nM koncentraciji SAA (Slika 10).

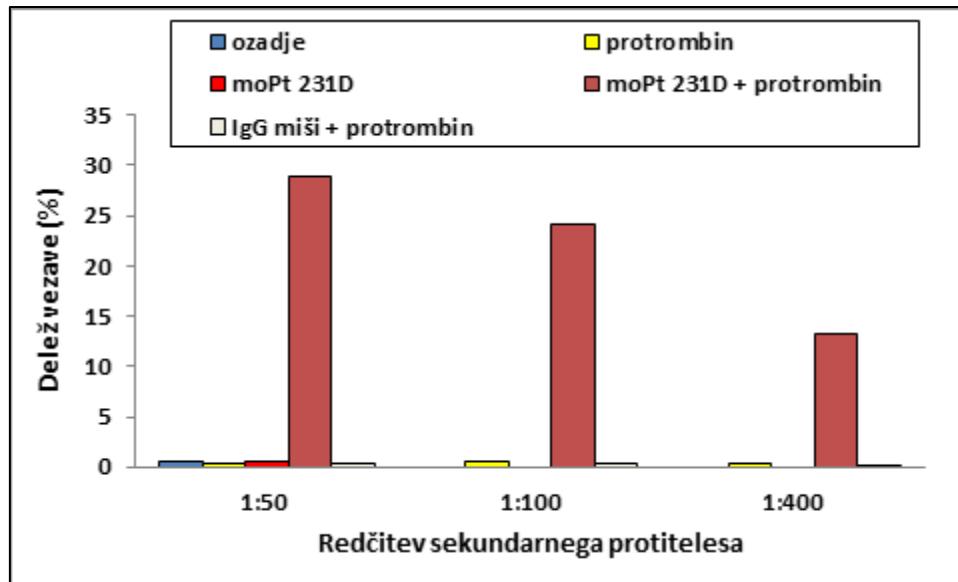


Slika 10: Vezava moPt 231D in IgG miši na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina. Celice so bile stimulirane z različnimi koncentracijami SAA (0, 100, 200 in 1000 nM).

4.2.4. Vpliv redčitve sekundarnega protitelesa

Celice HCAEC smo 6 ur inkubirali z 20 mg/L protrombina, moPt 231D ter IgG miši ob prisotnosti $2,8 \text{ mM Ca}^{2+}$. Vezavo protiteles na površino celic smo merili pri različnih redčitvah sekundarnega protitelesa, to je kozjih protiteles, usmerjenih proti mišjim IgG.

Testirali smo redčitve 1:50, 1:100 in 1:400. Največji delež vezave smo izmerili pri najvišji koncentraciji sekundarnega protitelesa – redčitev 1:50 (Slika 11). V vseh nadaljnjih poskusih smo sekundarno protitelo redčili 1:50.



Slika 11: Vezava moPt 231D in IgG miši na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina.

Testirali smo 3 različne redčitve sekundarnega protitelesa (1:50, 1:100 in 1:400).

4.3. VEZAVA POLIKLONSKIH PROTITELES PROTI PROTROMBINU NA POVRŠINO HCAEC

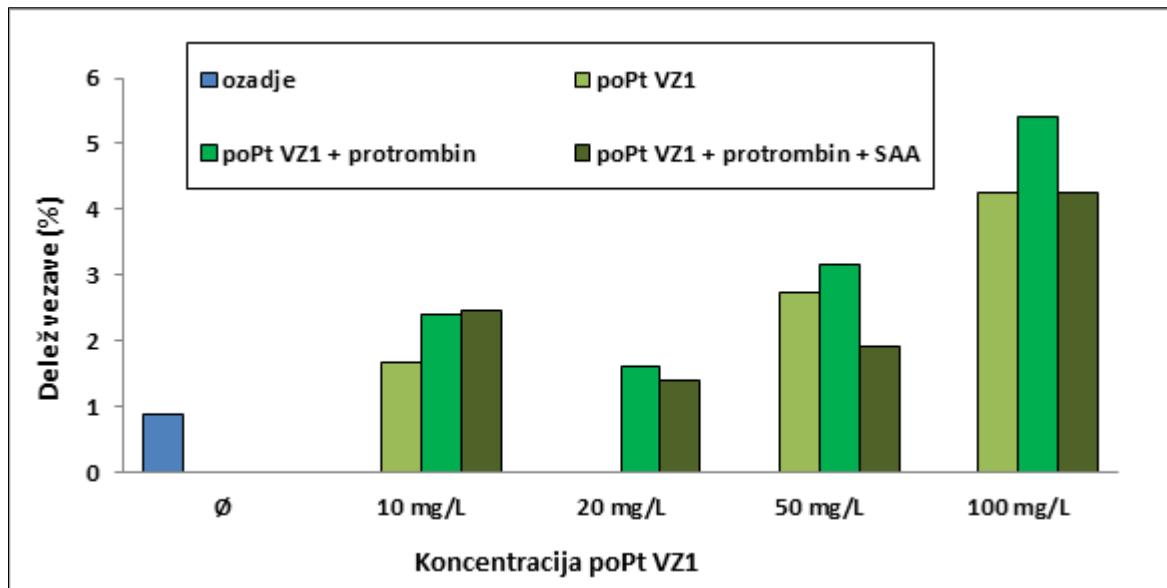
Vezavo poliklonskih protiteles proti protrombinu na površino celic smo merili s pretočnim citometrom. Pri stimulaciji HCAEC s poliklonskimi protitelesi smo najprej uporabili pogoje, določene s poskusi na monoklonskih protitelesih, kasneje pa smo v posameznih poskusih spreminali:

- koncentracijo izoliranih poliklonskih protiteles,
- koncentracijo protrombina in
- koncentracijo SAA v vzorcu.

Ugotavljali smo, kako dana sprememba vpliva na intenziteto vezave protiteles na površino HCAEC. Vezavo ozadja smo vsakokrat merili v vzorcu brez prisotnih protiteles (le celice in Ca^{2+}).

4.3.1. Vpliv različnih koncentracij poliklonskih protiteles proti protrombinu

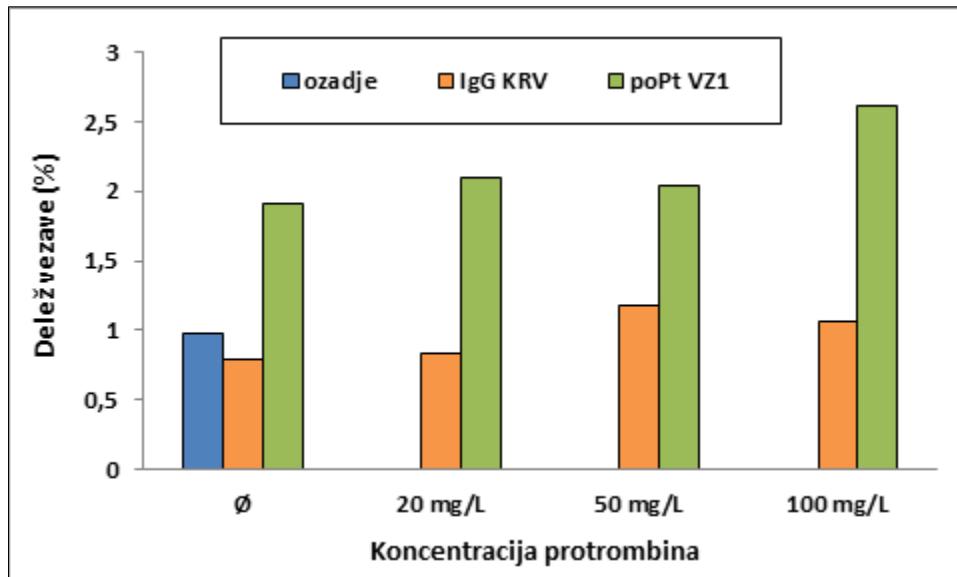
Celice smo ob prisotnosti $2,8\text{ mM Ca}^{2+}$ inkubirali z 200 nM SAA in 20 mg/L protrombina, pri različnih koncentracijah poPt VZ1 ($0, 10, 20, 50$ in 100 mg/L) ter merili vezavo protiteles na površino celic. Največjo vezavo poPt VZ1 na površino celic smo izmerili pri koncentraciji 100 mg/L (Slika 12). To koncentracijo smo uporabili tudi v nadalnjih poskusih.



