

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vytautas
ŽEKAS

Ląstelių mikrodalelės kaip naujas
ankstyvos aterosklerozės biožymuo
sveikų ir išemine širdies liga
sergančių vyrų populiacijose

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
medicina M 001

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2015–2019 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas.

Mokslinė vadovė – prof. habil. dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

pirmininkė – prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Jonas Algis Abaravičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

dr. Reet Kurg (Tartu universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

prof. dr. Pranas Šerpytis (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. gruodžio 12 d. 13 val. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų E korpuso E122 auditorijoje. Adresas: Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius, tel. + 370 5 236 5000; el. paštas info@santa.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Vytautas
ŽEKAS

Extracellular Vesicles as a New Biomarker of Early Atherosclerosis in Healthy and Ischemic Heart Disease-Affected Male Populations

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Medical and health sciences,
Medicine M 001

VILNIUS 2019

This dissertation was written between 2015 and 2019 at the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University. The research was supported by a doctoral grant of Vilnius University.

Academic Supervisor – Prof. Habil. Dr. Zita Aušrelė Kučinskienė (Vilnius University, Medical and health sciences, medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medical and health sciences, medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Jonas Algis Abaravičius (Vilnius University, Medical and health sciences, medicine – M 001);

Prof. Dr. Dainius Characiejus (Vilnius University, Medical and health sciences, medicine – M 001);

Dr. Reet Kurg (Tartu University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Prof. Dr. Pranas Šerpytis (Vilnius University, Medical and health sciences, medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13 Hour, on 12th December 2019 in room E122 of the Vilnius University Hospital Santaros Clinics. Address: Santariškių st 2, Room E122, Vilnius, Lithuania
Tel. +370 5 236 5000 ; e-mail: info@santa.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

1. ĮVADAS	7
2. METODAI	10
3. REZULTATAI	13
4. APTARIMAS	32
5. IŠVADOS.....	35
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	37
7. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	39
8. STAŽUOTĖ	40
9. TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ	41

SANTRUMPOS

BCh – bendrasis cholesterolis
CD105 – endoglinas
CD144 – VE (vazoendotelinis)-kadherinas
CD31 (PECAM) – trombocitų ir endoteliocitų adhezijos molekulė
CD42a – glikoproteinas IX
CD61 – integrinas β 3
CD62e – E-selektinas
CRB – C reaktyvusis baltymas
DTL-C – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis
ELM – ekstraląstelinės mikrodalės
ELISA – imunofermentinė analizė (angl. *Enzyme linked immunosorbent assay*)
EMD – endotelinės mikrodalės
KŠL – koronarinė širdies liga
MTL-C – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis
MDA – malondialdehidas
NS – nėra patikimumo
PECAM – trombocitų ir endoteliocitų adhezijos molekulė
TMD – trombocitinės mikrodalės

SANTRAUKA

1. ĮVADAS

Praėjusį dešimtmetį buvo išsiaiškinta, kad ekstraląstelinės mikrodalelės (ELM) gali dalyvauti ląstelių tarpusavio bendravime. Šiuo metu yra intensyviai nagrinėjami šių veiksnių ryšiai su patologiniais procesais siekiant panaudoti juos klinikinėje ligų diagnostikoje. Aterosklerozė ir jos klinikinės formos, kaip antai koronarinė širdies liga (KŠL), yra puikus to pavyzdys. ELM gali atspindėti ląstelės funkcijas ir parodyti pažeistą audinį geriau ir greičiau nei bet kuris kitas tradicinis rodiklis. Taip pat šių mikrodalelių nešamas krovinyas dalyvauja įvairiuose tiek teigiamuose, tiek neigiamuose ląstelės vidaus procesuose. Nors apie šių dalelių funkcijas žmogaus organizme jau yra nemažai žinoma, kol kas jos nėra visiškai aiškios. Šiame darbe mikrodalelės buvo nagrinėjamos kaip aterosklerozės biožymenys. Siekiant geriau išsiaiškinti jų reikšmę, buvo taikomi keli metodai, kuriuos pasitelkus buvo galima detaliau apibrėžti didelių endotelinių (EMD) ir trombocitinių mikrodalelių (TMD) bei egzosomų (mažųjų mikrodalelių) skaičius ir sąsajas su rizikos veiksniais bei oksidacinio streso žymeniu – malondialdehidu.

1.1. Problema

Endotelinės ir trombocitinės mikrodalelės bei egzosomos būtų geras endotelio pažeidimo rodiklis, tačiau dar nėra pakankamai duomenų, kurie leistų naudoti šiuos žymenis klinikinėje praktikoje.

1.2. Tyrimo pranašumas ir naujumas

Šiame darbe pateikti duomenys gali padėti geriau suprasti ryšį tarp oksidacinio bei lėtinio streso ir endotelinių mikrodalelių susidarymo ankstyvose aterosklerozės stadijose. Galutinis tokių

tyrimų tikslas būtų šių žymenų naudojimas ankstyvai aterosklerozės ir jos klinikinių komplikacijų diagnostikai.

1.3. Tyrimo tikslas

Darbo tikslas buvo ištirti endotelines ir trombocitines mikrodaleles bei egzosomas įvertinant jų kiekio ryšį su aterosklerozės rizikos veiksniais ir oksidaciniu stresu jaunų (25–39 metų), vyresnių (40–60 metų) ir patyrusių miokardo infarktą (40–60 metų) vyrų populiacijose.

1.4. Tyrimo uždaviniai

1.4.1. Ištirti ir įvertinti endotelinių ir trombocitinių mikrodalelių kiekį sergančių ir sveikų žmonių kraujo plazmoje.

1.4.2. Ištirti ir įvertinti visas endotelines mikrodaleles, kurios turi CD62e (nustatyti skirtingų mikrodalelių aktyvacijos lygį).

1.4.3. Surasti egzosomas ir nustatyti bei įvertinti jų kiekį sveikų ir sergančių asmenų kraujyje.

1.4.4. Ištirti malondialdehido koncentraciją ir įvertinti jos ryšį su mikrodalelių kiekiais sveikų ir sergančių miokardo infarktu kraujyje.

1.4.5. Ištirti ir įvertinti lipidų žymenų (bendrojo cholesterolio, didelio ir mažo tankio lipoproteinų cholesterolio), C reaktyviojo baltymo ir gliukozės koncentracijas sveikų ir sergančių asmenų kraujyje, įvertinti šių veiksnių ryšį su mikrodalelių kiekiu bei jų aktyvacija.

1.5. Ginamieji teiginiai

1.5.1. Skirtingų ekstraląstelių mikrodalelių populiacijų kiekiai organizme ir šių kiekių tarpusavio santykiai sveikų ir sergančių asmenų skiriasi.

1.5.2. Skirtingų endotelinių mikrodalelių populiacijų aktyvacijos lygiai sveikų ir sergančių asmenų skiriasi ir yra svarbūs aterosklerozės ir endotelio pažaidos patogenezėje.

1.5.3. Egzosomų kiekiai sveikų ir sergančių asmenų skiriasi ir šie kiekiai siejasi su oksidacinio streso žymens malondialdehido koncentracija kraujyje.

1.5.4. Ekstraląstelių mikrodalelių ir egzosomų kiekiai bei mikrodalelių aktyvacijos lygis yra susiję su oksidacinio ir streso žymens malondialdehido koncentracija kraujyje.

1.5.5. Aterosklerozės rizikos veiksniai (dislipidemija, sistolinis kraujospūdis ir kt.) siejasi su mikrodalelių ir egzosomų kiekiais sveikų ir sergančių asmenų populiacijose.

2. METODAI

2.1. Tyrimo dalyvių parinkimas.

Sveiki žmonės buvo kviečiami į tyrimą nuo 2015 metų gruodžio iki 2017 metų liepos.

Pacientai, sergantys koronarine širdies liga, buvo kviečiami į tyrimą praėjus trims mėnesiams po miokardo infarkto. Jie buvo ištirti vėliau nei sveiki žmonės. Visi pacientai buvo gydyti 2018 metų sausį–vasarį Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Intensyvios kardiologijos, reanimacijos ir intensyvios terapijos ir pirmajame kardiologijos skyriuose.

2.2. Kraujo mėginių paėmimas.

EMD ir TMD kiekiui nustatyti iš alkūninės venos buvo paimta 4 ml kraujo į „Vacutainer“ tipo vakuuminius mėgintuvėlius su natrio heparinu. Pakopinė centrifugacija buvo pritaikyta siekiant išgauti betrombocitinę plazmą.

