

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

ENDOTELINIŲ MIKRODALELIŲ TYRIMAS PIRMINĖJE LĄSTELIŲ KULTŪROJE

Magistrantė JUSTINA ŠAKALINYTĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas: asist. dokt. Vytautas Žėkas _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. A. Kučinskienė

Leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

VILNIUS, 2017

TURINYS

TURINYS	2
SUTRUMPINIMAI IR PAAIŠKINIMAI	3
ĮVADAS	4
LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1. Endotelinės mikrodalės	5
1.1. Endotelinių mikrodalelių formavimasis.....	5
1.2. Endotelinių mikrodalelių detekcija.....	7
1.3. Endotelinių mikrodalelių funkcijos	8
1.4. Endotelinės mikrodalės žmogaus organizmo procesuose.....	9
2. Ciklofilinas A.....	11
TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA	13
1. Tyrimo medžiaga	13
2. Tyrimo eiga.....	13
REZULTATAI.....	16
APTARIMAS IR IŠVADOS	22
LITERATŪROS SĄRAŠAS	24
SANTRAUKA.....	28
SUMMARY.....	29

SUTRUMPINIMAI IR PAAIŠKINIMAI

CD - paviršiaus žymuo (*angl.* Cluster of differentiation)

CyPA – ciklofilinas A

CRB – C reaktyvus baltymas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPBS - Dulbecco's fosfato buferinis tirpalas

EMD – endotelinės mikrodalelės

ICAM – 1 – intraląstelinė adhezijos molekulė 1

IFN – interferonas

IgM – imunoglobulinas M

IL – 6 – interleukinas 6

IL -1 α – interleukinas 1 α

LA – Lupus antikoaguliantas

LPS – lipopolisacharidai

miRNR – mikroribonukleorūštis

MTL – mažo tankio lipoproteinai

NO – azoto oksidas

RNR – ribonukleorūgštis

ROCK – Rho asocijuota baltymų kinazė

SKS – sistolinis kraujo spaudimas

TNF- α – tumoro nekrozės faktorius α

VCAM-1 - kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės

IVADAS

Endotelinės mikrodalės - bebranduolės pūslelės, kurių dydis svyruoja nuo 100 nm iki 1000 nm. Jos perneša baltymus bei kitas struktūras, galinčias veikti ląstelėje vykstančius procesus [1]. Yra žinoma, jog endotelinių mikrodalelių kiekio pokyčiai siejami su patologiniais procesais žmogaus organizme ir dėl šios priežasties mikrodalės gali būti taikomos atitinkamų ligų diagnostikai [2]. Endotelinių mikrodalelių išsiskyrimą skatina TNF- α [3], plazminogeno aktyvoklio inhibitorius 1, angiotenzinas II, ureminiai toksinai, oksiduoti lipoproteinai, didelė gliukozės koncentracija, trombinas, oksidacinis stresas, IL-1 α [1]. Uždegimo metu, esant oksidaciniam stresui dėl hipoksijos, arba infekcijos, ląstelės pradeda aktyviai sekretuoti ciklofiliną A. Ekstraląstelinis ciklofilinas A veikia kaip signalinė molekulė, kuri stimuliuoja uždegiminį atsaką endoteliocituose bei skatina kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulės (VCAM-1) ekspresiją ląstelių paviršiuje. Ciklofilinas A taip pat dalyvauja keliose aterosklerozės vystymosi stadijose – nuo riebalinės dėmės susidarymo intimoje iki aterosklerozinės plokštelės plyšimo ir trombo formavimosi [4].

Darbo tikslas: įvertinti endotelinių mikrodalelių susidarymą veikiant ciklofilinu A ir palyginti su mikrodalelių kiekiu sveikų asmenų kraujo plazmoje, pagrindžiant jas kaip naują diagnostinį žymenį.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti ciklofilino A poveikį pirminei endotelinių ląstelių kultūrai;
2. Išmatuoti endotelinių mikrodalelių kiekį tekmės citometrijos metodu;
3. Gautus rezultatus palyginti su sveikų asmenų endotelinių mikrodalelių tyrimo rezultatais ir pateikti išvadas.

LITERATŪROS APŽVALGA

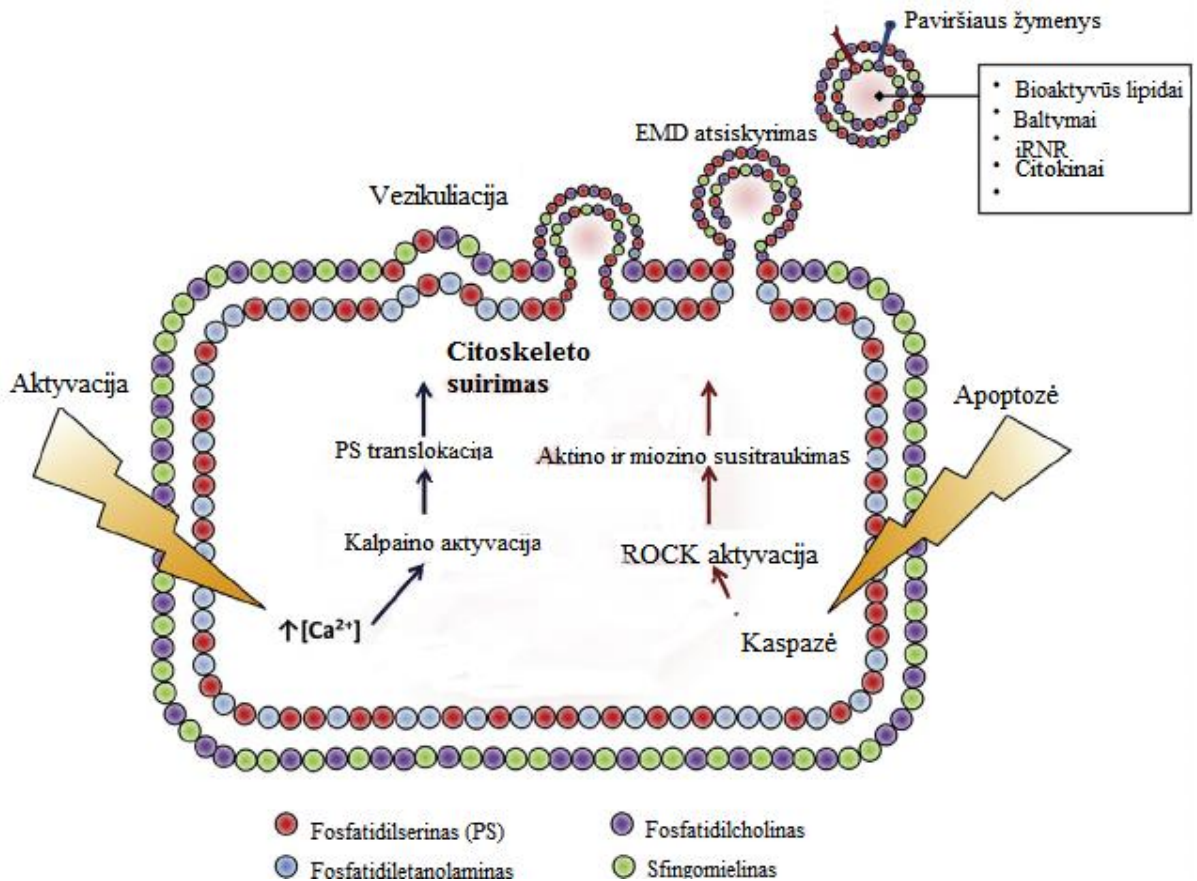
1. Endotelinės mikrodalės

Mikrodalės – citoplazmą turintys nebranduoliniai, 100 – 1000 μm dydžio ląstelių fragmentai, nešantys baltymus ir kitas struktūras. Mikrodalelių išskyrimas buvo stebėtas endoteliocituose, trombocituose, leukocituose, lygiųjų raumenų audinių ląstelėse, eritrocituose, kardiomiocituose, podocituose, naviko ląstelėse. Mikrodalės skiriasi tiek normaliomis sąlygomis, tiek patologinėmis, ląsteles paveikus streso faktoriais. Mikrodalės turi paviršiaus baltymus bei citoplazmą su baltymais, DNR, RNR, miRNR gautą iš ląstelės, nuo kurios atsiskyrė [1]. Nuo kitų vezikulių, mikrodaleles galima atskirti pagal dydį, nešamus baltymus ir paviršiaus molekules. Mikrodalės turinį gali perduoti kitoms ląstelėms, aktyvinti jas, skatinti baltymų sintezę. Apie mikrodalelių irimą žinoma daug mažiau nei apie susidarymą. Manoma, jog *in vivo* mikrodalės eliminuojamos fagocitinių ląstelių ir retikulo-endotelinės sistemos fagocitozės būdu. Mikrodalelių opsonizacija IgM taip pat gali būti vienas iš mikrodalelių eliminavimo mechanizmų. Opsonizuotos mikrodalės pagaunamos makrofagų ir sunaikinamos [5]. Mokslininkai teigia, jog mikrodalės gali būti kraujagyslių būsenos žymuo. Jų kiekio padidėjimas siejamas su ligomis, kurių metu pažeidžiamos kraujagyslės – ateroskleroze, širdies nepakankamumu, diabetu, pulmonarine hipertenzija, lėtine inkstų liga [1].