Slika 12: Vezava poPt VZ1 na površino HCAEC ob prisotnosti/odsotnosti protrombina in SAA. Celice so bile inkubirane z različnimi koncentracijami poPt VZ1 ($0, 10, 20, 50$ in 100 mg/L).

4.3.2. Vpliv različnih koncentracij protrombina na vezavo poliklonskih protiteles na površino HCAEC

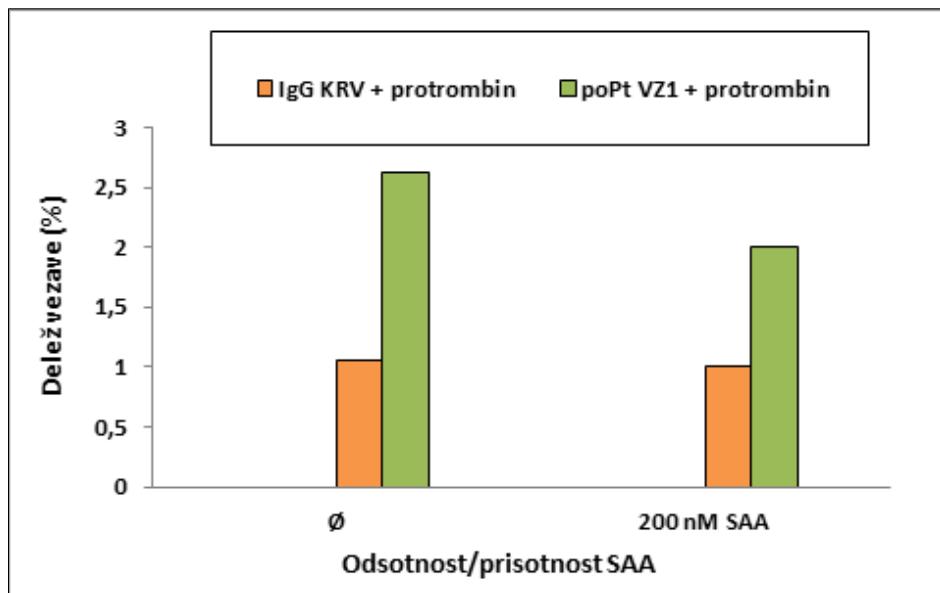
Celice smo inkubirali z $2,8\text{ mM Ca}^{2+}$ in 100 mg/L poPt VZ1 ali IgG KRV pri različnih koncentracijah protrombina in merili vezavo protiteles na površino celic. Testirali smo naslednje koncentracije protrombina: $0, 20, 50$ in 100 mg/L . Vezava poPt VZ1 na celice je bila največja pri koncentraciji protrombina 100 mg/L (Slika 13).



Slika 13: Vezava poPt VZ1 in IgG KRV na površino HCAEC ob odsotnosti/prisotnosti protrombina v različnih koncentracijah (0, 20, 50 in 100 mg/L).

4.3.3. Vpliv SAA na vezavo poliklonskih protiteles na površino HCAEC

Celice smo inkubirali z 2,8 mM Ca²⁺, protrombinom, poPt VZ1 ali IgG KRV v prisotnosti/odsotnosti 200 nM SAA in merili vezavo protiteles na površino celic. Koncentracija poPt VZ1, IgG KRV in dodanega protrombina je bila 100 mg/L. Pri koncentraciji 200 nM SAA smo izmerili nižjo vezavo poPt VZ1 na površino celic v primerjavi z vezavo brez dodanega SAA (Slika 14).



Slika 14: Vezava poPt VZ1 in IgG KRV na površino HCAEC ob odsotnosti/prisotnosti SAA.

4.4. TESTIRANJE SUPERNATANTOV NA IZLOČENE MOLEKULE IZ AKTIVIRANIH HCAEC

Po vsakem izvedenem poskusu na celicah smo celične supernatante zamrznili na -80 °C. Z namenom, da določimo vplive na izločene vnetne citokine, kemokine, adhezivne in druge molekule v celično okolje, smo s testom ELISA v njih določili koncentracijo IL-6, MIF in GRO α (Preglednica III) ter s testom za hkratno analizo več različnih analitov v vzorcu (Magnetic Luminex® Screening Assay) določili koncentracijo 23-ih različnih molekul (TNF- α , IL-8, MMP-1, hitinaza, VEGF, IL-1 β , IFN- γ , tenascin C, IL-31, IL-17A, IL-9, resistin, IL-5, VCAM-1, TNF R, IL-23, IL-18, IL-10, IL-27, IL-2, IL-13, mCSF in α -fetoprotein) (Preglednica IV).

Testirali smo supernatante pridobljene po 6-urni stimulaciji celic s protrombinom v koncentraciji 20 mg/L ter:

- moPt 231D v koncentraciji 20 mg/L ali
- IgG miši v koncentraciji 20 mg/L,

in s protrombinom v koncentraciji 100 mg/L ter:

- poPt VZ1 v koncentraciji 100 mg/L ali
- IgG KRV v koncentraciji 100 mg/L.

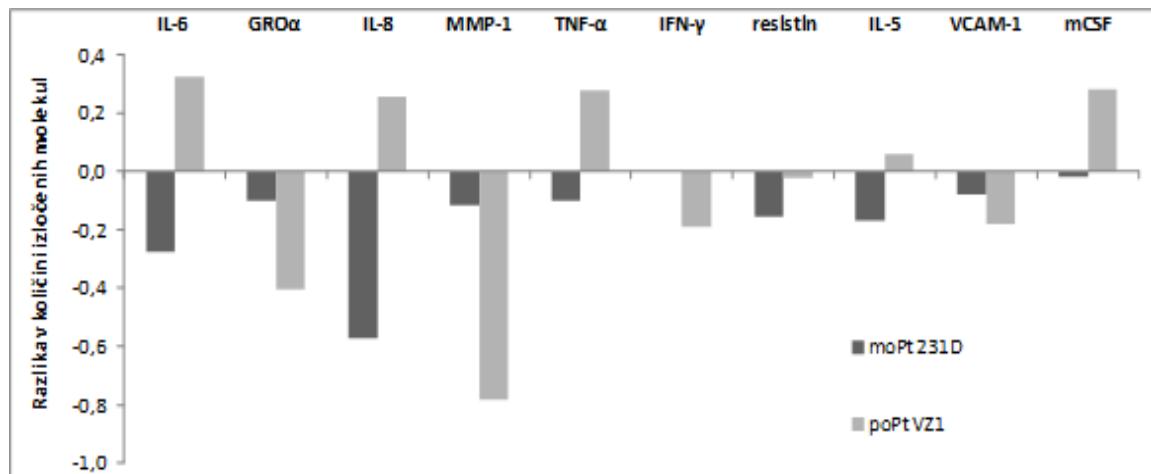
Preglednica III: Koncentracije izločenih IL-6, GRO α in MIF pri celicah, stimuliranih z moPt 231D, IgG miši, poPt VZ1 in IgG KRV ob sočasni prisotnosti protrombina.

	protrombin [20 mg/L]		protrombin [100 mg/L]	
	moPt 231D [20 mg/L]	IgG miši [20 mg/L]	poPt VZ1 [100 mg/L]	IgG KRV [100 mg/L]
IL-6 [pg/mL]	60	83	45	34
GROα [pg/mL]	160	178	144	242
MIF [ng/mL]	23	22	22	20

Preglednica IV: Koncentracije izločenih citokinov in kemokinov pri celicah, stimuliranih z moPt 231D, IgG miši, poPt VZ1 in IgG KRV ob sočasni prisotnosti protrombina. Rezultati so podani v mediani fluorescence.

