

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Roman ŠTUKELJ

**POVEZAVA MED HOLESTEROLOM IN ŠTEVILOM
MIKROVEZIKLOV V PERIFERNI KRV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RELATIONSHIP BETWEEN CHOLESTEROL AND THE NUMBER
OF MICROVESICLES IN PERIPHERAL BLOOD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za klinično biofiziko, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija živilske tehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Helena Abramovič, za somentorico prof. dr. Veroniko Kralj-Iglič in za recenzenta prof. dr. Marjana Simčiča.

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Somentorica: prof. dr. Veronika Kralj-Iglič

Recenzent: prof. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Roman Štukelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.1+577.3:612.397:616.15(043)=163.6
KG	biološke membrane / holesterol / lipoproteini / lipidni rafti / mikrovezikli / trombociti / pretočna citometrija / cirkadialni ritem
AV	ŠTUKELJ, Roman
SA	ABRAMOVIČ, Helena (mentorica) / KRALJ-IGLIČ, Veronika (somentorica) / SIMČIČ, Marjan (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2011
IN	POVEZAVA MED HOLESTEROLOM IN ŠTEVILOM MIKROVEZIKLOV V PERIFERNI KRV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 56 str., 6 pregl., 13 slik, 2 priloge, 121 vir.
IJ	Sl
JI	sl / en
AI	V sklopu diplomske naloge smo želeli ugotoviti ali v populaciji zdravih oseb obstaja pozitivna korelacija med koncentracijo krvnega holesterola in številom mikroveziklov (MV) v izolatih, dobljenih iz vzorcev periferne krvi. Ugotovili smo precej veliko (50 %), statistično pomembno povečanje števila MV po obroku bogatim s holesterolom, maščobami in ogljikovimi hidrati v populaciji oseb, ki so zdrave, ter majhno (1 %) in statistično nepomembno znižanje skupnega holesterola. Z upoštevanjem membran krvnih celic lahko predpostavimo, da negativna korelacija med številom MV po obroku (<i>post-prandial</i>) in na tešče (<i>post-fasting</i>) koncentracijo skupnega holesterola, ter med <i>post-prandial</i> številom MV in <i>post-fasting</i> koncentracijo LDL-holesterola, predstavlja nejasen bazen holesterola, ki je prisoten v krvi. Manjša količina holesterola v drugih oblikah bi lahko pomenila večjo količino holesterola v membranskih krvnih celicah, kar pa lahko v zameno vodi k povečani mikrovezikulaciji. Izkazalo se je, da je metoda izolacije mikroveziklov iz krvi občutljiva na temperaturo in dinamiko izolacije. Z analizo metode smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv temperature na število MV v izolatih iz krvi. Ugotovili smo, da v izolatih izmerimo manj MV, če je temperatura med celotnim postopkom izolacije višja (Slika 13). Možni poglobljen vpliv na ta pojav je zmanjšana viskoznost krvi pri višjih temperaturah, kar posledično vpliva na hitrost usedanja celic, zlasti trombocitov, v krvnih vzorcih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.1+577.3:612.397:616.15(043)=163.6
CX	biological membranes / cholesterol / lipoproteins / lipid rafts / microvesicles / platelets / flow cytometry / circadian rhythm
AU	ŠTUKELJ, Roman
AA	ABRAMOVIČ, Helena (supervisor) / KRALJ-IGLIČ, Veronika (co-advisor) / SIMČIČ, Marjan (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2011
TI	RELATIONSHIP BETWEEN CHOLESTEROL AND THE NUMBER OF MICROVESICLES IN PERIPHERAL BLOOD
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	X, 56 str., 6 tab., 13 fig., 2 ann., 121 ref.
LA	sl
AL	sl / en
AB	As part of this work was to determine whether the population of healthy subjects is positively correlated with blood cholesterol and the number of microvesicles (MV) in isolates obtained from samples of peripheral blood. It turns out that the method of isolation from the blood microvesicles is sensitive to external parameters and dynamics of isolation. The analysis method was to determine the influence of temperature on the number of MV in the isolates from the blood. We found quite a lot (50%), statistically significant increase in the number of MV after a meal rich in cholesterol, fat and carbohydrates in the population of people who are healthy, and low (1%) and statistically insignificant reduction in total cholesterol. With regard to blood cell membranes can be assumed that a negative correlation between the number of MV after a meal (<i>post-prandial</i>) and fasting (<i>post-fasting</i>) total cholesterol concentration, and between <i>post-prandial</i> number of MV and <i>post-fasting</i> levels of LDL-cholesterol, a opaque pool of cholesterol that is present in the blood. Small amount of cholesterol in other forms could result in a higher amount of cholesterol in membranes of blood cells, which can in turn lead to increased microvesiculation. We found that the MV isolates measured less if the temperature during the whole process of isolation was higher (Figure 13). Possible overarching impact on this phenomenon is the reduced blood viscosity at higher temperatures, which in turn affects the rate of sedimentation of cells, especially platelets, in blood samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HOLESTEROL.....	3
2.1.1 Sestava holesterola.....	3
2.1.2 Presnova holesterola.....	4
2.1.3 Vloga holesterola	8
2.2 MIKROVEZIKLI	9
2.2.1 Mikrovezikli in njihov klinični pomen	9
2.2.2 Holesterol in mikrovezikli.....	14
2.2.3 Določanje mikroveziklov.....	15
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANCI	18
3.2 KEMIČALIJE.....	18
3.3 MERJENJE KRVNEGA HOLESTEROLA IN GLUKOZE.....	19
3.3.1 Princip testa za določanje skupnega holesterola na Roche /Hitachi cobas® 6000 sistemu	19
3.3.2 Statistična obdelava podatkov dobljenih iz Adria Lab.....	20
3.4 PRIPRAVA PLAZME, IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV IN VPLIV TEMPERATURE	20
3.4.1 Odvzem krvi.....	20

3.4.2	Ločitev krvnih celic od plazme	23
3.4.3	Izolacija mikroveziklov iz krvne plazme	24
3.4.4	Merjenje števila mikroveziklov s pretočnim citometrom	25
4	REZULTATI.....	27
4.1	VPLIV HOLESTEROLA NA ŠTEVILO MIKROVEZIKLOV	27
4.2	VPLIV TEMPERATURE NA ŠTEVILO MIKROVEZIKLOV V IZOLATIH ..	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.1.1	Mikrovezikli, holesterol in glukoza	33
5.1.2	Vpliv temperature pri postopku izolacije na število mikroveziklov v izolatih periferni krvi	36
5.2	SKLEPI	40
6	POVZETEK.....	41
7	VIRI	43
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti in sestava glavnih lipoproteinov (hilomikroni, lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL), lipoproteini nizke gostote (LDL), lipoproteini visoke gostote (HDL), trigliceridi, holesterol (Hol)) (Boyer, 2005: 515)	6
Preglednica 2: Orientacijske referenčne vrednosti parametrov v Adria Lab d.o.o. (holesterol (Hol), trigliceridi, HDL-holesterol in LDL-holesterol) (referenčni list Adrialab)	7
Preglednica 3: Podatki o spolu (M: moški, Ž: ženska), starosti, številu mikroveziklov (MV) in koncentraciji skupnega holesterola (Hol), glukoze (Glu), trigliceridov (Trigl.), HDL-holesterola in LDL-holesterola, pri prostovoljcih po postu (<i>pfast</i>) in po uživanju hrane (<i>prand</i>) stanju, povprečna vrednost (povpr.) in standardni odklon (SD)	28
Preglednica 4: Razlike med povprečno vrednostjo števila MV med stanjema po postu in po uživanju hrane ter razlike med povprečno koncentracijo skupnega holesterola (Hol), glukoze, trigliceridov, HDL-holesterola in LDL-holesterola med stanjema po postu (<i>post-fasting</i>) in po uživanju hrane (<i>post-prandial</i>). Podane so povprečne vrednosti in ustrezni odstotki (v oklepaju), statistična signifikanca razlik (p) in ustrezna statistična moč (P). Statistično pomembne razlike ($p \leq 0,05$) so označene z zvezdico	30
Preglednica 5: Naklonski koeficient med različnimi parametri krvi. Upoštevani so vsi podatki (po postu in po uživanju hrane): število mikroveziklov (MV), koncentracije skupnega holesterola (Hol), glukoze, trigliceridov, HDL-holesterola in LDL-holesterola. Statistične pomembnosti korelacij so prikazane v oklepajih, statistično pomembne vrednosti ($p \leq 0,05$), pa so označene z zvezdico.	30
Preglednica 6: Nad diagonalo: Pearsonovi koeficienti korelacij med različnimi spremenljivkami, ki ustrezajo stanjema po postu (<i>pfast</i>) in po uživanju hrane (<i>prand</i>), (število mikroveziklov (MV), koncentracije skupnega holesterola (Hol), glukoze (GLU), trigliceridov (TRIG), HDL-holesterola in LDL-holesterola), ter starosti darovalcev krvi. V oklepajih so navedene statistične pomembnosti korelacij. Pod diagonalo: naklonski koeficienti statistično pomembnih korelacij med spremenljivkami, za katere je predvidena linearna odvisnost.	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura molekule holesterola (levo) (Cholesterol, 2007) in 3D struktura molekule holesterola (desno) (Sterols, 2000).....	4
Slika 2: Sinteza lipoproteinov v tankem črevu, jetrih in krvni plazmi in njihov prehod do perifernih tkiv v telesu (Cholesterol, 2007).....	5
Slika 3: Struktura biološke membrane (Cholesterol, 2007).....	8
Slika 4: Izolat iz periferne krvi človeka brez ugotovljene bolezni. V vzorcu so večinoma posamezni eritrociti in številni trombocitni mikrovezikli (A-D). Trombocitni mikrovezikli zavzemajo oblike celic brez notranje strukture (puščice na kroglicah (D), diskocitne (A), »starfish« oblike (B) in cevke (C). Slike smo pridobili z vrstično elektronsko mikroskopijo (Šuštar in sod., 2010).....	110
Slika 5: (A) Brstenje levkocitov, slikano s presevnim elektronskim mikroskopom. Vidni so številni brsti (bela puščica) in MV (črna puščica) (Šuštar in sod., 2010). (B) Brstenje eritrocitov, izzvano z dodajanjem detergenta suspenziji eritrocitov in (C) izolirani MV, ki so nastali kot končni produkt tega procesa, slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Šuštar in sod., 2010). (D) MV, izolirani z periferne krvi, slikani z mikroskopom na atomsko silo (Junkar in sod., 2009).....	13
Slika 6: Število MV pri treh prostovoljcih brez ugotovljene bolezni (A: ženska, 60 let, B: ženska, 50 let, C: moški, 46 let). Kri je bila odvzeta na Kliničnem oddelku (KO) za revmatologijo (črni stolpec), na KO za gastroenterologijo (sivi stolpec) in na Nevrološki kliniki (beli stolpec) Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana (Bedina-Zavec in sod., 2009)	17
Slika 7: Odvzem krvi iz medialne kubitalne vene (A), epruveta z odvzetim vzorcem krvi pred (B) in po (C) ločitvi celic od plazme, vzorec po cetrifugiranju pri 17570 obr. (D); Rdeča pika v peletu (črna puščica) kaže na prisotnost eritrocitnih mikroveziklov; pipetiranje supernatanta po centrifugiranju pri 17570 obr. (E), ter mikrocentrifugirka s 100 μ l suspenzije z MV, pripravljena za merjenje na citometru (F).....	21
Slika 8: Shema odvzema krvi	22

Slika 9: Shema ločitve krvnih celic od plazme.....	23
Slika 10: Shema izolacije mikroveziklov	24
Slika 11: Prikaz potovanja delca in sipanja svetlobe v pretočni citometriji (levo) in Coulter EPICS Altra pretočni citometer (Fullerton, ZDA), na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (desno)	25
Slika 12: Razsevni diagram dogodkov, ki jih določa svetloba, sipana v smeri naprej (FS) in v stranski smeri (PMT1) za merjenje števila MV s pretočnim citometrom. Območje R1 ustreza merilnim kroglicam z velikostjo 10 μm , območje R2 ustreza celicam, območje R3 pa mikroveziklom.....	26
Slika 13: Povprečna vrednost števila mikroveziklov izoliranih iz vzorcev krvi pri različnih temperaturah	32

KAZALO PRILOG

Priloga A: Soglasje Republiške komisije za medicinsko etiko

Priloga B: Formular, ki so ga izpolnili darovalci krvi

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

GA	glutaraldehyd
HDL	lipoproteini visoke gostote
Hol	holesterol
KO	klinični oddelek
LDL	lipoproteini nizke gostote
MV	mikrovezikli
PBS	fosfatni pufer s soljo (z NaCl)
UKC	Univerzitetni klinični center
UL	Univerza v Ljubljani
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote

1 UVOD

Lipidi predstavljajo skupino molekul z veliko strukturno diverziteto in širokim spektrom bioloških funkcij. Ena izmed teh funkcij je, da so pomembni gradniki bioloških membran. Biološke membrane si predstavljamo kot mozaik mikrodomen, ki plavajo v fluidnem matriksu. Domene bogate s holesterolom (Hol) in sfingomielinom imenujemo lipidni rafti.

Rafti imajo izjemno pomembne biološke funkcije: sodelujejo pri membranskem transportu in signalni transdukciji (Simons in Ikonen, 1997; London, 2002; Edidin, 2003). S holesterolom obogateni rafti tvorijo področja z veliko ukrivljenostjo membrane (Tenchov in sod., 2006; Aefferer in sod., 2009), kar vodi v brstenje membrane (Simons in Ikonen, 1997; Brown in London, 2000; Biro in sod., 2005) in v končni fazi, v odpuščanje mikroveziklov (MV) od membrane v okolno raztopino, tudi v kri. Mikrovezikli tako predstavljajo dodatno zalogo Hol v krvi, ki pa do sedaj še ni bila vključena v standardizirane diagnostične postopke. Število MV izmerimo s pretočnim citometrom in je močno odvisno od postopka izolacije, parametre Hol pa določimo po standardnih laboratorijskih metodah.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je izboljšanje razumevanja presnove holesterola. Želeli smo ugotoviti, ali je koncentracija krvnega Hol povezana s številom MV v krvi. Pri določanju števila MV v krvi pa se je izkazalo, da je metoda za izolacijo MV občutljiva na zunanje parametre in dinamiko izolacije. Zato smo z analizo metode želeli ugotoviti, kakšen je vpliv temperature izolacije na število MV v izolatih iz krvi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- v populaciji zdravih oseb obstoja pozitivna korelacija med koncentracijo krvnega holesterola in številom mikroveziklov v izolatih, dobljenih iz vzorcev periferne krvi;
- temperatura v postopku izolacije pomembno vpliva na število MV v izolatu iz periferne krvi; med potekom izolacije pri višjih temperaturah je v izolatih manj MV kot pri nižjih temperaturah.

2 PREGLED OBJAV

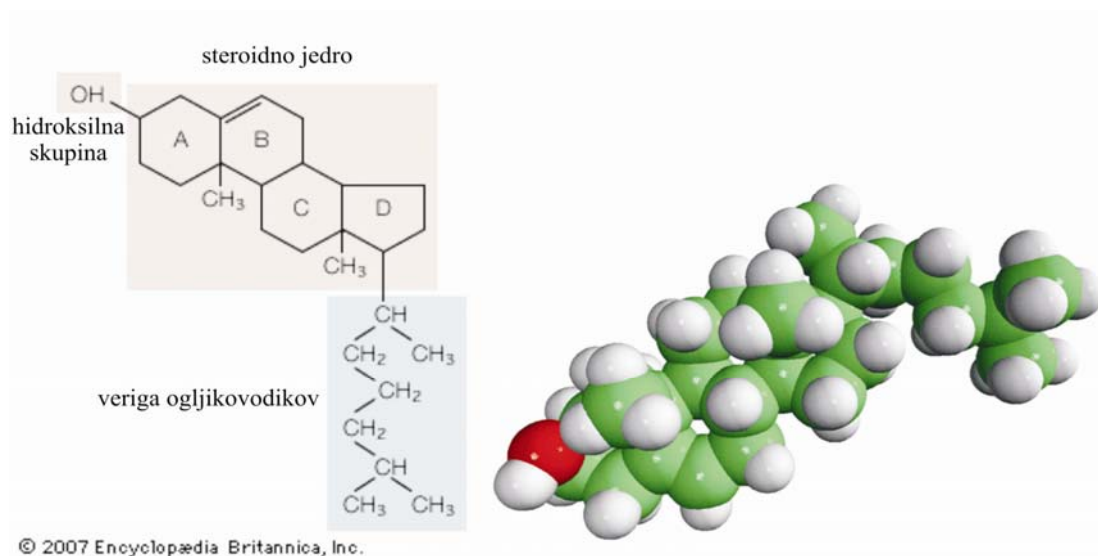
2.1 HOLESTEROL

2.1.1 Sestava holesterola

Holesterol je morda ena najbolj »strah vzbujajočih« molekul v naravi, vendar nujno potrebna v organizmu. Njegova prisotnost sama po sebi ni povezana z zdravstvenimi težavami, do teh pride zaradi neučinkovitosti njegovega prenosa in drugih motenj v metabolizmu.

Lipidi so skupina bioloških molekul, ki jih družijo lastnosti, da so zaradi svoje hidrofobne narave bolj topni v nepolarnih topilih kot v vodi. Nepolarni lipidi, zlasti triacilgliceridi, predstavljajo zalogo molekul za metabolično gorivo. Polarni lipidi pa so pomembne sestavine bioloških membran, ki jih poleg lipidov sestavljajo tudi proteini. Med lipide prištevamo tudi steroide, katerih najbolj poznan predstavnik je holesterol (Boyer, 2005).

Steroide predstavlja značilni sistem kondenziranih obročev. Holesterol je sestavljen iz treh šestčlenskih obročev, označenih z A, B, C in enega petčlenskega obroča, ki ga označimo z D. Molekula Hol je amfifilna. Ima polarno glavo, ki jo predstavlja hidroksilna skupina na obroču A, dvojno vez na obroču B in na več mestih vezane verige ogljikovodikov, ki predstavljajo obširno hidrofobno območje (Slika 1). Obroči so v trans konfiguraciji, kar naredi molekulo planarno in rigidno, izjema je njena izooktilna stranska veriga, ki je fleksibilna (Boyer, 2005).