1.1. Endotelinių mikrodalelių formavimasis

Mikrodalelių membraninių baltymų sąstatas priklauso nuo motininės ląstelės, nuo kurios atsiskyrė mikrodalės bei stimulo, kuriuo buvo veikiamos motininės ląstelės [6]. Endoteliocitai reaguoja į TNF- α [3], plazminogeno aktyviklio inhibitorių 1, angiotenziną II, ureminius toksinus, oksiduotus lipoproteinus, didelę gliukozės koncentraciją, trombiną, oksidacinį stresą, IL-1 α [1]. Nuo aktyvuotų endoteliocitų atsiskiria mikrodalės. Nors EMD susidarymo mechanizmas *in vivo* nėra iki galo ištirtas, tyrimai *in vitro* rodo, jog mikrodalelių formavimasis vyksta dėl fosfolipidinės membranos asimetriškumo praradimo bei citoskeleto baltymų persitvarkymo [7]. Padidėjusi intraląstelinio kalcio jonų koncentracija inhibuoja lipidų pernašos fermentus ir aktyvina fermentus - kaspazes, ROCK ir mitogenų aktyvinto baltymo kinazę [8]. Šie fermentai kartu su kalcio jonais aktyvina kitus fermentus – skrambalazę, kalpainą, gelsoliną – bei slopina fosfolipidų translokazę. Fosfolipidų translokazė - fermentas atsakingas už fosfolipidų asimetrijos ląstelės membranoje palaikymą. Esant normalioms sąlygoms, aminofosfolipidai (fosfatidilserinas ir fosfatidiletanolaminas) randami tik vidiniame fosfolipidų sluoksnyje ląstelės membranoje (1 pav.). Formuojantis endotelinei mikrodalelei skrambalazė

perskirsto fosfolipidus tiek į išorinį, tiek į vidinį sluoksnį. Išnykus fosfolipidų asimetrijai membranoje, fosfatidilserinas patenka į išorę, citoskeletas suardomas ir susiformuoja pūslelė, kuri atsiskiria nuo ląstelės ir patenka į kraujotaką. Skirtingų ląstelių mikrodalelių susidarymas gali nežymiai skirtis.



1 pav. Endotelinių mikrodalelių susidarymas. (Shiro *et al.*, 2014)

Mikrodalelių formavimasis iš endotelinių ląstelių stimuliuoja TNF- α , bakteriniai LPS, esant riebalų rūgštims, IL-1 α ir CRP, reaktyvūs deguonies dariniai, plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius, trombinas, ureminiai toksinai. Antioksidantai, tokie kaip vitaminas C, padidina endotelinių mikrodalelių kiekį pacientų, sergančių diabetu ir dislipidemija, plazmoje po miokardo infarkto [9]. Statinų poveikis endotelinėms mikrodalelėms nėra iki galo ištirtas. Vieni tyrimai rodo, kad statinai skatina mikrodalelių atsiskyrimą *in vitro* [10]. Kiti tyrimai *in vitro* parodė, kad 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzimo A reduktazės inhibitorius (statinas) gali turėti priešuždegiminį poveikį endotelinėms ląstelėms, inhibuoti Rho-kinazės kelią ir taip stabdyti endotelinių mikrodalelių susidarymą bei kiekį organizme [11]. Yra keletas gydymo algoritmų, kurie siejami su endotelinių mikrodalelių mažinimu. II tipo diabetu sergantiems pacientams, kurie vartoja kalcio antagonistus arba blokatorius, nustatytas sumažėjęs endotelinių mikrodalelių kiekis pagal žymenis – CD51 ir aneksiną V [12]. Panašius rezultatus parodė ir

eikosapentateoninė rūgštis [13]. Tokie tyrimai gali padėti suprasti endotelinių mikrodalelių formavimąsi bei jų sąsaja su ligomis.

1.2. Endotelinių mikrodalelių detekcija

Šiuo metu mikrodalelių išskyrimas ir tyrimas neturi protokolo, tad skirtingais metodais gautus rezultatus lyginti yra keblu. Yra žinoma, jog mikrodalelių išskyrimas priklauso nuo centrifugavimo greičio ir vyksta dviem etapais. Iš pradžių, periferinio kraujo ar ląstelių kultūros viršnuosėdinis skystis yra sukamas 3000 g gravitacijos jėga 10 minučių. Taip pašalinamos ląstelės ir didelės dalelės. Antrame etape papildomai centrifuguojamas viršnuosėdinis skystis 10000 - 20000 g gravitacijos jėga 30–45 minučių [14]. Taip gaunama betrombocitinė plazma ir nuosėdos, kuriose nustatomas skirtingas mikrodalelių santykis. Tyrimams galima pasirinkti tiek betrombocitinę plazmą, tiek nuosėdas, nes taip užtikrinamas efektyvesnis tyrimas bei geresni rezultatai. Tyrimą gali paveikti ląstelių nuolaužos bei šiukšlės, tačiau, naudojant kalibracinius tėkmės citometrijos rutuliukus ir fluorochromu žymėtus antikūnus, galima atskirti mikrodaleles pagal jų dydį ir membraninių molekulių kiekį.

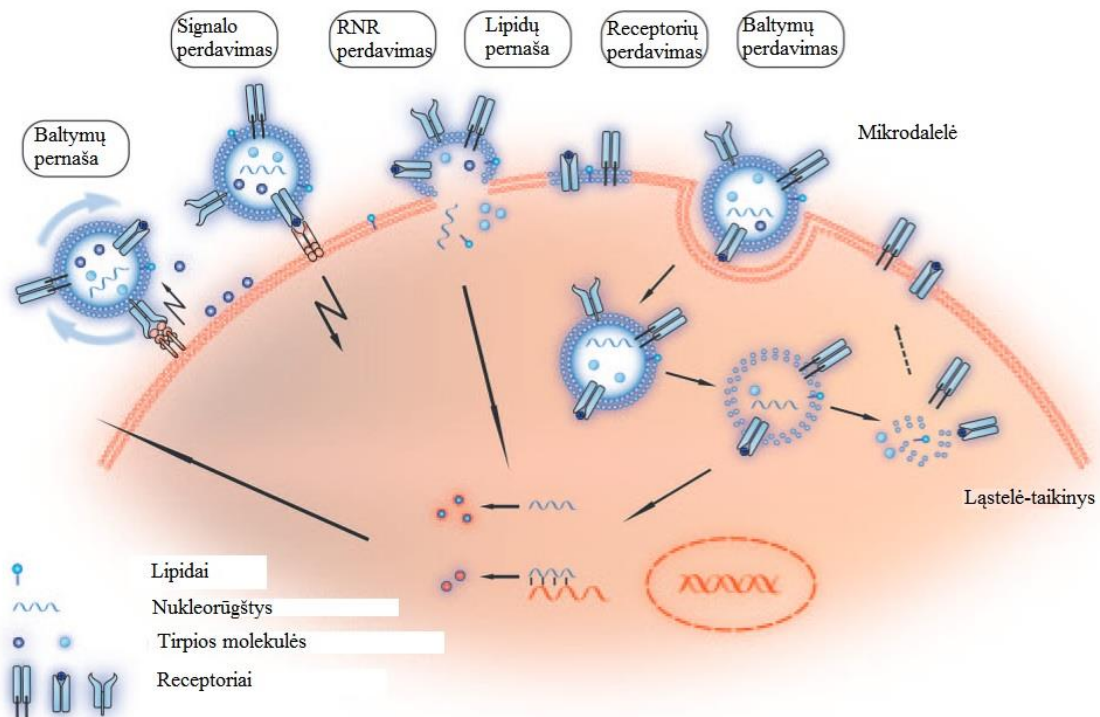
Mikrodalelių tyrimui gali būti naudojami įvairūs metodai: elektroninė mikroskopija, atominės jėgos mikroskopija, *Western blotas*, masės spektrometrija, tėkmės citometrija imunofluorescenciniai, imunofermentiniai ir funkciniai tyrimai [15]. Visi šie metodai yra skirtingos gebos ir kainos, tad parenkami priklausomai nuo atliekamų tyrimų. Elektroninė mikroskopija - ribotas metodas, nes sunku atskirti mikrodaleles nuo artefaktų dėl jų panašaus dydžio, todėl tiek kiekybiniam, tiek kokybiniam tyrimui taikyti šį metodą nerekomenduojama. Atominės mikroskopijos metodas panašus į elektroninę mikroskopiją savo efektyvumu ir jautrumu susidariusiems artefaktams. Naudojant masių spektrometriją galima nustatyti baltymų kiekį mikrodalelės viduje, tačiau neįmanoma diferencijuoti mikrodalelių pagal jų dydį. Masių spektrometrija ir *Western blotas* gali būti parenkami tiriant mikrodalelių vidinius baltymus.

Endotelinių mikrodalelių ieškoma tėkmės citometrijos metodu tiriant kraujo plazmos mėginius. Taikant šį metodą galima nustatyti kelis antigenus vienu metu ir geriau apibrėžti mikrodalelės fenotipą, todėl metodas gali būti tinkamas kiekybiniam ir kokybiniam tyrimui [15]. Pagrindiniai identifikavimo kriterijai: dydis, granuluotumas ir specifiniai paviršiaus antigenai. Šis metodas pritaikytas aptikti ir mažiausias mikrodaleles – iki 0,1 μm. Naudojant paviršiaus antigenus galima atsekti nuo kokio tipo ląstelės atsiskyrė mikrodalelės. Nėra vienintelio markerio endotelinėms mikrodalelėms aptikti, todėl efektyviai detekcijai rekomenduojama naudoti kiek įmanoma daugiau markerių.