	protrombin [20 mg/L]		protrombin [100 mg/L]	
	moPt 231D [20 mg/L]	IgG miši [20 mg/L]	poPt VZ1 [100 mg/L]	IgG KRV [100 mg/L]
IL-8	583	1369	772	614
MMP-1	5129	5798	916	4233
VEGF	71	68	81	81
TNF-α	23	26	30	24
hitinaza	15	15	11	12
IL-1β	24	25	24	23
IFN-γ	17	17	17	21
tenascin C	21	22	22	25
IL-31	41	41	41	38
IL-17A	17	19	21	20
IL-9	32	31	30	29
resistin	22	26	24	25
IL-5	10	12	9	89
VCAM-1	18	20	18	22
TNF R	80	78	81	76
IL-23	57	65	59	57
IL-18	29	30	29	29
IL-10	39	43	44	43
IL-27	25	24	24	24
IL-2	94	93	94	91
IL-13	16	17	16	16
mCSF	49	50	79	62
α-fetoprotein	26	26	23	23

Na Sliki 15 so prikazani rezultati za tiste analite, pri katerih smo zaznali pomembno spremenjene vrednosti izločenih molekul po stimulaciji s protitelesi (moPt 231D ali poPt VZ1) v primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi pri celicah, stimuliranih s kontrolnimi protitelesi (IgG miši ali IgG KRV).



Slika 15: Razlika v količini izločenih molekul po stimulaciji HCAEC z moPt 231D v primerjavi z IgG miši in po stimulaciji HCAEC s poPt VZ1 v primerjavi z IgG KRV.

Prisotnost moPt 231D je vplivala na zmanjšano izločanje IL-6, GRO α , IL-8, MMP-1, TNF- α , resistina, IL-5 in VCAM-1 v celično okolje v primerjavi z IgG miši. Prisotnost poPt VZ1 je vplivala na zmanjšano izločanje GRO α , MMP-1, IFN- γ in VCAM-1 v celično okolje v primerjavi z IgG KRV ter povečano izločanje IL-6, IL-8, TNF- α , IL-5 in mCSF.

5 RAZPRAVA

5.1. Izolacija protiteles proti protrombinu in njihovo določanje z imunsko metodo na trdnem nosilcu (test ELISA)

V našem raziskovalnem delu smo se izmed vseh aPL osredotočili na protiteesa proti protrombinu, natančneje aPS/PT, in na njihov vpliv na endotelijske celice. S tem namenom smo protiteesa najprej izolirali iz seruma bolnika s postavljeno diagnozo APS in SLE, ki je imel prisotna tudi druga aPL, med drugim tudi protiteesa proti kardiolipinu in protiteesa proti β_2 glikoproteinu I.

Pred izolacijo protiteles proti protrombinu smo v serumu vzorca poPt VZ1 določili avidnost protiteles s testom kaotropna aPS/PT ELISA. Pri 500 mM NaCl smo izmerili 77 % vezave pri fizioloških pogojih (136 mM NaCl), kar je pomenilo, da serum vsebuje predvsem visoko avidna aPS/PT. Ta podatek nam je pomagal pri kasnejši izolaciji, saj smo na podlagi tega vedeli, da se bodo protiteesa iz kolone izpirala predvsem z bolj kislim in molarnim pufrom za visoko avidna protiteesa (4 M NaCl 0,1 M glicin 0,1 % Tween 20 pH 2,5).

Protiteesa smo izolirali v dveh korakih. Najprej smo izolirali frakcije IgG, s čimer smo se znebili vseh preostalih protiteles in drugih motečih snovi/proteinov, ki bi morda lahko prispevali k nespecifični vezavi na celice. Odstranili smo tudi β_2 glikoprotein I in protrombin, ki sta v serumu normalno prisotna. V drugem delu smo na koloni z vezanim protrombinom specifično izolirali le protiteesa proti protrombinu, ostala aPL pa so se sprala iz kolone. Končnemu izolatu za uporabo na celicah (poPt VZ1) smo določili IgG aPS/PT=37 AUG in koncentracijo 1,43 g/L v volumnu 1,5 mL, kar predstavlja približno 2,145 mg protiteles proti protrombinu in 13,70 % izkoristek glede na izhodiščno količino izoliranih protiteles IgG. Z izolacijo pa nismo izolirali le aPS/PT, ampak vsa protiteesa proti protrombinu, ker je bil na agarozo v koloni vezan sam protrombin in ne protrombin v kompleksu s fosfatidilserinom. Izolirana protiteesa so se kasneje vezala v testu aPS/PT ELISA in izpirek ni več vseboval protiteles aPS/PT (negativen v testu aPS/PT ELISA). Lahko trdimo, da smo uspeli vezati večino protiteles aPS/PT, ki jih ta serum vsebuje.

Izolat poPt VZ1 je vseboval poliklonska protiteesa proti protrombinu, ki nastajajo pri zrelem imunskem odzivu iz različnih klonov limfocitov B, so usmerjena proti različnim

epitopom na antigenu, imajo različno specifičnost in afiniteto za antigen. Monoklonska protitelesa, kot so moPt 231D, pa so pridobljena iz enega samega klena limfocita B, prepozna le en specifičen epitop in jih *in vitro* lahko pridobivamo v neomejenih količinah, kar je njihova velika prednost (74, 80). V nasprotju pa poliklonska protitelesa, izolirana iz bioloških vzorcev, pridobimo v omejenih količinah s časovno zamudnim postopkom.

Pri proučevanju mehanizmov delovanja aPL se zaradi omenjenih razlogov velikokrat uporablajo monoklonska protitelesa kot približek patogenemu delovanju poliklonskih protiteles v organizmu, saj je slednje težko prečistiti (52, 53, 57, 81, 82).

V študijah za tretiranje celic uporablajo tudi serum bolnikov z aPL (53) ali pa iz seruma izolirane frakcije IgG (44, 56, 62, 81, 83, 84), ki vključujejo tako IgG, usmerjene proti raznolikim antigenom, kot tudi vse podskupine patogenih IgG aPL. V teh primerih je določitev specifičnih učinkov aPL zaradi prisotnosti drugih protiteles lahko spregledana. Prav tako pa se ne more točno opredeliti, katera izmed prisotnih aPL so odgovorna za učinke na celicah.

V literaturni ni objavljenih celičnih študij s prečiščenimi poliklonskimi protitelesi proti protrombinu, patogeni mehanizmi teh avtoprotiteles so predstavljeni le s poskusi ob uporabi monoklonskih protiteles ali IgG frakcije bolnika z APS (23, 66, 85). Zato smo v magistrski nalogi izolirali poliklonska protitelesa proti protrombinu iz seruma bolnika z vensko trombozo, s čimer smo poskrbeli, da smo v nadaljevanju vrednotili le vpliv protiteles proti protrombinu na HCAEC.

Pred poskusi na celicah smo preverili čistost izolata poPt VZ1, in sicer z reducirajočo SDS PAGE. Zanimalo nas je, ali so morebiti prisotne kakšne nečistote, ki bi lahko motile poskuse na celicah. Ker sta glede na označevalec molekulske mase vidni le lisi pri 50 in 25 kDa, to potruje, da izolat poPt VZ1 nima dodanih primesi. Vsa protitelesa zaradi reducirajočih pogojev pri tej metodi razpadejo na lahko in težko verigo, to je 25 in 50 kDa.

V vsaki stopnji izolacije protiteles proti protrombinu smo s testom aPS/PT ELISA preverjali koncentracijo le teh tako v izolatih kot tudi izpirkih. Test aPS/PT ELISA, ki ga je prvi opisal Atsumi s sodelavci (23) in modificirala Žigon s sodelavci (78) dobro posnema fiziološko stanje v telesu s prisotnimi Ca^{2+} in fosfatidilserinom.