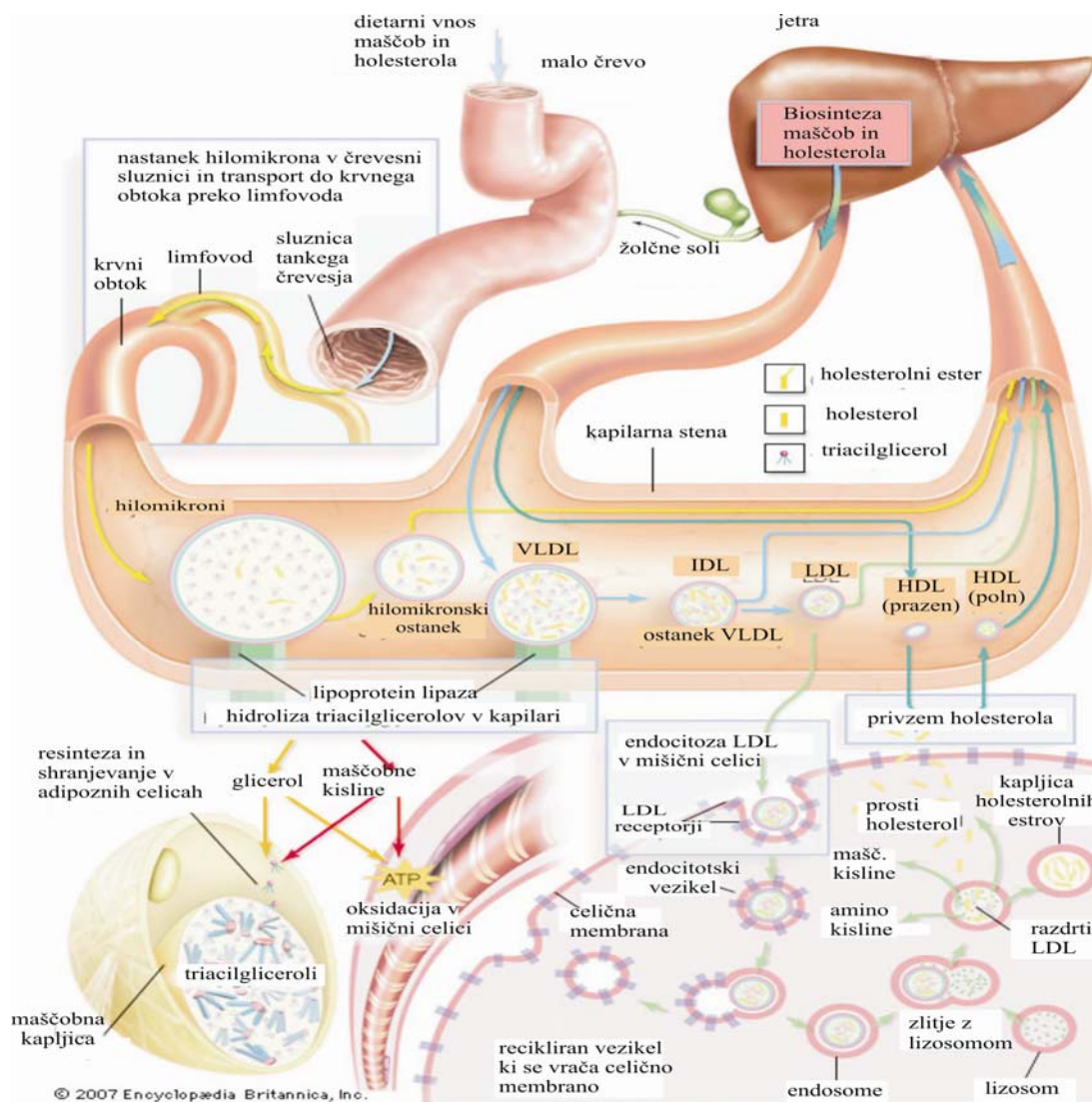


Slika 1: Kemijska struktura molekule holesterola (levo) (Cholesterol, 2007) in 3D struktura molekule holesterola (desno) (Sterols, 2000).

2.1.2 Presnova holesterola

Holesterol (Slika 2) lahko sintetizirajo celice jeter (75 % celotnega Hol), tankega črevesa in kože ali pa ga dobimo s prehranskim vnosom (25 %). Ker je vitalno pomembna molekula in ker izkušnje kažejo, da so motnje v presnovi Hol povezane z različnimi boleznimi, je bila presnova Hol predmet številnih študij. Izdelana je bila slika, v skladu s katero po zaužitju in mehanski obdelavi v ustni votlini prehajajo lipidi kemično nespremenjeni v želodec ter nadaljujejo pot do dvanajstnika v obliki maščobnih kapljic. V alkalni svetlini dvanajstnika nastanejo zaradi delovanja žolčnih kislin emulgirane maščobne kapljice. Šele emulgacija lipidov omogoči delovanje pankreasne lipaze, zaradi česar v dvanajstniku potече lipoliza, kar povzroči nastanek mešanih micel, ki so rezervoar netopnih produktov presnove maščob, tudi holesterola. Te micelle se absorbirajo v enterocit tankega črevesa, kjer med drugimi procesi poteka tudi reesterifikacija holesterola. Ponovno sintetizirani lipidi se obdajo z ovojnico iz posebnih glikoproteinov, kar vodi do nastanka hilomikronov. Ti se izločijo iz enterocitov v obliki sekretornih mešičkov – veziklov, ki se z eksocitozo izločijo v limfne vode in se preko centralnega in torakalnega limfovoda vliva v bližnji krvni obtok (Koren, 2004).

Hilomikroni so lipoproteini z najmanjšo gostoto (Preglednica 1). Lahko jih razumemo kot kapljice maščobe, obdane s plastjo proteinov – apoproteinov in polarnih lipidov, ki se v kapilarah maščevja s pomočjo encima pretvorijo v maščobne kisline in glicerol. Rezultat tega so tudi hilomikronski ostanki, ki so med drugim bogati tudi z Hol in se prenesejo na lipoproteine visoke gostote (HDL) s katerimi se Hol povrne v jetrne hepatocite in porabi za sintezo žolčnih kislin. Omenjeni presnovi Hol pravimo zunanja (eksogena) pot, ker je povezana z dietarnim vnosom (rumena) pot (Koren, 2004).



Slika 2: Sinteza lipoproteinov v tankem črevu, jetrih in krvni plazmi in njihov prehod do perifernih tkiv v telesu (Cholesterol, 2007).

Ugotovili so tudi, da obstoja notranja (endogena) pot presnove Hol. V skladu s to potjo se v jetrih sintetizirajo lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL), ki direktno preidejo v kri. Endotelijsko vezana lipaza hidrolizira triacilglicerole, pri tem iz VLDL nastanejo VLDL ostanki (IDL). Večje IDL privzamejo jetra, manjši pa se pretvorijo v lipoproteine nizke gostote (LDL). Večino LDL privzamejo jetra, ostanek pa prenaša Hol predvsem v nadledvičnice. LDL delci so poglavitni nosilci Hol v plazmi in vir Hol različnim tkivnim celicam (svetlo modra pot na sliki 2). Prebitek LDL z vezavo v jetrnih celicah vpliva na homeostazo skupnega holesterola. Ravno obratno pa prenašajo Hol in njegove estre HDL, torej iz perifernih tkiv do jeter. HDL se sintetizirajo v jetrih v nepopolni obliki. Prenašajo se po krvnem obtoku, kjer zbirajo prebitni Hol iz perifernih tkiv in ga prenesejo v jetra. Proces se imenuje obratni (reverzni) transport holesterola (temno modra pot na sliki 2). HDL zato pogosto imenujemo »dobro« prenašalno obliko holesterola (Koren, 2004).

Preglednica 1: Fizikalne lastnosti in sestava glavnih lipoproteinov (hilomikroni, lipoproteini zelo nizke gostote (VLDL), lipoproteini nizke gostote (LDL), lipoproteini visoke gostote (HDL), trigliceridi, holesterol (Hol)) (Boyer, 2005: 515).

	Gostota g/dl	Premernm	Trigliceridi %	Hol %	Fosfolipidi %	Proteini %
hilomikroni	0,95	75 – 1200	80 – 95	2 – 7	3 – 9	2
VLDL	0,95 - 1,006	30 – 80	55 – 80	5 – 15	10 – 20	10
LDL	1,019 - 1,063	18 – 25	5 – 15	40 – 50	20 – 25	25
HDL	1,063 - 1,210	5 – 12	5 – 10	15 – 25	20 – 30	55

Številne populacijske študije so pokazale, da so motnje v presnovi Hol povezane s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Razvite in standardizirane so bile metode določanja Hol v periferni krvi za diagnosticiranje motenj, ki vključujejo povišan nivo Hol in lipidov in motnje v metabolizmu lipoproteinov. Standardni postopek obsega meritve koncentracije skupnega krvnega Hol, koncentracije LDL-holesterola, koncentracije HDL-holesterola in koncentracije trigliceridov v krvi. Naše meritve so bile opravljene na Adria Lab d.o.o. zasebnem diagnostičnem laboratoriju v Ljubljani na Roche/Hitachi cobas® 6000 sistemu (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) za katerega imajo predpisane vrednosti koncentracije v plazmi za posamezne parametre, ki so podane v Preglednici 2. Vsak laboratorij pa mora raziskati prenosljivost pričakovanih vrednosti glede na svojo populacijo ljudi in po potrebi določiti referenčni razpon.

Preglednica 2: Orientacijske referenčne vrednosti parametrov v Adria Lab d.o.o. (holesterol (Hol), trigliceridi, HDL-holesterol in LDL-holesterol) (referenčni list Adrialab).

Preiskava	orientacijske referenčne vrednosti (mmol/l)
skupni Hol	4,0 – 5,2
trigliceridi	0,6 – 1,7
HDL-holesterol	nad 1,6
LDL-holesterol	2,0 – 3,5

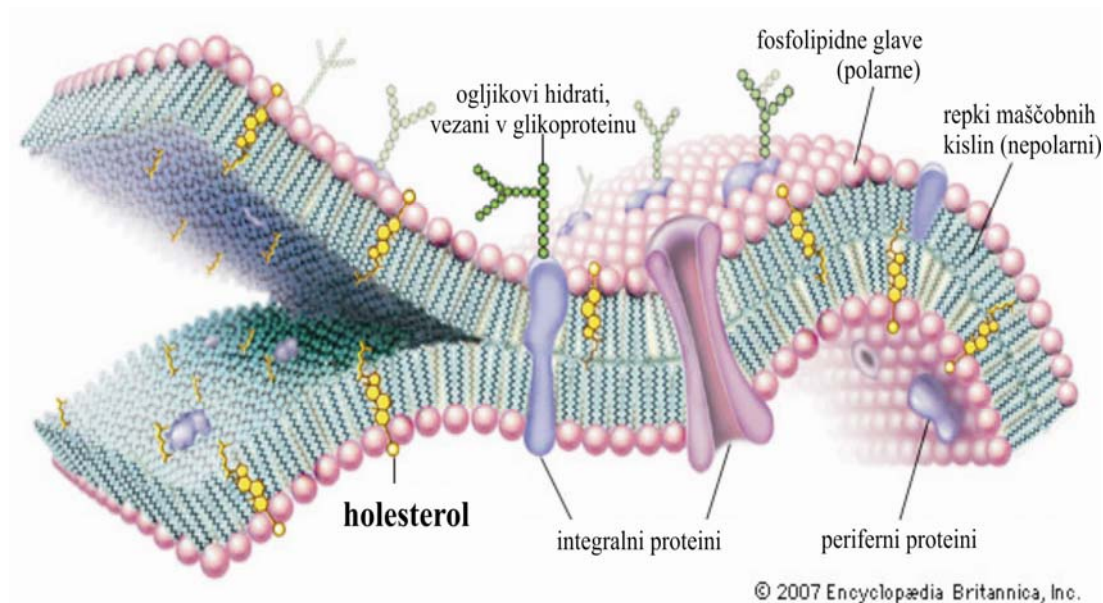
Svetovna zdravstvena organizacija označuje koncentracijo skupnega Hol v plazmi pod 5,17 mmol/l (200 mg/dl) kot »zaželeno«; koncentracijo nad 6,20 mmol/l (240 mg/dl) pa kot mejo zvečane koncentracije holesterola. Povprečna koncentracija LDL-holesterola se giblje med 100 in 190 mg/dl (2,58–4,90 mmol/l) in naj bi bila čim nižja. Povečane koncentracije imajo pri moških hujše posledice. Koncentracija HDL-holesterola naj bi bila čim višja, običajno je med 40 in 60 mg/dl (1,03-1,55 mmol/l), posledice njenega znižanja pa so hujše pri ženskah. Raven trigliceridov naj nebi presegala 2,0 mmol/l (175 mg/dl), po novjših raziskavah celo 1,7 mmol/l (150 mg/dl) (WHO, 2006).

Normalne plazemske koncentracije Hol se spreminjajo v odvisnosti od starosti. Ob rojstvu so najnižje, nato pa z leti naraščajo in dosežejo maksimalno vrednost pri obeh spolih okoli starosti 60 let, vendar vrednosti nista enaki. To pripisujemo zmanjšani postmenopavzalni uporabi Hol kot prekursorja pri sintezi spolnih hormonov.

Navedene referenčne vrednosti so se uveljavile na določenih populacijah, dejstvo pa je, da rezultati niso zelo decizivni za posameznika (zaradi velikih fluktuacij), kar pomeni, da pri izbrani osebi ne moremo z veliko verjetnostjo napovedati, ali visok Hol pomeni večje tveganje. To pomeni, da mehanizmi presnove Hol še niso dobro razumljeni.

2.1.3 Vloga holesterola

Holesterol je pomemben gradnik v bioloških membranah (Slika 3). Osnovni model sodobnega opisa membrane je model tekočega mozaika (Singer in Nicolson, 1972), ki je dopolnjen z modelom mikrodomen (Simons in Ikonen, 1997; London in Brown, 1998) - področij, ki imajo specifično sestavo in fizikalne lastnosti (Lichtenberg in sod., 2005). Domene, bogate s Hol in sfingomielinom imenujemo lipidni rafti. S holesterolom obogateni rafti tvorijo področja z veliko ukrivljenostjo membrane (Tenchov in sod., 2006; Aeffer in sod., 2009), kar vodi v brstenje membrane (Simons in Ikonen, 1997; Brown in London, 2000; Biro in sod., 2005) in v končni fazi, v odpuščanje MV od membrane, v okolno raztopino, tudi v kri. Ker mikrovezikli nastanejo iz raftov, so njihove membrane obogatene s Hol in tako predstavljajo dodatno zalogo holesterola v krvi, ki pa do sedaj še ni bila vključena v standardizirane diagnostične postopke. Dosedanje študije MV namreč izpostavljajo predvsem njihovo fiziološko vlogo pri transportu in katalizi reakcij strjevanja krvi.

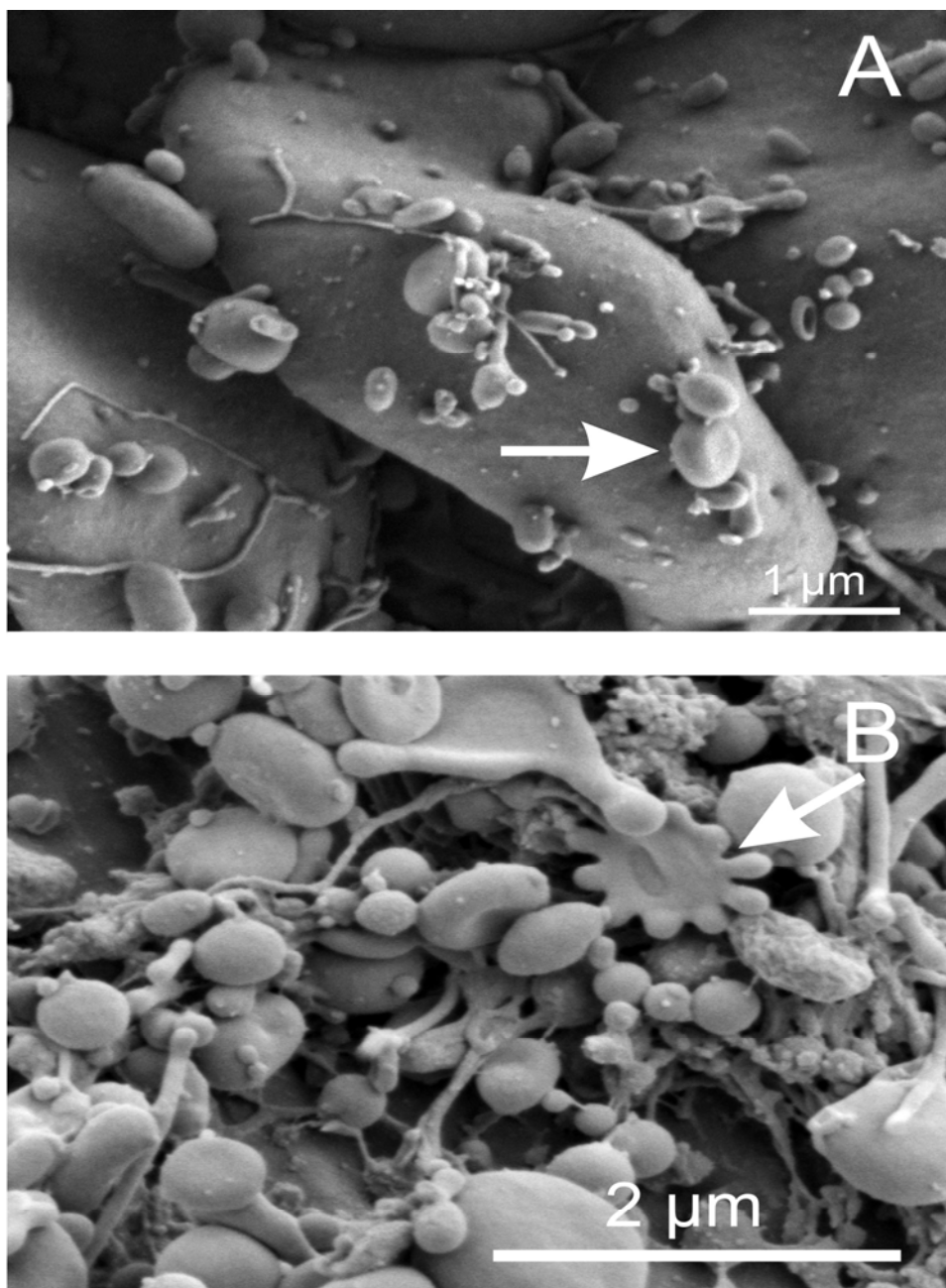


Slika 3: Struktura biološke membrane (Cholesterol, 2007).