1.3. Endotelinių mikrodalelių funkcijos

Endotelinės mikrodalelės yra biologinės informacijos pernašos elementas. Mikrodalelės gali aktyvinti, modifikuoti ar pakeisti ląstelių funkcijas, perduodant joms savo vidaus molekules, pvz., baltymus, bioaktyvius lipidus, RNR, citokinus, chemokinus, augimo faktorius (2 pav.) [16]. Šių vidaus molekulių perdavimas vyksta endotelinei mikrodalelei susiliejus su ląstele – taikiniu. Kadangi mikrodalelės cirkuliuoja kraujotakoje, jos gali aktyvinti ląsteles tiek autokriniu, tiek parakriniu būdu. Tai rodo, kad ląstelės gali sąveikauti tarpusavyje ne tik sekretuojant signalines molekules ar membranoms susilietus, bet ir per mikrodaleles [17]. Tokia mikrodalelėmis paremta ląstelių komunikacija gali greitai sklirti bei efektyviau aktyvinti būtinas ląstelių funkcijas, pvz., imunoreguliaciją. Tačiau, esant patologiniams procesams, mikrodalelės gali aktyvuoti generalizuotus procesus, pvz., uždegimą, trombozę. Be medžiagų pernešimo, mikrodalelės gali veikti kaip organizme cirkuliuojantys signalai, ekspresuojantys su membrana surištus receptorius, sukeliančius specifinį atsaką ląstelėje-taikinyje. Mikrodalelės gali sužadinti ląstelę ir neperduodant jai savo vidaus turinio.

Endotelinės mikrodalelės, pernešančios genetinę informaciją, gali pakeisti ląstelės-taikinio genų raišką [16]. Endoteliocitų išskirtos mikrodalelės perneša transkriptus, stimuliuojančius angiogenzinį aktyvumą nesidalinančiuose endoteliocituose ir skatiną endoteliocitų proliferaciją, organizaciją į kapiliarų struktūrą ir apoptozės inhibiciją [18].



2 pav. Endotelinių mikrodalelių funkcijos. (Mause SF, Weber C, 2010)

Mikrodalelės gali perduoti savo membranoje esančius receptorius ląstelėms-taikiniams. Taip pakeičiamas ląstelių fenotipas - jos tampa jautresnės dirgikliams nei kitos tokio pat tipo ląstelės. Mack *et al.* pademonstravo chemokino receptoriaus CCR5 perdavimą nuo žiurkėno kiaušidžių ląstelių ant šio receptoriaus neturinčių monocitų [19]. Mikrodalelės membranos receptorių perdavimas vyksta mikrodalelei susiliejus su ląstele-taikiniu.

Tiriant mikrodaleles *in vitro* pastebėta, kad mikrodalelės gali perduoti ir infekcinius agentus, tokius kaip prionus ar žmogaus imunodeficito virusą. Tačiau tokia funkcija yra mažiau tikėtina *in vivo* [16].

1.4. Endotelinės mikrodalelės žmogaus organizmo procesuose

Endotelinės mikrodalelės dalyvauja įvairiuose žmogaus fiziologiniuose procesuose. Mokslininkų tyrimai parodė, kad mikrodalelės reguliuoja laisvų deguonies radikalų susidarymą mažinamos NO kiekį [7]. Iš miokardo infarktą patyrusių žmonių išskirtos mikrodalelės slopino NO sintazės veiklą ir stipriai sumažino NO kiekį, o iš sveiko endotelio išskirtos mikrodalelės, tokiu poveikiu nepasižymėjo [20].

Mikrodalelių gebėjimas sąlygoti trombino gamybą buvo įrodytas endotelinų ląstelių kultūroje mažinant normalios plazmos, inkubuotos su vis didėjančių mikrodalelių kiekiu, krešėjimo laiką *in vitro*. Trombogeninis mikrodalelių aktyvumas patvirtintas pademonstravus endotelinų mikrodalelių iššaukto nuo audinių faktoriaus priklausomo trombino formavimąsi *in vitro* ir trombo formavimąsi *in vivo* [21]. Mikrodalelės su audinių faktoriais bei adhezijos molekulėmis gali prisijungti prie kitų ląstelių, tokių kaip monocitai, ir perduoti bioaktyvų audinių faktorių *in vitro* [22]. Kiti moksliniai tyrimai parodė, kad mikrodalelės gali turėti endotelinio proteino C receptorių ir pasižymėti antikoaguliacinėmis savybėmis. Tai leidžia daryti prielaidą, jog endotelinės mikrodalelės dalyvauja krešėjimo skatinimo ir slopinimo veiksmų reguliavime [23].

Sabattier *et al* pademonstravo EMD, išskirtos iš endoteliocitų, paveikus juos TNF- α , jungiasi prie monocitų kultūros ir skatina nuo audinių faktoriaus priklausomą prokoaguliacinį aktyvumą šiose ląstelėse. Tai priklauso nuo ICAM-1 receptoriaus ant EMD ir β 2 integrino ant monocitų. EMD moduliuoja audinių faktoriaus geno ekspresiją monocituose. Gauti duomenys gali būti pritaikomi protrombotinėse situacijose siejant padidėjusią EMD koncentraciją ir monocitų audinių faktorių, pvz., meningokokinio sepsio, trombotinės trombocitopeninės purpuros, antifosfolipidinio sindromo, aterosklerotinės plokštelės plyšimo metu [24].

Eksperimentai su endoteliocitų kultūromis parodė, kad mikrodalelių formavimasis koreliuoja su IL-6 išlaisvinimu, o tai parodo glaudų ryšį tarp endotelio vezikuliacijos ir citokinų

gamybos klasikiniame uždegimo procese [25]. Kiti tyrimai parodė, jog endotelinėmis mikrodalelėmis paveikus naivas endotelines ląsteles, padidėja ICAM – 1 reguliacija bei atsakas į uždegimą, o uždegimo paveiktas endoteliocitas gali formuoti uždegimines mikrodaleles [10]. Taip pailgėja uždegimo laikas, kuris gali daryti įtaką aterosklerotiniams pokyčiams kraujagyslėse. Neutrofilų mikrodalelės pasižymi uždegimą slopinančiu poveikiu ir išskiria baltymą aneksiną – 1, kuris inhibuoja leukocitų ir endotelinių ląstelių sąveiką [11].

Apoptozės procese, kaip ir uždegimo metu, endotelinės mikrodalelės yra ne tik rezultatas, bet ir stimuliuojantis veiksnys [13]. Mikrodalelės turi savyje proteolitinių fermentų, skatinančių apoptozės pradžią. Abid Hussein *et al* tirdami endotelines mikrodaleles pateikė hipotezę apie mikrodalelių įtaką siekiant išvengti apoptozės. Endotelinių ląstelių išskirtos mikrodalelės gali gauti ir apoptozę sukeliantį fermentą – kaspazę 3 – taip sumažindamos jo kiekį ląstelėje ir slopindamos apoptozę [3].

Plazmino turinčios endotelinės mikrodalelės yra svarbios kraujagyslių pralaidumui. Perduodamos plazminą, mikrodalelės aktyvuoja matrikso metaloproteazes, kurios susijusios su užląstelinio matrikso irimu ir išlaisvina augimo faktorius, svarbius audinių pertvarkymui, angiogenezei ir vėžio plitimui [26]. Kitas *in vitro* tyrimas parodė, kad endotelinės mikrodalelės perduoda matrikso metaloproteazių šeimai signalus angiogenezei pradėti [27]. Proangiogenetinę programą mikrodalelės taip pat gali sužadinti horizontaliai perduodamos turimą iRNR ląstelėms [18]. Šie atradimai buvo įrodyti *in vivo*: endotelinės mikrodalelės iš išeminio raumens skatina endotelio proliferaciją *in vitro* ir postnatalinę vaskulogenezę *in vivo* [28]. Endotelinių mikrodalelių angiogenezės skatinimas išlieka kontraversiškas.

Endotelinių mikrodalelių tyrimams dažnai naudojamas TNF – α , kurio veikimas į endotelinių mikrodalelių išsiskyrimą ištirtas geriausiai. Tyrimai parodė, jog endotelinių ląstelių stimuliavimas TNF – α , veikia ląstelėse esančių baltymų kiekį ir tipą. Tiriant 29 skirtingus ląstelės baltymus, rezultatai parodė, kad po veikimo TNF – α , 8 baltymai ekspresuojami stipriau, 12 baltymų raiška nusilpo, 8 baltymų raiška visiškai sustabdyta ir vienas naujas baltymas pradėtas ekspresuoti. Išnagrinėjus mikrodaleles, jose aptikti 8 baltymai iš 29 nagrinėtų ir iš jų trijų raiška buvo padidėjusi, keturių – sumažėjusi ir vienas nebeekspresuojamas [29]. Proteominė endotelinių mikrodalelių analizė parodė, kad 1/3 baltymų, esančių mikrodalelėse, yra specifinių signalui, sąlygojančiam jų formavimuisi [16]. Tai rodo, kad endotelinės mikrodalelės gali skirtis tarpusavyje dėl skirtingų nešamų baltymų, o jas ištyrus galima nustatyti endotelinių ląstelių būklę.

Įvairių ląstelių išskirtos mikrodalelės cirkuliuoja sveiko žmogaus kraujyje. Staigus endotelinių mikrodalelių pokytis gali turėti rimtą priežastį – širdies-kraujagyslių sistemos sutrikimą. Nežymios endotelio pažaidos, pvz., sukeltos pasyvaus rūkymo, sutrikdo endotelio

funkciją ir padidina endotelinių mikrodalelių kiekį jaunuose ir sveikuose tiriamuosiuose [30]. Tiriamuosiuose su rizika susirgti širdies koronarine liga, endotelinės mikrodalelės, ekspresuojančios kraujyslių endotelinį kadheriną, taip pat dalyvauja ligos predikcijoje [11]. Tokie ir panašūs tyrimai leidžia endotelines mikrodaleles ateityje priskirti diagnostiniams žymenims pacientams su aukšta širdies-kraujagyslių ligų rizika.

Combes *et al* atliko EMD kiekio lyginamuosius tyrimus tarp sveikų asmenų ir pacientų, turinčių Lupus antikoaguliantą. Tyrimo rezultatai parodė, jog Lupus antikoaguliantą turinčių pacientų endotelinių mikrodalelių kiekis buvo du kartus didesnis, lyginant su sveikais asmenimis. Pacientai su LA turi didesnę riziką turėti trombozinių komplikacijų, nes LA siejamas su hiperkoaguliacine būseną. Combes *et al* taip pat ištyrė asmenis turinčius ir neturinčius trombozių. Tyrimo rezultatai parodė, kad EMD žymiai daugiau turi pacientai su trombozėmis. Gydant pacientus antikoaguliaciniais vaistais nuo trombozių, EMD kiekis organizme nesumažėjo [31].

Atliekant EMD tyrimus pacientams su ūmiu koronariniu sindromu pastebėta, kad EMD skaičius didesnis pacientų plazmoje, kurie turėjo pirmą miokardo infarktą lyginant su pacientais, kurie neturėjo arba turėjo pakartotinį miokardo infarktą [32]. Morel *et al* pateikė duomenis, jog vitaminas C apsaugo nuo miokardo infarkto pacientus ir nuo tolimesnio endotelinio pažeidimo ir sumažina EMD [9].

2. Ciklofilinas A

Ciklofilinas A yra uždegimo mediatorius, siejantis įvairius aterogenezės rizikos veiksnius ir atspindi širdies ir kraujagyslių ligų sunkumą [9]. Ciklofilinai vadinami su ciklosporinu A kompleksą sudarantys baltymai. Ciklofilinas A svarbus baltymų erdvinės struktūros pasikeitimui, dalyvauja perduodant signalus, reguliuoja transkripcijos procesus. Jis taip pat žinomas kaip pagrindinis imunosupresanto ciklosporino A taikiny. Tyrimai rodo, kad uždegimo metu įvairios ląstelės (endoteliocitai, imuninio atsako ląstelės, trombocitai) gali išskirti šį baltymą. Ciklofilinas A taip pat yra imuninio atsako ląstelių (monocitų, neutrofilų, eozinofilų, T limfocitų) chemoatraktantas. Mokslinių tyrimų rezultatai rodo, kad ciklofilinas A skatina endotelio aktyvaciją, adhezijos molekulių ekspresiją ir apoptozę [33]. Literatūroje yra duomenų apie ciklofilino A vaidmenį įvairių ligų patogenezėje: širdies-kraujagyslių, uždegiminių ligų, navikų [34].

CyPA sekreciją reguliuoja Rho-kinazė, kuri taip pat yra svarbi uždegimo, kraujagyslių susiaurėjimo ir aterosklerozės patogenezėje [35]. Ypač svarbus ciklofilino A vaidmuo aterosklerozės patogenezėje, nes ciklofilinas A aterosklerozės fone gali būti vadinamas

prouždegimine ir proaterogenine molekule. Yra duomenų, teigiančių, kad ciklofilinas A dalyvauja mažo tankio lipoproteinų pasisavinimo stimuliavime, skatina VCAM-1 ekspresiją endoteliocituose, aktyvina juos ir skatina uždegiminius procesus, endotelinių mikrodalelių skyrimąsi bei uždegiminių ląstelių telkimąsi pažeidimo vietoje. Ciklofilinas A dalyvauja keliose aterosklerozės vystimosi stadijose – nuo riebalinės dėmės susidarymo intimoje iki aterosklerozinės plokštelės plyšimo ir trombo formavimosi. [4]. Ciklofilinas A taip pat yra esminė TNF- α indukuotos endoteliocitų apoptozės determinantė [36].

CyPA koncentracijos sumažėjimas yra siejamas su ryškiu aterosklerozės procesų silpnėjimu. Keliais atliktais eksperimentais įrodyta endotelio ląstelių proliferacijos ir angiogenezės tiesioginė priklausomybė nuo CyPA koncentracijos kraujyje [34].

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA

1. Tyrimo medžiaga

Endoteliocitų kultūros auginimas

Pirminė endotelinų mikrodalelių kultūra HUVEC (Lonza, Vokietija). Ląstelių tankumas 2,500 ląstelių/cm². Jos išsėtos į penkis ląstelių auginimo butelius. Endoteliocitų proliferacijai taikytos standartinės auginimo sąlygos +37°C±1°C, 5% CO₂, 90%±2% drėgmės. Endoteliocitams augti buvo naudojama EGM – 2 /Bullet Kit (Lonza, Vokietija) terpė.

2. Tyrimo eiga

Tyrimo priemonės:

1. Kintamo tūrio vienkanalės mechaninės pipetės su vienkartiniais antgaliais
2. Eppendorf tipo mėgintuvėliai (1,5 mL)
3. Termostatas (sąlygos +37°C±1°C, 5% CO₂, 90%±2%)
4. Mikrocentrifuga (Hettich, Vokietija)
5. BD Fortessa LSR II tekmės citometras (BD, San Jose)
6. 5 ml vienkartiniai mėgintuvėliai
7. HUVEC linija, vieno donoro (Lonza, Vokietija)

Tyrimo medžiagos:

1. Ciklofilinas A (Abcam, Vokietija)
2. Ląstelių augimo terpė EGM – 2 /Bullet Kit (Lonza, Vokietija)

Endoteliocitų veikimas ciklofilinu A:

Endoteliocitų kultūros veikiamos ciklofilinu A – inkubuojamos 24 val. su skirtinga ciklofilino A koncentracija – 10 ng/mL, 20 ng/mL, 30 ng/mL, 60 ng/mL.

Endotelinų mikrodalelių išskyrimas iš endoteliocitų kultūros

Po endoteliocitų veikimo ciklofilinu A, išsiurbiamą jų augimo terpė. Ji centrifuguojama 30 min 15200 g. Gautos nuosėdos perpilamos į 2 mL mėgintuvėlį pridedant 1 mL endoteliocitų augimo terpės.

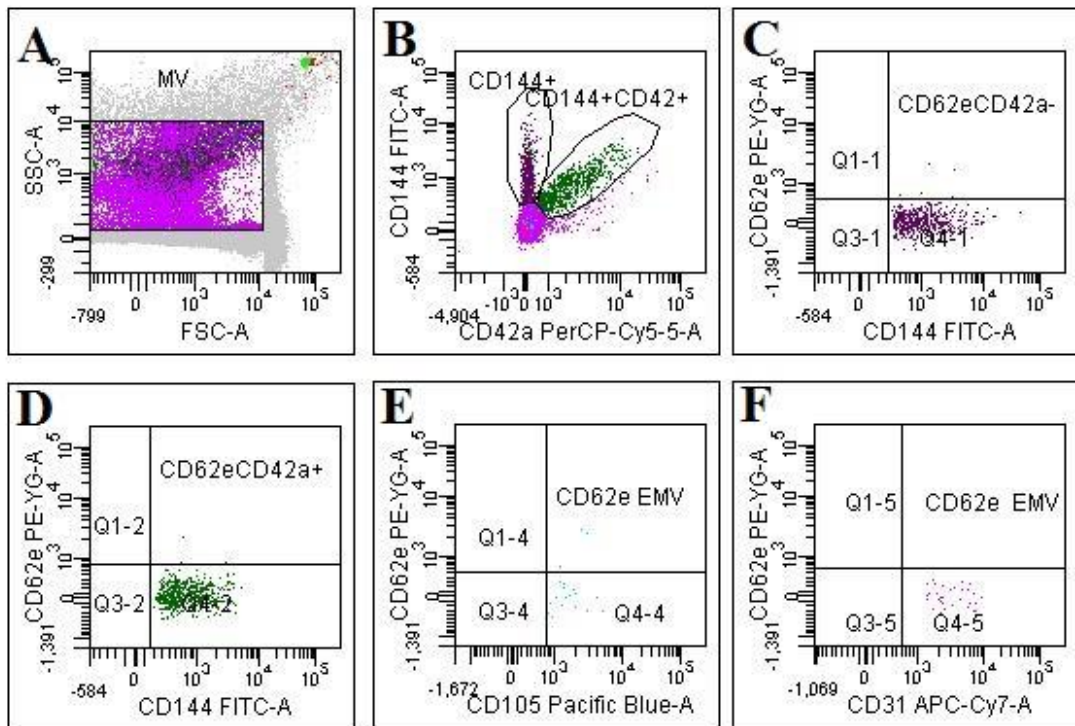
Tyrimas tėkmės citometru

Endotelinų mikrodalelių mėginiai buvo tiriami BD Fortessa LSR II tėkmės citometru (BD, San Jose, California). Aptinkamų dalelių dydžio ribos buvo apibrėžtos remiantis priekinės šviesos sklaida iš polistireno mikrosferų. Buvo naudojamos standartinės mikrogranulės iš BD

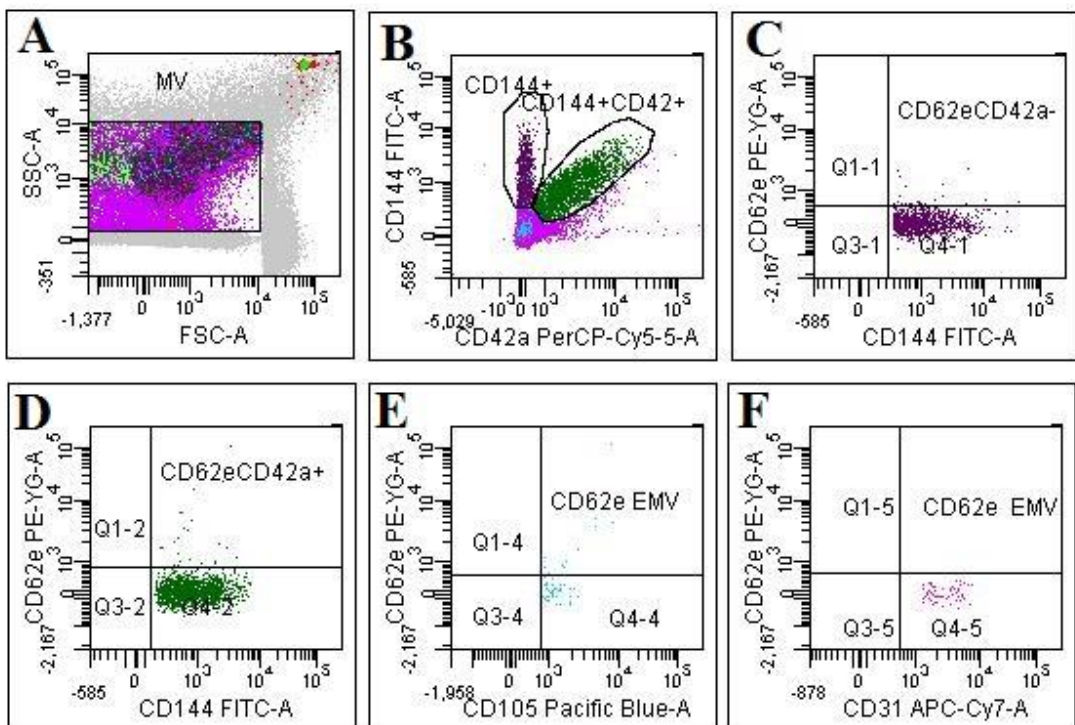
Megamix + (BioCytex, Prancūzija), kurių skersmuo 0,5, 0,9 ir 3 mikrometrai. Toks dydis buvo parinktas mikrodalelių, mažesnių už 1 mikrometrą, aptikimui. CD144 buvo parinktas, kaip pats specifiškiausias markeris endotelinėms mikrodalelėms aptikti, tačiau jis yra mažiau jautrus.

Endotelinės mikrodalelės nustatomos tėkmės citometrijos metodu, identifikuojant jų paviršiaus žymenis, kurie yra identiški ląstelių, nuo kurių atsiskyrė, žymenims [14, 15]. Pats specifiškiausias markeris EMD aptikimui – VE-kadherinas (CD144). CD144 yra endotelinų ląstelių transmembraninė adhezijos molekulė, tačiau šis vienas žymuo nėra jautrus [5, 36]. Be CD144, EMD identifikacijai naudojamas E-selektinas (CD62e). EMD, turinčios šį žymenį, siejamos su padidėjusia kardiovaskuliarinių sutrikimų rizika, ekstrakranijine stenoze [5, 36]. CD31 – trombocitų endotelinų ląstelių adhezijos molekulė. Jos kiekio padidėjimas stebimas pacientuose po pirmo arba pasikartojančio miokardo infarkto [14, 36]. Glikoproteinas IX (CD42a) – tai mažas membraninis glikoproteinas, randamas ant trombocitų. Jis formuoja nekovalentinį kompleksą su glikoproteinu Ib, kuris veikia kaip receptorių von Willebrando faktoriui [5]. Endoglinas (CD105) – endotelio transmembraninis glikoproteinas taip pat laikomas endoteliocitų proliferacijos indikatoriumi [14]. Integrinas $\beta 3$ (CD61) – integralinis ląstelės paviršiaus proteinas, dalyvaujantis ląstelių adhezijoje bei signalų perdavime.

Visi mėginiai buvo pažymėti su anti CD144-FITC, anti CD105-BV421, anti CD42a-PerCP, anti CD62e-PE, anti CD31-APC γ 7, anti CD61-APC (BD, San Jose).



3 pav. Endotelinės mikrodalės sveikame asmenyje, nustatytos tekėms citometru. A – visos detektuotos mikrodalės; B – EMD turinčios CD144+ ir CD144+42+ žymenis; C – CD62e+144+42a- pažymėtos EDM; D – CD62e+144+42a+ pažymėtos EMD; E – EMD, turinčios CD62e+105+ žymenis; F – EMD, turinčios CD62e+31+ žymenis.



4 pav. Endotelinės mikrodalės sergančiame asmenyje, nustatytos tekėms citometru. A – visos detektuotos mikrodalės; B – EMD turinčios CD144+ ir CD144+42+ žymenis; C – CD62e+144+42a- pažymėtos EDM; D – CD62e+144+42a+ pažymėtos EMD; E – EMD, turinčios CD62e+105+ žymenis; F – EMD, turinčios CD62e+31+ žymenis.

REZULTATAI

Atlikto tyrimo tikslas yra palyginti gautus duomenis *in vivo* ir *in vitro*. Statistinė analizė atlikta su RStudio programa. Atliktas duomenų normalumo tikrinimas atliekant Shapiro-Wilk testą. Duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, jei $p > \alpha$ ($\alpha = 0,05$).

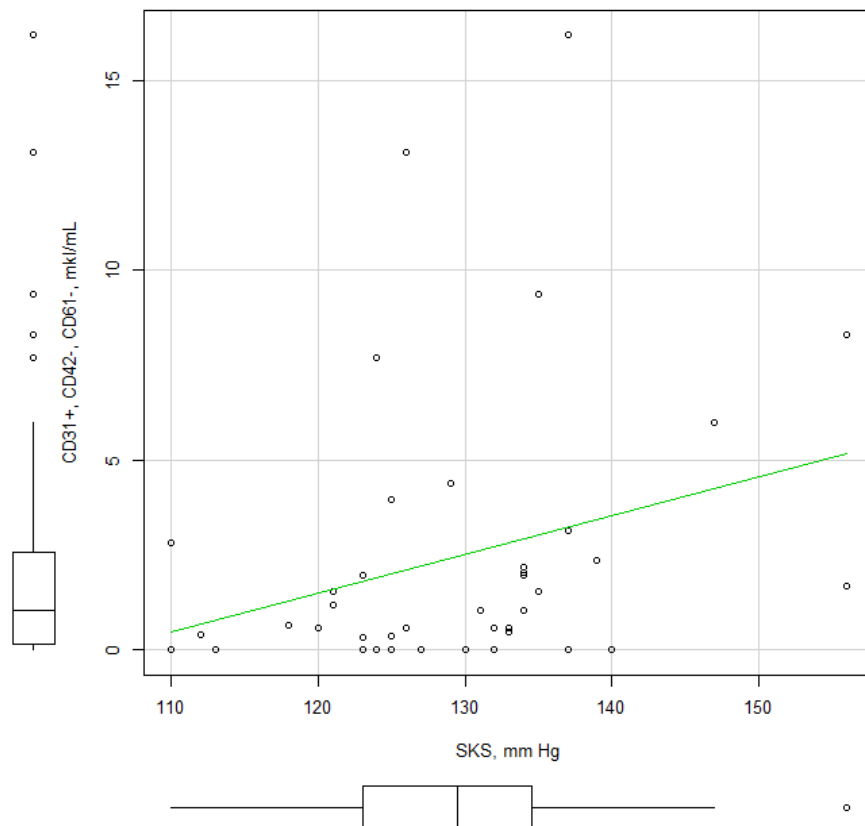
Tiriamieji kintamieji	Vidurkis	SD	Distribucija
CD144+, CD42a+	312,05	171,36	Nenormali
CD144+, CD42a-	310,2	203,42	Nenormali
CD144+	539,9	296,03	Nenormali
CD31+, CD42a-, CD61-	2,219	3,37	Nenormali
CD105+	79,63	199,47	Nenormali
CD62e+, CD144+, CD42a-	5,841	3,84	Nenormali
CD62e+, CD144+, CD42a+	54,73	40,87	Nenormali
MTL	3,08	0,79	Nenormali
SKS	131.32	12.37	Nenormali

1 lentelė. Tiriamų duomenų aprašomoji statistika.

Sveikų vyrų, 25-54 metų amžiaus, tyrimų duomenys buvo išskirstyti į dvi grupes pagal cholesterolio koncentraciją kraujyje. Pirmoje grupėje $n=41$ (n – vyrų skaičius grupėje), cholesterolio koncentracija 3,5-4,99 mmol/L. Tai yra pageidaujama cholesterolio reikšmė siekiant išvengti širdies-kraujagyslių ligų. Antroje grupėje $n=42$, cholesterolio koncentracija – 5-7,6 mmol/L. Šie asmenys yra padidėjusios rizikos grupėje ir jiems greičiau gali išsivysti išeminė širdies liga bei aterosklerozė.

Šiose abiejose grupėse buvo tiriama koreliacija tarp MTL ir SKS bei endotelinių mikrodalelių, tirtų tėkmės citometru. Kintamųjų koreliacija statistiškai reikšminga tuomet, kai $P < \alpha$ ($\alpha = 0,05$). Koreliacijos koeficientas skaičiuotas Spearman metodu.

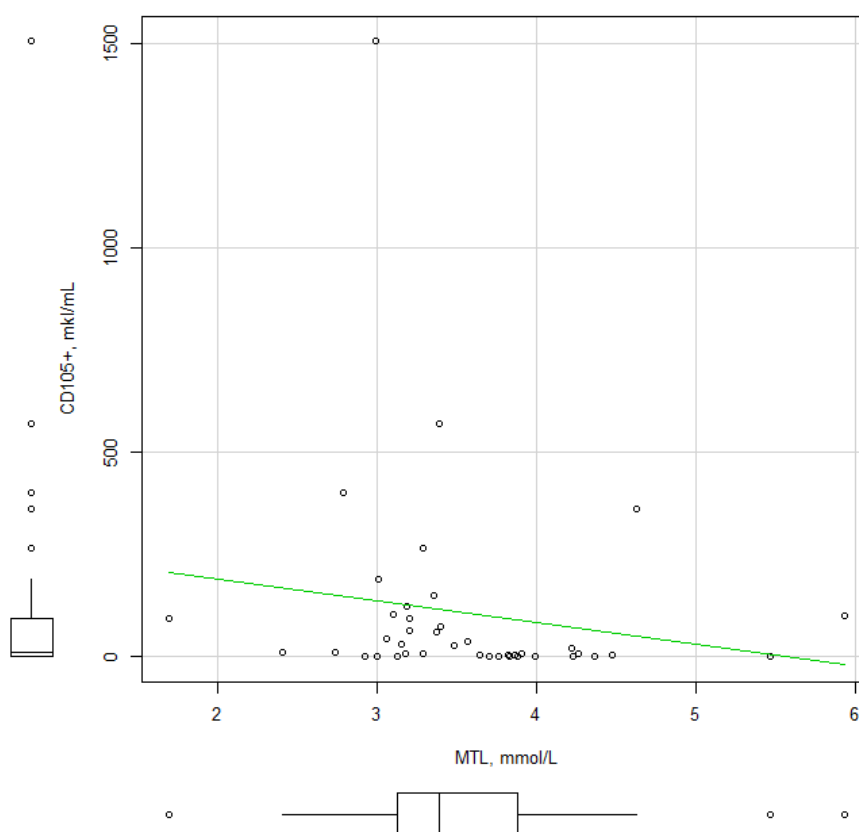
Pirmoje grupėje sistolinis kraujo spaudimas ir CD31+, CD42a-, CD61- mikrodalelės koreliuoja statistiškai reikšmingai ($P=0,0304$). Koreliacijos koeficientas ($R=0,343$) rodo nestiprią koreliaciją. Tarp kitų kintamųjų koreliacija nėra statistiškai reikšminga. Koreliuojančių kintamųjų išsibarstymo grafikas rodo esančias penkias išskirtis CD31+, CD42a-, CD61- mikrodalelių kintamųjų grupėje ir vieną išskirtį SKS kintamųjų grupėje.



5 pav. Endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD31+, CD42a- ir CD61-, ir SKS išsibirstymo grafikas.

Kadangi kintamieji SKS ir EMD, pažymėtos CD31+, CD42a- ir CD61-, koreliuoja tarpusavyje pirmoje grupėje, jiems sudarytas tiesinės regresijos modelis. Jo determinacijos koeficientas 0,08313, o pataisytas determinacijos koeficientas 0,059. Gauta tiesinės regresijos lygtis $CD31+, CD42a-, CD61- = -10,76216 + 0,10224 * (SKS)$, kur SKS – sistolinis kraujo spaudimas. Galima daryti prielaidą, jog vyrams, kurių cholesterolio koncentracija kraujyje neviršija normos ribų, padidėjęs SKS lems padidėjusią ir EMD koncentraciją, kurios turės CD31+, CD42a- ir CD61- žymenis.

Antroje grupėje, vyrams, turintiems padidėjusią cholesterolio koncentraciją, kintamasis MTL statistiškai reikšmingai koreliuoja su CD105+ ($P=0,0455$, $R=-0,314$). Kitų kintamųjų koreliacija su MTL nėra statistiškai reikšminga. Kintamųjų išsibarstymo grafikas rodo, jog tarp CD105+ kintamųjų yra 5 išskirtys, o tarp MTL yra 3 išskirtys.

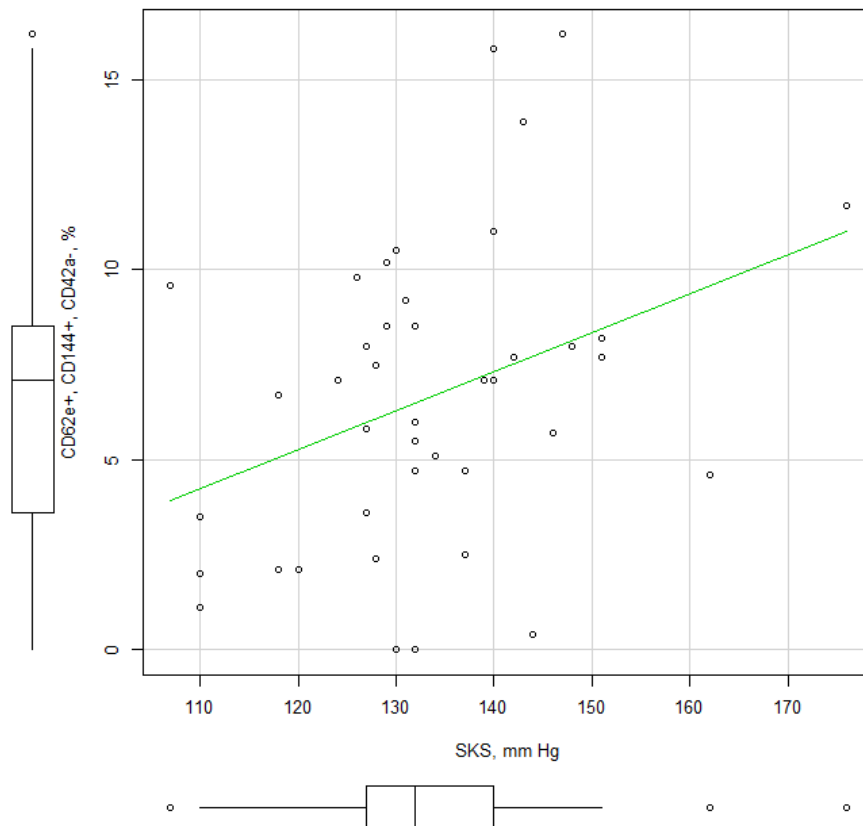


6 pav. Endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD105+, ir MTL išsibarstymo grafikas.

Kadangi kintamieji MTL ir EMD, pažymėtos CD105+ koreliuoja, jiems sudarytas tiesinės regresijos modelis. Jo determinacijos koeficientas 0,0244, o pataisytas determinacijos koeficientas -0,0006118. Gauta tiesinės regresijos lygtis $CD105+=295,49-52,8*(MTL)$, kur MTL – mažo tankio lipoproteinų koncentracija. Tad su padidėjusia MTL koncentracija mažėja ir mikrodalelių kiekis, kurios žymimos CD105+.

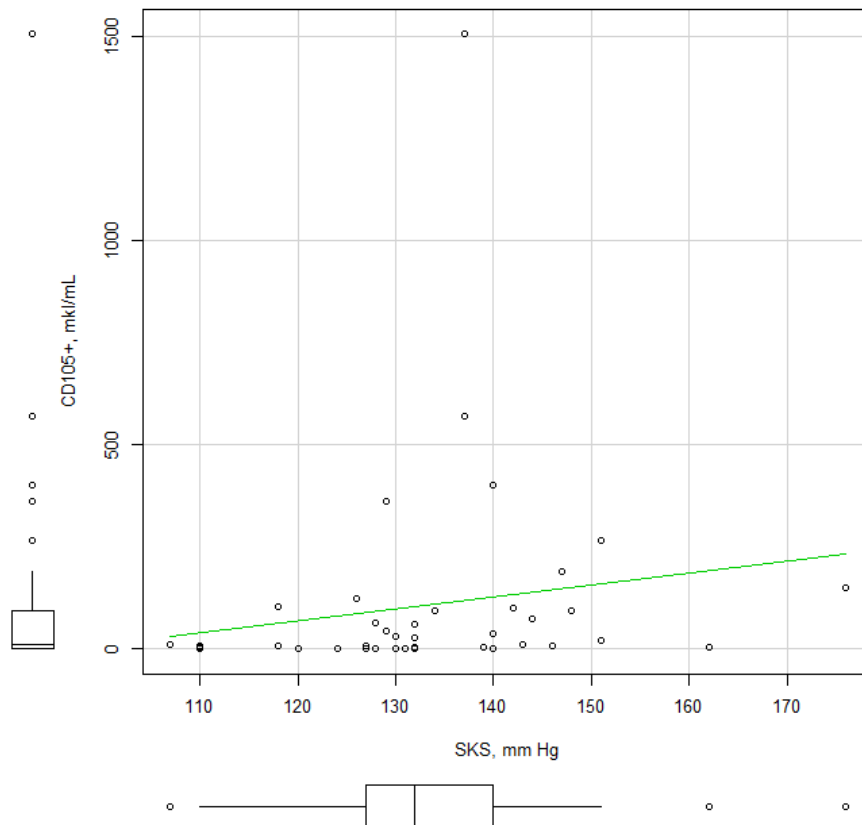
Antroje grupėje EMD, pažymėtos CD62e+, CD144+ ir CD42a-, koreliuoja su SKS ($P=0,0489$, $R=0,309$). Jiems sudarytas tiesinės regresijos modelis, kuriame determinacijos koeficientas 0,1274, o pataisytas determinacijos koeficientas 0,1051. Gauta tiesinės regresijos lygtis $CD62e+$, $CD144+$ ir $CD42a-=-7,0558+0,10265*(SKS)$, kur SKS – sistolinis kraujo spaudimas. Tokia statistinė duomenų analizė leidžia manyti, jog asmenys, turintys aukštą

cholesterolio koncentraciją bei aukštą SKS taip pat turės didesnę CD62e+, CD144+, CD42a- kieki.



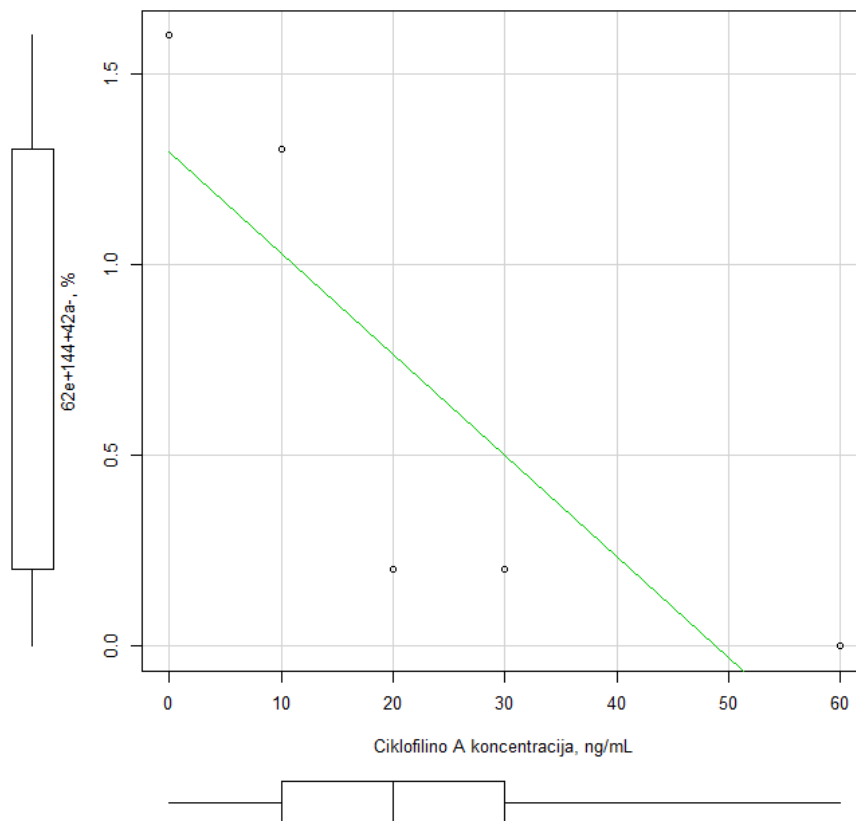
7 pav. Endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD62e+144+42a-, ir SKS išsibarstymo grafikas.

Antroje grupėje SKS taip pat koreliuoja ir su CD105+ ($P=0,0113$, $R=0,3916728$). Jiems sudarytas tiesinės regresijos modelis, kurio determinacijos koeficientas = 0,025, o pataisytas determinacijos koeficientas = 0,00028. Gauta tiesinės regresijos lygtis $CD105+ = -284,288 + 2,94 * (SKS)$, kur SKS – sistolinis kraujo spaudimas. Tokia statistinė duomenų analizė leidžia manyti, jog asmenys, turintys aukštą cholesterolio koncentraciją bei aukštą SKS taip pat turės didesnę CD105+ kieki.



8 pav. Endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD105+ ir SKS išsibarstymo grafikas.

Duomenims, gautiems *in vitro*, normalumo tikrinimas buvo atliekamas pagal Shapiro-Wilk testą. Duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, jei $p > \alpha$ ($\alpha = 0,05$). Duomenys *in vitro* buvo gauti inkubuojant endotelines mikrodaleles su skirtingomis ciklofilino koncentracijomis 24 val. Stebima koreliacija tarp ciklofilino A koncentracijos ir endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD62e+, CD144+ ir CD42a- ($P = 0,005$, $R = -0,975$).



9 pav. Endotelinių mikrodalelių, pažymėtų CD62e+144+42a-, ir ciklofilino A išsibarstymo grafikas.

Šiems dviem kintamiesiems, ciklofilinui A ir CD62e+, CD144+, CD42- mikrodalelėms, sudarytas tiesinės regresijos modelis. Šiuo atveju tiek determinacijos koeficientas, tiek ir pataisytas determinacijos koeficientas yra daugiau už 0,25 (determinacijos koeficientas 0,6923; pataisytas determinacijos koeficientas 0,5897), tad tiesinės regresijos modelis tinkamas nagrinėjamiems duomenims aprašyti. Sudaryta tiesinės regresijos lygtis $CD62e+, CD144+, CD42a- = 1,29623 - 0,02651 * (CyPA)$, kur (CyPA – ciklofilino koncentracija, ng/mL).

Lyginant duomenis, gautus *in vivo* ir *in vitro* pastebėta, jog *in vivo* SKS ir CD62e+, CD144+ ir CD42a- pažymėtos mikrodalelės koreliuoja teigiamai, o *in vitro* – ciklofilino A koncentracija koreliuoja neigiamai su CD62e+, CD144+, CD42a-. Yra žinoma, jog CyPA sukelia ląstelių apoptozę [33]. Rezultatai, gauti *in vitro*, galėjo būti paveikti sumažėjusiu ląstelių kiekiu, dėl kurio sumažėja susidariusių EMD kiekis.

APTARIMAS IR IŠVADOS

Endotelinės mikrodalės – bebranduolės membraninės pūslelės, atsiskyrusios nuo endotelio citų. Jų kiekio padidėjimas, siejamas su cukriniu diabetu, hipertenzija, širdies – kraujagyslių ligomis [1-3, 8, 11-13, 15]. Padidėjusio EMD kiekio aptikimas organizme, gali padėti diagnozuoti ligas ankstyvose stadijose, taip pagerinant ligos gydymo efektyvumą ir išėigą.

Šiame tyrime buvo tirtos endotelinės mikrodalės *in vitro*, gautos endotelio citus paveikus skirtingomis ciklofilino A koncentracijomis, ir palygintos su EMD tyrimų rezultatais, gautais *in vivo*. Sveikų vyrų grupėje, kurioje cholesterolis buvo 3,5-4,99 mmol/L, aukštas sistolinis kraujo spaudimas sąlygojo EMD, turinčių CD31+, CD42a- ir CD61- padidėjimą. EMD, turinčios CD31+, gali būti mikrovaskuliarios endotelinės apoptozės, sukeltos hipertenzijos, žymuo [42].

Antroje grupėje, kurioje kurioje cholesterolio koncentracija 5-7,6 mmol/L, aukšta MTL koncentracija neigiamai koreliuoja su EMD, kurios savo membranoje ekspresavo CD105+. Be to, aukštas SKS parodė EMD, turinčių CD105+, teigiamą koreliaciją. SKS yra aterosklerozę predisponuojantis veiksnys, tad tikėtina, jog SKS paveikti endotelio citai išskyrė didesnę EMD su CD105+ kiekį [2]. Šios EMD, galimai rodančios aktyvuotą endotelio būseną, galėtų būti ankstyvas diagnostinis žymuo aterosklerozės rizikai nustatyti [39]. *In vivo*, sergantiems cukriniu diabetu nustatytas žymiai didesnis CD105+ kiekis lyginant su sveikais tiriamaisiais [38]. Nors literatūroje duomenų nėra apie EMD, turinčių CD105+ padidėjimą sveikuose individuose, tyrimai *in vitro* parodė, jog EMD su CD105+ ekspresuojamos esant hipoksijos, kuri kaip MTL ir SKS, sukelia ląstelių pažeidimą, sąlygoms [39].

Vyrams, su padidėjusia cholesterolio koncentracija, taip pat nustatytas aukštas CD62e+, CD144+ ir CD42a- žymenis ekspresuojančių EMD kiekis, kuris teigiamai koreliuoja su SKS. EMD, turinčių CD62e+, CD144+ ir CD42a- žymenis, padidėjimas siejamas su aktyvuotu endotelium. Toks endotelis dalyvauja širdies-kraujagyslių ligų patogenezėje [8, 43]. Identifikuojant CD62e+, CD144+ ir CD42a- endotelines mikrodaleles galima identifikuoti asmenis, turinčius aukštą riziką susirgti širdies-kraujagyslių ligomis [40, 43].

Duomenys, gauti *in vitro*, parodė, jog didėjanti CyPA koncentracija mažino CD62e+, CD144+ ir CD42a- EMD. Didžiausias EMD, turinčių žymenis CD62, CD144+ bei CD42a-, kiekis buvo kontrolinėje ląstelių grupėje bei esant 10 ng/mL koncentracijai. Taip pat, EMD CD105+ kiekis didėjo didinant CyPA koncentraciją endotelio citams nuo 10 ng/mL iki 30ng/mL. Toks pats CD105+ EMD nutatytas abiejose tirtose vyrų grupėse esant normaliam SKS – 110-112 mm Hg, o SKS didėjant, atitinkamai didėja ir CD105+ pažytos EMD. Esant CyPA koncentracijai

60ng/mL, EMD CD105+ kiekis nežymiai sumažėjo. EMD sumažėjimas esant didesnei ciklofilino A koncentracijai gali būti siejamas su ciklofilino A sukelta ląstelių apoptoze [33, 41].

Lyginant EMD, pažymėtų CD62e+, CD144+, CD42a-, kieki abiejose tirtose vyrų grupėse su rezultatais *in vitro*, matoma, jog grupėje, kurioje cholesterolis neviršija normos, toks EMD kiekis aptiktas esant apie 3-4mmol/L MTL koncentracijai. Antroje grupėje, kurioje cholesterolio koncentracija virš 5 mmol/L, tą pačių EMD kiekis aptiktas esant apie 4-5,5 mmol/L MTL koncentracijai. Šiems dviems rodmenims didėjant, CD62e+, CD144+ ir CD42a- turinčių EMD kiekis atitinkamai didėja. Šis didėjimas ypač pastebimas aukštą cholesterolio koncentraciją turinčioje grupėje.

Duomenys gauti *in vitro* rodo, jog maža ciklofilino A koncentracija skatina EMD susidarymą, o didesnė koncentracija – endotelio ląstelių apoptozę [33]. Tačiau tam, kad būtų galima taikyti endotelines mikrodaleles kaip diagnostinį žymenį, reikia papildomų tyrimų. Norint gauti tikslesnę informaciją apie EMD, reikėtų detaliau išnagrinėti ciklofilino A koncentracijų poveikį endoteliocitams bei atitinkamų koncentracijų veikimą endoteliocitams laike.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 124(7): 423-41.
2. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating Microparticles. A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease. *Hypertension*. 2006; 48(2): 180-6.
3. Abid Hussein MN, Böing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost*. 2007 ;98(5): 1096-107.
4. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis*. 2013 Oct 31;4:e888.
5. Litvack ML, Post M, Palaniyar N. IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS ONE* 2011; 6(3): e17223.
6. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110:2440-8.
7. Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh Ch. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*. 2009; 94: 387-94.
8. Shiro A, Wilkinson FL, Weston R, Smyth JV, Serracino-Inglott F, Alexander MY. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2014; 234(2):295-302
9. Morel O, Jesel L, Hugel B, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, *et al*. Protective effects of vitamin C on endothelium damage and platelet activation during myocardial infarction in patients with sustained generation of circulating microparticles. *J Thromb Haemost* 1[1], 171-177 (2003).
10. Diamant M, Tushuizen ME, Abid-Hussein MN, Hau CM, Boing AN, Sturk A *et al*. Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Throm Haemost*. 2008; 100: 489-97.
11. Tramontano AF, O'Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia MV, El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 320(1): 34-8.

12. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Iwasaka T. Benidipine improves oxidized LDL-dependent monocyte and endothelial dysfunction in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens*. 2005 Jul;19(7):551-7.
13. Dignat-George F, Boulanger CM. The Many Faces of Endothelial Microparticles. *Arterioscler Thomb Vsc Biol*. 2011; 31(1): 27-33.
14. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, *et al*. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: Sources of variability within the assay. *Thromb Res* 2010; 127(4): 370–7.
15. Žėkas V, Kučinskienė ZA. Endotelinės mikrodalelės: naujas ankstyvosios aterosklerozės žymuo. *Laboratorinė medicina*. 2016; 18(2): 87-92.
16. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010; 107(9): 1047-57.
17. Burnier L, Fontana P, Angelillo-Scherrer A, Kwak BR. Intercellular communication in atherosclerosis. *Physiology*. 2009; 24: 36–44.
18. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L *et al*. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007;110:2440–2448.
19. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, *et al*. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*. 2000;6:769–775.
20. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A *et al*. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104(22): 2649–52.
21. Abid Hussein MN, Boing AN, Biro E, Hoek FJ, Vogel GM, Meuleman DG, *et al*. Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res*. 2008;121:865– 871.
22. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002;99:3962–3970.
23. Perez-Casal M, Downey C, Cutillas-Moreno B, Zuzel M, Fukudome K, Toh CH. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica*. 2009;94:387–394.

24. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells *in vitro* induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*. 2002; 99(11): 3962-70.
25. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM. p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost* 2009; 7(4): 701–9.
26. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A *et al*. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood* 2007; 110:2432–2439.
27. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P *et al*. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 673–680.
28. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C *et al*. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2009; 119: 2808–2817.
29. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens*. 2012; 6(2): 85-99.
30. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium – derived microparticles impair endothelial function *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: 1910-5.
31. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F *et al*. *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 104, 93-102 (1999).
32. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro L, Horstman LL *et al*. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 145[6], 962-970 (2003).
33. Jin Z-G, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1186–91
34. Banys V, Kučinskienė ZA, Andrejevaitė V, Kaminskas A, Jablonskienė V, Vitkus D. Ciklofilino A ir tradicinių aterosklerozės žymenų reikšmė vertinant širdies ir kraujagyslių ligas. *Laboratorinė medicina* 2014; 16(1): 3–13.
35. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nachioka K *et al*. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circulation Journal* 2013; 77: 447–55.

36. Taguchi I, Abe S, Inoue T. Cyclophilin A is a promising predictor of coronary artery disease. *Circulation Journal* 2013; 77: 321–22.
37. Santilli F, Marchisio M, Lanuti P, Boccacchia A, Miscia S, Davì G. Microparticles as new markers of cardiovascular risk in diabetes and beyond. *Thromb Haemost.* 2016 Aug 1;116(2):220-34.
38. Tramontano AF, Lyubarova R, Tsiakos J, Palaia T, Deleon JR, Ragolia L. Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:250476.
39. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost.* 2006 Jun;4(6):1296-302.
40. Soon-Tae L, Kon C, Keun-Hwa J, Jeong-Min K, Hye-Jin M, Jae-Jun B *et al.* Circulating CD62E⁺ Microparticles and Cardiovascular Outcomes. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35713.
41. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 2006 May 1;66(9):4795-801.
42. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension.* 2003 Feb;41(2):211-7.
43. Hu SS, Zhang HG, Zhang QJ, Xiu RJ. CD144(+)/EMP/CD62E(+)/EMP: a couple of new biomarkers to monitor endothelial function in hypertension with hyperlipidemia involved. *Int J Cardiol.* 2014 Jul 15;175(1):203.

SANTRAUKA

Endotelinės mikrodalelės (EMD) yra kompleksinės vezikulinės struktūros, atsiskyrusios nuo endotelinių ląstelių ir pernešančios baltymus bei genetinę informaciją, galinčią daryti įtaką ląstelių gyvybiniam procesams. EMD atlieką svarbų vaidmenį krešėjimo, uždegimo ir angiogenezės procesuose bei endotelio funkcijos palaikyme. Šiame darbe EMD buvo tirtos sveikų vyrų populiacijoje bei palygintos su susidariusiomis EMD endoteliocitų ląstelių kultūrose, paveiktose ciklofilinu A. Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes pagal cholesterolio koncentraciją kraujyje. Grupėje, kurioje cholesterolio koncentracija neviršija 5 mmol/L, sistolinis kraujo spaudimas teigiamai koreliuoja su CD105+ EMD. Kitoje grupėje, kurioje cholesterolio koncentracija yra virš 5 mmol/L, CD105+ EMD neigiamai koreliuoja su mažo tankio lipoproteinais, tačiau šioje grupėje sistolinis kraujo spaudimas teigiamai koreliuoja CD62e+, CD144+ ir CD42a- turinčiomis EMD. Šių EMD padidėjimas pastebėtas ir *in vitro*, paveikus endoteliocitus ciklofilino A 10 ng/mL koncentracija. Didesnėje ciklofilino A koncentracijoje EMD susidarymas nepastebėtas. Tai gali būti susiję su apoptotiniu ciklofilino A veikimu. Rezultatai *in vivo* ir *in vitro* rodo, jog EMD galima būtų taikyti endotelio aktyvacijos tyrimams, tačiau tam, kad būtų galima jas pritaikyti kaip naują diagnostinį įrankį, reikia papildomų tyrimų.

SUMMARY

Endothelial microvesicles (EMV) are complex vesicular structures shed from activated or apoptotic endothelial cells and carry inside a variety of proteins and genetic material that may influence the cell processes. They play a role in coagulation, inflammation, endothelial function, and angiogenesis and thus may be marker for early vascular diseases. In the present study, the presence of endothelial microvesicles in healthy male plasma were investigated using flow cytometry and compared to endothelial microvesicles shed from endothelial cells effected by cyclophilin A *in vitro*. Healthy subjects were divided into two groups according to cholesterol concentration. Results have shown that in lower cholesterol concentration group, high systolic blood pressure positively correlated with EMV CD105+. Compared with other group, where cholesterol concentration was higher, EMV CD105+ had negative correlation with concentration of low density lipoproteins. Though second group have shown positive correlation between systolic blood pressure and EMV CD62e+, CD144+, CD42a-. EMP CD62e+, CD144+ CD42a- also were elevated *in vitro* influenced by cyclophilin A at concentration of 10ng/mL. EMV increase was not observed at higher cyclophilin A concentrations. We believe apoptotic effect of cyclophilin A on endothelial cells could be blamed. These *in vivo* and *in vitro* observations indicate that endothelium activation level may be observed by identifying and counting EMV. Future research is needed to better evaluate EMV as diagnostic marker for early vascular disease.