5.2. Delo s celičnimi kulturami

Ključno vlogo pri razvoju tromboz pri APS imajo poleg vnetja in humoralnih komponent tudi endotelijske celice (37). Na živalskih modelih so pokazali, da človeška poliklonska in monoklonska aPL aktivirajo endotelij in spodbujajo tvorbo strdka *in vivo* (44, 45). Eden izmed predlaganih učinkov protiteles proti protrombinu na endotelijske celice je prepoznavna kompleksa protrombina z anionskimi fosfolipidi na membrani endotelijskih celic in aktivacija celic, da sprostijo prokoagulantne molekule (41).

Ker endotelijske celice neposredno sodelujejo v kaskadni reakciji strjevanja krvi (12), se pričakuje, da se bodo protitelesa, ki povzročajo tromboze, nanje vezala intenzivneje, kot bi se na druge celične linije. Kot model proučevanja *ex vivo* je smiselno uporabiti celične kulture, ki ustrezajo mestu nastanka in razvoja bolezni v telesu, kot so to endotelijske celice koronarne arterije (HCAEC). Pri bolnikih z APS se zapleti namreč pojavljajo tudi v arterijah in ti bolniki imajo večje tveganje za razvoj ateroskleroze (29). Za razliko od našega eksperimentalnega dela na HCAEC so, glede na dostopne podatke v literaturi, največ poskusov z aPL naredili na človeških endotelijskih celicah umbilikalne vene (HUVEC) (44, 53, 57, 62, 81-84), ki niso prisotne pri odraslih in so kot take neprimeren model za študije vnetja in strjevanja krvi v endoteliju (70, 86). Lakota in sodelavci pa so predpostavljali, da imajo HCAEC in HUVEC različne vzorce izražanja molekul, kar naj bi vodilo do drugačnih vnetnih odgovorov. Pokazali so, da so HCAEC bolj odzivne na vnetne dražljaje in kažejo večjo nagnjenost k vnetju ter potencialnemu razvoju ateroskleroze (58). Med različnimi vrstami endotelijskih celic namreč obstajajo fenotipske variacije, tudi med arterijskimi in venskimi, zato te celice izražajo različne markerje in se drugače odzovejo na isti dražljaj (69).

Celično linijo HCAEC smo inkubirali s protrombinom in protitelesi proti protrombinu (moPt 231D ali poPt VZ1) v prisotnosti 2,8 mM Ca²⁺. Višje koncentracije Ca²⁺ od fizioloških (2,2-2,6 mM) smo uporabili kot primarni sprožilec, ki naj bi aktiviral celice preko izpostavitve fosfatidilserina na zunanj stran celične membrane, s čimer bi bila omogočena vezava protrombina na fosfatidilserin in vezava protiteles proti protrombinu na nastale komplekse. Nespecifični transportni encimi skramblaze, ki regulirajo dvosmerno mešanje membranskih fosfolipidov, se namreč aktivirajo v prisotnosti Ca²⁺, kar privede

fosfatidilserin na površino celic (50), kjer lahko reagira s faktorji strjevanja krvi, spodbuja nastajanje trombina in privede do strjevanja krvi (51).

5.3. Vezava monoklonskih protiteles proti protrombinu na površino HCAEC

V začetnih poskusih na celični liniji HCAEC smo spreminjali pogoje in preverjali vplive različnih dejavnikov na vezavo moPt 231D na površino celic. IgG miši, izolirana iz zdrave miši, smo uporabili kot negativno kontrolo. Vezavo ozadja smo vsakokrat merili v vzorcu brez prisotnih protiteles (le celice in Ca^{2+}). Celice smo po tretiranju in kolekciji inkubirali s sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s FITC.

Vezavo moPt 231D na površino celic HCAEC smo najprej potrdili z indirektno imunofluorescenco, kasneje pa s pretočno citometrijo. Pri indirektni imunofluorescenci smo uporabili modro fluorescentno barvilo DAPI, ki se veže na dvooverižno DNA in obarva jedra celic modro. Na ta način smo vsako celico tudi locirali. Pri celicah, tretiranih samo z moPt 231D brez dodanega protrombina, so se obarvala modro le jedra celic, sama membrana celic pa ne, saj se moPt 231D ni vezalo na membrane celic. Pri celicah tretiranih z moPt 231D in protrombinom, pa so se moPt 231D specifično vezala na protrombin na površini HCAEC. V tem primeru smo poleg modro obarvanih jader videli tudi fluorescentno zeleno obarvano področje celice, kjer so se na membrano vezala moPt 231D (Slika 7). S tem poskusom smo potrdili, da se moPt 231D vežejo na endotelijalne celice le v prisotnosti protrombina in da gre za specifično vezavo. Nespecifično (npr. preko Fc predela) se moPt 231D na celice ne vežejo, kar je razvidno tudi iz Slike 8. V prihodnje bi bilo smiselno celice diferencialno obarvati tako z jedrnim kot tudi s citoplazemskim barvilom, s katerim bi bolje predstavili mesto vezave protiteles proti protrombinu na HCAEC, prav tako bi bilo vezavo na takšen način dobro pokazati tudi za poPt VZ1.

Vezavo protiteles na površino celic smo v nadaljevanju kvantitativno vrednotili z meritvami na pretočnem citometru. Ta je vzorce po prej nastavljenem avtomatiziranem postopku barval s propidijevim jodidom. Gre za fluorescentno barvilo, ki se vgradi v dvooverižne nukleinske kisline. Ker lahko prehaja le celične membrane mrtvih celic, je bila s tem omogočena kasnejša izločitev mrtvih celic (66). V prihodnje bi bilo smiselno vzorce

barvati še z Annexin V, kot so to naredili v nekaterih drugih študijah (62). Ta protein se veže na fosfatidilserin, ko je ta izpostavljen na površini celic v primeru aktivacije, apoptoze, nekroze, degranulacije in diferenciacije celic (66). S kombinacijo obeh barvil bi tako identificirali ločeno populacijo že mrtvih in populacijo apoptočnih celic in preverili vezavo protiteles na njihovo površino.

Po vsaki meritvi na pretočnem citometru smo z računalniškim programom izvedli analizo rezultatov. Pri tem smo v vsaki analizi po enakem postopku označili populacijo celic, kjer smo ocenili delež vezave na površino. V prvem koraku vsake analize smo izbrali primerno populacijo celic glede na njihovo velikost in granuliranost za nadaljnjo obdelavo, kar smo prikazali kot primer ene od analiz na Sliki 8, prvi stolpec. V naslednjem koraku smo glede na barvanje s propidijevim jodidom iz analize izločili populacijo mrtvih celic (Slika 8, drugi stolpec). V tretjem koraku smo označili delež vezave protiteles na celice. MoPt 231D se v odsotnosti protrombina niso vezala na površino celic (pozitivna populacija 1,01 %), medtem ko je 14,65 % celic vezalo moPt 231D ob prisotnosti protrombina, s čimer smo potrdili predhodne ugotovitve, prikazane z indirektno imunofluorescenco.

V enem izmed poskusov smo hoteli preveriti, ali bodo celice zaradi daljše izpostavljenosti Ca^{2+} in protrombinu na svoji površini izpostavile več fosfatidilserina, s čimer bi se povečala količina vezanega protrombina na fosfatidilserin in posledično bi se na protrombin vezalo tudi več protiteles. V primeru 16-urne predstimulacije celic s Ca^{2+} in protrombinom smo dobili skoraj $3\times$ nižjo vezavo moPt 231D na celice kot v primeru, ko smo Ca^{2+} , protrombin in moPt 231D celicam dodali hkrati (Slika 9). To bi si lahko razlagali s tem, da so celice po nekem času aktiviranega stanja ponovno vzpostavile fiziološko stanje z normalno integriteto membrane, saj smo jim za rast zagotovili fiziološke pogoje ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % atmosfera CO_2 in 100 % relativna vlažnost). S tem so se izpostavljene molekule fosfatidilserina po določenem času premaknile nazaj na notranjo stran celične membrane in onemogočena je bila vezava protiteles preko protrombina na površino celic. Sklepamo, da je za vezavo na celice boljša hkratna prisotnost protrombina in protiteles v celični suspenziji. Zanimivo je, da so enako pokazali tudi Žigon in sodelavci v poskusih *in vitro* s testom aPS/PT ELISA, kjer so z modifikacijo metode, ki je pomenila hkratno inkubacijo protiteles in protrombina, povečali analitsko občutljivost metode (78). Iz tega lahko sklepamo, da protitelesa, ki so v reakcijski mešanici prisotna hkrati s protrombinom

povečajo vezavo protrombina na fosfolipidne površine, kar posledično omogoči večjo vezavo protiteles.