2.2 MIKROVEZIKLI

2.2.1 Mikrovezikli in njihov klinični pomen

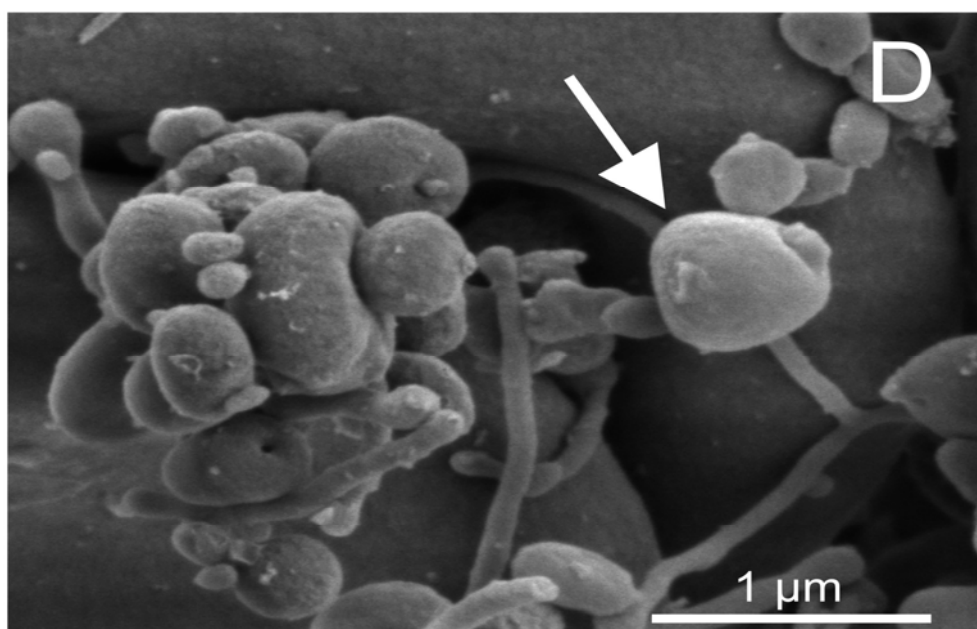
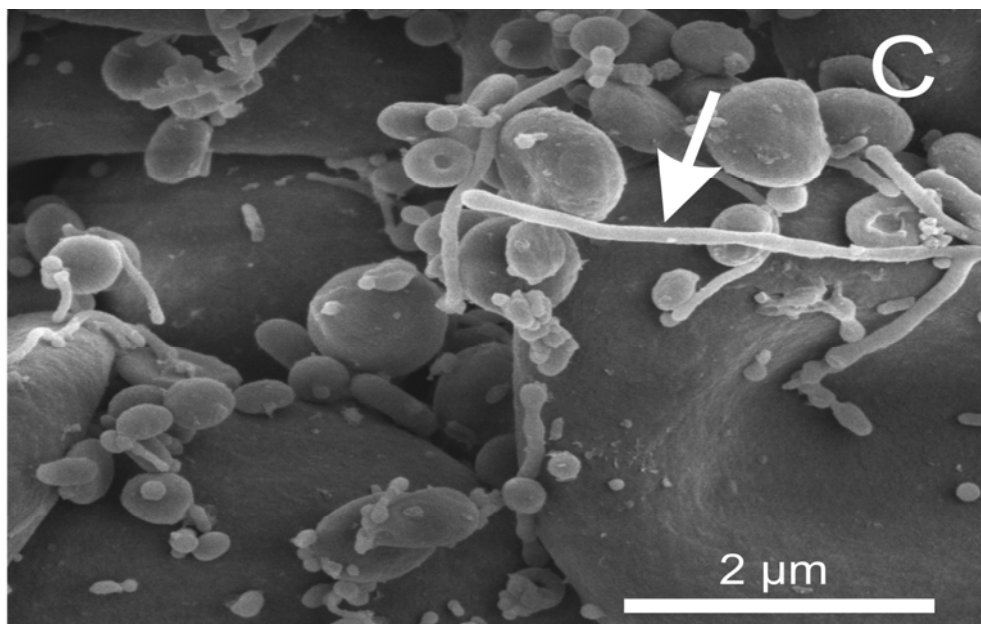
Sprva so mikrovezikle, ki so jih izolirali iz krvi opisali kot trombocitni prah (Wolf, 1967). Kasneje so opazili, da se MV odcepljajo od membrane eritrocitov v shranjeni krvi (Rumsby in sod., 1997; Shukla in sod., 1978; Cole in sod., 1979; Dumaswala in sod., 1983; Greenwalt, 2006; Simak in Gelderman, 2006) ali *in vitro* po dodatku različnih učinkovin v suspenzijo eritrocitov (Allan in sod., 1976; Araki, 1979; Hägerstrand in Isomaa, 1989; Hägerstrand in Isomaa 1992; Hägerstrand in Isomaa 1994; Yamaguchi in sod., 1991). Mikrovezikulacijo so opazili pri trombocitih (Hägerstrand in sod., 1996; Heijnen in sod., 1999), endotelnih celicah (Martinez in sod., 2005; Brogan in sod., 2004; Combes in sod., 1999; Shet in sod., 2003), belih krvnih celicah (Cerri in sod., 2006; Baj-Krzyworzeka in sod., 2006) in rakastih celicah (Black, 1980; Taylor in sod., 1983; Koga in sod., 2005; Kralj-Iglič in sod., 1998; Whiteside, 2005; Huber in sod., 2005; Valenti in sod., 2007; Ginestra in sod., 1998; Shedden in sod., 2003; Ratajczak, 2006), kjer so jo povezali s prokoagulantno aktivnostjo (Bastida in sod., 1983; Bastida in sod., 1985; Bastida in sod., 1986; Rauch in Antoniuk, 2007).



Slika 4: Izolat iz periferne krvi človeka brez ugotovljene bolezni. V vzorcu so večinoma posamezni eritrociti in številni trombocitni mikrovezikli (A-D). Trombocitni mikrovezikli zavzemajo oblike celic brez notranje strukture (puščice na kroglicah (D), diskocitne (A), »starfish« oblike (B) in cevke (C)). Slike smo pridobili z vrstično elektronsko mikroskopijo (Šuštar in sod., 2010).

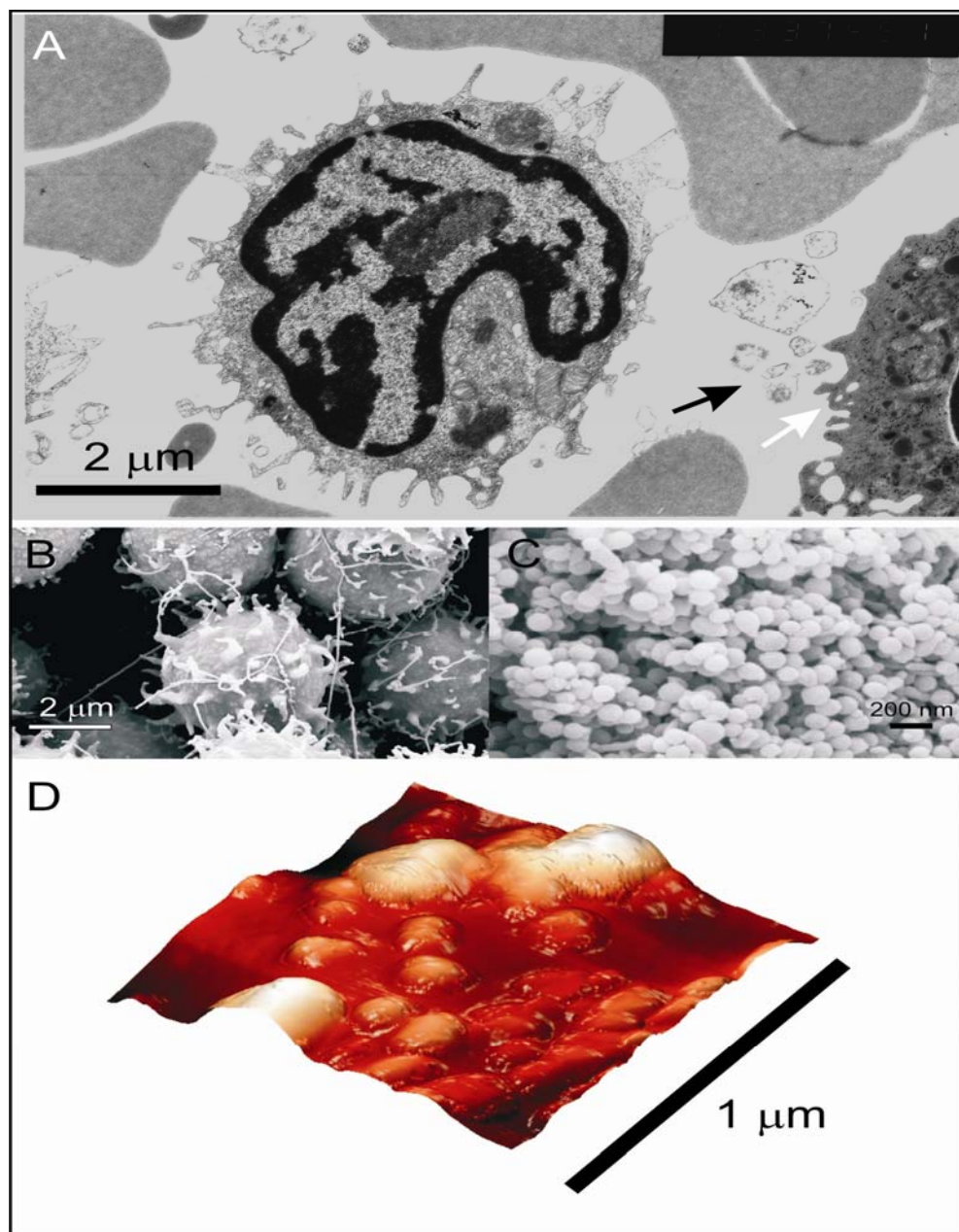
»se nadaljuje«

»nadaljevanje slike 4«



Slika 4: Izolat iz periferne krvi človeka brez ugotovljene bolezni. V vzorcu so večinoma posamezni eritrociti in številni trombocitni mikrovezikli (A-D). Trombocitni mikrovezikli zavzemajo oblike celic brez notranje strukture (puščice na kroglicah (D), diskocitne (A), »starfish« oblike (B) in cevke (C)). Slike smo pridobili z vrstično elektronsko mikroskopijo (Šuštar in sod., 2010).

V zadnjem času opisujejo MV (Greenwalt, 2006; Whiteside, 2005; Diamant in sod., 2004; Taylor in Black, 1987; Hugel in sod., 2005; Distler in sod., 2005; Flaumenhaft, 2006; Ratajczak in sod., 2006a; Pisetsky, 2009) kot biološko aktivne, z membrano obdane delce, katerih premer je manjši od 1 μm , ki se odcepijo od membrane celice v zadnji fazi brstenja (Slika 4) in postanejo prosto gibljivi v okolni raztopini. Mikrovezikli potujejo z limfo in krvjo, zato lahko dosežejo oddaljene celice in interagirajo z njimi. Molekule, ki sestavljajo MV, tako vstopijo v celico in tam postanejo funkcionalne. Mikrovezikli lahko prenašajo genetski material (Pisetsky, 2009; Reich in Pisetsky, 2009; Ardoin in sod., 2007; Baj-Krzyworzeka in sod., 2005), na membrano vezane ligande in receptorje (Ratajczak in sod., 2006a, Ratajczak in sod., 2006b; Pisetsky, 2009; Baj-Krzyworzeka in sod., 2002; Janowska-Wieczorek in sod., 2001; Rozmyslowicz in sod., 2003), prionske proteine (Fevrier in sod., 2004; Robertson in sod., 2006; Vella in sod., 2008) in infektivne delce (Pelchen-Matthews in sod., 2004; Coltel in sod., 2006; Booth in sod., 2006) in s tem prispevajo k razširjanju tumorjev, vnetja in okužbe (Rozmyslowicz in sod., 2003; Reich in Pisetsky, 2009; Ardoin in sod., 2007; Lopez in sod., 2005; Holmes in sod., 2009; Janowska-Wieczorek in sod., 2006). Z analizo števila in sestave MV lahko uporabimo pri diagnostiki in načrtovanju zdravljenja (Simak in Gelderman, 2006; Greer, 2004; Knijff-Dutmer in sod., 2002; Brogan in Dillon, 2004; Kim in sod., 2003), kar je še posebej pomembno pri boleznih, kjer so zdaj potrebne invazivne preiskave (Schetter in Harris, 2009).



Slika 5: (A) Brstenje levkocitov, slikano s presevnim elektronskim mikroskopom. Vidni so številni brsti (bela puščica) in MV (črna puščica) (Šuštar in sod., 2010). (B) Brstenje eritrocitov, izzvano z dodajanjem detergenta suspenziji eritrocitov in (C) izolirani MV, ki so nastali kot končni produkt tega procesa, slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) (Šuštar in sod., 2010). (D) MV, izolirani z periferne krvi, slikani z mikroskopom na atomsko silo (Junkar in sod., 2009).

Sestavine ki sestavljajo MV lahko katalizirajo nastanek krvnih strdkov (Bona in sod., 1987; Furie in sod., 2005; Müller in sod., 2003; del Conde in sod., 2005; Sabatier in sod., 2002; Berckmans in sod., 2002; Mallat in sod., 1999), pri tem pa je razmerje med površino in prostornino MV precej večje kot pri trombocitih, tako da mikrovezikulacija znatno poveča katalitsko površino za nastajanje krvnih strdkov in jo obravnavamo kot prokoagulantni mehanizem. Mikrovezikli posredujejo interakcije med trombociti, endotelnimi celicami in tumorskimi celicami, ki se lahko izrazijo v razširjanju tumorjev (Huber in sod., 2005; Valenti in sod., 2007; Janowska-Wieczorek in sod., 2005) in sekundarnih tromboemboličnih dogodkih (npr. pri avtoimunih boleznih (Dignat-George in sod., 2004; Jy in sod., 2007; Warkentin in sod., 1994; Pereira in sod., 2006; Sheremata in sod., 2008; Kravitz in Shoenfeld, 2005) in raku (del Conde in sod., 2007; Hron in sod., 2007; Rauch in Antoniuk, 2007; Furie B. in Furie B.C., 2006)).

2.2.2 Holesterol in mikrovezikli

Po maščobnem obroku so hilomikroni v plazmi prisotni v povečani koncentraciji, Hol je torej pomembna sestavina membranskih raftov, iz katerih nastanejo mikrovezikli. Prav zaradi teh dejstev smo pričakovali, pozitivno korelacijo med MV in Hol, po obroku bogatim z maščobami in ogljikovimi hidrati. Sklepali smo, da bo po obroku koncentracija skupnega Hol višja in s tem tudi višje število MV.

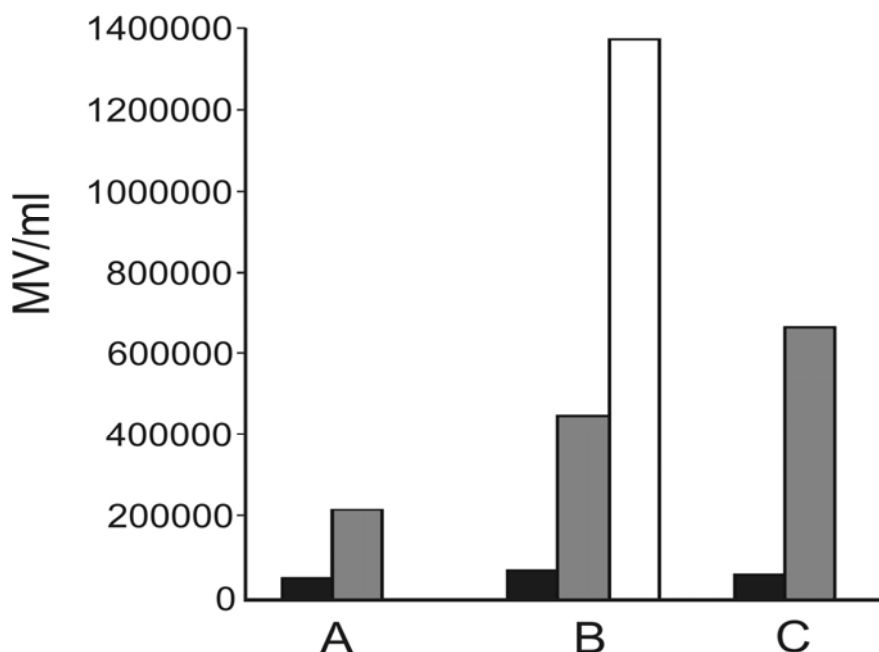
Prejšnje študije, ki vključujejo MV v zdravi populaciji, so pokazale povečanje endotelijskih (Ferreira in sod., 2004; Tushuizem in sod., 2006) in plazemskih MV (Michelsen in sod., 2009) v izolatih iz periferni krvi po obroku, medtem ko študije o metabolizmu lipoproteinov in glukoze poročajo o spremembah presnove Hol in ravni glukoze v krvi (Tushuizem in sod., 2006, Tushuizem in sod., 2007; Michelsen in sod., 2009; Cohn in sod., 1988; DeRosa in sod., 2010; Alssema in sod., 2010; Olano-Martin in sod., 2008). V moji diplomski nalogi smo povečanje MV po obroku sistematično raziskovali v povezavi s povečanjem Hol in glukoze v krvi, v populaciji 26 prostovoljcev brez evidentirane bolezni.

2.2.3 Določanje mikroveziklov

Odkar so mikroveziklom odkrili biološko vlogo in njihovo potencialno diagnostično in terapevtsko vrednost, so poskušali tudi izdelati metode za njihovo izolacijo iz periferne krvi in njihovo karakterizacijo (Dignat-George in sod., 2004; Diamant in sod., 2002; George in sod., 1982; Biro in sod., 2004; Hugel in sod., 2004; Nomura, 2004; Shet in sod., 2004). Izolirane MV lahko slikamo ali štejemo s pretočnim citometrom. Izmerjeno število MV odraža zalogo membran, ki je na voljo za brstenje in vezikulacijo, učinkovitost mehanizmov čiščenja, lastnosti membrane in lastnosti okolne raztopine. Povečano število MV so našli v izolatih iz periferne krvi bolnikov s srčno-žilnimi boleznimi (Diamant in sod., 2004; VanWijk in sod., 2003; Boulanger in sod., 2006; Morel in sod., 2005), rakom (Ginestra in sod., 1998; Kim in sod., 2003; Janša in sod., 2008) in avtoimunimi boleznimi (Knijff-Dutmer in sod., 2002; Diamant in sod., 2002; Morel in sod., 2005). Študije izvora MV, ki so jih izolirali iz krvi, so pokazale, da največ MV izvira iz trombocitov (okrog 80 %), kot vir sledijo eritrociti (okrog 10 %) in druge celice (monociti, T-limfociti, B-limfociti, granulociti in endotelijske celice) (Diamant in sod., 2002). Brstijo tudi rakaste celice, vendar pa je število MV v izolatih iz krvi bolnikov z rakom predvsem posledica brstenja trombocitov, ki jih aktivirajo MV iz rakastih celic (Janowska-Wieczorek in sod., 2006).

Za izolacijo MV smo v literaturi našli različne protokole (Dignat-George in sod., 2004; Diamant in sod., 2002; George in sod., 1982; Biro in sod., 2004; Hugel in sod., 2004; Nomura, 2004; Shet in sod., 2004; VanWijk in sod., 2003). Običajno so ti protokoli sestavljeni iz centrifugiranja in izpiranja vzorca. Mikrovezikle v izolatih potem štejemo s pretočnim citometrom. Pri tem lahko uporabimo tudi fluorescenčno označevanje s protitelesi, ki kažejo na izvor MV (Diamant in sod., 2002; Jy in sod., 2004).

Pojavljajo se številni problemi pri določanju MV, ki še niso zadovoljivo razrešeni. V literaturi nismo zasledili sistematične analize parametrov postopka izolacije. Da metoda določanja MV še ni standardizirana, niti vpeljana v klinično prakso, kaže na to, da še ni dovolj ponovljiva in zanesljiva. To je v skladu tudi z dosedanjimi izkušnjami Laboratorija za klinično biofiziko, Medicinske fakultete UL. Poleti leta 2009 so izvajali klinične študije, ki so hkrati potekale na treh KO UKC Ljubljana. Ugotovili so, da obstajajo velike razlike v izmerjenem številu MV oseb brez ugotovljene bolezni, glede na to, na katerem oddelku so bili vzorci krvi odvzeti. Slika 6 prikazuje število MV, izoliranih iz krvi, odvzete trem osebam (A, B in C, brez ugotovljene bolezni) na KO za revmatologijo, KO za gastroenterologijo in na Nevrološki kliniki UKC Ljubljana. Vidimo, da se rezultati iz različnih oddelkov pri isti osebi razlikujejo za nekajkrat pri vseh treh osebah, iz česar so sklepali, da razlike v rezultatu pri isti osebi ne izvirajo iz lastnosti vzorca, temveč iz postopka izolacije. Med razlogi, zaradi katerih bi lahko prišlo do razlik, so upoštevali tehniko odvzema, lastnosti igle, s katero so odvzeli kri (debelina, material), čas, ki je pretekel od odvzema do začetka centrifugiranja (centrifuga se ne nahaja v isti stavbi kot mesto odvzema krvi) in razlike v delovanju centrifug na KO za revmatologijo, kjer so analizirali vzorce, odvzete na KO za revmatologijo, in Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, kjer so analizirali vzorce, odvzete na KO za gastroenterologijo in na Nevrološki kliniki. Da bi preverili vpliv tehnike odvzema, sta isti osebi (osebi B) istočasno odvzeli 2,7 ml krvi sestra s KO za gastroenterologijo in sestra z Nevrološke klinike. Isti sestri sta kri odvzeli tudi pri meritvi, prikazani na Sliki 6. Ob hkratnem odvzemu sta se rezultata razlikovala za manj kot 20 %, kar pomeni, da razlike, prikazane na Sliki 6, niso izvirale iz tehnike odvzema. Da bi preverili vpliv igle za odvzem krvi, je bilo isti osebi v časovnem intervalu nekaj minut odvzeto 2,7 ml krvi iz medialne kubitalne vene skozi iglo debeline 20 gauge, in enaka količina s kirurškim rezom blazinice prsta (brez igle). Tudi v tem primeru razlika med rezultatoma ni presegala 20 %. Iz tega so sklepali, da izbira igle ne more razložiti razlik, prikazanih na Sliki 6.