C reaktyviojo baltymo (CRB), malondialdehido (MDA), trigliceridų ir bendrojo cholesterolio (BCh) bei didelio ir mažo tankio lipoproteinų cholesterolio (DTL-C ir MTL-C) koncentracijų matavimai buvo atlikti iš kito 4 ml „Vacutainer“ tipo mėgintuvėlio, turinčio gelio, atskiriančio serumą nuo ląstelių. Mėginiai buvo paimti naktį nevalgius. Serumų mėgintuvėlis visada buvo imamas pirmas.

2.3. Derivatizacija ir didelės gebos skysčių chromatografijos metodo taikymas nustatant malondialdehido koncentraciją kraujo serume.

MDA yra lipidų peroksidacijos žymuo ir dažnai naudojamas nustatant oksidacinio streso lygį [1]. Mėginiai buvo paruošti taikant Khoschsorur ir kitų. metodą. Serumų malondialdehido koncentracija

buvo ištirta *Shimadzu Nexera X2 UHPLC* aparatu [2]. Duomenys buvo apdoroti naudojant *LabSolutions* programinę įrangą.

2.4. Tėkmės citometrija

Tyrimo buvo naudojami fluorescenciniai polistireno rutuliukai Megamix-Plus FSC (*Bio-Cytex*, Prancūzija). Šis mišinys buvo sudarytas iš žaliai fluorescuojančių 100, 300, 500 ir 900 nm dydžio rutuliukų. Pagal šiuos rutuliukus buvo nustatyta mikrodalelių, kurių spindis yra mažesnis nei vienas mikrometras, vieta taškiniame grafike. EMD ir TMD koncentracija buvo išreikšta kaip mikrodalelės/ μ l. CD62e ekspresija buvo išreikšta kaip procentinė mikrodalelių, ekspresuojančių šį žymenį, dalis nuo bendro endotelinų mikrodalelių kiekio kiekvienoje EMD populiacijoje. Nustatant CD9 ant egzosomų buvo taikomas metodas, aprašytas Mellisho ir kitų [3]. Mėginiai buvo tiriami LSRII tėkmės citometru (BD, San Jose, Kallifornija, JAV).

2.5. Tyrimai *in vitro* ląstelių kultūroje

Siekiant įsitikinti, kad aptiktos dalelės iš tikrųjų yra endotelinės mikrodalelės, buvo atliktas *in vitro* tyrimas su HUVEC endotelinų ląstelių linija (*Lonza*). Siekiant palyginti aktyvintų ir neaktyvintų ląstelių išskirtų mikrodalelių kiekių skirtumus, endotelinės ląstelės buvo augintos su ciklofilinu A (*Abcam*, Vokietija) ir be jo augimo terpėje. Mikrodalelės buvo išskirtos ir ištirtos tuo pačiu metodu kaip ir *in vivo* eksperimentuose. Tokios pačios keturios skirtingos EMD populiacijos buvo stebimos *in vitro* ir *in vivo*. Paveiktos ciklofilinu A endotelinės ląstelės generavo du kartus daugiau mikrodalelių nei tos, kurios augo ramybės sąlygomis. Reikėtų pažymėti, kad tos ląstelės, kurios augo aukštesnės nei 10 ng/ml ciklofilino A koncentracijos terpėje, generavo mažiau EMD negu tos, kurios augo nepaveiktos ciklofilino A. Tikėtina, kad taip įvyko dėl to, kad ciklofilinas A yra stiprus apoptozės sukėlėjas [4].

2.6. Western blotas

Atliekant Western bloto analizę, mėginiai buvo tirti naudojant 10 % arba 12 % poliakrilamido gelius. Buvo naudojami pirminiai antikūnai: prieš vėžinio jautrumo geną (angl. *tumour susceptibility gene 101-TSG101*), prieš flotiliną-1 (angl. *anti-flotillin-1*), prieš karščio šoko baltymą 70 (angl. *antiheat shock protein 70* (HSP70)).

2.7. Bradfordo baltymų koncentracijos kiekio analizė

Buvo naudojama skaidri 96 šulinėlių plokštelė. Į neigiamos kontrolės šulinėlį buvo dedama tik buferio. Šviesos absorbcija buvo nustatyta ties 595 nm.

2.8. Nanodalelių sekimo analizė

Dalelių dydis ir jų koncentracija mėginiuose buvo nustatyti nanodalelių sekimo analizės metodu naudojant *ZetaView* platformą (*ParticleMetrix*, Vokietija). Gauti duomenys analizuojami su *ZetaView* analizės programa (versija 8.03.08.02).

3. REZULTATAI

3.1. Klinikinės charakteristikos

Demografinės ir klinikinės charakteristikos yra pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Tirtos populiacijos demografinės ir klinikinės charakteristikos. Duomenys pateikti kaip medianos ir interkvartiliniai skirtumai arba kaip vidurkiai (tai priklauso nuo rodiklio pasiskirstymo). NS reiškia, kad jokie patikimumo neaptikta.

Rodikliai	Mediana (IQR) arba vidurkiai (SD)			P
	Jaunų sveikų asmenų grupė (25–40 metų) (n = 52)	Vyresnių sveikų asmenų grupė (40–60 metų) (n = 29)	MI patyrusių asmenų grupė (40–60 metų) (n = 15)	
Amžius, metais	Vidurkis (SD) 30,31 (0,49)	Vidurkis (SD) 47,28 (0,84)	Vidurkis (SD) 51,93 (1,54)	< 0,001
Sistolinis kraujospūdis	Mediana (IQR) 131,50 (12)	Mediana (IQR) 131 (18,50)	Mediana (IQR) 120 (15)	0,021
Diastolinis kraujospūdis	Mediana (IQR) 78,50 (8)	Mediana (IQR) 71 (17,50)	Mediana (IQR) 80 (6)	NS
Širdies susitraukimų dažnis per minutę	Vidurkis (SD) 71,35 (1,84)	Vidurkis (SD) 71,55 (2,28)	Vidurkis (SD) 67,07 (9,09)	NS
CRB koncentracija (mg/l)	Mediana (IQR) 0,46 (0,70)	Mediana (IQR) 0,60 (1,70)	Mediana (IQR) 1,78 (1,90)	0,002
MTL-C	Mediana	Mediana(IQR)	Mediana	< 0,001

koncentracija (mmol/l)	(IQR) 2,92 (0,98)	3,14 (0,97)	(IQR) 2,02 (0,9)	
DTL-C koncentracija (mmol/l)	Mediana (IQR) 1,20 (0,30)	Mediana (IQR) 1,18 (0,35)	Mediana (IQR) 1 (0,36)	NS
Trigliceridų koncentracija (mmol/l)	Mediana (IQR) 1,12 (0,59)	Mediana (IQR) 1,29 (1)	Mediana (IQR) 1,44 (0,52)	NS
BCh koncentracija (mmol/l)	Mediana (IQR) 4,79 (1,31)	Mediana (IQR) 5,08 (1,13)	Mediana (IQR) 3,73 (1,31)	< 0,001
Gliukozės koncentracija (mmol/l)	Mediana (IQR) 5,13 (0,57)	Mediana (IQR) 5,32 (0,66)	Mediana (IQR) 5,82 (3,29)	0,03
MDA koncentracija	Mediana (IQR) 92,17 (30,98)	Mediana (IQR) 101,61 (34,85)	Mediana (IQR) 154,72 (8,21)	< 0,001
Kairiojo skilvelio išmetimo frakcija	–	–	Vidurkis (SD) 45,7 (7,50)	–

3.2. Tėkmės citometrija

Visų keturių EMD populiacijų charakteristikos pateiktos 2 ir 3 lentelėse.

2 lentelė. EMD charakteristika, išreikšta medianomis ir interkvartiliniais skirtumais. Pateiktos P (statistinio patikimumo) reikšmės.