Ko smo ugotovili, da je za vezavo na celice boljša hkratna prisotnost protrombina in protiteles v celični suspenziji, nas je zanimalo, kakšna je časovno optimalna inkubacija. Pri testiranju vpliva časa inkubacije na delež vezave moPt 231D na površino celic se je kot bolj optimalna izkazala krajša, 6-urna inkubacija, s skoraj $3\times$ večjim deležem vezave protiteles na celice v primerjavi z daljšo, 16-urno inkubacijo (Preglednica II). Kljub sklepanju, da bi bila daljša inkubacija boljša za merjenje celičnega odziva na proteinskem nivoju, smo vse nadaljnje poskuse izvajali pri 6-ih urah inkubacije, tako kot so to naredili tudi nekateri drugi raziskovalci (62, 81). Pri poskusu smo se opirali na rezultate, ki so jih prej dobili že Žigon in sodelavci, ki so optimalno vezavo moPt 231D na površino celic dobili pri 3-4-ih urah inkubacije, ravno tako pa se je tudi pri njih vezava nižala z daljšanjem časa inkubacije (87). V drugih študijah so celice večinoma inkubirali 4 ure (44, 57, 83, 84), ampak so uporabili frakcije IgG ter monoklonska protitelesa proti protrombinu, ne pa poliklonska protitelesa proti protrombinu. V študiji Chen in sodelavcev (53) so se njihova monoklonska protitelesa proti β_2 glikoproteinu I na endotelijalne celice vezala le prvih nekaj ur po aktivaciji celic, kar bi lahko trdili tudi za naše poskuse.

Celice smo poleg dodatka 2,8 mM Ca^{2+} poskusili dodatno aktivirati še z dodatkom SAA. Tem je bil naš namen poustvariti okolje v žilni steni, kjer je že prisoten vnetni proces, saj je SAA protein akutne faze, katerega koncentracija se poviša pri vnetju (12). Še dodatno aktivirane endotelijalne celice naj bi izpostavile še več fosfatidilserina s posledično večjo vezavo protiteles proti protrombinu na celice, spodbujeno pa naj bi bilo tudi izločanje citokinov in kemokinov iz celic. HCAEC naj bi se pod vplivom SAA odzivale močno vnetno in prokoagulacijsko z izločanjem IL-6, IL-8 (58) in tkivnega faktorja (65) v primerjavi z drugimi endotelijalnimi celicami, kot so npr. HUVEC (59). Na vpliv SAA na HCAEC lahko sklepamo tudi na podlagi rezultatov študije Lakota in sodelavcev (59), kjer je dodatek 1000 nM SAA sprožil izločanje GROα, IL-6, IL-8, adhezijskih in drugih molekul iz HCAEC. Isti raziskovalci pa so že prej ugotovili, da SAA lahko spodbudi lastno sintezo pri HCAEC (58).

V nasprotju z našimi pričakovanji je dodatek SAA le minimalno povečal vezavo moPt 231D na površino celic. Med fiziološkimi in patološkimi koncentracijami SAA skoraj ni

bilo razlik. Trdimo lahko, da SAA bistveno ne poveča vezave moPt 231D na celice, ki jo dosežemo že z dodatkom Ca²⁺. Še največjo razliko v vezavi smo zaznali pri 200 nM koncentraciji SAA, ki smo jo uporabili tudi v nadalnjih poskusih. IgG miši kot negativna kontrola in moPt 231D brez protrombina so se na površino celic le minimalno vezala. V nadaljnjih študijah bi bilo smiselno HCAEC predstimulirati s SAA, nato dodati protrombin ter moPt 231D in morda bi v tem primeru določili večjo vezavo.

V drugih študijah so z namenom aktivacije celic uporabili dodatek bakterijskega lipopolisaharida (44, 57) kot kofaktorja, ki naj bi v prisotnosti aPL spodbudil tvorbo strdkov. To molekulo so uporabili, ker se pogosto pojavlja pri pacientih z APS in sama po sebi ne more sprožiti strjevanja krvi. Podobne učinke lahko dosežemo tudi z drugimi vnetnimi posredniki, ki aktivirajo endotelijske celice, trombocite in levkocite (56). Pierangelli in sodelavci so lipopolisaharid uporabili kot pozitivno kontrolo za povečanje površinskega izražanja adhezivnih molekul na celicah HUVEC (36). Znano je namreč, da lahko lipopolisaharid sproži aktivacijo endotelijskih celic s povečanjem izločanja citokinov in adhezijskih molekul.

Pri nekaterih drugih študijah so celice spodbujali z interlevkinom 1β (88), TNF-α (81) in z aktiviranim proteinom C (89). V različnih študijah, kjer so uporabili različne molekule za aktivacijo celic, so proučevali vplive teh molekul na izločanje citokinov in kemokinov iz HCAEC. Pokazali so se edinstveni vzorci izločanja molekul (88), kar pomeni, da je tudi od vrste stimulatorne molekule odvisno, kateri citokini in kemokini se bodo izločali iz celic.

5.4. Vezava poliklonskih protiteles proti protrombinu na površino HCAEC

Ko smo na moPt 231D vzpostavili optimalne pogoje vezave, smo vezavo na površino HCAEC izmerili še na poPt VZ1. Testirali smo različne koncentracije protiteles, protrombina in vpliv SAA na vezavo. Nasprotno smo pri poPt VZ1 dobili bistveno nižje vezave protiteles na površino celic (do 6 %) v primerjavi z vezavo moPt 231D (do 30 %). Verjeten razlog je ta, da je koncentracija specifičnih protiteles proti protrombinu v poPt VZ1 znatno nižja kot pri moPt 231D, pa tudi razlika v avidnosti med monoklonskimi in poliklonskimi protitelesi je lahko razlog za razlike v deležu vezave.

Izmerili smo tudi dokaj visoko nespecifično vezavo poPt VZ1 na površino celic v odsotnosti protrombina. Ta poliklonska protitelesa lahko namreč prepoznajo različne epitope na protrombinu, poleg tega morda prepoznajo ter navzkrižno reagirajo tudi z drugimi strukturami na membrani celic. Nespecifično vezavo bi lahko v nadaljinih poskusih nekoliko znižali z dodatkom blokirnega reagenta Fc, ki bi preprečil, da bi se ta protitelesa s svojim predelom Fc vezala na receptorje Fc na površini celic.

Pri poPt VZ1 smo najprej hoteli določiti koncentracijo protiteles, pri kateri bi dobili največjo vezavo na celice. Pričakovali smo, da bomo pri višjih koncentracijah dodanih poPt VZ1 dobili večjo vezavo na celice. Kot najbolj optimalna se je izkazala koncentracija 100 mg/L, ki smo jo uporabili tudi v kasnejših poskusih (Slika 12). Pri še višji koncentraciji 200 mg/L je bila vezava na celice nižja (rezultati niso prikazani). Vendar pa to velja le za našega specifičnega bolnika. Pri vsakem posameznem bolniku bi pri njegovih izoliranih poliklonskih protitelesih lahko določili drugačno koncentracijo, ki bi dala največjo vezavo na celice. Zanimivo bi bilo narediti študijo z večjim številom bolnikov, kjer bi pri vsakem določili optimalno koncentracijo protiteles, ki bi dala največjo vezavo na celice, s čimer bi dobili vpogled, v kakšnem območju so te koncentracije.