Slika 6: Število MV pri treh prostovoljcih brez ugotovljene bolezni (A: ženska, 60 let, B: ženska, 50 let, C: moški, 46 let). Kri je bila odvzeta na Kliničnem oddelku (KO) za revmatologijo (črni stolpec), na KO za gastroenterologijo (sivi stolpec) in na Nevrološki kliniki (beli stolpec) Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana (Bedina-Zavec in sod., 2009).

Ob izvajanju poskusa, pri katerem so kri odvzeli iz žile in z rezom, je prišlo pri izolaciji do hemolize, tako v vzorcu, odvzetem iz žile, kot v vzorcu, odvzetem z rezom. S preiskavo so bile pri darovalki izključene nepravilnosti krvnih celic. Preverjanje vseh korakov postopka pa je nakazalo kot možen vzrok tako hemolize kot tudi razlik v izmerjenem številu MV na Sliki 6 prenašanje vzorcev od mesta odvzema do centrifuge v ohlajeni posodi. Predpostavili smo, da je vpliv temperature med celotnim postopkom izolacije na število MV v izolatu lahko zelo pomemben in upoštevali, da ohladitev aktivira trombocite (Maurer-Spurej in sod., 2001), kar lahko privede do odpuščanja MV. Zato smo želeli ugotoviti, ali je temperatura v procesu izolacije MV lahko vzrok nastanka velikega števila MV po odvzemu krvi.

Mnoge klinične študije kažejo na potencialno možnost uporabe določanja MV v diagnostiki in terapiji, vendar je za to potrebno metodo izolacije bolj razumeti in izboljšati. Da bi izboljšali metodo določanja MV, smo v okviru te naloge želeli preveriti vpliv temperature med postopkom izolacije na število MV v izolatih iz periferne krvi.

3 MATERIALI IN METODE

Pri izolaciji MV iz krvi smo uporabili modificirano metodo po Diamant in sod. (2002).

3.1 PREISKOVANCI

Diplomsko delo smo opravili v okviru širše raziskave z naslovom » Mikrovezikli v telesnih tekočinah domačih živali in človeka«. Za raziskavo smo dobili podano soglasje Republiške komisije za medicinsko etiko (št. 117/02/10) (Priloga A). Vse telesne tekočine smo pridobili s pisnim soglasjem prostovoljcev (Priloga B).

V raziskavo ugotavljanja korelacije med krvnim Hol in številom MV v izolatih dobljenih iz vzorcev periferne krvi smo kri odvzeli 33 preiskovancem, od tega je bilo 18 žensk in 15 moških. Populacijo so predstavljali sodelavci iz Medicinske fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani in UKC Ljubljana.

Za študijo vpliva temperature na število MV smo kri odvzeli 59 teščim preiskovancem brez ugotovljene bolezni. Populacijo sestavljajo študenti prvega letnika Veterinarske fakultete v Ljubljani, somentorica in avtor diplomskega dela. Študentom veterine smo kri odvzeli ob odvzemu zaradi obveznega sistematskega pregleda v prvem letniku študija. 18 vzorcev, ki smo jih odvzeli študentom veterine, smo zavrgli, ker se je izkazalo, da je bil pufer, s katerim smo izpirali vzorce, kontaminiran z bakterijami. Od 41 preiskovancev, ki smo jih vključili v analizo, pa je bilo 29 žensk in 12 moških.

3.2 KEMIČALIJE

Fiziološka raztopina s fosfatnim pufrom s soljo (PBS) je bila pripravljena iz:

- 8 g natrijevega klorida (NaCl): SIGMA-ALDRICHOL (1kg, Lot 90070),
- 0,2 g kalijevega klorida (KCl): SIGMA-ALDRICHOL (1kg, Lot 80520),
- 1,15 g dinatrijev hidrogefosfat dihidrata ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): SIGMA-ALDRICHOL (500g, Lot 81330)

- 0,2 g mono kalijevega fosfata (KH_2PO_4): SIGMA-ALDRICHOL (500g, Lot 9191A)
- Vode (H_2O) do prostornine enega litra.
- Trinatrijev citrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): CARLO ERBA REAGENTS: smo dodali PBS v razmerju 84 μl 0,123 M citrata na 10 ml fiziološke raztopine s fosfatnim pufrom.

Epruvete (Becton Dickinson) za odzem krvi so vsebovale antikoagulate:

- K3EDTA (3 kalijev etilenediamin tetraacetat - $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_8\text{K}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- heparin ($\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_{20}\text{S}_3$)
- trinatrijev citrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.3 MERJENJE KRVNEGA HOLESTEROLA IN GLUKOZE

Laboratorijske analize krvnega Hol, trigliceridov in glukoze so izvedli na Adria Lab d.o.o zasebnem diagnostičnem laboratoriju v Ljubljani. Vse meritve so naredili na Roche/Hitachi cobas[®] 6000 sistemu (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Merjenje skupnega Hol, HDL-holesterola in LDL-holesterola ter trigliceridov temelji na encimskih kolorimetričnih testih.

3.3.1 Princip testa za določanje skupnega holesterola na Roche /Hitachi cobas[®] 6000 sistemu

Holesterolni ester se s pomočjo encima holesterol esteraze (HE) razcepi na prosti holesterol in maščobno kislino z dolgo alifatsko verigo R.



Nato holesterol-oksidaža (HO) katalizira oksidacijo holesterola do holest-4-en-3-ona, pri tem se sprosti vodikov peroksid.



Nastali vodikov peroksid povzroči kondenzacijo fenola in 4-aminopirina ob prisotnosti encima peroksidaze (P). Posledica tega je rdeče obarvanje zaradi barvila kinon-imina.



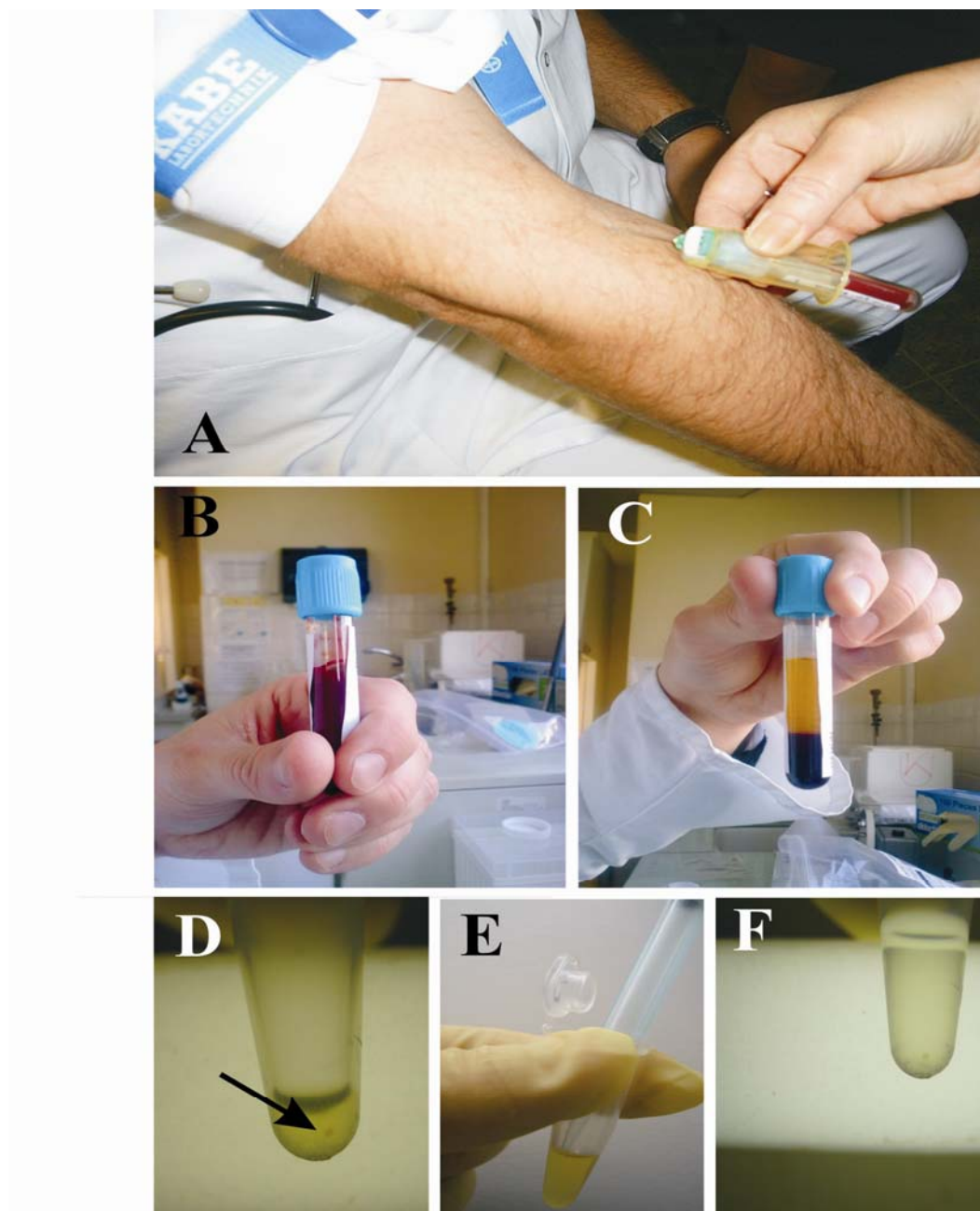
3.3.2 Statistična obdelava podatkov dobljenih iz Adria Lab

Povprečne vrednosti, standardni odklon, verjetnost statistične pomembnosti za t-test (p) in pobočja linearne odvisnosti med parametri smo izračunali s programsko opremo Microsoft Excel (Microsoft, ZDA, 2007). Pearsonov koeficient (r) in ustrezne statistične pomembnosti korelacij (p) smo izračunali s programsko opremo SPSS (SPSS Inc., ZDA, 2008). Statistična moč razlik smo izračunali s PS Power, pri čemer smo izbrali vrednost $\alpha = 0,05$ za napako tipa I.

3.4 PRIPRAVA PLAZME, IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV IN VPLIV TEMPERATURE

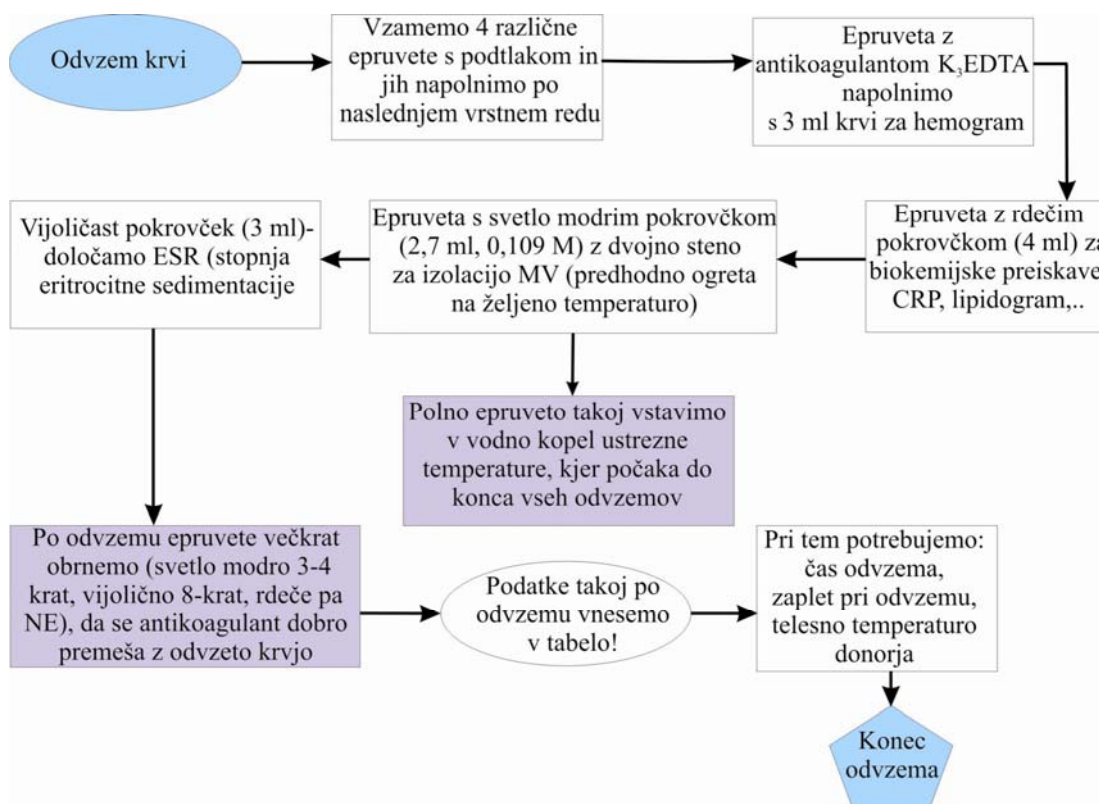
3.4.1 Odvzem krvi

Vsem prostovoljcem smo iz medialne kubitalne vene kri odvzeli z iglo debeline 21 gauge (MULTI Sample Needle, Nipro Corporation, Tokyo, Japonska), na KO za gastroenterologijo, UKC Ljubljana. Poskus, pri katerem smo ugotavljali korelacijo med koncentracijo krvnega Hol in številom MV, je trajal dva dni. Mikrovezikle smo izolirali pri 37 °C. Prvi dan je odvzem krvi potekal ob sedmih zjutraj. Preiskovance, ki so bili 15 ur tešči smo razdelili v skupine po osem oseb. Odvzeli smo jim po 4 ml krvi za merjenje Hol in glukoze in 2,7 ml za izolacijo MV v epruvete s podtlakom (proizvajalca Becton Dickinson, New Jersey, USA), katere smo centrifugirali najkasneje 15 minut po odvzemu, nato pa jim svetovali, naj cel dan jedo čim bolj bogato hrano s Hol, maščobami in ogljikovimi hidrati. Nismo jih omejili glede aktivnosti, odsvetovali pa smo izpostavljanje večjim naporom. Drugi dan pa so vsi ob sedmih zjutraj za zajtrk pojedli dve jajci, kruh in spili kozarec mleka, ob desetih pa še jogurt. Odvzem je potekal ob 12 uri po istem postopku kot dan prej.



Slika 7: Odvzem krvi iz medialne kubitalne vene (A), epruveta z odvzetim vzorcem krvi pred (B) in po (C) ločitvi celic od plazme, vzorec po cetrifugiranju pri 17570 obr. (D); Rdeča pika v peletu (črna puščica) kaže na prisotnost eritrocitnih mikroveziklov; pipetiranje supernatanta po centrifugiranju pri 17570 obr. (E), ter mikrocentrifugirka s 100 μ l suspenzije z MV, pripravljena za merjenje na citometru (F).

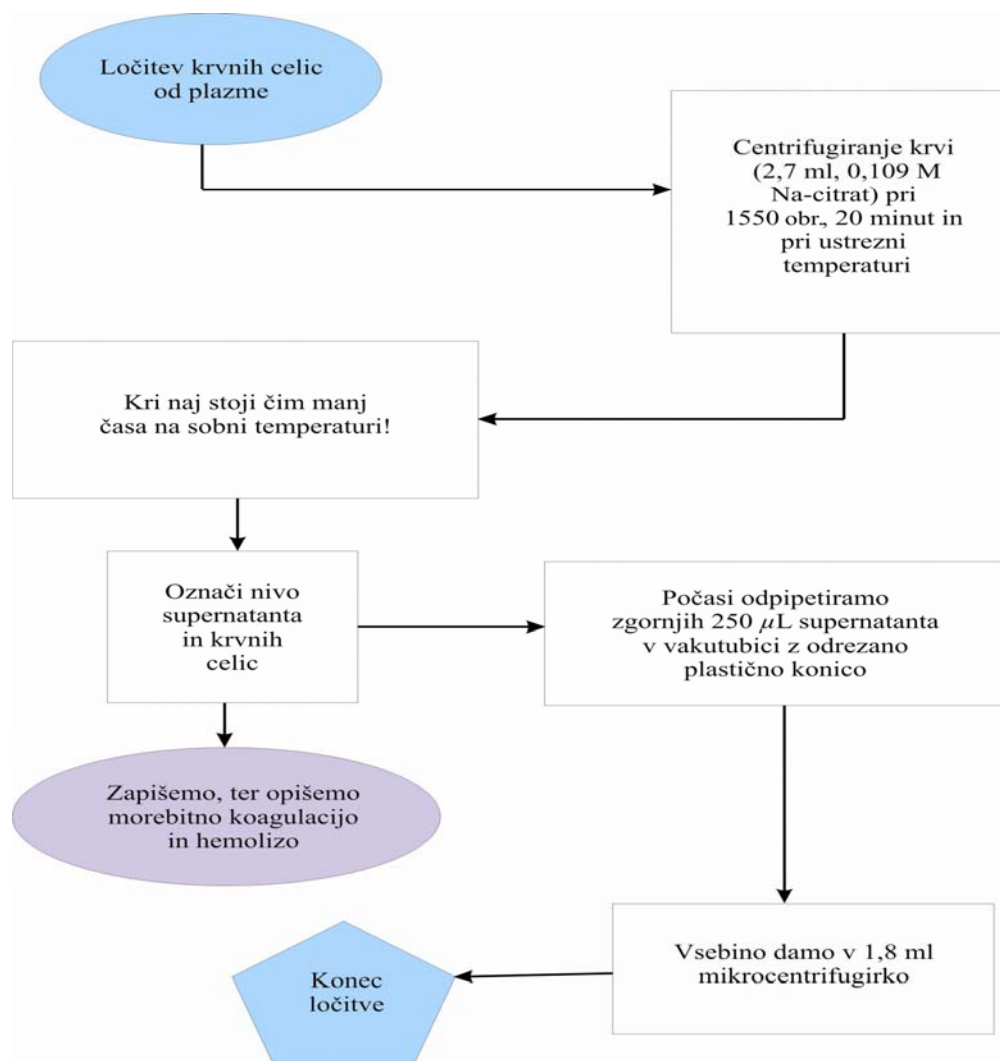
Pri ugotavljanju vpliva temperature na število MV je sodelovalo 59 prostovoljcev, ki 15 ur pred odvzemom krvi niso jedli. Odvzeli smo jim do 15 ml krvi v epruvete s podtlakom. Od tega: 3 ml krvi za hemogram (epruveta z antikoagulantom K₃EDTA), 4 ml za biokemijske preiskave (epruveta z antikoagulantom heparinom), 2,7 ml za izolacijo MV (epruveta z 0,109 M antikoagulantom trinatrijevim citratom) in 3 ml za sedimentacijo (epruveta z antikoagulantom K₃EDTA), po navedenem vrstnem redu. Epruvete (2,7 ml) za izolacijo MV smo v kopeli pred odvzemom vzdrževali pri izbrani temperaturi (30 °C, 37 °C, 40 °C). Za izolacijo MV smo uporabili kri, odvzeto v epruvete s trinatrijevim citratom, ostala kri je bila uporabljena za sistematski pregled študentov. Odvzem krvi smo izvedli ob upoštevanju Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku, določil Konvencije Sveta Evrope o varovanju človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine (Oviedske konvencije) in načel slovenskega Kodeksa medicinske deontologije.



Slika 8: Shema odvzema krvi.