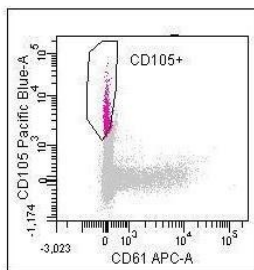
	Mikrodalelių kiekis (mikrodalelės/ μ) (mediana \pm IQR)			
Mikrodalelių populiacija	Jaunų sveikų asmenų grupė (25–40 metų)	Vyresnių sveikų asmenų grupė (40–60 metų)	Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė (40–60 metų)	P
Endoglininių EMD kiekiai	22,89 \pm 75,20	10,93 \pm 53,81	33,68 \pm 205,47	NS
VE-kadherininių be trombotinių žymenų EMD kiekiai	322,79 \pm 232,64	173,37 \pm 426,84	215,56 \pm 133,67	NS
VE-kadherininių su trombotiniais žymenimis EMD kiekiai	254,68 \pm 185,15	304,73 \pm 210,64	73,29 \pm 49,23	< 0,001
PECAM EMD kiekiai	0,63 \pm 2,16	1,94 \pm 2,62	1,38 \pm 2,02	0,04
TMD kiekiai	257,14 \pm 353,43	186,92 \pm 307,86	338,99 \pm 375	NS

3 lentelė. EMD charakteristika, išreikšta medianomis ir interkvartiliniais skirtumais. CD62e ekspresija yra skaičiuojama kaip procentinis santykis nuo bendro mikrodalelių kiekio. Pateiktos P (statistinio patikimumo) reikšmės.

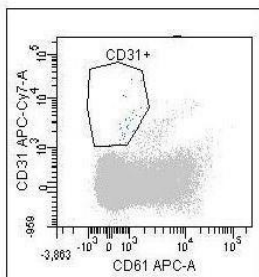
	CD62e ekspresija (%) (mediana ± IQR)			
Mikrodalelių populiacija	Jaunų sveikų asmenų grupė (25–40 metų)	Vyresnių sveikų asmenų grupė (40–60 metų)	Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė (40–60 metų)	P
Endoglininių EMD kiekiai	1,75 ± 4,58	1,40 ± 5,05	14,80 ± 17,60	< 0,001
VE-kadherininių be tromboticinių žymenų EMD kiekiai	5,55 ± 6,13	7 ± 5,95	1,80 ± 6	0,03
VE-kadherininių su tromboticiniais žymenimis EMD kiekiai	41,25 ± 87,80	63,70 ± 79,45	98,90 ± 5,80	0,002

Buvo rastos keturios skirtingos mikrodalelių populiacijos (1 pav.): 1) CD105+, CD42a– ir CD61– arba endoglino EMD; 2) CD31+, CD42a– ir CD61– arba PECAM (trombocitų ir endotelioцитų adhezijos molekulė) EMD; 3) CD144+, CD42a– ir CD61– arba VE-kadherino EMD be tromboticinių žymenų; 4) CD144+, CD42a+ ir CD61– arba VE-kadherino EMD su tromboticiniais žymenimis. Kiekviena subpopuliacija turėjo vieną endotelinį žymenį: CD105 (endoglinas), CD144 (VE-kadherinas) arba CD31 (PECAM), kuris

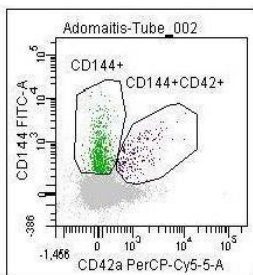
galėjo atspindėti jų funkciją. CD144+ EMD populiacijos išsiskyrimas į dvi grupes pagal trombocitinių žymenų ekspresiją ant membranos atitiko tėkmės citometrijos duomenis ir abiejų populiacijų kiekiai skirtingai koreliavo su klinikiniais žymenimis bei oksidacinio streso žymeniu – malondialdehidu.



A. Endoglino mikrodalelių nustatymas



B. PECAM mikrodalelių nustatymas



C. VE-kadherino su trombocitiniiais žymenimis ir be jų mikrodalelių nustatymas

1 pav. Skirtingų endotelinų mikrodalelių populiacijų nustatymas. A. Endoglino mikrodalelių; B. PECAM mikrodalelių; C. VE-kadherino su trombocitiniiais žymenimis ir be jų mikrodalelių.

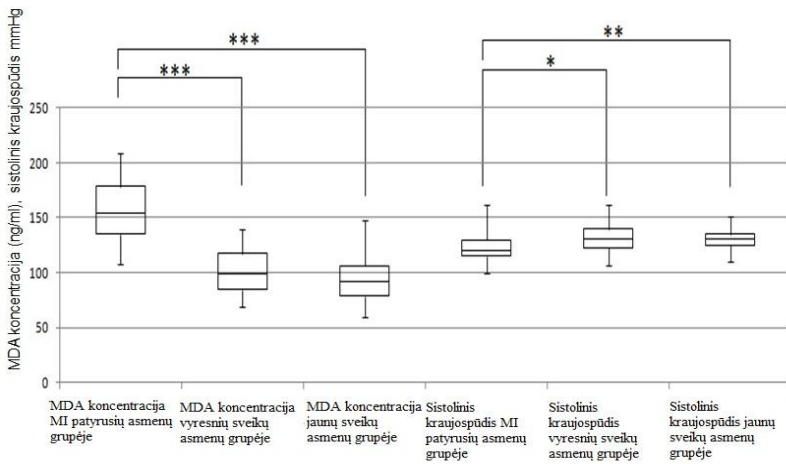
3.3. Aterosklerozės rizikos veiksnių skirtumai tarp grupių

Sergantiems asmenims buvo labiau padidėjusi MDA koncentracija ($154,72 \pm 8,21$) nei vyresniems sveikiems asmenims ($101,61 \pm 34,85$) ar jauniems sveikiems asmenims ($92,17 \pm 30,98$, $P < 0,001$). Sergančių asmenų taip pat buvo mažesnė mažo tankio lipoproteino cholesterolio koncentracija ($2,02 \pm 0,9$) nei jaunų sveikų asmenų ($2,92 \pm 0,98$) ar vyresnių sveikų asmenų ($3,14 \pm 0,97$, $P < 0,001$) ir mažesnė bendrojo cholesterolio koncentracija, palyginti su abiejų grupių sveikais asmenimis – patyrusių miokardo infarktą asmenų grupė ($3,73 \pm 1,31$), jaunų sveikų asmenų grupė ($4,79 \pm 1,31$), vyresnių sveikų asmenų grupė ($5,08 \pm 1,13$, $P < 0,001$), (1 lentelė, 2 ir 3 pav.). Buvo fiksuotas statistinis amžiaus skirtumas tarp miokardo infarktą patyrusių asmenų grupės ir vyresnių sveikų asmenų grupės. Šį skirtumą galima paaiškinti tuo, kad miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje buvo daugiau 50–60 metų asmenų, palyginti su vyresnių sveikų asmenų grupe ($d = -4,83 \pm 1,62$, $P = 0,005$).

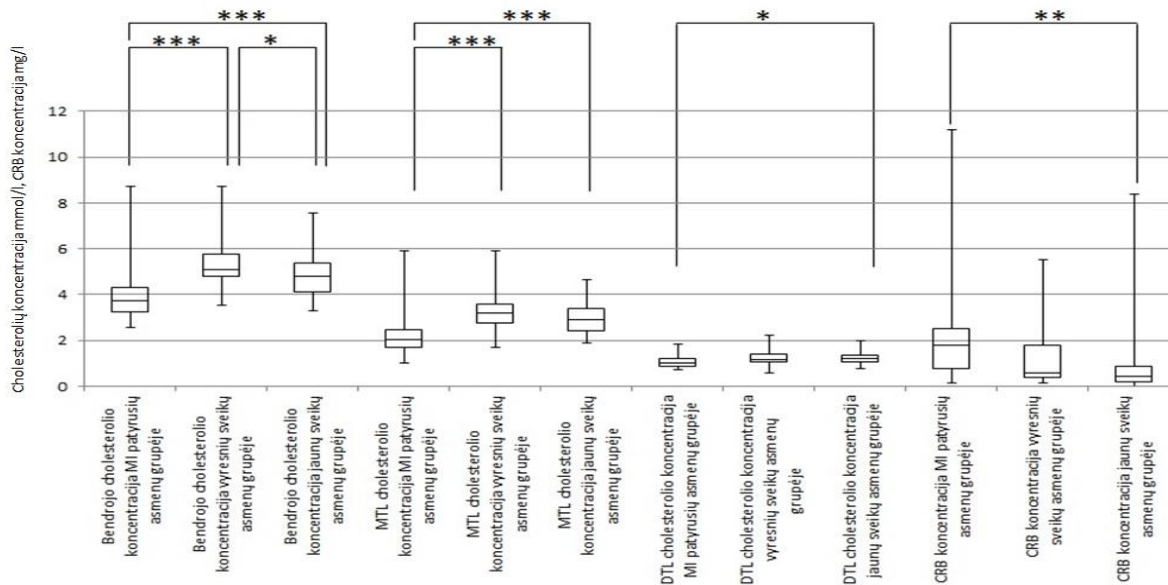
Lyginant jaunų sveikų asmenų grupę su miokardo infarktą patyrusių asmenų grupe, statistiškai reikšmingas skirtumas buvo aptiktas ištyrus MDA koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($92,17 \pm 30,98$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($154,72 \pm 8,21$, $P < 0,001$); MTL-C koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($2,92 \pm 0,98$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($2,02 \pm 0,9$, $P < 0,001$); DTL-C koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($1,2 \pm 0,3$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($1 \pm 0,36$, $P = 0,023$); CRB koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($0,46 \pm 0,7$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($1,78 \pm 1,9$, $P = 0,001$); BCh koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($4,79 \pm 1,31$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($3,73 \pm 1,31$, $P < 0,001$); gliukozės koncentraciją: jaunų sveikų asmenų grupė ($5,13 \pm 0,57$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($5,82 \pm 3,29$, $P = 0,029$) ir sistolinį kraujospūdį: jaunų sveikų asmenų grupė ($131,27 \pm 1,64$),

miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė (120 ± 15 , $P = 0,005$) (2 ir 3 pav.).