V nadaljevanju nas je zanimalo, pri kateri koncentraciji dodanega protrombina bomo dobili največjo vezavo na celice. To se je zgodilo pri najvišji koncentraciji dodanega protrombina, to je 100 mg/L, pri kateri sta se koncentraciji dodanih protiteles in protrombina izenačili (Slika 13). Rezultati so smiselní, saj za više koncentracije protiteles potrebujemo tudi več protrombina, da imajo protitelesa dovolj antiga na vezavo. Zanimivo bi bilo izmeriti še vezavo pri koncentraciji protrombina 200 mg/L zaradi predvidene bivalentne vezave, kjer molekula protitelesa veže antogene z obema vezavnima mestoma. Fosfatidilserin namreč predstavlja površino, na kateri se protrombin lahko nakopiči z večjo gostoto, tako da oba paratopa na molekulah protitelesa vežeta antogene. V tem primeru se protitelesa na antigen vežejo bivalentno in z visoko avidnostjo (52, 74). Kljub nizkim deležem vezave poPt VZ1 na površino HCAEC, se je pri različnih koncentracijah protrombina pokazala razlika v vezavi v primerjavi z negativno kontrolo IgG KRV.

Tako kot pri moPt 231D smo tudi pri poPt VZ1 žeeli preveriti vpliv SAA na vezavo na površino celic. V primeru dodatka 200 nM SAA smo izmerili nižjo vezavo poPt VZ1 na površino celic kot brez SAA, na vezavo IgG KRV pa dodatek SAA skoraj ni imel vpliva. Tudi v primeru poPt VZ1 lahko trdimo, da SAA ne poveča vezave na celice, ki jo dosežemo že z dodatkom Ca^{2+} . Glede vplivov SAA lahko zaključimo, da je to močan aktivator, ki vpliva na povečano izločanje vnetnih, prokoagulacijskih in drugih molekul iz HCAEC (58, 59, 65), vendar ne vpliva na večjo vezavo protiteles proti protrombinu na površino celic.

5.5. Testiranje supernatantov na izločene molekule iz aktiviranih celic

S svojimi protrombotičnimi lastnostmi aPL sprožijo prokoagulantno stanje, ki prispeva k trombotičnim manifestacijam APS, ki se zgodijo tudi v koronarnih in karotidnih arterijah. Zaradi tega so začeli raziskovati, ali so aPL povezana z aterosklerozo (30), kar je raziskovalcem uspelo pokazati na živalskih modelih (90). Prisotnost aPL je ena izmed razlag za pospešeno aterosklerozo pri vnetnih sindromih APS in SLE (30), pri katerih je bila potrjena tudi aterogena vloga vnetja (91). Za ateroskleroizo je bilo najprej mišljeno, da je predvsem degenerativna bolezen, a so potem ugotovili, da je njena patogeneza predvsem vnetna in zdaj velja za kronično vnetno bolezen (92), ki vodi v koronarno arterijsko bolezen (93).

Aktivacija endotelijskih celic z aPL in vnetna poškodba žilne stene pri sistemskih avtoimunskih boleznih, kot je APS, lahko vodi v disfukcijo endotelija (42), kar je zgodnji dogodek ateroskleroze v arterijski intimi (12) in spodbuja izločanje citokinov in kemokinov, odgovornih za aktivacijo levkocitov (43). Izločeni vnetni in protivnetni citokini sodelujejo pri vnetnem procesu, ki ima pomembno vlogo tako pri sprožitvi kot pri napredovanju ateroskleroze (92, 94). Vedno več je dokazov, da je vnetje ne le osnova za prihodnje aterosklerotične dogodke, ampak je tudi nujno za tvorbo koronarnih plakov, kar vodi v trombozo (88).

Velja, da je imunski odziv Th 1 in njegovi posredniki (med drugim tudi TNF- α) vneten in spodbuja aterogenezo, medtem ko citokini tipa Th 2, kot je IL-5, delujejo predvsem zaščitno (95). Obstajalo pa naj bi ravnotežje med vnetnimi in protivnetnimi citokini, kar

naj bi bilo ključno za razvoj aterosklerotične lehe (96). Študije so pokazale, da imajo povišani nivoji nekaterih vnetnih posrednikov napovedno vrednost za prihodnje koronarne žilne dogodke. To so pokazali za adhezijske molekule, akutno-fazne reaktante kot je SAA in vnetne citokine (tudi IL-6 in TNF- α) (94).

Da imajo protitelesa proti protrombinu prokoagulantno vlogo in da vplivajo na povečano izražanje tkivnega faktorja, je že bilo pokazano v predhodni študiji Oku in sodelavcev (66). V magistrski nalogi smo preverili vpliv protiteles proti protrombinu še na druge molekule, ki bi lahko potrdile njihovo posredno vlogo pri aterosklerozi, vendar so bili nivoji izločenih molekul precej nizki. Celice so bile namreč stimulirane krajši čas (le 6 ur), kar je bilo ugodno z vidika merjenja površinske vezave, ne pa tudi izražanja proteinov. Z namenom merjenja celičnega odziva na proteinskem nivoju bi bilo smiselno inkubacijo podaljšati na 16 ur ali več, s čimer bi mogoče izmerili bolj povišane nivoje citokinov in kemokinov. Molekule, ki so se pri poPt VZ1 povečano izločale v primerjavi z IgG KRV, so bile IL-8, IL-6, TNF- α , mCSF in IL-5.

Kemokin IL-8 je kemotaktični dejavnik, ki v primeru ateroskleroze poveča prehajanje levkocitov v intimo arterijske stene, ki je ključno mesto za začetek omenjene bolezni (12, 74). Povišani nivoji IL-8 so povezani s povečanim tveganjem za koronarno arterijsko bolezen (97). Vnetni citokin IL-6 je bil prepoznan kot neodvisni dejavnik tveganja za koronarno arterijsko bolezen (98), saj spodbuja razvoj aterosklerotične lehe in povzroča endotelijsko disfunkcijo (99), ki je prva stopnja razvoja ateroskleroze (92). Vnetni citokin TNF- α povečuje prepustnost endotelija (100), spodbuja adhezijo levkocitov na endotelijskie celice (101) ter povečuje privzem makrofagov v aterosklerotične lehe (102) in z omenjenimi mehanizmi direktno prispeva k razvoju ateroskleroze. Raziskave so pokazale, da je povezan s povečanim tveganjem za ponovne koronarne dogodke (103) ter s starostjo povezano aterosklerozo (96, 104). Kolonije stimulirajoči dejavnik za makrofage (mCSF) deluje kot kemotaktični dejavnik za monocite in se je pokazal kot proaterogen, najverjetneje preko vpliva na fenotip makrofagov v aterosklerotičnih lehah. Njegovo izražanje v žilni steni je lahko kritično za preživetje penastih celic, ki nastanejo pri aterosklerozi (96). IL-5 naj bi *in vivo* imel predvsem zaščitno vlogo pri aterosklerozi (105), vendar njegovi učinki na potek ateroskleroze zaenkrat niso še točno razjasnjeni.

Vemo, da je tveganje za razvoj ateroskleroze in z njo povezanih srčno-žilnih bolezni pri bolnikih z APS povečano. Z aterosklerozo povezujejo različne vnetne in protivnetne citokine, vnetje pa je tisto, ki povezuje APS in aterosklerozu in je vpleteno v vse faze razvoja ateroskleroze. V našem primeru so se v primerjavi z IgG KRV pri poPt VZ1 povečano izločali IL-6, IL-8, TNF- α in mCSF, ki glede na študije spodbujajo razvoj ateroskleroze. Povečano pa se je izločal tudi IL-5, ki naj bi imel zaščitno delovanje pri aterosklerozi, a ravno ravnotežje med vnetnimi in protivnetnimi citokini, naj bi bilo ključno za razvoj aterosklerotične lehe. Zaradi povečanega izločanja omenjenih molekul v celično okolje, ki je posledica aktivacije endotelijskih celic z izoliranimi protitelesi proti protrombinu, lahko sklepamo, da protitelesa proti protrombinu prispevajo tudi k razvoju ateroskleroze. Za podrobnejše poznavanje mehanizmov delovanja teh avtoprotiteles pa bi bilo potrebno narediti dodatne študije s prečiščenimi poliklonskimi protitelesi.