3.4.2 Ločitev krvnih celic od plazme

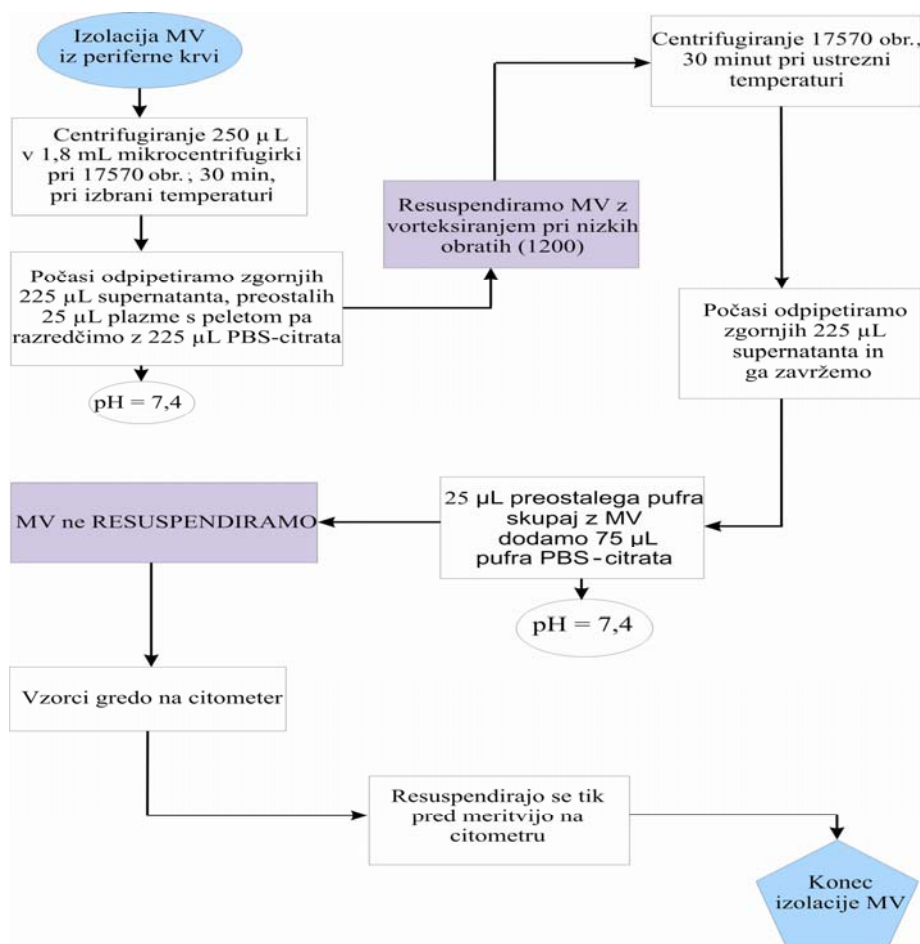
Ločitev krvnih celic od plazme smo izvedeli s centrifugiranjem največ 20 minut po odvzemu krvi na KO za gastroenterologijo, UKC Ljubljana, 20 min pri 1550 obratov (obr.) in pri ustrezni temperaturi (30 °C, 37 °C, 40 °C) (s centrifugo Centric 200/R, Tehnica Železniki, Podjetje precizne mehanike in elektronike d.o.o.). Po centrifugiranju smo ločili v epruveti na pogled več predelkov: rdeče obarvanega, v katerem so pretežno eritrociti, belo obarvanega, v katerem so pretežno levkociti, rumenkasto obarvanega, v katerem so pretežno trombociti, in bistrejšo tekočino - plazmo. 250 μ l plazme nad trombociti smo odpipetirali v 1,8 ml Eppendorf mikrocentrifugirke.



Slika 9: Shema ločitve krvnih celic od plazme.

3.4.3 Izolacija mikroveziklov iz krvne plazme

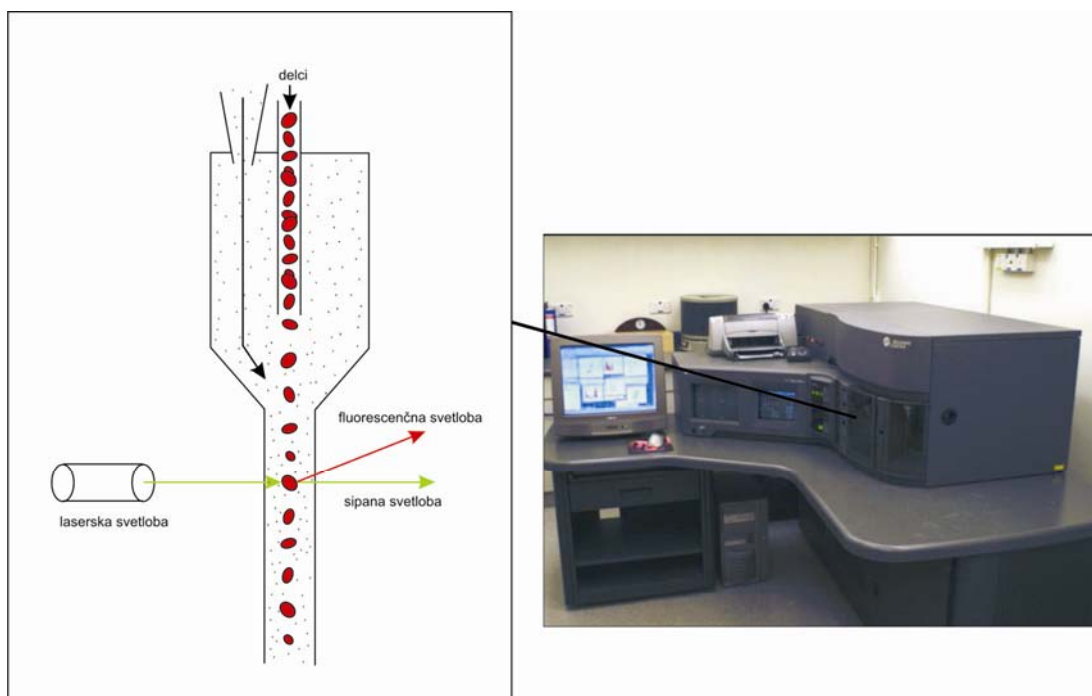
Od vsake osebe smo pripravili po dva vzorca. 250 μL plazme v 1,8 ml mikrocentrifugirkah smo centrifugirali pri 17570 obr., 30 minut pri izbrani temperaturi (30 °C, 37 °C, 40 °C). Po centrifugiranju so se MV zbrali na dnu mikrocentrifugirke. To smo videli kot majhen prozoren madež z rdečo piko. Ta izvira iz eritrocitnih MV, ki vsebujejo hemoglobin. Iz vsakega vzorca smo odpipetirali 225 μL plazme z vrha ter zavrgli, preostalih 25 μL plazme s peletom pa razredčili z 225 μL PBS - citrata (pH = 7,4). Pelet smo vorteksirali na 1200 obratih, ga v celoti resuspendirali in znova centrifugirali 30 minut na 17570 obr. pri ustrezni temperaturi (30 °C, 37 °C, 40 °C). Po centrifugiranju vzorcev z MV smo ponovno odpipetirali zgornjih 225 μL supernatanta in zavrgli, 25 μL peleta z MV pa dodali 75 μL PBS - citrata (pH = 7,4).



Slika 10: Shema izolacije mikroveziklov

3.4.4 Merjenje števila mikroveziklov s pretočnim citometrom

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji druga za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe (Slika 11). Svetlobni žarek se ob stiku s celico sipa in absorbira v fluorokromih, če smo jih predhodno vezali na celice; celica s fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine (Kotnik in sod., 2001). Vzorce, ki so vsebovali izolirane MV, smo analizirali s Coulter EPICS Altra pretočnim citometrom (Fullerton, ZDA), na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Slika 11). Pri eni meritvi smo zabeležili vsaj 60000 dogodkov.

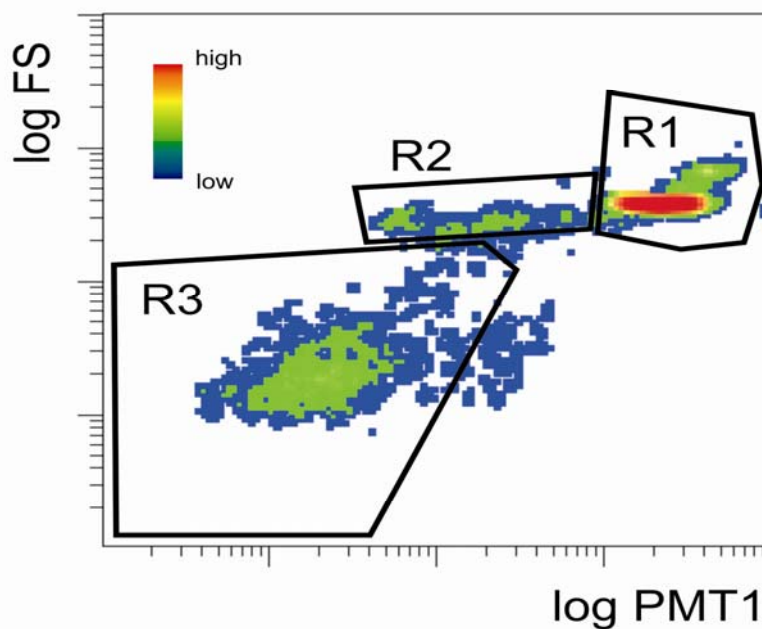


Slika 11: Prikaz potovanja delca in sipanja svetlobe v pretočni citometriji (levo) in Coulter EPICS Altra pretočni citometer (Fullerton, ZDA), na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (desno).

Število MV smo podali glede na število merilnih kroglic (Flow - Count, Beckman Coulter, koncentracija $1,05 \times 10^6/\text{ml}$, premer kroglic = $10 \mu\text{m}$). Ustrezne prostornine vzorca z MV in raztopine kroglic smo prilagodili znotraj posameznega poskusa.

S sipano svetlobo določimo razsewni diagram, na katerem enemu dogodku ustreza en delec, ki ga zazna pretočni citometer (Slika 12). Parametra: FS, ki opisuje svetlobo, sipano v smer žarka, ter PMT1, ki opisuje svetlobo, sipano v stranski smeri, ustrezata velikosti in

granuliranosti delcev. Razsevni diagram smo razdelili na tri območja: v območje R1 smo zajeli merilne kroglice z znano velikostjo premera $10\ \mu\text{m}$, ki smo jih dodali vzorcu tik pred meritvijo; v območje R2 smo zajeli strukture z velikostjo okrog $10\ \mu\text{m}$, ki jih pripisujemo eritrocitom, v območje R3 pa smo zajeli manjše strukture, ki jih interpretiramo kot kroglaste MV.



Slika 12: Razsevni diagram dogodkov, ki jih določa svetloba, sipana v smeri naprej (FS) in v stranski smeri (PMT1) za merjenje števila MV s pretočnim citometrom. Območje R1 ustreza merilnim kroglicam z velikostjo $10\ \mu\text{m}$, območje R2 ustreza celicam, območje R3 pa mikroveziklom.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV HOLESTEROLA NA ŠTEVILO MIKROVEZIKLOV

Podatki o spolu, letih, MV, Hol in glukozi so prikazani v Preglednici 3. V končno analizo smo vključili 26 prostovoljcev, 13 žensk (povprečna starost $28 \text{ let} \pm \text{standardni odklon } 12 \text{ let}$) in 13 moških ($31 \text{ let} \pm 10 \text{ let}$). En moški prostovoljec je bil izključen iz študije, saj smo ugotovili, da je na dan prvega odvzema pred tem osem ur letel z letalom. Tri preiskovance smo izločili (1 moškega in 2 ženski), ker smo ugotovili, da se niso postili predpisanih 15 ur pred prvim odvzemom krvi. Tri smo izvzeli zaradi zdravljenja s statini. Ena prostovoljka (14 v Preglednici 3) prejema blokator beta in je podvržena antihipertenzijskemu zdravljenju, medtem ko je bilo ostalih 25 brez terapije in ugotovljenih bolezni. Podatke o Hol in glukozi dveh preiskovancev smo izgubili, vendar pa smo upoštevali meritve MV teh dveh oseb.

Če primerjamo populacijo žensk in populacijo moških, lahko ugotovimo, da se statistično pomembno razlikujeta le v številu MV ($p = 0,026$), medtem ko so razlike v vseh ostalih parametrih statistično nepomembne: razlika v povprečnem številu MV (glede na število merilnih kroglic) med stanjema po postu in po uživanju hrane je večja pri ženskah (povprečje $0,86 \pm \text{standardni odklon } 0,63$) kot pa pri moških ($0,53 \pm 0,32$). Moška populacija ima v povprečju višjo koncentracijo skupnega Hol ($5,28 \pm 1,12$) mmol/l, glukoze ($4,94 \pm 0,30$) mmol/l, trigliceridov ($1,45 \pm 1,03$) mmol/l in LDL-holesterola ($3,12 \pm 1,04$) mmol/l, kot ženska populacija, kjer je koncentracija skupnega Hol ($5,16 \pm 0,87$) mmol/l, glukoze ($4,72 \pm 0,52$) mmol/l, trigliceridov ($1,30 \pm 0,65$) mmol/l in LDL-holesterola ($2,87 \pm 0,70$) mmol/l, medtem ko je koncentracija HDL-holesterola višja pri ženskah ($1,58 \pm 0,21$) mmol/l kot pri moški populaciji ($1,47 \pm 0,19$) mmol/l.

Preglednica 3: Podatki o spolu (M: moški, Ž: ženska), starosti, številu mikroveziklov (MV) in koncentraciji skupnega holesterola (Hol), glukoze (Glu), trigliceridov (Trigl.), HDL-holesterola in LDL-holesterola, pri prostovoljcih po postu (*pfast*) in po uživanju hrane (*prand*) stanju, povprečna vrednost (povpr.) in standardni odklon (SD).

Osebe (spol)	starost (leta)	MV <i>pfast</i>	MV <i>prand</i>	Hol <i>pfast</i> *	Hol <i>prand</i> *	Glu <i>pfast</i> *	Glu <i>prand</i> *	Trigl <i>pfast</i> *	Trigl <i>prand</i> *	HDL <i>pfast</i> *	HDL <i>prand</i> *	LDL <i>pfast</i> *	LDL <i>prand</i> *
1 (Ž)	44	0,51	1,40										
2 (M)	51	0,52	0,54	5,9	5,9		4,8						
3 (M)	25	0,60	1,14	5,1	4,9	4,4	4,6	2,5	3,9	1,1	1,3	2,8	2,5
4 (Ž)	20	0,78	1,70	4,0	3,8	4,7	3,7	1,0	1,0	1,5	1,7	1,9	1,7
5 (Ž)	42	0,31	0,46	6,2	5,8	4,5	4,3	2,1	2,1	1,5	1,5	3,6	3,4
6 (M)	32	0,25	0,32	4,5	4,7	5,4	5,1	0,7	1,1	1,5	1,5	2,5	2,5
7 (Ž)	20	0,45	0,57	6,2	5,8	5,1	4,8	2,2	2,7	1,2	1,4	4,0	3,7
8 (Ž)	20	0,16	0,80	4,8	4,6	4,8	3,2	0,8	1,4	2,0	2,0	2,2	2,0
9 (Ž)	47	0,60	0,35	5,9	6,0	5,4	4,8	0,7	0,8	1,6	1,6	3,8	3,8
10 (M)	42	0,14	0,32	7,4	7,1	5,1	4,7	1,2	1,2	1,8	1,9	5,0	4,8
11 (Ž)	20	0,23	0,32	5,4	5,5	4,9	4,6	0,9	0,7	1,8	1,8	3,2	3,3
12 (M)	20	0,41	0,46	4,3	4,1	4,8	5,0	0,7	1,0	1,5	1,7	2,2	2,1
13 (M)	22	0,36	0,52	5,0	4,8	5,0	4,9	0,8	0,8	1,5	1,5	2,9	2,8
14 (Ž)	51	0,84	1,25	5,2	5,4	5,6	5,5	0,7	1,7	1,5	1,5	3,2	3,1
15 (Ž)	20	0,57	2,70	3,8	3,8	4,7	5,0	1,0	0,9	1,2	1,3	2,0	2,1
16 (Ž)	20	0,63	0,90	5,9	5,7	4,5	4,4	2,9	1,6	1,7	1,6	3,3	3,3
17 (M)	29	0,30	0,23	5,2	5,2	4,5	4,8	0,8	0,8	1,5	1,5	3,3	3,2
18 (M)	27	0,22	0,27	4,8	4,9	5,1	5,2	1,0	0,4	1,5	1,3	2,9	3,0
19 (M)	22	1,11	0,80	4,8	4,7	5,3	4,8	1,3	0,9	1,5	1,5	2,8	2,7
20 (M)	43	0,74	1,48	5,5	5,4	4,8	4,7	1,3	2,0	1,4	1,4	3,4	3,3
21 (Ž)	27	0,93	0,58	5,5	5,0	4,5	4,8	1,0	1,1	1,9	1,6	3,0	2,7
22 (M)	45	0,34	0,66	7,7	7,6	5,4	4,9	3,8	3,9	1,1	1,2	5,2	5,2
23 (M)	31	0,24	0,71	3,3	3,5	5,7	4,8	0,8	0,9	1,7	1,6	1,4	1,5
24 (Ž)	20	1,16	1,06	4,2	4,4	5,1	4,6	0,9	0,7	1,5	1,6	2,3	2,3
25 (Ž)	20	0,49	2,52	4,3	4,8	5,0	4,7	1,1	1,2	1,4	1,6	2,4	2,5
26 (M)	20	0,52	0,60	5,3	5,6	5,0	4,6	1,4	1,5	1,3	1,4	3,5	3,5
povpr.	30	0,52	0,87	5,21	5,16	4,97	4,69	1,32	1,43	1,51	1,54	3,03	2,96
SD	11	0,28	0,64	1,03	0,95	0,37	0,46	0,80	0,92	0,23	0,19	0,90	0,88

*(mmol/L)

Povprečno število MV je za 50 % večje po uživanju hrane kot po postu (Preglednica 4). Razlika je statistično pomembna ($p = 0,006$), medtem ko je izračun moči analize pokazal, da je vzorec reprezentativen ($P = 0,82$ pri $\alpha = 0,05$). Koncentracije skupnega Hol, LDL-holesterola in HDL-holesterola so ostale v okviru 2 % glede na začetne vrednosti po postu (Preglednica 4). Po uživanju hrane smo ugotovili 8 % povečanje koncentracije trigliceridov, vendar razlika ni bila statistično pomembna ($p = 0,31$). Ugotovili smo 6 % zmanjšanje koncentracije glukoze v krvi, kar je bilo statistično pomembno, statistična moč pa primerna ($p = 0,005$, $P = 0,86$) (Preglednica 4).

Kot je pokazano v Preglednici 5, smo ob vključitvi vseh podatkov (prvega in drugega dne), dobili statistično pomembno negativno korelacijo med številom MV in koncentracijo LDL-holesterola ($r = -0,29$, $p = 0,04$), statistično pomembno pozitivno korelacijo med koncentracijo skupnega Hol in trigliceridov ($r = 0,54$, $p \leq 0,01$) in med koncentracijo trigliceridov in LDL-holesterola ($r = 0,48$, $p \leq 0,01$), ter statistično pomembno negativno korelacijo med koncentracijo glukoze in HDL-holesterola ($r = -0,30$, $p = 0,04$) in med koncentracijo trigliceridov in HDL-holesterola ($r = -0,45$, $p \leq 0,01$).

Korelacije med vsemi spremenljivkami v stanju po postu in v stanju po uživanju hrane so navedene v Preglednici 6. Nad diagonalo so predstavljeni Pearsonovi koeficienti in statistična pomembnost korelacij, pod diagonalo pa naklonski koeficienti ustreznih linearnih odvisnosti, ki so se izkazale kot statistično pomembne.