Lyginant vyresnių sveikų asmenų grupę su miokardo infarktą patyrusių asmenų grupe, statistiškai reikšmingų skirtumų buvo aptikta įvertinus MDA koncentraciją: miokardo infarktą patyrusių grupės asmenims ($154,72 \pm 8,21$) buvo nustatyta didesnė koncentracija, nei vyresnių sveikųjų grupės asmenims ($101,61 \pm 34,85$, $P < 0,001$). BCh koncentracija buvo didesnė vyresnių sveikųjų grupės asmenims ($5,08 \pm 1,13$), nei miokardo infarktą patyrusių grupės asmenims ($3,73 \pm 1,31$, $P < 0,001$). MTL-C koncentracija buvo didesnė vyresnių sveikųjų grupės asmenims ($3,14 \pm 0,97$), nei miokardo infarktą patyrusių grupės asmenims ($2,02 \pm 0,9$, $P < 0,001$). Sistolinis kraujospūdis taip pat buvo aukštesnis vyresnių sveikų asmenų grupės asmenims ($131,41 \pm 2,51$), nei miokardo infarktą patyrusių grupės asmenims (120 ± 15 , $P = 0,029$) (2 ir 3 pav.). Malondialdehido, BCh, MTL-C koncentracijos ir sistolinis kraujospūdis abiejų sveikų asmenų grupių ir pacientų reikšmingai skyrėsi (2 ir 3 pav.). Sveikų ir sergančių žmonių lipidų koncentracijos ir sistolinio kraujospūdžio skirtumai susidarė dėl statinų ir antihipertenzinio gydymo, kuris buvo taikomas sergantiesiems.



2 pav. Sveikų ir sergančių asmenų malondialdehido koncentracijos ir sistolinio kraujospūdžio palyginimas. Ūsai rodo kiekvieno rodiklio medianą ir interkvartilinį skirtumą. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

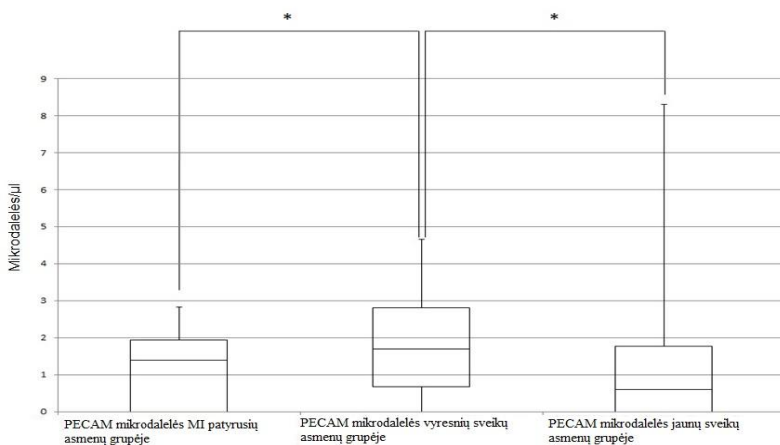


3 pav. Sveikų ir sergančių asmenų CRB ir lipidų koncentracijų skirtumai. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Lyginant abi sveikų asmenų grupes tarpusavyje, tik bendrojo cholesterolio ($4,79 \pm 1,31$ (jaunų sveikų asmenų grupė), $5,08 \pm 1,13$ (vyresnių sveikų asmenų grupė), $P = 0,021$) ir gliukozės ($5,13 \pm 0,57$ (jaunų sveikų asmenų grupė), $5,32 \pm 0,66$ (vyresnių sveikų asmenų grupė), $P = 0,05$) koncentracijos buvo statistiškai reikšmingai skirtingos.

3.4. Cirkuliuojančių endotelinių ir trombocitinių mikrodalelių kiekio skirtumai

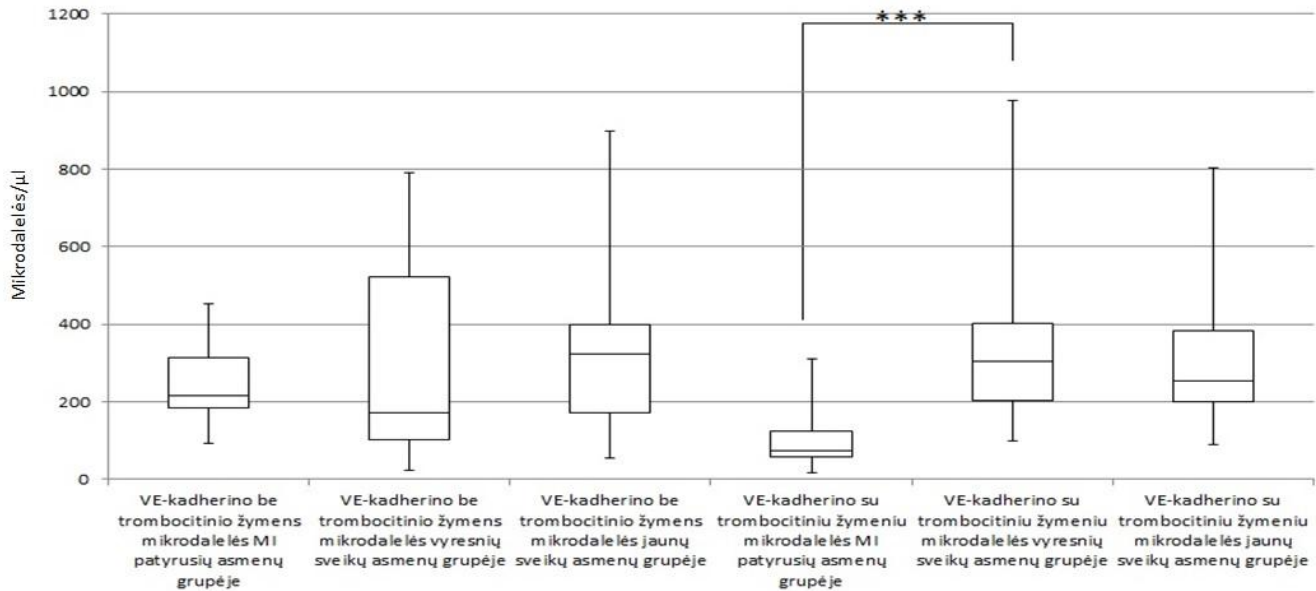
Lyginant tiriamų asmenų grupes buvo aptiktas VE-kadherino EMD su trombocitiniiais žymenimis kiekio medianos skirtumas: jaunų sveikų asmenų grupė ($254,68 \pm 185,15$), vyresnių sveikų asmenų grupė ($304,73 \pm 210,64$) ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($73,29 \pm 49,23$, $P < 0,001$) (2 lentelė, 5 pav.), taip pat PECAM EMD bendro kiekio medianos skirtumas: jaunų sveikų asmenų grupė ($0,63 \pm 2,16$), vyresnių sveikų asmenų grupė ($1,94 \pm 2,62$) ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($1,38 \pm 2,02$, $P = 0,04$) (2 lentelė, 4 pav.).



4 pav. PECAM mikrodalelių kiekio skirtumai tarp grupių.

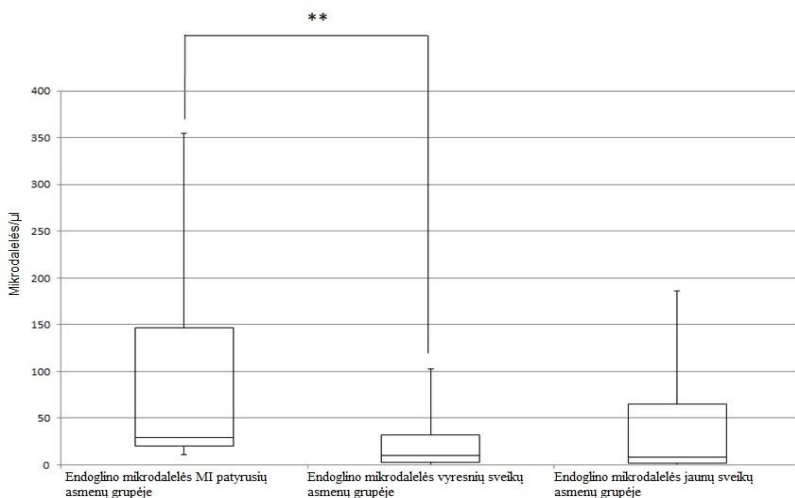
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Lyginant jaunų sveikų asmenų grupę ($254,68 \pm 185,15$) su miokardo infarktą patyrusių asmenų grupe ($73,29 \pm 49,23$, $P < 0,001$), buvo aptiktas tik VE-kadherino mikrodalelių su trombocitiniiais žymenimis kiekio medianos skirtumas. Lyginant vyresnių sveikų asmenų grupę ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupę, buvo aptiktas mikrodalelių kiekio medianos skirtumas visose EMD populiacijose, išskyrus VE-kadherino be trombocitinių žymenų: 1) VE kadherino mikrodalelių su trombocitiniiais žymenimis populiacijoje – vyresnių sveikų asmenų grupė ($304,73 \pm 210,64$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($73,29 \pm 49,23$, $P < 0,001$) (5 pav.); 2) endoglino mikrodalelių populiacijoje – vyresnių sveikų asmenų grupė ($10,93 \pm 53,81$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($33,68 \pm 205,47$, $P = 0,009$) (6 pav.); 3) PECAM mikrodalelių populiacijoje – vyresnių sveikų asmenų grupė ($1,94 \pm 2,62$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($1,38 \pm 2,02$, $P = 0,032$) (4 pav.). Lyginant abi sveikų asmenų grupes, kiekio medianos skirtumas buvo rastas PECAM mikrodalelių populiacijoje – jaunų sveikų asmenų grupė ($0,63 \pm 2,16$), vyresnių sveikų asmenų grupė ($1,94 \pm 2,62$, $P = 0,025$) (4 pav.).



5 pav. VE-kadherino mikrodalelių su trombotiniais žymenimis ir be jų kiekio skirtumai tarp grupių.

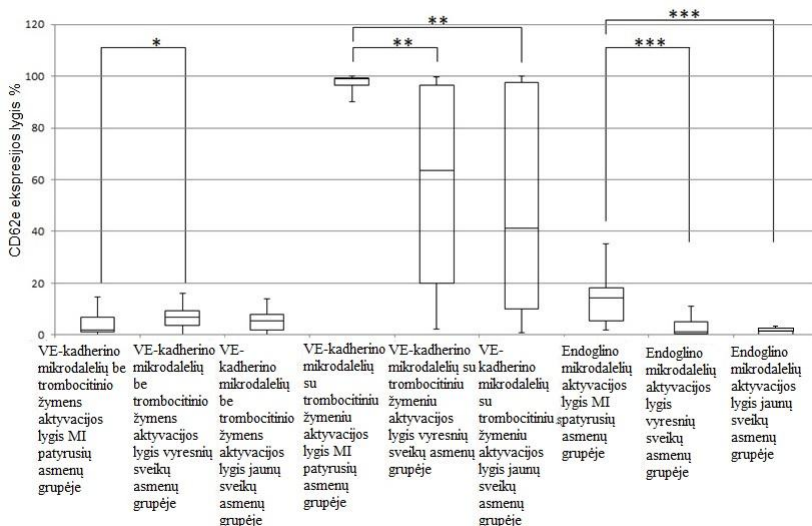
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$



6 pav. Endoglino mikrodalelių kiekio skirtumai tarp grupių. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Lyginant sveikų ir sergančių asmenų grupių CD62e ekspresiją, visų mikrodalelių populiacijose, išskyrus PECAM mikrodaleles, buvo aptikta ekspresijos skirtumų (3 lentelė, 7 pav.). Lyginant sveikų asmenų grupes, buvo rasta endoglino (jaunų sveikų asmenų grupė ($1,75 \pm 4,58$), vyresnių sveikų asmenų grupė ($1,4 \pm 5,05$), $P < 0,001$) ir VE-kadherino bei trombocitinių žymenų mikrodalelėse (jaunų sveikų asmenų grupė ($5,55 \pm 6,13$) ir vyresnių sveikų asmenų grupė ($7 \pm 5,95$), $P = 0,002$) medianos skirtumų. Lyginant vyresnių sveikų asmenų grupę su patyrusių miokardo infarktą asmenų grupe, CD62e ekspresija buvo statistiškai reikšmingai skirtinga visose mikrodalelių populiacijose, išskyrus PECAM mikrodaleles, – endoglino mikrodalelių populiacijoje (vyresnių sveikų asmenų grupė ($1,4 \pm 5,05$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($14,8 \pm 1,76$), $P < 0,001$), VE-kadherino mikrodalelių bei trombocitinių žymenų populiacijoje (vyresnių sveikų asmenų grupė ($7 \pm 5,95$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($1,8 \pm 6$), $P = 0,013$) ir VE-

kadherino su trombocitiniais žymenimis populiacijoje (vyresnių sveikų asmenų grupė ($63,7 \pm 79,45$), miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($98,9 \pm 5,8$), $P = 0,001$). Tarp jaunų sveikų asmenų grupės ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupės buvo rastas aktyvacijos lygio statistiškai reikšmingas endoglinio (jaunų sveikų asmenų grupė ($1,75 \pm 4,58$) ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($14,8 \pm 17,6$), $P < 0,001$) ir VE-kadherino su trombocitiniais žymenimis mikrodalelių populiacijų (jaunų sveikų asmenų grupė ($41,25 \pm 87,8$) ir miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė ($98,9 \pm 5,8$), $P = 0,002$) skirtumas (7 pav.). Sveikų asmenų grupių mikrodalelių aktyvacijos lygio medianos skirtumų nebuvo rasta. Ant PECAM mikrodalelių membranos CD62e nebuvo aptiktas.



7 pav. Aktyvacijos lygio (CD62e raiška ant mikrodalelių membranos) skirtumai tarp grupių. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

3.5. Tradicinių žymenų ir endotelinių mikrodalelių kiekio bei jų aktyvacijos lygio sąsajos

Jaunų sveikų asmenų grupėje CD62e+ ekspresijos lygis endoglinio populiacijoje neigiamai koreliavo su amžiumi. Vyresnių sveikų asmenų grupėje taip pat buvo rastos koreliacijos su mikrodalelių kiekiais: 1) bendras kiekis VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų neigiamai koreliavo su DTL-C koncentracija ($R = -0,37$, $P = 0,046$); 2) TMD kiekis teigiamai koreliavo su amžiumi ($R = -0,39$, $P = 0,036$); 3) endoglinio mikrodalelių bendras kiekis neigiamai koreliavo su DTL-C koncentracija ($R = -0,47$, $P = 0,011$); 4) CD62e+ ekspresijos lygis endoglinio mikrodalelėse neigiamai koreliavo su DTL-C koncentracija ($R = -0,64$, $P < 0,001$).

Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje buvo rastos šios koreliacijos: 1) bendras VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų kiekis neigiamai koreliavo su BCh koncentracija ($R = -0,63$, $P = 0,011$) ir MTL-C koncentracija ($R = -0,68$, $P = 0,005$); 2) bendras endoglinio mikrodalelių kiekis neigiamai koreliavo su BCh koncentracija ($R = -0,64$, $P = 0,01$) ir MTL-C koncentracija ($R = -0,69$, $P = 0,004$) ir teigiamai koreliavo su sistoliniu kraujospūdžiu ($R = 0,54$, $P = 0,038$); 3) CD62e ekspresijos lygis VE-kadherino be trombocitinių žymenų mikrodalelėse teigiamai koreliavo su DTL-C koncentracija ($R = 0,78$, $P = 0,001$) ir neigiamai – su sistoliniu kraujo spaudimu ($R = -0,54$, $P = 0,037$); 4) CD62e ekspresijos lygis VE-kadherino mikrodalelėse su trombocitininiais žymenimis neigiamai koreliavo su gliukozės koncentracija ($R = -0,65$, $P = 0,009$) ir sistoliniu kraujo spaudimu ($R = -0,53$, $P = 0,04$). Jokių koreliacijų su aktyvacijos lygiu endoglinio mikrodalelėse nebuvo aptikta. Tai rodo galimus funkcinius skirtumus tarp VE-kadheriną ir endogliną ekspresuojančių mikrodalelių.

Širdies dažnis ir diastolinis kraujospūdis neturėjo jokio ryšio su EMD visose trijose grupėse.

3.6. Mikrodalelių kiekio ir malondialdehido koncentracijos kraujo serume ryšys

Jaunų sveikų asmenų grupėje tik VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų koncentracija teigiamai koreliavo su MDA koncentracija ($R = 0,28$, $P = 0,04$). Vyresnių sveikų asmenų grupėje MDA koncentracija teigiamai koreliavo su TMD koncentracija ($R = 0,64$, $P < 0,001$), VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų koncentracija ($R = 0,49$, $P = 0,007$), endoglinto mikrodalelių koncentracija ($R = 0,38$, $P = 0,04$) ir su aktyvacijos lygiu endoglinto mikrodalelėse ($R = 0,49$, $P = 0,008$).

Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje nebuvo rasta jokio ryšio tarp MDA koncentracijos ir mikrodalelių kiekio ar jų aktyvacijos lygio.

3.7. Ryšiai tarp atskirų endotelinių mikrodalelių populiacijų

Jaunų sveikų asmenų grupėje VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų koncentracija teigiamai koreliavo su bendra endoglinto mikrodalelių koncentracija ($R = 0,41$, $P = 0,003$) ir aktyvacijos lygiu endoglinto mikrodalelėse ($R = 0,37$, $P = 0,007$). Endoglinto mikrodalelių koncentracija teigiamai koreliavo su aktyvacijos lygiu VE-kadherino be trombocitinių žymenų mikrodalelių populiacijoje ($R = 0,42$, $P = 0,002$) ir aktyvacijos lygiu VE-kadherino su trombocitininiais žymenimis mikrodalelių populiacijoje ($R = 0,66$, $P < 0,001$).

Vyresnių sveikų asmenų grupėje endoglinto mikrodalelių koncentracija teigiamai koreliavo su VE-kadherino be trombocitinių žymenų mikrodalelių koncentracija ($R = 0,69$, $P < 0,001$) ir su VE-kadherino su trombocitininiais žymenimis mikrodalelių koncentracija ($R = 0,47$, $P = 0,01$). Taip pat toje pačioje grupėje aktyvacijos lygis endoglinto mikrodalelių populiacijoje turėjo neigiamą ryšį su TMD koncentracija ($R = 0,47$, $P = 0,018$) ir teigiamai koreliavo su VE-kadherino mikrodalelių be trombocitinių žymenų populiacijos

koncentracija ($R = 0,48$, $P = 0,009$). Aktyvacijos lygis VE-kadherino mikrodalelėse su trombocitinais žymenimis teigiamai koreliavo su endoglinio mikrodalelių koncentracija ($R = 0,53$, $P = 0,003$).

Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje VE-kadherino be trombocitinių žymenų mikrodalelių populiacija teigiamai koreliavo su endoglinio mikrodalelių populiacijos koncentracija ($R = 0,64$, $P = 0,01$) ir neigiamai su CD62e ekspresija VE-kadherino mikrodalelėse su trombocitinais žymenimis ($R = -0,76$, $P = 0,001$). CD62e ekspresija endoglinio mikrodalelėse neigiamai koreliavo su PECAM mikrodalelių bendru kiekiu ($R = -0,57$, $P = 0,027$). Aktyvacijos lygis VE-kadherino mikrodalelėse su trombocitinais žymenimis neigiamai koreliavo su TMD ($R = -0,56$, $P = 0,031$) ir endoglinio mikrodalelių koncentracijomis ($R = -0,76$, $P = 0,001$).

3.8. Santykiai tarp skirtingų endotelinių ir trombocitinių mikrodalelių koncentracijų ir jų aktyvacijos lygio

Nustačius ryšį tarp mikrodalelių populiacijų kiekių, buvo nuspręsta apskaičiuoti santykius tarp šių mikrodalelių populiacijų ir juos įvertinti. EMD aktyvacijos lygis taip pat buvo įtrauktas į analizę, tačiau santykis tarp mikrodalelių kiekių ir jų aktyvacijos lygio nebuvo skaičiuojamas dėl nesutampančių matavimo dimensijų. Tiek santykis tarp endoglinio mikrodalelių ir VE-kadherino mikrodalelių su trombocitinais žymenimis koncentracijų ($P < 0,001$), tiek santykis tarp endoglinio mikrodalelių ir VE-kadherino be trombocitinių žymenų mikrodalelių koncentracijų ($P = 0,011$) buvo statistiškai reikšmingi. Santykis tarp aktyvintų endoglinio ir aktyvintų VE-kadherino su trombocitinais žymenimis mikrodalelių lygių taip pat reikšmingai skyrėsi ($P = 0,002$). TMD koncentracija taip pat buvo įtraukta į skaičiavimus ir jos santykis su VE-kadherino mikrodalelių su trombocitinais žymenimis koncentracija buvo reikšmingas ($P = 0,001$).

3.9. Cirkuliuojančių egzosomų (mažųjų mikrodalelių) skaičius

Remiantis nanodalelių sekimo analize (*Zeta View, Particle metrix*, Vokietija) buvo rastas dalelių koncentracijos medianos skirtumas tarp miokardo infarktą patyrusių asmenų grupės ($3,1 \cdot 10^{10}/\text{ml}$) ir vyresnių sveikų asmenų grupės ($7,07 \cdot 10^{10}/\text{ml}$, $P < 0,001$). Sveikiems žmonėms koncentracija buvo didesnė nei asmenims, patyrusiems miokardo infarktą. Nagrinėjant dalelių dydį ar tūrį, tarp grupių nebuvo rasta jokio skirtumo.

Tetraspanino CD9 ekspresija ant mažųjų mikrodalelių membranos buvo nustatoma naudojant tėkmės citometriją. Vidutinio fluorescencijos intensyvumo ir procentinio santykio nuo visų įvykių skaičiaus analizė parodė, kad sveiki žmonės turėjo didesnį kiekį mažųjų mikrodalelių nei miokardo infarktą patyrusių grupės asmenys (MFI – $275 \pm 39,5$ (vyresnių sveikų asmenų grupė), 252 ± 13 (miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė), $P < 0,001$, įvykių procentinė dalis – $23,01 \% \pm 17,4$ (vyresnių sveikų asmenų grupė) $1,3 \% \pm 0,6$ (miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė), $P < 0,001$). Analizuojant bendrą baltymų koncentraciją, didesnis jų kiekis buvo aptiktas pacientų mėginiuose ($1,01 \mu\text{g}/\text{ml} \pm 0,49$ (vyresnių sveikų asmenų grupė) $1,95 \mu\text{g}/\text{ml} \pm 1,07$ (miokardo infarktą patyrusių asmenų grupė), $P = 0,001$). Mėginio priemaišos gali būti šio fenomeno priežastis, nes nanodalelių sekimo analizės duomenys koreliavo su Bradfordo tyrimo rezultatais sveikų asmenų grupėje, bet nekoreliavo miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje.

3.10. Egzosomų (mažųjų mikrodalelių) fenotipavimas

TSG101, flotilinas-1 ir karščio ir šoko baltymas 70 ant egzosomų membranos nustatyti taikant Western bloto metodą, bet buvo matomas tik TSG101. Flotilino 1 buvimas ant membranos buvo patvirtintas tėkmės citometrijos metodu, naudojant po 4 mėginius iš kiekvienos grupės.

3.11. Ryšiai tarp tradicinių aterosklerozės žymenų, malondialdehido koncentracijos ir mažųjų mikrodalelių koncentracijos bei CD9 mažųjų mikrodalelių kiekio.

Sveikų vyresnių asmenų grupėje MDA koncentracija koreliavo su mažųjų mikrodalelių koncentracija, nustatyta nanodalelių sekimo analizės metodu ($R = 0,4$, $P = 0,003$), vidutiniu CD9 ekspresuojančių mažųjų mikrodalelių fluorescencijos intensyvumu ($R = 0,49$, $P = 0,008$) ir CD9 ekspresuojančių mažųjų mikrodalelių procentine dalimi nuo bendro įvykio skaičiaus ($R = 0,55$, $P = 0,002$). Miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje jokių ryšių neaptikta.

Sveikų vyresnių asmenų grupėje taip pat buvo rasta koreliacija tarp didelio tankio lipoproteinų cholesterolio koncentracijos ir mažųjų mikrodalelių koncentracijos ($R = 0,46$, $P = 0,01$).

3.12. Tioredoksino nustatymas Western bloto metodu

Tioredoksino, taikant Western bloto metodą, buvo rasta visuose mėginiuose, tačiau atliekant ELISA analizę jokio tioredoksino aktyvumo nebuvo aptikta. Galima teigti, kad tioredoksinas yra lokalizuotas labiau mažųjų mikrodalelių viduje, bet ne ant membranų.

4. APTARIMAS

Šio darbo tikslas buvo nustatyti mikrodalelių kiekio skirtumus tarp sveikų asmenų (skirtinguose laiko intervaluose) ir pacientų, kuriems nuo miokardo infarkto yra praėję trys mėnesiai. Buvo nustatytos keturios skirtingos endotelinių mikrodalelių grupės ir rastas ryšys tarp šių dalelių kiekio ir oksidacinį stresą parodančio veiksnio – malondialdehido koncentracijos kraujo serume. Taip pat CD62e (e-selektino) ekspresijos ant mikrodalelių membranų lygis buvo aukštesnis asmenims, kurie turėjo širdies ir kraujagyslių rizikos veiksnių.

MDA koncentracija buvo susijusi su padidėjusiu mikrodalelių kiekiu abiejose sveikų asmenų grupėse, bet ne miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje. Taip pat buvo aiškiai matyti, kad VE-kadherino mikrodalelių kiekiai skirtingai koreliavo su aterosklerozės rizikos veiksniais – tai priklausė nuo CD42a buvimo ant jų membranų. Tos, kurios turėjo CD42a, buvo labiau susijusios su aterosklerozės rizikos veiksniais, o neturinčios CD42a – su oksidaciniu stresu. Tikėtina, kad toks rezultatas buvo gautas dėl šių mikrodalelių skirtingų funkcijų organizme, kurios, greičiausiai, susijusios su šių mikrodalelių nešamomis adhezijos molekulėmis.

Analizuojant rizikos veiksnių ryšį su mikrodalelių kiekiais ar jų aktyvacijos lygiu, buvo aiškiai matomas skirtumas tarp endogliną ar VE-kadheriną nešančių endotelinių mikrodalelių. Tai aiškiai matoma lyginant DTL-C koncentracijos sąsajas su endotelinių mikrodalelių populiacijų kiekiu ir aktyvacijos lygiu. Skirtingos studijos rodo, kad padidėjęs VE-kadherininą ir E-selektiną nešančių mikrodalelių kiekis yra siejamas su dislipidemija [5]. Tačiau yra gaunama ir prieštaraujančių duomenų. Vienoje studijoje buvo nustatyta, kad endogliną ir VE-kadheriną mikrodalelių kiekiai nesiskyrė sveikų asmenų ir asmenų, sergančių KŠL [6].

Mikrodalelių kiekiai dažniau skyrėsi tarp pacientų ir vyresnių sveikų asmenų: VE-kadherino mikrodalelių daugiau buvo sveikų asmenų grupėje, o endogliną mikrodalelių daugiau miokardo

infarktą patyrusių asmenų grupėje. Tas pats matyti ir nagrinėjant šių populiacijų aktyvacijos lygius. Abu žymenys dalyvauja endotelio pažaidos ir reparacijos mechanizmuose. VE-kadherinas yra reikalingas siekiant palaikyti endotelio barjerą, taip pat atlieka ląstelės jungties molekulės funkciją [7]. Ši molekulė yra aprašoma kaip tikėtina susijusi su endotelio pažaida [8]. Jos fosforilinimo ir degradacijos procesai yra glaudžiai susiję su limfocitų ir neutrofilų migracija per endotelio sluoksnį [9]. Endoglino molekulė yra kaip papildomas transformuojančio augimo faktoriaus β (TGF β) receptorių ir yra reikalinga endotelio aktyvacijos procese [10]. Endoglinas paprastai yra siejamas su sveiku endotelium ir atvirkščiai koreliuoja su koronarinės aterosklerozės sunkumu [11]. Tikėtina, kad VE-kadherino mikrodalelės labiau susijusios su uždegimu, o endoglino – su sveiko endotelio regeneracijos procesais. Reikėtų pažymėti, kad, lygindami jaunesnių sveikų asmenų grupę su miokardo infarktą patyrusių asmenų grupe, tokio skirtumo nematome, tačiau tikėtina, kad tam turėjo įtakos taikomas gydymas. Statinai yra aprašyti literatūroje kaip galintys mažinti EMD sintezę [12], tačiau yra ir tam prieštaraujančių rezultatų [13]. Kitas galimas paaiškinimas yra, kad mikrodalelių išskyrimas didėjant amžiui skiriasi dėl atsirandančių pokyčių endotelio sluoksnyje. Taikomas gydymas galėjo sumažinti pažeidžiamą tirtų žymenų poveikį endotelio ląstelėmis ir taip pakeisti endotelinių mikrodalelių kiekius ir tarpusavio santykius. Tačiau reikėtų nepamiršti ryšio su DTL-C koncentracija, nes didelio tankio lipoproteinų cholesterolis yra žinomas kaip atliekantis antioksidacinę protekcinę funkciją [14], todėl dalis aptariamų mikrodalelių gali turėti protekcinę funkciją.

Taip pat buvo atliktas egzosomų arba mažųjų mikrodalelių tyrimas, tačiau į jį buvo įtraukta tik vyresnių sveikų asmenų grupė ir pacientai. Taip buvo pasielgta nustatant, kad, tiriant didesnes mikrodaleles, tarp šių grupių buvo rasta ryškesnių skirtumų. Vertinant mažųjų mikrodalelių tyrime gautus duomenis matyti, kad skirtumai tarp grupių buvo panašūs į gautus mikrodalelių tyrime, ir tai rodo ryšį tarp mažų ir didelių mikrodalelių. Egzosomų

mėginiuose buvo nustatytas tioredoksinas, kuris yra žinomas kaip antioksidantas [15]. Taip pat buvo nustatytas mažųjų mikrodalelių kiekio ir CD9 ekspresijos ryšys su malondialdehido koncentracija. Tai rodo jų dalyvavimą oksidacinio streso procese ir vėliau atsirandančioje endotelio pažeidime.

Apibendrinant rezultatus yra aiškiai matomas CD62e arba e-selektino vaidmuo pažeidžiant endotelį. Mikrodalelių, nešančių šį žymenį, kiekių skirtumai tarp grupių, ryšiai su aterosklerozės rizikos faktoriais ar malondialdehido koncentracija aiškiai rodo, kad yra svarbu ne tik įvertinti patį mikrodalelių kiekį, bet ir nustatyti, kokia jų dalis neša CD62e. Tai gali būti reikšmingas ankstyvo endotelio pažeidimo žymuo.

5. IŠVADOS

1. Sveikų ir sergančių (patyrusių miokardo infarktą) asmenų kraujyje buvo rastos keturios skirtingos endotelinių mikrodalelių populiacijos:
 - a) VE-kadherino žymenį turinčiose mikrodalelių populiacijose:
 - 1) VE-kadherino mikrodalelių, nešančių trombocitinį žymenį, kiekis buvo didžiausias vyresnių sveikų asmenų grupėje ($304,73 \pm 210,64$ mikrodalelės/ μ l), mažiausias miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje ($73,29 \pm 49,23$ mikrodalelės/ μ l).
 - 2) VE-kadherino mikrodalelių, kurios neneša trombocitinio žymens, kiekis buvo didžiausias jaunų sveikų asmenų grupėje ($322,79 \pm 232,15$ mikrodalelės/ μ l), mažiausias vyresnių sveikų asmenų grupėje ($173,37 \pm 426,84$ mikrodalelės/ μ l).
 - b) PECAM žymenį turinčių mikrodalelių kiekis didžiausias vyresnių sveikų asmenų grupėje ($1,94 \pm 2,62$ mikrodalelės/ μ l), mažiausias jaunų sveikų asmenų grupėje ($0,63 \pm 2,16$ mikrodalelės/ μ l).
 - c) Endoglininių mikrodalelių kiekiai buvo gerokai mažesni sveikų asmenų grupėse: mažiausi vyresnių sveikų asmenų grupėje ($10,93 \pm 53,81$ mikrodalelės/ μ l) ir didžiausi miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje ($33,68 \pm 205,47$ mikrodalelės/ μ l).
 - d) Trombocitinių mikrodalelių kiekių skirtumų tarp grupių nebuvo aptikta.
2. Aktyvacijos lygis (CD62e ekspresija) buvo aukštesnis miokardo infarktą patyrusių asmenų grupėje visose endotelinių mikrodalelių populiacijose, išskyrus VE-kadherino mikrodaleles, kurios neturėjo trombocitinio žymens (endoglino mikrodalelių populiacijoje ($14,8 \pm 17,6$ %), VE-kadherino be trombocitinio žymens mikrodalelių populiacijoje ($1,8 \pm 6$ %)); VE-kadherino su trombocitiniu žymeniu mikrodalelių populiacijoje ($98,9 \pm 5,8$

%). Tai rodo, kad mikrodalelių kiekiai ir aktyvacijos lygis yra vienodai svarbūs.

3. Egzosomų (mažųjų mikrodalelių) koncentracija, nustatyta nanodalelių sekimo analizės metodu, buvo didesnė vyresnių sveikų asmenų grupėje ($7,07 \cdot 10^{10}/\text{ml} \pm 3$), nei MI patyrusių asmenų grupėje ($3,1 \cdot 10^{10}/\text{ml} \pm 1,9$).
4. Malondialdehido koncentracija koreliavo su VE-kadherino mikrodalelių (neturinčių trombocitinio žymens) kiekiu jaunų ir vyresnių sveikų asmenų grupėse, su endoglinto mikrodalelių kiekiu ir su jų aktyvacijos lygiu – vyresnių sveikų asmenų grupėje, taip pat su trombocitinių mikrodalelių kiekiu vyresnių sveikų asmenų grupėje. Buvo aptiktas malondialdehido koncentracijos ryšys su mažųjų mikrodalelių koncentracija vyresnių sveikų asmenų grupėje, o tioredoksino buvo rasta mažųjų mikrodalelių mėginiuose. Tai rodo ryšį tarp mikrodalelių, egzosomų (mažųjų mikrodalelių) ir oksidacinio streso.
5. Ryšiai su aterosklerozės rizikos faktoriais:
 - 5.1. VE-kadherino be trombocitinio žymens ir endoglinto mikrodalelių kiekiai koreliavo su bendro, mažo ir didelio tankio lipoproteinų cholesterolio koncentracijomis ir pacientų, ir sveikų asmenų kraujo mėginiuose. Endoglinto mikrodalelių e-selektino ekspresija sveikiems asmenims buvo susijusi su didelio tankio cholesterolio koncentracija.
 - 5.2. E-selektino ekspresija VE-kadherino mikrodalelėse, kurios neturėjo trombocitinio žymens, buvo susijusi su sistoliniu kraujospūdžiu. Ryšiai rodo, kad ligos procese dalyvauja endotelinės, bet ne trombocitinės mikrodalelės.

6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk BO, Isbilen E, Tutuncu NB. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2009; 70:469–474.
2. Khoschorur GA, Winklhofer-Roob BM, Rabl H et al. Evaluation of a Sensitive HPLC Method for the determination of malondialdehyde, and application of the Method to Different Biological Materials. *Chromatographia* 2000; 52:181.
3. Mellisho EA, Velásquez AE, Nuñez MJ, Cabezas JG, Cueto JA, Fader C et al. Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced *in vitro*. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5):e0178306.
4. Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C et al. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*. 2004; 23 (8):1514–1521.
5. Hu SS, Zhang HG, Zhang QJ, Xiu RJ. CD144⁺ EMPs/CD62E⁺ EMPs: A couple of new biomarkers to monitor endothelial function in hypertension with hyperlipidemia involved. *International Journal of Cardiology*. 2014; 175 (1):203.
6. Berezin AE, Kremzer AA, Berezina TA, Martovitskaya YV. Pattern of circulating microparticles in chronic heart failure patients with metabolic syndrome: Relevance to neurohumoral and inflammatory activation. *BBA Clinical*. 2015; 4:69–75.
7. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: A wacky comradeship. *Cell Adhesion & Migration*. 2014; 8 (2):158–164.

8. Zhang LZ, Lei S. Changes of junctions of endothelial cells in coronary sclerosis: A review. *Chronic Diseases and Translational Medicine*. 2016; 2 (1):22–26.
9. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou A-P, Lampugnani MG et al. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *Journal of Cell Science*. 2008; 121:29–37.
10. Park SY, DiMaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways. *Journal of Cell Science*. 2013; 126:1392–1405.
11. Saita E, Miura K, Suzuki-Sugihara N, Miyata K, Ikemura N, Ohmori R et al. Plasma soluble endoglin levels are inversely associated with the severity of coronary atherosclerosis – brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2016; 37:49–52.
12. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 320–1:34–38.
13. Badimon L, Suades R, Arderiu G, Peña E, Chiva-Blanch G, Padró T. Microvesicles in atherosclerosis and angiogenesis: From bench to bedside and reverse. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2017; 4:77.
14. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clinical*. 2017; 8:66–77.
15. Chettimada S, Lorenz DR, Misra V et al. Exosome markers associated with immune activation and oxidative stress in HIV patients on antiretroviral therapy. *Scientific Reports*. 2018; 8 (1):7227.

7. PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Žėkas V, Kuėinskienė ZA. Endotelinės mikrodalelės: naujas ankstyvosios aterosklerozės žymuo. *Laboratorinė medicina*. 2016; 18 (2):25–29.

2. Thery C, Kenneth WW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, ..., Žėkas V et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018; 23; 7 (1):1535750.

3. Žėkas V, Matuzeviėienė R, Karėiauskaitė D, Mažeikienė A, Burokienė N, Radzeviėius M, Janiulionienė A, Linkeviėiūtė A, Kuėinskienė ZA. Chronic and oxidative stress association with total count of endothelial microvesicles in healthy young male plasma. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2019; 28 (5):683–692.

4. Žėkas V, Matuzeviėienė R, Karėiauskaitė D, Vitkus D, Radzeviėius M, Janiulionienė A, Linkeviėiūtė A, Kutkienė S, Kuėinskienė ZA. Circulating microvesicles association with oxidative and chronic stress in healthy and coronary artery disease affected male populations. *Laboratorinė medicina*. 2019; 21:2 (82):51–55.

8. STAŽUOTĒ

Stažuotē Tartu universiteto Technologijas institute, Tartu, Estija (2018 m. gegužē ir 2019 m. sausī–vasarī). Priēmējas – instituto direktorē dr. Reet Kurg. Stažuotēs metu buvo tirtos mažosios mikrodalelēs ir jų ryšys su oksidaciniu stresu. Tam buvo taikomi Western bloto, tēkmēs citometrijas, nanodalelių sekimo analizēs, Bradfordo baltymų koncentracijas tyrimo ir ELISA metodai.

9. TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Vardas, pavardė: Vytautas Žėkas.

Dabartinės pareigos: Vilniaus universiteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros doktorantas, jaunesnysis mokslo darbuotojas.

Adresas: Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius.

Elektroninis paštas: vytautas.zekas@mf.vu.lt

Aukštasis išsilavinimas:

2019 m. – doktorantūros studijos Vilniaus universiteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje.

2014 m. – rezidentūros studijos Vilniaus universiteto Medicinos fakultete. Įgyta laboratorinės medicinos gydytojo kvalifikacija.

2010 m. – medicinos studijos Vilniaus universiteto Medicinos fakultete. Suteiktas medicinos magistro laipsnis ir medicinos gydytojo kvalifikacija.

2004 m. – Varėnos r. Merkinės mstl. Vinco Krėvės-Mickevičiaus vidurinė mokykla.

Dalyvavimas sąjungų ir draugijų veikloje:

Lietuvos laboratorinės medicinos draugija – narys.

Europos aterosklerozės draugija – narys.

Tarptautinė ląstelių mikrodalelių draugija – narys.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10221 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 30 egz.