6 SKLEP

Zadane cilje nam je uspelo uresničiti:

1. Izdelali smo afinitetno kolono z vezanim protrombinom na agarazi, aktivirani s CNBr in s pomočjo te kolone izolirali poliklonska protitelesa proti protrombinu iz seruma bolnika z APS.
2. Določili smo količino teh protiteles ter pokazali, da imajo ustrezno čistost in imunsko specifičnost.
3. S pretočno citometrijo in indirektno imunofluoresenco smo pokazali specifično vezavo monoklonskih in poliklonskih protiteles proti protrombinu na površino celic HCEAC ob prisotnosti protrombina.
4. Z različnimi encimsko imunskimi testi nam je uspelo določiti koncentracijo izloženih molekul v celičnem okolju stimuliranih HCAEC.

Prišli smo do naslednjih spoznanj in ugotovitev:

1. S testom kaotropna aPS/PT ELISA smo pokazali, da ima serum, iz katerega smo izolirali poPt VZ1, pretežno visoko avidna protitelesa, in z reducirajočo SDS PAGE potrdili, da poPt VZ1 nima dodanih primesi.
2. Na površino HCAEC so se moPt 231D specifično vezala le ob prisotnosti protrombina, medtem ko do vezave v njegovi odsotnosti ni prišlo. .
3. Večjo vezavo na površino celic smo izmerili pri hkratni inkubaciji moPt 231D s Ca^{2+} in protrombinom v primerjavi s 16-urno predstimulacijo celic s Ca^{2+} in protrombinom.
4. V primerjavi s 16 urami inkubacije smo večjo vezavo moPt 231D na površino celic dobili po 6-ih urah inkubacije.
5. Dodatek SAA ni povečal vezave protiteles proti protrombinu na površino celic.
6. Največjo vezavo poPt VZ1 na površino celic smo izmerili pri koncentraciji 100 mg/L in pri koncentraciji protrombina 100 mg/L.
7. Prisotnost poPt VZ1 je vplivala na povečano izločanje IL-6, IL-8, TNF- α , IL-5 in mCSF v celično okolje v primerjavi z IgG KRV. Z izjemo IL-5 te molekule spodbujajo razvoj ateroskleroze.
8. Protitelesa proti protrombinu lahko prispevajo k razvoju ateroskleroze.

7 LITERATURA

1. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287(6399):1088-9.
2. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295-306.
3. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):1019-27.
4. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Anti-beta 2-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2003;102(8):2717-23.
5. Cervera R. Lessons from the "Euro-Phospholipid" project. *Autoimmun Rev*. 2008;7(3):174-8.
6. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis. In: Lahita R, editor. *Systemic lupus erythematosus*. 5 ed. San Diego, CA: Academic Press; 2010. p. 945-66.
7. Hughes G. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet*. 1993;7(342):341-4.
8. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(5):451-64.
9. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun*. 2000;15(2):145-51.
10. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet*. 1990;335(8705):1544-7.
11. Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(6):330-9.
12. Ribarič S. Temelji patološke fiziologije. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2011.
13. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*. 1987;26(19):6165-77.
14. Chow BK, Ting V, Tufaro F, MacGillivray RT. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *J Biol Chem* 1991;266(28):18927-33.

15. Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. 1990;76(1):1-16.
16. Pelzer H, Schwarz A, Stüber W. Determination of human prothrombin activation fragment 1+2 in plasma with an antibody against a synthetic peptide. *Thromb Haemost* 1991;65(2):153-9.
17. Roubey RA. Autoantibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood*. 1994;84(9):2854-67.
18. Loeliger A. Prothrombin as a co-factor of the circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus? *Thromb Diath Haemorrh*. 1959;3:237-56.
19. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *ThrombHaemost*. 1994;71(5):596-604.
20. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G, Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *ThrombHaemost*. 1995;74(4):1120-5.
21. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Kawasugi K, Gohchi K, Tsukamoto M. Phosphatidyl serine-dependent antiprothrombin antibody is exclusive to patients with lupus anticoagulant. *BrJRheumatol*. 1996;35(6):589-91.
22. Galli M, Beretta G, Daldossi M, Bevers EM, Barbui T. Different anticoagulant and immunological properties of anti-prothrombin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *ThrombHaemost*. 1997;77(3):486-91.
23. Atsumi T, Ieko M, Bertolaccini ML, Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, et al. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):1982-93.
24. Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, Kuratsune H, Kanakura Y. The presence of anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies as risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica*. 2006;91(5):699-702.
25. Zigon P, Cucnik S, Ambrozic A, Kveder T, Semrl SS, Rozman B, et al. Detection of Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibodies and Their Potential Diagnostic Value. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013;2013:8.
26. Sciascia S, Sanna G, Murru V, Roccatello D, Khamashta MA, Bertolaccini ML. Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thromb Haemost*. 2013;111(2).

27. Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibody: why do we need more assays? *Lupus*. 2010;19(4):436-9.
28. Ghirardello A, Bizzaro N, Zampieri S, Iaccarino L, Bassi N, Tozzoli R, et al. Biological and clinical relevance of anti-prothrombin antibodies. *AnnNYAcadSci*. 2007;1109:503-10.
29. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Shoenfeld Y. Atherosclerosis and antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2003;25(1):79-88.
30. Sherer Y, Shoenfeld Y. Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3(4):328-33.
31. Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(2):97-9.
32. Levy PJ, Cooper CF, Gonzalez MF. Massive lower extremity arterial thrombosis and acute hepatic insufficiency in a young adult with premature atherosclerosis associated with hyperlipoprotein(a)emia and antiphospholipid syndrome. A case report. *Angiology*. 1995;46(9):853-8.
33. Artenjak A, Lakota K, Frank M, Čučnik S, Rozman B, Božič B, et al. Antiphospholipid antibodies as non-traditional risk factors in atherosclerosis based cardiovascular diseases without overt autoimmunity. A critical updated review. *Autoimmun Rev*. 2012;11(12):873-82.
34. Vaarala O, Puurunen M, Mänttäri M, Manninen V, Aho K, Palosuo T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thromb Haemost*. 1996;75(3):456-9.
35. Yasuda S, Bohgaki M, Atsumi T, Koike T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology*. 2005;210(10):775-80.
36. Žigon P, Ambrožič A, Božič B, Čučnik S. Protitelesa proti protrombinu. *Zdrav vestn*. 2015;84:209-21.
37. Willis R, Gonzales EB, Brasier AR. The journey of antiphospholipid antibodies from cellular activation to antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(3):16.
38. Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(4):305-21.
39. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003;48(4):886-95.
40. Akimoto T, Akama T, Kono I, Sumida T. Relationship between clinical features and binding domains of anti-prothrombin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 1999;8(9):761-6.

41. Arnout J. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelisms with heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 1996;75(4):536-41.
42. Bijl M. Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Neth J Med.* 2003;6(9):273-7.
43. Rodríguez G, Mago N, Rosa F. [Role of inflammation in atherogenesis]. *Invest Clin.* 2009;50(1):109-29.
44. Pierangeli SS, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris EN. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation.* 1999;99(15):1997-2002.
45. Pierangeli SS, Liu X, Espinola R, Olee T, Zhu M, Harris EN, et al. Functional analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. *Thromb Haemost.* 2000;84(3):388-95.
46. Graham A, Ford I, Morrison R, Barker RN, Greaves M, Erwig LP. Anti-endothelial antibodies interfere in apoptotic cell clearance and promote thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *J Immunol.* 2009;182(3):1756-62.
47. Williamson P, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585(2-3):53-63.
48. Contreras FX, Sánchez-Magraner L, Alonso A, Goñi FM. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS Lett.* 2010;584(9):1779-86.
49. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Harmsma M, Zwaal RF. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus.* 1998;7(2):126-31.
50. Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1026(2):153-60.
51. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(9):971-88.
52. D'Agnillo P, Levine JS, Subang R, Rauch J. Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable, cells and serves as a target of lupus anticoagulant autoantibodies. *J Immunol.* 2003;170(6):3408-22.
53. Chen Q, Stone PR, Woon ST, Ching LM, Hung S, McCowan LM, et al. Antiphospholipid antibodies bind to activated but not resting endothelial cells: is an independent triggering event required to induce antiphospholipid antibody-mediated disease? *Thromb Res.* 2004;114(2):101-11.

54. Jankowski M, Vreys I, Wittevrongel C, Boon D, Vermylen J, Hoylaerts MF, et al. Thrombogenicity of beta 2-glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibodies in a photochemically induced thrombosis model in the hamster. *Blood*. 2003;101(1):157-62.
55. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanisms of antiphospholipid syndrome: a new autoimmune disease. *Drug Disc Today*. 2004;1(3):309-16.
56. Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, Debeus A, Macor P, Bulla R, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. 2005;106(7):2340-6.
57. Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *BrJHaematol*. 2006;135(2):214-9.
58. Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Kveder T, Tomšič M, Sodin-Semrl S. Serum amyloid A activation of inflammatory and adhesion molecules in human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *European journal of inflammation*. 2007;5(2):73-81.
59. Lakota K, Mrak-Poljsak K, Bozic B, Tomsic M, Sodin-Semrl S. Serum amyloid A activation of human coronary artery endothelial cells exhibits a neutrophil promoting molecular profile. *Microvasc Res*. 2013;90:55-63.
60. Sikara MP, Grika EP, Vlachoyiannopoulos PG. Pathogenic Mechanisms of Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome (APS). In: Tranquilli AL, editor. *Trombophilia*: InTech; 2011. p. 161-86.
61. Meroni PL, Raschi E, Testoni C, Borghi MO. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol*. 2004;112(2):169-74.
62. Chen PP, Lin YC, Wu KC, Yen JH, Ou TT, Wu CC, et al. Activation of endothelial cells by antiphospholipid antibodies--a possible mechanism triggering thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *KaohsiungJMedSci*. 2006;22(10):484-90.
63. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *CircRes*. 2001;88(2):245-50.
64. Reverter JC, Tassies D, Font J, Khamashta MA, Ichikawa K, Cervera R, et al. Effects of human monoclonal anticardiolipin antibodies on platelet function and on tissue factor expression on monocytes. *Arthritis Rheum*. 1998;41(8):1420-7.
65. Zhou H, Wolberg AS, Roubey RA. Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by dilazep. *Blood*. 2004;104(8):2353-8.
66. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(10):1775-84.

67. Artenjak A, Omersel J, Grabnar PA, Mlinarič-Raščan I, Shoenfeld Y, Sodin-Semrl S, et al. Oxidatively altered IgG with increased immunoreactivity to β 2-glycoprotein I and its peptide clusters influence human coronary artery endothelial cells. *Lupus*. 2015;24(4-5):448-62.
68. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(12):1508-12.
69. Gallagher G, Sumpio BE. Vascular endothelial cell. In: Sumpio BE, Sidawy AS, editors. *Basic science of Vascular Disease*. Mt. Kisco: Futura Publishing Co.; 1997. p. 151-86.
70. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-61.
71. Griendling KK, Alexander RW. Cellular biology of blood vessels. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, editors. *Hurst's the Heart, Arteries and Veins*. 9 ed. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 125-41.
72. Jovanović DB. Clinical importance of determination of serum amyloid A. *Srp Arh Celok Lek*. 2004;132(7-8):267-71.
73. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem*. 1999;265(2):501-23.
74. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8 ed. Philadelphia: Saunders; 2015.
75. Sakai Y, Atsumi T, Ieko M, Amengual O, Furukawa S, Furusaki A, et al. The effects of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on thrombin generation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(8):2457-67.
76. Kočevar N, Kreft S, Obermajer N. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. In: Štrukelj B, Kos J, editors. *Biološka zdravila – Od gena do učinkovine*. 1 ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
77. Fonović UP, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M, Hafner A, et al. *Vaje iz farmacevtske biokemije*. 2 ed. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biokemijo; 2011.
78. Zigon P, Ambrožič A, Cucnik S, Kveder T, Rozman B, Božič B. Modified phosphatidylserine-dependent antithrombin ELISA enables identification of patients negative for other antiphospholipid antibodies and also detects low avidity antibodies. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(6):1011-8.
79. Zigon P, Cucnik S, Ambrožič A, Sodin Semrl S, Kveder T, Božič B. Antibodies to phosphatidylserine/prothrombin complex as an additional diagnostic marker of APS? *Lupus*. 2012;21(7):790-2.

80. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 1 ed. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
81. Clemens N, Frauenknecht K, Katzav A, Sommer C, Landenberg Pv. In vitro effects of antiphospholipid syndrome-IgG fractions and human monoclonal antiphospholipid IgG antibody on human umbilical vein endothelial cells and monocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:805-13.
82. Zhao Y, Rumold R, Zhu M, Zhou D, Ahmed AE, Le DT, et al. An IgG antiprothrombin antibody enhances prothrombin binding to damaged endothelial cells and shortens plasma coagulation times. *Arthritis Rheum.* 1999;42(10):2132-8.
83. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, et al. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest.* 1995;96(5):2211-9.
84. Ferrara DE, Swerlick R, Casper K, Meroni PL, Vega-Ostertag ME, Harris EN, et al. Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2004;2(9):1558-63.
85. Bertolaccini ML, Atsumi T, Koike T, Hughes GR, Khamashta MA. Antiprothrombin antibodies detected in two different assay systems. Prevalence and clinical significance in systemic lupus erythematosus. *ThrombHaemost.* 2005;93(2):289-97.
86. Stoltz JF, Muller S, Kadi A, Decot V, Menu P, Bensoussan D. Introduction to endothelial cell biology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2007;37(1-2):5-8.
87. Žigon P. Značilnosti vezave antiprotrombinskih protiteles in vitro ter in vivo. Magistrsko delo. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; 2008.
88. Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Sodin-Šemrl S. Increased responsiveness of human coronary artery endothelial cells in inflammation and coagulation. *Mediators Inflamm.* 2009;146872.
89. Hooper WC, Phillips DJ, Renshaw MA, Evatt BL, Benson JM. The up-regulation of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells by activated protein C. *J Immunol.* 1998;161(5):2567-73.
90. George J, Afek A, Gilburd B, Levy Y, Blank M, Kopolovic J, et al. Atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice is accelerated by immunization with anticardiolipin antibodies. *Lupus.* 1997;6(9):723-9.
91. Shovman O, Gilburd B, Shoenfeld Y. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus-related atherosclerosis: a novel target for treatment? *J Rheumatol.* 2006;33(3):445-7.
92. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.

93. Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, et al. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *Isr Med Assoc J.* 2008;10(7):494-8.
94. Abbasi SH, Boroumand MA. Expanded network of inflammatory markers of atherogenesis: where are we now? *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:38-44.
95. Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res.* 2002;90(10):1039-40.
96. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3):360-76.
97. Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, et al. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1503-8.
98. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2364-7.
99. Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins *in vivo*. *Circulation.* 1997;96(9):3042-7.
100. Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med.* 1989;169(6):1977-91.
101. Thorne SA, Abbot SE, Stevens CR, Winyard PG, Mills PG, Blake DR. Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 127(2):167-76.
102. Kim CJ, Khoo JC, Gillotte-Taylor K, Li A, Palinski W, Glass CK, et al. Polymerase chain reaction-based method for quantifying recruitment of monocytes to mouse atherosclerotic lesions *in vivo*: enhancement by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(8):1976-82.
103. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101(18):2149-53.
104. Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(2):255-60.
105. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2004;114(3):427-37.