Koncentracija glukoze po uživanju hrane ne kaže statistično pomembne korelacije z drugimi spremenljivkami, medtem ko število MV po uživanju hrane negativno korelira s koncentracijo skupnega Hol, oziroma koncentracijo LDL-holesterola po postu ($r = -0,43$, $p = 0,03$ in $r = -0,40$, $p = 0,05$).

Preglednica 4: Razlike med povprečno vrednostjo števila MV med stanjema po postu in po uživanju hrane ter razlike med povprečno koncentracijo skupnega holesterola (Hol), glukoze, trigliceridov, HDL-holesterola in LDL-holesterola med stanjema po postu (*post-fasting*) in po uživanju hrane (*post-prandial*). Podane so povprečne vrednosti in ustrezni odstotki (v oklepaju), statistična signifikanca razlik (p) in ustrezna statistična moč (P). Statistično pomembne razlike ($p \leq 0,05$) so označene z zvezdico.

	Razlika med <i>post-prandial</i> in <i>post-fasting</i> stanji	p(t-test)	Moč (P)
MV	0,35 (50 %)	0,006*	0,82
Hol	-0,05 mmol/L (-1 %)	0,33	
glukoza	-0,28 mmol/L (-6 %)	0,005*	0,86
trigliceridi	0,11 mmol/L (8 %)	0,31	
HDL-holesterol	0,03 mmol/L (2 %)	0,21	
LDL-holesterol	-0,07 mmol/L (-2 %)	0,01*	0,79

* $p \leq 0,05$

Preglednica 5: Naklonski koeficient med različnimi parametri krvi. Upoštevani so vsi podatki (po postu in po uživanju hrane): število mikroveziklov (MV), koncentracije skupnega holesterola (Hol), glukoze, trigliceridov, HDL-holesterola in LDL-holesterola. Statistične pomembnosti korelacij so prikazane v oklepajih, statistično pomembne vrednosti ($p \leq 0,05$), pa so označene z zvezdico.

	Hol	Glukoza	Trigliceridi	HDL- holesterol	LDL- holesterol
MV	-0.24 (0.10)	-0.16 (0.23)	0.05 (0.73)	-0.10 (0.48)	-0.29 (0.04)*
Hol	1	0.06 (0.70)	0.54(≤ 0.01)*	-0.09 (0.56)	0.98 (≤ 0.01)*
glukoza		1	-0.12 (0.43)	-0.30 (0.04)*	0.17 (0.25)
trigliceridi			1	-0.45 (≤ 0.01)*	0.48 (≤ 0.01)*
HDL- holesterol				1	-0,19 (0,20)

* $p \leq 0,05$

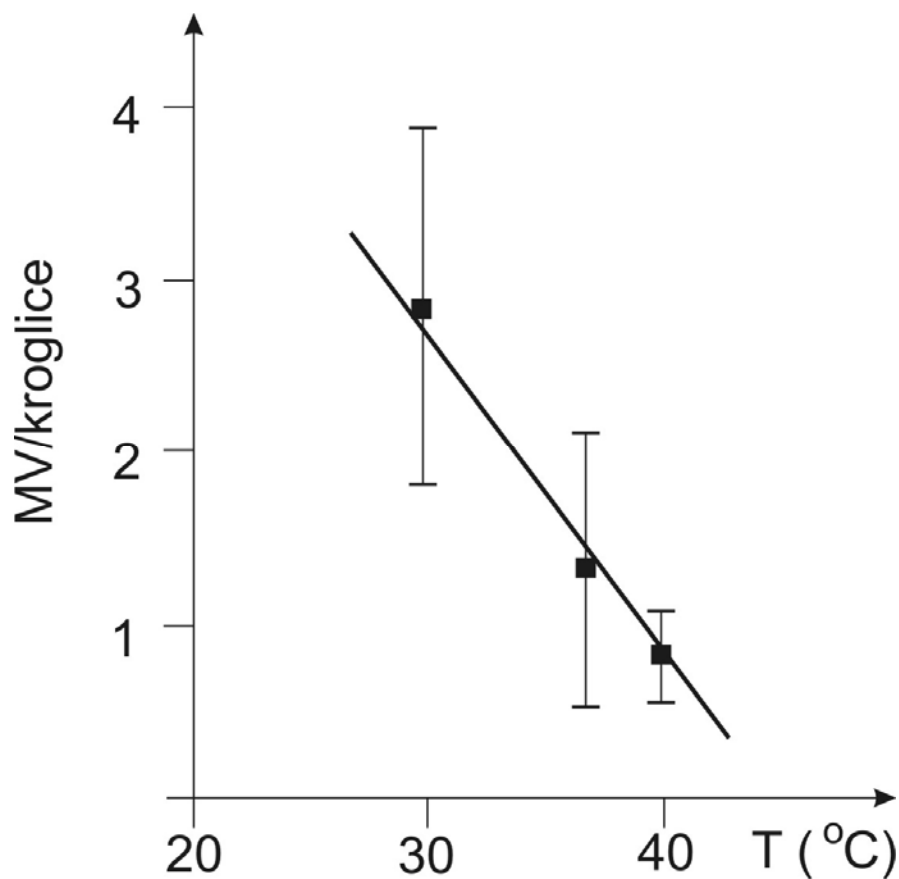
Preglednica 6: Nad diagonalo: Pearsonovi koeficienti korelacij med različnimi spremenljivkami, ki ustrezajo stanjema po postu (*pfast*) in po uživanju hrane (*prand*), (število mikroveziklov (MV), koncentracije skupnega holesterola (Hol), glukoze (GLU), trigliceridov (TRIG), HDL-holesterola in LDL-holesterola), ter starosti darovalcev krvi. V oklepajih so navedene statistične pomembnosti korelacij. Pod diagonalo: naklonski koeficienti statistično pomembnih korelacij med spremenljivkami, za katere je predvidena linearna odvisnost.

	Hol <i>pfast</i>	GLU <i>pfast</i>	TRIG <i>pfast</i>	HDL <i>pfast</i>	LDL <i>pfast</i>	Starost	MV <i>prand</i>	Hol <i>prand</i>	GLU <i>prand</i>	TRIG <i>prand</i>	HDL <i>prand</i>	LDL <i>prand</i>
MV <i>pfast</i>	-0.20 (0.34)	-0.04 (0.86)	-0.02 (0.90)	-0.14 (0.52)	-0.18 (0.40)	-0.07 (0.72)	0,35 (0.08)	-0.21 (0.32)	0.08 (0.68)	-0.03 (0.88)	-0.17 (0.42)	-0.21 (0.32)
Hol <i>pfast</i>	1	-0.03 (0.88)	0.61* (≤0.01)	-0.06 (0.79)	0.97* (≤0.01)	0.53* (≤0.01)	-0.43* (0.03)	0,97* (≤0.01)	0.05 (0.80)	0,52* (0.01)	-0.08 (0.70)	0,95* (≤0.01)
GLU <i>pfast</i>		1	-0.18 (0.39)	-0.03 (0.90)	0.07 (0.74)	0,39* (0.06)	-0.15 (0.49)	0.10 (0.66)	0,43* (0.04)	-0.12 (0.58)	-0.06 (0.79)	0.14 (0.52)
TRIG <i>pfast</i>	0.80		1	-0,47* (0.02)	0,55* (0.01)	0.12 (0.58)	-0.01 (0.95)	0,58* (≤0.01)	-0.07 (0.73)	0,82* (≤0.01)	-0,46* (0.02)	0,54* (0.01)
HDL <i>pfast</i>			-1.63	1	-0.17 (0.43)	-0.03 (0.89)	-0.34 (0.10)	-0.10 (0.63)	-0.39 (0.08)	-0.57* (≤0.01)	0.84* (≤0.01)	-0.18 (0.40)
LDL <i>pfast</i>	1.12		0.49		1	0,55* (0.01)	-0,40* (0.05)	0,98* (≤0.01)	0.19 (0.37)	0.47* (0.02)	-0.18 (0.39)	0,99* (≤0.01)
starost	0.09				0.05	1	-0.18 (0.39)	0.61* (≤0.01)	0.33 (0.11)	0.27 (0.19)	0.16 (0.45)	0,55* (0.01)
MV <i>prand</i>	-0.67						1	-0,30 (0.13)	-0.10 (0.65)	-0.06 (0.80)	-0.16 (0.44)	-0,38 (0.07)
Hol <i>prand</i>	1.05		0.49		0.92	6.93		1	0.13 (0.53)	0.49* (0.02)	-0.12 (0.58)	0,98* (≤0.01)
GLU <i>prand</i>		0.34							1	-0.04 (0.83)	-0.55* (0.01)	0.24 (0.25)
TRIG <i>prand</i>	0.59		0.72	2.27	0.46			0.51		1	-0.45* (0.03)	0.41* (0.04)
HDL <i>prand</i>			-1.93	1.02					1.33	2.19	1	-0.20 (0.30)
LDL <i>prand</i>	1.12		0.49		1.01	6.54		1.07		0.44		1

* $p \leq 0,05$

4.2 VPLIV TEMPERATURE NA ŠTEVILO MIKROVEZIKLOV V IZOLATIH PERIFERNE KRVİ

Slika 13 prikazuje odvisnost števila MV v izolatih periferne krvi od temperature med procesom izolacije, s katero ponovno potrdimo opažanje, ki smo ga podali na Sliki 6. Vidimo, da pri višjih temperaturah izmerimo manj mikroveziklov v izolatih. Vidimo tudi, da že ohladitev krvi na temperaturo 30 °C povzroči znatno povečanje števila MV v izolatu.



Slika 13: Povprečna vrednost števila mikroveziklov izoliranih iz vzorcev krvi pri različnih temperaturah.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Mikrovezikli, holesterol in glukoza

Ugotovili smo znatno (50 %), statistično pomembno povečanje števila MV po uživanju hrane, bogate s Hol, maščobami in ogljikovimi hidrati, v populaciji zdravih oseb. Število MV se je povečalo pri 21 in znižalo pri 5 preiskovancih (Preglednica 4). Največje povišanje je bilo za 135 % in največje znižanje za 51 %. Povečanje skupnega števila MV je v skladu s predhodnimi rezultati (Tushuizen in sod., 2006; Michelsen in sod., 2009), ki ugotavljajo statistično pomembno povečanje števila MV po uživanju hrane.

Ugotovili smo tudi 8 % povečanje trigliceridov v krvi, po uživanju hrane, vendar pa učinek ni bil statistično pomemben. Trigliceridi so se povišali pri 13, zmanjšali na 6 in ostali enaki pri 5 darovalcih. Največje povišanje oz. znižanje je znašalo približno 85 %, kar je dokaj visoka vrednost. Tako kot pri MV, se je tudi pri trigliceridih pokazala precejšnja raznolikost rezultatov pri različnih osebah, ki pa je skupaj dala relativno majhen skupni učinek v populaciji. Naši rezultati se ujemajo z rezultati predhodnih raziskav, ki poročajo o povečanju koncentracije trigliceridov v krvi z vrhom 3-7 ur po obroku, bogatim z maščobami (Tushuizen in sod., 2007; Cohn in sod., 1988; DeRosa in sod., 2010; Assema in sod., 2010; Olano-Martin in sod., 2008). Naše vzorce smo pridobili pet ur po zajtrku (ki je imel največjo hranilno vrednost), kar je v območju, kjer so drugi avtorji opazili vrh koncentracije trigliceridov v krvi, vendar je ta višji od naših rezultatov. Pogoji pri naših prostovoljcih pa so nekoliko drugačni. Razlika je v tem, da so se prostovoljci pri drugih avtorjih postili, potem so imeli obrok in merili odvisnost od časa. Naši prostovoljci pa so začeli jesti obroke približno 30 ur pred drugim merjenjem (jedli so cel dan), zato je odziv na obrok lahko drugačen in primerjava ni povsem relevantna.

Prišlo je do majhnega (1 %) in statistično nepomembnega znižanje skupnega Hol po uživanju hrane, od tega je devet oseb prispevalo k povišanju, 13 oseb pa k znižanju, medtem ko pri petih osebah sprememb ni bilo. Največje in najmanjše povečanje pri

posameznem preiskovancu je bilo sorazmerno majhno (okoli 10 %) v primerjavi s spremembo števila MV in koncentracijo trigliceridov (približno 100 %). Naši rezultati se ujemajo s prejšnjimi rezultati Cohn in sod. (1988), ki poročajo o 1 % znižanju skupne koncentracije Hol šest ur po obroku, bogatem z maščobami in rezultati DeRosa s sod. (2010), poročajo o 1 % povečanju skupne koncentracije Hol, prav tako po obroku bogatim z maščobami.

Statistično pomembno je tudi zmanjšanje koncentracije LDL-holesterola po uživanju hrane in sicer 2 % ob zadostni statistični moči. Pri petih osebah se je koncentracija LDL-holesterola povečala, pri 13 pa zmanjšala, medtem ko je pri šestih osebah ostala nespremenjena. Največje zvišanje je 7 % in največje znižanje 11 %, kar je podobno kot pri skupnem holesterolu. Cohn s sod. (1988), opisujejo ne-monotono odvisnost koncentracije LDL-holesterola od časa po obroku. Globina minimuma znaša okoli 15 % začetne vrednosti. DeRosa in sod. (2010) prikazujejo trend zmanjšanja koncentracije LDL-holesterola v 12 urah, pri čemer pa v prvih šestih urah po obroku pride tudi do povišanja, kar je v skladu z našimi rezultati.

Koncentracija HDL-holesterola po postu in po uživanju hrane kaže majhno (2 %) in statistično nepomembno spremembo (Preglednica 4). Čeprav je učinek znotraj populacije nepomemben, je zanimiva ugotovitev, da se je koncentracija HDL-holesterola povečala pri 10 preiskovancih (maksimalno povečanje za 16 %) po uživanju hrane, pri ravno tolikem številu ostala na enaki ravni in zmanjšala le pri 4 preiskovancih (maksimalno zmanjšanje za 17 %) (Preglednica 3). Cohn in sod. (1988), DeRosa in sod. (2010), in Alssema in sod. (2010) so ugotovili ne-monotono odvisnost koncentracije HDL-holesterola v odvisnosti od časa po uživanju hrane s spremembo vrednosti okoli 10 %. V teh študijah se je v nasprotju z našimi rezultati, pet ur po obroku koncentracija HDL-holesterola zmanjšala.

Ugotovili smo znatno (6 %), statistično pomembno znižanje glukoze v krvi po uživanju hrane z zadostno statistično močjo (0,86). Koncentracija glukoze v krvi se je povečala pri 6 osebah in zmanjšala pri 18. Maksimalno povečanje je znašalo 7 %, in maksimalno znižanje je znašalo 18 %. Prejšnje raziskave so pokazale ne-monotone odvisnosti glukoze v krvi od časa po obroku v območju 20 % (DeRosa in sod., 2010; Tushuizen in sod., 2006).

Cohn in sod. (1988) prikazujejo negativno korelacijo med koncentracijo trigliceridov in koncentracijo HDL-holesterola po obroku ($r = -0,502$, $p \leq 0,05$). Podobno smo dobili negativno korelacijo med koncentracijo trigliceridov po uživanju hrane in koncentracijo HDL-holesterola po uživanju hrane ($r = -0,45$, $p \leq 0,01$), ter med koncentracijo trigliceridov po postu in koncentracijo HDL-holesterola po postu ($r = -0,47$, $p \leq 0,02$).

Ugotovili smo tudi pozitivno korelacijo med koncentracijo trigliceridov po uživanju hrane in koncentracijami skupnega Hol in LDL-holesterola po postu in po uživanju hrane ($r = 0,52, 0,49, 0,47, 0,41$), kar kaže tudi dejstvo, da sta skupni Hol in LDL-holesterol v obeh stanjih močno povezana. Obe koncentraciji LDL-holesterola kažeta pozitivno korelacijo, medtem ko koncentracija HDL-holesterola po uživanju hrane kaže negativno korelacijo s koncentracijo trigliceridov po postu ($r = 0,55, 0,54, -0,46$). To nakazuje, da visoka koncentracija trigliceridov po postu implicira po obroku višjo koncentracijo skupnega Hol, LDL-holesterola in trigliceridov nižjo koncentracijo HDL-holesterola, kar je neugodno. Na drugi strani pa visoka koncentracija skupnega Hol in LDL-holesterola, ter nizka koncentracija HDL-holesterola po postu implicirajo po uživanju hrane visoko koncentracijo trigliceridov, kar pa predstavlja začaran krog.

Čeprav na povprečne vrednosti parametrov, predvsem skupnega Hol, LDL-holesterola in HDL-holesterola, uživanje hrane nima znatnega vpliva (Preglednica 4), pa so se pri posameznih osebah pokazale znatne razlike (Preglednica 3), kar so ugotovili že Cohn in sod. (1988). Zato ne moremo sklepati, da je povečanje ali zmanjšanje katerega koli parametra po uživanju hrane pokazatelj normalnega ali patološkega procesa na ravni posameznika. Poleg tega na podlagi obstoječih rezultatov, ni mogoče sklepati na določen mehanizem, ki ohranja povprečne vrednosti parametrov relativno konstantne med postom in uživanjem hrane.

Naš protokol ni omejeval prostovoljcev pri njihovih vsakdanjih dejavnostih in prehranjevalnih navadah, kljub temu se rezultati v veliki meri ne razlikujejo od prejšnjih raziskav z bolj natančno opredeljenim in nadzorovanim vnosom hrane. Hkrati pa naš protokol boljše predstavlja dejansko/realno stanje posameznikov, kar je prednost glede na druge študije.

Pri razlagi rezultatov je treba upoštevati, da cirkadialni ritem vpliva na raven koncentracije krvnih sestavin. Ker smo kri prvi dan odvzeli ob sedmi uri zjutraj, drugi dan pa po 12 uri, bi se koncentracije Hol in glukoze v krvi zaradi tega morale razlikovati. Glede na predhodna poročanja o odvisnosti koncentracije Hol in koncentracije trigliceridov od časa (Ogita in sod., 2007; Bremner in sod., 2000) moramo upoštevati, da se zaradi učinka cirkadialnega ritma koncentracija celotnega Hol pri naših preiskovancih po uživanju hrane povprečno poveča za približno 3 %, koncentracija trigliceridov za 7 %, koncentracija LDL-holesterola se zmanjša za 2 %, medtem ko koncentracija HDL-holesterola ostane nespremenjena. Če te rezultate primerjamo z našimi (Preglednica 4), bi učinek uživanja hrane na trigliceride in LDL-holesterola lahko pripisali cirkadialnemu ritmu, medtem ko se vpliv na skupni Hol in HDL-holesterol razlikuje, čeprav le za nekaj odstotkov. Študijo cirkadialnega ritma so izvedli na prostovoljcih, ki se med preiskavo niso postili, pač pa so se prehranjevali z uživanjem rednih obrokov (Ogita in sod., 2007; Bremner in sod., 2000).

Ugotavljamo tudi, da negativna korelacija med številom MV po uživanju hrane in koncentracijo skupnega Hol po postu, ter med številom MV po uživanju hrane in koncentracijo LDL-holesterola po postu, kaže na doslej prikrito zalogo holesterola v krvi, ki se nahaja v MV in krvnih celicah. Manjša količina holesterola v obliki HDL in LDL bi lahko pomenila večjo količino holesterola v krvnih celicah in MV.

5.1.2 Vpliv temperature pri postopku izolacije na število mikroveziklov v izolatih periferni krvi

V tem delu smo se omejili na študij vpliva temperature pri postopku izolacije na število MV v izolatih, saj zanesljivost in točnost metode za izolacijo MV predstavlja ključni korak v kliničnih raziskavah, kjer želimo populacije kvantitativno primerjati. Študirali smo populacijo preiskovancev brez ugotovljene bolezni. Ugotovili smo, da v izolatih izmerimo manj MV, če je temperatura med celotnim postopkom izolacije višja (Slika 13). Možni poglavitni vpliv na ta pojav je zmanjšana viskoznost krvi pri višjih temperaturah, kar posledično vpliva na hitrost usedanja celic, zlasti trombocitov, v krvnih vzorcih. V ravnovesju namreč velja, da je vsota vseh sil, ki delujejo na delec, ki potuje v centrifugirki,

enaka 0. Upoštevamo smo silo zaradi centrifugalnega pospeška ($F_{centrifugalna}$), silo vzgona (F_{vzgon}) in silo upora tekočine (F_{upora}),

$$F_{centrifugalna} - F_{vzgon} - F_{upora} = 0 \quad \dots(4)$$

Vzamemo, da je

$$F_{centrifugalna} = ma, \quad \dots(5)$$

kjer je m masa delca, a pa pospešek centrifuge (v našem primeru 1550 g),

$$F_{vzgon} = m'a, \quad \dots(6)$$

kjer je m' masa izpodrinjene tekočine, v kateri se giblje delec,

$$F_{upora} = \alpha d \eta v, \quad \dots(7)$$

kjer je α brez dimenzijski koeficient, ki opisuje obliko delca, d razsežnost delca, η viskoznost tekočine, v kateri se giblje delec, in v hitrost delca pri usedanju. Če vstavimo enačbe (2) - (4) v enačbo (1), in jo uredimo, dobimo

$$v = \frac{(m - m')a}{\alpha d \eta} \quad \dots(8)$$

Če je viskoznost tekočine, v kateri celice plavajo, manjša, se celice počasneje usedajo, saj je hitrost obratnosorazmerna viskoznosti. Ker viskoznost tekočine pada z dviganjem temperature, se pri nižjih temperaturah celice dlje časa zadržujejo v zgornjem delu epruvete (v območju plazme), pri tem pa nenehno sipajo MV. V plazmi bo tako pri nižjih temperaturah nastalo več MV kot pri višjih, ustvari pa se tudi gradient koncentracije MV v epruveti. Zato je pomembno, katero plast plazme vzamemo. Dinamika sedimentacije (usedanja) pri posamezniku je odvisna tudi od velikosti in oblike krvnih celic, predvsem trombocitov (parametrov a in d).

Temperaturna regulacija v centrifugi je šibka točka naše metode. Zaradi trenja med deli centrifuge se slednja med vrtenjem segreva. Pri tem se avtomatsko vključi hlajenje, ko

temperatura preseže določeno vrednost. Nihanja v temperaturi so lahko velika tudi do nekaj stopinj Celzija, časovni potek temperaturne regulacije pa ni predvidljiv in ponovljiv. Menimo, da postopka izolacije ni mogoče izboljšati brez predhodnega izboljšanja delovanja centrifuge.

Plazmo po centrifugiranju odvzamemo ročno (s pipeto). Pri takem odvzemu je možnost kontrole hitrosti vsesavanja tekočine omejena, razen tega ni ponovljivo, kateri del vzorca vsesamo v pipeto. Za izboljšanje ponovljivosti odvzema plazme iz epruvete bi morali uporabiti avtomat z nastavljivo hitrostjo sesanja in senzorjem za ustrezno postavitev konice za sesanje glede na gladino vzorca.

Ker izboljšane aparature še niso na voljo, na osnovi naših rezultatov menimo, da je primernejša temperatura za izolacijo 37 °C, namesto sobne temperature, kot navajajo drugi avtorji (Diamant in sod., 2002). Pri 37 °C je viskoznost vzorcev manjša, zato se celice v centrifugi hitreje posedajo in v predelek, iz katerega odvzamemo vzorec, odpustijo manjše število mikroveziklov. Pri telesni temperaturi tudi ne pride do aktivacije trombocitov zaradi ohlادتve na sobno temperaturo.

Pretočna citometrija je sodobna, elegantna in pogosto uporabljana metoda določanja števila MV. Prednosti pretočne citometrije so v tem, da ne zahteva fiksacije in drugih dolgotrajnih postopkov. Slabosti pa so, da ostane pri merjenju oblika značilnih mikroskopskih struktur v vzorcu nejasna in da štetje s citometrom ni dovolj natančno. Če imata dva delca različno sestavo in enako velikost, se pri absorpciji svetlobe njena amplituda različno zmanjša, tako da je signal, ki potuje naravnost, za oba delca različen, kar predstavlja artefakt. Artefakti se pojavljajo tudi pri štetju delcev, katerih velikost je blizu valovne dolžine svetlobe, ki jo merimo (Simons in Ikonen, 1997).

Artefakt metode predstavlja tudi dejstvo, da se kri, ki je odvzeta preiskovancu, razlikuje od krvi *in vivo*. Pri odvzemu in pri centrifugiranju pride do aktivacije trombocitov, stanje krvi pa se spremeni tudi zaradi prisotnosti antikoagulantov v epruvetah za odvzem (George in sod., 2004). Mikrovezikli se lahko lepijo na stene igle, epruvet in centrifugirke, pa tudi na

konice pipet. Pomembnost posameznih vplivov na končni rezultat in analiza vseh korakov, ki sodelujejo v postopku izolacije MV, še nista bili izvedeni. Tako analizo je pomembno izdelati, saj je izboljšava obstoječih protokolov za izolacijo MV iz krvi predpogoj, da se ustvari trdna podlaga za klinične študije. Mikrovezikli predstavljajo zanimivo in obetavno področje v kliničnih raziskavah, zaradi potencialne možnosti uporabe v diagnostične in terapevtske namene pri različnih boleznih. Seveda bi bilo nujno potrebno vložiti dodatna prizadevanja v izboljšanje protokola za izolacijo in opazovanje.

5.2 SKLEPI

Glede na rezultate opravljenih analiz smo prišli do sledečih zaključkov:

- Izolirali smo mikrovezikle iz krvi človeka.
- Uživanje hrane povzroči povečanje števila mikroveziklov v izolatih iz krvi zdravih preiskovancev.
- Mikrovezikli predstavljajo zalogo holesterola v krvi.
- Temperatura med procesom izolacije pomembno vpliva na število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi; pri nižjih temperaturah dobimo večje število mikroveziklov.
- Postopka izolacije mikroveziklov, ki je občutljiv na zunanje parametre in dinamiko izolacije, ni mogoče izboljšati brez tehnološko naprednih rešitev. Potrebno je nadgraditi instrumente, ki v sedanji obliki ne zagotavljajo zadostne kontrole postopka.
- V okviru obstoječih možnosti predlagamo izboljšavo protokola. Postopek izolacije mikroveziklov daje boljše rezultate pri temperaturi 37 °C kot pri sobni temperaturi.

6 POVZETEK

Lipidi so skupina hidrofobnih bioloških molekul, ki opravljajo številne pomembne funkcije v naravi. So pomembni gradniki bioloških membran, katere si predstavljamo kot mozaik mikrodomen. Eden takih predstavnikov je holesterol. Domene bogate s Hol in sfingomielinom imenujemo lipidni rafti. Rafti tvorijo področja z veliko ukrivljenostjo membrane, kar vodi v brstenje membrane in v končni fazi, v odpuščanje mikroveziklov (z membrano obdanih fragmentov celice manjših kot mikrometer) od membrane v okolno raztopino, tudi v kri. Proces se imenuje mikrovezikulacija celičnih membran. Mikrovezikli, ki vsebujejo tudi Hol, predstavljajo dodatno zalogo Hol v krvi, ki do sedaj še ni bila vključena v standardizirane diagnostične postopke. Metoda določanja MV pa še ni dovolj ponovljiva in zanesljiva, da bi bila uporabna v klinični praksi, predvsem zaradi velike občutljivosti metode na različne zunanje parametre, kot je na primer temperatura, in na dinamiko procesa izolacije.

Namen naloge je izboljšanje razumevanja presnove Hol in mehanizmov mikrovezikulacije. Ugotoviti smo želeli, ali je koncentracija holesterola povezana s številom MV v krvi. Z analizo metode smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv temperature na število MV v izolatih iz krvi.

Koncentracije skupnega krvnega Hol, LDL-holesterola, HDL-holesterola in koncentracije trigliceridov v krvi smo določali s standardnimi kolorimetričnimi metodami produktov encimskih reakcij. Mikrovezikle smo izolirali s centrifugiranjem in izpiranjem in jih šteli s pretočnim citometrom. Temperaturo med izolacijo smo regulirali s toplotno kopeljo.

Povprečno število MV je za 50 % večje po uživanju hrane kot po postu, koncentracije skupnega Hol, LDL-holesterola in HDL-holesterola so ostale v okviru 5 % od prvotnega stanja (*post-fasting*), medtem ko smo ugotovili 8 % povečanje koncentracije trigliceridov po obroku, vendar razlika ni bila statistično pomembna ($p = 0,31$). Ugotovili smo tudi 6 % statistično pomembno zmanjšanje koncentracije glukoze v krvi po obroku. Ugotovili smo statistično pomembno negativno korelacijo med številom MV in koncentracijo LDL-holesterola ($r = -0,29$, $p = 0,04$).

Potrdili smo tudi hipotezo, da je število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi večje, če postopek poteka pri nižjih temperaturah. Rezultati kažejo, da večina mikroveziklov, izoliranih iz periferne krvi, nastane po odvzemu krvi.

Uživanje hrane povzroči povečanje števila MV v krvi. Če postopek izolacije MV iz krvi poteka pri nižjih temperaturah, dobimo večje število mikroveziklov v izolatih, ki večinoma nastanejo po odvzemu krvi. Za izboljšanje metode izolacije so potrebne tehnološko napredne rešitve. V okviru obstoječih možnosti predlagamo izboljšavo protokola za izolacijo mikroveziklov glede na temperaturo, ki naj bo 37 °C namesto sobne temperature.

7 VIRI

Aeffner S., Reusch T., Weinhausen B., Salditt T. 2009. Membrane fusion intermediates and the effect of cholesterol: An in-house X-ray scattering study. *European Physical Journal*, 30: 205-214.

Allan D., Billah M.M., Finean J.B., Michell R.H. 1976. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$. *Nature*, 261: 58-60.

Alssema M., El-Harchaoui K., SHolindhelm R.K., Diamant M., Nijpels G., Kostense P.J., Teerlink T., Heine R.J., Dallinga-Thie G.M., Kuivenhoven J.A., Dekker J.M., Scheffer P.G. 2010. Fasting cholesteryl ester transfer protein concentration is independently associated with the postprandial decrease in high-density lipoprotein cholesterol concentration after fat-rich meals: the Hoorn prandial study. *Metabolism*, 59: 854-860.

Araki T. 1979. Release of cholesterol-enriched microvesicles from human erythrocytes caused by hypertonic saline at low-temperatures. *FEBS Letters*, 97: 237-240.

Ardoin S.P., Shanahan J.C., Pisetsky D.S. 2007. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66: 159-165.

Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reca R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. 2002. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Experimental Hematology*, 30: 450-459.

Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Weglarczyk K., Baran J., Urbanowicz B., Branski P., Ratajczak M.Z., Zembala M. 2005. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 55: 808-818.

Bastida E., Ordinas A., Jamieson G.A. 1983. Identity of procoagulant and platelet aggregating activities in microvesicles from human glioblastoma cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 50: 218-218.

Bastida E., Escolar G., Ordinas A., Jamieson G.A. 1985. Identical thrombogenic effects of human-tumor cells and shed microvesicles with different mechanisms of platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 54: 264-264.

Bastida E., Escolar G., Ordinas A., Jamieson G.A. 1986. Morphometric evaluation of thrombogenesis by microvesicles from human-tumor cell-lines with thrombindependent (u87mg) and adenosine-diphosphate dependent (sknmc) platelet activating mechanisms. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 108: 622-627.

Bedina-Zavec P., Frank M., Janša V., Sušanj P., Jerala R., Rozman B., Kralj-Iglič V. 2009. Assessment of nanovesicles isolated from peripheral blood. V: *SLONANO: Book of Abstracts*. Ljubljana, 19-21 October 2009. Mihailović D.D., Hočevan S., Arčon D., Kunej Š., Umek P., Knave M. (ur.). Ljubljana, Kemijski inštitut: 85-86.

Berckmans R.J., Nieuwland R., Tak P.P., Boing A.N., Romijn F.P., Kraan M.C., Breedveld F.C., Hack C.E., Sturk A. 2002. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis & Rheumatism*, 46: 2857-2866.

Biro E., Nieuwland R., Sturk A. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1843-1844.

Biro E., Akkerman J.W.N., Hoek F.J., Gorter G., Pronk L.M., Sturk A., Nieuwland R. 2005. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 2754-2763.

Black P.H. 1980. Shedding from normal and cancer-cell surfaces. *New England Journal of Medicine*, 303: 1415-1416.

Bona R., Lee E., Rickles F. 1987. Tissue factor apoprotein - intracellular-transport and expression in shed membrane-vesicles. *Thrombosis Research*, 48: 487-500.

Booth A.M., Fang Y., Fallon J.K., Yang M., Hildreth J.E.K., Gould S.J. 2006. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 172: 923-935.

Boulanger C.M., Amabile N., Tedgui A. 2006. Circulating microparticles a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*, 48; 180-186.

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 208-240.

Bremner W.F., Sothorn R.B., Kanabrocki E.L., Ryan M., McCormick J.B., Dawson S., Connors E.S., Rothschild R., Third J.L.H.C, Vahed S., Nemchausky B.M., Shirazi P., Olwin J.H. 2000. Relation between circadian patterns in levels of circulating lipoprotein(a), fibrinogen, platelets, and related lipid variables in men. *American Heart Journal*, 139: 164-173.

Brogan P.A., Dillon M.J. 2004. Endothelial microparticles and the diagnosis of the vasculitides. *Internal Medicine*, 43: 1115-1119.

Brogan P.A., Shah V., Brachet C., Harnden A., Mant D., Klein N., Dillon M.J. 2004. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis & Rheumatism*, 50: 927-936.

Brown D.A., London E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 17221-17224.

Cerri C., Chimenti D., Conti I., Neri T., Paggiaro P., Celi A. 2006. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *Journal of Immunology*, 177: 1975-1980.

Cholesterol. 2007. V: *Encyclopedia Britannica online*. Chicago, Encyclopedia Britannica, Inc.: 11 str.

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/114106/cholesterol> (September 2010)

Cohn J.S., McNamara J.R., Cohn D., Ordovas J.M., and Schaefer E.J. 1988. Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *Journal of Lipid Research*, 29: 469-478.

Cole W.F., Rumsby M.G., Longster G.H., Tovey L.A.D. 1979. Changes in the inhibition of specific agglutination by plasma due to microvesicles released from human red-cells during storage for transfusion. *Vox Sanguinis*, 37: 73-77.

Coltel N., Combes V., Wassmer S.C., Chimini G., Grau G.E. 2006. Cell vesiculation and immunopathology: Implications in cerebral malaria. *Microbes Infection*, 8: 2305-2316.

Combes V., Simon A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F. 1999. *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *Journal of Clinical Investigation*, 104: 93-102.

del Conde I., Shrimpton C.N., Thiagarajan P., Lopez J.A. 2005. Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106: 1604-1611.

del Conde I., Bharwani L.D., Dietzen D.J., Pendurthi U., Thaigarajan P., Lopez J.A. 2007. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5: 70-74.

DeRosa G., Ferrari I., D'Angelo A., Salvadeo S.A.T., Fogari E., Gravina A., Mereu R., Palumbo I., Maffioli P., Randazzo S., Cicero A.F.G. 2010. Effects of a standardized oral fat load on vascular remodeling markers in healthy subjects. *Microvascular Research*, 80: 110-115.

Diamant M., Nieuwland R., Pablo R.F., Sturk A., Smit J.W., Radder J.K. 2002. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 106: 2442-2447.

Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R. 2004. Cellular microparticles: New players in the field of vascular disease? *European Journal of Clinical Investigation*, 34: 392-401.

Dignat-George F., Camoin-Jau L., Sabatier F., Arnoux D., Anfosso F., Bardin N., Veit V., Combes V., Gentile S., Moal V., Sanmarco M., Sampol J. 2004. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis and Haemostasis*, 91: 667-673.

Distler J.H., Pisetsky D.S., Huber L.C., Kalden J.R., Gay S., Distler O. 2005. Microparticles as regulators of inflammation: Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*, 52: 3337-3348.

Dumaswala U.J., Bryan D.J., Greenwalt T.J. 1983. Biochemical-characterization of microvesicles shed by red-cells during sickling and storage. *Federation Proceedings*, 42: 2197.

Edidin M. 2003. The state of lipid rafts: From model membranes to cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32: 257-283.

Ferreira A.C., Peter A.A., Mendez A.J., Jimenez J.J., Mauro L.M., Chirinos J.A., Ghany R., Virani S., Garcia S., Horstman L.L., Purow J., Jy W., Ahn Y.S., de Marchena E. 2004. Postprandial hyperglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation*, 110: 3599-3603.

Fevrier B., Vilette D., Archer F., Loew D., Faigle W., Vidal M., Laude H., Raposo G. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9683-9688.

Flaumenhaft R. 2006. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36: 182-187.

Furie B., Zwicker J., LaRocca T., Kos C., Bauer B., Furie B.C. 2005. Tissue factorbearing microparticles and cancer-associated thrombosis. *Haematology Research*, 1: 5-8.

Furie B., Furie B.C. 2006. Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 36: 177-181.

George J.N., Thoi L.L., McManus L.M., Reimann T.A. 1982. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*, 60: 834-840.

George F.D., Sabatier F., Camoin-Jau L., Sampol J. 2004. Measuring circulation cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1844-1845.

Ginestra A., La Placa M.D., Saladino F., Cassara D., Nagase H., Vittorelli M.L. 1998. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Anticancer Research*, 18: 3433-3437.

Greenwalt T.J. 2006. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*, 46: 143-152.

Greer I.A. 2004. Endothelial cell microparticles and antiphospholipid syndrome: Pathologic explanation and diagnostic opportunities. *Thrombosis and Haemostasis*, 91: 636-638.

Hägerstrand H., Isomaa B. 1989. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 982: 179-186.

Hägerstrand H., Isomaa B. 1992. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1109: 117-126.

Hägerstrand H., Isomaa B. 1994. Lipid and protein-composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1190: 409-415.

Hägerstrand H., Bobrowska-Hägerstrand M., Lillsunde I., Isomaa B. 1996. Vesiculation induced by amphiphiles and ionophore A23187 in porcine platelets: a transmission electron microscopic study. *Chemico-Biological Interactions*, 101: 115-126.

Heijnen H.F.G., Schiel A.E., Fijnheer R., Geuze H.J., Sixma J.J. 1999. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94: 3791-3799.

Holmes C.E., Levis J.E., Ornstein D.L. 2009. Activated platelets enhance ovarian cancer cell invasion in a cellular model of metastasis. *Clinical Experimental Metabolism*, 26: 653-661.

Hron G., Kollars M., Weber H., Sagaster V., Quehenberger P., Eichinger S., Kyrle P.A., Weltermann A. 2007. Tissue factor positive microparticles-cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thrombosis and Haemostasis*, 97: 119-123.

Huber V., Fais S., Iero M., Lugini L., Canese P., Squarcina P., Zaccheddu A., Colone M., Arancia G., Gentile M., Seregni E., Valenti R., Ballabio G., Belli F., Leo E., Parmiani G., Rivoltini L. 2005. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128: 1796-1804.

Hugel B., Zobairi F., Freyssinet J.M. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1846-1847.

Hugel B., Martinez M.C., Kunzelmann C., Freyssinet J.M. 2005. Membrane microparticles: Two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*, 20: 22-27.

Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J., Baj-Krzyworzeka M., Reca R., Turner A.R., Ratajczak J., Emerson S.G., Kowalska M.A., Ratajczak M.Z. 2001. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 98: 3143-3149.

Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marques-Curtis J.L., Machaliniski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *International Journal of Cancer*, 113: 752-760.

Janowska-Wieczorek A., Marquez-Curtis L.A., Wysoczynski M., Ratajczak M.Z. 2006. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion*, 46: 1199-1209.

Janša R., Šuštar V., Frank M., Sušanj P., Bešter J., Manček-Keber A., Kržan M., Iglič A. 2008. Number of microvesicles in peripheral blood and ability of plasma to induce adhesion between phospholipid membranes in 19 patients with gastrointestinal diseases. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 41: 124-132.

Junkar I., Šuštar V., Frank M., Janša V., Bedina Zavec A., Rozman B., Mozetič M., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V. 2009. Blood and synovial microparticles as revealed by atomic force and scanning electron microscope. *Open Autoimmunity Journal*, 1: 50-58.

Jy W., Horstman L.L., Jimenez J.J., Ahn Y.S. 2004. Measuring circulation cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1842-1843.

Jy W., Tiede M., Bidot C.J., Horstman L.L., Jimenez J.J., Chirinos J., Ann Y.S. 2007. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thrombosis Research*, 121: 319-325.

Kim H.K., Song K.S., Park Y.S., Kang Y.H., Lee Y.J., Lee K.R., Kim H.K., Ryu K.W., Bae J.M., Kim S. 2003. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastatic predictor. *European Journal of Cancer*, 39: 184-191.

Knijff-Dutmer E.A., Koerts J., Nieuwland R., Kalsbeek-Batenburg E.M., Laar M.A. 2002. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 46: 1498-1503.

Koga K., Matsumoto K., Akiyoshi T., Kubo M., Yamanaka N., Tasaki A., Inakashima H., Nakamura M., Kuroki S., Tanaka M., Katano M. 2005. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Research*, 25: 3703-3707.

Koren A. 2004. Presnova, termoregulacija in prebava. 2. razširjena izdaja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31-36.

Kotnik V., Čurin-Šerbec V., Ihan A., Jeras M., Malovrh T., Simčič S., Škobrne M., Wraber B. 2001. Imunologija: Priročnik za vaje. Ljubljana, Medicinski razgledi: 13-17.

Kralj-Iglič V., Batista U., Hägerstrand H., Iglič A., Majhenc J., Sok M. 1998. On mechanisms of cell plasma membrane vesiculation. *Radiology and Oncology*, 32: 119-123.

Kravitz M.S., Shoenfeld Y. 2005. Thrombocytopenic conditions-autoimmunity and hypercoagulability: Commonalities and differences in ITP, TTP, HIT, and APS. *American Journal of Hematology*, 80: 232-242.

Lichtenberg D., Goni M. F., Heerklotz H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends in Biochemical Science*, 30: 430-436.

London E. 2002. Insight into raft structure and formation from experiment in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 480-486.

London E., Brown D.A. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14: 111-136.

Lopez J.A., Del Conde I., Shrimpton C.N. 2005. Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 1737-1744.

Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Lesche G., Freyssinet J.M., Tedgui A. 1999. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 99: 348-353.

Martinez M.C., Tesse A., Zobairi F., Andriantsitohaina R. 2005. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 288: H1004-H1009.

Maurer-Spurej E., Pfeiler G., Maurer N., Lindner H., Glatter O., Devine D.V. 2001. Room temperature activates human blood platelets. *Laboratory Investigation*, 81: 581-592.

Michelsen A.E., Noto A.T., Brodin E., Mathiesen E.B., Brosstad F., Hansen J.B. 2009. Elevated levels of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during the postprandial state. *Thrombosis Research*, 123:881-886.

Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F. 2005. Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis. *Thrombosis Journal*, 3: 15-15.

Müller I., Klocke A., Alex M., Kotzsch M., Luther T., Morgenstern E., Zieseniss S., Zahler S., Preissner K., Engelmann B. 2003. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB Journal*, 17: 476-478.

Nomura S. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1847-1848.

Ogita K., Ai M., Tanaka A., Ito Y., Hirano T., Yoshino G., Shimokado K. 2007. Circadian rhythm of serum concentration of small dense low-density lipoprotein cholesterol. *Clinical Chimica Acta*, 376: 96-100.

Olano-Martin E., Abraham E.C., Gill-Garrison R., Valdes A.M., Grimaldi K., Tang F., Jackson K.G., Williams C.M., Minihane A.M. 2008. Influence of apoA-V gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *Journal of Lipid Research*, 49: 945-953.

Pelchen-Matthews A., Raposo G., Marsh M. 2004. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends in Microbiology*, 12: 310-316.

Pereira J., Alfaro G., Goycoolea M., Quiroga T., Ocqueteau M., Massardo L., Pérez C., Sáez C., Panes O., Matus V., Mezzano D. 2006. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus: Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thrombosis and Haemostasis*, 95: 94-99.

Pisetsky D.S. 2009. Microparticles as biomarkers in autoimmunity: from dust bin to center stage. *Arthritis Research & Therapy*, 11, 135: doi:10.1186/ar2856: 3 str.

Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. 2006a. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell to cell communication. *Leukemia*, 20: 1487-1495.

Ratajczak J., Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reca R., Dvorak P., Ratajczak M.Z. 2006b. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20: 847-856.

Ratajczak M.Z. 2006. Microvesicles: From "dust to crown". *Blood*, 108: 2885-2886.

Rauch U., Antoniak S. 2007. Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thrombosis and Haemostasis*, 97: 9-18.

Reich C.F., Pisetsky D.S. 2009. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Experimental Cell Research*, 315: 760-768.

Robertson C., Booth S.A., Beniac D.R., Coulthart M.B., Booth T.F., McNicol A. 2006. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood*, 107: 3907-3911.

Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Murphy S.L., Conover D.O., Poncz M., Ratajczak J., Gaulton G.N., Ratajczak M.Z. 2003. Platelet- and megakaryocytederived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids*, 17: 33-42.

Rumsby M.G., Trotter J., Allan D., Michell R.H. 1997. Recovery of membrane microvesicles from human erythrocytes stored for transfusion: a mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation. *Biochemical Society Transactions*, 5: 126-128.

Sabatier F., Roux V., Anfosso F., Camoin L., Sampol J., Dignat-George F. 2002. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells *in vitro* induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*, 99: 3962-3970.

Schetter A.J., Harris C.C. 2009. Plasma microRNAs: a potential biomarker for colorectal cancer? *Gut*, 58: 1318-1319.

Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P., Chang Y.T., Rosania G.R. 2003. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Research*, 63: 4331-4337.

Sheremata W.A., Jy W., Horstman L.L., Ahn Y.S., Alexander S., Minagar A. 2008. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 27: doi:10.1186/1742-2094-5-27: 6 str.

Shet A.S., Aras O., Gupta K., Hass M.J., Rausch D.J., Saba N., Koopmeiners L., Key N.S., Hebbel R.P. 2003. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*, 102: 2678-2683.

Shet A.S., Key N.S., Hebbel R.P. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2: 1848-1850.

Shukla S.D., Coleman R., Finean J.B., Michell R.H. 1978. Use of phospholipase-c to detect structural-changes in membranes of human erythrocytes aged by storage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 512: 341-349.

Simak J., Gelderman M.P. 2006. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews*, 20: 1-26.

Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572.

Singer S.J., Nicolson G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.

Sterols. 2000. Alabaster, Avanti Polar Lipids, Inc.: 1str.
<http://www.avantilipids.com> (September 2010)

Šuštar V., Štukelj R., Frank M., Janša V., Bedina Zavec A., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V. 2010. Slike mikroveziklov dobljene z vrstično in presevno elektronsko mikroskopijo. Ljubljana, Laboratorij za klinično biofiziko, Medicinska fakulteta: neobjavljeno.

Taylor D.D., Chou I.N., Black P.H. 1983. Isolation of plasma-membrane fragments from cultured murine melanoma-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113: 470-476.

Taylor D.D., Black P.H. 1987. Neoplastic and developmental importance of plasma membrane vesicles. *American Zoologist*, 26: 411-415.

Tenchov B.G., MacDonald R.C., Siegel D.P. 2006. Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: Cholesterol as membrane "fusogen". *Biophysical Journal*, 91: 2508-2516.

Tushuizen M.E., Nieuwland R., Scheffer P.G., Sturk A., Heine R.J., Diamant M. 2006. Two consecutive high-fat meals affect endothelial-dependent vasodilation, oxidative stress and cellular microparticles in healthy men. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 1003-1010.

Tushuizen M.E., Nieuwland R., Rustemeijer C., Hensgens B.E., Sturk A., Heine R.J., Diamant M. 2007. Elevated endothelial microparticles following consecutive meals are associated with vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30: 728-730.

Valenti R., Huber V., Iero M., Filipazzi P., Parmiani G., Rivoltini L. 2007. Tumorreleased microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Research*, 67: 2912-2915.

VanWijk M.J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R. 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 59: 277-287.

Vella L.J., Greenwood D.L.V., Cappai R., Scheerlinck J.P., Hill A.F. 2008. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124: 385-393.

Warkentin T.E., Hayward C.P., Boshkov L.K., Santos A.V., Sheppard J.A., Bode A.P., Kelton J.G. 1994. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 84: 3691-3699.

Whiteside T.L. 2005. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *British Journal of Cancer*, 92: 209-211.

WHO. 2006. Diabetes mellitus. V: Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus. Khatib O.M.N. (ed.). Geneva, WHO- World Health Organization: 20-27.

Wolf P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13: 269-288.

Yamaguchi T., Kajikawa T., Kimoto E. 1991. Vesiculation induced by hydrostatic pressure in human erythrocytes. *Journal of Biochemistry*, 3: 355-359.

ZAHVALA

V okviru predstavljenega dela smo izvedeli laboratorijske poskuse in klinične študije. Delo je potekalo v Laboratoriju za klinično biofiziko Medicinske fakultete UL. Klinične študije so potekale na KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana. Delo je potekalo od septembra leta 2009.

Kompleksen pristop k problematiki je terjal sodelovanje mnogih strokovnjakov doma in v tujini ter delo z opremo, ki presega možnosti Laboratorija za klinično biofiziko. Ker brez sodelovanja in podpore kolegov to delo ne bi bilo mogoče, se jim zahvaljujem za njihov pomemben prispevek.

Posebna zahvala velja mentorici, doc. dr. Helena Abramovič, univ. dipl. inž. živilske tehnologije, iz Katedre za biokemijo in kemijo živil Biotehniške fakultete UL in še posebej somentorici prof. dr. Veroniki Kralj-Iglič, univ. dipl. fiz. iz Laboratorija za klinično biofiziko Inštituta za biofiziko Medicinske fakultete UL, ki me je spremljala in vodila skozi vse faze raziskovalnega dela. Iskrena hvala za njeno vzpodbudo in izreden človeški občutek do ljudi.

Moja zahvala gre recenzentu prof. dr. Marjan Simčiču, univ. dipl. inž. živilske tehnologije, iz Katedre za tehnologije, prehrano in vino Biotehniške fakultete UL in prof. dr. Vojtehu Cestniku, dr. vet. med., z Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete UL.

Zahvaljujem se Roku Hrženjaku, študentu iz Veterinarske fakultete UL, za njegov prispevek k nastanku dela naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štabucu, dr. med., predstojniku KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana in asist. Radu Janši, dr. med., iz iste ustanove, ter prof. dr. Romanu Jerali s Kemijskega inštituta, ker so mi omogočili delo na kliniki in s pretočnim citometrom.

Zahvaljujem se dr. Apoloniji Bedini-Zavec s Kemijskega inštituta in Laboratorija za klinično biofiziko za meritve na pretočnem citometru.

Prof. dr. Alešu Igliču s Fakultete za elektrotehniko UL in prof. dr. Petru Veraniču z Medicinske fakultete UL se zahvaljujem za nasvete in diskusije.

Dr. Mojci Frank, dr. med. iz KO za revmatologijo UKC Ljubljana in Vidu Šuštarju, univ. dipl. biol. iz Laboratorija za klinično biofiziko Medicinske fakultete UL se zahvaljujem za izboljšave protokola za izolacijo mikroveziklov.

Za sodelovanje pri poskusih se zahvaljujem dr. Mojci Frank, dr. med., Vidu Šuštarju, univ. dipl. biol., Vidu Janši, študentu medicine in Petri Sušanj, študentki medicine.

Za odvzem krvi se zahvaljujem Ines Hribar Ignaščenko, viš. med. ses. iz KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana. Posebna zahvala gre darovalcem krvi.

Za lektoriranje slovenskega teksta se zahvaljujem Marijanu Pušavcu, prof. slov.

Za skrben pregled literature se zahvaljujem Lini Burkan Makivić, univ dipl. inž. živ. tehnol.

Hvala mojim staršem, mami Vidi in očetu Jožetu, sestri Katji, bratu Urošu in babici Mariji in dedku Jožefu, ker ste mi stali ob strani in me na vse načine spodbujali pri študiju.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem.

Nenazadnje bi se zahvalil tudi tebi Klara, ker me sprejemaš takega kot sem.

Hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Soglasje Republiške komisije za medicinsko etiko.



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, dr. med.
Laboratorij za klinično biofiziko
Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta v Ljubljani
Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

Štev.: 117/02/10
Datum: 23. 3. 2010

Spoštovana gospa prof. dr. Kralj-Iglič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 11. 2. 2010¹ poslali vašo prošnjo za mnenje o etični primernosti raziskave z naslovom:

"Mikrovezikli v telesnih tekočinah domačih živali in človeka."

KME je na seji 23. 2. 2010 ocenila, da raziskava ni v nasprotju z etičnimi standardi, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije za medicinsko etiko

¹ Vaša vloga ni imela spremnega dopisa.

Priloga B: Formular, ki so ga izpolnili darovalci krvi.

Spoštovani kolegi!

V novembru in decembru boste imeli zdravniški pregled, pri katerem Vam bodo odvzeli kri za hemogram, lipidogram in biokemijske analize, po nekaj mililitrov. Pri odvzemu sestra ali tehnik vstavi (navadno v medialno kubitalno veno) iglo in nastavi epruveto, v kateri je vakuum, tako da predpisana količina krvi steče v epruveto. Če se boste odločili za sodelovanje v naši raziskavi, bi Vam odvzeli dodatno 2,7 mililitrov krvi.

Člen naše raziskave je izboljšanje protokola za izolacijo mikrovesiklov iz periferne krvi, zanimajo pa nas tudi korelacije med številom mikrovesiklov in parametri, ki so določeni z lipidogramom, hemogramom in biokemijskimi preiskavami.

Mikrovesikli (na sliki spodaj so prikazani mikrovesikli, izolirani iz periferne krvi zdravega človeka) nastanejo kot končni produkt brstenja celic in s krvnim in limfnim obtokom potujejo po telesu. Mikrovesikli so prisotni tudi v telesnih tekočinah živali. Klinične študije kažejo, da je pri bolnikih s tromboemboličnimi zapleti, rakom in avtoimunimi boleznimi njihovo število povečano. Določanje lastnosti, števila in sestave mikrovesiklov v periferni krvi je potencialna diagnostična metoda, med prvimi uporabi te metode je bilo določanje prisotnosti ustrezne mikro RNA v krvi živali z BSE (bovina spongioforna encefalopatija, bolj znana kot bolezen norih krav). Tako so lahko preverili prisotnost bolezni z odvzemom krvi živim živalim, ne pa z analizo možganov mrtvih živali.

Zenkrat še ne obstoja standardiziran protokol za določanje števila mikrovesiklov, predvsem zaradi tega, ker na končni rezultat vpliva mnogo parametrov in metoda še ni dovolj ponovljiva in presojljiva. V okviru te študije bi raziskali vpliv temperature pri odvzemu krvi, načina ločitve plazme od celic in časa procesiranja na občutljivost določanja števila mikrovesiklov v krvi zdravih prostovoljcev. Študirali bi tudi možne korelacije med številom mikrovesiklov in krvnim holesterolom, krvnim sladkorjem, številom krvnih celic in ostalimi parametri, ki jih bodo določali ob pregledu.

Z darovanjem krvi pomagata potencialnim bolnikom, tako ljudem kot živalim, saj bi metoda nadomestila bolj invazivne posege kot so biopsije in izboljšala diagnostiko tumorjev in zlasti možganskih bolezni, saj mikrovesikli lahko prehajajo bariero med možgani in krvjo.

Pri odvzemu krvi pride do določenega tveganja, prisotni pa so tudi stranski učinki kot bolečina in strah ob vbodu, možnost infekcije in vrtoglavica. Tveganje za neželene učinke je manjše, če sledite navodilom osebja. Pred odvzemom se za nekaj minut umirite, po odvzemu pa morate dovolj dolgo pritiskati na mesto vboda, da ne pride do izliva krvi in posledično, do modrice. Zaradi odvzema dodatnih 2,7 mililitrov krvi (za raziskavo) ne bo prišlo do povečanega tveganja. Če se strinjate s sodelovanjem v raziskavi Vas vljudno prosim, da podpišete izjavo.

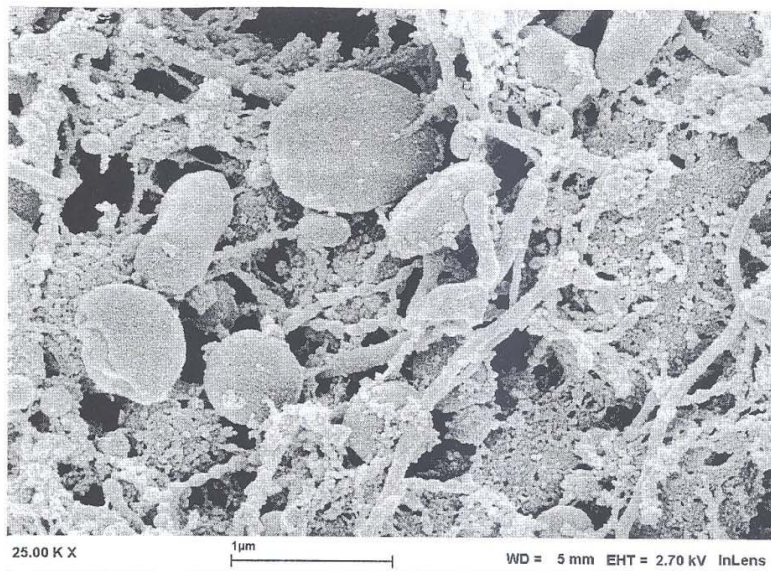
Naslov in telefonska številka zdravnika, pri katerem lahko oseba dobi nujno medicinsko pomoč je Urgenca Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Zaloška 7, tel. 01 5225276.

Za Vaš prispevek se Vam iskreno zahvaljujemo.
prof. dr. Veronika Kralj-Iglič v imenu sodelavcev Laboratorija za klinično biofiziko
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ljubljana, 5.11.2009

»se nadaljuje«

»nadaljevanje Priloge B«



Slika 1: Izolat, slikan z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Šuštar in sod., v pripravi). Večje strukture, ki na sliki merijo okrog 1 mikrometra, pripišemo trombocitom, manjše tubularne in globularne strukture dimenzij nekaj deset do nekaj sto nanometrov pa mikrovesiklom. Slike so bile izdelane na Abo Akademi University, Finska.

I Z J A V A

Podpisani

Izjavljam, da prostovoljno sodelujem v raziskavi izboljšanja protokola za izolacijo mikrovesiklov iz periferne krvi, tako, da ob odvzemu krvi za hematološke in biokemijske preiskave pri rednem zdravniškem pregledu, dovolim odvzem dodatnih 2,7 mililitrov krvi.

Seznanjen(a) sem z vsebino raziskave in s tveganjem ob sodelovanju.

Rezultati raziskave me zanimajo (obkrožite odgovor) **da** **ne**

Ljubljana,

Podpis: