

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო  
უნივერსიტეტი  
მედიცინის ფაკულტეტი  
კარდიოლოგიის დეპარტამენტი

ნათელა ჯახუტაშვილი

მონოციტ-ენდოთელური უჯრედული ურთიერთქმედების ინჰიბიცია  
ათეროსკლეროზის ადრეულ სტადიებში

დისერტაცია

წარმოდგენილი მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის  
მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი ბონდო ქობულია  
მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, კარლჰეინც პეტერი  
მედიცინის დოქტორი, ირინა ჯაში



უნივერსიტეტის  
ბაზოციფლოზა

თბილისი, 2014 წელი

## სარჩევი

	<b>სარჩევი</b>	<b>2</b>
	<b>გამოყენებული აბრევიატურა</b>	<b>6</b>
	<b>შესავალი</b>	<b>11</b>
<b>თავი I.</b>	<b>ლიტერატურის მიმოხილვა</b>	<b>18</b>
1.1.	ათეროსკლეროზი	18
1.1.1.	ეპიდემიოლოგია და პათოგენეზი	18
1.1.2.	ათეროგენეზის ჰიპოთეზები	18
1.1.3.	ათეროსკლეროზის რისკფაქტორები	20
1.2.	ათეროსკლეროზის განვითარების სტადიები	24
1.3	მოლეკულური მექანიზმები ათეროსკლეროზის განვითარებაში	26
1.3.1.	ენდოთელიუმის როლი ათეროსკლეროზის განვითარების ადრეულ სტადიაზე	26
1.3.2.	ენდოთელური დისფუნქცია	27
1.4.	ადჰეზიური მოლეკულები	28
1.4.1.	სელექტინები	29
1.4.2.	ინტეგრინები	30
1.4.3.	იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახი	31
1.4.4.	ინტერცელულარული ადჰეზიური მოლეკულა1-ICAM1	32
1.4.5.	ვასკულური ადჰეზიური მოლეკულა1 – VCAM1	33
1.5.	მონოციტები	36
1.6.	მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების საფუძვლები	37
1.7.	ციტოჩონჩხის შებოჭვის მნიშვნელობა	39
<b>თავი II.</b>	<b>მასალა და მეთოდები</b>	<b>41</b>
2.1	კონსტრუქტი CD7/VCAM-1	41
2.2	უჯრედულ კულტურებში ჩატარებული სამუშაოები	43
2.2.1.	HMEC-1 კულტურა	43
2.2.2.	უჯრედების კულტივირება	45

2.2.3.	უჯრედების გამოღობა და გაყინვა	47
2.2.4.	HMEC-1 უჯრედების სტიმულაცია	48
2.2.5.	HMEC-1 უჯრედების ტრანსფექცია	49
2.3.	გამდინარე ციტომეტრია (FACS)	50
2.3.1.	ზოგადი მიმოხილვა	50
2.3.2.	უჯრედების მომზადება რეცეპტორების ექსპრესიის შესაფასებლად FACS-ში	54
2.3.3.	FACS-ში ექსპრესიის შეფასება	55
2.4.	ადამიანის სისხლზე ჩატარებული გამოკვლევები	58
2.4.1.	სისხლის აღება	58
2.4.2.	სისხლიდან მონოციტების იზოლაცია	58
2.4.3.	უჯრედების დათვლა	61
2.5.	დინამიური აღჭვრიერი ცდები	63
2.5.1	გამდინარე კამერის მეთოდის (Flow Chamber) ზოგადი მიმოხილვა	63
2.5.2.	HMEC-1 უჯრედების მომზადება გამდინარე კამერაში გამოსაკვლევად	67
2.5.3.	მონოციტების სტიმულაცია, შეღებვა და მომზადება გამდინარე კამერაში გამოსაკვლევად	68
2.5.4.	კვლევის მიმდინარეობა	69
2.5.5.	საკვლევი ჯგუფები	70
2.6.	IN VIVO კვლევები	73
2.6.1	ApoE <sup>-/-</sup> თაგვების მომზადება	74
2.6.1.1.	ქოლესტერინით მდიდარი დიეტა	74
2.6.2.	ოპერაციული ჩარევა	76
2.6.2.1.	ApoE <sup>-/-</sup> დეფიციტური თაგვების საერთო საძილე არტერიის ტრანსფექცია	77
2.6.2.1.1.	აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენება	78
2.6.2.1.2.	ინექციის ტექნიკის გამოყენება	78
2.6.3.	სისხლძარღვის ამოღება და მისი მომზადება	80

	შემდგომი კვლევისათვის	
2.6.4.	სისხლძარღვების დამუშავება და გამოკვლევა აპლიკაციის ტექნიკით მათი ტრანსფექციის შემდეგ	80
2.7.	საძილე არტერიებზე ჩატარებული ჰისტომორფოლოგიური კვლევები	81
2.7.1.	პრეპარატების მომზადება	81
2.7.1.1.	პარაფინის ბლოკები	83
2.7.1.2.	პარაფინის ანათლების დამზადება	83
2.7.1.3.	კრიობლოკების წარმოება	84
2.7.1.4.	კრიობლოკების დაჭრა	84
2.7.2.	ჰისტოლოგიური ღებვა	85
2.7.2.1.	პარაფინის და კრიოანათლების H&E-ღებვა	86
2.7.2.2.	პარაფინისა და კრიო ანათლების PAS - ღებვა	90
2.7.2.3.	სუდან IV-ღებვა (Sudan-Herxheimer's Staining)	92
2.7.3.	მიკროსკოპია	93
2.8.	სტატისტიკური გამოკვლევა	94
<b>თავი III.</b>	<b>კვლევის შედეგები</b>	<b>95</b>
3.1.	HMEC-1 უჯრედული კულტურაზე მუშაობის შედეგები	95
3.2.	რეცეპტორექსპრესიის განსაზღვრა გამდინარე ციტომეტრიის გამოყენებით (FACS)	96
3.3.	დინამიური ადჰეზიური კვლევის შედეგები	97
3.3.1.	მონოციტების ადჰეზიის ბლოკადა ენდოთელურ უჯრედებზე დინების პირობებში	97
3.3.2.	მონოციტების ენდოთელიუმის ზედაპირზე მტკიცე ადჰეზიის შესწავლის შედეგები	100
3.3.3.	მონოციტების ენდოთელიუმის ზედაპირზე ბრუნვის/პირველადი ადჰეზიის შესწავლის შედეგები	104
3.3.4.	კორელაციური ანალიზის შედეგები	108
3.4.	IN VIVO სამუშაოების შედეგები	110
3.4.1.	ApoE-/- დეფიციტურ თაგვებში ათეროსკლეროზის	112

	მორფოლოგიური დახასიათება ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგად	
3.4.2.	პათოლოგიური ათეროსკლეროზული ცვლილებები წარმოდგენილი H&E და PAS ღებვის მეთოდებით	113
3.4.3.	სუდან IV ღებვის შედეგები	116
<b>თავი IV.</b>	<b>მიღებული შედეგების განხილვა</b>	<b>118</b>
	<b>დასკვნები</b>	<b>136</b>
	<b>მომავლის პერსპექტივები</b>	<b>137</b>
	<b>გამოყენებული ლიტერატურა</b>	<b>139</b>

## გამოყენებული აბრევიატურა

<b>AAV</b>	ადენო-ასოცირებული ვირუსი (Adeno-Associated Virus)
<b>ADP</b>	ადენოზინდიფოსფატი (Adenosindiphosphat)
<b>AP-1</b>	აქტივაციის პროტეინი (Activation Protein-1)
<b>BSA</b>	ძროხის შრატის ალბუმინი (Bovine Serum Albumine)
<b>°C</b>	ტემპერატურის საზომი, გრადუსი (Celcius)
<b>CHO</b>	იმორტალიზებული ეპითელური უჯრედული შტო, რომელიც მღრღნელების საკვერცხის კულტურისაგან იწარმოება (Chinese Hamster Ovary)
<b>CD</b>	უჯრედის ზედაპირული ანტიგენი (Cluster of Differentiation)
<b>cDNA</b>	დეზოქსირიბონუკლეინის მუავა (Complementary DNA)
<b>CMV</b>	ციტომეგალოვირუსი (Cytomegalo-Virus)
<b>CRP</b>	C რეაქტიული პროტეინი (C-reactive Protein)
<b>DMEM</b>	CHO-უჯრედების საკვები ხსნარი (Dulbecco's modified Eagle's medium)
<b>DMSO</b>	დიმეთილსულფოქსიდი (Dimethylsulfoxid)
<b>ECGM</b>	HUVEC უჯრედების საკვები ხსნარი (Endothelial Cell Growth Medium)
<b>ECGS</b>	HUVEC-საკვებ ხსნარზე დანამატი

	(Endothelial Cell Growth Supplement)
<b>EDTA</b>	ეთილენდიამინტეტრაკმარმუავა (Ethylenediaminetetraacetate)
<b>EGF</b>	ენდოთელური ზრდის ფაქტორი (Endothelial Growth Factor)
<b>ELAM-1</b>	ენდოთელური ლეიკოციტების ადჰეზიური მოლეკულა-1 (Adhesionmolecul-1)
<b>ELISA</b>	ენზიმ-ბმული იმუნოსორბენტული ანალიზი (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>ESL-1</b>	E სელექტინის ლიგანდი-1 (E-Selektin Ligand-1)
<b>FACS</b>	ფლუორესცენციის გზით აქტივირებული უჯრედების სკანი (Fluorescence Activated Cell Scan)
<b>Fc</b>	ანტისხეულის ეფექტური რეგიონი (Fc crystalline Fragment of antibody)
<b>FITC</b>	ფლუორესცენ-5-იზოთიოციანატი (Fluorescein-5-isothiocyanat)
<b>FKS</b>	ფეტალური ხბოს შრავი (Fetal Calf serum)
<b>FSC</b>	წინ მიმართული გაფანტული სინათლე FACS-ში (Forwardscatter)
<b>g</b>	აჩქარების მუდმივა (Acceleration of Gravity)
<b>GFP</b>	მწვანე მოფლუორესცენცირე პროტეინი (Green-fluorescence Protein)
<b>HMEC</b>	ადამიანის მიკროვასკულური ენდოთელური უჯრედები (Human Microvascular Endothelial Cells)
<b>HUVEC</b>	პირველადი ენდოთელური უჯრედები, რომლებიც მიიღება ადამიანის ჭიპლარის ვენისაგან (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)
<b>ICAM</b>	ინტერცელულარული ადჰეზიური მოლეკულა

	(Intercellular Adhesion Molecule)
<b>IFN</b>	ინტერფერონი (Interferon)
<b>Ig</b>	იმუნოგლობულინი (Immunoglobulin)
<b>Ig-Superfamilie</b>	იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახი (Immunoglobulin-Super family)
<b>IL</b>	ინტერლეიკინი (Interleukin)
<b>LAM-1</b>	ლეიკოციტარული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (Leukocyte Adhesion Molecule-1)
<b>LB</b>	ლურია-ბერტანის კულტურის მედიუმი (Luria-Bertani Zell Culture Medium)
<b>LDL</b>	დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინები (Low Density Lipoprotein)
<b>LFA-1</b>	ლეიკოციტების ფუნქციასთან ასოცირებული ანტიგენი-1, ინტეგრინის ოჯახის ზედაპირული რეცეპტორი (Leukocyte Function Associated Antigen-1)
<b>LPS</b>	ლიპოპოლისაქარიდი (Lipopolysaccharid)
<b>MCDB</b>	უჯრედული კულტურის მედიუმი (მოლეკულური, უჯრედული და განვითარებადი ბიოლოგია, კოლორადოს უნივერსიტეტის განყოფილება) (Molecular, Cellular and Developmental Biology (Department at the University of Colorado))
<b>MCP-1</b>	ქემოატრაქტიული მონოციტების პროტეინი-1 (Monocyte Chemoattractant protein-1)
<b>MCS</b>	ვექტორის კლონირების მხარე (Multiple Cloning Side)
<b>NCAM</b>	ნეიტრალური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა (Neural Cell Adhesion Molecule)



<b>MOPS 3</b>	მორფოლინო-1 პროპანსულფონმჟავა (Morpholino-1-Propansulfonacid)
<b>NF-<math>\beta</math></b>	ნუკლეარული ფაქტორი $\beta$ (Nuclear Factor $\beta$ )
<b>NK</b>	ბუნებრივი კილერ-უჯრედი (Natural Killer cell)
<b>NO</b>	აზოტის მონოქსიდი (Nitrate Monoxide)
<b>p</b>	აღბათობა (Probability)
<b>PBS</b>	ფოსფატ-ბუფერული მარილი, ბუფერული ხსნარი (pH=7,4) (Phosphate Buffered Saline)
<b>PCT</b>	პროკალციტონინი (Procalcitonine)
<b>PECAM</b>	თრომბოციტები / ენდოთელური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (Platelet / Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)
<b>Pen / Strep</b>	პენიცილინი / სტრეპტომიცინი (Penicillin / Streptomycin)
<b>PMA</b>	პორბოლ მარისტატის აცეტატი, პროტეინ C კინაზა, ლეიკოციტების სტიმულაციის აქტივატორი (Phorbol Myristate Acetate, Protein C Kinase)
<b>PMN</b>	პოლიმორფულ-ნუკლეარული უჯრედები (Polymorph-Nuclear Cell)
<b>PSGL-1</b>	P-სელექტინის გლიკოპროტეინ ლიგანდი-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1)
<b>RNA</b>	რიბონუკლეინის მჟავა (Ribonucleic acid)
<b>rpm</b>	ბრუნის წუთში (Rounds Per Minute)

<b>RT</b>	ოთახის ტემპერატურა (Room Temperature)
<b>SDS</b>	ნატრიუმდოდეცილსულფატი (Sodium Dodecyl Sulfate)
<b>SSC</b>	გვერდითი გაფანტული სინათლე FACS-ში (Sidewardscatter)
<b>sVCAM-1</b>	ხსნადი ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (Soluble VCAM-1)
<b>TNF</b>	ტუმორ-ნეკროზის ფაქტორი (Tumor-Necrosis-Factor)
<b>Tris</b>	Tris-ჰიდროქსიმეთილ-ამინომეთანი (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
<b>u</b>	ერთეული (Unit)
<b>V</b>	ვოლტი (Volt)
<b>VCAM-1</b>	ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1)
<b>VEGF</b>	ვასკულური ენდოთელური ზრდის ფაქტორი (Vascular Endothelial Growth Factor)
<b>VLA-4</b>	ძალიან გვიანი ანტიგენი-4, ინტეგრინების ოჯახის ზედაპირული ანტიგენი, ლიგანდი (Very Late Antigen-4)
<b>WT</b>	ველური ტიპი (Wild Type)
<b>vWF</b>	ფონ ვილენბრანდის ფაქტორი (von Willebrand-Factor)
<b>w / v</b>	წონის დამოკიდებულება მოცულობასთან (წონა/მოცულობა) (Weight / Volume)

## შესავალი

ათეროსკლეროზი კომპლექსური, ქრონიკული ანთებითი დაავადებაა, რომელიც აღმოცენდება ენდოთელიუმის დაზიანებაზე პასუხად (Ross, 1999). ათეროგენეზი დინამიური პროცესია. იგი იწყება ბავშვობაში, უსიმპტომოდ პროგრესირებს ხანგრძლივი პრეკლინიკური სტადიის განმავლობაში და ბოლოს კლინიკურად მანიფესტირებს. ათეროსკლეროზი იყო და არის განვითარებულ ქვეყნებში სიკვდილიანობისა და ავადობის ყველაზე გავრცელებული მიზეზი. ჯანმრთელობის დაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის 2014 წლის მსოფლიო ჯანმრთელობის სტატისტიკის ანგარიშის თანახმად ლეტალობის 20 ყველაზე გავრცელებულ მიზეზს შორის პირველ ადგილზე დასახელდა გულის იშემიური დაავადება, ხოლო მესამე ადგილზე ინსულტი. ყოველწლიურად კარდიოვასკულური დაავადებებით მსოფლიოში იღუპება 17 მილიონი ადამიანი. დაავადებების კონტროლისა და პრევენციის ცენტრის და ამერიკის კარდიოლოგთა ასოციაციის 2014 წლის გულის დაავადებებისა და ინსულტის სტატისტიკის განახლებული მონაცემების თანახმად ლეტალობის საერთო მაჩვენებლის 31% მოდის კარდიოვასკულური დაავადებებით გამოწვეულ ლეტალობაზე მამაკაცებში, ხოლო 26.8% კი ქალებში. ათეროსკლეროზი წარმოადგენს შრომის უნარის დაკარგვისა და ინვალიდობის ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ მიზეზს. ცნობილ რისკ ფაქტორებთან ერთად როგორებიცაა მამრობითი სქესი, ასაკი, სიმსუქნე, ჰიპერტენზია, მემკვიდრული წინასწარგანწყობა, თამბაქოს მოხმარება, უმოძრაობა, ლიპიდური ცვლის ანომალიები, შაქრიანი დიაბეტი, ფსიქოსოციალური და მეტაბოლური ფაქტორები, გამოვლინდა სხვა მრავალი ფაქტორი, რომელიც ენდოთელური დისფუნქციის განვითარების პროცესში მონაწილეობს. ათეროსკლეროზი მულტიფაქტორული, სისტემური, ქრონიკული დაავადებაა და ხასიათდება ინტიმაში პათოლოგიური ცვლილებებით. ენდოთელიუმის დისფუნქცია წინ უძღვის მორფოლოგიური ათეროსკლეროზული ცვლილებების განვითარებას და მონაწილეობს ათეროსკლეროზული დაზიანების ფორმირებასა და გვიანი კლინიკური გართულებების განვითარებაში. თანამედროვე სამეცნიერო წარმოდგენა ათეროსკლეროზის შესახებ ცხადყოფს ანთების ფუნდამენტურ როლს ამ დაავადების განვითარების ყველა ეტაპზე მისი ინიციალიზაციიდან პროგრესირებამდე და საბოლოოდ მისი მძიმე გართულებების ჩამოყალიბებამდე. ახალი სამეცნიერო მიდგომები წარმოაჩენენ მნიშვნელოვან კავშირს რისკ

ფაქტორებსა და ათეროგენეზის მექანიზმებს შორის. ფუნდამენტური მეცნიერება ანთების ბიოლოგიის შესახებ ათეროსკლეროზთან მიმართებაში მნიშვნელოვან როლს ანიჭებს ათეროსკლეროზულ პროცესში მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების მექანიზმებს.

დაუზიანებელი, ნორმალური ენდოთელიუმი არ ახდენს ლეიკოციტებთან ურთიერთქმედებას. თუმცა, ათეროგენეზის ადრეულ სტადიაშივე არტერიების ენდოთელური უჯრედები ახდენენ თავიანთ ზედაპირზე სელექტიური ადჰეზიური მოლეკულების ექსპრესიას, რომლებიც თავის მხრივ იზიდავენ ლეიკოციტების სხვადასხვა სახეობის უჯრედებს და ახდენენ მათ ადჰეზიას. სწორედ ვასკულური ადჰეზიური მოლეკულა 1 (VCAM1) უკავშირდება ლეიკოციტებს, კერძოდ კი მონოციტებს და T ლიმფოციტებს რომლებიც აღმოჩენილ იქნენ ათერომის ექსპერიმენტულ მოდელებში. ცხადია, ენდოთელურ უჯრედებზე VCAM1 ექსპრესიის მატება არ წარმოადგენს ათერომის განვითარების ერთადერთ მიზეზს, თუმცა თავგებს, რომლებიც ტრანსგენეტიკურად შეიცავენ დეფექტიან VCAM1 არ უვითარდებათ ათეროსკლეროზი (Cybulsky, 2001). საინტერესოა, რომ ადჰეზიური მოლეკულის VCAM1 მომატებული ექსპრესია ემთხვევა არტერიული ხის ათერომატოზული დაზიანების არეებს. ასევე საყურადღებოა, რომ ენდოგენური ათეროპროტექტორული მექანიზმები ნაკლებად აღმოცენდებიან არტერიების იმ არეებში, სადაც ენდოთელური უჯრედები განიცდიან პათოლოგიურ ზეგავლენას სისხლის ნაკადის დარღვეული ტურბულენტური დინების გამო (Topper, 1996). ცნობილია, რომ ამ ფაქტორს შეუძლია გამოიწვიოს ასევე ლეიკოციტების ადჰეზიური მოლეკულების ექსპრესიის მატება (Nagel, 1994). როდესაც არ არსებობს სისხლის დინების პროცესში ნორმალური ლამინარული წანაცვლების დაძაბულობა (shear stress), დაქვეითებულია ენდოთელიუმის მიერ NO გამომუშავებაც. ამ ენდოგენურ ვაზოდilatატორს აგრეთვე აქვს ანტი-ანთებითი თვისებები და ცნობილია ამასთანავე, რომ მას შეუძლია განაპირობოს VCAM1 ექსპრესიის შეფერხება (De Caterina R, 1995). შეცვლილი წანაცვლების დაძაბულობა და სიჩქარე ხელს უწყობს არტერიული გლუვი კუნთოვანი უჯრედების პროლიფერაციას, რომლებიც თავის მხრივ იზიდავენ ლიპოპროტეინის ნაწილაკებს, ხელს უწყობენ მათ ოქსიდაციურ გარდაქმნას და ამით აჩქარებენ დაზიანების კერებში ანთებითი პასუხის განვითარებას (Lee, 2001). მას შემდეგ რაც ლეიკოციტები ადჰერირდებიან ენდოთელიუმზე, იწყება მათი ინტიმაში პენეტრაცია. ამ პროცესში მონაწილეობს

ასევე მონოციტარული ქემატრაქტანტული პროტეინი-1, რომელიც პირდაპირ პასუხისმგებელია მონოციტების სუბენდოთელურ შრეებში ტრანსმიგრაციის პროცესზე (Gu, 1998; Boring, 1998). ადგილი აქვს მონოციტების სუბენდოთელურ აკუმულაციას, მათში ლიპოპროტეინების ჩართვას და მათ მაკროფაგებად გარდაქმნას. ისინი ჩაირთავენ ქოლესტერინს, რაც ხელს უწყობს ქაფიანი უჯრედების განვითარებას, რომლებიც ახდენენ ათეროსკლეროზული პროცესის პროგრესირებას, ლიპიდების კიდევ მეტად ჩართვას და ათეროსკლეროზული ფოლაქის ჩამოყალიბებას, საბოლოოდ კი ფოლაქის ნეკროზული ბირთვისა და ფიბროზული სახურავის ფორმირებას. ფოლაქის რუპტურა კი საფუძვლად უდევს ათეროთრომბოზულ გართულებებს, თავის ტვინის, გულისა და პერიფერიული არტერიების დაზიანების კლინიკურ გამოვლინებებს ინსულტის, ინფარქტის, თრომბოზების, ანევრიზმების, პერიფერიული ვასკულური დაავადებისა და სხვათა სახით.

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული მონოციტებსა და ენდოთელურ უჯრედებს შორის ურთიერთქმედება გადამწყვეტ როლს თამაშობს ათეროგენეზის პროცესში. ათეროგენეზის ფორმირების პროცესში ლეიკოციტების ენდოთელიუმზე ადჰეზია მრავალი კვლევის შედეგად დადასტურებულია (Parks, 2013; Gerrity, 1981, Pober, 1990, Bauer, 1992). ვასკულური ენდოთელი ამ პროცესში ჩართულია მის ზედაპირზე მრავალი სპეციალური ადჰეზიური მოლეკულის ექსპრესიის საშუალებით. გარკვეული ადჰეზიური მოლეკულები მრავალსაფეხურიანი პროცესის ფარგლებში არეგულირებენ ლეიკოციტების მიგრაციას ათეროსკლეროზის უბნებში. ერთერთი ასეთი ადჰეზიური მოლეკულაა სწორედ ვასკულური ადჰეზიური მოლეკულა 1 (VCAM1).

VCAM1 (CD106) არის იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახის წევრი. იგი არის 90kD ზომის უჯრედის ზედაპირული გლიკოპროტეინი, რომელიც ენდოთელურ, ეპითელურ, დენდრიტულ უჯრედებზე და მაკროფაგებზეა ექსპრესირებული (Yutaka Nakashima, 1998, Albelda, 1990, Endres, 1997, Konstantopoulos, 1997). ეს ტრანსმემბრანულად ლოკალიზებული გლიკოპროტეინი არის ერთი მხრივ უჯრედზე მიმაგრებული, ხოლო მეორე მხრივ იგი თვით იკავშირებს სპეციფიურ ექსტრაცელულარულ ლიგანდებს. VCAM1 თამაშობს ცენტრალურ როლს მონონუკლეარული უჯრედების როგორებიცაა მონოციტები და T-ლიმფოციტები ენდოთელურ უჯრედებზე ადჰეზიაში (Sakai, 1997; Walpola, 1995; Marui, 1993). იგი ურთიერთქმედებს VLA-4 (Very

Late Antigen-4) - თან, რომელიც მუდმივად ექსპრესირდება მონოციტებსა და ლიმფოციტებზე და განაპირობებს ამ უჯრედების ფიქსაციას ენდოთელიუმის ზედაპირზე. ცნობილია, რომ ენდოთელიური უჯრედები აქტივირდებიან ციტოკინების (TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) საშუალებით. აქტივირებულ ენდოთელიურ უჯრედებზე კი წარმოდგენილია VCAM1-ის მაღალი ექსპრესია. კვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ ენდოთელიური VCAM1-ის მაღალი ექსპრესია აღინიშნება ApoE-/- თაგვებსა და ბოცვრებში ადრეული ათეროსკლეროზული დაზიანების ადგილებში (Yutaka Nakashima, 1998; Albelda, 1990; Endres, 1997). VCAM1 თამაშობს განსაკუთრებულ როლს როგორც ლეიკოციტების პირველადი ადჰეზიის (ე.წ. „ბრუნვა“ Rolling), ასევე მათ მტკიცე ადჰეზიასა და ადჰეზიის ფინალურ ფაზაში - მონოციტების გავრცელებასა და ფიქსაციაში (ე.წ. Spreading und Tethering). ამ განსაკუთრებულობის გამო მრავალ ნაშრომში VCAM-1 განიხილება როგორც ათეროსკლეროზის პოტენციური მარკერი (Craig, 1998; Ronald, 2002; Parks; 2013). საინტერესო იყო ამ რეცეპტორის ექსპრესიის შესწავლა ენდოთელიურ უჯრედულ კულტურებში, რამდენადაც უჯრედული კულტურების გამოყენება ენდოთელიუმის დაზიანებით მიმდინარე დაავადებების კვლევაში აპრობირებული და ხელსაყრელია. სწორედ ასეთი უჯრედული კულტურები წარმოადგენენ ენდოთელიუმის in vitro მოდელს.

ვასკულური ენდოთელიური უჯრედები მდებარეობენ სისხლძარღვის კედელზე, მისი სანათურის მხარეს და ურთიერთქმედებენ სისხლსა და ქსოვილს შორის, ამით ისინი გადამწყვეტ როლს თამაშობენ მრავალ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პროცესში (Sakai, 1997). ადამიანის ენდოთელიური უჯრედების გამოყენებამ in vitro უჯრედული კულტურის სისტემებში შესაძლო გახადა ანთების, ანგიოგენეზის, ჭრილობის შეხორცების, ათეროსკლეროზის და სხვა ექსპერიმენტული მოდელის ჩატარება. ენდოთელიური უჯრედების იზოლაციისა და კულტივირების მეთოდები შემუშავებული იქნა ენდოთელიური უჯრედების სხვადასხვა ფორმებზე.

VCAM-1 უკავშირდება მონოციტებს, ლიმფოციტებს და ეოზინოფილურ გრანულოციტებს. განსაკუთრებული ინტერესის მქონეა ფაქტი, რომ VCAM-1 შეუძლია განაპირობოს როგორც მონოციტების ბრუნვისმაგვარი ადჰეზია ენდოთელიურ უჯრედებზე, ასევე მათი მტკიცე ადჰეზია, მათი სუბენდოთელიური მიგრაცია და აკუმულაცია. VCAM-1 თამაშობს დომინანტურ როლს ათეროსკლეროზის ინიცირების პროცესში. მრავალი კვლევით დადასტურებულია,

რომ ამ ადჰეზიური მოლეკულის ექსპრესია სხეებისაგან განსხვავებით წარმოდგენილია მხოლოდ დაზიანების კერებში და ადჰეზიური კასკადის VCAM-1 მიერ რეგულაციის მოდელი უნიკალურია (I.M.Cybulsky,2001; Hansson, G.K. et all. 1991). ზემოთაღნიშნულიდან გამომდინარე VCAM-1 უფუნქციო რეცეპტორად გარდაქმნით ენდოთელიუმში მონოციტების ქრონიკული ჩართვის პროცესის დათრგუნვა არაჩვეულებრივი შესაძლებლობა იქნებოდა ათეროგენეზის ინჰიბიციისათვის.

მიზანმიმართულ და გამართლებულ ცდას წარმოადგენს ენდოთელიუმზე მონოციტების ადჰეზიის ინჰიბიცია VCAM-1-ის ფუნქციური ბლოკადის საშუალებით რაც შესაძლოა მიღწეულ ყოფილიყო კონკურენტული ხსნადი პროტეინებით ენდოთელიუმის შესაბამისი ტრასფექციის შემთხვევაში. ამ მიზნით ქვრებიურგის საუნივერსიტეტო კლინიკის ბაზაზე შეიქმნა ხსნადი პროტეინი CD7/VCAM. იგი შედგება CD7 და β3 ერთეულებისაგან. შიდაუჯრედული დომენი წინარე ნაშრომებში წარმატებით კონკურირებდა ინაქტივირებულ VCAM1 რეცეპტორთან მისი ციტოჩონჩხთან მიმაგრების ადგილებისათვის სტატიურ ადჰეზიურ კვლევებში (ნაშრომი S.Marheineke, 2002). კლონირებული CD7 ნაწილი კი მოიცავდა ტრანსმემბრანულ და ექსტრაცელულარულ დომენებს და ასრულებდა ექსტრაცელულური მარკერის როლს. CD7 განსაკუთრებული უპირატესობა არის მცირე სპეციფიური ლიგანდების შეკავშირება. VCAM1-ის წარმატებული დათრგუნვით ხსნადი პროტეინის CD7/VCAM გამოყენებით შესაძლოა მიგველო უფუნქციო ნატიური რეცეპტორი, რაც თავის მხრივ აისახებოდა ერთდროულად CD7/VCAM და VCAM1 ექსპრესიის გზით კონკურენციაში შიდაუჯრედული VCAM1-ის დომენის ციტოჩონჩხთან შეკავშირების დონეზე. ეს კი შედეგად მოგვცემდა მონოციტების ენდოთელიუმთან ურთიერთქმედების რგოლის გამოვარდნას ათეროსკლეროზის განვითარების პროცესში. CD7/VCAM კონსტრუქტის მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების მაინჰიბირებელი ეფექტი შეიძლება სამომავლო გენთერაპიული მნიშვნელობის აღმოჩნდეს არა მხოლოდ ათეროსკლეროზისათვის არამედ აგრეთვე ვასკულური ქრონიკული ანთებითი პროცესების დათრგუნვისათვის. დაზიანების კერაში CD7/VCAM კონსტრუქტის პერკუტანული კორონარული ინტერვენციის გზით მიწოდება შესაძლოა ლოკალურ ანტიათეროსკლეროზულ მკურნალობად მოიაზრებოდეს.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა მიგველწია VCAM1 რეცეპტორის უფუნქციო რეცეპტორად გარდაქმნისათვის რეცეპტორკონკურენტული ხსნადი პროტეინის

CD7/VCAM-1 გამოყენებით. მარჰეინეკეს შრომაში წარმატებით იქნა ნაჩვენები სტატიურ ადჰეზიურ კვლევებში უფუნქციო VCAM1 რეცეპტორის ინაქტივაცია (S. Marheineke 2002). წინამდებარე შრომის მიზანი კი არის მონოციტებისა და ენდოთელიუმის უერთიერთქმედების CD7/VCAM კონსტრუქტის საშუალებით ინჰიბიციის შესწავლა დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში.

აღნიშნული უერთიერთქმედება შესწავლილ იქნა HMEC1 ენდოთელურ უჯრედებზე (შესაბამისი ტრანსფექციითა და სტიმულაციით) გამდინარე კამერის სისტემაში მონოციტების ნაკადის წინასწარგანსაზღვრული დინების სიჩქარის პირობებში. მოცემული შრომის ფარგლებში ჩატარდა ასევე *in vivo* კვლევები ApoE-/- დეფიციტურ თაგვებზე, რომელთაც სპონტანურად და განსაკუთრებით ქოლესტერინით მდიდარი დიეტის ფონზე უვითარდებათ ათეროსკლეროზი. ApoE-/- დეფიციტური თაგვების საშუალებით შესაძლოა ათეროგენეზის შესწავლა დაავადების სხვადასხვა სტადიაზე. CD7/VCAM1 ხსნადი პროტეინის ათეროსკლეროზის ცოცხალ მოდელში შესასწავლად რამოდენიმე მეთოდი გამოიცადა.

უჯრედების ადჰეზიის ბლოკადის საწყისი ნაბიჯები იყო ხსნადი პროტეინის შექმნა, ამ პროტეინით ტრანსგენური უჯრედების ტრანსფექცია, CD7/VCAM და ადჰეზიური მოლეკულების ტრანსგენური ექსპრესიის განსაზღვრა, სტატიური ადჰეზიური ცდები, ტრანსმიგრაციული ცდები, მუშაობა ტრანსგენურ ენდოთელურ უჯრედებზე (HUVECs), ციტოჩონჩხის ბლოკირების შესწავლა (ნაშრომი S.Marheineke, 2002). ტრანსგენურ უჯრედთა კულტურებზე ჩატარებული ამ ცდების შედეგები დაედო საფუძვლად CD7/VCAM1 კვლევების გაგრძელებას ადამიანის ენდოთელური უჯრედების მოდელზე და *in vivo* ათეროსკლეროზის მოდელზე.



## კვლევის ამოცანები:

### **In Vitro:**

- დინამიურ ადჰეზიურ კვლევის მოდელში VCAM1 რეცეპტორის ფუნქციისა და სპეციფიურობის შესწავლა;
- VCAM1 რეცეპტორის ექსპრესიის შესწავლა გამდინარე ციტომეტრიის საშუალებით ენდოთელური უჯრედული კულტურის ციტოკინებით სტიმულაციისა და CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციის შედეგად;
- მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების შესწავლა დინამიურ ადჰეზიურ კვლევის მოდელში ენდოთელური უჯრედული კულტურის ციტოკინებით სტიმულაციისას;
- CD7/VCAM1 კონსტრუქტის შესწავლა დინამიურ ადჰეზიურ კვლევის მოდელში ენდოთელური უჯრედული კულტურის ციტოკინებით სტიმულაციისა და შესაბამისი CD7/VCAM1 ტრანსფექციის ფონზე;

### **In Vivo:**

- CD7/VCAM1 კონსტრუქტის შესწავლა ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტურ თაგვებში აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით;
- CD7/VCAM1 კონსტრუქტის შესწავლა ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტურ თაგვებში ინექციის ტექნიკის გამოყენებით;

## ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1. ათეროსკლეროზი

#### 1.1.1. ეპიდემიოლოგია და პათოგენეზი

ათეროსკლეროზი წარმოადგენს არტერიების დაავადებას. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის თანახმად "ათეროსკლეროზი არის არტერიების ინტიმის ცვლილებების ვარიანტული კომბინაცია, რომელიც შედგება ლიპიდების, კომპლექსური ნახშირწყლების, სისხლისა და სისხლის პროდუქტებისაგან, ფიბროზული ქსოვილისა და კალციუმის დეპოზიტებისაგან და ასოცირებულია არტერიებში მედიალურ ცვლილებებთან".

ათეროსკლეროზი სისტემური დაავადებაა, რომელიც ხასიათდება სისხლძარღვებში პათოლოგიური ცვლილებებით, როგორც ინტიმის მეზენქიმური უჯრედების ასევე სისხლძარღვის შუა შრის (Intima Media) ღრმა შრეების დონეზე. მუხუდოს მარცვლის მაგვარი პათოლოგიური წარმონაქმნები განთავსებული სისხლძარღვის კედელში კი ე.წ. „ათეროსკლეროზული ფოლაქები“.

არტერიული სისტემის ეს დაავადება ვითარდება ნელა და ხშირად დიდხანს უსიმპტომოდ მიმდინარეობს. ის მანიფესტირებს იშემიის, სტენოკარდიის, მიოკარდიუმის ინფარქტის, ინსულტის, თრომბოზების, უეცარი სიკვდილის სახით. ათეროსკლეროზი და მისი გართულებები დასავლურ ცივილიზაციაში ლეტალობის ყველაზე ხშირი მიზეზია. შესაბამისად ათეროსკლეროზი წარმოადგენს უდიდეს ეპიდემიოლოგიურ და მსოფლიო ჯანმრთელობის დაცვის პოლიტიკის პრობლემას. მრავალი ათეული წელია ათეროსკლეროზი არის სამედიცინო და ბიოქიმიური კვლევის ცენტრში მთელ მსოფლიოში. ეს პროგრესირებადი დაავადება ბავშვობაში იწყება და მისი კლინიკური მანიფესტაცია საშუალოდან ხანდაზმულ ასაკში ხდება.

#### 1.1.2 ათეროგენეზის ჰიპოთეზები

ათეროსკლეროზის პათოგენეზის თეორიები ეფუძნება ჯერ კიდევ ვირხოვის (Virchow Frankfurt-am-Main, Meidinger Sohn and Co.,1856), როკიტანსკის (Con Rokitansky, C.: London, The Sydenham Society, 1852) და დუგუიდის (Duguid,

J.B.Pathol.Bacteriol.58:207,1946) ადრეულ შრომებს. ცნობილია პათოლოგ-ანატომმა როკიტანსკიმ (1804 - 1878) (იენის 1990) წარმოადგინა ე.წ. "ინკრუსტაციის" თეორია, რომელიც საბოლოოდ დუგუიძმა გადაამუშავა. ამ თეორიის თანახმად არტერიების კედლების დაზიანების უბნებთან არსებობენ მცირე ზომის კედლისმიერი თრომბები, რომლებიც თანდათან გლუვი კუნთოვანი ქსოვილის განვითარებასთან ერთად ორგანიზდებიან. ამას თან ერთვის ლიპიდების აკუმულაცია. ცნობილ ექიმს, პათოლოგ-ანატომს, ბიოლოგს, ანთროპოლოგს რუდოლფ ვირხოვს (1821 - 1902) ჰქონდა ათეროსკლეროზის განვითარების სრულიად განსხვავებული ჰიპოთეზა, რომლის თანახმადაც ათეროსკლეროზი წარმოადგენს არტერიების ანთეზას. ანთებითი ცვლილებები კი არტერიების კედლების შუა და შიდა შრეებში სისხლიდან ლიპიდების ჩალაგების შედეგი უნდა ყოფილიყო. (ვირხოვ 1856, Ackcknecht 1977).

1973 წელს ეს ორი თეორია გაერთიანდა ახალი ცოდნის საფუძველზე. კერძოდ კი ათეროსკლეროზის აღმოცენების პროცესში საჭიროდ მიიჩნიეს უჯრედული და მოლეკულურ-ბიოლოგიური მექანიზმების როლის გათვალისწინება. ეს ჰიპოთეზა ცნობილია „დაზიანებაზე-პასუხი“-ს სახელწოდებით „response-to-injury-hypothesis of atherosclerosis“. (Ross and Glomset 1973, Ross and Harker 1976, Ross 1990).

მონოკლონური ჰიპოთეზა, რომელიც ასევე 1973 წელს იქნა ფორმულირებული ვარაუდობს, რომ ათეროსკლეროზული დაზიანებები შესაძლოა ნეოპლაზიური ფორმის ერთ-ერთ გამოვლინებას წარმოადგენდეს (Benditt 1973).

### **„დაზიანებაზე-პასუხი“-ს ჰიპოთეზა – ე.წ. „response-to-injury-hypothesis“**

„დაზიანებაზე-პასუხი“-ს ჰიპოთეზის თანახმად არტერიების კედლის გარკვეულ ანატომიურ მონაკვეთებზე ადგილი აქვს ენდოთელური უჯრედების დაზიანებას. თვით დაზიანება არის ამ ჰიპოთეზის ამოსავალი წერტილი. ცნობილია ამერიკელმა მეცნიერმა ათეროსკლეროზის მკვლევარმა რუსელ როსმა 1976 წელს გამოთქვა მოსაზრება, რომ თვით სისხლთან მომიჯნავე სისხლძარღვის კედლის შრის დაზიანება წარმოადგენს მაინცირებელ ფაქტორს კომპლექსური, ათეროსკლეროზული მოვლენის განვითარებაში. ინტიმა შედგება ენდოთელური უჯრედების ერთრიგად განლაგებული შრისაგან და სუბენდოთელური შემაერთებული ქსოვილისაგან. ენდოთელური შრის დაზიანების მრავალი მიზეზი არსებობს: ტრავმის გზით მისი მორფოლოგიური დაზიანება, მექანიკური

დაზიანება, ბიოქიმიური დაზიანება ბაქტერიული ტოქსინების საშუალებით, ვირუსებით გამოწვეული დაზიანება ან ანტიგენ-ანტისხეულის რეაქციით ინტიმის დაზიანება. ეს ფაქტორები განაპირობებენ კომპლექსურ ურთიერთქმედებებს ენდოთელიუმს, მიოციტებს, ლიმფოციტებს, მონოციტებს, თრომბოციტებს, მაკროფაგებსა და ზრდის ფაქტორებს შორის (Ross 1981; Ross 1990; Ross 1993; Liao 1998). აქედან გამომდინარე ათეროსკლეროზის განვითარებაში მნიშვნელოვანია ლეიკოციტების ტრანსმიგრაცია და აკუმულაცია სუბენდოთელურ შრეებში, გლუვი კუნთოვანი უჯრედების პროლიფერაცია და მათი მიგრაცია ინტიმასა და ინტიმა მედიაში, რაც თავის მხრივ გამოწვეულია ზრდის ფაქტორებით, როგორებიცაა მაგ. ციტოკინები და ე.წ. „ქაფიანი უჯრედების“ წარმოქმნა სისხლძარღვის კედლის ამ შრეებში, განპირობებული მათში ლიპიდების ჩალაგებით. ეს მოვლენები დროთა განმავლობაში იწვევენ სისხლძარღვის კედელში მუხუდოს მარცვლისმაგვარი ცვლილებების ფორმირებას, რომელნიც „ფოლაქებად“ იწოდებიან და რომლებიც მიკროსკოპიულად ათეროსკლეროზს წარმოადგენენ. (Ross 1993).

### 1.13 ათეროსკლეროზის რისკ-ფაქტორები

ამ კომპლექსური, ქრონიკულ-ანთებითი პროცესის განვითარებაში მრავალი ფაქტორი მონაწილეობს.

#### არამოდლიფიცირებადი ფაქტორები

##### ასაკი

შეუცვლელი რისკფაქტორი არის ადამიანის ხანდაზმული ასაკი. მრავალმა კვლევამ დაადასტურა, რომ ჯერ კიდევ სიცოცხლის ადრეულ ასაკში შესაძლოა არსებობდეს ორგანიზმში ათეროსკლეროზული ცვლილებები. 10 დან 14 წლამდე ასაკის ბავშვთა აუტოფსიის შედეგად დაახლოებით ნახევარში შეიძლება ლიპიდებით მდიდარი მაკროფაგების ე.წ. „fatty streaks“ არსებობის დადასტურება (Ross 1993). გასქელებული ინტიმის არეების დადგენა ადამიანში შესაძლოა დაბადებისთანავე (Stary et al.1995). თუმცა ბავშვებში ათეროსკლეროზი შემოიფარგლება მხოლოდ საწყისი სტადიებით. მხოლოდ სიცოცხლის მესამე ათწლეულში ვითარდება ათეროსკლეროზული ცვლილებების კლინიკური მანიფესტაცია (Stary et al.1995).

ასაკთან ერთად იმატებს ათეროსკლეროზული დაზიანებების სიმძიმე და სისშირე, ისევე როგორც მისი გართულებების გამოვლინებები.

## **სქესი**

მამრობითი სქესისათვის მრავალ კვლევაში დადასტურდა ათეროსკლეროზის განვითარების მნიშვნელოვნად მომატებული რისკი. ამასთან მიმართებაში მდედრობითი სასქესო ჰორმონები მნიშვნელოვან ანტიათეროსკლეროზულ როლს თამაშობენ (Ceska et al. 2006). ცნობილია, რომ ესტროგენთერაპიას თან ახლავს სისხლში LDL ქოლესტერინის დონის დაქვეითება და HDL ქოლესტერინის დონის მატება როგორც მამაკაცებში ასევე ქალებში (Kuller 2003). თუმცა პროგნოზი ქალბატონებში დაავადების შემთხვევაში გაცილებით ცუდია, ვიდრე მამაკაცებში (Duarte et al. 2002 ; Vittinghof et al.2002; Sparks and Frazier et al. 2002 ).

## **ოჯახური წინასწარგანწყობა / გენეტიკური დაავადებები**

გენეტიკური ასპექტები თამაშობენ მნიშვნელოვან როლს ათეროსკლეროზის პათოგენეზში. მრავალჯერ იქნა დადასტურებული, რომ დადებითი ოჯახური ანამნეზი დამოუკიდებელი რისკ ფაქტორია. მზგავსი დადგენილია ასევე სხვა რისკ-ფაქტორებთან მიმართებაში როგორებიცაა დიაბეტი, ჰიპერტონია და ჰიპერლიპიდემია (Descamps et al.2003; Higgins 2000; Li et al.2000; Herman and Paul 2001).

## **მოდიფიცირებადი ფაქტორები**

### **მწვეველობა**

თამბაქოს მოხმარების საშუალებით ორგანიზმში ხვდება უამრავი მაგნე ნივთიერება როგორებიცაა მხუთავი აირი, ალდეჰიდები, კადმიუმი, ათასობით სხვადასხვა მაგნე ქიმიური აგენტი - ნიტროამინები, ბენზოპინენები, ციანწყალბადი, ბილიონობით თავისუფალი რადიკალი, რომლებიც ესენციურ ანტიოქსიდანტებს გახარჯავენ. თავისუფალი რადიკალები აზიანებენ ორგანიზმის ცილებს, ლიპიდებს და დნმ-ს. უჯერი ცხიმოვანი მჟავები განიცდიან ოქსიდაციას და ფიქსირდებიან არტერიის კედლებზე (Karl et al.2004). მწვეველებში ათეროსკლეროზული გართულებების სისშირე ბევრად დიდია (Zeiber et al.1993).

## **სიმსუქნე**

არამხოლოდ ზედმეტი წონა არის ათეროსკლეროზის რისკ-ფაქტორი, არამედ ცხიმის განაწილებაც, განსაკუთრებით პაციენტებში მაღალი ე.წ. „waist-to-hip-ratio“ (თანაფარდობა წელისა და ბარდაყის ზომებს შორის) (Dietze et al. 2000; Hu and Willett 2002; Abbassi et al. 2002).

## **უმოძრაობა**

ფიზიკურ აქტივობას აქვს დადებითი ზემოქმედება ყოველ ორგანოთა სისტემაზე. ამ გზით მიიღწევა წონის რედუქცია, ინსულინრეზისტენტობის დაქვეითება, HDL-ქოლესტერინის მატება და LDL-ქოლესტერინის დაქვეითება, იმუნური სისტემის გაძლიერება, არტერიული წნევის დაქვეითება, C-რეაქტიული პროტეინის და ფიბრინოგენის დაქვეითება და კიდევ მრავალი სხვა.

## **სტრესი**

მოდულირებად ფაქტორებში განიხილება ასევე ემოციური სტრესი. ადამიანის ემოციურ დატვირთვას დიდი მნიშვნელობა აქვს ათეროსკლეროზის განვითარებაში. ცნობილია, რომ არსებობს ასოციაცია დეპრესიულ სიმპტომებს, ემოციურ სტრესსა და ათეროსკლეროზის სუბკლინიკურ ფორმებს შორის (R.Hernandez, 2014).

## **ფაქტორები, რომელთაც შესაძლოა ვუმკურნალოთ**

### **შაქრიანი დიაბეტი**

დიაბეტური მაკროანგიოპათია ანუ დიდი სისხლძარღვების კედლების გაზრდილი გამავლობა ხელს უწყობს ათეროსკლეროზის განვითარებას. შაქრიანი დიაბეტის მქონე პაციენტებში აღინიშნება სისხლძარღვების გამოსატული ცვლილებები და ათეროსკლეროზული გამოვლინებების მაღალი სიხშირე. მრავალი ფაქტორია, რომელიც ამაში მონაწილეობს. ნივთიერებათა ცვლის დარღვევა, რომელიც ასოცირებულია დიაბეტთან განაპირობებს დისლიპიდემიას და ექსტრაცელულური მატრიქსის გლუკო-ოქსიდაციას. ამ დაავადების ფონზე კლასიკური ათეროსკლეროზული რისკ ფაქტორების სიხშირე როგორებიცაა ჰიპერტონია, სიმსუქნე, დისლიპიდემია მატულობს (Arschag&Mooradian et al.2003).

## **არტერიული ჰიპერტენზია**

ეპიდემიოლოგიური კვლევებით დემონსტრირებულ იქნა, რომ ჰიპერტენზია წარმოადგენს ათეროსკლეროზის ერთ-ერთ რისკ ფაქტორს, თუმცა ძირითადი მექანიზმები, რომლებიც აკავშირებს ამ ორ დაავადებას კომპლექსური და ჯერ კიდევ საკამათოა (M.Kobayashi,1995). პოტენციური ვაზოკონსტრიქტორის ანგიოტენზინ II-ის კონცენტრაცია, ჰიპერტენზიის მქონე პაციენტებში მომატებულია. ანგიოტენზინ II გლუვი კუნთების სპეციალურ რეცეპტორებს უკავშირდება, იწვევს ფოსფოლიპაზა C-ს აქტივაციას, ინტრაცელულარული კალციუმის დონის მატებას, გლუვი კუნთოვანი უჯრედების პროლიფერაციას. ფაქტორები, რომლებიც ზემოქმედებენ ორივეზე არტერიულ წნევასა და გლუვი კუნთოვანი უჯრედების პროლიფერაციაზე შესაძლოა თამაშობდნენ ცენტრალურ როლს ათეროსკლეროზსა და ჰიპერტენზიას შორის ურთიერთკავშირის პროცესში (M.Kobayashi,1995,R.Weyne,1995). ჰიპერტენზიას აქვს ასევე პროინფლამატორული ზეგავლენა სისხლძარღვებზე. არსებობს ჰიპოთეზა, რომ ანთება შესაძლოა იყოს ხიდი ჰიპერტენზიასა და ათეროსკლეროზს შორის (J.J.Li, 2004, Franklin et al.1999).

## **ჰიპერლიპიდემია**

ჰიპერლიპიდემია თამაშობს ცენტრალურ როლს ათეროსკლეროზის განვითარებაში. არსებობს კორელაცია სისხლში ქოლესტერინის, ტრიგლიცერიდების დონესა და გულის კორონარული დაავადების განვითარებას შორის (Li et al.2002; Gotto 2002). ლიპოპროტეინები განირჩევიან თავიანთი სიმკვრივის მიხედვით. LDL (Low-Density-Lipoprotein) იგივე დაბალი სიმკვრივის მქონე ლიპოპროტეინის მომატებული დონე წარმოადგენს ათეროსკლეროზის განვითარების და პროგრესირების გაზრდილ რისკს. გულ-სისხლძარღვთა სისტემაზე პროტექტორული ეფექტი გააჩნია HDL (High-Density-Lipoproteine) მაღალი სიმკვრივის მქონე ლიპოპროტეინს (Gotto2002; Ross1976; Franklin et al.1999;Rösen 2002).

## **სხვა რისკ-ფაქტორები**

არსებობს უამრავი დაავადება როგორებიცაა ჰიპოთირეოზი, ოსტეოპოროზი, დეპრესია, მეტაბოლური სინდრომი, პაროდონტიტი და სხვა, რომლებიც ასევე განიხილებიან ათეროსკლეროზის რისკ ფაქტორებად.

## ინფექცია

ბაქტერია *Chlamidia pneumoniae* შესაძლოა წარმოადგენდეს დამოუკიდებელ რისკ ფაქტორს ათეროსკლეროზისათვის. ეს საკითხი ჯერ კვლევის პროცესშია. სხვა გამომწვევები როგორებიც არიან *Helicobacter pylori* და ჰერპეს ვირუსი ასევე ეჭვქვეშ არიან (Auer, J. Berent, T. 2004). ქრონიკული რესპირატორული, უროგენიტალური ინფექციები მრავალი ავტორის მიერ განიხილება როგორც ათეროსკლეროზის შესაძლო რისკ ფაქტორები (Auer, J. Berent, T. 2004).

## 1.2. ათეროსკლეროზის განვითარების სტადიები

ათეროსკლეროზი მუდმივად მოპროგრესირე დაავადებაა. ჰისტოლოგიური ანათოლები როგორც წესი წარმოაჩენენ ათეროსკლეროზული ფოლაქის განვითარების სხვადასხვა სტადიებს. ჰისტოლოგიურ სურათზე პათოლოგიური ცვლილებები შესაძლოა იდენტიფიცირებულ იქნას ათეროსკლეროზული ფოლაქების განვითარების სტადიებთან. ქვემოთ წარმოდგენილი ცხრილი ასახავს ფოლაქების შემადგენლობას მათი განვითარების სხვადასხვა სტადიებზე ადამიანებში.

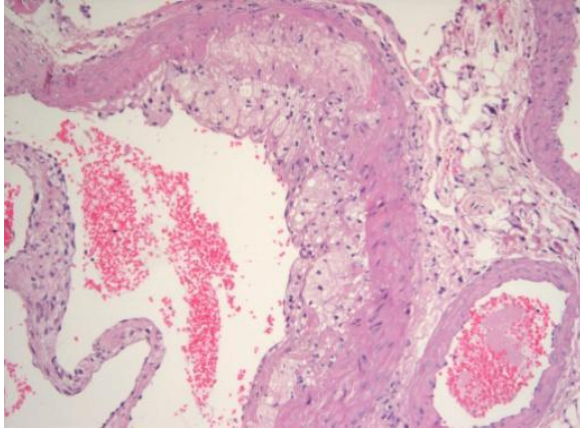
ტიპი	მორფოლოგიური კრიტერიუმები	
I	გაბნეულად მდებარე ლიპოპროტეინით-დატვირთული მაკროფაგები (=ქაფიანი უჯრედები)	
II	ქაფიანი უჯრედების დეპოზიტები და ლიპიდებით დატვირთული გლუვი კუნთოვანი უჯრედები ქმნიან ცხიმოვან ფენას	
III	შუალედური სტადია: პრეათერომა ჩაშენებული ლიპიდური დეპოზიტებით	
IV	ათერომა: ლიპიდური დეპოზიტები იზრდებიან, ერთდებიან, ჩნდება რუპტურის საშიშროება	
V	ფიბროათერომა: ლიპიდების შრესთან ერთად ყალიბდება შემაერთებელქსოვილოვანი შრე	
	Vb	ძლიერი კალციფიკაცია
	Vc	ძირითადად შემაერთებელქსოვილოვანი სტრუქტურა
VI	რთული დაზიანება: დამატებით ფიბროზულ ფოლაქში ნაპრალები, ჰემორაგია ან თრომბები	

ცხრილი 1: ათეროსკლეროზული ფოლაქის განვითარების სტადიები ადამიანში

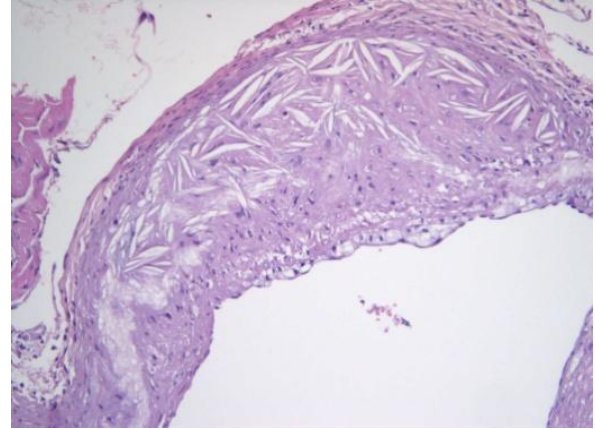


სტარის თანახმად (Stary, 2000).

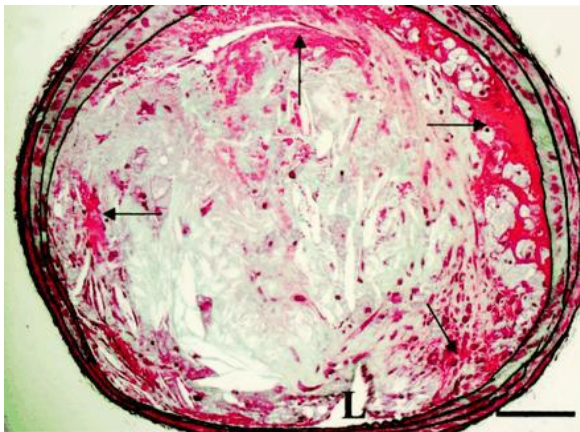
ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტურ თაგვებში ათეროსკლეროზული ფოლაქების განვითარების სტადიების ვიზუალიზირებული კლასიფიკაცია როზენფელდის მიხედვით:



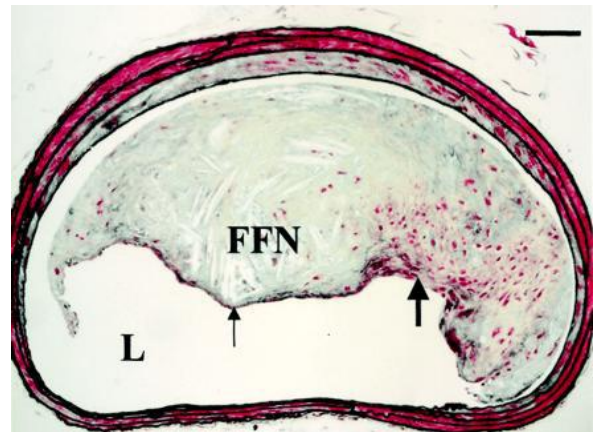
I



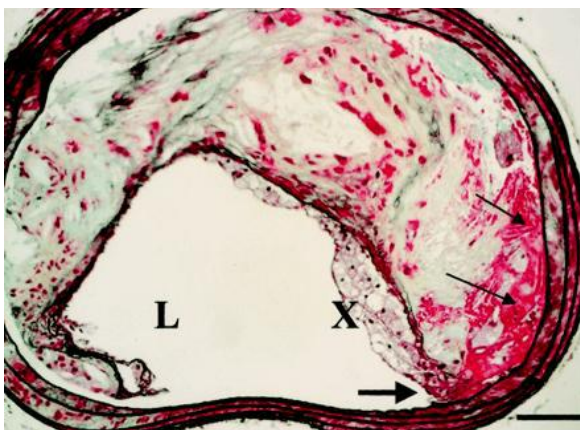
II



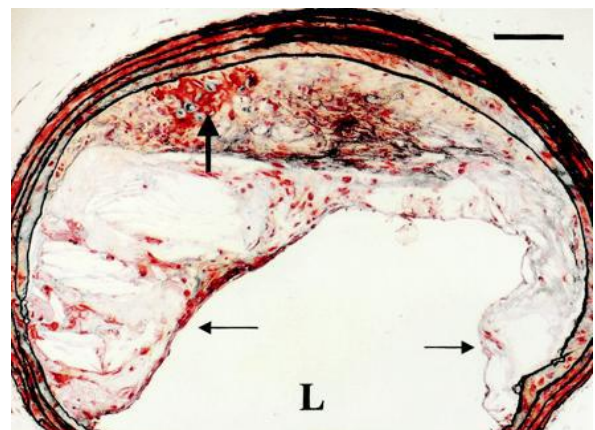
IIIa



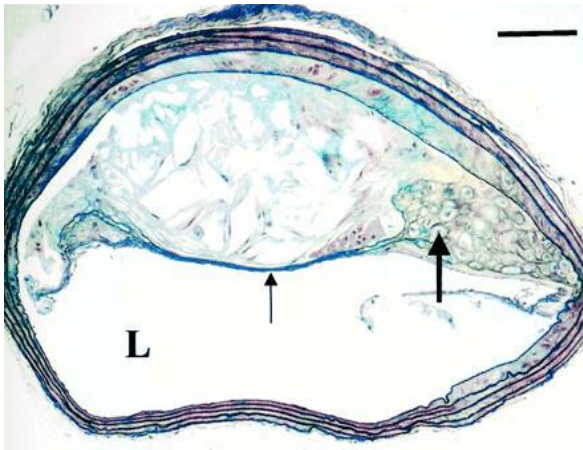
IIIb



IIIc



IIIe,f



### IIIe,g

#### სურათი 1

**L** = სანათური (Lumen), **FFN** = ფიბროციტოვანი ბირთვი (Fibrofatty nodule) = პროგრესირებულ დაზიანებას ქოლესტერინის კრისტალებით, **X** = ქსანთომა (Xanthoma).

I: ფოლაქი ქაფიანი უჯრედებით;

II: ფოლაქი ქოლესტერინის კრისტალებით;

IIIa: ფიბრო-ციტოვანი ბირთვი სანათურის გაქრობით, ჰემორაგია;

IIIb: ფიბრო-ციტოვანი ბირთვი ფიბროზული სახურავის გაქრობით;

IIIc: ფიბრო-ციტოვანი ბირთვი ჰემორაგიით, ფოლაქის რუპტურა;

IIIe,f: ფიბრო-ციტოვანი ბირთვი ფენების წარმოქმნით და ქონდროციტისმაგვარი უჯრედები;

IIIg: ფიბრო-ციტოვანი ბირთვი ნეკროზით და ფოლაქის თავსახურის ნეკროზული რღვევით.

## 1.3 მოლეკულური მექანიზმები ათეროსკლეროზის განვითარებაში

### 1.3.1 ენდოთელიუმის როლი ათეროსკლეროზის განვითარების ადრეულ სტადიაზე

ენდოთელიუმი წარმოადგენს ინტიმის სისხლძარღვის სანათურისაკენ მიმართულ ენდოთელური უჯრედების შრეს. გულ-სისხლძარღვთა სისტემის ყველა სისხლძარღვი წარმოადგენილია ენდოთელური უჯრედების ერთშიანი განლაგებით. ენდოთელიუმი მიუხედავად თავისი მიკროსკოპული მოცულობისა (სშორად ის 1 მკმ-ზე ნაკლებია) არის აქტიური, დინამიური ქსოვილი, რომელიც მრავალ

მნიშვნელოვან ფუნქციას ასრულებს. ის არის მულტიფუნქციური ორგანო, რომლის დისფუნქცია არის ათეროსკლეროზის განვითარების კრიტიკული ფაქტორი. სისხლძარღვის ეს შიდა შრე არის სისხლის კონტეინერი და წარმოადგენს სელექციურ, პერმეაბილურ ბარიერს. ენდოთელის სპეციალიზირებული სტრუქტურების საშუალებით, როგორებიცაა ზედაპირული გლიკოკოლიქსი, უჯრედულ-უჯრედული კავშირები, მიკროვეზიკულები, ტრანსცელულარული არხები, სუბენდოთელური მატრიქსი რეგულირდება ინტრავასკულური სივრციდან მაკრომოლეკულების ტრანსპორტი. ენდოთელს აქვს უნარი შეიცნოს სიგნალები სისხლის ნაკადიდან, მოახდინოს მათი ინტეგრირება და სპეციფიურ სიგნალებად გარდაქმნა. იგი წარმოადგენს არა მხოლოდ სენსორს და მიმღებს, არამედ აგრეთვე სიგნალების გადამცემია ისეთი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერების წარმოქმნის გამო როგორებიცაა ლიპიდმედიატორები, ციტოკინები, ზრდის ფაქტორები, ვაზოტონუსის მარეგულირებელი სუბსტანციები, პროსტაციკლინი, აზოტის მონოქსიდი, ენდოთელინ-1, ანგიოტენზინ II და მრავალი სხვა. ვასკულური ენდოთელის მნიშვნელოვან ფუნქციებს შორის არის: უჯრედული სიგნალების ამოცნობა და გარდაქმნა, ჰომეოსტაზისა და თრომბოზების დინამიური რეგულაცია, სისხლძარღვოვანი ტონუსის რეგულირება, სისხლძარღვის ზრდისა და რემოდელირების პროცესის რეგულაცია, ანთებით და იმუნოლოგიურ რეაქციებში მონაწილეობა. ენდოთელი არის სისხლის შემცველი რეზერვუარი, სელექტიური გამავლობის ბარიერი, ბიოლოგიური რეაქციების მედიატორების წყარო და სამიზნე (Gimbrone A, Topper JN.1999; Baumgartner-Parzer SM, Waldhaus WK2001; Rösen P, 2002; ).

### 1.3.2 ენდოთელური დისფუნქცია

ათეროსკლეროზის განვითარებას ადრეულ სტადიაზე თან ახლავს ენდოთელური დისფუნქცია. იგი ხასიათდება შეცვლილი ვაზოაქტივობით ენდოთელიუმზე დამოკიდებული რელაქსაციის შეზღუდვით, პლაზმის პროტეინებისათვის სისხლძარღვის კედლის გაზრდილი გამავლობით და ლეიკოციტების სელექტიური ჰიპერადჰეზიურობით, თრომბოზული გართულებებით და ჰომეოსტაზისა და ფიბრინოლიზის შორის ბალანსის დარღვევით (Simonevscu N, Simonevscu M.1992; Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P.1990; Tak PP, Firestin GS. 2001; Casas J.P., Bautista L.E, 2004).

პროინფლამატორული სტიმული როგორიც შეიძლება იყოს ზემოთ ნახსენები რისკ

ფაქტორები ზემოქმედებენ ენდოთელზე და ენდოთელის გამავლობა ლიპოპროტეინებისათვის და სისხლში მოცირკულირე სხვა ნივთიერებებისათვის მატულობს. ამავდროულად ადგილი აქვს პირველადი პროინფლამატორული ციტოკინების როგორებიც არიან ინტერლეიკინი (IL-1) და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორის (Tumor Nekrose Faktor (TNF- $\alpha$ )) წარმოქმნას. ეს განაპირობებს ენდოთელური უჯრედების აქტივაციას, ადგილი აქვს ენდოთელიუმიდან და სხვა უჯრედებიდან ადჰეზიური მოლეკულების, პროტეინების გამოთავისუფლებას. აქტივირებული ენდოთელური უჯრედები თავიანთ ზედაპირზე გაძლიერებულად ახდენენ იმ ადჰეზიური მოლეკულების ექსპრესიას, რომლებიც მონოციტებისა და ლიმფოციტების მიმაგრებას განაპირობებენ. სელექტინები იწვევენ მონოციტებისა და T ლიმფოციტების დროებით კონტაქტს ენდოთელურ უჯრედებზე, უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულები კი პირიქით ახდენენ მათ მიმაგრებას ენდოთელიუმის ზედაპირზე. ამით შესაძლებელი ხდება ლეიკოციტების შეჭრა განხორციელდეს სისხლძარღვის სუბინტიმურ შრეში. (Libby.2003; Imhof, Koenig 2003). მრავალი პროსპექტული კვლევით დადგინდა, რომ არსებობს პირდაპირი კავშირი სისტემურ ანთების მარკერებსა როგორებიც არიან ადჰეზიური მოლეკულები (ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin), ციტოკინები (IL-6, TNF- $\alpha$ ) და სხვა მწვავე ფაზის პროტეინები მაგ. C რეაქტიული პროტეინი (CRP) და ანგიო-კარდიოლოგიურ მოვლენებს შორის (Ross R.1999).

#### **1.4. ადჰეზიური მოლეკულები**

ადჰეზიური მოლეკულები არიან უჯრედის ზედაპირზე არსებული პროტეინები, რომლებიც რეცეპტორ-ლიგანდ პრინციპით უჯრედებს შორის მიზნობრივ კონტაქტს ახორციელებენ და ამით უჯრედული კომუნიკაციის საშუალებას იძლევიან. ადჰეზიური მოლეკულების სხვადასხვა ოჯახები ადამიანის ორგანიზმში სხვადასხვა მნიშვნელოვან ფუნქციას ასრულებენ და ამით არეგულირებენ ადამიანის ორგანიზმში მიმდინარე დინამიურ პროცესებს. ისინი განაპირობებენ ერთი უჯრედის კავშირს მეორესთან ან ექსტრაცელულურ მატრიქსთან (Piggot R. 1993). სტრუქტურული ჰომოლოგიების საფუძველზე ადჰეზიური მოლეკულები სხვადასხვა მოლეკულურ ოჯახებად იყოფა:

- იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახი
- კადჰერინები
- სელექტინები
- ინტეგრინები

ლეიკოციტების მიგრაციაში მონაწილე მოლეკულები ეკუთვნიან სელექტინების, ინტეგრინების და იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახის ჯგუფს.

### 14.1 სელექტინები

სელექტინები არის ადჰეზიური მოლეკულების ჯგუფი, რომლებიც მწვავე ან ქრონიკული ანთების პროცესში ლეიკოციტების ვასკულურ ენდოთელზე ადჰეზიასა და მათი ანთებად ქსოვილში ქემოტაქტილურ მიგრაციაში მონაწილეობენ. ამასთან სელექტინები ააქტიურებენ მთლიანი ადჰეზიური მოვლენების კომპლექსურ კასკადს. სისხლის კაპილარული ნაკადიდან ლეიკოციტები მოძრაობის შენელების გამო იწყებენ ე.წ. „ბრუნვას“ ("Rolling") და კონცენტრირდებიან ლოკალურად სისხლძარღვის კედლის გასწვრივ. მხოლოდ ამის შემდეგ შეუძლიათ სხვა ადჰეზიურ მოლეკულებს მართონ ლეიკოციტების ენდოთელთან მყარი კავშირი და მათი შემდომი მიგრაცია ქსოვილში. სელექტინები უკავშირდებიან გლიკოპროტეინებზე არსებულ სპეციალურ ოლიგოსაქარიდებს და გლიკოლიპიდებს.

აქამდე ცნობილია მხოლოდ სამი სელექტინი: E-, P- და L- სელექტინი. E-და P-სელექტინები მდებარეობენ სისხლძარღვების ენდოთელზე, ხოლო P-სელექტინი დამატებით მდებარეობს ასევე თრომბოციტების ზედაპირზეც. რაც შეეხება L-სელექტინს იგი ლეიკოციტებზეა ექსპრესირებული. სელექტინები თამაშობენ დიდ როლს ლეიკოციტების მიგრაციის ადრეულ ფაზაში. ისინი განაპირობებენ პირველ კონტაქტს ლეიკოციტებსა და სისხლძარღვის ენდოთელს შორის. ამის შედეგად ადგილი აქვს ფენომენს ე.წ. „ბრუნვას“ „Rolling“. ლეიკოციტები ბრუნავენ სისხლძარღვის შიდა შრის გასწვრივ (Rosales, Juliano, 1995).

**სელექტინების ფუნქცია**

**ლეიკოციტების მოთოკვა-შეჩერება და ბრუნვა**

→ გადაადგილება ანთების კერისაკენ

	<b>L-სელექტინი</b>	<b>E-სელექტინი</b>	<b>P-სელექტინი</b>
<b>ექსპრესიის არეები</b>	ლიმფოციტები (მაღალი ექსპრესია ბუნებრივ T-უჯრედებზე, მსუბუქი ექსპრესია მეხსიერების უჯრედებზე) ნეიტროფილური გრანულოციტები მონოციტები	ენდოთელი	ენდოთელი, თრომბოციტები
<b>ექსპრესიის რეგულაციის გზა</b>	ციტოკინებით სტიმულირებადი	TNF, IL-1 ციტოკინებით სტიმულირებადი (4-6სთ)	სტიმულირებულია (წამებიდან წუთებამდე), გრანულაში შენახული
<b>სამიზნე-უჯრედები</b>	ენდოთელური უჯრედები	ნეიტროფილური გრანულოციტები	ნეიტროფილური გრანულოციტები, მონოციტები

*ცხრილი 2 - სელექტინების დახასიათება (R.Tauber, 2006)*

**14.2. ინტეგრინები**

ინტეგრინები არიან რეცეპტორის ცილები, რომლებიც უჯრედებს ექსტრაცელულურ მატრიქსთან აკავშირებენ და რეაგირებენ გარედან-შიგნით და შიგნიდან-გარეთ სიგნალებზე (outside-in / inside-out Signalling). ისინი არიან მოლეკულების დიდი ოჯახი და ექსპრესირდებიან სხვადასხვა ქსოვილში. ქიმიური თვალსაზრისით ინტეგრინი შედგება ორი ერთეულისაგან (α- და β-), რომლებიც ერთმანეთთან კავშირშია. ალფა და ბეტა ქვეერთეულებისათვის არსებობს სხვადასხვა ქვეტიპი როგორებიცაა ბეტა 1, ბეტა 2 და ა.შ. ლეიკოციტებზე რამოდენიმე ინტეგრინი არსებობს, რომელიც ლეიკოციტების მიგრაციის პროცესში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს. აქედან ერთ-ერთი არის ლიმფოციტების ფუნქციური ანტიგენი-1 (LFA-1). იგი ექსპრემირებულია თითქმის ყველა ლეიკოციტის ზედაპირზე. სხვა ინტეგრინი, მაკროფაგ-1 (Mac-1), საპირისპიროდ

მხოლოდ გრანულოციტებზე და მონოციტებზე არსებობს. ინტეგრინები განაპირობებენ ლეიკოციტების მტკიცე ადჰეზიას ენდოთელიუმზე. ეს არის ლეიკოციტების სისხლის ნაკადიდან გადმოსვლის (მიგრაციის) ერთერთი აუცილებელი პირობა (Bevilacqua&Nelson, 1993; Humphries 2000; Hynes, 2002).

**ინტეგრინების ბიოლოგიური ფუნქციები და მოქმედების მექანიზმები**

ინტეგრინების ბიოლოგიური ფუნქციები	უჯრედების გადაადგილება →	შეჩერება, ციტოქონჩხის ორგანიზაცია
	უჯრედული პროცესები/ მდგომარეობები როგორებიცაა →	პოლარობა, ჰომეოსტაზი, გადარჩენა/აპოპტოზი, ზრდა,დიფერენცირება
	ინტეგრინები მონაწილეობენ →	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ პოლარიზებული უჯრედული კულტურის წარმოქმნა</li> <li>➤ კორექტული ქსოვილოვანი არქიტექტურა</li> </ul>
მოქმედების მექანიზმი	ინტეგრინებს შეუძლიათ უამრავი სხვადასხვა სიგნალების გადაცემის გზების აქტივირება (მაგ.პროტეინკინაზა, Ras, Rho.)	
	მხოლოდ ინტეგრინები <b>სშირად არასაკმარისია</b> ისეთი ეფექტების მისაღწევად როგორებიცაა გადარჩენა, პროლიფერაცია ან დიფერენციაციის გამოწვევა, აუცილებელია იმავდროულად აგრეთვე სხვა სიგნალებების აქტივაცია (მაგ.ზრდის ფაქტორებით) → <b>სინერგიზმი, ნებადამრთველი მოქმედება</b>	

**ცხრილი 3 - ინტეგრინების ოჯახის მიმოხილვა (R.Hynes, 2002)**

**14.3. იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახი**

იმუნოგლობულინ სუპეროჯახის წევრები არიან მემბრანული პროტეინები, რომელთა ექსტრაცელულური არე სულ მცირე ერთ იმუნოგლობულინის დომენს (Ig-Domäne) შეიცავს (Williams&Barclay, 1988). შიდაუჯრედული ნაწილის არსებობა

განაპირობებს როგორც შესაბამისი მოლეკულის შეკავშირებას უჯრედის ციტონონხსთან, ასევე უზრუნველყოფს სიგნალის გადაცემის ფუნქციასაც. ისევე როგორც თვით იმუნოგლობულინებს ამ ოჯახის ბევრ სხვა წევრს აქვს სიგნალების აღქმის, უჯრედული ადჰეზიის, და რეცეპტორული ფუნქციები. ისინი არსებობენ სხვადასხვა ორგანოებსა და ქსოვილებში (Springer, 1990). ამ ჯგუფს ეკუთვნის იმუნური სისტემის მოლეკულები – B უჯრედული რეცეპტორი (BZR), T უჯრედული რეცეპტორი (TZR) და მათი კო-რეცეპტორები CD4/CD8, MHC მოლეკულები (Wdelman, 1987). იმუნოგლობულინების სუპეროჯახის პროტეინები ასევე მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ნერვული სისტემის ფუნქციონირებაში. ასეთებია მაგ. ნერვული უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა N-CAM, Nr-CAM, ნეიროფასცინი, IL1 (Crossin&Kruschel, 2000).

ამ ოჯახის მნიშვნელოვანი წარმომადგენლები არიან ინტრაცელულარული უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (ICAM-1) და ვასკულარული ადჰეზიური მოლეკულა-1 (VCAM-1). ICAM-1 და VCAM-1 თავიანთი სტრუქტურითა და ფუნქციით ერთმანეთთან მჭიდრო ნათესაობაში არიან. ორივე მათგანი უკავშირდება ლეიკოციტის ინტეგრინს (Gerrity, R.G. 1981). ნორმალურ თავებებსა და ბოცვრებში ორივე მათგანი ექსპრესირებულია აორტის ენდოთელიუმზე ათეროსკლეროზული ცვლილებების რეგიონებში. ჰიპერქოლესტერინემიის მქონე ცხოველებში ორივე მათგანის ექსპრესია ძალიან მომატებულია, განსაკუთრებით ქაფიანი უჯრედების ფორმირების ფაზაში, ათეროსკლეროზული დაზიანების არეებში, ნაწილობრივ ასევე პერიფერიაზე. თუმცა ხაზგასმით უნდა აღინიშნოს, რომ VCAM-1 უნიკალურია, რადგან მისი ექსპრესია მკაცრად შემოფარგლულია დაზიანების კერით და დაზიანებისადმი მიდრეკილი რეგიონებით, მაშინ როცა ICAM-1 ექსპრესია დაუზიანებელ აორტასა და დაზიანებისაგან დაცულ რეგიონებშია გამოხატული (Hansson, G.K. et all. 1991). ეს განსხვავება ექსპრესიის ნიმუშში მიუთითებს დაზიანების წარმოშობის პროცესში ამ მოლეკულების განსხვავებულ ფუნქციაზე და შესაბამისად მათ განსხვავებულ მნიშვნელობაზე ათეროსკლეროზული პროცესის განვითარებაში (Myron I. Cybulsky, 2001).



#### **1.4.4. ICAM1 - ინტერცელულარული ადჰეზიური მოლეკულა 1**

ICAM-1 (CD54) არის 95kD ზომის გლიკოპროტეინი, რომელიც ლეიკოციტებზე, ფიბრობლასტებზე, ენდოთელურ, ეპითელურ და სხვადასხვა სიმსივნურ უჯრედებზე ექსპრესირდება (Van de Stolpe & van der Saag, 1996). ენდოთელურ უჯრედებზე იუამ1 (ICAM-1) არის მცირე რაოდენობით წარმოდგენილი. შესაძლებელი იქნა ენდოთელურ უჯრედებზე TNF-, IFN- $\gamma$ - და IL-1 სტიმულაციის გზით ICAM-1-ის გაძლიერებული ექსპრესია მიეღოთ (Rothlein et al., 1988; Dustin et al., 1986).

როგორც ლიგანდები ცნობილია ინტეგრინები (LFA-1, Mac-1), რომლებიც წარმოდგენილია ლეიკოციტებზე, რინოვირუსებში და პლაზმოდოუმ ფალციპარუმით დაინფიცირებულ ერითროციტებზე (Greve et al., 1989; Hynes & Lander, 1992; Diamond et al., 1995). ICAM-1 თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ლეიკოციტებსა და ენდოთელურ უჯრედებს შორის კავშირის შექმნაში. სელექტინების მიერ დამყარებული კონტაქტები ICAM-1-ის საშუალებით ჩანაცვლდება უფრო მყარ კონტაქტებად. კაპლანსკის მიერ ICAM-1 და VCAM-1 ურთიერთქმედება აღწერილია როგორც უმნიშვნელოვანესი მოვლენა ლეიკოციტების ენდოთელიუმთან შეკავშირების პროცესში (Kaplanski et al., 1998).

#### **1.4.5. VCAM1 - ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა 1**

VCAM-1 (CD106) არის იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახის წევრი. ეს ადჰეზიური მოლეკულა არის 90kD ზომის უჯრედის ზედაპირული გლიკოპროტეინი, რომელიც ენდოთელურ, ეპითელურ, დენდრიტულ უჯრედებზე და მაკროფაგებზე ექსპრესირებული (Gearing & Newman, 1993). დნმ-ის სეკვენციური ანალიზის საშუალებით დაადგინეს, რომ VCAM-1 იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახს ეკუთვნის. ადამიანებსა და თაგვებში იგი წარმოდგენილია შვიდი იმუნოგლობულინის მზგავსი დომენით (Cybulsky & Gimbrone, 1991). რთი ღობს ჯგუფის მიერ კომპანია Biogen-ში განახორციელეს მისი კლონირება და დაადგინეს, რომ იგი უკავშირდება ინტეგრინ  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) და  $\alpha_4\beta_7$  (murine mucosal homing receptor, LPAM-1) (Roy Lobbs 2002).

VCAM-1 თამაშობს ცენტრალურ როლს მონონუკლეარული უჯრედების როგორებიცაა მონოციტები და T-ლიმფოციტები ენდოთელურ უჯრედებზე ადჰეზიაში, (Cybulsky et al., 1991). ეს ადჰეზიური მოლეკულა ურთიერთქმედებს VLA-4 (Very Late Antigen-4) - თან, რომელიც მუდმივად ექსპრესირდება მონოციტებსა და

ლიმფოციტებზე და განაპირობებს ამ უჯრედების ფიქსაციას ენდოთელიუმის ზედაპირზე. ენდოთელური უჯრედები აქტივირდებიან ციტოკინების (TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) და თრომბინის საშუალებით. აქტივირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე წარმოდგენილია VCAM-1-ის მაღალი ექსპრესია. VCAM-1 ექსპრესიის მატება შესაძლოა ინდუცირებულ იქნეს ათეროსკლეროზული რისკ ფაქტორებით როგორცაა ჰიპერქოლესტერინემია, ე.წ. "AGEs" (Advanced Glycation End Products), ოქსიდირებული LDLs, სხვადასხვა ციტოკინის (IL-1, TNF- $\alpha$ ) მეშვეობით. VCAM-1 განაპირობებს ენდოთელური უჯრედული კონტაქტების გახსნას. ეს საშუალებას აძლევს ლეიკოციტებს გადავიდნენ სუბინტიმაში (Kumar et al. 1994).

მონოციტები წარმოადგენენ ლეიკოციტარული უჯრედების დაახლოებით 80%-ს ათეროსკლეროზული დაზიანების უბანში. ამიტომაც VCAM-1, რომელიც მართავს ამ უჯრედების ჩართვას სუბენდოთელურ შრეში უდიდესი როლი ენიჭება ათეროგენეზის ადრეულ სტადიაში. მრავალი კვლევის საფუძველზე დადგინდა, რომ ენდოთელური VCAM-1 – ის გაძლიერებული ექსპრესია აღინიშნება ApoE-/- თაგვებსა და ბოცვრებში ადრეული ათეროსკლეროზული დაზიანების ადგილებში. VCAM1-ის მაღალი ექსპრესია დაფიქსირდა აგრეთვე ათეროსკლეროზით დაავადებულ პაციენტებში ათეროსკლეროზის შორსწასულ სტადიებში, ოლსონ და სრივასტავა თავიანთ ნაშრომებში აღნიშნავენ გამოკვლევების შესახებ VCAM-1 და  $\alpha_4$  ინტეგრინის დეფიციტის შემთხვევაში (Olson და Srivastava (1996). აღმოჩნდა, რომ ასეთ დეფიციტს შედეგად მოსდევს ეპიკარდიუმის დეზორგანიზაცია და მიოკარდიუმის შემდგომი გათხელება.

გარმი სუსინის მიერ დემონსტრირებულ იქნა, რომ ინტეგრინი  $\alpha_4\beta_1$  და ადჰეზიური მოლეკულა VCAM-1 ექსპრესიას განიცდიან მხოლოდ მოპროლიფერირე და არა მოსვენებულ ენდოთელურ და მურალურ უჯრედებზე (Garmy-Susini et al. 2005) .

VCAM-1 თამაშობს განსაკუთრებულ როლს როგორც ლეიკოციტების პირველადი ადჰეზიის (ე.წ. „ბრუნვა“ Rolling), ასევე ადჰეზიის ფინალურ ფაზაში - მათ გავრცელებასა და ფიქსაციაში (ე.წ. Spreading und Tethering) (Berlin C. 1995; Alon R. 1995). ამ განსაკუთრებულობის გამო მრავალ ნაშრომში VCAM-1 განიხილება როგორც ათეროსკლეროზის პოტენციური მარკერი. (Peter et al., 1999; Silvestro et al., 2005; Steven M. Albelda, 1994).

**ლეიკოციტ-ენდოთელური უჯრედული ადჰეზიური რეცეპტორების ექსპრესია და მათი ლიგანდები**

მოლეკულები	პირველადი ექსპრესია	ლიგანდი
<b>სელექტინები</b>		
<i>L-სელექტინი</i>	პოლიმორფულნუკლეარული ლეიკოციტები და ლიმფოციტები	CD34 Gly-CAM-1
<i>P-სელექტინი</i>	ენდოთელური უჯრედები, თრომბოციტები	<i>P-სელექტინი</i> გლიკოპროტეინ ლიგანდი (PSGL) <i>Syalil Lewis</i> და <i>სხვა</i>
<i>E-სელექტინი</i>	ენდოთელური უჯრედები	<i>Syalil Lewis</i> და <i>სხვა</i>
<b>ინტეგრინები</b>		
<i>LFA-1</i> ( <i>CD11a/CD18</i> )	პოლიმორფულნუკლეარული ლეიკოციტები და ლიმფოციტები	<i>ICAM1-ICAM2</i>
<i>Mac-1</i> ( <i>CD11b/CD18</i> )	პოლიმორფულნუკლეარული ლეიკოციტები	<i>ICAM-1</i> და <i>სხვა</i>
<i>VLA-4</i> ( $\alpha_4\beta_1$ )	ეოზინოფილების და ლიმფოციტები	<i>VCAM-1, FN</i>
<b>იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახი</b>		
<i>ICAM-1</i>	ლიმფოციტები, ენდოთელური უჯრედები	<i>LFA1, Mac1</i>
<i>ICAM-2</i>	ლიმფოციტები, ენდოთელური უჯრედები	<i>LFA1</i>
<i>VCAM-1</i>	ენდოთელური უჯრედები	<i>VLA4</i>
<i>PECAM-1</i>	ენდოთელური უჯრედები, პოლიმორფულნუკლეარული ლეიკოციტები, ლიმფოციტები, თრომბოციტები	<i>PECAM, სხვა</i>

ცხრილი 4 ლეიკოციტ-ენდოთელური უჯრედული ადჰეზიური რეცეპტორები სტივენ ალბელდას თანახმად (*Steven M. Albelda*)

## 1.5. მონოციტები

მონოციტი არის ადამიანის სისხლის უჯრედული კომპონენტი, რომელიც ლეიკოციტების უჯრედულ კლასს განეკუთვნება. როდესაც ლეიკოციტები ტოვებენ მოცირკულირე სისხლს მათგან ყალიბდება მაკროფაგები, რომელთა ამოცანაა ორგანიზმის უცხო სხეულების განადგურება ფაგოციტოზის გზით და შექნილი იმუნური პასუხის გააქტივება ანტიგენების წარმოდგენის გზით. თავიანთი 5-20 მკმ დიამეტრით მონოციტები ლეიკოციტებს შორის ყველაზე დიდი უჯრედებია და ლეიკოციტარული პოპულაციის დაახლოებით 3-8% შეადგენენ. მათ გააჩნიათ დამახასიათებელი დიდი ბირთვი ხშირად ლობიოს მარცვლის ფორმის და შედარებით მცირე ციტოპლაზმა. მონოციტები და მაკროფაგები ფიზიოლოგიური ნორმის პირობებში ახდენენ LDL, ცხიმოვანი ნივთიერებათა ცვლის მნიშვნელოვანი ნაწილის გადამუშავებას. LDL -ის მოდიფიცირების შემთხვევაში, რასაც ადგილი აქვს მისი პროტეინული ნაწილის აცეტილირების შედეგად, ოქსიდირებული, მოდიფიცირებული LDL ვეღარ გადამუშავდება და ხდება მისი ლეიკოციტარული უჯრედის შიგნით დაგროვება. ასე გარდაქმნილი მონოციტები და მაკროფაგები წარმოადგენენ ე.წ. „ქაფიან უჯრედებს“. ქაფიანი უჯრედები ქმნიან უდიდეს ნაწილს ყველა ცნობილი ათეროსკლეროზულად დაზიანებული, ე.წ. "ჩაკირული" სისხლძარღვებისა.

ისინი აღმოცენდებიან სისხლძარღვის ინტიმაში და ინტიმა მედიაში ცხიმების ჩალაგების შედეგად. ასეთი „ცხიმოვანი ფოლაქები“ ე.წ. „fatty streaks“ შეიძლება სისხლძარღვის კედლის 10-50% ფარავდეს. ასე ზიანდება ენდოთელიუმი. გამოკვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ ათეროსკლეროზული დაზიანების არეები შედგება როგორც ცხიმით გაჯერებული მაკროფაგების ასევე ცხიმით გაჯერებული გლუვი კუნთოვანი უჯრედებისაგან (Gimbrone M.A. , 1998).

სისხლში მოცირკულირე მაკროფაგები თავიანთ წინა ფორმაში, როგორც მონოციტები სისხლძარღვების ღრმა შრეებში აღწევენ ენდოთელური შრის გავლით. ეს პროცესი სტიმულირდება ქემოტაქტილური ფაქტორებით. ჯერ კიდევ სუბენდოთელში ადგილი აქვს მონოციტების ცვლილებას და მათ დიფერენცირებას მაკროფაგებად. იქ შეუძლიათ მაკროფაგებს ჩაილაგონ ლიპიდები და ქოლესტერინეთერები. ეს იწვევს ქაფიანი უჯრედების წარმოქმნას. ქიმიურად მოდიფიცირებული, ოქსიდირებული LDL მაკროფაგების მიერ ე.წ. სკავენჯერის

რეცეპტორებით უცვლელად და კონცენტრაციისდამიუხედავად შეიწოვება და შეინახება (Gebbers, G.O. 1998). ენდოთელიუმის დაზიანების შედეგად ვლინდება ათეროგენეზის ტიპური ფენომენი: ინტიმასა და მედიალურ შრეში მონოციტების მიგრაცია და აკუმულაცია, ამ შრეებში ცხიმების ჩალაგება, ქაფიანი უჯრედების წარმოქმნა, გლუვი კუნთოვანი უჯრედების პროლიფერაცია და მიგრაცია მედიალური შრიდან ინტიმაში. ეს მნიშვნელოვანი მოვლენები დროთა განმავლობაში განაპირობებენ ქსოვილებში მუხუდოს მარცვლისმაგვარი ცვლილებების განვითარებას, რომლებიც ცნობილია „ფოლაქების“ სახელწოდებით. კუმულირებული ქაფიანი უჯრედები და ლიმფოციტები, დაღუპული უჯრედები და ლიპიდების ჩართვის პროგრესირება, იწვევენ დაზიანების კერაში ნეკროზული ბირთვის გაჩენას. პარალელურად სხვა კუნთოვანი უჯრედები მიგრირებენ ინტიმაში და ექსტრაცელულარულ მატრიქსთან ქმნიან ფიბროზულ სახურავს. ასეთი სახურავით დაფარული არასტაბილური ფოლაქი განიცდის რუპტურას, სისხლი და ცხიმოვანი ბირთვის თრომბოგენული მასა ერთმანეთს ეხება და ჰემოსტაზის სისტემა აქტივირდება. ფოლაქის რუპტურა და თრომბის წარმოქმნა კლინიკურად მანიფესტირებს არასტაბილური სტენოკარდიისა, მიოკარდიუმის ინფარქტისა და სხვათა სახით (Bauer J. SS 2004).

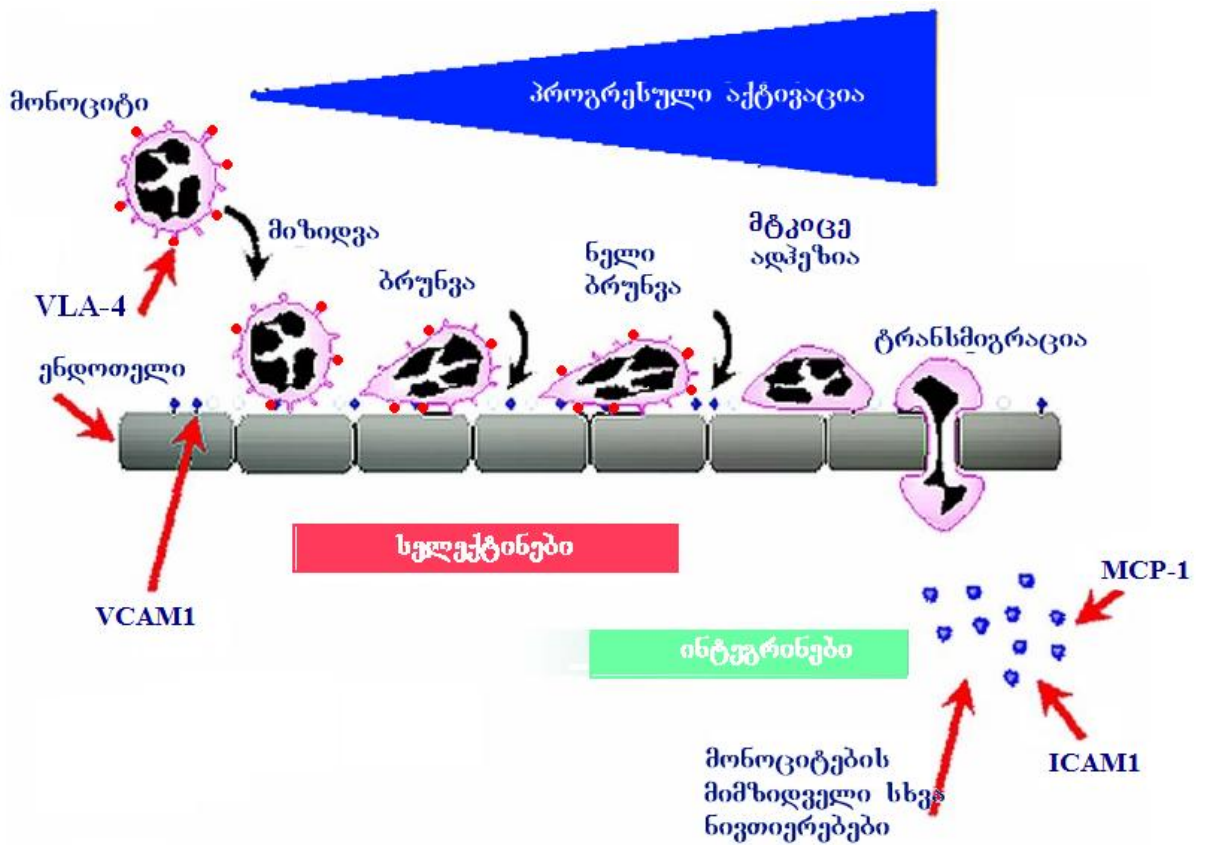
## 1.6. მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების საფუძვლები

ლეიკოციტების ურთიერთქმედება ვასკულარულ ენდოთელიუმთან სისხლძარღვის ანთების რეგიონებში აქტივაციაზე-დამოკიდებული ადჰეზიური მოლეკულების საშუალებით დინამიურად რეგულირდება. ლეიკოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების დღეისათვის არსებული მოდელები, რომლებიც მრავალრიცხოვან კვლევებს ეფუძნება ამტკიცებენ, რომ ლეიკოციტების ინიციალური შეჩერება-ბრუნვის (Rolling), სტაბილური ადჰეზიის (Arrest), გავრცელების (Spreading) და საბოლოო დიაპედეზის პროცესში სელექტინების, ინტეგრინებისა და იმუნოგლობულინის-სუპეროჯახის მრავალი წევრი მონაწილეობს.

მონოციტების ადჰეზიის ადრეული კვლევები ჩატარებული კულტივირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე სტატიურ პირობებში აჩვენებენ, რომ იზოლირებული მონოციტების ბაზალური ადჰეზია უფრო მაღალია ნეიტროფილებსა და

ლიმფოციტებთან შედარებით (Arnaout M.A., 1988; Bevilacqua M.P., 1987; Carlos T.M., 1990; Hakkert B.C., 1991; Harlan J.M., 1985; Pawlowsky N.A., 1985; Luscinskas F.W., 1991). ფაქტორები, რომლებიც მონოციტებსა და ენდოთელურ უჯრედებს ააქტიურებენ და ამით ვუამ-ის ექსპრესიის მატებასა და ქემოტაქტილური მიგრაციის საპასუხო რეაქციებს იწვევენ, მონოციტ-ენდოთელურ ურთიერთქმედებაში უდიდესი მნიშვნელობისაა. უჯრედის ადჰეზიური მოლეკულები და მათი რეგულაციის მექანიზმები პროგრამირებული პრინციპით მოქმედებენ და მონაწილეობენ ე.წ. ლეიკოციტ-ენდოთელურ უჯრედულ ადჰეზიურ კასკადში (Pober J.S., 1990; Butcher E.C., 1991; Smith C.V., 1993; Luscinskas F.W., 1989).

ენდოთელის აქტივირება ისეთი ფაქტორებით, როგორებიცაა TNF $\alpha$ , IL-1, LPS განაპირობებს მონოციტების ადჰეზიის 2-5-ჯერ გაზრდას. ადჰეზიური კასკადის პირველ ეტაპს წარმოადგენს ხანმოკლე და შექცევადი ადჰეზიური მოვლენა, რომელიც მონოციტების პირველ მცირე შეხებას განაპირობებს ენდოთელიუმის ზედაპირთან. ამ ეტაპზე ენდოთელური P- და E- სელექტინები და ნახშირწყლოვანი ლიგანდები უკავშირდებიან ლეიკოციტებს. ლეიკოციტების ინტეგრინი VLA-4 ურთიერთქმედებს VCAM-1-თან, რომელიც ექსპრესირდება ენდოთელიუმის მიერ. ეს საწყისი ნაბიჯი იწვევს მოცირკულირე უჯრედების სისხლძარღვის კედელზე ე.წ. "შეჩერება-ბრუნვას" "Rolling". ამ მოძრაობას მოსდევს შემდეგი სწრაფი მოვლენა ადჰეზიის მატება და ლეიკოციტების შეჩერება. ქემოატრაქტილური პროტეინები, რომლებიც გამომუშავდება ქსოვილების მიერ ან ენდოთელიუმის ზედაპირზე ექსპრესირდება ატარებენ სხვადასხვა სიგნალებს, რომელთა საშუალებითაც ინტეგრინების ადჰეზიური უნარი აქტივირდება. იმუნოგლობულინ-სუპეროჯახის წევრები VCAM-1 და ICAM-1 განაპირობებენ მონოციტების მყარ ადჰეზიას. ფინალურ ეტაპზე ადგილი აქვს ქემოტაქსისს და მონოციტების ტრანსმიგრაციას ენდოთელური შრის გავლით ქსოვილში. იმუნოგლობულინების-სუპეროჯახის სხვა წევრი PECAM-1 კი არის საჭირო მონოციტების შემდგომი ტრანსმიგრაციისათვის (Nakashima Y., 1998; Luscinskas F.W., 1994).



სურათი 2 ლეიკოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედება (მოდიფიცირებულია კლეის-ს „ლეიკოციტების ადჰეზიური კასკადის“ თანახმად, 1999)

### 1.7. ციტოჩონჩხის შებოჭვის მნიშვნელობა

ციტოჩონჩხი არის უჯრედის კომპლექსური, დინამიური, ფუნქციურად მნიშვნელოვანი სტრუქტურა. იგი შედგება პროტეინებისაგან, რომლებიც მთლიანობაში სამ დიდ სისტემას ქმნიან: აქტინფილამენტები, ინტერმედიალური ფილამენტები და მიკროტუბულები (Sabatini et al., 1963 J.Cell Biol.; Ishikawa et al., 1968 J. Cell Biol.). ციტოჩონჩხი პასუხისმგებელია უჯრედის ელასტიურობასა და მექანიკურ სტაბილურობაზე, უჯრედის როგორც ერთი მთლიანის მოძრაობაზე და მის გარეგან ფორმაზე, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მისი როლი უჯრედის დაყოფის პროცესში, ასევე გარეგანი სიგნალების აღქმაში და შემდგომ მათი უჯრედშიგნით გადაცემაში.

უჯრედების ადჰეზიისათვის სხვა უჯრედებზე ან ექსტრაცელულურ მატრიქსზე უმნიშვნელოვანესია ზედაპირული რეცეპტორების ციტოპლაზმური ნაწილის

შებოჭვა. ინტეგრინით განპირობებული ადჰეზიის შესწავლისას დადგინდა, რომ გარეთა დომენი ექსტრაცელულური მატრიქსის ნაწილს უკავშირება, მაშინ როდესაც პარალელურად ციტოპლაზმური ნაწილი ბოჭკოების აქტინფილამენტებს გადაეჭდობა. ციტოპლაზმური ნაწილი უკავშირდება ტალინს. ის კი თავის მხრივ უკავშირდება ვინკულინს. ეს სტრუქტურული პროტეინი მდებარეობს აქტინთან ერთად და შეჭიდულია აქტინფილამენტთან (Burrige&Chrzanowska-Wodnicka, 1996). LFA-1-ის ცდებში მიღწეულ იქნა ციტოჩონჩხის ფიბრილების ციტოქლაზინ D-ის საშუალებით დარღვევის შედეგად LFA-1 განპირობებული ლეიკოციტების ადჰეზიის ცვლილება (Peter&O'Toole, 1995; Kaapa A, Peter K, 1999).

უჯრედის ზედაპირული რეცეპტორის შიდაუჯრედული ნაწილის და უჯრედის ციტოჩონჩხის ურთიერთქმედება მნიშვნელოვანი შესწავლის საგანია. გამოკვლევებით დადგინდა, რომ ზედაპირული რეცეპტორი, რომელიც უჯრედზე წარმოდგენილია ციტოჩონჩხთან კონტაქტის გარეშე სავარაუდოდ ვერ შეძლებს თავისი ადჰეზიური ფუნქციის განხორციელებას. აქედან გამომდინარე შესაძლოა ციტოჩონჩხის შებოჭვის დათრგუნვა მონოციტების ენდოთელზე ადჰეზიის ინჰიბიციის პროცესში მნიშვნელოვანი კომპონენტი იყოს. ეს კონცეფცია გამოკვლეულ იქნა კონკურენტული ხსნადი პროტეინების საშუალებით (S.Marheineke 2002). ადჰეზიური მოლეკულების ასეთი ბლოკადა ათეროსკლეროზის მკურნალობაში ახალი თერაპიული ფორმების განვითარების შესაძლებლობას ქმნის.



## 2. მასალა და მეთოდები

მოცემული შრომის ფარგლებში *in vitro* ექპერიმენტები ჩატარებულ იქნა ქალაქ ფრეიბურგის საუნივერსიტეტო კლინიკის ანგიოლოგიისა და კარდიოლოგიის განყოფილების ბაზაზე.

### 2.1. CD7/VCAM-1

ქალაქ ფრეიბურგის (გერმანია), საუნივერსიტეტო კლინიკის ანგიოლოგიისა და კარდიოლოგიის განყოფილების კლინიკურ ლაბორატორიაში გამოსაკვლევად მზადყოფნაში არსებობდა ხსნადი პროტეინი CD7/VCAM-1, მოთავსებული ვექტორ pTR-UF5 (Invitrogen) ადენოვირუსში. ხსნადი პროტეინი CD7/VCAM-1 შედგება CD7 და VCAM-1. მათი ფუზიონირებისათვის წინარე კვლევებში (S.Marheineke 2002) ჩატარებულ იქნა სხვადასხვა ხელახალი კლონირება. CD7 დაიყო Xho I საშუალებით ისე, რომ საბოლოოდ ექსტრაცელულური და ტრანსმემბრანული დომენების მაკოდირებელი სეკვენცი იქნა მიღებული. გენი EcoR I და Xho I საშუალებით ისე გამოიყო, რომ მხოლოდ გენის ციტოპლაზმური დომენის მაკოდირებელი ნაწილი იქნა მიღებული. საბოლოოდ ჩატარდა ორივე ნაწილის ლიგირება ვექტორ pcDNA1-ში მზა ხსნადი მოლეკულა CD7/VCAM-1 Xho I საშუალებით ხელახლა გამოიყო. PCR-ის გამოყენებით საჭირო პრაიმერის დამატებით ჭრის ადგილი Hind III იგივე Mlu I იქნა შევსებული, რამაც შესაძლებელი გახდა, რომ მისი კლონირება pZeoSV (Invitrogen) ვექტორში განხორციელდებოდა. დამატებითი გადაკლონირებები გახდა საჭირო, რათა AV ვექტორის pTR-UF5 ადექვატური ჭრის ადგილი მიეღო (S.Marheineke 2002).

რეკომბინანტური E1/E3-დელეტირებული ადამიანის ადენოვირუსი წარმოადგენს ადენოვირუსების სეროტიპ 5. ვირუსები pJM17/pAdRSV სისტემის დახმარებით იქნა მიღებული. მათი გამრავლება HEK 293-Zellen-ში განხორციელდა (ProCorde).

ხსნადი კონსტრუქტი მოგვიანებით ვექტორ pZeoSV2(+) (Invitrogen) და ადენოვირუსულ ვექტორ pTR-UF5 სუბკლონირდა. ხოლო ფინალური კონსტრუქტი მიღებულ იქნა სეკვენცირების გზით.

CD7 გამოყენება როგორც ექსტრაცელულური მარკერისა კარგად აპრობირებული მეთოდია (Aruffo & Seed, 1987; Lee, 1997). ადამიანის CD7 შედარებით პატარა (40 kDa) მემბრანული მოლეკულაა და ეკუთვნის იმუნოგლობულინ სუპეროჯახს (Eisenbarth

*et al.*, 1980). მწიფე T-უჯრედებთან და ბუნებრივ კილერებთან ერთად (Barcena *et al.*, 1993; Rabinowich *et al.*, 1994) იგი ექსპრესირებულია ასევე B -უჯრედებზე ან მიელოიდების წინამორბედ უჯრედებზე მათ თიმუსში შედწვევამდე (Haynes *et al.*, 1980; Vodinelich *et al.*, 1983) და ხშირად კლინიკურ დიაგნოსტიკაში მარკერადაც გამოიყენება ლიმფოიდური T-უჯრედული ლეიკემიის შემთხვევაში (Haynes *et al.*, 1981). თუმცა ბოლომდე უცნობია ამ მემბრანული მოლეკულის როლი იმუნურ პასუხში. ამასთანავე არსებობს ვარაუდი, რომ იგი ამ უჯრედების ციტოკინების პროდუქციას არეგულირებს (Heinly *et al.*, 2001). აღნიშნული მოლეკულა არ მონაწილეობს ე.წ. "outside-in-signaling" პროცესში. იგი როგორც ექსტრაცელულური მარკერი გამოიყენებულ იქნა იმ უპირატესობით, რომ მას არ შეეძლო სპეციფიური ლიგანდების შეკავშირება. ეს ფაქტი სწორედ რომ საჭირო იყო ქვემოთაღწერილი ცდების ჩასატარებლად. აქ განხილული თვისებების გამო CD7 ურთიერთქმედება სხვა ზედაპირულ მოლეკულებთან მოსალოდნელი არ იყო და გამდინარე ციტომეტრიაში მცდარი ინტერპრეტაციის ალბათობას გამორიცხავდა ვინაიდან ნატიური უჯრედები CHO, HUVEC, HMEC1 და მონოციტები არ იყვნენ შესაბამის მდგომარეობაში რათა ანტი-CD7 შეეკავშირებინათ. ყოველივე ზემოთაღნიშნულის გამო CD7 გამოიყენება გარე მარკერად სავსებით გამართლებული იყო. GFP –ადენოვირალური ვექტორი გამოიყენებული იყო როგორც დადებითი კონტროლი.

**ადენოვირალური კონსტრუქტის დახასიათება (ProCorde).**

<b>pR275 (GFP)</b>	<b>pR658 (GFP)</b>	<b>pR274 (VCAM7CD7)</b>
3,7*10 <sup>9</sup> PFU/ml	1,0*10 <sup>10</sup> PFU/ml	2,1*10 <sup>9</sup> PFU/ml
3,7*10 <sup>11</sup> VP/ml	1,0*10 <sup>12</sup> VP/ml	3,7*10 <sup>11</sup> VP/ml
VP/PFU 100	VP/PFU 101,20	VP/PFU 100
OD 0, 73	OD 0, 74	OD 0, 71

**ცხრილი 5** PFU – Plaque Forming Units; VP – Viral Particles; OD – Optical Density 260nm/280nm.

მარკინეკეს ნამუშევარში ნაჩვენებია იქნა, რომ ინტრაცელულური დომენი ინტაქტური რეცეპტორის ციტოჩონჩხთან ბმის ადგილებში კონკურირებს და ამით ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიას აინჰიბირებს (S.Marheineke 2002). ციტოჩონჩხის დათრგუნვა შესაძლოა გახდეს ერთერთი მნიშვნელოვანი თერაპიული სტრატეგია VCAM-1 ფუნქციური ბლოკადისათვის. ციტოჩონჩხთან ზედაპირული მოლეკულის კონტაქტის გარეშე ადჰეზიური ფუნქციის შესრულება შეუძლებელი იქნებოდა. მრავალჯერ იქნა დადასტურებული, რომ ენდოთელურ რეცეპტორებს შორის, რომლებიც ქრონიკული ანთებითი პროცესების დროს ენდოთელში ლეიკოციტების მიზიდვის პროცესში მონაწილეობენ VCAM-1 ყველაზე მნიშვნელოვანია (Klaus L.2001, I.Cybulsky, 2001, Endres M. 1997, O'Brien KD 1996, Peter K 1997). CD7/VCAM-1 ის საშუალებით VCAM-1 ის ფუნქციური ინაქტივირება ვასკულარულ ენდოთელზე მონოციტების ადჰეზიის ინჰიბიციის რეალური შესაძლებლობაა. მარკინეკეს ნაშრომში სხვა გამოკვლევებს შორის აღწერილია ფუნქციური ცდებიც (S.Marheineke 2002). CD7/VCAM1-ის მოქმედება გამოკვლევულ იქნა ტრანსფიცირებულ ტრანსგენურ უჯრედებში. ამ გამოკვლევების დადებითი შედეგები ტრანსგენურ უჯრედულ კულტურებზე გახდა საფუძველი აღნიშნული სხნადი პროტეინის შემდგომი კვლევისა ადამიანის ენდოთელური უჯრედული კულტურის მოდელზე.

## 2.2. უჯრედულ კულტურებში ჩატარებული სამუშაოები

### 2.2.1. HMEC-1 კულტურა

ვასკულური ენდოთელური უჯრედები მდებარეობენ სისხლძარღვის კედელზე მისი სანათურის მხარეს და ურთიერთქმედებენ სისხლსა და ქსოვილს შორის, ამით ისინი გადამწყვეტ როლს თამაშობენ მრავალ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პროცესში (Cines et al., 1998; Kirkpatrick et al., 1996). ადამიანის ენდოთელური უჯრედების გამოყენებამ *in vitro* უჯრედული კულტურის სისტემებში შესაძლო გახდა ანთების, ანგიოგენეზის, ჭრილობის შეხორცების, ათეროსკლეროზის და სხვა ექსპერიმენტული მოდელის ჩატარება. ენდოთელური უჯრედების იზოლაციისა და კულტივირების მეთოდები შემუშავებული იქნა ენდოთელური უჯრედების სხვადასხვა ფორმებზე. მიკროვასკულური ენდოთელური

უჯრედები მიღებულ იქნენ სხვადასხვა წყაროდან როგორებიცაა მაგ. ზურგის ტვინი, პლაცენტა, ფილტვები და თავის ტვინი. (Dye et al., 2001; Hewett and Murray, 1993; Lamszus et al., 1999; Jinga et al., 2000). თუმცა პირველადი უჯრედული კულტურების გამოყენებას აქვს მრავალი ნაკლი, როგორიცაა მაგ. სიცოცხლის უნარის პროგრესული კარგვა, ენდოთელური მარკერების შეცვლილი ექსპრესია და სხვა. ამიტომაც არის განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი უჯრედების კულტივირების პროცესში ყველა ამ ნაკლის გათვალისწინება. ჩატარებულ იქნა კვლევები, რომელთა ფარგლებში ერთმანეთს შეადარეს სხვადასხვა ენდოთელური კულტურები (Hewett and Murray, 1993; Lamszus et al., 1999, Springhorn JP. 1995, Van Leeuwen EB. 2000, Müller AM. 1999, Boyer M. 2000, Hewett PW. 1993). განსაკუთრებით საინტერესოა მონაცემები უნგერის კვლევისა (Ronald E.Unger, 2002). შემდეგი ენდოთელური უჯრედები გამოიკვლიეს: HMEC-1, HUVEC, HFMEC, EAhy926, ECV 304, EVLC2, HAEND, HPMEC-STI6R, ISO-HAS-1. მათგან მხოლოდ კულტურებმა EAhy926, HMEC-1, HPMEC-STI6R, ISO-HAS-1 საუკეთესოდ დაადასტურეს პირველადი ენდოთელური უჯრედული ფენოტიპი.

ამ ნაშრომში გამოყენებულ იქნა HMEC-1 ენდოთელური უჯრედების კულტურა. HMEC-უჯრედები წარმოადგენენ იმორტალიზებულ ენდოთელურ უჯრედებს. უჯრედები კულტურაში იმყოფებიან უკვე აქტივირებულ, ანთებით მდგომარეობაში. ენდოთელური უჯრედების ტიპის განსაზღვრის საკმაოდ ფართოდ გამოყენებული კრიტერიუმი არის ადჰეზიური მოლეკულების (ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin) და ციტოკინების ექსპრესია. როდესაც ადგილი აქვს უჯრედების პროინფლამატორული სტიმულებით სტიმულირებას ენდოთელური უჯრედების პასუხი ისეთივეა როგორც *in vivo* აღმოცენებული. უჯრედის ადჰეზიური პროტეინების ექსპრესიის მდგომარეობის ცვლილება არის უმნიშვნელოვანესი და კრიტიკული ანთების კერებში ლეიკოციტების მიზიდვის პროცესში, ლეიკოციტების ადჰეზიისათვის და მათი ტრანსენდოთელური მიგრაციისათვის (Madri et al. 1996). HMEC-1 უჯრედული კულტურა არის ენდოთელური უჯრედების კულტურა, რომელიც სტიმულაციის შემდეგ ციტოკინებისა და ადჰეზიური პროტეინების ექსპრესიის მატებას ასახავს (Ronald E. Unger, 2002, Davies M.J. 1993, Li H. 1993, die Arbeit von K.Moritz 2004, Edwin W. Ades 1992).

სწორედ ამიტომ ჩვენი კვლევებისათვის შევარჩიეთ ზემოთაღწერილი ენდოთელური უჯრედული კულტურა.

## 2.2.2. უჯრედების კულტივირება

HMEC-1 უჯრედული კულტურის კულტივირება ხდებოდა უჯრედული კულტურის სინჯარებში. სინჯარების ფსკერზე ადჰერირებული უჯრედები 37°C და 5% CO<sub>2</sub> პირობებში ქმნიან ერთიან ფენას ე.წ. „Monolayer“. სხვადასხვა უჯრედები ავლენენ ზრდის სხვადასხვა თვისებებს. უჯრედების კულტივირებისათვის აუცილებელია მათი ცოდნა და უჯრედებისათვის შესაბამისი საარსებო პირობების შექმნა. სხვადასხვა უჯრედული კულტურისთვის არსებობს უამრავი სხვადასხვა სინთეზური თხევადი გარემო ე.წ. „Medium“. HMEC-1 უჯრედების კულტივირებას ვახდენდით MCB131 მედიუმში. მედიუმის გამოცვლა მიმდინარეობდა ყოველკვირეულად. მედიუმი უჯრედის კულტურის სინჯარაში ფარავდა თვით უჯრედულ კულტურას. უჯრედების საკვები ნივთიერებები მედიუმიდან თანდათან იხარჯება. უჯრედებს სჭირდებათ სისტემატიური მოვლა, სხვა შემთხვევაში არსებობს საშიშროება, რომ ისინი ზედმეტად გაიზრდებიან, რაც ხელს შეუშლის ექსპერიმენტული პირობების შექმნას.

ვახდენდით მედიუმის ამოღებას, უჯრედების რეცხვას ერთხელ PBS და მათზე ტრიფსინის დამატებას Trypsin/EDTA, რათა უჯრედების ფსკერიდან მოცილების პროცესი დაწყებულიყო. პროტეაზა ტრიფსინი ახდენს უჯრედების შრის ნაწილობრივ რღვევას, რაც ახდენს სინჯარის ზედაპირსა და უჯრედის მემბრანას შორის ურთიერთკავშირის გაწყვეტას და უჯრედები სინჯარის ზედაპირს უვნებლად სცილდება. PBS-ით უჯრედების გარეცხვა აუცილებელია, რათა მედიუმში არსებული FCS ჩამოირეცხოს, რადგან მას ენზიმის ინაქტივაცია შეუძლია. 3-5 წუთში ტრიფსინი 37°C-ზე სინჯარის ფსკერიდან განაცალკევებდა თითქმის ყველა უჯრედს. HMEC-1 –ზე მედიუმის დამატებით ტრიფსინი ნეიტრალდებოდა და მთლიანი უჯრედული ხსნარიდან მხოლოდ 1/10 რჩებოდა სინჯარაში შემდგომი კულტივირებისათვის. უჯრედული კულტურის სინჯარა HMEC-1 მედიუმით გარკვეულ მოცულობამდე ივსებოდა და შემდგომი კულტივირებისათვის ინკუბატორში ინახებოდა.

## უჯრედული კულტურის მედიუმი

### *HMEC-1 უჯრედული კულტურის მედიუმი:*

- **MCDB 131(1x) L-გლუტამინი 500ml** Gibco, Art.Nr.10372-019
- **50ml FCS (10%)** PAA, Gold, A15-649
- **250µl EGF (ეპიდერმალური ზრდის ფაქტორი, 5µg/500ml)** BD, Art.Nr354052
- **25ml L-გლუტამინი 200mM, 5mM/500ml** Gibco, 25030-024
- **5ml ანტიბიოტიკი/ანტიმიკოზური ხსნარი, 100x (1%)** Sigma, A-5955

### *მედიუმი 2% FCS -ით HMEC-1-თვის*

### *უჯრედული კულტურა:*

- **MCDB 131(1x) L-გლუტამინის გარეშე 500ml** Gibco, Art.Nr.10372-019
- **2% FCS, Hi** PAA, Gold, A15-649
- **250µl EGF (ეპიდერმალური ზრდის ფაქტორი, 5µg/500ml)** BD, Art.Nr354052
- **ჰიდროკორტიზონი 1µg/500ml** Sigma, H-0888
- **L-გლუტამინი 200mM, 5mM/500ml** Gibco, 25030-024
- **ანტიბიოტიკი/ანტიმიკოზური ხსნარი, 100x (1%)** Sigma, A-5955

### *მედიუმი FCS -ის გარეშე HMEC-1 უჯრედული კულტურისათვის:*

- **MCDB 131(1x) L-გლუტამინის გარეშე 500ml** Gibco, Art.Nr.10372-019
- **250µl EGF (ეპიდერმალური ზრდის ფაქტორი, 5µg/500ml)** BD, Art.Nr354052
- **ჰიდროკორტიზონი 1µg/500ml** Sigma, H-0888

- L-გლუტამინი 200mM, 5mM/500ml Gibco, 25030-024
- ანტიბიოტიკი/ანტიმიკოზური სსნარი, 100x (1%) Sigma, A-5955

### უჯრედული კულტივირების მასალა

175 cm <sup>2</sup> უჯრედული კულტურის სინჯარა	Nuclon Surface, NUNC GmbH, Wiesbaden, 175 cm <sup>2</sup> culture area #178883
25cm <sup>2</sup> უჯრედული კულტურის სინჯარა	Nuclon Surface, NUNC GmbH, Wiesbaden, 25cm <sup>2</sup> culture area #136196
PBS (Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> )	Dulbecco's PBS (Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> ), CELL CONCEPTS, Umkirch, Deutschland, #B-L0500-1
Trypsin/EDTA	BIO WHITTAKER, Belgien, #BE17-161E
უჯრედების ასაფხეკი 25cm	Corning BV, Schiphol-Rijk, 50002421

### 2.2.3. უჯრედების გამოლღობა და გაყინვა

ხანგრძლივი კვლევების შემთხვევაში შეუძლებელია მუშაობა უჯრედების კონსერვირების გარეშე, რათა კონტამინაციის შემთხვევაში შეგვეძლოს რეზერვების გამოყენება. გარდა ამისა ბევრი პასაჟის შემთხვევაში არსებობს საშიშროება, რომ მოხდეს უჯრედების დიფერენცირება. იმ შემთხვევაშიც კი თუ უჯრედებს მუდმივად არ ვიყენებთ შესაძლოა მათი დიდი ხნით სპეციალურ კრიოსინჯარაში შესაბამისი DMSO მედიუმით -80°C თხევად აზოტში გაყინვა. უჯრედების გასაღლობად კრიოსინჯარას ვათავსებდით 37°C წყლის აბაზანაში. როგორც კი უჯრედები გამოლღვებოდა მათ გადავიტანდით უჯრედების კულტურის სინჯარაში. ამ სინჯარაში მომზადებული იყო 24მლ თბილი ღვობის სპეციალური მედიუმი (ნორმალური HMEC-1 კულტურის მედიუმი სელექციის მდგომარეობის გარეშე და 20% FCS). უჯრედები ინკუბირდებოდნენ ინკუბატორში 24 საათის განმავლობაში. უჯრედისათვის საზიანო DMSO გასაყინი მედიუმის მოსაშორებლად, ძველი მედიუმი ჩანაცვლდებოდა ნორმალური უჯრედული კულტურის მედიუმით და უჯრედების კულტივირება გრძელდებოდა ჩვეულებრივ.

უჯრედების გასაყინად მათ გამოეყოფდით უჯრედული კულტურიდან და 8 წუთი 1000rpm დავაცენტრიფუგებდით. ნალექს 3მლ გასაყინ მედიუმში ვხსნიდით. უჯრედული კულტურის ყოველი 1 მლ-ს გადავანაწილებდით 3 კრიოსინჯარაში. სინჯარები ინახებოდა -80°C საყინულეში. 24 საათის შემდეგ კი უჯრედები ხანგრძლივი შენახვისათვის გადატანილ იყვნენ თხევად აზოტში.

<b>Cryo</b>	<b>გასაყინი</b>	<b>სინჯარა</b>	Greiner bio-one GmbH Frickenhausen, Deutschland, #126280
	<b>(კრიოსინჯარები)</b>		Cell Culture Freezing Medium, Gibco BRL, USA, #11101-011
	<b>გასაყინი მედიუმი</b>		Nalgene Cryo Freezing Container, #5100-0001

#### 2.2.4. HMEC-1 უჯრედების სტიმულაცია

HMEC-1 უჯრედები უნდა სტიმულირდებოდნენ ყოველი ცდის წინ 48 საათით ადრე 75cm<sup>2</sup> პლასტიკურ უჯრედული კულტურის სინჯარაში. უჯრედების სტიმულაცია შემდეგნაირად ხორციელდებოდა: როდესაც უჯრედები 80% სიმჭიდროვით გაიზრდებოდნენ ძველ მედიუმს გადავაქცევდით. შემდეგ უჯრედები PBS ირეცხებოდნენ მედიუმის ნარჩენების მოსაცილებლად. უჯრედები დაიფარებოდნენ 2%FCS მედიუმით ხოლო მათი სტიმულაციისათვის ვიყენებდით ორ სხვადასხვა სტიმულატორს (IL1 $\beta$  და TNF $\alpha$ ), სხვადასხვა სინჯარაში 166ng/ml IL1 $\beta$  და 100ng/ml TNF $\alpha$  ვუმატებდით. უჯრედები 2 საათის განმავლობაში ინკუბატორში 37°C ინკუბირდებოდნენ. ამ დროის შემდეგ ძველ მედიუმს ვაცილებდით. უჯრედებს ვრეცხავდით PBS-ში და თუ მათი შემდგომი CD7/VCAM-1-ტრანსფექცია გვსურდა მათ დაეფარავდით მედიუმით FCS გარეშე და დავამატებდით CD7/VCAM-1. სხვა შემთხვევაში უჯრედული კულტურის სინჯარები ივსებოდა 2% FCS შემცველი მედიუმით და ინკუბირდებოდა. FACS-ში ან გამდინარე კამერაში გამოკვლევისათვის HMEC-1 უჯრედებს სჭირდებოდათ 48 საათში შესაბამისი დამუშავება.

<b>IL1<math>\beta</math></b>	R&D System GmbH, Wiesbaden, #201-LB-005
------------------------------	--

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Sigma, T6674 -10UG
-------------------------------	--------------------



## 2.2.5. HMEC-1 უჯრედების ტრანსფექცია

ტრანსფიცირებულ იქნენ როგორც ციტოკინებით სტიმულირებული ასევე არასტიმულირებული HMEC-1 უჯრედები. ტრანსფექცია ტარდებოდა სტიმულაციიდან 2 საათის შემდეგ (სტიმულაცია 2 საათის განმავლობაში 2% FCS სტიმულატორების შემცველი მედიუმით) პირველ რიგში უჯრედები განთავისუფლებოდნენ ძველი მედიუმისა და ნარჩენებისაგან, გაირეცხებოდნენ PBS და დაიფარებოდნენ FCS შემცველი მედიუმით. ამ დროისათვის ხორციელდებოდა ენდოთელური უჯრედების ტრანსფექცია CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის საშუალებით. CD7/VCAM-1 კონსტრუქტი ემატებოდა HMEC-1 უჯრედული კულტურის მედიუმს FCS-ის გარეშე. როგორც დადებითი კონტროლი პარალელურად ტარდებოდა ენდოთელური უჯრედების GFP-ადენოვირალური ვექტორით ტრანსფექცია. 2 საათის განმავლობაში ინკუბირდებოდნენ ტრანსფიცირებული და არატრანსფიცირებული ასევე სტიმულირებული და არასტიმულირებული უჯრედები 37°C ინკუბატორში. მოგვიანებით ძველი მედიუმი მოცილდებოდა და PBS-ით რეცხვის შემდეგ 2% FCS შემცველი მედიუმით დაიფარებოდნენ და ინკუბატორში შეინახებოდნენ. შემდგომი FACS / Flow Chamber-გამოკვლევებისათვის უჯრედები შესაბამისად მუშავდებოდნენ.

**pR274 (CD7/VCAM1)**

CD7/VCAM1 Adenoviren,  $2,1 \cdot 10^9$  PFU/ml,  
Procorde GmbH, Martinsried, Deutschland

**pR658 (GFP)**

GFP, Adenoviren  $1,0 \cdot 10^{10}$  PFU/ml,  
Procorde GmbH, Martinsried, Deutschland

## 2.3. გამდინარე ციტომეტრია (FACS)

### 2.3.1. ზოგადი მომხილვა

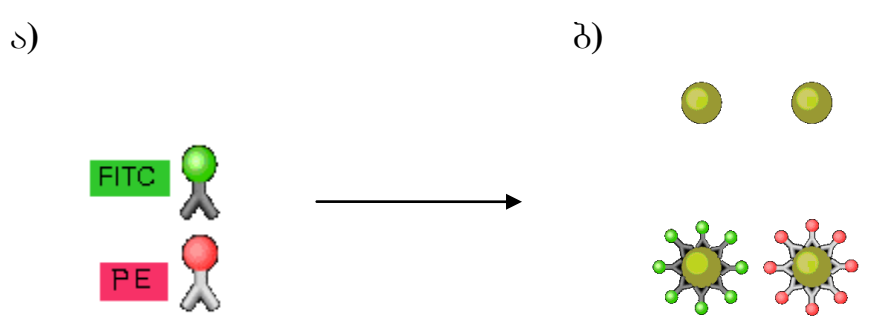
გამდინარე ციტომეტრია იგივე FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) არის ზედაპირული მოლეკულებისა და ინტრაცელულური პროტეინების რაოდენობრივი და ხარისხობრივი შეფასების მეთოდი. უჯრედების იდენტიფიცირება იმ ანტიგენების საწინააღმდეგო ანტისხეულების საშუალებით, რომლებსაც ეს უჯრედები აექსპრესირებენ ცნობილია იმუნოფენოტიპირების სახელით. ამ გამოკვლევის საფუძველი ანტიგენ-ანტისხეულის რეაქციაა, რომელიც ხორციელდება ფლუორესცენციის მქონე ნივთიერებით მარკირებული ანტისხეულების საშუალებით. ეს ანტიგენები რეალურად მემბრანის ფუნქციური პროტეინებია, რომლებიც უჯრედულ კომუნიკაციაში, ადჰეზიასა ან მეტაბოლიზმში მონაწილეობენ. გამდინარე ციტომეტრიას როგორც გამოკვლევის მეთოდს ფართოდ მიმართავენ როგორც ფინდამენტურ კვლევებში ასევე კლინიკურ დიაგნოსტიკაში.

გამდინარე ციტომეტრიის ძირითადი პრინციპები	
<b>თხევადი ტექნიკა</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ უჯრედები წარმოდგენილია თხევადი ხსნარის სახით</li> <li>▪ უჯრედები მიედინება ერთმანეთის მიმდევრობით...</li> </ul>
<b>ოპტიკა</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ილუმინირებული სივრცის გავლით ისე, რომ ...</li> <li>▪ განაბნევენ სინათლეს და იმიტირებენ ფლუორესცენციას</li> </ul> <p>ხდება ორივეს შეგროვება, გაფილტვრა და ...</p>
<b>ელექტრონიკა</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ დიგიტალურ მაჩვენებლებად გარდაქმნა ...</li> <li>▪ რომლებიც დამახსოვრებულ იქნება კომპიუტერში</li> </ul>

ცხრილი 6: გამდინარე ციტომეტრიული კვლევის პრინციპები რობინსონის მიხედვით (J.P. Robinson).

ამ ტექნიკით იკვლევენ უჯრედის ან სხვა ნაწილაკების თვისებებს მაშინ, როცა უჯრედები ერთიმეორეს მიყოლებით საზომ კამერაში გაედინება. აუცილებელი პირობაა, რომ უჯრედები ხსნარში განცალკევებულად იყვნენ წარმოდგენილი. შედეგები ეფუძნება თითოეული უჯრედის მრავალი ფიზიკური და ბიოქიმიური პარამეტრის ერთდროულ შეფასებას. იზომება შემდეგი მაჩვენებლები: უჯრედის ზომა (Forward Scatter-FSC), გრანულარობა იგივე უჯრედის შიდა სტრუქტურა (Side Scatter- SSC) და ფლუორესცენციის ინტენსივობა (FL1, FL2, FL3 und FL4).

გამოსაკლვევი უჯრედები გადინების დროს გვერდიდან ლაზერით სხივდება. სანამ ლაზერის სხივი შეუფერხებლად გაივლის ანუ მას წინააღმდეგობა არ ხვდება (მაგ.უჯრედის სახით), გაბნეული სინათლე არ აღმოცენდება. ხოლო როდესაც უჯრედი საპირისპიროდ სხივს გადალახავს სინათლე სხვადასხვა მიმართულებით გაიბნევა. ლაზერული სხივის წინა მიმართულებით გაბნეული სინათლე იძლევა ინფორმაციას უჯრედის სიდიდის შესახებ. ხოლო ლაზერული სხივიდან დაახლოებით 90° კუთხით აღმოცენებული გაბნეული სინათლე დამოკიდებულია როგორც უჯრედის ზომაზე, ასევე უჯრედის გრანულარობაზე. მეცნიერებსა და ექიმებს უზარმაზარ ინფორმაციას აწვდის თითოეული უჯრედისა და უჯრედული პოპულაციის შესახებ ანტისხეულებზე, უჯრედებზე, მიკროორგანიზმებსა და მიკროსკოპულ ნაწილაკებზე მცირე მოფლუორესცენციურ ნაწილაკების დაკავშირება. განსაკუთრებით ხშირად გამოიყენება FACS-ში ფლუოროქრომით მონიშნული ანტისხეულები.



სურათი 3 ა) ფლუოროქრომთან კონიუგირებული ანტისხეული ბ) ფლუოროქრომით კონიუგირებულ ანტისხეულთან შეკავშირებული უჯრედი

შესაბამისი ფლუოროქრომით მონიშნული ნაწილაკების სინათლის სხივთან კონტაქტისას აღმოცენდება სხვადასხვა ინტენსივობის ოპტიკური სიგნალები. გარკვეული სიგრძის სინათლის სხივის ემისია სპეციფიურია თითოეული ფლუოროქრომისათვის. ლაზერპულსის შემდეგ ელექტრონები კვლავ იყოფიან ენერგიის მოცილების ფონზე (ფოტონების ფორმით) თავიანთ საწყის დონემდე. ემიტირებული ფოტონების კონცენტრაცია, რომელიც ფოტოდეტექტორის მიერ რეგისტრირდება, მოქმედებს მიბმული ანტისხეულის/უჯრედის რაოდენობის პროპორციულად. FACS-გაზომვა ერთდროულად რამდენიმე სხვადასხვა ფლუორესცენც ნივთიერების საშუალებით შესაძლებელია, რადგან გამოყენებული ნივთიერებებიდან ფოტონების ემისია საერთო ტალღის სიგრძეს ავითარებს. თითოეულს აქვს კონკრეტული, განსხვავებული დამახასიათებელი ემისიის უნარი. თუ ცნობილია მოფლუორესცენცირე ნივთიერების ემისიური თვისებები, შესაძლოა ისეთი ფლუოროქრომების ამორჩევა, რომელიც ცალკეული გამდინარე ციტომეტრისათვის არის ოპტიმალურად განსაზღვრული.

**ფლუოროქრომები იმუნოფენოტიპირებისათვის:**

ფლუოროქრომი	სტიმულაციის პიკი (nm)	ემისიის პიკი (nm)	ლაზერული ტალღის სიგრძე (nm)
AMCA	345	440	334-364, 351-356
Alexa 350	350	445	334-364, 351-356
Marina blue	365	460	334-364, 351-356, 405, 407
Per-CP	490	670	488
FITC	495	520	488
PE-Cy5	565	670	488, 514
PE	565	575	488, 514, 568

<b>Alexa 594</b>	594	620	568
<b>APC-Cy7</b>	650	770	633, 635, 647
<b>Alexa 700</b>	700	720	633, 635, 647
<b>Pacific blue</b>	405	455	405, 407

**ცხრილი 7 (Shapiro HM.)**

FACS-გამოკვლევებისათვის ამ ნაშრომში გამოყენებულ იქნა შემდეგი ორი ფლუოროქრომი:

**FITC** – Fluoresceinisothiocyanate ეკუთვნის ფლუორესცენცპროტეინებს, რომლებიც მაქსიმალურად 492 nm ავითარებენ. მისი ნაკლია სინათლის ზემოქმედებით მისი სწრაფი დაშლა და მისი შეზღუდული მოქმედება მუავე გარემოში. **PE** – R-Phycoerythrin ეკუთვნის ფიკობილიპროტეინების ოჯახს, რომლებიც მოიპოვება ციანობაქტერიებსა და ეუკარიოტულ მცენარეებში. მისი მოლეკულური მასაა 240 000Da და აბსორბციის მაქსიმუმია - 480, 546 და 565 nm, ხოლო არგონის ლაზერის გამოყენებით 488 nm. PE-კონიუგატებს აქვთ ძალიან მაღალი სენსიტივობა და არიან შედარებით ნაკლებ მგრძობიარენი pH-ისა და იონური მოცულობის მიმართ (Haugland RP 2002. Shapiro HM. 2003).

სინათლის სიგნალის ინტენსივობა თითოეული პარამეტრისათვის გარდაიქმნება ელექტრონულ სიგნალად. გამდინარე ციტომეტრის ოპტიკურ და ელექტრულ სისტემებში ყველა სიგნალი შეგროვდება და ანალიზირდება. შედეგებია არჩევისამებრ ჰისტოგრამა, ე.წ. Dot Plot, Contour Plot და სხვა.

ამ ნაშრომში გამოყენებული იქნა გამდინარე ციტომეტრი FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) სინათლის წყაროს სახით ლაზერმა ყველაზე ფართო გამოყენება ჰპოვა გამდინარე ციტომეტრიაში. დანადგარი შეიცავს არგონის ლაზერს ემისიური ხაზით 488 nm.

წინარე კვლევებში ჩატარდა აპარატის ძირითადი პარამეტრების ენდოთელური უჯრედების გასაზომ მონაცემებზე (უჯრედის ზომის, გრანულარობის, ფლუორესცენციის ინტენსივობის) ანალიზისათვის მორგება. Dot Plot-ებზე ყოველი გაზომვისას ამონარჩევ უჯრედულ პოპულაციას მოერგომ ე.წ. „Gate“ (იგივე გაზომვის ფანჯარა) რათა მონიშნული უჯრედული პოპულაციის შეფასება განხორციელდებოდა. აგრეთვე დადებული უჯრედების და უჯრედული

ნაწილაკების შემოსაფარგლად დაედო შემომფარგლავი ფანჯარა, რათა უფრო მკაფიოდ განსაზღვრულიყო ენდოთელური უჯრედების პოპულაცია. თითოეულ გაზომვაზე  $1 \times 10^4$  უჯრედის მონაცემების ჩაწერა მოხდა პირდაპირ შეერთებული კამერისა და კომპიუტერული პროგრამების საშუალებით. მონაცემთა გასაანალიზებლად გამოყენებულ იქნა სპეციალური პროგრამა Softwareprogramm CellQuestPro, Becton Dickinson.

### 2.3.2. უჯრედების მომზადება რეცეპტორების ექსპრესიის შესაფასებლად FACS-ში

FACS-ექსპერიმენტებისათვის შემდეგი HMEC-1 უჯრედები მომზადდა: HMEC-1 უჯრედები სტიმულაციისა და ტრანსფექციის გარეშე, HMEC-1 უჯრედები IL1 $\beta$  სტიმულაციით, HMEC-1 უჯრედები TNF $\alpha$  სტიმულაციით და CD7/VCAM-1 ვექტორით ტრანსფიცირებული HMEC-1 უჯრედები. HMEC-1 უჯრედების სტიმულაცია (IL1 $\beta$ - და TNF $\alpha$ -სტიმულატორების გამოყენებით) განხორციელდა ზემოთ აღწერილი მეთოდის თანახმად (იხილეთ 2.2.4.). HMEC-1 უჯრედების ტრანსფექცია დეტალურად განხილული იქნა 2.2.5. თავში. ყველა უჯრედული კულტურის შემცველი რეზერვუარი FACS-გამოკვლევამდე 48 საათის განმავლობაში ინკუბატორში იმყოფებოდა 37°C პირობებში. ენდოთელური უჯრედები მსგავს ფიზიკალურ და ქიმიურ პირობებში უნდა კულტივირებულიყვნენ რათა სტიმულაციისა და ტრანსფექციის ეფექტის შეფასება ყოფილიყო შესაძლებელი. ტრანსფექციისათვის განკუთვნილი უჯრედული კულტურის შემთხვევაში გამოყენებულ იქნა CD7/VCAM-1 და GFP ადენოვირალური ვექტორები. გარდა ამისა მხოლოდ გამდინარე ციტომერიულ კვლევებში იქნა შეფასებული CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის სხვადასხვა კონცენტრაციით უჯრედული კულტურის ტრანსფექციის ეფექტი, კერძოდ კი 0.003 $\mu$ l/ml, 0.016 $\mu$ l/ml, 0.03 $\mu$ l/ml, 0.1 $\mu$ l/ml, 0.16 $\mu$ l/ml, 0.33 $\mu$ l/ml ხსნადი პროტეინის გამოყენებით. ამით შესაძლო გახდა ისეთი ხსნადი პროტეინის კონცენტრაცია შეგვერჩია, რომელიც VCAM1 ექსპრესიაზე ყველაზე ძლიერ ზემოქმედებას მოახდენდა. FACS-ში ექსპრესიის შეფასებამდე უჯრედები ერხელ PBS გაირეცხა. ყველა უჯრედის (სტიმულირებულის, არასტიმულირებულის, ტრანსფიცირებულის, არატრანსფიცირებულის) რეზერვუარის ფსკერიდან მოსაცილებლად უჯრედები Trypsin/EDTA დამუშავდა. 3-5 წუთში ტრიფსინის ზემოქმედებით 37°C ინკუბატორში ფსკერს მოცილდა ყველა უჯრედი. 2 % FCS –ის

შემცველი HMEC-1 მედიუმით ტრიფსინი ინაქტივირდა. ასეთნაირად მივიღეთ შემდეგი HMEC-1 უჯრედები: HMEC-1 უჯრედები სტიმულაციისა და ტრანსფექციის გარეშე, HMEC-1 უჯრედები IL1 $\beta$  სტიმულაციით, HMEC-1 უჯრედები TNF $\alpha$  სტიმულაციით და HMEC-1 უჯრედები CD7/VCAM-1 ადენოვირალური ვექტორის ტრანსფექციით და HMEC-1 უჯრედები GFP ტრანსფექციით.

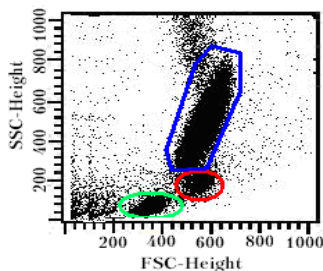
<b>უჯრედული კულტურის სინჯარა</b>	Nunclon Surface, NUNC GmbH, Wiesbaden, 175 cm <sup>2</sup> culture area #178883
<b>PBS (Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>)</b>	Dulbecco's PBS (Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> ), CELL CONCEPTS, Umkirch, Deutschland, #B-L0500-1
<b>pR274 (CD7/VCAM-1)</b>	CD7/VCAM-1 Adenoviren, 2,1*10 <sup>9</sup> PFU/ml, Procorde GmbH, Martinsried, Deutschland
<b>0% მედიუმი HMEC-1 უჯრედული კულტურისთვის:</b>	Siehe 2.2.2.
<b>2% მედიუმი HMEC-1 უჯრედული კულტურისთვის:</b>	Siehe 2.2.2.
<b>მედიუმი HMEC-1 უჯრედული კულტურისთვის:</b>	Siehe 2.2.2.
<b>Trypsin/EDTA</b>	Siehe 2.2.2.
<b>IL1<math>\beta</math></b>	R&D System GmbH, Wiesbaden, #201-LB-005
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Sigma, T6674-10UG

### 2.3.3. FACS-ში ექსპრესიის შეფასება

უჯრედები რეზერვუარის ფსკერიდან მოცილების შემდეგ გადატანილ იქნენ 15მლ-იან სინჯარებში და 10 წუთის განმავლობაში 1000 rpm დავაცენტრიფუგეთ. ნალექი PBS საშუალებით იქნა გადაყვანილი თხევად მდგომარეობაში და უჯრედული კონცენტრაცია გამოთვლილ იქნა 1მლ/მლ იქნა დაყენებული. ამ უჯრედული სუსპენზიიდან 50მკლ გადატანილ იქნა FACS –სინჯარებში, დაემატა თითოეულს 5მკლ ანტისხეული და ოთახის ტემპერატურაზე ინკუბირდა 15 წთ-ის განმავლობაში, სიბნელეში, ვინაიდან სინათლის ზემოქმედებით FITC ფლუოროქრომი იშლება. გამოყენებულ ანტისხეულებთან ერთად ყოველთვის მზადდებოდა იზოტიპ-კონტროლი. ანტისხეულებს კი წარმოადგენდნენ:

- ანტი -CD106 PE კონიუგირებული ანტისხეული
- ანტი-CD7 FITC კონიუგირებული ანტისხეული
- IgG1 FITC კონიუგირებული ანტისხეული
- IgG1 PE კონიუგირებული ანტისხეული

HMEC-1 უჯრედების ფლუოროქრომ-კონიუგირებულ ანტისხეულებთან ინკუბაციის შემდეგ საბოლოოდ ემატებოდა 500მკლ 10x CellFix, 1:10 ddH<sub>2</sub>O-ით განზავებული. მხოლოდ ამ პროცედურის გავლის შემდეგ იყო შესაძლებელი, რომ მოგვეხდინა ფიქსირებული უჯრედების გამდინარე ციტომეტრში გამოკვლევა.



სურათი 4

Dot Plot-ზე ლეიკოციტების

ვიზუალიზაცია:

X ღერძის პარამეტრი – წინა გაბნეული სინათლე (FSC)

Y - ღერძის პარამეტრი – გვერდით გაბნეული სინათლე (SSC)

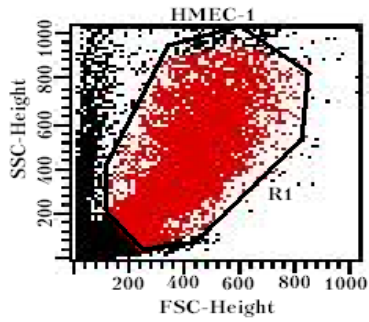
ლეიკოციტარული უჯრედები

შემდეგნაირადაა წარმოდგენილი: მწვანე

– ლიმფოციტები, წითელი – მონოციტები,

ლურჯი – გრანულოციტები.





სურათი 5

HMEC-1 უჯრედები გამდინარე ციტომეტრიაში

**FACS-დანადგარი**

Becton Dickinson FACSCalibur,  
Heidelberg, Deutschland

**ციტომეტრის სითხე**

FACS Flow™ Becton Dickinson,  
Heidelberg, Deutschland

**FACSSafe**

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

**FACSRinse**

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

**10x CellFIX™ Fixationslösung**

BD Biosciences, Erembodegem, Belgien,  
#340181

**FACS-სინჯარა**

BD Falcon, BD Bioscience, Bedford, USA,  
#352054

**სინჯარა 15ml**

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,  
#188271

**anti-CD7 ანტისხეული**

(N-19) Santa Cruz Biotechnology, #sc-6992

**anti-CD106 ანტისხეული**

BD Pharmingen, #555645

**IgG1-FITC/ Iso FITC**

Beckman Coulter-Immunotech, Krefeld,  
Deutschland, #IM0639

**IgG1-PE/ Iso PE**

Beckman Coulter-Immunotech,  
Marseille/Frankreich, #IM0670

## 2.4. ადამიანის სისხლზე ჩატარებული გამოკვლევები

### 2.4.1. სისხლის აღება

სისხლი მიღებული იყო ვენური პუნქციის გზით მოზრდილი მოხალისეებისაგან, რომლებიც არავითარ მედიკამენტს არ ღებულობდნენ. გამოყენებული იყო ნემსი 21 Gauge Butterfly, ხოლო ანტიკოაგულაცია ჩატარებული იყო ნატრიუმის ციტრატით.

**Butterfly®**

Butterfly® - 21, Abbott, Sligo, Ireland,  
#4492A05

**ადაპტორი**

Multi-Adapter, SARSTEDT, Nümbrecht,  
Deutschland, #14.1205

**Softasept**

N Farblos 250ml (20) 00008180B. Braun  
Melsungen AG. Melsungen

**ნატრიუმ-ციტრატის სინჯარა**

**S - სინჯარა 5ml**

Sarstedt, Nümbrecht, #05.1071

**S - სინჯარა 10ml**

Sarstedt, Nümbrecht, #21067001

### 2.4.2. სისხლიდან მონოციტების იზოლაცია

აღებული სისხლი განზავდა PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) 1:2 50მლ სინჯარაში მოთავსდა 15მლ Ficoll და მასზე ფრთხილად დაეფინა 20მლ განზავებული სითხე. შემდეგი ნაბიჯი იყო 20 წთ ოთახის ტემპერატურაზე 3000 ბრუნზე წუთში დაცენტრიფუგირება მუხრუჭის გარეშე. სიმკვრივის გრადიენტი ფიკოლი გამოყოფს მონონუკლეარულ უჯრედებს განზავებული სისხლიდან. ასეთნაირად მიიღება სამი ფაზა: პლაზმის შრე, ლიმფოციტ/მონოციტური შრე, თვით ფიკოლის შრე და ერითროციტ/გრანულოციტების შრე. შუა შრე გადმოტანილი იყო ფრთხილად შესაბამის სინჯარაში. ასეთნაირად მონონუკლეარული უჯრედების შრე იზოლირდა სხვა დანარჩენი შრეებისგან.



**ცენტრიფუგირებამდე და ცენტრიფუგირების შემდეგ**

**სურათი 6 მონოციტების იზოლირება ფიკოლის გამოყენებით**

გამოყოფილი მონონუკლეარების შრე განზავდებოდა ამავე რაოდენობის PBS-ში და კიდევ ერთხელ ცენტრიფუგირდებოდა 3000 ბრუნზე წუთში 20 წუთის განმავლობაში. უჯრედები ფსკერზე ნალექის სახით გროვდებოდა. ნალექი განზავდებოდა 5მლ PBS-ით და 10 წუთი კვლავ დაცენტრიფუგირდებოდა 1000 ბრუნზე წუთში. ამასობაში მზადდებოდა სპეციალური ბუფერი ე.წ. "Tyrode-Puffer". ნალექი განზავდებოდა 5მლ თიროდის ბუფერში. შემდეგ უჯრედები 175სმ<sup>2</sup> უჯრედული კულტურის რეზერვუარით კულტურაში გადაიტანებოდა და 25მლ 37°C თბილი მონოციტების მედიუმით დაიფარებოდა. ისინი ინახებოდა ინკუბატორში 37°C ორი საათის განმავლობაში. ამ პერიოდში უპირატესად მონოციტები ადჰერირდებოდნენ რეზერვუარის ზედაპირზე, ლიმფოციტების კი მხოლოდ მცირე ნაწილი. მედიუმის გამოცვლის შემდეგ ხორციელდებოდა კიდევ ერთი რეცხვა 15მლ PBS გამოყენებით და ახალი მედიუმის დამატების შემდეგ უჯრედები მთელი დამის განმავლობაში ინკუბატორში რჩებოდნენ ინკუბაციისათვის. იზოლაციის პროცესი საბოლოოდ იძლეოდა მონოციტების 90%, ხოლო დანარჩენი ლეიკოციტები ანალიზიდან ეთიშებოდა მათი ანტისხეულით მონიშვნის საშუალებით.

<b>PBS (Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>)</b>	Dulbecco's PBS (Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> ), CELL CONCEPTS, Umkirch, Deutschland, #B-L0500-1
<b>უჯრედული კულტურის სინჯარა</b>	Nuclon Surface, NUNC GmbH, Wiesbaden, 175 cm <sup>2</sup> culture area #178883
<b>სინჯარა 50ml</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, #227261
<b>სინჯარა 15ml</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, #188271
<b>Ficoll- Biocoll საიზოლაციო ხსნარი</b>	Biochrom, Berlin, Deutschland, #16115
<b>ცენტრიფუგა</b>	Heraeus, ID Nr-20057820, #4500272390
<b>სეროლოგიური პიპეტები 25ml, 10ml, 5ml</b>	Schuber&Weiss GmbH, München, #357551, #357525, #357543

*მონოციტების მედიუმი:*

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| • <b>500ml RPMI 1640</b>                 | BIO WHITTAKER, Belgien, #BE12-115F |
| • <b>50ml FCS</b>                        | BIO WHITTAKER, Belgien, #DE14-801F |
| • <b>5ml</b><br>პენიცილინი/სტრეპტომიცინი | BIO WHITTAKER, Belgien, #DE17-602E |
| • <b>5ml L-გლუტამინი</b>                 | BIO WHITTAKER, Belgien, #BE17-605E |

*თიროდის ბუფერი:*

*საბაზისო ხსნარი (10x):*

**1.5M NaCl**  
**25mM KCl**

1 ლიტრი დესტილირებული წყალი და დგებოდა pH 7,4

120mM NaHCO<sub>3</sub>

ცდებისთვის ყოველთვის ახალი

მზადდებოდა:

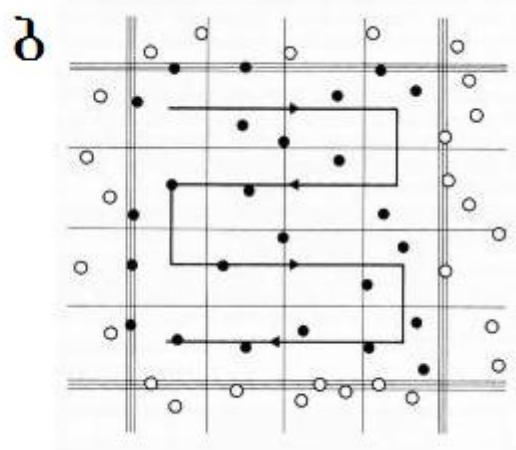
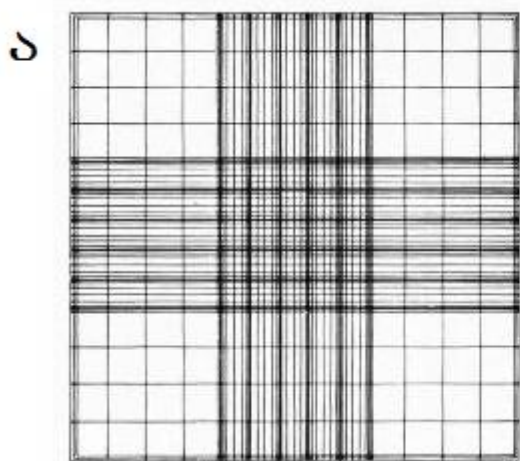
- 25ml 10x Tyrode
- 0.5ml 1M CaCl<sub>2</sub>
- 0.5ml 1M MgCl<sub>2</sub>
- 0.25g BSA
- 0.25g Glucose
- 223.5ml დესტილირებული წყალი

### 2.4.3. უჯრედების დათვლა

ყოველი გამოკვლევისათვის უჯრედების კონცენტრაციას განვსაზღვრავდით და გამოვითვლიდით ერთიდაიმავე უჯრედულ რაოდენობაზე: მონოციტები 10<sup>6</sup> უჯრედი/მლ, HMEC-1 უჯრედები (FACS-ისთვის) 10<sup>6</sup> უჯრედი/მლ. ამისათვის უჯრედები შესაბამისად განზავდებოდა 10მლ PBS. 10მკლ მონოციტების სუსპენზიას ვათავსებდით უჯრედების სათვლელი კამერის შუშის ქვეშ და ოთხ დიდ უჯრედში მათ რაოდენობას ვითვლიდით. გამოითვლებოდა უჯრედების საშუალო მაჩვენებელი.

*უჯრედების საერთო რაოდენობა = უჯრედების საშუალო რაოდენობა X  
10 000 X განზავების ფაქტორზე (მაგ. 10მლ)*

საბოლოოდ კამერა მუშავდებოდა EtOH და წყლით.



სურათი 7 ა)-ნოიბაუერის სათვლელი კამერის ქსელი ბ)-უჯრედების დათვლა (შავი) სათვლელი კამერის ერთ დიდ კვადრატში. (Lindl: Zell- und Gewebekultur (4.Auflage)

უჯრედული კამერა

Neubauer-Zählkammer SIGMA-ALDRICH  
GmbH, Steinheim, Deutschland, #Z  
35,962-9

PBS ( $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ )

იხილეთ 2.2.2.

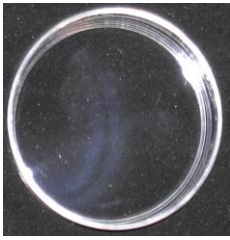
## 2.5. დინამიური ადჰეზიური ცდები

### 2.5.1. გამდინარე კამერის მეთოდის (Flow Chamber Method) ზოგადი მიმოხილვა

არსებობს გამოკვლევის მეთოდი, რომლის თანახმადაც მიკროსკოპული გამდინარე კამერის გამოყენებით სხვადასხვა უჯრედის (პოლიმორფულნუკლეარული ლეიკოციტების, თრომბოციტების, სიმსივნური უჯრედების და სხვა) ადჰეზიური მოქმედება შესაძლოა შესწავლილ იქნეს კვლევის ადჰეზიურ დინამიურ მოდელში და წინასწარ განსაზღვრული დინების სიჩქარის გამოყენებით. ეს არის ე.წ. გამდინარე კამერაში უჯრედული მექანიკის კვლევის მეთოდი. ამ მეთოდის დახმარებით შესაძლოა განხორციელდეს სისხლძარღვის პირობების იმიტაცია (Piali et al. 1998). სტატიურ ადჰეზიურ ცდებს არ ძალუძს რეცეპტორ-ლიგანდის ურთიერთქმედების სრულყოფილად ასახვა, რადგან უჯრედების გადაადგილება და უჯრედების ადჰეზია ფიზიოლოგიურ პირობებში მუდმივი დინების ფონზე მიმდინარეობს. გამდინარე კამერის კვლევის მეთოდი უჯრედ-უჯრედისა ან უჯრედ-სუბსტრატის ადჰეზიის ცალკეული ეტაპის ვიზუალიზაციის საშუალებას იძლევა. (Lawrence, M.B., 1987; Patton, J.T., 1993; Jones, D.A., 1993).

გამდინარე კამერის პრინციპი იმაში მდგომარეობს, რომ უჯრედები სპეციალური გარსით დაფარულ ზედაპირზე წინასწარ შერჩეული დინების სიჩქარით დახურულ სისტემაში მიედინებიან. სიჩქარე, რომლითაც ცალკეული უჯრედი კამერაში გადაადგილდება განისაზღვრება პროგრამირებადი ტუმბოს საშუალებით.

გამდინარე კამერის სისტემა შემდეგი ნაწილებისაგან შედგება:



სურათი 8

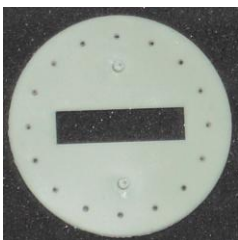
**ლანგარი** – გამდინარე კამერის ქვედა ნაწილი. მისი ზედაპირი იფარება სპეციალური ფენით. ყოველი ცდის შემდეგ ეს ლანგარი იცვლება და იგი წარმოადგენს რეალურ დაკვირვების ზედაპირს კვლევის დროს.



სურათი 9

**ცილინდრი** – გამდინარე კამერის ზედა ნაწილი

ცილინდრზე მდებარეობენ მილების სისტემაზე მიერთების ადგილები. ერთმანეთის გვერდით მდებარე კავშირებით შეედინება კამერაში და გაედინება კამერიდან უჯრედების სუსპენზია. ცილინდრზე არსებული მესამე კავშირი არის ვაკუუმ ტუმბოს შეერთების ადგილი.



სურათი 10

**რეზინის რგოლი** – გამდინარე კამერის შუა ნაწილი

იგი მდებარეობს სინჯარასა და ცილინდრს შორის ცილინდრის ორ ჩაღრმავებაში. რეზინის რგოლი შესაბამის პოზიციაში ყენდება. ამის საშუალებით ორი პლასტიკური სინჯარა ერთმანეთისაგან გარკვეულ დისტანციაში პოზიციონირებს. სწორედ იქ სადაც რეზინის ზედაპირი ამოჭრილია თავსდება კამერა.



სურათი 11

**მაპროგრამებელი ტუმბო**

ამ დანადგარის საშუალებით შესაძლოა პროგრამა გარკვეულ დინების სიჩქარეზე დაყენდეს. ეს ფაქტორი იძლევა საშუალებას, რომ კამერაში გაიაროს წინასწარ ზუსტად განსაზღვრულმა სითხის რაოდენობამ წამში.



სურათი 12

**ვაკუუმის ტუმბო**

იგი განავითარებს საჭირო წნევას გამდინარე კამერის სიმჭიდროვისათვის



კამერას ვაფიქსირებდით ინვერსიულ მიკროსკოპზე და უჯრედების დინებას ვაკვირდებოდით 20 ჯერადი გადიდების ობიექტივით. მიკროსკოპზე დამაგრებული იყო კომპიუტერი მასზე მიერთებული დიგიტალური კამერით, რომლის საშუალებითაც ხდებოდა კადრების გადაღება და დამახსოვრება. გამდინარე ნაწილი შეერთებული იყო 50მლ შპრიცთან, რომელიც დაფიქსირებული იყო პროგრამირებად ტუმბოზე. ვაკუუმის ტუმბო მილით შეერთებული იყო კამერასთან, რითაც უზრუნველყოფდა სისტემის მთლიან ფიქსაციას. სისხლის ნაკადის ჰიდროდინამიკური პირობებისათვის მნიშვნელოვანი საზომია წანაცვლების სიჩქარე (shear rate) და წანაცვლების დაძაბულობა (shear stress). ისინი ასახავენ დინების მიმართულების სიჩქარეს სისხლძარღვის კედელთან სითხის დაშორებასთან დამოკიდებულებაში.

დინების სიჩქარე დამოკიდებულია ასევე კამერის გეომეტრიაზე და უჯრედის კამერის კედლიდან დაშორებაზე. გამდინარე მილის ცენტრში არის უმაღლესი სიჩქარე. რაც უფრო ახლოს მდებარეობს უჯრედი კედელთან მით უფრო კლებულობს წანაცვლების სიჩქარე. წანაცვლების სიჩქარე და წანაცვლების დაძაბულობა მნიშვნელოვანი ჰიდროდინამიკური სიდიდეებია. სიჩქარის პროფილის გამოთვლა გამდინარე კამერაში შემდეგი ფორმულის საშუალებითაა შესაძლებელი:

$$\tau w = \gamma \mu = 6\mu Q/a^2 b$$

$\tau w$  – წანაცვლების დაძაბულობა

$\gamma$  – წანაცვლების სიჩქარე (ლ/წმ)

$\mu$  - სიბლანტე

$a$  – გამდინარე კამერის სისქე

$b$  – გამდინარე კამერის სიგანე

$Q$  – დინების სიხშირე (მლ/წმ) დინების სიხშირეები, რომლებიც მაპროგრამებელ ტუმბოზე ყენდებოდა, ანგარიშდებოდა ამ ნაშრომში გამოყენებული ცილინდრის ზომით (სიმაღლე 0.0254სმ და სიგანე 0.5სმ) შემდეგნაირად:

$$15 \text{ dynes/cm}^2 = 6 \cdot (0,01) \cdot Q / (0,0254 \cdot 0,5) = 186 \cdot Q \quad Q = 15/186 = 0,08064 \text{ ml/sec} = 4,8387 \text{ ml/min}$$

$$1 \text{ dynes/cm}^2 = 6 \cdot (0,01) \cdot Q / (0,0254 \cdot 0,5) = 186 \cdot Q \quad Q = 1/186 = 0,005376 \text{ ml/sec} = 0,32268 \text{ ml/min}$$

$$0.5 \text{ dynes/cm}^2 = 6 \cdot (0.01) \cdot Q / 0.0254 \cdot 0.5 = 186 \cdot Q \quad Q = 0.5 / 186 = 0.00269 \text{ ml/sec} = 0.16129 \text{ ml/min}$$

გამდინარე კამერის კვლევებისათვის საჭირო მასალები

გამდინარე კამერა	CIRCULAR Parallel Plate Flow Chamber Kit, GLYCOTECH, Rockville, USA, #31-001
მაპროგრამებელი ტუმბო	PHD Programmable, HARVARD Apparatus, Holliston, USA, #70-2002
ვაკუუმტუმბო	Laboport Vacuum Pump, KNF NEUBERGER INC., Trenton, USA
დიგიტალური კამერა	AVT BC-11, AVT HORN, Aalen, Deutschland
კომპიუტერული პროგრამა	Let's Edit, Canopus Inc. Kobe, Japan.
PC და Hardware	MaxData PC
35mm ლანგარი	Cell Culture Dish 35mm x 10mm Style, CORNING INC., NY, USA, #430165
რეზინის რგოლი	Flow Chamber Gaskets, Channel Width 5.0mm / Gasket Thickness 0.010 inch, GLYCOTECH, Rockville, USA, #31-004
ცხიმოვანი საცხი	Exsikkatorenfett, Riedel-de Haem, SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #18405
50-ml-შპრიცი	Perfusor-Spritze OPS 50ml (B.Braun, Melsungen, #8728810F)

მიკროსკოპი

Inverses Mikroskop Axiovert 25, Okular 10x/20,  
Objektiv CP-Achromat 5x/0.12, ZEISS,  
Oberkochen, Deutschland

PBS  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$

იხილეთ 2.2.2.

## 2.5.2. HMEC-1 უჯრედების მომზადება გამდინარე კამერაში გამოსაკვლევად

HMEC-1 უჯრედული კულტურის კულტივირება განხორციელდა  $25\text{cm}^2$  უჯრედული კულტურის რეზერვუარში (იხილეთ 2.2.2.). ამის შემდეგ განხორციელდა უჯრედების სტიმულაცია  $\text{TNF}\alpha$  და  $\text{IL1}\beta$  (იხილეთ 2.2.4.) გამოყენებით და მათი ტრანსფექცია CD7/VCAM-1 კონსტრუქტით (იხილეთ 2.2.5.). ამ მოსამზადებელი ღონისძიებებიდან 48 საათში უჯრედები გადატანილ იქნენ  $35\text{mm}$  სინჯარებში, რომელთა ფსკერიდან ისინი 48 საათში მოცილებულ იქნენ ტრიფსინის გამოყენებით. ამის შემდეგ კულტურას დაემატა მედიუმი, რომელმაც 3-4 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ გაანეიტრალა ტრიფსინი და უჯრედული მასალა გადატანილ იქნა 2 სინჯარაში. სინჯარები, რომლებიც გამდინარე კამერის ფსკერს წარმოადგენენ და რომლებიც ენდოთელური უჯრედების ზედაპირს წარმოადგენენ გამდინარე კამერაში კვლევისათვის შემდეგნაირად მომზადდნენ. უჯრედებს დაახლოებით 2-5 წუთი სჭირდებოდათ სანამ ისინი სინჯარის პლასტიკურ ზედაპირზე კარგად ადჰერირდებოდნენ. ხოლო როდესაც ისინი კარგად ადჰერირებულ, მჭიდრო უჯრედულ ზედაპირს წარმოადგენდნენ შესაძლებელი იყო მათი გამოყენება გამდინარე კამერის ექსპერიმენტებისათვის. კვლევის დაწყებამდე სულ რამოდენიმე წუთით ადრე ენდოთელური უჯრედები გარეცხილ იქნენ PBS  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  საშუალებით და ანტი-CD106 და ანტი-CD54 ანტისხეულებით ჩაუტარდათ ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე 10 წუთის განმავლობაში. ამ ეტაპზე ენდოთელური უჯრედები უკვე მზად იყვნენ გამოკვლევისათვის.

ანტი-CD106

(Clone 51-10C9), Becton Dickinson (BD)

ანტი-CD54

(Clone 84H10), Beckman Coulter, Krefeld,  
Deutschland

### 2.5.3. მონოციტების სტიმულაცია, შედგება და მომზადება გამდინარე კამერაში გამოსაკვლევადად

მონოციტების იზოლაცია ხორცილედებოდა ფიკოლის საშუალებით როგორც ეს ზემოთ აღწერილ იქნა მონოციტების იზოლაციის ოქმში (2.4.2). იზოლირების პროცესის შედეგად მივიღეთ მონოციტების დაახლოებით 90% შემადგენლობა. ღამის განმავლობაში შესაბამისი მედიუმით ინკუბირებული უჯრედები მეორე დღის ექსპერიმენტებისათვის გამდინარე კამერაში კვლევისათვის მზად იყვნენ. ამისათვის უჯრედებს მოვაშორეთ მედიუმი, უჯრედები გაგრეცხეთ PBS. უჯრედული კულტურის რეზერვუარების ფსკერზე ადჰერირებული მონოციტები უჯრედების განსაცალკევებელი ინსტრუმენტით იქნენ განთავისუფლებულნი რეზერვუარის ზედაპირიდან. PBS კარგად გახსნილი უჯრედები გადატანილ იქნენ 15მლ სინჯარებში. ამას მოსდევდა იზოლირებული მონოციტების მხოლოდ ნაწილის სტიმულაცია სპეციალური არასპეციფიური სტიმულატორით ე.წ. PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) რაოდენობით 200ნგ/მლ. ამავედროულად უჯრედები შედებილ იქნენ კალციინით. კალციინი AM გაივლის რა უჯრედის მემბრანას, ესთერაზების მიერ იშლება. სიგნალის გაზომვა კი ამ პარამეტრებით ხდება: EX 490 EM 515. ასეთნაირად გამოჩნდებიან მონოციტები მაფლუორესცენცირებელი ნივთიერების საშუალებით მიკროსკოპში. მონოციტები 10 წუთის განმავლობაში 1000 ბრუნზე წუთში ცენტრიფუგირდებოდნენ რათა სტიმულაციისა და ღებვის ნარჩენები აღმოგვეფხვრა. ამის შემდგომ ისინი გაიხსნებოდნენ PBS-ში და საბოლოოდ ანტისხეულ ანტი-CD49d (VLA-4) ინკუბირდებოდნენ 10 წუთის განმავლობაში.

**PMA**

Phorbol-12-Myristate-13-Acetat, unspezifisches  
Zellstimulanz Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Taufkirchen, P1585#1MG

**Calcein შესაღები ხსნარი** Mobitec GmbH, #MFPC009

**შესაღები ხსნარის მომზადება:**

1 მილიმოლი Calcein AM DMSO-ში 1:50 კმმოლით PBS განზავდება

გამოიყენება 1:10 უჯრედული სუსპენზია

**ანტი-CD49d** (Clone HP2/1), Beckmann Coulter, Krefeld,  
Deutschland

#### **2.5.4. კელევის მიმდინარეობა**

გამდინარე კამერის ექსპერიმენტის დასაწყისში ვამზადებდით გამდინარე კამერის სისტემას. ამისათვის რეზინის რგოლი სპეციალური ცხიმით მუშავდებოდა, რათა ცილინდრზე მყარად მიკრულიყო და იგი თავსდებოდა დასაწყისში ცარიელსა და ჯერ კიდევ შემოუგარსავ სინჯარასა და ცილინდრს შორის. გამავალი და შემომავალი კონტაქტები ორი მილის სისტემით ერთდებოდა მონოციტებიან სინჯარასა და 50მლ პერფუზორულ შპრიცთან. ეს უკანასკნელი მაგრდებოდა მაპროგრამებელ ტუმბოზე. ვაკუუმის ტუმბო კი სხვა მილის საშუალებით უკავშირდებოდა გამდინარე კამერას. ამით უზრუნველყოფილი იყო გამდინარე კამერის სიმჭიდროვე. ფსკერისა და თავსახურის ერთმანეთთან მჭიდრო კავშირი მათ შორის ფიქსირებული სიმაღლის შენარჩუნებას განაპირობებდა. გამდინარე კამერა მაგრდებოდა მიკროსკოპზე. მიკროსკოპზე მაგრდებოდა ასევე პერსონალური კომპიუტერი დიგიტალური კამერით, რომლის საშუალებითაც ხდებოდა ვიდეოკადრების, აგრეთვე ცალკეული ფოტოების გარკვეულ განსაზღვრულ მომენტებში გადაღება და დამახსოვრება. კამერა ივსებოდა PBS-ით ჰაერის ბუშტუკების გარეშე 4.8 მლ/წთ დინების სიჩქარის გამოყენებით. ვაკუუმის ტუმბო ირთვებოდა. სტაბილური პირობებისა და შესაბამისი დინების სიჩქარის მისაღწევად კამერას ვამუშავებდით 1-2 წუთის ხანგრძლივობით სხვადასხვა სიჩქარის

პირობებში. ამის შემდეგ ვაკუუმის ტუმბოს ვაჩქარებით და ცარიელ სინჯარას ჩავანაცვლებდით ენდოთელური უჯრედებით დაფარული სინჯარით. ამის შემდეგ HMEC-1 უჯრედები წარმოდგენდნენ გამდინარე კამერის ფსკერს. გამდინარე კამერაში გამოკვლევებისათვის მონოციტები მომზადდა შემდეგი კონცენტრაციით -  $1 \times 10^6$  /მლ. ისინი შემავალი მილით შეედინებოდნენ კამერაში. ვიყენებდით წანაცვლების სიჩქარეს  $15 \text{ dyne/cm}^2$ . მონოციტების ურთიერთქმედება ენდოთელური უჯრედების ზედაპირთან ვიზუალიზირდებოდა ვიდეომიკროსკოპის საშუალებით 20ჯერად გადიდებაზე. მონოციტების ბრუნვა და ადჰეზია ფასდებოდა 6 სხვადასხვა დაკვირვების უბანში ((mean $\pm$ SD) 5-5 წამის განმავლობაში გადაღებული ვიდეოფილმების საშუალებით. ვიდეოების გადაღება და დამახსოვრება პოსტექსპერიმენტული, ხარისხობრივი და რაოდენობრივი შეფასების შესაძლებლობას იძლეოდა, რაშიც გამოიყენებოდა კომპუტერული პროგრამა „Let’s Edit“. მათგან კი ვანგარიშობდით საშუალო მონაცემებს.

### 2.5.5 საკვლევი ჯგუფები

ცხრილებში 8,9,10,11 წარმოდგენილია საკვლევი ჯგუფები, რომლებიც შერჩეულ იქნა დინამიური ადჰეზიური კვლევებისათვის. თითოეულ ჯგუფში ასახულია ენდოთელური კულტურის, CD7/VCAM1 კონსტრუქტის, GFP, სისხლიდან იზოლირებული მონოციტებისა და ანტისხეულების ანტიCD49d, ანტიCD54, ანტიCD106 გამოყენების კომბინაციები გამდინარე კამერის ცდებში.

ენდოთელური უჯრედები CD7/VCAM1 ტრანსფექციითა და ტრანსფექციის გარეშე

HMEC1 (+antibodies) versus HMEC1-CD7/VCAM1 (+antibodies)	
HMEC1+Monos	HMEC1-CD7/VCAM1+Monos
HMEC1+Monos-ანტიCD49d	HMEC1-CD7/VCAM1+Monos-ანტიCD49d
HMEC1-ანტიCD54+Monos	HMEC1- CD7/VCAM1-ანტიCD54+Monos
HMEC1-ანტიCD54+Monos-ანტიCD49d	HMEC1- CD7/VCAM1-ანტიCD54+Monos- ანტიCD49
HMEC1-ანტიCD106+Monos	HMEC1-CD7/VCAM1-ანტიCD106+Monos
HMEC1-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d	HMEC1-CD7/VCAM1-ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d

ცხრილი 8

ენდოთელური უჯრედები IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  სტიმულაციითა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციით

HMEC1-stimulated (antibodies) versus HMEC1-CD7/VCAM1 (antibodies)	
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos	HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos-ანტიCD49	HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos-ანტიCD49d
HMEC1-IL1 $\beta$ -ანტიCD106+Monos	HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos
HMEC1-IL1 $\beta$ -ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d	HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos	HMEC1-IL1-CD7/VCAM1+Monos
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos-ანტიCD49	HMEC1-IL1-CD7/VCAM1+Monos-ანტიCD49d
HMEC1-IL1 $\beta$ -ანტიCD106+Monos	HMEC1-IL1-CD7/VCAM1-ანტიCD106+Monos
HMEC1-IL1 $\beta$ -ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d	HMEC1-IL1-CD7/VCAM1- ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d
HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos	HMEC1- TNF $\alpha$ -CD7/VCAM1+Monos
HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos-ანტიCD49d	HMEC1- TNF $\alpha$ -CD7/VCAM1+Monos- ანტიCD49d
HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos	HMEC1- TNF $\alpha$ -CD7/VCAM1- ანტიCD106+Monos
HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d	HMEC1- TNF $\alpha$ -CD7/VCAM1- ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d

ცხრილი 9

ენდოთელური უჯრედები GFP და CD7/VCAM1 ტრანსფექციით

HMEC1-GFP (antibodies) versus HMEC1-CD7/VCAM1 (antibodies)	
HMEC1-GFP+Monos	HMEC1-CD7/VCAM1+Monos
HMEC1-GFP+Monos-ანტიCD49	HMEC1-CD7/VCAM1+Monos-ანტიCD49d
HMEC1-GFP-ანტიCD106+Monos	HMEC1-CD7/VCAM1-ანტიCD106+Monos
HMEC1-GFP-ანტიCD106+Monos- ანტიCD49	HMEC1-CD7/VCAM1-ანტიCD106+Monos- ანტიCD49d

ცხრილი 10

ენდოთელური უჯრედები IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  სტიმულაციით და სტიმულაციის გარეშე

HMEC1 (antibodies) versus HMEC1 -stimulated (antibodies)	
HMEC1+Monos	HMEC1-IL1+Monos
HMEC1+Monos-ანტიCD49	HMEC1-IL1+Monos-ანტიCD49
HMEC1-ანტიCD106+Monos	HMEC1-IL1-ანტიCD106+Monos
HMEC1-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49	HMEC1-IL1-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d
HMEC1+Monos	HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos
HMEC1+Monos-ანტიCD49	HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos-ანტიCD49d
HMEC1-ანტიCD106+Monos	HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos
HMEC1-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49	HMEC1-TNF $\alpha$ -ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d

ცხრილი 11



## 2.6. IN VIVO კვლევები

აღნიშნული შრომის ფარგლებში in vivo ექსპერიმენტები ჩატარებულ იქნა ქმელებურნის ბეიკერის სახელობის გულისა და დიაბეტის კვლევითი ინსტიტუტის ბაზაზე.

კვლევის in vitro მოდელების საშუალებით შესაძლოა CD7/VCAM-1 ზემოქმედების მსოლოდ ნაწილობრივი შესწავლა. CD7/VCAM-1-ით VCAM-1 რეცეპტორის კონკურენტული ინაქტივაციის გამოვლენა და ათეროგენეზის პროცესზე გენური ტრანსფექციის და ხსნადი პროტეინის ზემოქმედების შესწავლისათვის საჭირო გახდა კვლევა in vivo ექსპერიმენტებში გაგრძელებულიყო. ამ მიზნით ჩატარდა in vivo სამუშაოები, რომელთათვის შერჩეულ იქნენ ApoE-/- ტრანსგენური თაგვები. ცნობილია, რომ მათ ApoE დეფიციტის ფონზე სპონტანურად და განსაკუთრებით კი ცხიმით მდიდარი დიეტის ფონზე ათეროსკლეროზი უვითარდებათ. აპოლიპოპროტეინი E პასუხისმგებელია ტრიგლიცერიდებით მდიდარი ლიპოპროტეინების კომპონენტების ნორმალურ კატაბოლიზმზე, შესაბამისად მისი დეფიციტი ტრანსგენურ ცხოველებში იწვევს ათეროსკლეროზის განვითარებას. ხსნადი პროტეინის შესასწავლად in vivo კვლევებში შემდეგი ექსპერიმენტული მოდელები გამოიცადა: ApoE-/- დეფიციტური თაგვების საძილე არტერიის ტრანსფექცია აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით და ApoE-/- დეფიციტური თაგვების საძილე არტერიის ტრანსფექცია ინექციის ტექნიკის გამოყენებით.

In vivo ექსპერიმენტები ApoE-/- თაგვები			
აპლიკაციის ტექნიკა		ინექციის ტექნიკა	
I ეტაპი	II ეტაპი	I ეტაპი	II ეტაპი
Arteria Carotis Comunis ტრანსფექცია (მარცხენა/მარჯვენ ა) CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის აპლიკაციის გზით	48 საათის შემდეგ ტრანსფიცირებული სისხლძარღვის ამოღება	Arteria Carotis Comunis ტრანსფექცია (მარცხენა/მარჯვენ ა) CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის ინექციის გზით	ტრანსფიცირებუ ლი სისხლძარღვის ამოღება 4 სხვადასხვა დროის ერთეულში

ცხრილი 12 კვლევის გეგმა

ცხრილი 12 წარმოადგენს in vivo სამუშაოების ეტაპებს. პირველი ეტაპი იყო კაროტიდული არტერიის (Arteria Carotis) ტრანსფექცია, ხოლო მეორე ეტაპი კი ტრანსფიცირებული და არა-ტრანსფიცირებული სისხლძარღვის გარკვეული დროის შემდეგ ამოკვეთა და შემდგომი შესწავლა იყო.

### **2.6.1. ApoE-/- თაგვების მომზადება**

ლაბორატორიული ცხოველების მოვლა და გამოყენება მიმდინარეობდა საერთაშორისო სახელმძღვანელოების თანახმად და სპეციალური უფლება ამ სამუშაოების ჩასატარებლად გაცემულ იქნა როგორც ქ.ფრეიბურგის საუნივერსიტეტო კლინიკის ასევე ბეიკერის გულისა და ღიაბეტის კვლევითი ინსტიტუტის მიერ.

ცხოველები სიცოხლის მეოთხე კვირიდან 2 კვირის განმავლობაში იღებდნენ სპეციალურ ქოლესტერინით მდიდარ საკვებს. ყველა საცდელ ცხოველთან in vivo კვლევების პირველი ეტაპი იწყებოდა 5 კვირის ასაკიდან.

#### **2.6.1.1. ქოლესტერინით მდიდარი დიეტა**

ქოლესტერინით მდიდარი დიეტისათვის გამოყენებულ იქნა სპეციალური საკვები, რომელიც 21% ცხიმსა და 0.15% ქოლესტეროლს შეიცავდა. 2 კვირიანი დიეტის შემდეგ იწყებოდა გამოკვლევის პირველი ეტაპი. პირველ და მეორე ეტაპს შორის პერიოდში ისინი ასევე იგივე საკვებს ღებულობდნენ.

2.6.1.2 ApoE-დეფიციტურ თაგვებზე ცდების მიმოხილვა

ჯგუფი	ინექცია	ცხოველების რაოდენობა		
		ბამოკვლევა		
		2 კვირაში	4 კვირაში	6 კვირაში
I	CD7/VCAM-1 10 <sup>9</sup> PFU/ml	-	-	16
	CD7/VCAM-1 10 <sup>8</sup> PFU/ml	-	-	5
	GFP 10 <sup>9</sup> PFU/ml	-	-	4
II	CD7/VCAM-1 10 <sup>9</sup> PFU	-	10	-
	CD7/VCAM-1 10 <sup>8</sup> PFU	-	10	-
	GFP 10 <sup>9</sup> PFU/ml	-	5	-
III	CD7/VCAM-1 10 <sup>9</sup> PFU	-	5	-
	CD7/VCAM-1 10 <sup>8</sup> PFU	-	6	-
	GFP 10 <sup>9</sup> PFU/ml	-	8	-
IV	CD7/VCAM-1 10 <sup>9</sup> PFU	6	-	-
	CD7/VCAM-1 10 <sup>8</sup> PFU	16	-	-
	GFP 10 <sup>9</sup> PFU/ml	9	-	-

ცხრილი 13 ცხოველების რაოდენობა, აღენოვირალური კონსტრუქტის გამოყენებული კონცენტრაციები, დროის ინტერვალები

### ცხრილის განმარტება:

I – პირველი საცდელი ჯგუფის ცხოველებს მეორე ოპერაცია უტარდებოდათ 6 კვირაში. II – მეორე საცდელი ჯგუფის ცხოველებს მეორე ოპერაცია უტარდებოდათ 4 კვირაში. III - მესამე საცდელი ჯგუფის ცხოველებს მეორე ოპერაცია უტარდებოდათ 6 კვირაში. (III და IV ჯგუფების ცხოველების სისხლძარღვების in vitro დამუშავება განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან).

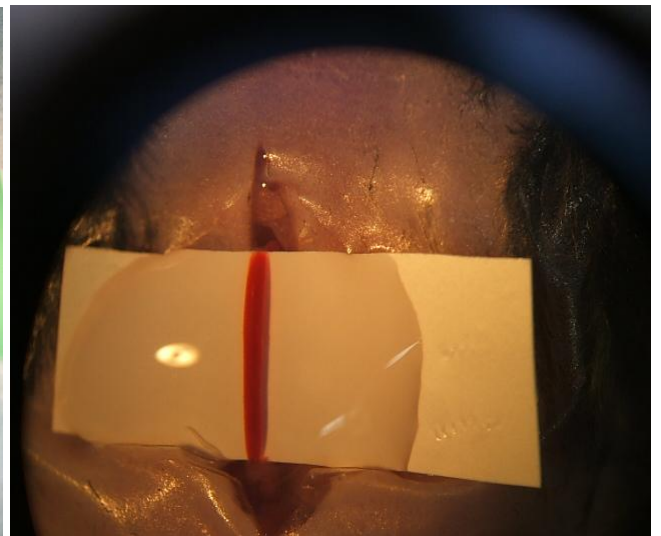
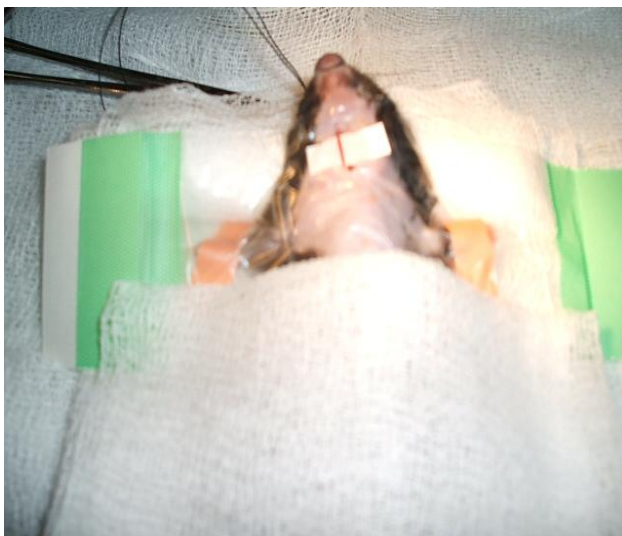
IV - მეოთხე საცდელი ჯგუფის ცხოველებს მეორე ოპერაცია უტარდებოდათ 2 კვირაში.

თითოეული საცდელი ჯგუფის ცხოველის შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა ადენოვირალური კონსტრუქტისა და როგორც ვირალური კონტროლის GFP ადენოვირალური კონსტრუქტის ორი სხვადასხვა ტიტრ-კონცენტრაციის ინექციას/აპლიკაციას.

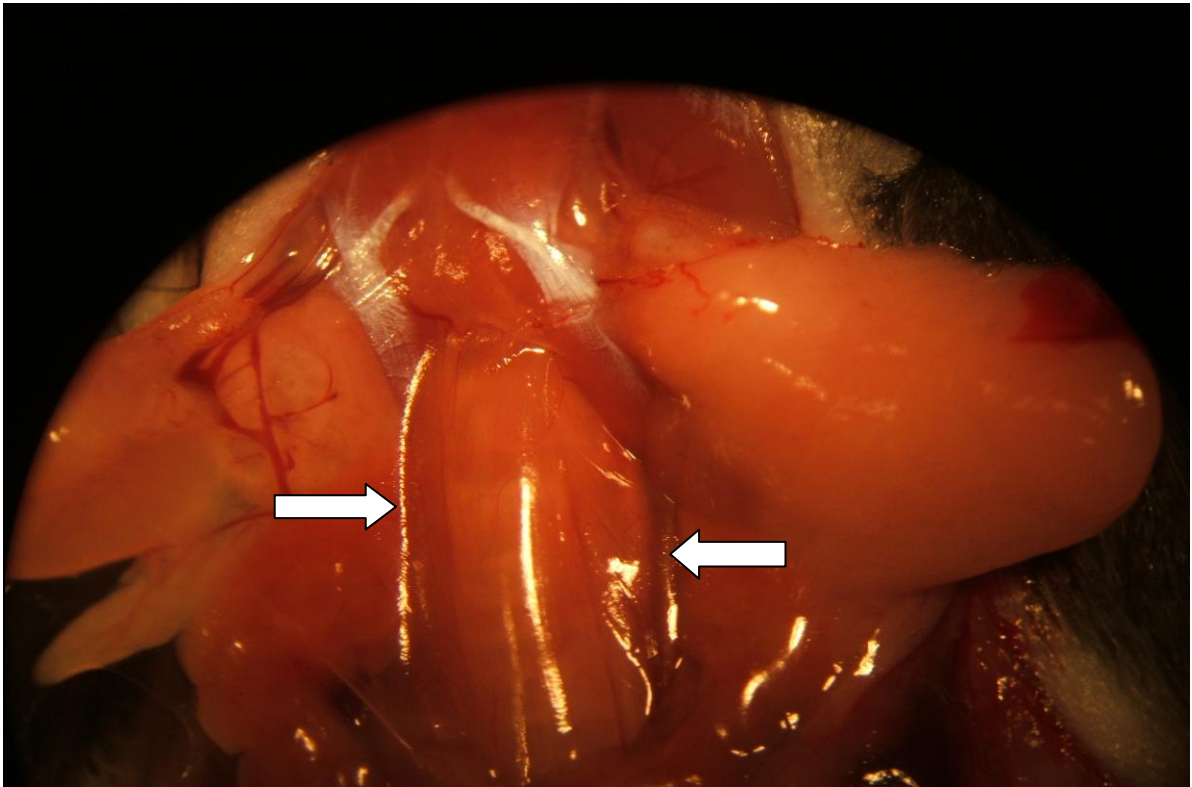
### 2.6.2. ოპერაციული ჩარევა

ყოველი ოპერაციული ჩარევა ხორციელდებოდა ღრმა ზოგადი ანესთეზიის ქვეშ. ნარკოზის დოზირების გამოსაანგარიშებლად ხდებოდა თავდაპირველად ცხოველების აწონვა. ამ შრომის ფარგლებში გამოყენებულები იყვნენ თავგები 20-30გ წონით. თავგებს ანესთეზია უტარდებოდათ იზოფლურან, კეტამინისა (Ketanest® 100 mg/kg BW) და ქსილაზინის (Rompun® 5 mg/kg BW) საშუალებით და თავსდებოდნენ დისექციურ მიკროსკოპზე. თვალის კაკლები იფარებოდა ბეპანთინის თვალის მაზით რათა ისინი არ გამოშრალიყვნენ. შესაბამისი ნარკოზული სიღრმის მიღწევის შემდეგ, რაც მოწმდებოდა რქოვანასა და ტკივილის რეფლექსების (მაგ. ტერფის ფალაგებს შორის რეფლექსის) არ არსებობით, ცხოველები მოთავსებულ იქნებოდნენ თბილ მატრასზე ზურგზე მწოლიარე პოზიციაში. თბილი მატრასის საშუალებით სხეულის ტემპერატურა ნარჩუნდებოდა მუდმივად 37°C დონეზე. საჭიროების შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა სანარკოზე სითხის დაახლოებით მესამედის დამატებას.

კისრის ნაწილში თავგებს შეეზილებოდათ თმის მოსაშორებელი კრემი და სპეციალური შპატელით ხდებოდა თმის მოცილება. კანი განაკვეთის ადგილი კარგად დეზინფიცირდებოდა სპეციალური სადეზინფექციო ხსნარის საშუალებით. სტერილური, გამჭვირვალე პარკი დაეკვრებოდა ოპერაციის არეში. კანის განაკვეთი კეთდებოდა ცენტრში. სანერწყვე ჯირკვლები ერთმანეთისაგან ფროთხილად განცალკევდებოდა და კაროტიდული არტერიები გამოთავისუფლდებოდნენ. მარჯვენა საერთო საძილე არტერია (Arteria carotis communis dextra) და მარცხენა საერთო საძილე არტერია (Arteria carotis communis sinistra) განთავისუფლდებოდნენ ირგვლივმდებარე ქსოვილებისაგან ატრაუმატული, მიკროქირურგიული ტექნიკის საშუალებით. ამას მოყვებოდა სისხლძარღვის ტრანსფექცია (იხ.2.6.2.1.). საბოლოოდ განაკვეთი დაიხურებოდა და გაიკერებოდა. მეთვალყურეობის ქვეშ ცხოველები იღვიზებდნენ ნარკოზიდან. რამოდენიმე დღეში ჭრილობა ხორცდებოდა და 2-6 კვირის ცხიმით მდიდარი დიეტის პერიოდის შემდეგ ტარდებოდა ამ ცხოველების ხელახალი გამოკვლევა.



სურათი 13: ცდის ცხოველის მომზადება



სურათი 14: სისხლძარღვების გამოთავისუფლება

ისრებით მარცხნივ: ACCD - Arteria Carotis Communis Dextra, მარჯვნივ: ACCS - Arteria Carotis Communis Sinistra.

### 2.6.2.1. ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტური თაგვების საერთო საძილე არტერიის ტრანსფექცია

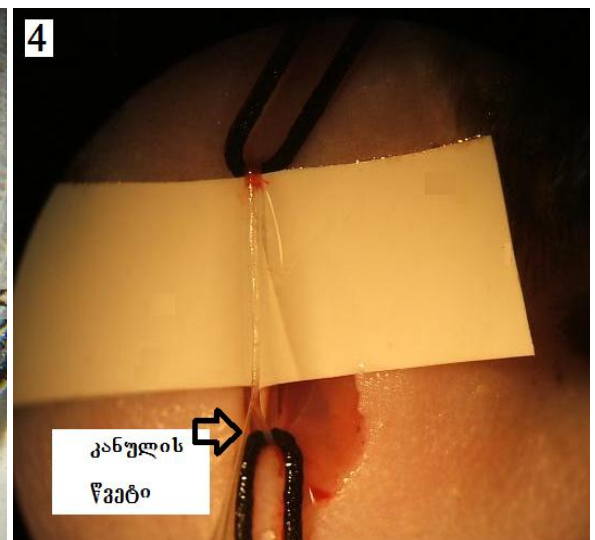
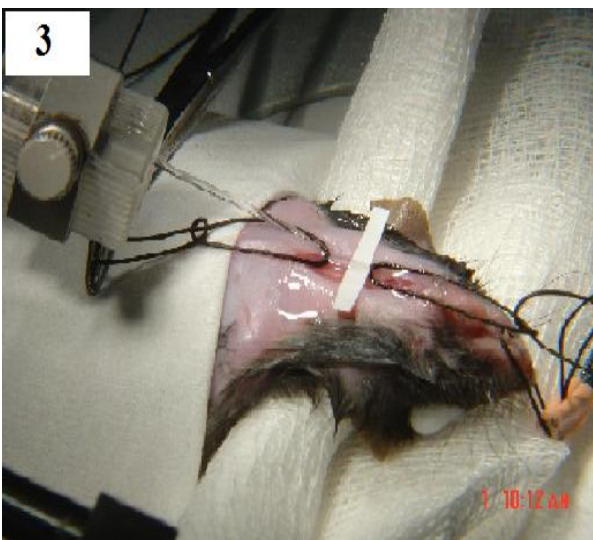
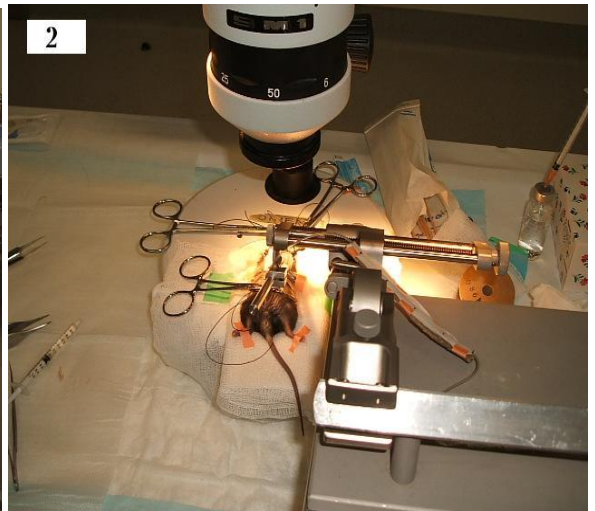
#### 2.6.2.1.1. აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენება

მას შემდეგ რაც საძილე არტერიები მიმდებარე რბილი ქსოვილებისაგან გამოთავისუფლდებოდა მოვახდენდით GFP ადენოვირალური კონსტრუქტის ფუნჯით მარჯვენა და მარცხენა საერთო საძილე არტერიებზე Arteria carotis comunis (sinistra,dextra) ერთ სეგმენტზე აპლიკაციას. ჭრილობა დაიხურებოდა და გაიკერებოდა. თაგვები გამოდიოდნენ ნარკოზიდან მეთვალეურეობის ქვეშ. სისხლძარღვის ამოღება ხორციელდებოდა აპლიკაციის გზით ადენოვირალური კონსტრუქტით ტრანსფექციიდან 48 საათში. ასეთი ტრანსფექციისათვის გამოყენებულ იქნა მხოლოდ GFP ადენოვირალური კონსტრუქტი. დასაწყისში დასადგენი იყო კონსტრუქტი აპლიკაციის გზით შეაღწევდა თუ არა სისხლძარღვის ინტიმაში. ვინაიდან იმის დადასტურება, რომ კონსტრუქტი ახდენდა ენდოთელამდე

შელწევას ტრანსფექციის აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით ვერ მოხერხდა, ამ მეთოდზე მუშაობა შეწყდა. ამ პრობლემის წამოჭრის გამო შემუშავებულ იქნა ალტერნატიული ტრანსფექციის ტექნიკა.

#### **2.6.2.1.2. ინექციის ტექნიკის გამოყენება**

ხსნადი პროტეინის საძილე არტერიაში ინექციამდე სისხლძარღვი ჭრილობის კიდებთან ზემოთ და ქვემოთ იქნა ლიგირებული. იგი დაცარილებულ იქნა სისხლისაგან. საოპერაციო მიკროსკოპის ქვეშ უწვრილესი შუშის კანულა შეყვანილ იქნა საერთო საძილე არტერიაში (*Arteria carotis communis*). ამ კანულაში იმთავითვე შეყვანილი იყო ადენოვირალური კონსტრუქტის შესაბამისი რაოდენობა. კანულის ბოლო მიერთებული იყო შპრიცთან. ყველაფერი მყარად იყო დაფიქსირებული სპეციალურ მიკრომანიპულატორზე. საერთო საძილე არტერიის განთავისუფლებული სეგმენტი გავსებულ იქნა ადენოვირალური კონსტრუქტით. ინკუბაციის პერიოდი გრძელდებოდა 20 წუთი. ამის შემდეგ კანულა ფრთხილად ტოვებდა სისხლძარღვს. ტრანსფექციის პერიოდში კი არტერია მოთავსებული იყო PBS ხსნარში რათა თავიდან აგვერიდებინა ქსოვილის გამოშრობა. ზოგიერთ შემთხვევაში ადგილი ქონდა მცირე რაოდენობით სისხლდენას ინექციის არეში, რომელიც წყდებოდა ამ ადგილზე კომპრესიის საშუალებით. ინკუბაციის შემდეგ სისხლძარღვი კვლავ განთავისუფლდებოდა და დავრწმუნდებით, რომ სისხლის მიმოქცევა აღდგა. ჭრილობა დაიხურებოდა და გაიკერებოდა. ცხოველი გამოდიოდა ნარკოზიდან მეტვალეურეობის ქვეშ. სისხლძარღვის ამოღების ოპერაცია ტარდებოდა 3 სხვადასხვა დროის მონაკვეთში (იხ. ცხრილი 13). ტრანსფექციისათვის გამოყენებულ იქნენ როგორც ადენოვირალური CD7/VCAM-1 კონსტრუქტი ასევე მისი GFP-კონტროლი.



სურათი 16: კაროტიდული არტერიის ტრანსფექცია ადენოვირალური კონსტრუქტის ინექციის გზით:

- 1 - საოპერაციო 2,3 -ინექციის გზით საძილე არტერიის ტრანსფექციის პროცესი
- 4 – ხსნადი პროტეინით შევსებული საძილე არტერია.

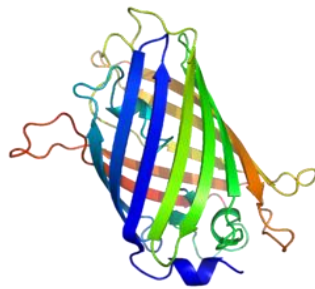


### 2.6.3. სისხლძარღვის ამოღება და მისი მომზადება შემდგომი კვლევისათვის

ApoE-/- ცხოველების აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით ტრანსფექციიდან 48 საათში და ინიექციური ტექნიკით ტრანსფექციიდან ოთხ სხვადასხვა დროის მონაკვეთში (იხ.ცხრილი 13) ცხოველს კვლავ ეძლეოდა ზოგადი ნარკოზი. ხდებოდა ორივე კაროტიდის გამოთავისუფლება (იხ.2.6.2.). სისხლძარღვის გამოთავისუფლებული სეგმენტი ზედა და ქვედა ნაწილში ლიგირდებოდა. სისხლძარღვები ამოიკვეთებოდა ერთიმეორეს მიყოლებით ბიფურკაციის ფარგლებში. ამოკვეთილი სისხლძარღვები შემდგომი ჰისტომორფოლოგიური კვლევების ჩასატარებლად ინახებოდნენ როგორც თხევად აზოტში გაყინულები ასევე დაფიქსირდებოდნენ 4% ფორმალინში. ცხოველები კი ოპერაციის დასრულების შემდეგ ნარკოზის ქვეშ ეუთანაზირდებოდნენ.

### 2.6.4. სისხლძარღვების დამუშავება და გამოკვლევა აპლიკაციის ტექნიკით მათი ტრანსფექციის შემდეგ

სისხლძარღვის სეგმენტი ამოკვეთის შემდეგ თავსდებოდა 4% ფორმალინით ავსებულ ეპენდორფის სინჯარაში. შემდგომი გამოკვლევა ეფუძნებოდა GFP თვისებებს.



სურათი 17: GFP სტრუქტურა

GFP მწვანე მოფლუორესცენციურე პროტეინი (Green Fluorescence Protein) პირველად 1961 წელს ოსამუ შიმომურას (Osamu Shimomura) მიერ იქნა აღმოჩენილი. იგი აღწერილი იყო როგორც პროტეინი Quale Aequorea victoria-დან, რომელიც ლურჯი ან ულტრაიისფერი სხივით დასხივებისას მწვანედ ფლუორესცენცირებს. მისი პირველადი სტრუქტურა შედგება 238 ამინომჟავისაგან 26.9 kDa მოლეკულური

მასით. იგი ხმარებაშია მხოლოდ ოპტიკური თვალსაზრისით. არამოდიფიცირებულ, ბუნებრივად არსებულ GFP აქვს 2 მოქმედების მაქსიმა. პირველი მდებარეობს 395 nm ტალღის სიგრძეში, ხოლო მეორე 475 nm ტალღის სიგრძეში. ემისიის ტალღის სიგრძე წარმოადგენს 509 nm. GFP შეუძლია ფლუორესცენც მიკროსკოპში მოგვცეს უჯრედში (შესაბამისად ქსოვილში) სამიზნე პროტეინის დროული და ადგილობრივი ლოკალიზაციის შესახებ ინფორმაცია. ამისათვის სისხლძარღვები შეღებულ იქნენ CD7 FITC. ასეთნაირად გახდა შესაძლებელი GFP ვიზუალიზაცია ტრანსფიცირებულ და არა-ტრანსფიცირებულ კაროტიდულ არტერიებში.

## 2.7. საძილე არტერიებზე ჩატარებული ჰისტომორფოლოგიური კვლევები

ჰისტომორფოლოგიური კვლევები ჩატარებულ იქნა საძილე არტერიებზე, რომლებიც CD7/VCAM1 კონსტრუქტის მეშვეობით ტრანსფიცირებულ იქნენ ინექციის ტექნიკის გამოყენებით.

### 2.7.1. პრეპარატების მომზადება

მიკროსკოპისათვის პრეპარატების მომზადების სქემა

პრეპარატების მომზადება	
პარაფინის ანათლები	კრიოანათლები
ქსოვილი: საძილე არტერია	
1. ფიქსაცია (აუტოლიზის შეფერხება, პრეპარატის მომზადება დასაჭრელად)	
A) პარაფინის ანათლები	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ პროტეინკოაგულაცია</li> <li>✓ პროტეინების ქსელი (ალდეჰიდების, ფორმალინის, პარაფორმალდეჰიდის მიერ დაქსელვა)</li> </ul>

B) კრიონათლები	გაყინვა
2. დეჰიდრატაცია	
✓ თუ პრეპარატი ფიქსაციის შემდგომ წყალში უხსნადი მედიუმით უნდა დაფარულიყო (მაგ.პარაფინით) გამოიყენებოდა ზრდადი ალკოჰოლური რიგი (ეთანოლი, იზოპროპრანოლი)	
3. შეფუთვა (უხშირესად პარაფინით)	
4. პრეპერატების დაჭრა, ანათლების მომზადება (მიკროტომი, კრიოტომი)	
5. სასაგნე მინებზე გადატანა	
6. დეპარაფინირება (მხოლოდ პარაფინის ანათლებზე ქსილოლისა და კლებადი ალკოჰოლური რიგით)	
7. ღებვა	
8. შრობა	
9. შესანახი მედიუმის გამოყენება	
10. სასაგნე მინაზე გადატანა	

ცხრილი 14: პრეპარატების მომზადება გუდოს თანახმად (M.Gudo 2004).

პარაფინისა და კრიო ანათლების დამუშავების შედარება	
ანათლები	
პარაფინის ანათლები	კრიონათლები
ქსოვილის ფიქსაცია	ქსოვილის ფიქსაცია (გაყინვა)
გაუწყლოება	-20°C პრეპარატის დაჭრა
პარაფინში შეფუთვა	სასაგნე მინაზე გადატანა
პრეპარატის დაჭრა	ფიქსაცია / ყოველი ღებვის შემდეგ გაუწყლოება
სასაგნე მინაზე გადატანა	ღებვა
დეპარაფინირება	შრობა
ღებვა	-
გაუწყლოება	-
გადახურვა	-

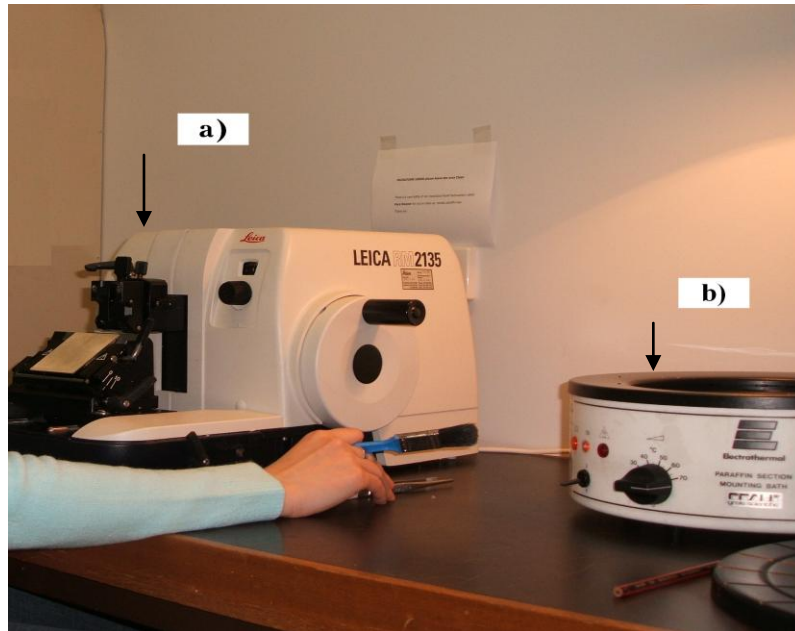
ცხრილი 15: პარაფინ და კრიონათლების დამუშავება გუდოს თანახმად (M.Gudo 2004).

### 2.7. 1.1. პარაფინის ბლოკები

ამოღებული სისხლძარღვების პარაფინის ბლოკები დამზადდა Alfred Hospital-ის ბაზაზე (Melbourne, Australia) არსებულ ჰისტოპათოლოგიურ ლაბორატორიაში.

### 2.7.12. პარაფინის ანათლების დამზადება

პარაფინ ანათლებზე მუშაობისათვის გამოყენებულ იქნა შემდეგი მასალა: წვეტიანი პინცეტი, საპრეპარაციო ნემსი, სკალპელი, ნაზი ფუნჯი, ფილტრის ქაღალდი. კომპაქტური მიკროტომი Leuca RM 2135 (იხ. სურათი 20) გამოყენებული იქნა პარაფინ ბლოკების დასაჭრელად ჰისტოლოგიის განყოფილებაში (Baker Heart Research Institute, Melbourne, Australia). ყოველი პარაფინ ბლოკი დაჭრამდე შესაბამისად მუშავდებოდა. ტრაპეციის ფორმის ბლოკები ვიწრო ნაწილით მიკროტომის დანაზე ფიქსირდებოდა. სასურველი ანათლის სისქე მას შემდეგ მიიღწეოდა, რაც პრეპარატის ნაწილები კარგად გამოჩნდებოდა. 5 მკმ სისქეზე ხდებოდა ანათლების დამზადება. ანათლები სერიულად ერთმანეთზე აკინძულები რჩებოდნენ და ერთიმეორეს მიყოლებით მიკროტომის დანის გასწვრივ განლაგდებოდნენ. მათ ფუნჯით ან პინცეტით ხანმოკლე დროით წყლის აუზში ვათავსებდით. აუზში წყლის ტემპერატურა შეადგენდა 30-40 °C. თბილ წყალში ანათლები სწორდებოდა, ხდებოდა მათი ამოღება და სასაგნე მინაზე განთავსება. წყალი ფილტრის ქაღალდით ამოშრებოდა. ანათლების საბოლოო და სრულყოფილი შრობა საშრობ ღუმელში ხდებოდა. დაახლოებით ერთი დღის შემდეგ ისინი მზად იყვნენ ლეზვისათვის.



სურათი 20: a) მიკროტომი Leica RM 2135; b) წყლის აბაზანა Grale Scientific (Electrothermal).

### 2.7.1.3. კრიობლოკების წარმოება

კრიობლოკების პრეპარატები დამზადებული იყო ApoE-დეფიციტური თაგვების საძილე არტერიებისაგან.

ამოკვეთილი სისხლძარღვი დასაწყისში თხევადი აზოტით სავსე სინჯარაში თავსდებოდა. კრიობლოკების წარმოებისათვის საჭირო იყო სისხლძარღვის შესაფუთ სითხეში ე.წ. Tissue Tek მოთავსება. ამასთან მნიშვნელოვანი იყო, რომ სისხლძარღვი აღნიშნულ სითხეში ვერტიკალურ მდგომარეობაში უნდა პოზიციონირებულიყო. სითხე ხანმოკლე დროში განიცდიდა გამყარებას და ასეთნაირად „შეფუთული“ სისხლძარღვი მალევე თხევად აზოტში თავსდებოდა და 24 საათის განმავლობაში მასში ინახებოდა. მოგვიანებით ბლოკებს საყინულეში 80°C ვინახავდით მათი შემდგომი დამუშავებისათვის.

### 2.7.1.4. კრიობლოკების დაჭრა

კრიობლოკების დაჭრა მიმდინარეობდა კრიოტომ Leica CM1900 UV გამოყენებით. ეს ხელსაწყო გამოიყენება სწრაფი რუტინული დიაგნოსტიკისათვის. მას აქვს ბევრი სივრცე მოსახერხებელი მუშაობისათვის. ანათლების უსაფრთხოდ და იზოლირებულად შესანახად ხელსაწყოს აქვს საყინულე კამერა განცალკევებული ობიექტის გასაყინი სივრცით. ყოველი ცალკეული პრეპარატიდან მზადდებოდა

მინიმუმ 10 გაყინული ანათალი. კრიოტომი (იხ.სურათი 21) ყენდებოდა  $-20^{\circ}\text{C}$  ტემპერატურაზე. კრიოპრეპარატების გაღობა რომ თავიდან ყოფილიყო აცილებული ბლოკებს მათში პორტატული  $-80^{\circ}\text{C}$  საყინულეს საშუალებით გადავიტანდით. ჭრილის სისქე შეადგენდა 5მკმ. მიღებული ანათლები 2-2- თითო ობიექტზე იქნა განთავსებული.



**სურათი 21: კრიოტომი Leica CM1900 UV**

გარკვეული მზადება იყო საჭირო კრიობლოკების დაჭრამდე. სასაგნე მინები გამოყენებამდე შესაბამისი საფიქსაციო წებოთი იფარებოდნენ. მანუალური ღებვის შემთხვევაში ასეთი წებოვანი ფენის არსებობა აუცილებელია. სასაგნე მინაზე წარწერები ფანქრით კეთდებოდა და შეიცავდნენ შემდეგ ინფრომაციას:

- ცხოველის სახელი
- პრეპარატის სახეობა (A.Carotis, r (მარჯვენა) ან (მარცხენა))
- ფიქსაცია (Formaldehyd)
- ნაკრების ნომერი და პრეპარატის ნომერი
- სერიის ნომერი

### **2.7.2. ჰისტოლოგიური ღებვა**

ჰისტოლოგია იკვლევს უჯრედებისა და ქსოვილების მიკროსკოპულ ანატომიას. ჩვეულებრივ ეს ხდება უჯრედებისა და ქსოვილების მცირე ანათლებად დამზადებისა და მათი შესაბამისი ღებვის გზით, რასაც მოსდევს მათი მიკროსკოპული გამოკვლევა. ჰისტოლოგიაში გამოყენებული საღებავი ნივთიერებები წარმოშობით ქსოვილოვანი ინდუსტრიიდან არიან. ღებვა ამ

მეთოდის აუცილებელი პირობაა ვინაიდან მისი საშუალებით ხდება ქსოვილის ვიზუალიზაცია კონტრასტისა და ცალკეული მახასიათებლების ერთმანეთისაგან გამიჯვნით. ამისათვის მოვახდინეთ რამდენიმე მიკრომეტრის ზომის ქსოვილის ანათლების დამზადება, ღებვა და მიკროსკოპის ქვეშ შეფასება. სანამ ექპერიმენტის ნაზი ქსოვილოვანი დეტალების შეფასება მოხდებოდა ქსოვილი მანამდე სრულყოფილად მუშავდებოდა. არსებობს მრავალი სხვადასხვა ღებვის მეთოდი, რომლებიც ერთმანეთისაგან საღებავების ქიმიური და ფიზიკური თვისებებით განირჩევა. სისხლძარღვის ქსოვილის (A.Carotis) ჰისტოლოგიური წარმოდგენისათვის ამ ნაშრომში ძირითადად გამოყენებული იქნენ შემდეგი ღებვის მეთოდები: ჰემატოქსილინი – ეოზინით H&E და ღებვის მეთოდი ე.წ. პერიოდული მჟავის შიფ რეაქცია PAS (Periodic acid-Schiff reaction).

### **2.7.2.1. პარაფინის და კრიოანათლების H&E-ღებვა**

H&E ღებვა არის ჰისტოლოგიური მასალის ყველაზე ხშირად გამოყენებული ღებვის მეთოდი. H&E ღებვა წარმოადგენს მიმოხილვითი ღებვის მეთოდს. ბირთვები უპირველესად იღებება ჰემატოქსილინის ხსნარით. ისინი ვლინდებიან ლურჯად, მუქ იისფრად ან შავად. მეორე ნაბიჯი არის საწინააღმდეგო ღებვა ქსანთენის საღებავის გამოყენებით (Eosin G oder B ან Erythrosin B). ციტოპლაზმა, კოლაგენი, კერატინი და ერთროციტები იღებებიან წითლად.

H-ღებვის შემდეგ უჯრედის ბირთვები ჩნდებიან მოწითალო-მოყავისფროდ. საღებავი ხსნარის დაბალი pH-მაჩვენებლის გამო. PH- მაჩვენებლის მომატებით გამდინარე წყალში გარეცხვით საღებავის ფერი გადადის ტიპურ მოლურჯო-იისფერში. საბოლოოდ კი ადგილი აქვს ციტოპლაზმის ღებვას ეოზინის ალკოჰოლურ / წყლისშემცველ ხსნარში. რეცხვის შემდგომი ეტაპების გამოყენებით ალკოჰოლის ხსნარებში მზარდი კონცენტრაციით საბოლოოდ აბსოლიტურ სპირტამდე ადგილი აქვს ქსოვილიდან წყლის გამოძევებას. საბოლოოდ კი გაუწყლოებული ანათალი მოთავსდება ორგანულ ხსნარში როგორცაა მაგალითად ქსილოლი და სასაგნე მინაზე დაიფარება საფარი მინით. ეს ანათალი და ასეთი ღებვის შემდეგი ნარჩუნდება ათწლეულების განმავლობაში და ყოველთვის შესაძლებელია მათი მიკროსკოპული დათვალიერება

## ხსნარები და მასალები H&E-ღებვისათვის

- ხსნარი Lillie Mayer Hämallum (იხ. ზევით)
- ხსნარი Scott's Brauchwasse Substitut
- ბეფერირებული ალკოჰოლური ეოზინოფილური ხსნარი
- ბეფერირებული ალკოჰოლური სამუშაო ხსნარი
- ნატრიუმის აცეტატის ხსნარი
- ძმარმუავას ხსნარი
- გამდინარე წყალი
- გამოხდილი წყალი
- ეთანოლი 95% und 100%
- DPX (ჩართვის-საფიქსაციო საშუალება სასაგნე მინასა და საფარ მინას შორის)
- საფარი მინა

### საღებავი ხსნარის მომზადება

ხსნარი	რაოდენობა (g)
<b>LILLIE MAYER HÄMALLUM</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämatoxylin</li> <li>• Ammonium alum (aluminium sulphate)</li> <li>• გამოხდილი წყალი</li> </ul>	<p>5გ</p> <p>50გ</p> <p>700მლ</p>
<p>Hämatoxylin და Ammonium alum მცირედი შეცხვლებით გაიხსნა გამოხდილ წყალში.                      ხსნარი შევაგრილეთ და დაუმატეთ შემდეგი:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1% Sodiumiodat</li> <li>• კრისტალური ძმარმუავა</li> <li>• Glycerol</li> </ul>	<p>30მლ</p> <p>20მლ</p> <p>300მლ</p>
<b>DER SCOTT'S BRAUCHWASSER SUBSTITUT</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sodium Bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)</li> <li>• Magnesiumsulphat (MgSO<sub>4</sub>)</li> <li>• გამოხდილი წყალი</li> </ul>	<p>8.75გ</p> <p>50.0გ</p> <p>2500.0მლ</p>
<p>მოხდა ამ კომპონენტების შერევა და გახსნა.</p>	



<b>ბუფერული ალკოჰოლური ეოზინის ხსნარები</b>	
<b>ალკოჰოლური ეოზინი</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ეოზინი</li> <li>• გამოსხილი წყალი } კარგად უნდა შეერიონ ერთმანეთში და</li> <li>• გაიხსნან</li> <li>• სუფთა ალკოჰოლი</li> </ul>	<p>10გ</p> <p>50მლ</p> <p>950მლ</p>
<b>0.2M SODIUM ACETATE IN 95% ეთანოლი</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sodium acetate</li> <li>• 95% ეთანოლი</li> </ul>	<p>8.2გ</p> <p>500მლ</p>
<b>1M ESSIGSÄURE IN 95% ეთანოლი</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eisessig</li> <li>• 95% ეთანოლი</li> </ul>	<p>31.2მლ</p> <p>520.0მლ</p>
<b>ბუფერული ალკოჰოლური ეოზინი - სამუშაო ხსნარი</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ალკოჰოლური ეოზინი</li> <li>• 0.2 M Natriumacetat (alkoholisch)</li> <li>• 1M Essigsäure (alkoholisch)</li> <li>• 95% ეთანოლი</li> </ul>	<p>500მლ</p> <p>80მლ</p> <p>170მლ</p> <p>1250მლ</p>

### ცხრილი 16

### პროცედურა

ფორმალინში დაფიქსირებული პარაფინის ანათლები ტიპური მეთოდით დეპარაფინირდნენ და დეჰიდრირდნენ (Xylene 10 Minuten/2x, Ethanol 100%/2x, Ethanol 95%, Aqua destillata).

პარაფინ და კრიო ანათლების შეღებვა	ხანგრძლივობა	მოქმედება
➤ გამდინარე წყალი	5 წუთი	რეცხვა
➤ Lillie Mayer Haemalum	8 წუთი	უჯრედული ბირთვების ღებვა
➤ გამდინარე წყალი	10-20 წუთი	რეცხვა
➤ გაღურჯება Scott's Brauchwasser-ში	30 წამი	ღურჯი ფერის ჩამორეცხვა და სამიზნე სტრუქტურებზე ფერის ფიქსაცია
➤ გამდინარე წყალი	10-20 წუთი	რეცხვა
➤ 95% Ethanol	10 წამი	დიფერენცირება
➤ ბუფერირებული ალკოჰოლური ეოზინი	10 წუთი	უჯრედის პლაზმისა და ინტრაცელულური სუბსტაციების ღებვა
➤ აბსოლუტური ალკოჰოლი 3x Ethanol 95%, 100%, 100%, 3x ➤ Xylene 2x	10 წამი / 3 ჯერ 2-3 წამი	დეჰიდრირდეს
➤ ამოღება და DPX ჩადება ➤ სასაგნე მინით დაფარვა (მოვერიდოთ ჰაერის ბუშტუკებს)		შეიფუტოს

### ცხრილი 17

#### წყარო

- Lillie, RD (1942). Stain Technol 17:89
- Lillie, RD (1941). Stain Technol 16:1
- Scott, SG (1912). J Path Bact 16:390
- Blake, J (1970). HISTOLOGICAL METHODS, RMIT Appl Biol, 31.

### 2.7.2.2. პარაზოზინსა და კრიო პნათლებსი PAS - ღებვა

პერიოდმუავა-ლეიკოფიქსინით ღებვა (Periodsäure-Leukofuchsin) არის ჰისტოლოგიაში ხშირად გამოყენებული ღებვის ტექნიკა. PAS - ღებვით უპირატესად გლიკოგენი იღებება. იგი ვლინდება წითლად, ბირთვები კი საპირისპიროდ ლურჯად.

#### ხსნარები და მასალები PAS - ღებვისათვის

- პერიოდმუავის ხსნარი
- Schiff რეაგენტის ხსნარი
- Lillie Mayer's Hämallumlösung (იხ. ზემოთ)
- Scott's Brauchwasser Substitut
- გამოსხილი წყალი
- გამდინარე წყალი
- Ethanol 95% und 100%
- DPX (ჩართვის-საფიქსაციო საშუალება სასაგნე მინასა და საფარ მინას შორის)
- 542 ფილტრის ქაღალდი
- საფარი მინა

#### სადებავი ხსნარის მომზადება

ხსნარი	რაოდენობა (მლ)
პერიოდმუავა (1%)	200
1გ Periodsäure განვაზაოთ 100მლ გამოსხილ წყალში	
<b>SCHIFF რეაგენტი</b>	400
<p><b>ხსნარი I:</b> 2g Pararosanilin Azetat in 60ml 1N HCL იხსნება (85ml HCL Konzentrat/1L Wasser )</p> <p><b>ხსნარი II:</b> 4g Sodium Metabisulhite in 340 ml გამოსხილ წყალში იხსნება</p> <p>აღწერა:                      ხსნარი I და ხსნარი II შერევა                      დამის განმავლობაში გაჩერება                      4გ აქტივირებული Charcoal დამატება                      შენჯღღრევა, 10 წუთი გაჩერება</p>	

542 ფილტრის ქაღალდში გაფილტვრა (ხსნარი უნდა იყოს კრისტალურად სუფთა და უნდა იქნეს განთავსებული 4°C)	
<b>LILLIE MAYER'S HÄMALLUM</b>	
(იხ.H&E-ღებვაში)	
<b>DER SCOTT'S BRAUCHWASSER SUBSTITUT</b>	
(იხ.H&E-ღებვაში)	

### ცხრილი 18

#### პროცედურა

ფორმალინში დაფიქსირებული პარაფინის ანათლები ტიპური ზემოთ აღწერილი გზით დეპარაფინირდებიან და რეჰიდრირდებიან (Xylene 10წუთი/2x, Ethanol 100%/2x, Ethanol 95%, Aqua destillata).

პარაფინისა და კრიო ანათლების ღებვა	ხანგრძლივობა	მოქმედება
➤ გამდინარე წყალი	5 წუთი	რეცხვა
➤ ანათლების გადატანა გამოსხილ წყალში	1-2 წუთი	რეცხვა
➤ 1% Periodsäure	5 წუთი	ოქსიდაცია
➤ გამდინარე წყალი	10 წუთი	რეცხვა
➤ გამოსხილ წყალში ჩაშვება	2-3 წამი	რეცხვა
➤ Schiff Reagent	10-20 წუთი	ღებვა
➤ გამოსხილ წყალში ჩაშვება	2-3 წამი	რეცხვა
➤ გამდინარე წყალი	15 წუთი	რეცხვა
➤ Lillie Mayer Haemalum	30 წამიდან 1 წუთამდე	ღებვა
➤ გამდინარე წყალი	5 წუთი	რეცხვა
➤ Bläuen in Scott's Brauchwasser	30 წამი	ლურჯი ფერის გამორეცხვა და ფერის ფიქსაცია

		სამიზნე სტრუქტურებზე
➤ გამდინარე წყალი	5 წუთი	რეცხვა
➤ 95% Ethanol	2 წუთი / 3 ჯერ	დეჰიდრირება
➤ 95% Ethanol	წუთი / 2 ჯერ	
➤ Xylene	5 წუთი / 2 ჯერ	
➤ ამოღება და DPX მოთავსება ➤ საფარი მინის დაფარება (მოვერიდოთ ჰაერის ბუშტუკების განვითარებას)		შეიფუტოს

### ცხრილი 19

#### წყაროს ჩამონათვალი

- Hans-Christian Burck: *Histologische Technik*, Thieme-Verlag, Stuttgart, ISBN 3-13-314306-9
- Werner Tackmann: *Repetitorium der Histologie: Teil 1 Zell- und Gewebelehre*, 1999, ISBN 3-932723-00-7 *Teil 2 Organe und Systeme*. 1999, ISBN 3-932723-01-5
- Gudrun Lang: *Histotechnik*. 2006, Springer-Wien-New York, ISBN 3-211-33141-7
- J.A. Kiernan: *Histological and histochemical Methods*. 1999, Arnold, ISBN 0-7506-4936-4

#### 2.7.3. სუდან IV-ღებვა (Sudan-Herxheimer's Staining)

სუდანის საღებავები არის სინთეზურად მიღებული აზოსაღებავები. ისინი იხსნებიან ნახშირწყლებში, ცხიმებში და ამდენად მოწოდებულია სწორედ ამ ნივთიერებების შესაღებად.

#### საღებავი PAS-ღებვის მასალა და ხსნარები

- სუდან-აცეტონი
- გამდინარე წყალი და ეთანოლი 70%
- 542 ფილტრის ქაღალდი

## სუდანის ხსნარის წარმოება

ხსნარი	რაოდენობა (გ,მლ)
<b>Sudan-Herxheimer's ხსნარი</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sudan IV- საღებავი Ethanol 70%</li> <li>▪ Azeton</li> </ul>	<b>5 გ</b>  <b>500 მლ</b>  <b>500 მლ</b>
<p>ხსნარი შერევისა და გამოყენების შემდეგ გაიფილტრა. იგი გადატანილ იქნა თავდაცულ სინჯარაში და ასე იქნა შენახული ოთახის ტემპერატურაზე.</p>	

### ცხრილი 20

## პროცედურა

A.carotis შეღებვა	ხანგრძლივობა	მოქმედება
➤ Ethanol 70%	1 Min.	ცხიმის მოცილება
➤ Sudan-Herxheimer's ხსნარი	20 Min.	ღებვა
➤ Ethanol 80% ჩაშვება	10 Sek.	რეცხვა
➤ Ethanol 80%	20 Min.	დეჰიდრირება
➤ გამდინარე წყალი	60 Min.	რეცხვა

### ცხრილი 21:

#### წყაროს ჩამონათვალი

- R.D.Lillie. Conn's Biological Stains. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, U.S.A.
- E.Gurr, (1971). Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. Academic Press, London, England.
- Aldrich chemical catalogue, 1992. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA.

## 2.7.4. მიკროსკოპია

მიკროსკოპიისათვის ჰისტოლოგიის განყოფილებაში მიკროსკოპების დიდი არჩევანი იყო (Baker Heart and Diabetes Research Institute, Melbourne, Australia). შემდეგი ხელსაწყოები იქნა გამოყენებული ამ ნაშრომის ფარგლებში: Olympus BH2, AxioCam MRc5 და LG დისექციური მიკროსკოპი.

## 2.8. სტატისტიკური გამოკვლევა

სტატისტიკური დამუშავება მოიცავდა საშუალო სიდიდეების (M) და მათი საშუალო სტანდარტული გადახრის გამოთვლას  $Mean \pm Std$ ;

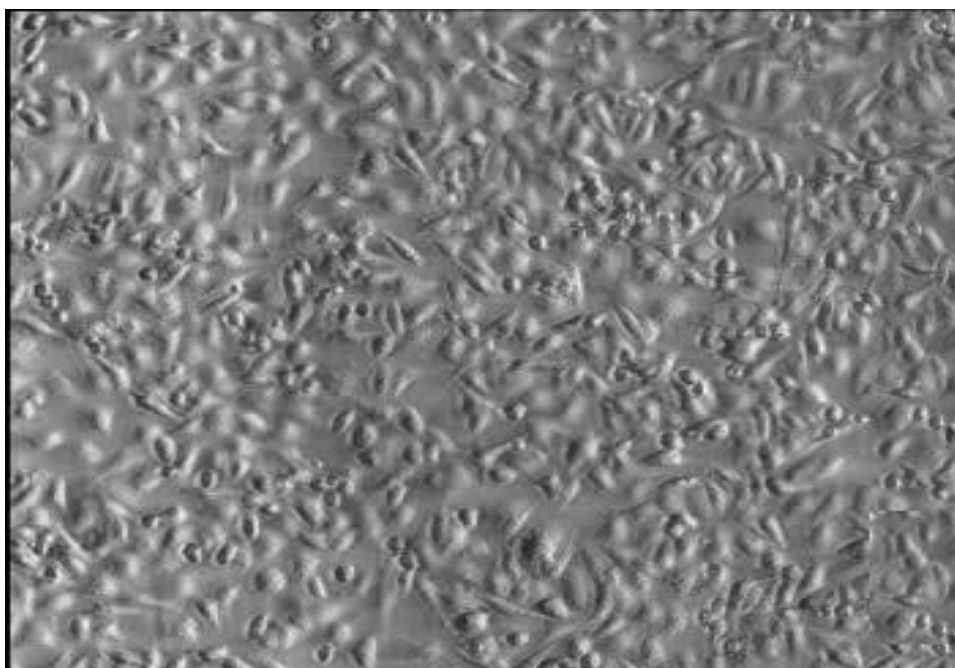
ჯგუფებს შორის განსხვავების შეფასებას ვახდენდით რაოდენობრივი მანკენებლებისათვის სტიუდენტის კოეფიციენტით ორმხრივი კრიტიკული არისთვის, დამოკიდებული ამონარჩევისათვის ვიყენებდით t- Test Paired Two Sample for Mean, ხოლო დამოუკიდებელი ამონარჩევისთვის t- independent Test, სადაც დისპერსიების ტოლობა მოწმდებოდა ლევენის ტესტით.

პარამეტრებს შორის ურთიერთკავშირის დასადგენად ჩატარდა პირსონის კორელაციური ანალიზი (pearson). 95% -იანი სარწმუნოების აღბათობით ( $p < 0,05$ ). მათემატიკური უზრუნველყოფა განხორციელდა პროგრამების პაკეტის SPSS 17-0 –ის გამოყენებით.

### 3. კვლევის შედეგები

#### 3.1. HMEC-1 უჯრედულ კულტურაზე მუშაობის შედეგები

ენდოთელური უჯრედები თამაშობენ კრიტიკულ როლს კომპლექსურ ფიზიოლოგიურ და პათოფიზიოლოგიურ პროცესებში როგორც არის ლეიკოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედება, ანთება, ანგიოგენეზი, ჭრილობის შეხორცება და ა.შ. ამ მექანიზმების შესასწავლად, მრავალ კვლევაში გამოყენებულ იქნა ენდოთელური უჯრედული კულტურები. ამ ნაშრომში როგორც ზემოთ უკვე ავლნიშნეთ გამოყენებულ იქნა HMEC-1 ენდოთელურ უჯრედული კულტურა. ქვემოთ წარმოდგენილ გამოსახულებაზე კარგად ჩანს გამოსაკვლევად მომზადებული ენდოთელური უჯრედების მონომოლეკულარული უჯრედების შრე. აუცილებელი პირობა დაგეგმილი ცდების ჩასატარებლად თავიდანვე იყო ამ უჯრედებზე VCAM-1 რეცეპტორის ექსპრესიის არსებობა.

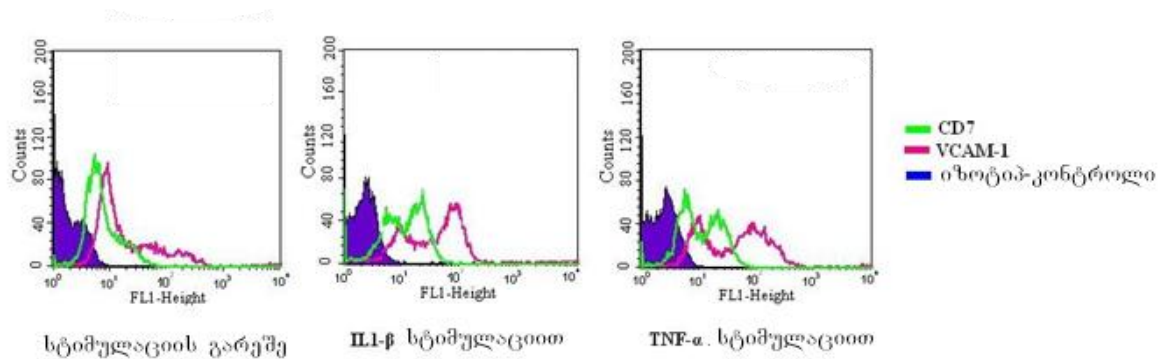


სურათი 22: HMEC-1 მონომოლეკულარული უჯრედების შრე



### 3.2. რეცეპტორექსპრესიის განსაზღვრა გამდინარე ციტომეტრიის გამოყენებით (FACS)

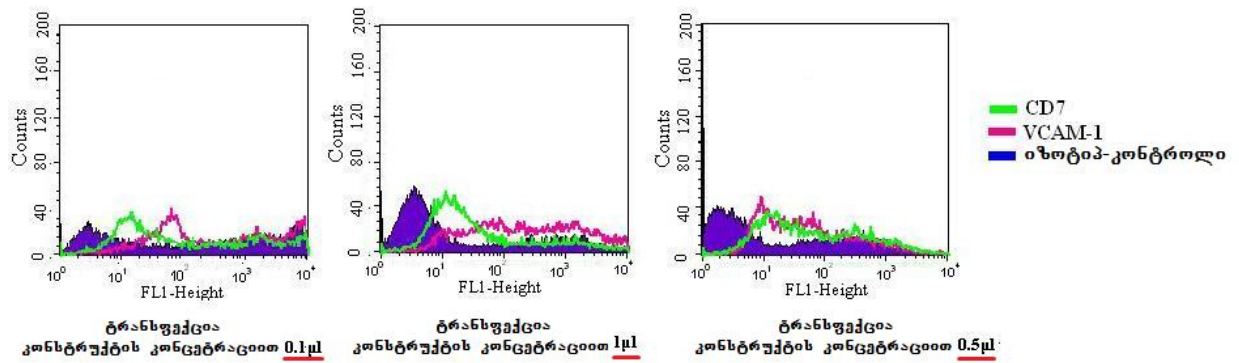
იმისათვის, რომ წარმოგვედგინა HMEC-1 უჯრედების როგორც ფენოტიპური მახასიათებლები ასევე მათი სტიმულაციისა და ტრანსფექციის შემდგომი ცვლილებები ჩავატარეთ ზოგიერთი ენდოთელურ უჯრედთან ასოცირებული ეპიტოპის გამდინარე ციტომეტრიული ანალიზი. VCAM-1- და CD7- ექსპრესია შეფასდა როგორც არასტიმულირებულ ასევე IL1-β და TNF-α სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე.



სურათი 23: VCAM-1 და CD7 ექსპრესია IL1-β- და TNF-α სტიმულირებულ HMEC-1 უჯრედებზე

როგორც ეს გამოსახულებაზე ჩანს HMEC-1 უჯრედებზე ექსპრესირებულია ორივე ეს ანტიგენი. უჯრედების სტიმულაციამ კი გვიჩვენა CD7 და განსაკუთრებით კი VCAM-1 ექსპრესიის მკვეთრი მატება.

CD7 და VCAM-1 ექსპრესია გამოკვლეულ იქნა ასევე CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის საშუალებით ენდოთელური უჯრედული კულტურის ტრანსფექციის შემდეგ. გამოყენებული იყო კონსტრუქტი ვირუსის სხვადასხვა კონცენტრაციებით რათა შეგვეჩინა მისი ეფექტური კონცენტრაცია და იგი შემდგომში დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში გამდინარე კამერის ცდებში გამოგვეყენებინა.



**სურათი 24: VCAM-1 და CD7 ექსპრესია CD7/VCAM-1 კონსტრუქტით ტრანსფეცირებულ HMEC-1 უჯრედებზე**

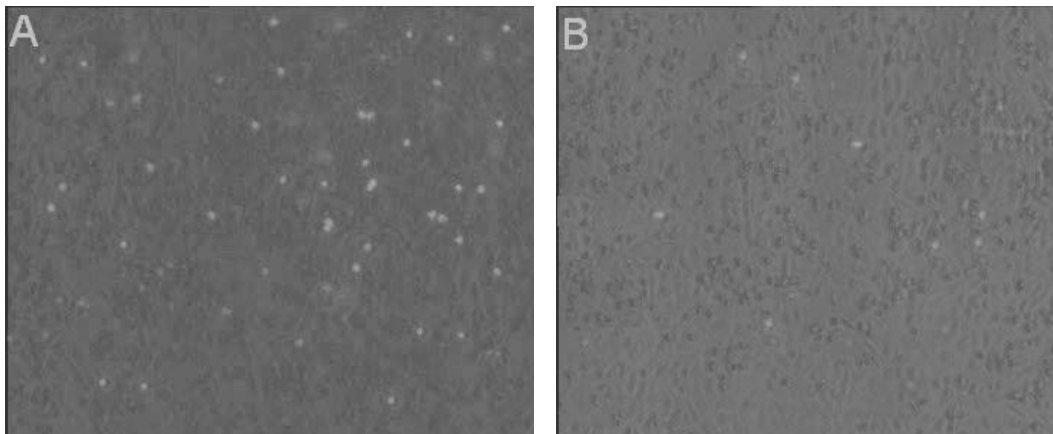
წარმოდგენილ ჰისტოგრამებზე კარგად ჩანს CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის ზემოქმედება HMEC-1 უჯრედებზე, კერძოდ კი ამ უჯრედების მიერ VCAM-1 რეცეპტორის ექსპრესიის დათრგუნვა სამივე კონცენტრაციის გამოყენებისას. ეს ცვლილება ძალიან თაღსაჩინოა არატრანსფეცირებულ-არასტიმულირებულ და ტრანსფეცირებულ-სტიმულირებულ უჯრედებზე ექსპრესიის შედარებისას (იხილეთ ჰისტოგრამები სურათებზე 23 და 24). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ კონსტრუქტის კონცენტრაცია 0.5μl ( $2,1 * 10^9$  PFU / ml) ამ თვალსაზრისით ყველაზე ეფექტური აღმოჩნდა. აქედან გამომდინარე შემდგომ გამდინარე კამერის დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში გამოყენებულ იქნა სწორედ კონსტრუქტის ეს კონცენტრაცია.

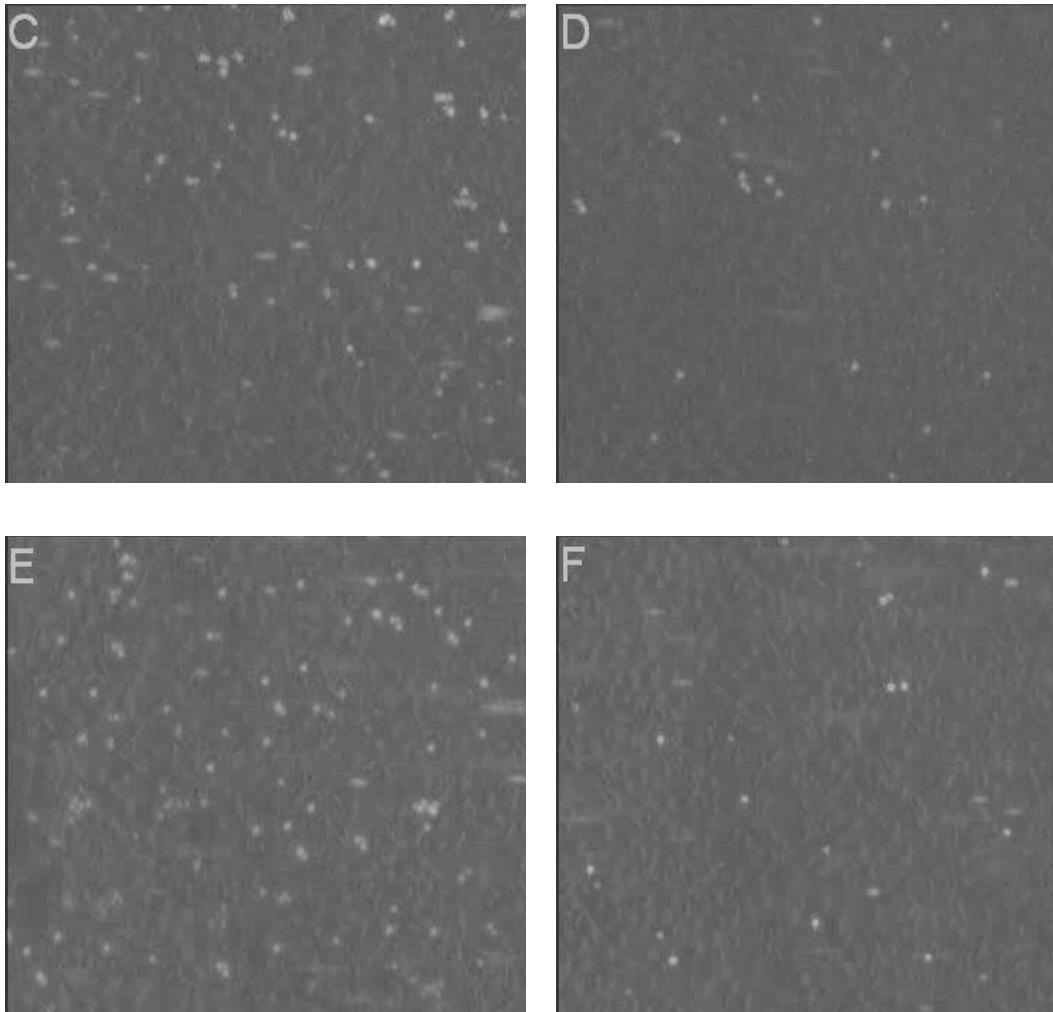
### 3.3. დინამიური ადჰეზიური კვლევის შედეგები (Flow Chamber)

#### 3.3.1. მონოციტების ადჰეზიის ბლოკადა ენდოთელურ უჯრედებზე დინების პირობებში

მონოციტ-ენდოთელურ ურთიერთქმედებაზე ხსნადი პროტეინის CD7/VCAM-1 ზეგავლენის დინების პირობებში შესასწავლად აღნიშნული ნაშრომის ფარგლებში გამოყენებულ იქნა გამდინარე კამერის მეთოდი. მონოციტარული რეცეპტორი VLA-4 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მონოციტებისა და ენდოთელიუმის ურთიერთქმედების პროცესში. VCAM-1 კი თვით წარმოადგენს ლიგანდს VLA-4-სათვის. მონოციტების ენდოთელიუმზე ადჰეზია სწორედ ამ კავშირის საშუალებით არის განპირობებული. შესაბამისად VCAM-1-ის ბლოკადა დიდი მნიშვნელობისაა

და CD7/VCAM-1 კონსტრუქტმა შესაძლოა სამომავლო თერაპიული გამოყენებაც კი ჰპოვოს. უნდა გადამოწმებულიყო რამდენად წარმოდგენდა თავისი აქტივაციის სპეციფიურობას ეს კონსტრუქტი დინამიურ ადჰეზიურ ფუნქციურ ცდებში. ზემოთ აღწერილი ოქმის თანახმად ჩატარდა დინამიური ადჰეზიური კვლევები HMEC-1 უჯრედული კულტურის საშუალებით. მონოციტები ადამიანის სისხლიდან ფიკოლ გრადიენტის საშუალებით იქნენ გამოყოფილნი. CD7/VCAM-1 კონსტრუქტის მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების ინჰიბიციის პოტენციალის შესაფასებლად ვიკვლევდით მონოციტების HMEC-1 ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე პირველად ადჰეზიასა (ე.წ.ბრუნვას) და მტკიცე ადჰეზიას როგორც ენდოთელური კულტურის სხვადასხვა პირობებში ასევე მონოციტების ანტი-CD49d ანტისხეულით დამუშავების, HMEC1 უჯრედების CD7/VCAM1 და GFP კონსტრუქტებით ტრანსფექციისა და IL1- $\beta$  და TNF- $\alpha$  სტიმულაციის სხვადასხვა კომბინაციაში. მონოციტების ბრუნვა და ადჰეზია HMEC-1 ენდოთელური კულტურის ზედაპირზე შეფასებულ იქნა პარალელურ გამდინარე კამერაში წინასწარგანსაზღვრული დინების სიჩქარის 15 dynes/cm<sup>2</sup> ფონზე. უჯრედების ადჰეზია და ბრუნვა ვიზუალიზებულ იქნა ვიდეო მიკროსკოპის საშუალებით, ექვსი რანდომულად შერჩეული არე 5 წამიან ვიდეოფილმებში იქნა გაანალიზებული.





სურათი 25: A - ადჰერირებული მონოციტები არატრანსფიცირებულ HMEC-1 უჯრედებზე; B – ადჰერირებული მონოციტები CD7/VCAM-1 ტრანსფიცირებულ HMEC-1 უჯრედებზე; C - ადჰერირებული მონოციტები IL1-β სტიმულირებულ HMEC-1 უჯრედებზე; D - ადჰერირებული მონოციტები IL1-β სტიმულირებულ და CD7/VCAM-1 ტრანსფიცირებულ HMEC-1 უჯრედებზე; E - ადჰერირებული მონოციტები TNF-α სტიმულირებულ HMEC-1 უჯრედებზე; F - ადჰერირებული მონოციტები TNF-α სტიმულირებულ და CD7/VCAM-1 ტრანსფიცირებულ HMEC-1 უჯრედებზე;

საინტერესო იყო ტრანსფიცირებულ უჯრედებზე მონოციტების ურთიერთქმედების შედარება არატრანსფიცირებულ კულტურასთან. ამასთანავე როგორც იყო აღნიშნული ადგილი ქონდა ენდოთელური უჯრედების სტიმულაციას ორი სხვადასხვა სტიმულატორით IL1-β და TNF-α და მათ იმავდროულ ტრანსფექციას CD7/VCAM-1 კონსტრუქტით. საინტერესო იყო ანტი- VCAM1, ანტი-VLA-4, ანტი-ICAM1 ანტისხეულების ზემოქმედების შესწავლაც მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედებისას. ცხრილებში ქვემოთ წარმოდგენილია თითოეულ საკვლევ გჯუფში მიღებული შედეგები.

3.3.2. მონოციტების ენდოთელიუმის ზედაპირზე მტკიცე ადჰეზიის შესწავლის შედეგები:

ცხრილი 22

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1-CD7/VCAM1+Monos	6.59	1.890	0.0015
HMEC1-GFP+Monos	16.02	2.478	
HMEC1-CD7/VCAM1+Monos-antiCD49d	5.88	1.967	0.0001
HMEC1-GFP+Monos-antiCD49	18.60	2.416	
HMEC1-CD7/VCAM1-antiCD106+Monos	4.57	1.969	0.0000
HMEC1-GFP-antiCD106+Monos	17.33	2.250	
HMEC1-CD7/VCAM1-antiCD106+Monos-antiCD49d	4.08	2.051	0.0028
HMEC1-GFP-antiCD106+Monos-antiCD49	14.29	2.077	

ცხრილიდან ჩანს, რომ CD7/VCAM1-ით ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ ნაკლებია, ვიდრე GFP-ით ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე.

ცხრილი 23

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მაჩვენებლების შედარებითი ანალიზი IL1β და TNFα სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1-IL1+Monos	46.06	6.774	0.0000
HMEC1-TNF+Monos	33.51	4.715	
HMEC1-IL1+Monos-ანტიCD49	42.89	8.076	0.1923
HMEC1-TNF+Monos-ანტიCD49d	41.94	4.109	
HMEC1-IL1-ანტიCD106+Monos	40.08	8.271	0.0038
HMEC1-TNF-ანტიCD106+Monos	36.46	4.163	
HMEC1-IL1-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d	35.85	10.427	0.0000
HMEC1-TNF-ანტიCD106+Monos-ანტიCD49d	23.45	5.790	

თვალსაჩინოა, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა IL1β-ით სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე TNFα-ით სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.

ცხრილი 24

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი  
ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე CD7/VCAM1 ტრანსფექციით/ტრანსფექციის  
გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	19.29	2.986	0.0000
HMEC1+Monos+CD7/VCAM1	6.59	1.890	
HMEC1+Monos-antiCD49	17.44	2.164	0.0019
HMEC1+Monos-antiCD49+CD7/VCAM1	12.88	1.967	
HMEC1-antiCD54+Monos	16.90	7.242	0.2349
HMEC1-antiCD54+Monos+CD7/VCAM1	16.74	6.750	
HMEC1-antiCD54+Monos-antiCD49	14.87	4.966	0.1131
HMEC1-antiCD54+Monos- antiCD49+CD7/VCAM1	14.77	5.035	
HMEC1-antiCD106+Monos	12.73	2.494	0.0012
HMEC1- antiCD106+Monos+CD7/VCAM1	7.56	1.969	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	10.71	2.157	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+CD7/VCAM1	4.08	2.051	

ცხრილიდან ჩანს, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა არატრანსფექცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შემთხვევაში.

ცხრილი 25

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი  
ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე IL1β სტიმულაციით/ სტიმულაციის გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	21.29	2.986	0.0001
HMEC1+Monos +IL1	46.06	6.774	
HMEC1+Monos-antiCD49	26.44	2.164	0.0021
HMEC1+Monos-antiCD49+IL1	42.89	8.076	
HMEC1-antiCD106+Monos	12.73	2.494	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1	40.08	8.271	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	10.71	2.157	0.0003
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+IL1	35.85	10.427	

თვალსაჩინოა, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე IL1 $\beta$  სტიმულაციით სარწმუნოდ მეტია ვიდრე სტიმულაციის გარეშე.

### ცხრილი 26

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე TNF $\alpha$  სტიმულაციით/ სტიმულაციის გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	21.29	2.986	0.0012
HMEC1+Monos +TNF	31.51	4.715	
HMEC1+Monos-antiCD49	17.44	2.164	0.0037
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF	29.84	4.109	
HMEC1-antiCD106+Monos	12.73	2.494	0.0123
HMEC1-antiCD106+Monos+TNF	24.46	4.163	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	10.71	2.157	0.0001
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+TNF	23.45	5.790	

ცხრილიდან ჩანს, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე TNF $\alpha$  სტიმულაციით სარწმუნოდ მეტია ვიდრე სტიმულაციის გარეშე.

### ცხრილი 27

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი IL1 $\beta$  სტიმულირებულ და CD7/VCAM1 ტრანსფეციირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos+IL1	46.06	6.774	0.0002
HMEC1+Monos+IL1-CD7/VCAM1	3.66	2.520	
HMEC1+IL1+Monos-antiCD49	42.89	8.076	0.0014
HMEC1+IL1+CD7/VCAM1+Monos-antiCD49	3.46	2.133	
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1	40.08	1.126	0.0023
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1-CD7/VCAM1	3.21	0.243	

HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+IL1	35.85	1.419	0.0000
HMEC1-antiCD106+IL1- CD7/VCAM1+Monos-antiCD49	2.53	0.217	

თვალსაჩინოა, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.

### ცხრილი 28

მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი TNF $\alpha$  სტიმულირებულ დაCD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos+TNF	33.51	4.715	0.0000
HMEC1+Monos+TNF -CD7/VCAM1	7.74	2.953	
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF	29.84	4.109	0.0086
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF - CD7/VCAM1	9.55	3.348	
HMEC1-antiCD106+Monos+TNF	27.46	4.163	0.0127
HMEC1-antiCD106+TNF - CD7/VCAM1+Monos	12.75	3.134	
HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+TNF	23.45	5.790	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+TNF -CD7/VCAM1	4.17	2.806	

ცხრილიდან ჩანს, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.



### 3.3.3. მონოციტების ენდოთელიუმის ზედაპირზე ბრუნვის/პირველადი ადჰეზიის

#### შესწავლის შედეგები:

#### ცხრილი 29

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1-CD7/VCAM1+Monos	13.77	2.817	0.0025
HMEC1-GFP+Monos	28.36	2.046	
HMEC1-CD7/VCAM1+Monos-antiCD49d	13.47	2.573	0.0037
HMEC1-GFP+Monos-antiCD49	26.38	1.939	
HMEC1-CD7/VCAM1-antiCD106+Monos	11.93	3.286	0.0018
HMEC1-GFP-antiCD106+Monos	24.43	2.598	
HMEC1- CD7/VCAM1-antiCD54+Monos-antiCD49	12.47	3.173	0.0001
HMEC1-GFP-antiCD106+Monos-antiCD49	23.46	1.952	

თვალსაჩინოა, რომ CD7/VCAM1-ით ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ ნაკლებია, ვიდრე GFP-ით ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე.

#### ცხრილი 30

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$

სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1-IL1+Monos	51.96	8.300	0.0005
HMEC1-TNF+Monos	35.28	5.835	
HMEC1-IL1+Monos-antiCD49	48.44	8.643	0.0029
HMEC1-TNF+Monos-antiCD49d	31.49	5.077	
HMEC1-IL1-antiCD106+Monos	43.38	9.380	0.023
HMEC1-TNF-antiCD106+Monos	32.02	4.613	
HMEC1-IL1-antiCD106+Monos-antiCD49d	38.05	11.738	0.0003
HMEC1-TNF-antiCD106+Monos-antiCD49d	25.75	5.496	

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა IL1 $\beta$ -ით სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე TNF $\alpha$  -ით სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.

ცხრილი 31

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე CD7/VCAM1 ტრანსფექციით/ტრანსფექციის გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	29.47	3.350	0.0000
HMEC1+Monos+CD7/VCAM1	13.77	2.817	
HMEC1+Monos-antiCD49	23.84	3.543	0.0014
HMEC1+Monos-antiCD49+CD7/VCAM1	18.47	2.573	
HMEC1-antiCD54+Monos	25.63	5.893	0.1795
HMEC1-antiCD54+Monos+CD7/VCAM1	25.24	2.920	
HMEC1-antiCD54+Monos-antiCD49	22.91	3.096	0.1090
HMEC1-antiCD54+Monos-antiCD49+CD7/VCAM1	22.47	3.173	
HMEC1-antiCD106+Monos	20.40	2.664	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos+CD7/VCAM1	11.93	3.286	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	17.56	2.437	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+CD7/VCAM1	10.43	3.467	

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა არატრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შემთხვევაში.

ცხრილი 32

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე IL1 $\beta$  სტიმულაციით/ სტიმულაციის გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	29.47	3.350	0.0059
HMEC1+Monos +IL1	41.96	8.300	
HMEC1+Monos-antiCD49	23.84	3.543	0.0129
HMEC1+Monos-antiCD49+IL1	34.44	8.643	
HMEC1-antiCD106+Monos	20.40	2.664	0.0000
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1	43.38	9.380	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	17.56	2.437	0.0012
HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+IL1	28.05	11.738	

თვალსაჩინოა, რომ მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე IL1β სტიმულაციით სარწმუნოდ მეტია ვიდრე სტიმულაციის გარეშე.

### ცხრილი 33

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი IL1β სტიმულირებულ დაCD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos+IL1	51.96	8.300	0.0077
HMEC1+Monos+IL1-CD7/VCAM1	9.54	3.976	
HMEC1+Monos-antiCD49+IL1	48.44	8.643	0.0001
HMEC1+Monos +IL1-CD7/VCAM1	9.80	3.639	
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1	43.38	9.380	0.0008
HMEC1-antiCD106+Monos+IL1- CD7/VCAM1	9.31	3.024	
HMEC1-antiCD106+Monos- antiCD49+IL1	38.05	11.738	0.0000
+IL1-CD7/VCAM1	5.23	2.409	

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა IL1β სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1-ით ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.

ცხრილი 34

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე TNF $\alpha$  სტიმულაციით/ სტიმულაციის გარეშე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos	29.47	3.350	0.0042
HMEC1+Monos +TNF	35.28	5.835	
HMEC1+Monos-antiCD49	23.84	3.543	0.0019
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF	31.49	5.077	
HMEC1-antiCD106+Monos	20.40	2.664	0.0008
HMEC1-antiCD106+Monos+TNF	29.02	4.613	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49	17.56	2.437	0.014
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+TNF	25.75	5.496	

ცხრილიდან ჩანს, რომ მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობა ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე TNF $\alpha$  სტიმულაციით სარწმუნოდ მეტია ვიდრე სტიმულაციის გარეშე.

ცხრილი 35

მონოციტების ბრუნვის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზი TNF $\alpha$  სტიმულირებულ და CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

ენდოთელური კულტურა/სტიმულაცია/ტრანსფექცია/ მონოციტები	Mean	Std. Dev.	p
HMEC1+Monos+TNF	35.28	5.835	0.0022
HMEC1+Monos+TNF -CD7/VCAM1	11.15	3.031	
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF	31.49	5.077	0.0005
HMEC1+Monos-antiCD49+TNF - CD7/VCAM1	9.75	3.036	
HMEC1-antiCD106+Monos+TNF	29.02	4.613	0.0018
HMEC1-antiCD106+TNF - CD7/VCAM1+Monos	8.35	3.537	
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+TNF	25.75	5.496	0.0021
HMEC1-antiCD106+Monos-antiCD49+TNF - CD7/VCAM1	6.21	3.579	

მონოციტების ბრუნვა TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე სარწმუნოდ მეტია ვიდრე CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე.

3.3.4. კორელაციური ანალიზის შედეგები:

ცხრილი 36

კორელაცია ენდოთელიუმის IL1β სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის მონოციტების მტკიცე ადჰეზიის შემთხვევაში

პარამეტრები	HMEC1-IL1β- CD7/VCAM1+Monos	HMEC1-IL1β - CD7/VCAM1+Monos- antiCD49d	HMEC1-IL1β- CD7/VCAM1- antiCD106+Monos	HMEC1-IL1β- CD7/VCAM1- antiCD106+Monos- antiCD49d
HMEC1-IL1 β +Monos	-.100 .472	.009 .949	-.007 .962	-.106 .445
HMEC1-IL1 β +Monos-antiCD49	-.182 .189	-.091 .513	-.092 .508	-.162 .243
HMEC1-IL1 β - antiCD106+Monos	-.096 .490	.003 .980	.016 .907	-.051 .712
HMEC1-IL1 β - antiCD106+Monos- antiCD49d	-.106 .444	-.091 .513	-.015 .916	-.086 .536

ცხრილი 37

კორელაცია ენდოთელიუმის TNFα სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის მონოციტების მტკიცე ადჰეზიის შემთხვევაში

პარამეტრები	HMEC1- TNFα - CD7/VCAM1+Monos	HMEC1- TNFα - CD7/VCAM1+Monos- antiCD49d	HMEC1- TNFα - CD7/VCAM1- antiCD106+Monos	HMEC1- TNFα - CD7/VCAM1- antiCD106+Monos- antiCD49d
HMEC1- TNFα+Monos	.382** .004	.263 .055	.292* .032	.311* .022
HMEC1- TNFα+Monos- antiCD49d	.144 .301	.018 .898	.058 .674	.118 .394
HMEC1-TNFα- antiCD106+Monos	.445** .001	.324* .017	.350** .010	.359** .008
HMEC1-TNFα- antiCD106+Monos- antiCD49d	.346* .010	.284* .037	.303* .026	.327* .016

ცხრილი 38

კორელაცია ენდოთელიუმის IL1 $\beta$  სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის მონოციტების ბრუნვის/პირველადი ადჰეზიის შემთხვევაში

პარამეტრები	HMEC1-IL1 $\beta$ - CD7/VCAM1+Monos	HMEC1-IL1 $\beta$ - CD7/VCAM1+Mono s-antiCD49d	HMEC1-IL1 $\beta$ - CD7/VCAM1- antiCD106+Monos	HMEC1-IL1 $\beta$ - CD7/VCAM1- antiCD106+Mono s-antiCD49d
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos	-.251 .068	-.210 .128	-.134 .333	-.062 .656
HMEC1-IL1 $\beta$ +Monos-antiCD49	-.395(**) .003	-.347(*) .010	-.257 .061	-.212 .124
HMEC1-IL1 $\beta$ - antiCD106+Monos	-.519(**) .000	-.474(**) .000	-.343(*) .011	-.315(*) .020
HMEC1-IL1 $\beta$ - antiCD106+Monos- antiCD49d	-.443(**) .001	-.393(**) .003	-.283(*) .038	-.232 .091

ცხრილი 39

კორელაცია ენდოთელიუმის TNF $\alpha$  სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის მონოციტების ბრუნვის/პირველადი ადჰეზიის შემთხვევაში

პარამეტრები	HMEC1- TNF $\alpha$ - CD7/VCAM1+Monos	HMEC1- TNF $\alpha$ - CD7/VCAM1+Monos- antiCD49d	HMEC1- TNF $\alpha$ - CD7/VCAM1- antiCD106+Monos	HMEC1- TNF $\alpha$ - CD7/VCAM1- antiCD106+Mon os-antiCD49d
HMEC1- TNF $\alpha$ +Monos	.208 .132	.157 .258	.175 .207	.240 .080
HMEC1- TNF $\alpha$ +Monos- antiCD49d	.157 .257	.110 .429	.202 .142	.257 .061
HMEC1-TNF $\alpha$ - antiCD106+Monos	.469(**) .000	.433(**) .001	.502(**) .000	.461(**) .000
HMEC1-TNF $\alpha$ - antiCD106+Monos- antiCD49d	.282(*) .039	.221 .109	.378(**) .005	.390(**) .004

მონოციტების პირველადი ადჰეზიის გჯუფებში კორელაციური ანალიზის შედეგად მნიშვნელოვანია შემდეგი კორელაციური კავშირების გამოვლენა:

HMEC1- IL1 $\beta$ -CD7/VCAM1+Monos სარწმუნო უარყოფით კორელაციას ამჟღავნებს HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos-antiCD49-თან, HMEC1- IL1 $\beta$  -antiCD106+Monos-თან და HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos-antiCD49d-თან, შესაბამისად:  $r=-0.395$ ,  $p=0.003$ ,  $r=-0.519$ ,  $p=0.000$ ,  $r=-0.443$ ,  $p=0.001$ ;

HMEC1- IL1 $\beta$ -CD7/VCAM1+Monos-antiCD49d სარწმუნო უარყოფით კორელაციას ამჟღავნებს HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos-antiCD49-თან, HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos-თან და HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos-antiCD49d-თან, შესაბამისად:  $r=-0.347$ ,  $p=0.010$ ,  $r=-0.474$ ,  $p=0.000$ ,  $r=-0.393$ ,  $p=0.003$ ;

HMEC1- IL1 $\beta$ -CD7/VCAM1-antiCD106+Monos სარწმუნო უარყოფით კორელაციას ამჟღავნებს HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos და HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos-antiCD49d-თან შესაბამისად  $r=-343$ ,  $p=0.011$ ,  $r=-283$ ,  $p=0.038$ .

HMEC1-IL1 $\beta$ -CD7/VCAM1-antiCD106+Monos-antiCD49d სარწმუნო უარყოფით კორელაციას ამჟღავნებს HMEC1- IL1 $\beta$ -antiCD106+Monos-თან, შესაბამისად  $r=-315$ ,  $p=0.020$ .

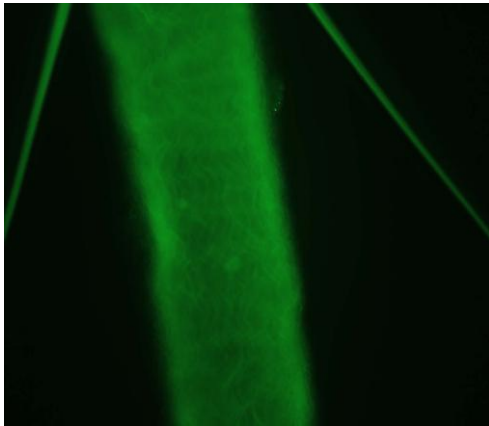
აღნიშნულიდან გამომდინარე ვასკნით, რომ რაც მეტად სტიმულირებულია ენდოთელური კულტურა IL1 $\beta$  სტიმულატორით მით ნაკლებია მონოციტების პირველადი ადჰეზია CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფეცირებული ენდოთელიუმის ზედაპირზე.

### 3.4. In Vivo სამუშაოების შედეგები

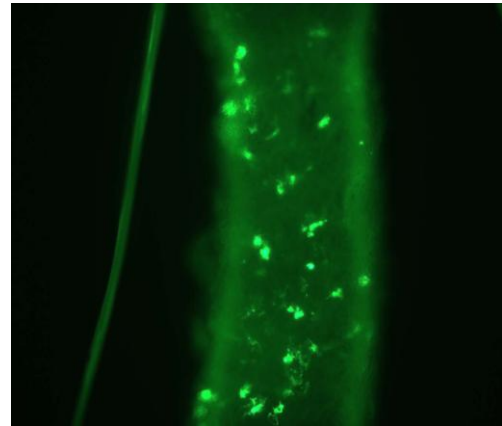
წინარე კვლევებმა, რომლებიც უჯრედული კულტურის ექსპერიმენტების ფარგლებში ჩატარდა, წარმოაჩინა ხსნადი პროტეინის CD7/VCAM-1 მაინჰიბირებელი ეფექტი ენდოთელიუმზე მონოციტების ადჰეზიასა და ბრუნვასთან მიმართებაში. თუმცა მათ მხოლოდ ნაწილობრივ შეეძლოთ აღენოვირალური კონსტრუქტის ეფექტის გამოვლენა. საჭირო იყო ხსნადი პროტეინის გამოყენებით VCAM-1 რეცეპტორის კონკურენტული ინაქტივაციის შესწავლა in vivo ექსპერიმენტებში. ამისათვის ტრანსგენური ApoE $^{-/-}$  თაგვები იქნენ გამოყენებული. ამ ცხოველებს სპონტანურად და განსაკუთრებით ცხიმით მდიდარი დიეტის ფონზე უვითარდებათ ათეროსკლეროზული ფოლაქები. უნდა შეგვესწავლა ხსნადი პროტეინის გავლენა ათეროგენეზის საწყის პროცესზე, კონკრეტულად კი კაროტიდულ არტერიაში მიმდინარე პათოლოგიურ პროცესებზე. ეს ცხოველები ლიტერატურაში აღწერილია

როგორც ყველაზე შესაფერისი ცოცხალი მოდელი ათეროსკლეროზის კვლევისათვის.

როგორც ეს ნაშრომის II თავში იყო აღწერილი *in vivo* კვლევებში სხვადასხვა გზები გამოიცადა, რათა მომხდარიყო ხსნადი კონსტრუქტით ენდოთელური შრის ტრანსფექცია. აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებისას GFP ვირალური ვექტორის შეღწევა ენდოთელიუმში არ დადასტურდა, ბიოლუმინისცენტრული მიკროსკოპით მწვანე მოფლურესცენცირე პროტეინის (დადებითი კონტროლის) ენდოთელურ უჯრედებზე ვიზუალიზაცია არ გამოვლინდა, თუმცა კარგად ჩანდა სისხლძარღვის გარე შრეებისა და მიმდებარე ქსოვილების ლუმინესცენცია. ამ მეთოდზე მუშაობა შეწყდა.



არა-რანსფიცირებული



ტრანსფიცირებული და CD7 FITC  
შედებილი

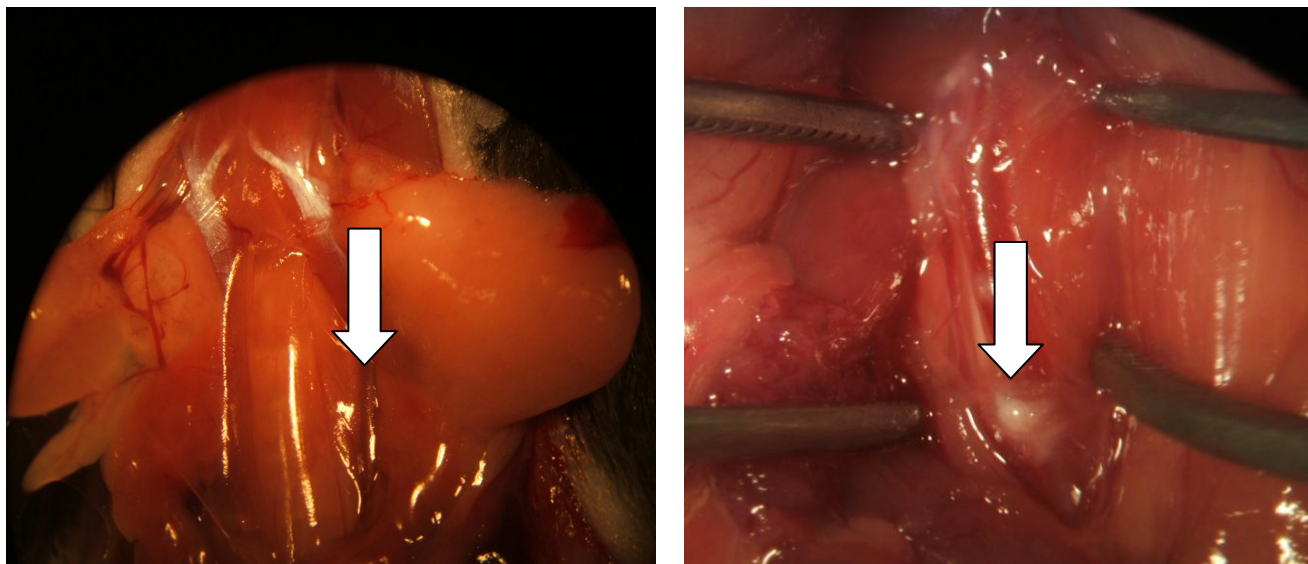
### სურათი 18: GFP კომპლექსით საძილე არტერიის ვიზუალიზაცია

აღწერილი პრობლემის წამოჭრის გამო შემუშავებულ იქნა ალტერნატიული ტრანსფექციის ტექნიკა. კერძოდ კი კაროტიდულ არტერიაში უწვრილესი კანულების საშუალებით სასურველი მასალის ინექციის ოპერაცია. ქვემოთ წარმოდგენილია შედეგები, რომლებიც მივიღეთ აღნიშნული კვლევების ჩატარების შემდგომ.

სურათი 26-ზე თვალსაჩინოა, რომ საძილე არტერიაში ადგილი ქონდა არტერიის



პათოლოგიურ სახეცვლილებას. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს სწორედ ტრანსფექციისას ინექციის არეა. საინტერესოა ფაქტი, რომ როგორც ხსნადი პროტეინის გამოყენებისას ასევე დადებითი კონტროლისა და უარყოფითი კონტროლის - ბუფერული ხსნარის (pH=7,4) გამოყენების შემთხვევაში ადგილი ქონდა მზგავსი პათოლოგიური ცვლილებების გამოვლენას.



სურათი 26: მარცხნივ - ApoE<sup>-/-</sup> თაგვის A. Carotis, ტრანსფექციამდე; მარჯვნივ - ApoE<sup>-/-</sup> თაგვის A. Carotis CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შემდეგ.

### 3.4.1. ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტურ თაგვებში ათეროსკლეროზის მორფოლოგიური დახასიათება ჰისტოლოგიური კვლევის შედეგად

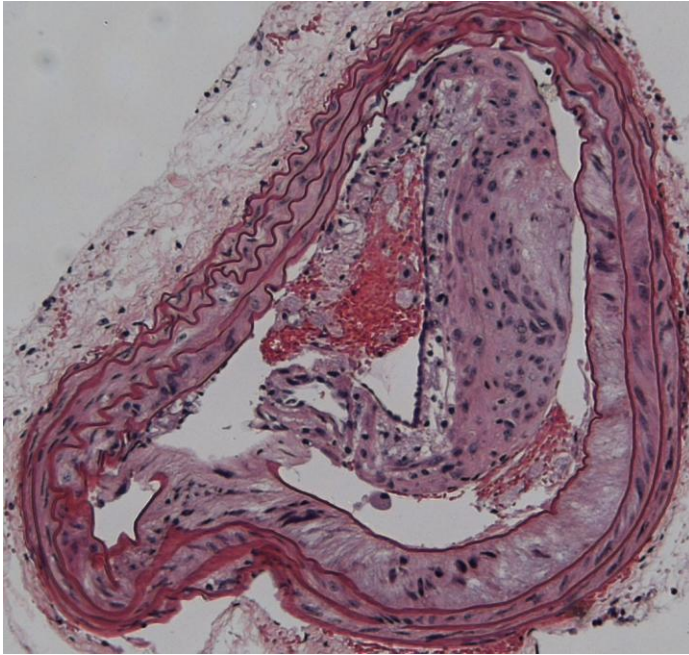
ApoE<sup>-/-</sup> თაგვები წარმოადგენენ საუკეთესო ცოცხალ ათეროსკლეროზის მოდელს, რომელთა დაზიანებულ სისხლძარღვებზე დაკვირვება ათეროსკლეროზის კვლევის შესანიშნავი საშუალებაა. ApoE<sup>-/-</sup> თაგვების სისხლძარღვის კედელში ათეროსკლეროზული ცვლილებების წარმოსაჩენად ვამზადებდით საძილე არტერიის ჰისტოლოგიური ანათლებს და ვახდენდით მათ ჰისტოლოგიურ კვლევას ზემოთ აღწერილი მეთოდების გამოყენებით. ჰისტოლოგიურ ანათლებში უნდა გამოგვეკვლია ათეროსკლეროზის გავრცელების ხარისხი ლიტერატურაში აღწერილი, აღიარებული კრიტერიუმების თანახმად (როგორებიც არის ანთების ხარისხი, ფიბრობლასტების პროლიფერაცია, ლეიკოციტების ინფილტრაცია, ჰიპერპლაზია და ა.შ.) და ის ცვლილებები, რაც შესაძლოა მოყოლოდა კაროტიდული არტერიის CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციას. ამ შრომაში ჰისტოლოგიურმა გამოკვლევებმა გვიჩვენა, რომ ინექციის ტექნიკის გამოყენებას

შედგება ქონდა სისხლძარღვებში განსაკუთრებით კი ინექციის არეში პათოლოგიური ცვლილებების განვითარება. ამდენად ნაცვლად იმისა, რომ გამოგვეკვლია კონსტრუქტის ეფექტი, ნაოპერაციებ ტრანსფიცირებულ კაროტიდულ არტერიებში განვითარდა გლუვი კუნთოვანი ქსოვილის პროლიფერაცია, არტერიის კედლის ფიბროზული მასებით, კომპექსური ნახშირწყლებით, კალციუმის დეპოზიტებით, ლიპიდებითა და მაკროფაგებით ინფილტრაცია.

### **3.4.2. პათოლოგიური ათეროსკლეროზული ცვლილებები წარმოდგენილი H&E და PAS ღებვის მეთოდებით**

ჰემატოქსილინ-ეოზინით ღებვა არის ჰისტოლოგიური ღებვის ერთერთი მეთოდი, რომლის საშუალებითაც ადგილი აქვს რბილი ქსოვილის ანათალის სხვადასხვა სტრუქტურის ვიზუალიზაციას. ჰემატოქსილინი არის ბუნებრივი საღებავი. იმისათვის რომ მან თავისი ღებვის უნარი გამოავლინოს იგი ჰემალაუმად უნდა გარდაიქმნას. ჰემალაუმი კი ყველა მჟავა ბაზოფილურ სტრუქტურას ლურჯად ღებავს, განსაკუთრებით კი უჯრედის ბირთვებს (რომლებიც დნმ-ს შეიცავენ) და შიშველ ენდოპლაზმურ რეტიკულუმს. ეოზინი არის სინთეზური მჟავა ნივთიერება და ღებავს ყველა აციდოფილურ კერძოდ კი ბაზალურ სტრუქტურებს წინთლად, რაც პირველ რიგში მოიცავს უჯრედის პლაზმურ პროტეინებს.

H&E-ღებვამ მოგვცა საშუალება გამოგვევლინა ათეროსკლეროზული ცვლილებების განვითარების ხარისხი ApoE-/- დეფიციტურ თაგვებში. ღებვის ეს მეთოდი არის ყველაზე ფართოდ გამოყენებული მეთოდი ქსოვილის, უპირატესად კი ენდოთელიუმის შეფასებისათვის. გამოსახულებები ქვემოთ წარმოდგენენ ApoE-/- დეფიციტურ თაგვებში ათეროსკლეროზული ცვლილებების მორფოლოგიურ ასახვას:



სურათი 27

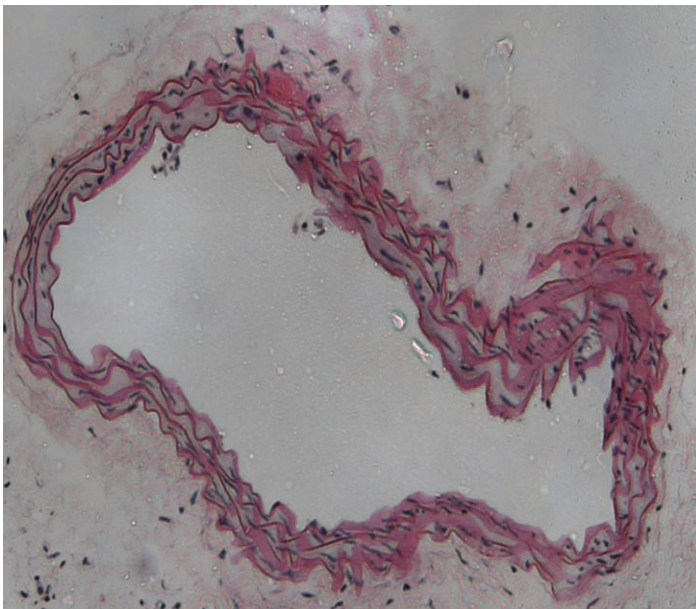
ApoE-/- დეფიციტური

თაგვის A.Carotis

CD7/VCAM-1

ტრანსფიცირებული მხარე

H&E ღებვა, 10x გადიდება



სურათი 28

ApoE-/- დეფიციტური

თაგვის A.Carotis

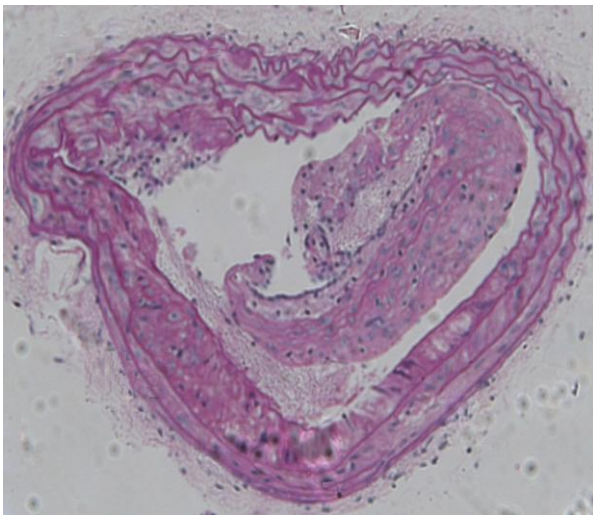
არატრანსფიცირებული

მხარე

H&E ღებვა, 10x გადიდება

ამ შემთხვევაშიც კარგად ჩანს, რომ CD7/VCAM-1 ტრანსფიცირებული საძილე არტერიის ენდოთელი პათოლოგიურად არის გადაგვარებული. უჯრედის ბირთვები კარგად ჩანს ხოლო სისხლძარღვის კედლის სტრუქტურა სრულიად შეცვლილია. ასევე კარგად ჩანს სისხლძარღვის კედლის ინფილტრაცია მონოციტებითა და მაკროფაგებით. ათეროსკლეროზის ამსახველი უჯრედული და ქსოვილოვანი სურათი ასევე წარმოდგენილია არატრანსფიცირებულ სისხლძარღვშიც, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ეს ცვლილებები გაცილებით მცირეა ნაოპერაციებ მხარესთან შედარებით.

რაც შეეხება PAS – Periodic acid-Schiff ღებვას იგი არის ხშირად გამოყენებული ღებვის ტექნიკა ჰისტოლოგიაში. იღებება გლიკოგენი, ცელულოზა, ნეიტრალური მუკოპოლისაქარიდები, მუკო- და გლიკოპროტეინები და გლიკოლიპიდების სუბსტანციები, რომლებიც მდებარეობენ კოლაგენში, ბაზალურ მემბრანაში, უჯრედის კედლებში და ნეიტრალურ ლორწოებში. ღებვის პრინციპი არის გლიკოჯგუფების ოქსიდაცია ალდეჰიდჯგუფებად პერისმეავის მეშვეობით. მომდევნო ეტაპებზე ადგილი აქვს კონტრასტით მდიდარი ბირთვების ღებვას ჰემალაუმის საშუალებით. ღებვის შედეგები ასე გამოიყურება: ნეიტრალური მოკოპოლისაქარიდები - წითლად, უჯრედის ბირთვები ლურჯ-ისფრად, ციტოპლაზმა-წითლად, რნმ-ით მდიდარი ციტოპლაზმა ლურჯად.



სურათი 29

ApoE-/- დეფიციტური თაგვის  
**A.Carotis**  
**CD7/VCAM-1**  
 ტრანსფიცირებული მხარე  
**PAS ღებვა, 10x გადიდება**



სურათი 30

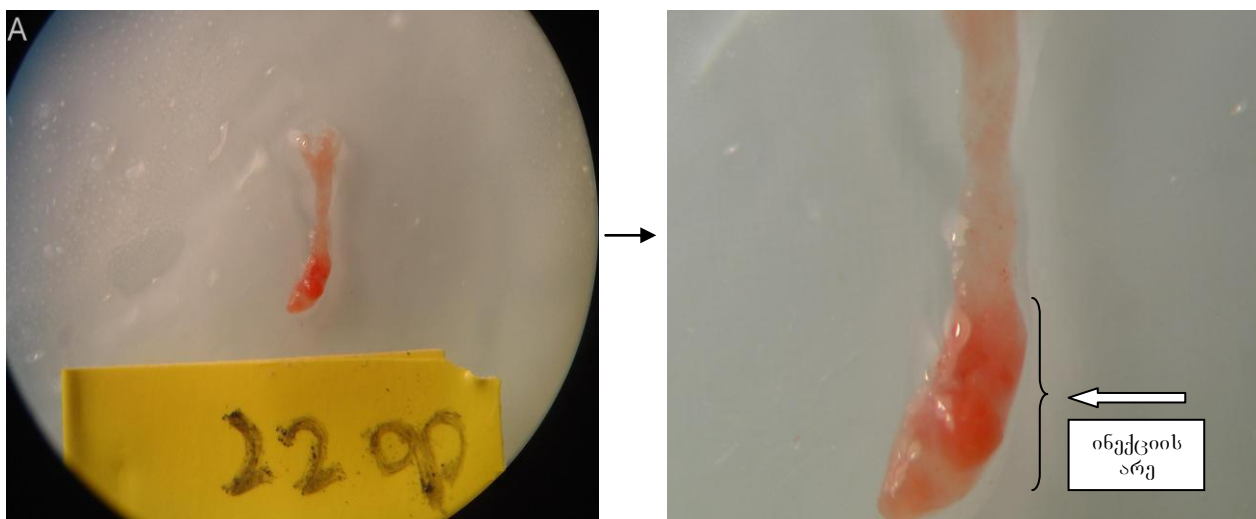
ApoE-/- დეფიციტური თაგვის  
**A.Carotis**  
 არატრანსფიცირებული მხარე  
**PAS ღებვა, 10x გადიდება**

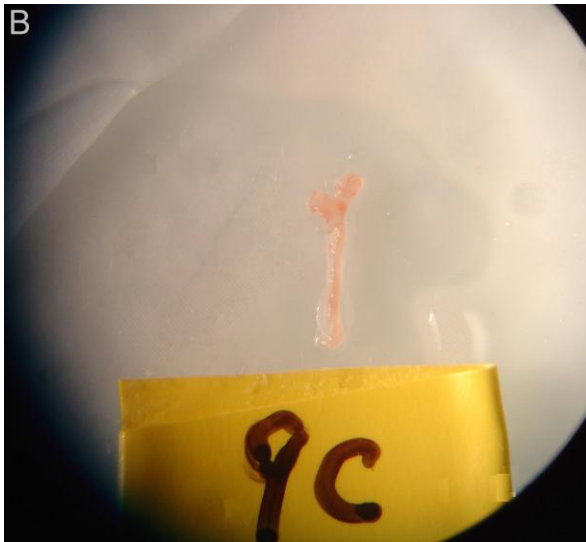
ორივე გამოსახულებაზე ჩანს ათეროსკლეროზის პათოლოგიური სურათი, ისევე როგორ **H&E** ღებვის შემთხვევაში. პათოლოგიური ათეროსკლეროზული ცვლილებები, რომლებიც გამოვლენილია ApoE-/- თაგვის CD7/VCAM-1

ტრანსფიცირებულ სისხლძარღვში მნიშვნელოვნად ნაკლებად ვლინდება არატრანსფიცირებულ სისხლძარღვში. მთლიანობაში კი ჩანს, რომ სისხლძარღვის კედლის ყველა შრე თანაბრად არის შეღებილი, შემაერთებელქსოვილოვანი სტრუქტურები მდიდარია ლიპიდების შემცველობით. დაზიანებები კი რომელიც ვლინდება ინტიმის გასქელებით, რაც გამოწვეულია ლიპიდებისა და მონოციტ/მაკროფაგული ინფილტრაციებით გამოვლენილია როგორც ტრანსფიცირებულ ასევე არატრანსფიცირებულ სისხლძარღვის კედელში, თუმცა საკმაო უპირატესობით ნაოპერაციები სისხლძარღვის შემთხვევაში.

### 3.4.3 სუდან IV ღებვის შედეგები

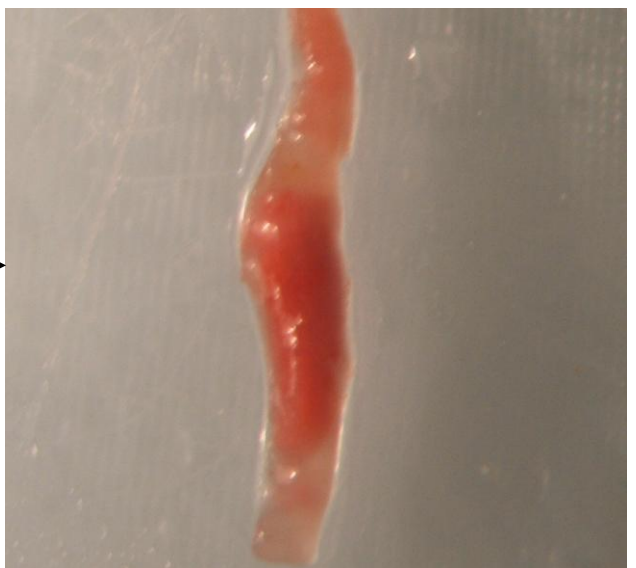
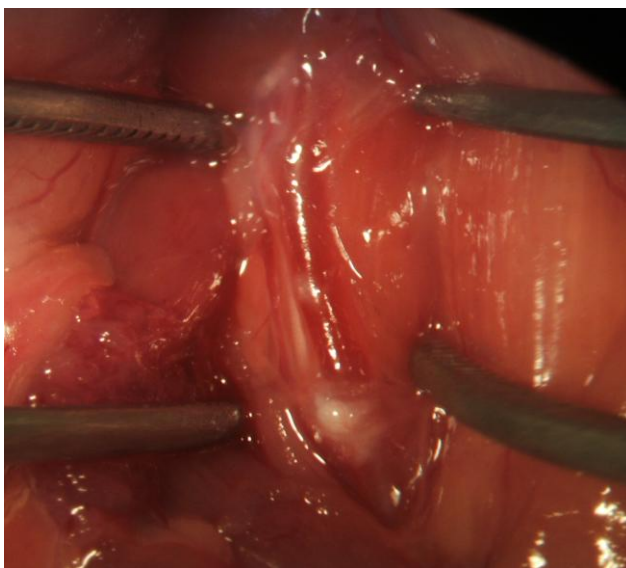
სუდან IV ღებვა არის პროგრესული ღებვა, რომლის დროსაც ფერით იღებება მხოლოდ ქსოვილის სასურველი ნაწილები, კერძოდ ცხიმოვანი ქსოვილი. ყველა სუდან IV-ით შეღებილ საძილე არტერიების შემთხვევაში დაზიანებული სისხლძარღვის დანახვა მარტივად შესაძლებელია შეუიარაღებელი თვალითაც, ვინაიდან შეღებილი ცხიმოვანი ქსოვილი წითელი ფერით გამოირჩევა სხვა ქსოვილებისაგან. ქვემოთ წარმოდგენილია ტრანსფიცირებული და არატრანსფიცირებული სისხლძარღვები. ტრანსფიცირებული სისხლძარღვის შემთხვევაში შესამჩნევია საღებავის ძლიერი ჩართვა საკონტროლო სისხლძარღვთან შედარებით. განსაკუთრებით თვალში საცემია ტრანსფიცირებული სისხლძარღვის ქვედა მესამედი, რომელიც სწორედ შეესაბამება ტრანსფექციისას ინექციის ადგილს.





სურათი 31: ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტური თაგვის Op(operated)ნაოპერაციები, ტრანსფიცირებული არანაოპერაციები, არატრანსფიცირებული მხარე.

A. Carotis, სუდან IV ღებვა, A - მხარე; B - C(control) კონტროლი,



სურათი 32: მარცხნივ - ApoE<sup>-/-</sup> თაგვის A. Carotis CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შემდეგ; მარჯვნივ - ApoE<sup>-/-</sup> თაგვის A. Carotis სუდან IV ღებვა, CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შემდეგ;

#### IV მიღებული შედეგების განხილვა

მონონუკლეარული უჯრედების ადჰეზია ენდოთელური ანთების კერებში არის ერთერთი პირველი ნაბიჯი ათეროსკლეროზული ფოლაქის განვითარებაში. ეს ადჰეზია ხორციელდება უამრავი სხვადასხვა რეცეპტორისა და ლიგანდის სპეციფიური ურთიერთქმედების გზით. ერთერთ უმნიშვნელოვანეს მოლეკულას მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების პროცესში წარმოადგენს VCAM1. იგი არის იმუნოგლობულინის მზგავსი ენდოთელური ადჰეზიური მოლეკულა, რომელიც ფართოდ არის ექსპრესირებული ადამიანის ათეროსკლეროზულ ფოლაქებში და ათეროსკლეროზული დაზიანების არეებში. იგი სტრუქტურულად ICAM1-ის მზგავსია, თუმცა რეგულაციის მისი მოდელი უნიკალურია. მნიშვნელოვანია ფაქტი, რომ VCAM1 არ არის ექსპრესირებული ენდოთელურ უჯრედებზე საწყის, არაანთებით მდგომარეობაში, მისი ექსპრესია სწრაფად ვითარდება ენდოთელური აქტივაციის მეშვეობით, რაც გულისხმობს ენდოთელიუმზე რეაქტიული ოქსიგენური მოლეკულების პროდუქციას, ციტოკინების აქტივაციას. ამ ადჰეზიური მოლეკულის ზე-რეგულაცია ანთების პირობებში დადასტურებულია ათეროსკლეროზული დაზიანების უბნებში, ათეროსკლეროზულ ფოლაქებში მაღალსპეციფიური გამოკვლევის საშუალებებით. მისი ექსპრესია არაერთხელ იქნა დემონსტრირებული კვლევებში თაგვებსა და ბოცვრებზე. ეს კიდევ ერთხელ ცხადყოფს VCAM1-ის სპეციფიურობას ამ დაავადების პათოგენეზში და წარმოაჩენს მას მიმზიდველ თერაპიულ სამიზნედ ათეროსკლეროზის მკურნალობაში.

მრავალი კვლევა განიხილავს VCAM-1 როგორც ერთერთ უმნიშვნელოვანეს ენდოთელურ რეცეპტორს და მედიატორს მონოციტების ადჰეზიისა და ტრანსმიგრაციის პროცესში. მნიშვნელოვანია, რომ მონოციტებზე არსებული ინტეგრინი  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) არის ყველაზე დიდი ლიგანდი ვასკულური ადჰეზიური მოლეკულა-1-თვის. აქამდე არსებული კვლევები ხშირად მოიხსენიებდა VCAM-1 განპირობებულ მონოციტების ადჰეზიას (Alon R., 1995, Carter R., 2001, Huo Y., 2000, etc.). ასევე უნდა აღინიშნოს, რომ არსებობს კორელაცია VCAM-1 ადამიანის ათეროსკლეროზული დაზიანების არეებში მათ მაღალ ექსპრესიასა და ამ არეებში მონოციტების აკუმულაციას შორის (O'Brien *et al.*, 1996). სხვა *in vitro* ცდებში ნაჩვენებია იყო, რომ VCAM-1, რომელიც ექსპრესირებულია ენდოთელური და გლუვი კუნთოვანი უჯრედების მიერ, ხელს უწყობდა მონოციტებისა და

ლიმფოციტების ადჰეზიას (Carlos *et al.*, 1990; Cybulsky & Gimbrone, 1991; Henseleit *et al.*, 1994). ვირთხებში VCAM-1 მომატებული ექსპრესია არტერიების დაზიანების შემდეგ განაპირობებდა მონოციტებისა და მაკროფაგების ადჰეზიას (Landry *et al.*, 1997). მოგვიანებით ცდებში კი აღნიშნული რეცეპტორის ბლოკადა ანტი-VCAM1 ანტისხეულის საშუალებით გამდინარე ექსპერიმენტებში, რომელთა დროსაც ApoE-/- თაგვების საძილე არტერიაში მონოციტების ინექცია ხდებოდა, იწვევდა სისხლძარღვის კედელზე მიმაგრებული მონოციტების მოცილებას (Huo *et al.*, 2000). შანგის მიერ დადგენილ იქნა, რომ მონოციტების მიგრაცია HUVEC უჯრედებში ანტი-VCAM-1 ანტისხეულის საშუალებით სრულიად ბლოკირდა (Shang *et al.*, 1998). თუმცა აღნიშნული ანტისხეულით ამ რეცეპტორის ბლოკირების ეფექტურობა ჩატარებული სხვა ცდებით გამოირიცხა (Gerszten *et al.* (1998). ლორენცოს მიერ ჩატარებულმა კვლევებმა ცხადყო, რომ ზედაპირული რეცეპტორის ანტი-VCAM-1 ბლოკირება უჯრედშიდა კალციუმის შემცველობას პათოლოგიურად ცვლიდა და სტრესბოჭკოებს წარმოშობდა (Lorenzon *et al.*, 1998). სხვა ცდების შედეგად დადგენილ იქნა, რომ VCAM1 ლეიკოციტების ენდოთელზე მიზიდვის ნებისმიერ ეტაპზე მონაწილეობს (Gerszten *et al.* 1998). მზგავსი სიგნალების ფუნქციონირება უფრო ადრეულ კვლევებშიც აღინიშნა (Carlos & Harlan, 1994), (Yoshida *et al.*, 1996). თუმცა VCAM1-ის უპირატესი როლი მონოციტების ენდოთელზე მიზიდვის პროცესში მოგვიანებით კვლევებში E-Selectin და ICAM-1 შესწავლის შედეგად გამოიკვეთა. ყველა გამოკვლევას ერთი რამ აერთიანებდა, რომ VCAM-1 ყოველთვის ექსპრესირებული იყო ათეროსკლეროზული დაზიანების უბანში. ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე ლოგიკური იყო რომ მისი ბლოკადის შედეგად იმუნური პასუხის ეფექტური უკუგანვითარება მიგველო.

როგორც უკვე აღინიშნა ქ.ფრაიბურგის საუნივერსიტეტო კლინიკის ანგიო-კარდიოლოგიურ განყოფილებაში შექმნილი მოლეკულების კომპლექსი შედგებოდა ინტრაცელულარული β3 ნაწილისა და ექსტრაცელულარული ტრანსმემბრანული CD7 ნაწილისაგან, ე.წ. ინერტული მარკერისაგან. კონცეფციის გამოცდისათვის მრავალი კვლევა ჩატარდა სხვადასხვა ადჰეზიურ მოლეკულებზე. CD7/VCAM-1 კონსტრუქტი შეიქმნა შიდაუჯრედული VCAM1 და ექსტრაცელულური და ტრანსმემბრანული CD7 ნაწილისაგან იმ მიზნით, რომ მას მოეხდინა კონკურენტული დომინანტური ზემოქმედება უჯრედის VCAM1 რეცეპტორზე,



განხორციელებინა მისი ინაქტივაცია, რასაც შედეგად მონოციტ-ენდოთელური ურთიერთქმედების შეზღუდვა ექნებოდა.

ისევე როგორც ჩატარებულ მრავალ კვლევაში, მარჰეინეკეს კვლევებშიც დადასტურდა, რომ ეს რეცეპტორი პასუხისმგებელია როგორც მონოციტების ადჰეზიაზე ასევე მათ ტრანსმიგრაციაზე (Marheinenke, 2002). თუმცა აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ამ კვლევების ფარგლებში ადგილი ქონდა VCAM-1 ფუნქციის შეფასებას ადჰეზიის სტატიურ მოდელში. VCAM-1 შესახებ მოპოვებულ ინფორმაციაზე დაყრდნობით მოსალოდნელი იყო, რომ მისი ფუნქცია ზემოთ აღნიშნულ პროცესებში დათრგუნულიყო ხსნადი პროტეინის ზემოქმედებით. საჭირო იყო ამ პროცესის დინამიური ადჰეზიური კვლევის მოდელში შესწავლა. ასეთი მიდგომისათვის ასევე გადამწვევტი გახდა მანამდე ჩატარებული ცდები ინტეგრინით განპირობებული უჯრედული ადჰეზიის ინჰიბიციისა ხსნადი პროტეინების ზემოქმედებით (Marheineke, 2002).

მარჰეინეკეს კვლევებში შესწავლილ იქნა ენდოთელის ზედაპირული რეცეპტორების ICAM-1 და E-სელექტინის როლი, ვინაიდან ისინი VCAM-1 ერთად იმ უმნიშვნელოვანეს მოლეკულებს მიეკუთვნებიან, რომლებიც ანთებით პროცესებში და ათეროსკლეროზის პროგრესირებაში მონაწილეობენ. თუმცა შედეგებმა გვაჩვენა, რომ ხსნადი პროტეინი CD7/VCAM ბუნებრივ VCAM-1 რეცეპტორს სპეციფიურად აბლოკირებდა და მას არ ქონდა ზეგავლენა ICAM-1 და E-სელექტინზე (Marheineke, 2002).

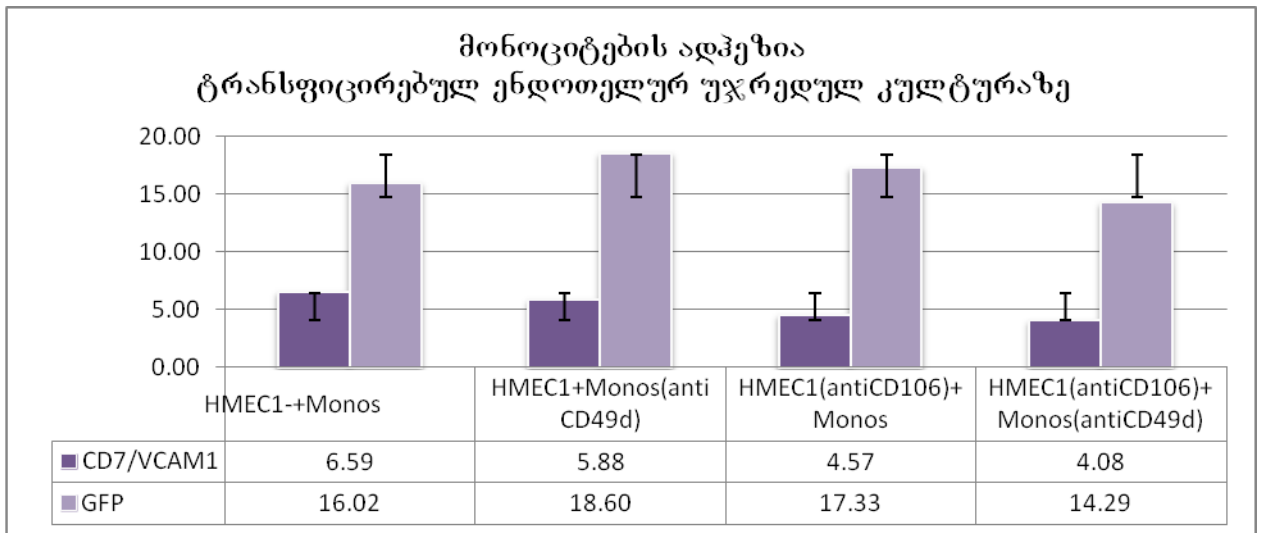
ჩვენი კვლევის ფარგლებში VCAM-1 ფუნქცია გამოკვლეულ იქნა სხვა ზედაპირული რეცეპტორებისგან დამოუკიდებლად. შესაძლებელი გახდა გვეჩვენებინა, რომ ეს რეცეპტორი სხვა ზედაპირულ მოლეკულებთან ურთიერთქმედების გარეშე განაპირობებს მონოციტების ადჰეზიას. მბრუნავი და ადჰეზირებული მონოციტების მაღალი პროცენტული შემცველობა კი ცალსახად VCAM-1 უნდა მივაწეროთ. ხოლო მათი პირიქით მკვეთრად შემცირებული რაოდენობა CD7/VCAM1 კონსტრუქტს. აღნიშნული შედეგები შესაძლოა წარმოადგენდნენ ფუნდამენტს CD7/VCAM ტრანსფიცირებული უჯრედებისა და ტრანსფიცირებული სისხლძარღვების კვლევისათვის.

დეტალურად განვიხილოთ დინამიური ადჰეზიური კვლევის თითოეულ საკვლევი გჯუფში მიღებული შედეგები:

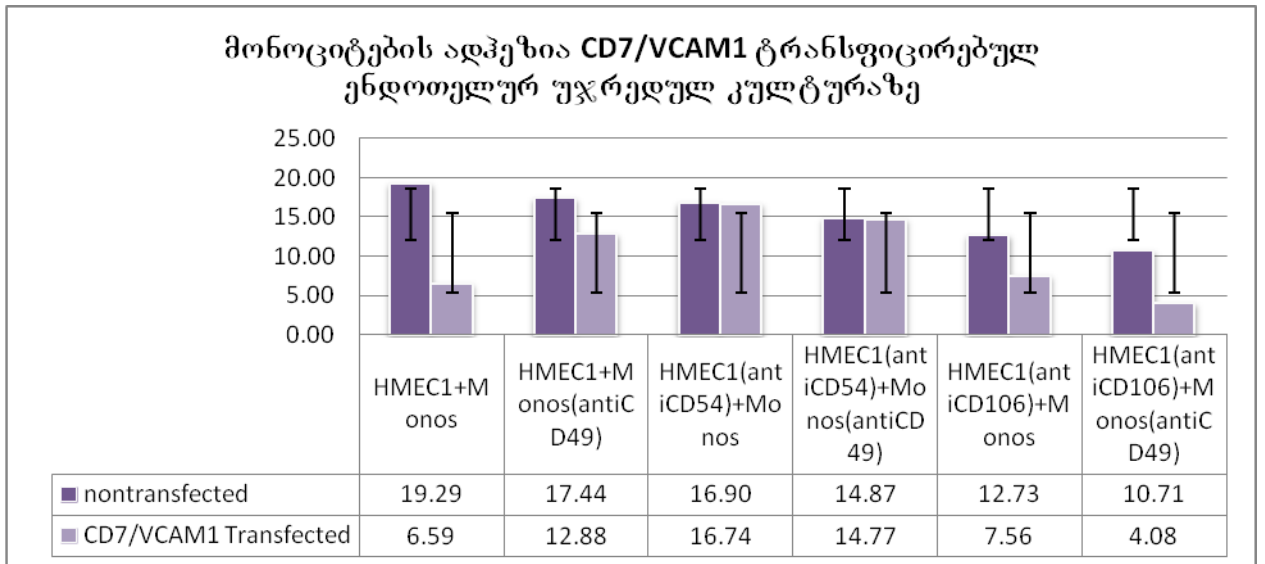
**ენდოთელიუმის ზედაპირზე მონოციტების ადჰეზიის შესწავლის შედეგები:**

CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციის, GFP საკონტროლო ტრანსფექციისა და ტრანსფექციის გარეშე ენდოთელიური კულტურისა და მონოციტების ურთიერთქმედების შესწავლისას მივიღეთ შემდეგი შედეგები:

- ენდოთელიურ კულტურაზე CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციისა და GFP საკონტროლო ტრანსფექციის ფონზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ ნაკლებია GFP საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1-GFP+Monos), ( $p < 0.05$ ). ზემოთაღნიშნული ცხადყოფს, რომ CD7/VCAM1 კონსტრუქტის მაინჰიბირებელი ეფექტი გამოვლენილია დადებით კონტროლთან შედარებით. (იხ. ცხრილი 22, გრაფიკი 1).
- ენდოთელიურ კულტურაზე CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციისა და ტრანსფექციის გარეშე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად მივიღეთ სარწმუნოდ ნაკლები ადჰერენტული მონოციტების საშუალო მნიშვნელობა არატრანსფიცირებულ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1+Monos), ( $p < 0.05$ ). თუმცა სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა ანტი-CD54 ანტისხეულის გამოყენების ჯგუფებში ( $p > 0.05$ ). შესაბამისად შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ICAM რეცეპტორისა და შესაბამისი ლიგანდის ლეიკოციტარული LFA-1 კავშირი არ იძლევა მონოციტების ადჰეზიაზე სარწმუნო ზეგავლენას. ზემოთაღნიშნული ფაქტები ცხადყოფენ, რომ CD7/VCAM1 კონსტრუქტს აქვს სპეციფიური მაინჰიბირებელი ზეგავლენა VCAM1 რეცეპტორსა და მონოციტების VLA-4 ლიგანდთან ურთიერთქმედების პროცესზე, რაც აისახება მონოციტების ენდოთელიუმთან ადჰეზიის შემცირებით. (იხ. ცხრილი 24, გრაფიკი 2).



გრაფიკი 1



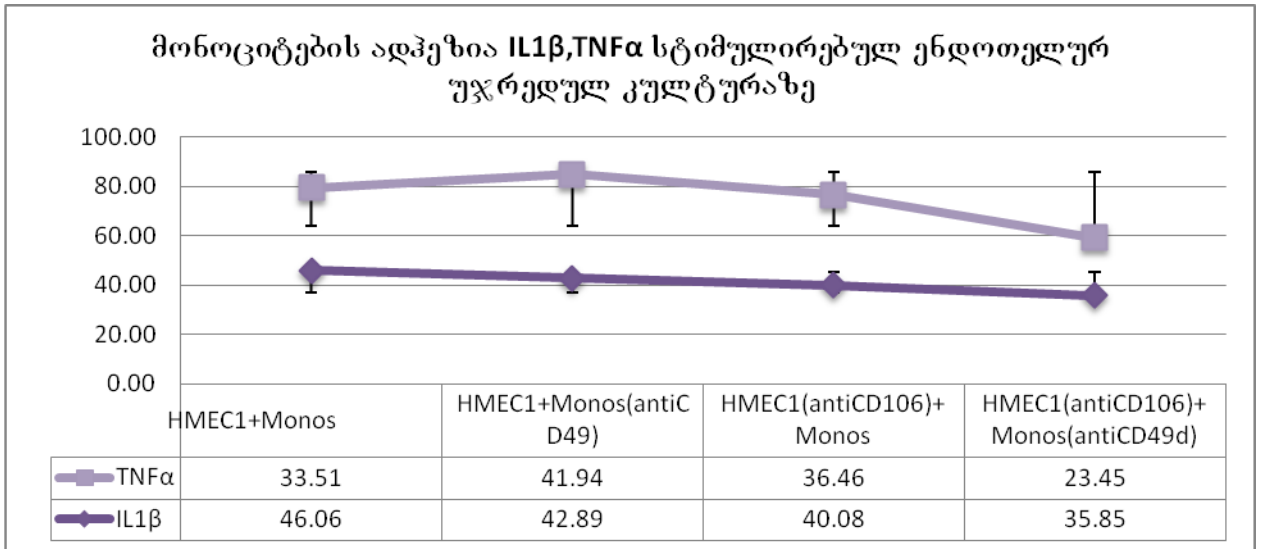
გრაფიკი 2

ენდოთელური უჯრედების სტიმულაციის შესწავლისას მივიღეთ შემდეგი შედეგები:

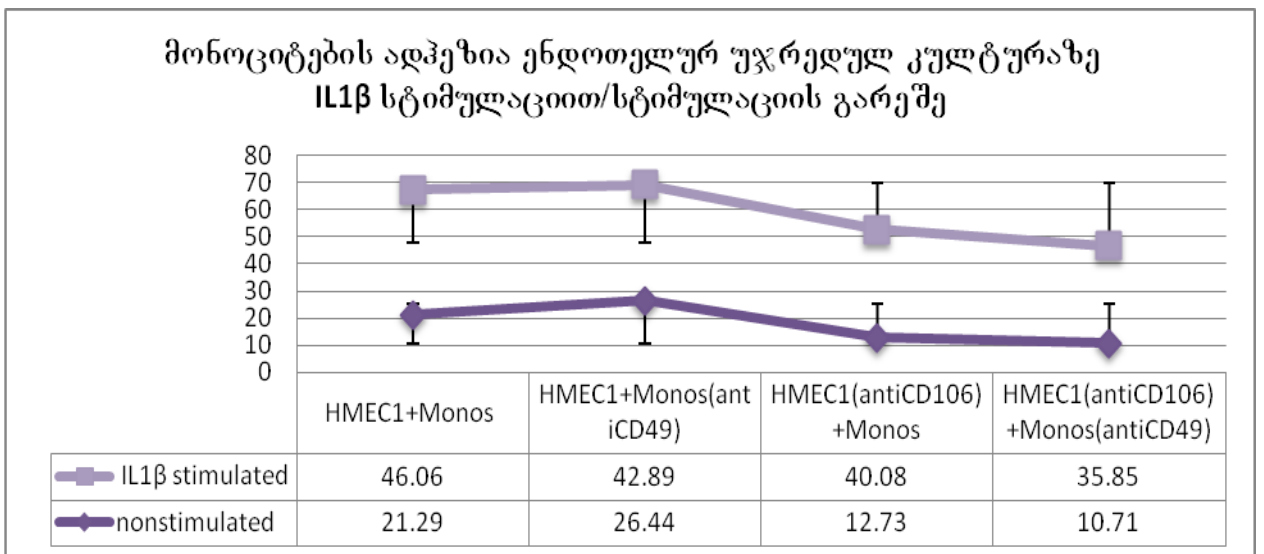
- არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე და არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მაჩვენებლების შედარებითი ანალიზის შედეგები ცხადყოფს, რომ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე

მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos), ( $p<0.05$ ). როგორც ჩანს IL1 $\beta$  სტიმულაციამ განაპირობა გაცილებით მეტი მონოციტის მტკიცე ადჰეზია არატრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე TNF $\alpha$  სტიმულაციასთან შედარებით. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე და არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე ანტი-CD49d ანტისხეულით დამუშავებული მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მაჩვენებლების შედარებითი ანალიზის შედეგად ( $p>0.05$ ) (იხ.ცხრილი 23, გრაფიკი 3).

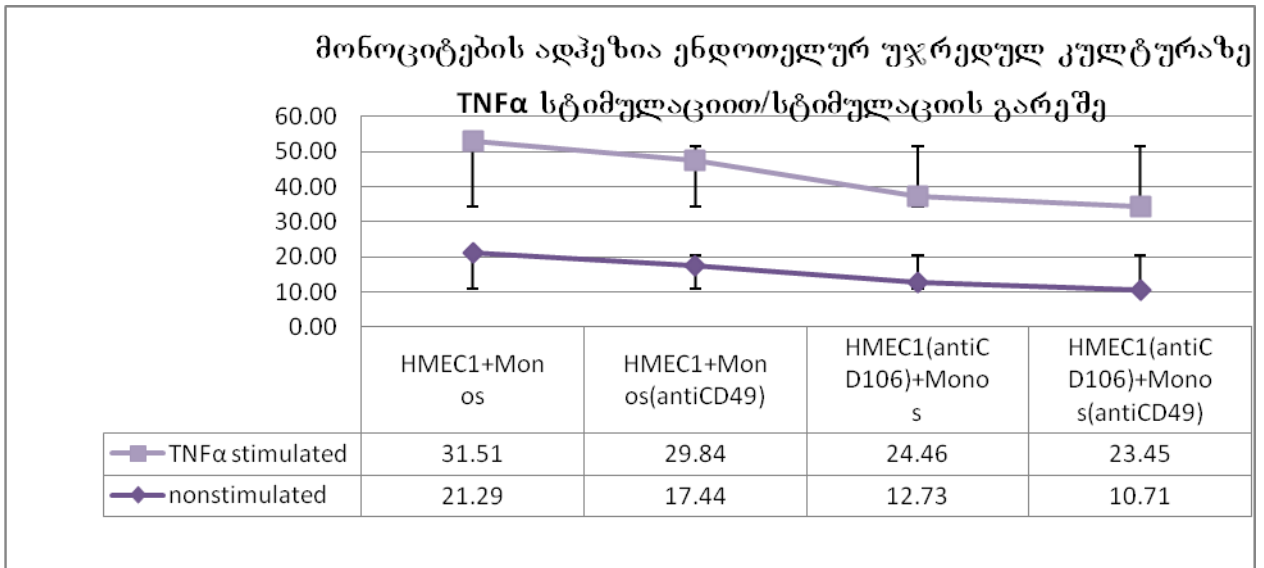
- არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ არასტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით (HMEC1+Monos), ( $p<0.05$ ). აღნიშნულიდან გამომდინარეობს, რომ IL1 $\beta$  სტიმულაციამ განაპირობა ენდოთელიუმზე მონოციტების ადჰეზიის მატება (იხ.ცხრილი 27, გრაფიკი 4).
- არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ არასტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით (HMEC1+Monos), ( $p<0.05$ ). როგორც ჩანს TNF $\alpha$  სტიმულაციამ განაპირობა ენდოთელიუმზე მონოციტების ადჰეზიის მატება, თუმცა აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ სტატისტიკურად სარწმუნო აღმოჩნდა IL1 $\beta$  სტიმულაციის ფონზე ადჰერენტული მონოციტების რაოდენობის მატება TNF $\alpha$  სტიმულაციასთან შედარებით (იხ.ცხრილი 28, გრაფიკი 5).



გრაფიკი 3



გრაფიკი 4

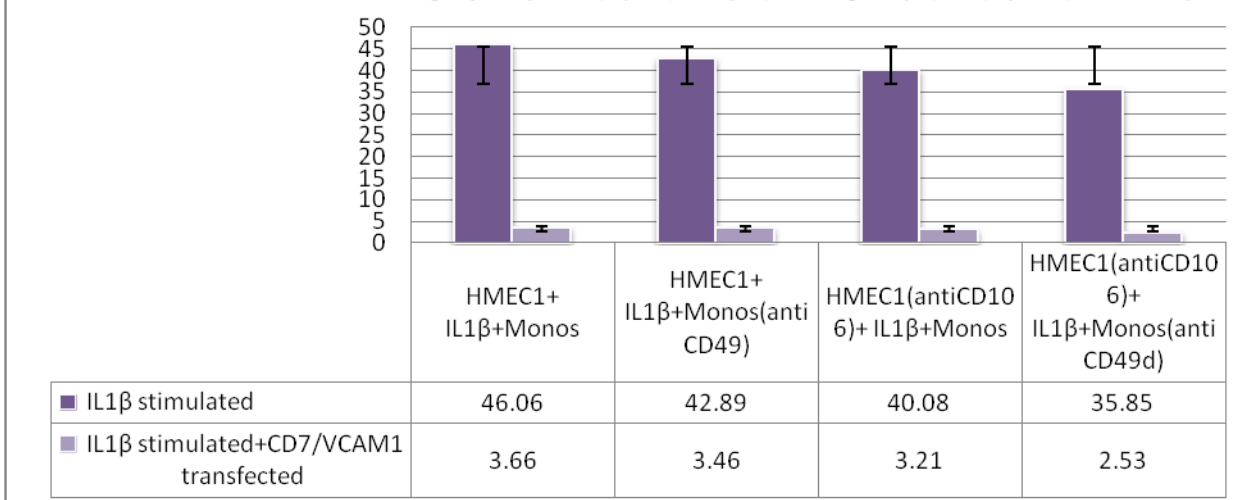


გრაფიკი 5

სტიმულირებულ და ტრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიის შესწავლისას მივიღეთ შემდეგი შედეგები:

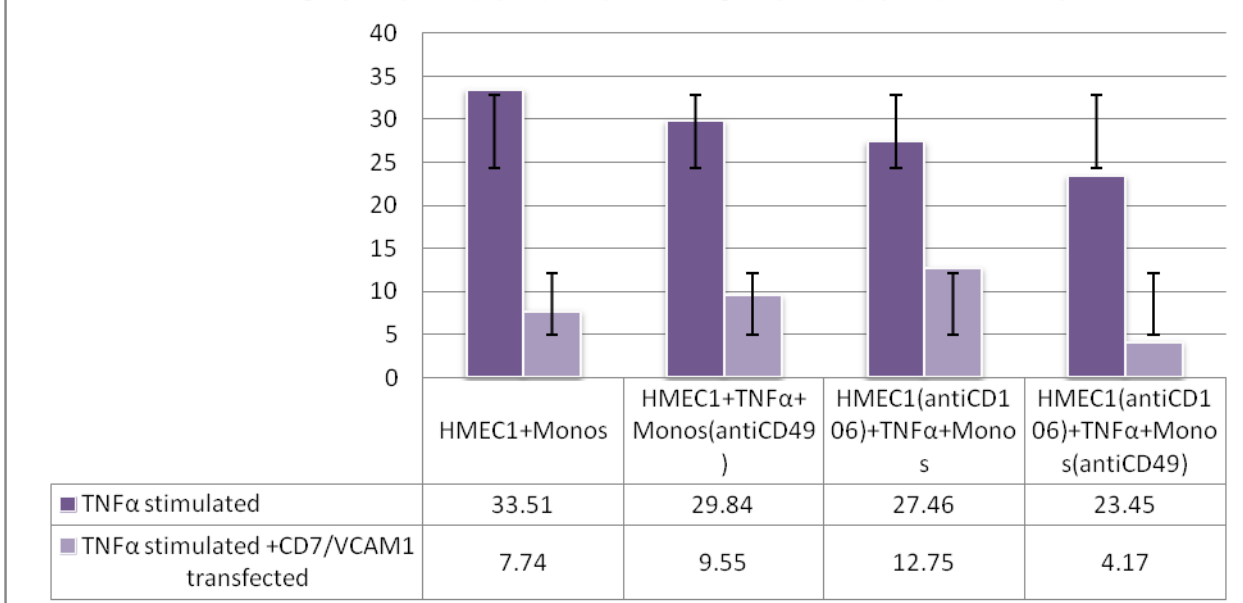
- მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე სარწმუნოდ ნაკლები აღმოჩნდა ადჰერენტული მონოციტების რაოდენობა არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით(HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos), ( $p < 0.05$ ). შესაბამისად ვლინდება, რომ CD7/VCAM1 კონსტრუქტს აქვს მაინჰიბირებელი ზეგავლენა მონოციტების ენდოთელიუმთან ადჰეზიის პროცესზე და ეს ეფექტი განსაკუთრებით ვლინდება IL1 $\beta$  სტიმულაციის ფონზე. (იხ.ცხრილი 27, გრაფიკი 6).
- მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე სარწმუნოდ ნაკლები აღმოჩნდა ადჰერენტული მონოციტების რაოდენობა არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით(HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos), ( $p < 0.05$ ). ამ შემთხვევაშიც CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციამ განაპირობა სარწმუნოდ ნაკლები რაოდენობით ადჰერენტული მონოციტების არსებობა ენდოთელურ უჯრედებზე (იხ.ცხრილი 28, გრაფიკი 7).

მონოციტების ადჰეზია IL1 $\beta$  სტიმულირებულ და CD7/VCAM1 ტრანსფეცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე



გრაფიკი 6

მონოციტების ადჰეზია TNF $\alpha$  სტიმულირებულ და CD7/VCAM1 ტრანსფეცირებულ ენდოთელურ უჯრედულ კულტურაზე

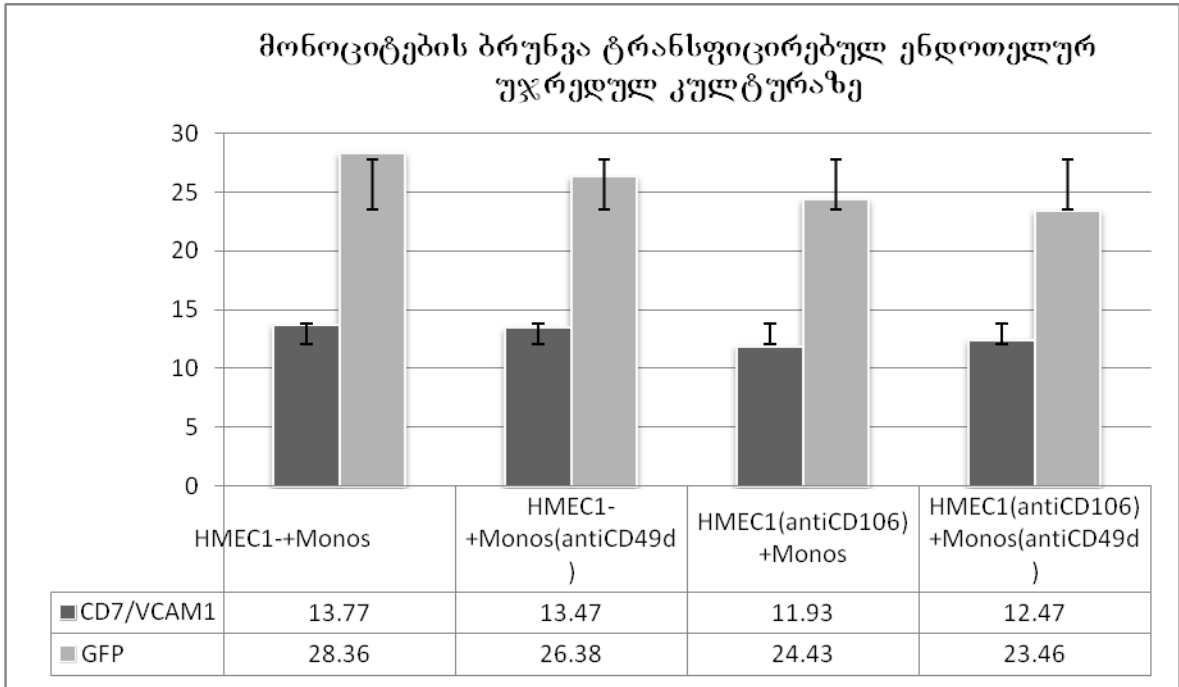


გრაფიკი 7

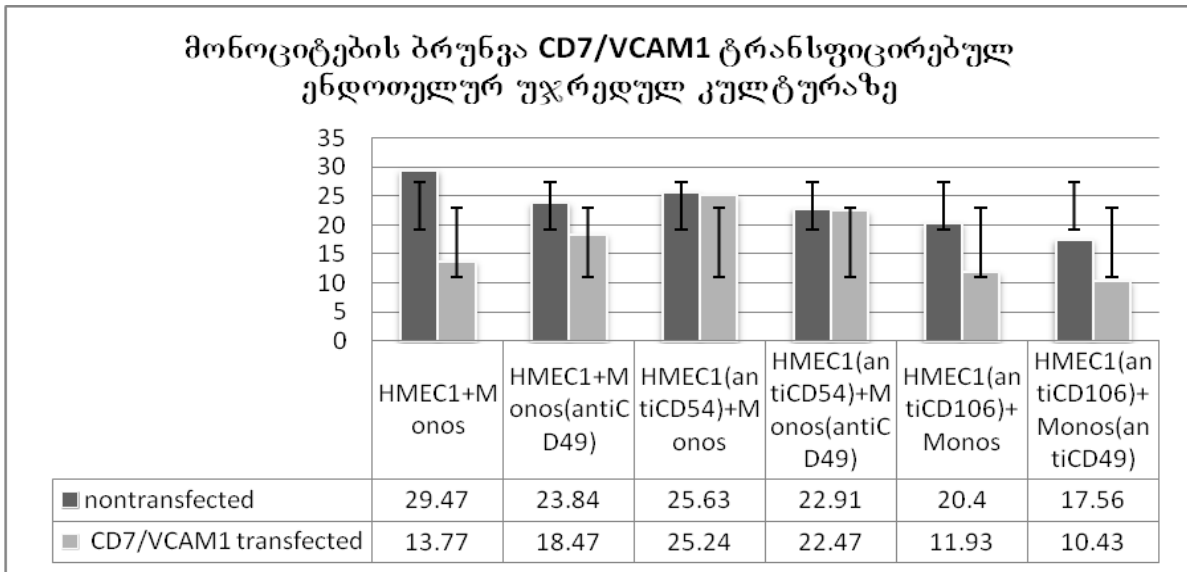
**ენდოთელიუმის ზედაპირზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის შედეგები:**

- ✓ ენდოთელურ კულტურაზე CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციისა და GFP საკონტროლო ტრანსფექციის ფონზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად გამოვლინდა, რომ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ ნაკლებია GFP საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1-GFP+Monos), ( $p < 0.05$ ). ზემოთაღნიშნულიდან გამომდინარე CD7/VCAM1 კონსტრუქტს აქვს მაინჰიბირებელი ეფექტი ასევე მონოციტების პირველად ადჰეზიაზე. (იხ. ცხრილი 29, გრაფიკი 8).
- ✓ ენდოთელურ კულტურაზე CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციისა და ტრანსფექციის გარეშე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად მივიღეთ სარწმუნოდ ნაკლები მბრუნავი მონოციტების საშუალო მნიშვნელობა არატრანსფიცირებულ საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1+Monos), ( $p < 0.05$ ). თუმცა სარწმუნო განსხვავება არ გამოვლინდა ანტი-CD54 ანტისხეულის გამოყენების ჯგუფებში ( $p > 0.05$ ). შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ICAM რეცეპტორისა და მისი ლეკოციტარული ლიგანდის LFA-1 კავშირი არ იძლევა სარწმუნო ზეგავლენას არც მონოციტების პირველად ადჰეზიაზე. ზემოთაღნიშნულიდან გამომდინარე CD7/VCAM1 კონსტრუქტი მაინჰიბირებელ ზეგავლენას ახდენს ასევე მონოციტების ენდოთელიუმზე პირველადი ადჰეზიის პროცესზე. (იხ. ცხრილი 31, გრაფიკი 9).





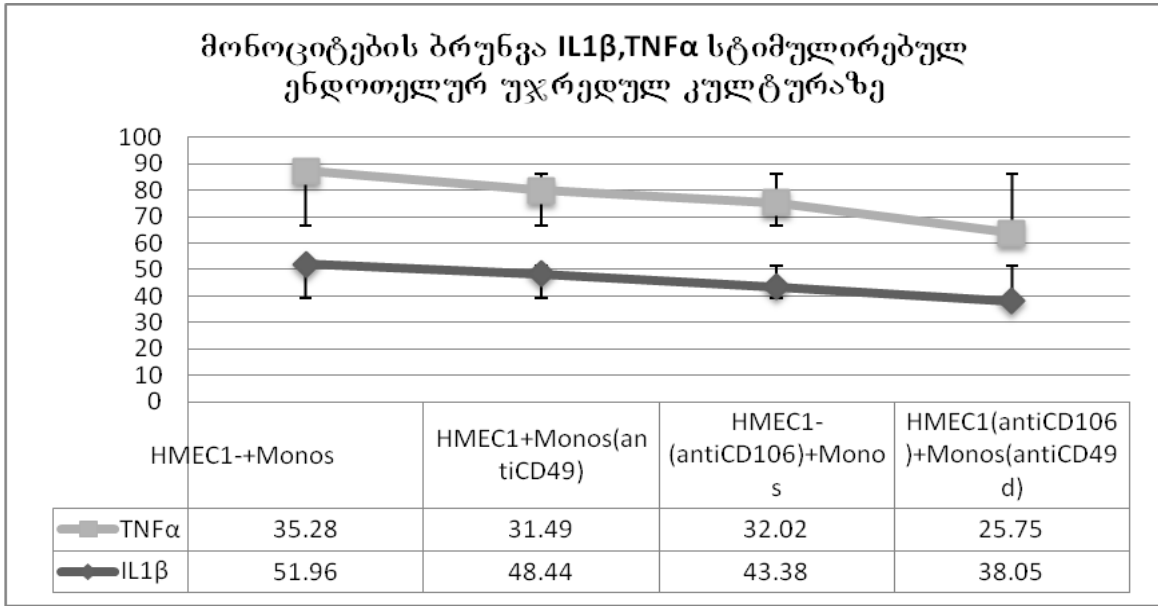
გრაფიკი 8



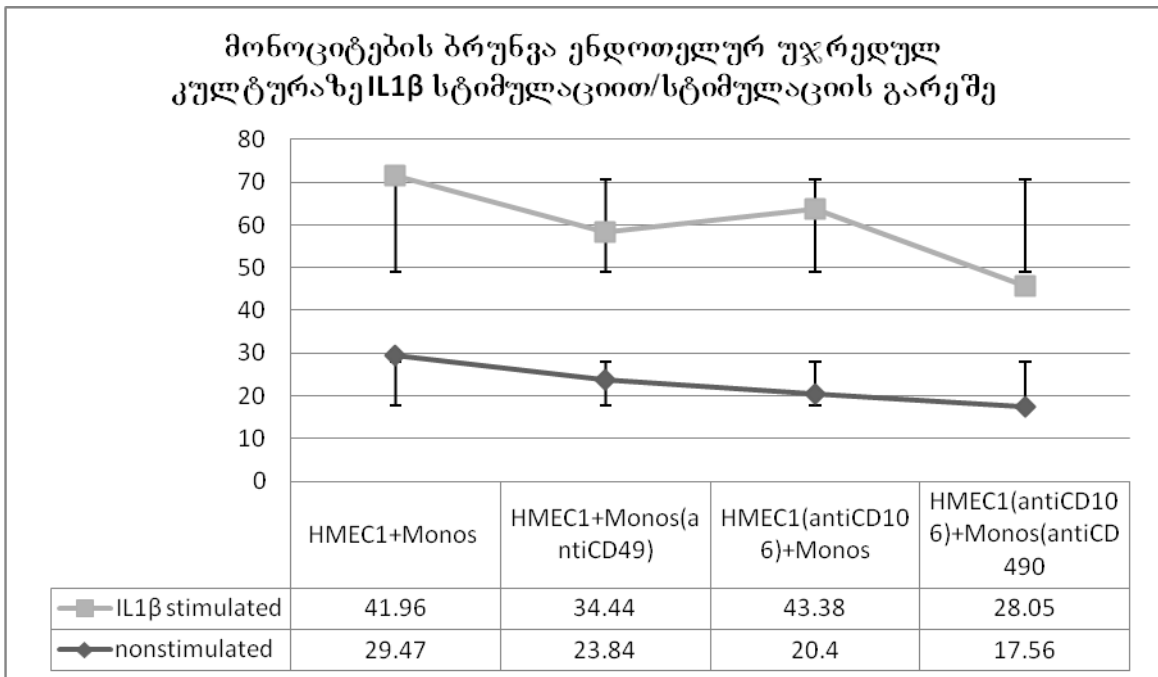
გრაფიკი 9

**ენდოთელური უჯრედების სტიმულაციის შესწავლისას მივიღეთ შემდეგი შედეგები:**

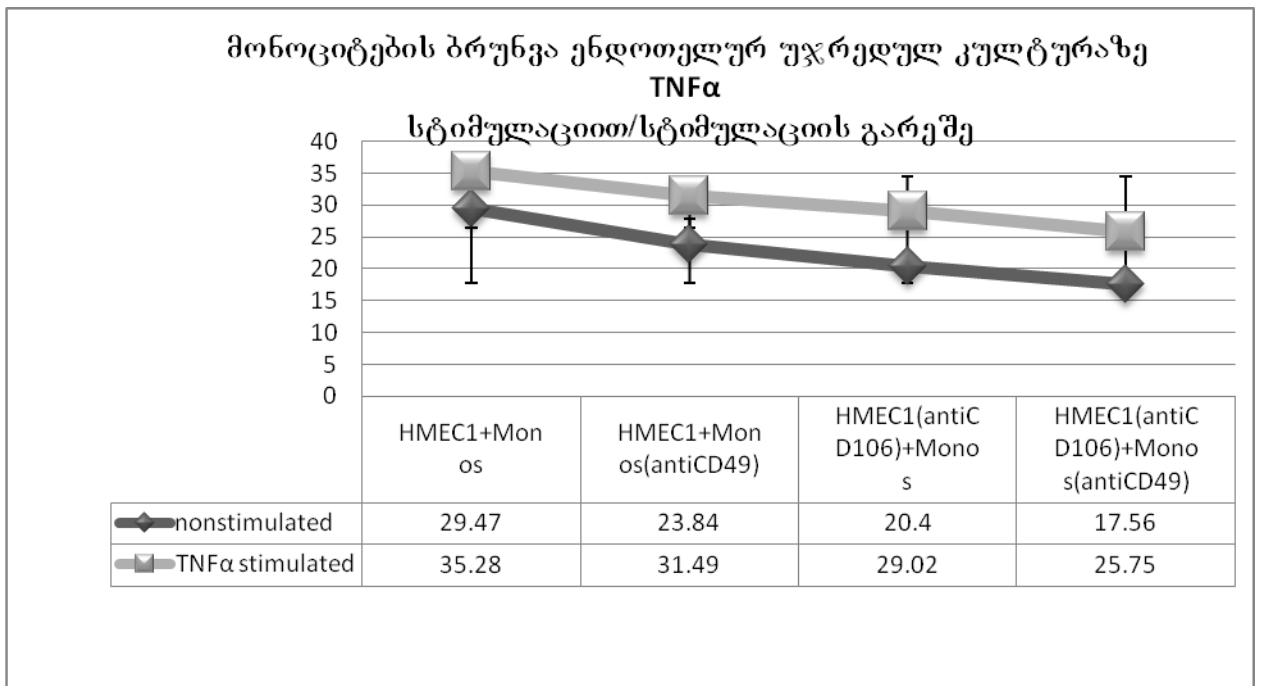
- ✓ არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე და არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მაჩვენებლების შედარებითი ანალიზის შედეგები ცხადყოფს, რომ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების პირველად ადჰეზიასთან შედარებით (ჯგუფი HMEC1-TNF $\alpha$ +Monos), ( $p < 0.05$ ). როგორც ჩანს IL1 $\beta$  სტიმულაცია განაპირობებს გაცილებით მეტი მონოციტის პირველად ადჰეზიას არატრანსფიცირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე TNF $\alpha$  სტიმულაციასთან შედარებით. (იხ.ცხრილი 30, გრაფიკი 10).
- ✓ არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ არასტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების პირველად ადჰეზიასთან შედარებით (HMEC1+Monos), ( $p < 0.05$ ). IL1 $\beta$  სტიმულაციის შედეგად ადგილი აქვს ენდოთელიუმზე მონოციტების პირველადი ადჰეზიის მატებას (იხ.ცხრილი 32, გრაფიკი 11).
- ✓ არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობა სარწმუნოდ მეტია არატრანსფიცირებულ არასტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების პირველად ადჰეზიასთან შედარებით (HMEC1+Monos), ( $p < 0.05$ ). როგორც ჩანს TNF $\alpha$  სტიმულაციამ განაპირობა ენდოთელიუმზე მონოციტების პირველადი ადჰეზიის მატება, თუმცა აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ სტატისტიკურად სარწმუნო აღმოჩნდა IL1 $\beta$  სტიმულაციის ფონზე მბრუნავი მონოციტების რაოდენობის მატება TNF $\alpha$  სტიმულაციასთან შედარებით (იხ.ცხრილი 34, გრაფიკი 12).



გრაფიკი 10



გრაფიკი 11

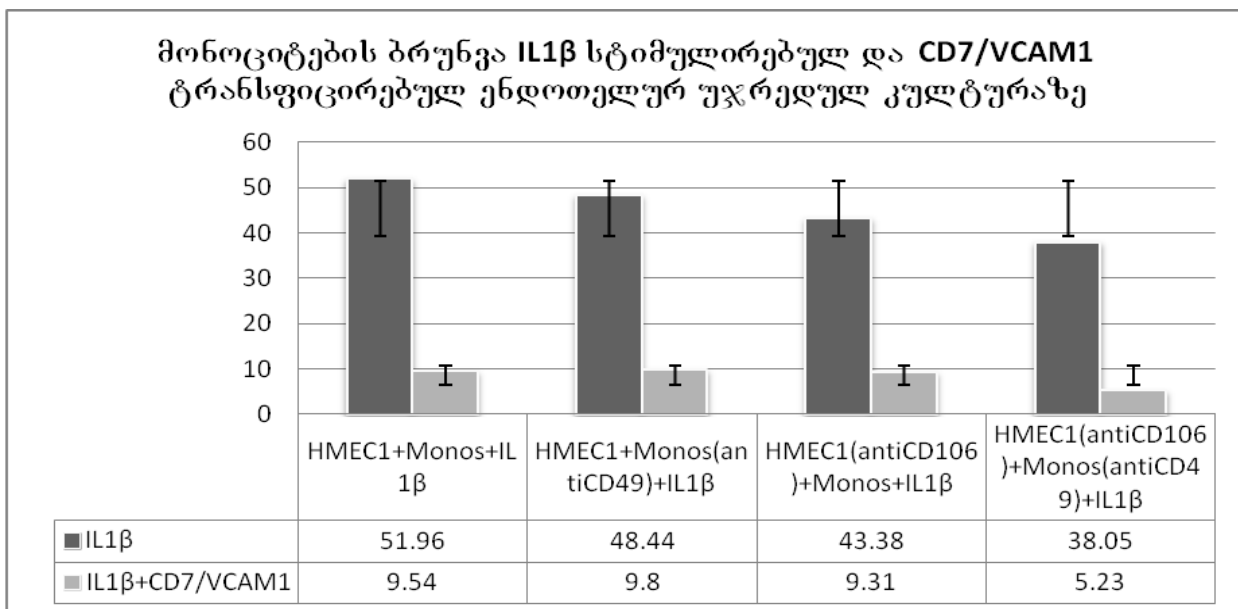


გრაფიკი 12

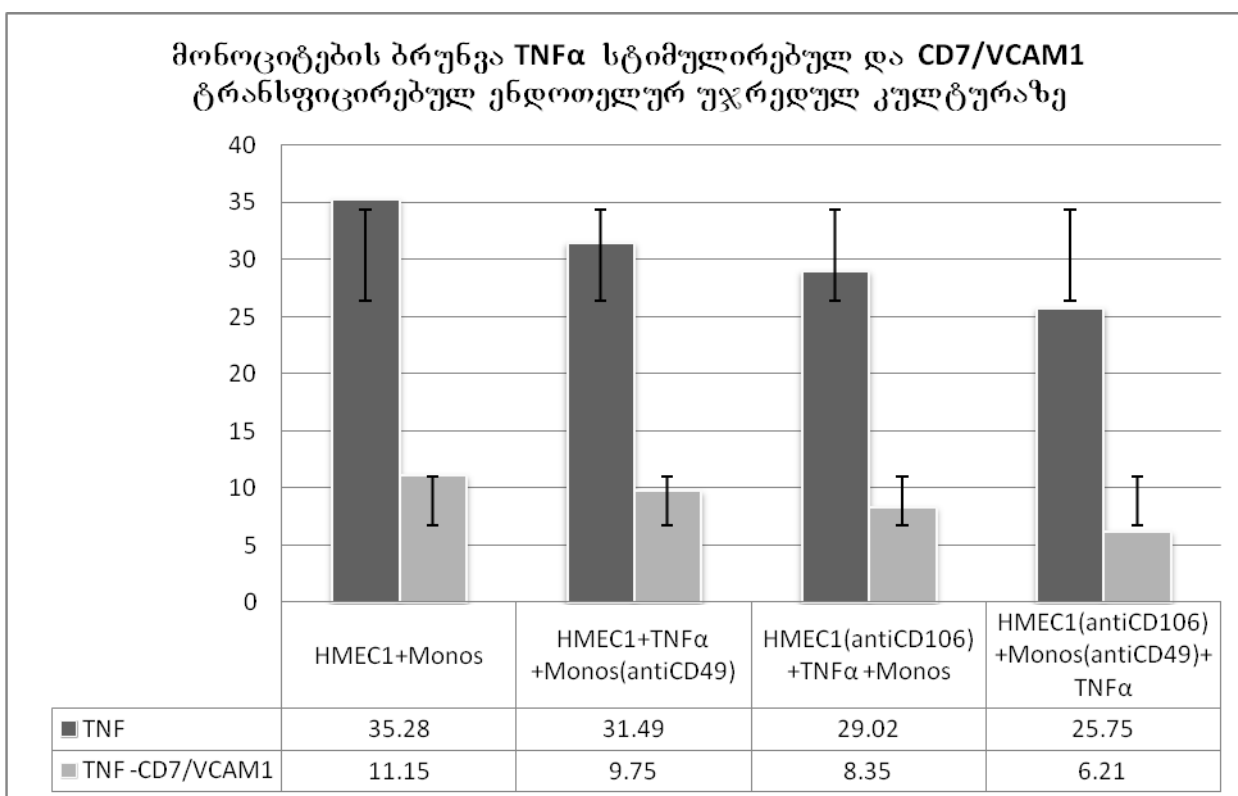
**სტიმულირებული და ტრანსფიცირებული ენდოთელური უჯრედებზე მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის შესწავლისას მივიღეთ შემდეგი შედეგები:**

- ✓ მონოციტების ბრუნვის ანუ პირველადი ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე სარწმუნოდ ნაკლები აღმოჩნდა მბრუნავი მონოციტების რაოდენობა არატრანსფიცირებულ IL1 $\beta$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების ადჰეზიასთან შედარებით(HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos), ( $p < 0.05$ ). შესაბამისად ვლინდება, რომ CD7/VCAM1 კონსტრუქტს აქვს მაინჰიბირებელი ზეგავლენა ასევე მონოციტების ენდოთელიუმზე პირველადი ადჰეზიის პროცესზე და ამასთანავე ეს ზეგავლენა განსაკუთრებით გამოხატულია IL1 $\beta$  სტიმულაციის ფონზე (იხ.ცხრილი 33, გრაფიკი 13).
- ✓ მონოციტების ადჰეზიის საშუალო მნიშვნელობათა შედარებითი ანალიზის შედეგად CD7/VCAM1 ტრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე სარწმუნოდ ნაკლები აღმოჩნდა მბრუნავი მონოციტების რაოდენობა არატრანსფიცირებულ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ენდოთელურ უჯრედებზე მონოციტების პირველად ადჰეზიასთან შედარებით(HMEC1- IL1 $\beta$ +Monos), ( $p < 0.05$ ). ამ შემთხვევაშიც CD7/VCAM1 კონსტრუქტით

ტრანსფექციამ განაპირობა მბრუნავი მონოციტების სარწმუნოდ ნაკლები რაოდენობის არსებობა მხოლოდ TNF $\alpha$  სტიმულირებულ ჯგუფთან შედარებით (იხ.ცხრილი 35, გრაფიკი 14).



გრაფიკი 13



გრაფიკი 14

მონოციტების პირველადი ადჰეზიის გჯუფებში კორელაციური ანალიზის შედეგად საინტერესო უარყოფითი კორელაცია გამოვლინდა ენდოთელიუმის IL1 $\beta$  სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის მონოციტების ბრუნვის/პირველადი ადჰეზიის შემთხვევაში, კერძოდ კი IL1 $\beta$  ტრანსფექციის ფონზე გაცილებით ეფექტური აღმოჩნდა CD7/VCAM1 კონსტრუქტის ზემოქმედება VCAM1 რეცეპტორსა და მის ლიგანდ VLA4-ს შორის კავშირის დათრგუნვის თვალსაზრისით, რაც მონოციტების პირველადი ადჰეზიის მკვეთრი კლებით გამოიხატა (იხ. ცხრილი 38). კორელაციური ანალიზის შედეგებიდან მნიშვნელოვანი კორელაციური კავშირი არ გამოვლინდა TNF $\alpha$  სტიმულაციასა და CD7/VCAM1 ტრანსფექციას შორის როგორც მონოციტების მტკიცე ადჰეზიის ასევე მონოციტების პირველადი ადჰეზიის გჯუფებში.

### **დინამიური ადჰეზიური კვლევების შედეგების შეჯამება**

აღნიშნული კვლევების შეჯამებისას მნიშვნელოვანია იმ ფაქტის ხაზგასმა, რომ მოცემულ შრომაში აღწერილი ყველა დინამიური ადჰეზიური ექსპერიმენტი ჩატარდა ტრანსგენურ HMEC1 უჯრედებით, რომლებიც მანამდე შესაბამისი გენური სტაბილიზატორებით იქნა ტრანსფიცირებული და სხვა ზედაპირულ რეცეპტორებთან VCAM-1 რეცეპტორის ურთიერთქმედება ამით გამოირიცხა. რაც გულისხმობს იმას, რომ VCAM-1 რეცეპტორის ფუნქციები სხვა დამატებითი ფაქტორების ზემოქმედების გარეშე იქნა შესწავლილი.

თავდაპირველად ენდოთელური უჯრედების მიერ VCAM-1 რეცეპტორის ექსპრესია ჩვენ შევაფასეთ გამდინარე ციტომეტრიის მეშვეობით, რითიც დადასტურდა VCAM1 რეცეპტორის ექსპრესიის არსებობა შესაბამისი დადებითი უჯრედული პოპულაციის ფლუორესცენციის ინტენსივობის მკვეთრად მარჯვნივ გადაადგილებით. აღმოჩნდა, რომ ეს უჯრედები არიან აქტივირებულ მდგომარეობაში და მათზე აღინიშნება VCAM-1 რეცეპტორის სრულყოფილი ექსპრესია. იმავე კვლევით ასევე დადგინდა, რომ უჯრედების სტიმულაცია შესანიშნავად არის შესაძლებელი ისეთი სტიმულატორების გამოყენებით როგორებიცაა IL1 $\beta$  და TNF $\alpha$ . გამდინარე ციტომეტრია იქნა გამოყენებული ენდოთელური უჯრედების CD7/VCAM1 ტრანსფექციის შეფასებისა და კონსტრუქტის კონცენტრაციის შერჩევის მიზნით. ამ კვლევის შედეგად გამოვლინდა, რომ კონსტრუქტის ზემოქმედებით VCAM1 ექსპრესია ენდოთელურ

უჯრედებზე განიცდის თვალსაჩინო ცვლილებას VCAM1 დადებითი უჯრედული პოპულაციის უჯრედული პარამეტრების ცვლილების თვალსაზრისით. აღნიშნული ევექტი განსაკუთრებით შესამჩნევი აღმოჩნდა CD7/VCAM1 კონსტრუქტის  $0.5\mu\text{ლ}$  ( $2,1 * 10^9$  PFU / ml) კონცენტრაციის გამოყენებისას.

დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში გამოვლინდა VCAM-1 რეცეპტორის პირდაპირი როლი მონოციტების ენდოთელიუმზე პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის პროცესში. ორივე მაჩვენებელი რაოდენობრივად იქნა შეფასებული. მნიშვნელოვანია ფაქტი, რომ შესაძლებელი და ევექტური აღმოჩნდა ენდოთელური უჯრედების სტიმულაცია IL1 $\beta$  და TNF $\alpha$  საშუალებით, რაც გამოვლინდა ორივე შემთხვევაში როგორც პირველადი ადჰეზიის ასევე მტკიცე ადჰეზიის მქონე მონოციტების საკმაოდ გაზრდილი რაოდენობით საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (იხ.ცხრილები 23,31). საკვლევი ჯგუფების შედარებამ აჩვენა, რომ IL1 $\beta$  სტიმულაცია გაცილებით ევექტურია TNF $\alpha$  სტიმულაციასთან შედარებით (იხ.ცხრილები 23,31). უფრო მეტიც, გამოვლინდა უარყოფითი კორელაცია მონოციტების ბრუნვის ჯგუფებში ენდოთელიუმის IL1 $\beta$  სტიმულაციასა და მისი CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციას შორის (იხ.ცხრილი 38).

CD7/VCAM1 კონსტრუქტის შესწავლისას კი ადგილი ქონდა თითქმის ყველა საკვლევი გჯუფში ენდოთელიუმზე მონოციტების პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის ინჰიბიციას შესაბამის საკონტროლო გჯუფთან შედარებით (იხ.ცხრილები 22,24,27,28,29,31).

დინამიური ადჰეზიური კვლევის შედეგები საუკეთესოდ წარმოაჩენს CD7/VCAM1 კონსტრუქტის მიერ VCAM1 რეცეპტორის ინაქტივაციას, რაც მონოციტების პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის მკვეთრ შემცირებაში გამოიხატა დადებით და უარყოფით კონტროლთან შედარებით. უკვე ჩატარებულ ცხოველთა მოდელებში არსებობდა VCAM1 ბლოკირების ცდები ანტი-VCAM1 ანტისხეულის საშუალებით. შესაბამისად საინტერესო იყო და საჭიროდ მივიჩნიეთ CD7/VCAM1 კონსტრუქტის კვლევა ApoE $^{-/-}$  თაგვებზე ჩაგვეტარებინა.

### **In Vivo კვლევების შედეგების შეჯამება**

ApoE $^{-/-}$  დეფიციტურ თაგვებს სპონტანურად და განსაკუთრებით ცხიმით მდიდარი დიეტის ფონზე უვითარდებათ ათეროსკლეროზული ფოლაქები. გვსურდა შეგვესწავლა CD7/VCAM1 კონსტრუქტის გავლენა ათეროგენეზის საწყის ეტაპზე,

რისთვისაც შევარჩიეთ ზემოთაღნიშნული ექსპერიმენტული ცხოველები. პირველ რიგში საჭირო იყო ისეთი ექსპერიმენტული ტექნიკის შემუშავება, რომლის საშუალებითაც მოხერხდებოდა ენდოთელიუმის CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექცია და ამ ტრანსფექციის შედეგების გამოკვლევა.

როგორც ეს ნაშრომის II თავში იყო აღწერილი კვლევის *in vivo* მოდელში სხვადასხვა მეთოდი იქნა გამოყენებული, რათა მიგვეღწია CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ენდოთელური შრის ტრანსფექციისათვის. აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით ვერ მოხერხდა ენდოთელურ უჯრედების GFP ვირალური ვექტორით ტრანსფექცია. აღნიშნული პრობლემის წამოჭრის გამო შევიმუშავეთ ალტერნატიული ტრანსფექციის ტექნიკა - საძილე არტერიაში უწვრილესი კანულის საშუალებით CD7/VCAM1 კონსტრუქტის ინექციის ოპერაცია.

ApoE-/- დეფიციტურ თაგვებში საძილე არტერიის CD7/VCAM1 კონსტრუქტით ტრანსფექციის შედეგად გამოვლინდა ლოკალური პათოლოგიური ცვლილებები ინექციის არეში სისხლძარღვის კედელში როგორც კონსტრუქტის გამოყენებისას ასევე მისი დადებითი კონტროლის (GFP ვირალური ვექტორის) და უარყოფითი კონტროლის (ბუფერული ხსნარის (pH=7,4)) გამოყენების შემთხვევაში. ნაოპერაციებში საძილე არტერიებში ადგილი ქონდა გლუვი კუნთოვანი ქსოვილის პროლიფერაციას, არტერიის კედლის ფიბროზული მასებით, კომპლექსური ნახშირწყლებით, კალციუმის დეპოზიტებით, ლიპიდებითა და მაკროფაგებით ინფილტრაციას. მიუხედავად იმისა, რომ აპლიკაციისა და ინექციის ტექნიკის გამოყენებით ვერ მოხერხდა CD7/VCAM1 კონსტრუქტის ეფექტის შესწავლა *in vivo* ექსპერიმენტულ მოდელში, ვთვლით, რომ ჩატარებული სამუშაოები და მათი შედეგები მნიშვნელოვანი და საყურადღებოა კონსტრუქტის სამომავლო კვლევის თვალსაზრისით. მიღებული გამოცდილება კი უდაოდ გასათვალისწინებელია შემდგომი კვლევების დაგეგმვისათვის.



## დასკვნები

### In Vitro:

- ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა 1-ის როლი სპეციფიური და უნიკალურია მონოციტების პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის პროცესში, რაც ვლინდება მონოციტების პირველადი და მტკიცე ადჰეზიით ენდოთელიუმზე სხვა რეცეპტორების კოექსპრესიის არარსებობის ფონზე.
- IL1 $\beta$  და TNF $\alpha$  სტიმულატორების გამოყენებით HMEC1 ენდოთელური უჯრედული კულტურის სტიმულაციას თან ახლავს ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა 1-ის ექსპრესიის მკვეთრი მატება ენდოთელური უჯრედების ზედაპირზე.
- ენდოთელური უჯრედების IL1 $\beta$  და TNF $\alpha$  საშუალებით სტიმულაცია განაპირობებს მონოციტების პირველადი ადჰეზიისა და მტკიცე ადჰეზიის გაზრდას.
- CD7/VCAM1 ხსნადი პროტეინის ზემოქმედებით ადგილი აქვს ვასკულური უჯრედული ადჰეზიური მოლეკულა 1-ის უფუნქციო რეცეპტორად გარდაქმნას, რასაც შედეგად მოჰყვება მონოციტების ენდოთელიუმზე პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის ინჰიბიცია.

### In Vivo:

- აპლიკაციის ტექნიკის გამოყენებით ენდოთელიუმის ადენოვირალური ვექტორით ტრანსფექცია არ დასტურდება.
- CD7/VCAM1 კონსტრუქტის in vivo კვლევას ინექციის ოპერაციული ტექნიკის გამოყენებით თან ახლავს ინექციის არეში პათოლოგიური ცვლილებების განვითარება.

## მომავლის პერსპექტივები

არასტაბილური (რუპტურისაკენ მიდრეკილი) ათეროსკლეროზული ფოლაქების ადგილობრივი მკურნალობა კარდიოვასკულური მედიცინის უდიდეს გამოწვევას წარმოადგენს. ადჰეზიური რეცეპტორები უმნიშვნელოვანეს როლს თამაშობენ ათეროსკლეროზის განვითარებაში უჯრედულ-უჯრედული ურთიერთქმედებებისა და უჯრედული სიგნალების ამოქმედების გზით. ჩვენი გენთერაპიული მიდგომა ეფუძნება VCAM1 რეცეპტორის მიზანში ამოღებას და ადენოვირალური ვექტორული სისტემის ხსნადი პროტეინის საშუალებით მონოციტ-ენდოთელურ ურთიერთქმედებაზე ზემოქმედებას. წინარე კვლევებით დადასტურდა, რომ CD7/CAM1 კოტრანსფექციას არავითარი ზეგავლენა არ აქვს ICAM1 და E-Selectin რეცეპტორებით განპირობებულ მონოციტების ადჰეზიაზე. CD7/VCAM1 განპირობებული ინჰიბიციის გზა დომინანტურია. იგი უნიკალური და სპეციფიურია მხოლოდ VCAM1 რეცეპტორისათვის.

ჩვენი კვლევის შედეგად აღმოჩნდა, რომ კონსტრუქტის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა VCAM1 ფუნქციების ინჰიბიციის, რამაც საბოლოოდ მონოციტების ენდოთელზე პირველადი და მტკიცე ადჰეზიის მნიშვნელოვან შეფერხებამდე მიგვიყვანა. სტატიურ ადჰეზიურ კვლევებში კი ადგილი ქონდა ასევე მონოციტების ტრანსმიგრაციის ინჰიბიციასაც. რაც სასურველია მომავალში ასევე დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში იქნას გამოკვლეული.

ჩვენი კვლევა ადასტურებს VCAM1 რეცეპტორის გადამწყვეტ როლს მონოციტების ადჰეზიისა და აკუმულაციის პროცესში. ჩვენი მონაცემები ამყარებენ მოსაზრებას ისეთი გენთერაპიული საშუალებების განვითარების შესაძლებლობის შესახებ, რომელიც მოახდენს მონოციტების ლიგანდისა და აქტივირებული ენდოთელიუმის ურთიერთქმედების ინჰიბიციას. აღნიშნული კვლევა არის პირველი აღწერა ამ ურთიერთქმედების ბლოკადისა კონკურენტული ხსნადი პროტეინის კოექსპრესიის საშუალებით დინამიურ ადჰეზიურ კვლევებში. აღნიშნული მიდგომა, რომელიც ეფუძნება დომინანტურ ნეგატიურ ინჰიბიტორულ ეფექტს, გვპირდება რეცეპტორის ფუნქციის რეგიონულ, ლოკალურ ბლოკადას, რაც შესაძლებელი იქნება კონსტრუქტის მხოლოდ მცირე რაოდენობით დაზიანების კერაში მიწოდებით. ეს უნიკალური მიდგომა კი შესაძლოა მომავალში ათეროსკლეროზის ადგილობრივი მკურნალობის საშუალებად მოგვევლინოს.

ჩატარებულ კვლევებზე დაფუძნებით ცხადია, რომ კონსტრუქტი იმედის მომცემი

საშუალება შეიძლება გახდეს ანტიათეროსკლეროზული თერაპიის კუთხით. შესაბამისად პირველ რიგში მისი კვლევა უნდა გაგრძელდეს ათეროსკლეროზის in vivo მოდელში ApoE<sup>-/-</sup> დეფიციტურ თაგვებში. საჭიროა ისეთი ოპერაციული მიდგომის შემუშავება, რომელიც მოახდენს მხოლოდ კონსტრუქტის ეფექტის გამოვლენას და სხვა დანარჩენი ფაქტორების გამორიცხვას. მისი ეფექტის შესწავლა შესაძლებელია ათეროსკლეროზის ნებისმიერ ეტაპზე.

სამომავლო კვლევები მიზანმიმართულად უნდა დაიგეგმოს იმ ფაქტორების გამოსაკვლევად თუ რამდენად ზემოქმედებს ეს ხსნადი პროტეინი აგრეთვე მონოციტების ენდოთელში ჩართვის სხვა პროცესებზე. აქვე არ უნდა გამოგვრჩეს, რომ შესაძლოა არსებობდეს CD7/VCAM საშუალებით სხვა რეცეპტორული სიგნალკასკადის დათრგუნვის შესაძლებლობა. ჩვენს კვლევაში პირველადი შედეგები ასახავენ კონსტრუქტის დადებით ეფექტს. შესაძლოა საქმე ეხებოდეს ახალ, პრეკლინიკურ მედიკამენტს, რომელმაც იმედის მომცემი ეფექტები გამოავლინა.

## **Inhibition of monocyte-endothelial interaction in early stages of atherosclerosis**

### **Summary of the Dissertation Thesis**

Atherosclerosis is a complex, chronic inflammatory disease, which occurs as a response to endothelial injury. It is a dynamic process, starts in early childhood, progresses during long preclinical stage and later manifests clinically. Atherosclerosis can affect all large and medium-sized arteries, including the coronary, carotid and cerebral arteries, the aorta, its branches and major arteries of the extremities. Atherosclerosis is heritable disease involving multiple cell types and the interactions of many different molecular pathways. Clinically the problem of atherosclerosis is related mainly to occlusion of the mentioned arteries. The main organs or body regions where atherosclerotic disease will cause tissue and/or organ damage are the brain, the heart, and the lower limbs. The clinical manifestations of atherosclerosis, such as coronary vascular disease (CVD), are common in Western and urban populations, and are an important and common cause of death and disease. Atherosclerosis is the leading cause of morbidity and mortality in the US and in most developed countries. It is rapidly increasing in prevalence. By 2020, atherosclerosis is expected to be the leading cause of death worldwide. According to the WHO's world health statistics report of 2014 Ischemic Heart Disease and Stroke were presented on the first and third places among 20 most common causes of mortality.

All stages of atherosclerosis - from initiation and growth to complication of the plaque - are considered an inflammatory response to injury mediated by specific cytokines. Endothelial injury and inflammation are thought to have a primary initiating or inciting role in the pathogenesis of atherosclerosis. In the molecular pathways involved in atherosclerosis monocytes are of pivotal importance. Circulating monocytes are components of the innate immunity and many pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules facilitate their adhesion and migration to the vascular endothelial wall.

One of the earliest detectable cellular responses in the formation of lesions of atherosclerosis is leukocyte adherence to the endothelium at particular anatomic sites in the artery wall. This adhesion occurs via the specific interaction of a number of receptors and ligands. Leukocytes migrate across the EC barrier and accumulate in the subendothelial space, where some of the monocytes ingest lipid and become foam cells. vascular endothelium participates in recruitment of leukocytes by expression of specific leukocyte adhesion molecules. Distinct adhesion molecules appear to regulate different stages of leukocyte immigration at inflammatory sites in a multistep process. One of such adhesion molecule is vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1). This member of

Immunoglobulin-Superfamily is 90kD cell surface protein, which is expressed on endothelial, epithelial and dendrite cells. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediates the adhesion of leukocytes to endothelial cells and is assessed as a possible future marker of atherosclerosis. Lots of studies demonstrated increased expression of endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in areas of early atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice and rabbits. Also in humans with atherosclerosis the high VCAM-1 expression in advanced atherosclerotic lesions were established. VCAM-1 plays the specific role in primary leukocyte adhesion identified as rolling as well as at final so called spreading and tethering. The integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4) on monocytes is the major ligand for the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), an immunoglobulin-like endothelial adhesion molecule highly expressed in human atherosclerotic plaques and linked to atherosclerosis susceptibility in mouse models. Although VCAM-1 is structurally similar to ICAM-1, its pattern of regulation is unique. VCAM-1 is not expressed under baseline conditions but is rapidly induced upon endothelial activation. The up-regulation of VCAM-1 under inflammatory conditions and on atherosclerotic plaques defines VCAM-1 as a highly attractive target for the treatment of atherosclerosis. Indeed, highly specific *in vivo* visualization of atherosclerotic plaques by molecular imaging of VCAM-1 expression has been demonstrated in mice and rabbits, presenting the specificity of VCAM-1 as an atherosclerosis-specific target. VCAM-1 is not only an important adhesion receptor, but also acts as a signal transducer upon leukocyte binding.

A fusion molecule CD7/VCAM-1 was designed at the university clinic of Freiburg containing the intracellular part of VCAM-1 and the extracellular and transmembrane part of CD7 in order to interfere with the cytoskeleton anchorage of VCAM-1 in a dominant negative manner. The functional consequences of transfection with the generated fusion protein were investigated *in vitro* in immortalized endothelial cell model (HMEC1) and in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

*In vitro* and *in vivo* studies were conducted within the framework of this doctoral study at the University clinic of Freiburg, Department of Angiology and Cardiology (*in vitro* part) and at the Baker IDI Heart and Diabetes Research Institute, Atherosclerosis and Vascular Biology Department (*in vivo* part).

It was hypothesized that inactivation of VCAM-1 via transfection of genes encoding for fusion proteins that compete with VCAM-1's cytoskeletal anchorage reduces monocyte adhesion to endothelial cells. The aim of this study was to investigate the feasibility of a gene therapy approach, specifically targeting the cytoskeletal anchorage of VCAM-1. Since monocyte recruitment into atherosclerotic plaques causes disease progression, blocking of monocyte adhesion to the vessel wall by local transfection of endothelial cells with a gene expressing a functional blocker of VCAM-1 may offer a novel therapeutic approach for the local treatment of atherosclerosis in

coronary and carotid arteries. With the aim to prevent further progression of coronary atherosclerosis, local injection of an adenovirus containing a VCAM-1 inactivating gene into the coronary arteries could be performed in the cardiac catheter laboratory and may be feasible for human application.

Local gene delivery by adenovirus vector systems has already been successfully implemented in animal models. The adenoviral delivery of gene vectors was combined with the local delivery via a biodegradable coating of stents. This approach was used to prevent restenosis after stenting of atherosclerotic plaques. Overall, besides the local injection into the coronary arteries, stent-associated delivery may also be useful in general to deliver therapeutic genes with anti-atherosclerotic effects in interventional cardiology.

Local treatment of rupture-prone atherosclerotic plaques and prevention of atherosclerosis are major challenges in cardiovascular medicine. The blockade of VCAM-1 appears to be a promising approach to reduce vascular damage. There is strong evidence that VCAM-1 is one of the major players in monocyte recruitment and it has been shown to enhance monocyte and macrophage adhesion in rats, mice and rabbits. Furthermore, blockade of VCAM-1 with monoclonal antibodies has been shown to inhibit adhesion and transmigration of a human monocyte cell line to human aortic endothelial cells. Anti-oxidative drugs have been found to repress ICAM-1 and VCAM-1. Direct blockade of the VCAM-1 counter receptor VLA-4 with different specific peptides has been observed to successfully attenuate monocyte migration and inflammatory reactions. Blockade of VCAM-1 in hypercholesterolaemic mice has been shown to result in reduced formation of the neointima due to the inhibition of monocyte migration. Gene targeting experiments highlighting the importance of VLA-4 and VCAM-1 in atherosclerotic lesion development have been hampered by the lack of availability of appropriate knockout mice. Mice with a homozygote deficiency in the fourth domain of VCAM-1, which binds VLA-4, have been shown to survive and to have reduced monocyte binding and an 84% reduction in lesions in the aortic root when crossed with ApoE<sup>-/-</sup> knockout mice.

All approaches that aim for systemic targeting of VCAM-1 may lead to unwanted side effects, due to the inhibition of physiological VCAM-1 functions in healthy tissues. Therefore, an ongoing effort continues into the development of agents that allow for the regional blockade of VCAM-1.

The gene therapy approach of this study was based on targeting of VCAM-1 via a CD7/VCAM-1 fusion protein using an adenoviral vector system that would allow local application.

The use of endothelial cell cultures in the studies of diseases with endothelial damage is widely implemented. These cultures represent the *in vitro* model of endothelium. They allow the experimental studies of inflammation, angiogenesis, atherosclerosis etc. For the dynamic adhesion

assays within this study the HMEC1 endothelial cell culture was used. The dynamic adhesion studies contained different stages, which included the multi-stage treatment of cells, their freeze and defrosting, their cultivation, stimulation and transfection.

At the next stage of the study it was necessary to investigate the cell phenotype in flow cytometry. The receptor expression on endothelial cells was studied within stimulated and/or transfected endothelial cell culture.

Dynamic adhesion assay – Flow Chamber method is widely implemented in modern fundamental-experimental studies. The adhesive behavior of different cells is observed and evaluated via the microscopic camera in the experimental system imitating the vessel conditions. Static adhesion assays cannot fully display the receptor-ligand interaction as the cell rolling and cell adhesion physiologically is performed under permanent flow condition.

The described method is wonderful approach of visualization of cell-cell and cell-substrate interaction at the different stages of dynamic interaction. The HMEC1 cells were stimulated and/or transfected (with CD7/VCAM1, GFP). The monocytes were isolated from the whole blood using Ficoll gradient and the flow of treated monocytes on the confluent monolayers of activated or non-activated, transfected or non-transfected HMECs was investigated using a parallel plate flow chamber. Cell rolling and adhesion was assessed in randomly selected 5 sec. video frames and counted in randomly selected optical fields. The rolled and adhered monocytes were evaluated using the Let's Edit computer software. The post experimental quality and quantity assessment and collection of the mean data were performed offline. The data were statistically analyzed.

The promising in vitro results were the basis of further studies in in vivo model of atherosclerosis – transgenic ApoE<sup>-/-</sup> deficient mice. Apolipoprotein-E KO mice (ApoE<sup>-/-</sup>) lack the primary lipoprotein required for the uptake of lipoproteins through the hepatic receptors, leading to increase of plasma cholesterol and consequently atherosclerosis can be observed in ApoE<sup>-/-</sup> mice maintained on a regular cholesterol rich diet. The transfection of a.Carotis was performed using two different operational techniques – Application and Injection techniques. Later the histomorphological studies were conducted on the transfected and non-transfected vessels. The following histological methods were used: H&E staining, PAS staining, Sudan IV staining. In vivo experiments revealed that better transfection method or operational technique is to be worked out to guarantee the distribution of CD7/VCAM1 protein to the endothelial cells. It should be able to evaluate the construct effect in vivo, which is the subject of future studies.

The above described selected genterapeutic approach resulted in very important outcomes:

In dynamic adhesion assays the CD7/VCAM-1 construct significantly inhibited VCAM-1-mediated rolling and adhesion of human monocytes in HMEC1 cells. The study findings indicate that

adenoviral-mediated transfer of the CD7/VCAM-1 construct is feasible and results in dominant negative inhibition of VCAM-1-mediated function. Very important discover of the study is the fact that the effect of CD7/VCAM-1 construct is highly specific for VCAM-1. Transfection of endothelial cells with the CD7/VCAM-1 construct as an inert competitor to wild-type VCAM-1 in stably transfected HMEC1 cells blocked VCAM-1 mediated monocyte rolling and adhesion and had no effect on ICAM-1 or E-Selectin mediated adhesion. CD7/VCAM-1 causes a dominant negative inhibition of VCAM-1. The proposed anti-atherosclerotic action of adenoviral-mediated local CD7/VCAM-1 transfection needs to be explored in further studies using a better operational technique in animal model of atherosclerosis.

In conclusion, this study confirms the crucial role of VCAM-1 in adhesion and accumulation of monocytes. Our findings strengthen the rationale for the development of therapies aimed at inhibiting the interaction between VLA-4 on monocytes and VCAM-1 on activated endothelial cells. To our knowledge, this is the first description of a blockade of this interaction via co-expression of a competing CD7/VCAM-1 fusion protein interfering with the cytoskeletal anchorage of VCAM-1 in dynamic cell adhesion studies. Based on a dominant negative inhibitory effect, the described gene therapeutic approach promises a regional, localized blockade of VCAM-1 function via the local delivery of only a small number of CD7/VCAM-1 constructs. This unique approach might allow a localized treatment of atherosclerosis for the future.



## გამოყენებული ლიტერატურა

1. Abe, Y., El-Masri, B., Kimball, K.T., Pownall, H., Reilly, C.F., Osmundsen, K., Smith, C.W. and Ballantyne, C.M. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:723-731.
2. Agrawal, S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. *Trends Biotechnol.* 1996;14:376-387.
3. Aiello, R.J., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(6): p. 1518-25.
4. Alan Daugherty, Debra L. Rateri Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice, 2005 Elsevier Inc., doi:10.1016/j.ymeth.2004.11.008;
5. Alan S., Mozaffarin D., Roger L.V., Benjamin E.J.; Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 update: A report from American Heart Association; *Circulation*. 2014; 129:e28-e292.
6. Albelda, M.S., Wayne S.C., and Ward, P.A., Adhesion molecules and inflammatory injury, *FASEB J.*1994; 8:504-512.
7. Alboluxin, a snake C-type lectin from *Trimeresurus albolabris* venom is a potent platelet agonist acting via GPIIb and GPIIb/IIIa. *Thromb. Haemost.* 87:692-698.
8. Alexander MY, Brosnan MJ, Hamilton CA, Downie P, Devlin AM, Dowell F, Martin W, Prentice HM, O'Brien T, Dominiczak AF. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves nitric-oxide dependent endothelial function in a hypertensive rat model. *Cardiovasc Res.* 1999;43:798-807.
9. Alexis Broisat, Sophie Hernot, Jakub Toczek, Jens De Vos, Laurent M. Riou, Sandrine Martin, Mitra Ahmadi, Nicole Thielens, Ulrich Wernery, Vicky Caveliers, Serge Muyldermans, Tony Lahoutte, Daniel Fagret, Catherine Ghezzi and Nick Devoogdt, Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions, *Circ Res.* 2012;110:927-937.
10. Ali ZA, Bursill CA, Hu Y, Choudhury RP, Xu Q, Greaves DR, Channon KM. Gene transfer of a broad spectrum CC-chemokine inhibitor reduces vein graft atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I235-I241.
11. Alon R, Kassner PD, Carr MW, et al: 1995. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 128: 1243-1253.
12. Alon, R., et al., Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J Cell Biol*, 1996. 135(3): p. 849-65.
13. Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E. and Springer, T.A. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* 1995; 128:1243-1253.

14. Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., Springer, T.A., The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1; *The Journal of Cell Biology*, Volume 128, Number 6, 1995; 1243 - 1253.
15. Altieri, D.C., Plescia, J. and Plow, E.F. The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin  $\alpha$ 2, (Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J.Biol. Chem.* 1993; 268:1847-1853.
16. An G, Wang H, Tang R, et al: 2008. P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation* 117:3227–3237.
17. Anderson JW, Chen WJL. Plant fiber: carbohydrate and lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* 1979; 32:346.
18. Andrew D. Blann<sup>1</sup>, Martine Seigneur<sup>2</sup>, Michael Steiner<sup>3</sup>, J. Paul Miller<sup>4</sup>, Charles N. McCollum, Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in Peripheral Artery Disease and Hypercholesterolaemia: Relationship to the Location of Atherosclerotic Disease, Smoking, and in the Prediction of Adverse Events. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1080–5.
19. Andrian UH<sup>1</sup>, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. 1995 Sep 22;82(6):989-99.
20. Anna C. Calkin, Josephine M. Forbes, Craig M. Smith, Markus Lassila, Mark E. Cooper, Karin A. Jandeleit-Dahm, Terri J. Allen Rosiglitazone Attenuates Atherosclerosis in a Model of Insulin Insufficiency Independent of Its Metabolic Effects *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1903-1909.
21. Anna C. Calkin, Josephine M. Forbes, Craig M. Smith, Markus Lassila, Mark E. Cooper, Karin A. Jandeleit-Dahm, Terri J. Allen Rosiglitazone Attenuates Atherosclerosis in a Model of Insulin Insufficiency Independent of Its Metabolic Effects. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1903-1909.
22. Antischkow N. Uber die atherosclerose der aorta beim kaninchen and uber derin entstehungsbedingungen. *Beitraege zur pathologischen anatomie und zur allegemeinen pathologie* 1914; 59:308– 348.
23. Aqel, N.M., et al., Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 1984. 53(3): p. 265-71.
24. Archelos, J.J. and Hartung, H.P. The role for adhesion molecules in multiple sclerosis: biology, pathogenesis and therapeutic implications. *Mol. Med. Today.* 1997; 3:310-321.
25. Aruffo, A. and Seed, B. J. Molecular cloning of two CD7 (T-cell leukemia antigen) cDNAs by a COS cell expression system. *EMBO* 1987; 6:3313-3316.
26. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964 –967.

27. Asahina, A., Tada, Y., Nakamura, K. and Tamaki, Colchicine and griseofulvin inhibit VCAM-1 expression on human vascular endothelial cells – evidence for the association of VCAM-1 expression with microtubules. *J.Dermatol. Sci.* K.2001; 25:1-9.
28. Avrum I.G. *Atherosclerosis Exposed: The complex Pathway to a Lethal Outcome*; American Society for Investigative Pathology, Experimental Biology, 2007;
29. Barcena, A., Muench, M.O., Galy, A.H., Cupp, J., Roncarolo, M.G., Phillipps, J.H. and Spits, Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the 6. *Literatur 123 human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development.* *Blood.* 1993; 82:3401-3414.
30. Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. and Isner, J.M. Constitutive expression of phVEGF165 following intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998; 97:1114-1123.
31. Bennett, C.F., Kornbrust, D., Henry, S., Stecker, K., Howard, R., Cooper, S., Dutson, S. and Jacoby, H.I. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 280:988-1000.
32. Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L. and Butcher, E.C. 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995; 80:413-422.
33. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, La Rosa SP, Dhainant JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr., PROWESS study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001; 344 (10):699-709.
34. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, et al: 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13:587–596.
35. Bevilacqua, M.P. and Nelson, R.M. J. Selectins. *Clin. Invest.* 1993; 91:379-387.
36. Bevilacqua, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev.Immunol.* 1993;11:767-804.
37. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S. and Gimbrone, M.A. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 1987; 84:9238-9242.
38. Bild D.E., Bluemke D.A., Burke G.L., *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis: Objectives and Design*; *Am.J.Epidemiol*; 2002; 156:871-881;
39. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science.*1988; 242 (4877): 423-6.
40. Birnbaum, Y., Patterson, M. and Kloner, The effect of CY1503, a sialyl Lewis, R.A. analog blocker of the selectin adhesion molecules, on infarct size and „noreflow“ in the rabbit model of acute infarction/reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1997; 29:2013-2025.

41. Birnboim, H.C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 1979; 7:1513-1523.
42. Blake Pepinsky, Catherine Hession, Ling-Ling Chen, Pamela Moy, Linda Burkly, Aniela Jakubowski, E. Pingchang Chow, Christopher Benjamin, Gloria Chi-Rosso, Stefan Luhowskyj, and Roy Lobb. Structure/Function Studies on Vascular Cell Adhesion Molecule-1", *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 267, No. 25, pp. 17820-17826, 1992.
43. Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Peetz, D., Hafner, G., Tiret, L. and Meyer, J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 104:1336-1342.
44. Blasberg, R. and Tjuvajev, J. Herpes simplex virus thymidine kinase as a marker/reporter gene for PET imaging of gene therapy. *Q. J. Nucl. Med.* 1999; 43:163- 169.
45. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha_v\beta_3$  integrin and GPIIb/IIIa. *J Ex Med.* 1998;187: 329–339.
46. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha_v\beta_3$  integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med*, 1998. 187(3): p. 329-39.
47. Bonatti J, Bernecker O, Chevtchik O, Hammerer-Lercher A, Laufer G, Oberhuber A, Ott H, Podesser B, Ruttman E, Schachner T, Walter J, Zou Y. Kardiovaskuläre Gentherapie - was kann der Chirurg derzeit davon erwarten?, *Journal für Kardiologie* 2002; 9(1-2): 14-20.
48. Boring, L., et al., Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 894-7.
49. Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, Chignier E, Bricca G, McGregor JL. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double knockout mice (apoE2/2/ICAM-1/2/2) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2630-2635.
50. Braun-Falco, M., Doenecke, A., Smola, H. and Hallek, M. Efficient gene transfer into human keratinocytes with recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 1999;6:432-441.
51. Braunwald, E. Shattuck Lecture – cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* 1997;337:1360-1369.
52. Braunwald, E., Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med*, 1997. 337(19): p. 1360-9.
53. Brenner, G., Gulbins, E. and Schlottmann, K. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93:15376-15381.
54. Breslow, J.L. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat. Med.* 1997; 3:600-601.

55. Briscoe, D.M., Cotran, R.S. and Pober, J.S. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3T cell infiltration. *J. Immunol.* 1992;149:2954-2960.
56. Briskin, M.J., McEvoy, L.M. and Butcher, E.C. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature.* 1993; 363:461- 464.
57. Broisat A, Riou LM, Ardisson V, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C. Molecular imaging of vascular cell adhesion molecule-1 expression in experimental atherosclerotic plaques with radiolabelled B2702-p. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;34:830–840.
58. Broisat,A., Hernot,S.,Toczek,J., Jens De Vos, Riou,L.M., Martin,S., Ahmadi,M.,Thielens, N., Wernery,U., Caveliers,V., Muyltermans,S., Lahoutte,T., Fagret,D., Ghezzi,C., Devoogdt, N.; Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions, *Circ Res.* 2012;110:927-937.
59. Buckley, C.D. and Simmons, D.L. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol. Med. Today.* 1997; 3:449-456.
60. Buerke, M., Weyrich, A.S., Zheng, Z., Gaeta, F.C., Forrest, M.J. and Lefer, A.M. Sialyl Lewisx-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J. Clin. Invest.* 1994; 93:1140-1148.
61. Burch RM, Noronha-Blob L, Bator JM, Lowe VC, Sullivan JP. Mice treated with a leumedin or antibody to Mac-1 to inhibit leukocyte sequestration survive endotoxin challenge. *J Immunol* 150 (8 Pt 1): 3397-403.
62. Burns LJ, Pooley JC, Walsh DJ, Vercellotti GM, Weber ML, Kovacs A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in ECs is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. *Transplantation.* 1999;67: 137–144.
63. Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. Focal adhesions, contractility and signaling. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1996; 12:463-518.
64. Butcher, E.C., Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 1991. 67(6): p. 1033-6.
65. BATTERY LD, SPRINGALL DR, CHESTER AH, EVANS TJ, STANDFIELD N, PARUMS DV, YACOUB MH, POLAK JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 1996;75:77–85.
66. By Robert G. Collins, Rizwan Velji, Natalia V. Guevara, M. John Hicks,§ Lawrence Chan, i and Arthur L. BeaudetP-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E–deficient Mice, *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press • 0022-1007/2000. Volume 191, Number 1, January 3, 2000 189–194.

67. Campbell R, Edelmann ER, Simon DI. A mAb to the  $\beta$ 2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/Cd18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc Natl Acad Sci.*1998; USA 95: 10134-10139.
68. Campbell, J.J., E.F. Foxman, and E.C. Butcher, Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *Eur J Immunol*, 1997. 27(10): p. 2571-8.
69. Campbell, J.J., et al., Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 1998. 279(5349): p. 381-4.
70. Candido, R., Jandeleit-Dahm, K.A., Cao,Z., Nesteroff, S.P., Burns,W.C., Twigg,S.M., Dilley, R.J., Cooper, M.E., Allen, T.J., Prevention of Accelerated Atherosclerosis by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Diabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice, *Circulation*. 2002;106:246-253.
71. Cao Y1, Jacobsen NR, Danielsen PH, Lenz AG, Stoeger T, Loft S, Wallin H, Roursgaard M, Mikkelsen L, Møller P. Vascular effects of multiwalled carbon nanotubes in dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> mice and cultured endothelial cells. *Toxicol Sci*. 2014 Mar;138(1):104-16.
72. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules *Blood* 84(7) 2068-2101.
73. Carlos TM, Harlan JM (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*.1993; 84 (7): 2068-101.
74. Carlos, T.M. and Harlan, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994; 84:2068-2101.
75. Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R. and Roso, M. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells published erratum appears in *Blood*. 1990; 1;76:2420. *Blood* 76:965-970.
76. Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D.E. and Springer, T.A. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and -actinin. *J. Cell. Biol.* 1992; 118:1223-1234.
77. Carroll L. Ramos, Yuqing Huo, Unsu Jung, Shukti Ghosh, David R. Manka, Ian J. Sarembock, Klaus Ley, Direct Demonstration of P-Selectin- and VCAM-1-Dependent Mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E-Deficient Mice .*Circ Res*. 1999;84:1237-1244.
78. Carroll L. Ramos, Yuqing Huo, Unsu Jung, Shukti Ghosh, David R. Manka, Ian J. Sarembock and Klaus Ley, Direct Demonstration of P-Selectin- and VCAM-1-Dependent Mononuclear Cell Rolling in Early Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E-Deficient Mice, *Circ. Res*. 1999;84;1237-1244.
79. Carter, R.A. and Wicks, I.P. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106). A Multifaceted Regulator of Joint Inflammation. *Arthritis Rheum*. 2001; 44:985-994.
80. Chan, J.R., Hyduk, S.J. and Cybulsky, M.I. 41 Integrin/VCAM-1 interaction activates L2 Integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J. Immunol*. 2000;164:746-753.

81. Chang CC, Chu CF, Wang CN, Wu HT, Bi KW, Pang JH, Huang ST. The anti-atherosclerotic effect of tanshinone IIA is associated with the inhibition of TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1, ICAM-1 and CX3CL1 expression. *Phytomedicine*. 2014 Feb 15;21(3):207-16.
82. Chapman AP, Antoniw P, Spitali M, West S, Stephens S, King DJ. Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol*. 1999; 17 (8): 780-3.
83. Charakida M, Donald A, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, Davey Smith G, Golding J, Klein NJ, Deanfield JE, and ALSPAC Study Team. Endothelial dysfunction in childhood infection. *Circulation* 2005;111: 1160–1165.
84. Chavakis T, Athanasopoulos A, Rhee JS, Orlova V, Schmidt-Woll T, Bierhaus A, May AE, Celik I, Nawroth PP, Preissner KT. Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. *Blood*. 2005; 105: 1036-1043.
85. Chobanian, A.V. and Dzau, V.J. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: *Atherosclerosis and coronary artery disease* (ed. by Fuster, V., Ross, R. & Topol, E.J.), Vol.1, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996;pp. 237-242.
86. Choi KW1, Um SH, Kwak JH, Park HJ, Kim KH, Moon EY, Kwon ST, Pyo S. Suppression of adhesion molecule expression by phenanthrene-containing extract of bulbils of Chinese Yam in vascular smooth muscle cells through inhibition of MAPK, Akt and NF- $\kappa$ B. *Food Chem Toxicol*. 2012 Aug;50(8):2792-804. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.005.
87. Chuntharapai, A., et al., Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol*, 1994. 153(12): p. 5682-8.
88. Chyu KY, Dimayuga P, Zhu J, Nilsson J, Kaul S, Shah PK, Cercek B. Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Res*. 1999;85:1192–1198.
89. Clark, E.A. and Brugge, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995; 268:233-238.
90. Collins RG, Velji R, Guevara NV, et al: 2000. PSelectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191:189–194.
91. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*. 2000;191:189 –194.
92. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, et al:2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117:1649–1657.
93. Cominacini, L., Garbin, U., Pasini, A.F., Davoli, A., Campagnola, M., Contessi, G.B., Pastorini, A.M. and Lo Cascio, V. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion

- molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22:117-127.
94. Cooke BM, Usami S, Perry I, Nash GB. A simplified method for culture of endothelial cells and analysis of blood cells under conditions of flow. *Microvasc Res.* 1993;45:33– 45.
  95. Cooper, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 1987; 105:1473-1478.
  96. Corbí, A.L. Leukocyte integrins, structure, expression and function. Springer, Heidelberg. 1996.
  97. Couffinal, T., Dupl a, C., Moreau, C., Lamaziere, J.M.D. and Bonnet, J. 1994.
  98. Cross, C.E., van der Vliet, A. and Eiserich, J.P. Cigarette smokers and oxidant stress: a continuing mystery. *Am J. Clin. Nutr.* 1998; 67:184-185.
  99. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr.: 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251:788–791.
  100. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al: 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255–1262.
  101. Cybulsky, M.I., and Gimbrone, M.A., Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 251:788–791.
  102. Cybulsky, M.I., Fries, J.W., Williams, A.J., Sultan, P., Eddy, R., Byers, M., Shows, T. Gimbrone, M.A., Jr. and Collins, T. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88:7859-7863.
  103. Cybulsky, M.I., Fries, J.W.U., Williams, A.J., Sultan, P., Davis, V.M., Gimbrone, M.A., Jr. and Collins, T. Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 1991;138:815-820.
  104. Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4642– 4646.
  105. Dansky, H.M., Barlow, C.B., Lominska, C., Sikes, J.L., Kao, C., Weinsaft, J., Cybulsky, M.I. and Smith, J.D. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically depending on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21:1662- 1667.
  106. Davies, M.J., Gordon, J.L., Gearing, A.J., Pigott, R., Woolf, N., Katz, D. and Kyriakopoulos, A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.* 1993; 171:223- 229.
  107. Davies, P.F. and Tripathi, S.C. Mechanical stress mechanisms and the cell: an endothelial paradigm. *Circ. Res.* 1993; 72:239-245.
  108. Dawber, T.R. and Kannel, W.B. The Framingham study. An epidemiological approach to coronary heart disease. *Circulation.* 1966; 34:553-555.



109. Degawa H, Watanabe K, Uchida H, Nagao T, Tomikawa S, Beck Y, Nomura Y, Ichikawa N, Ando J, Kikuchi K, Ito S (1996) Blocking of ICAM-1 and LFA-1 in rat liver transplantations. *Transplantation Proceedings* Jun; 28(3), 1362-1363.
110. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, Lisnock J, Weikel R, Bergstrom JD, Shevell DE, Hermanowski-Vosatka A, Sparrow CP, Chao YS, Rader DJ, Wright SD, Pure E. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J Immunol.* 2000;165:3430–3435.
111. Detmers, P.A., et al., Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*, 1990. 171(4): p. 1155-62.
112. Dibasio, R.B. and LoBuglio, A.F. Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., editors. *Goodman & Gilman: the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, pp. 1996; 1291-1308.  
Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, Ballantyne CM (1999). Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* 163 (9): 5029-38.
113. Dong JF, Moake JL, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntyre LV, Fujikawa K, Lopez JA. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002;100:4033–4039.
114. Dong ZM, Brown AA, Wagner DD. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation.* 2000;101:2290–2295.
115. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, et al: 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102:145–152.
116. Dormann, D., J.M. Clemetson, A. Navdaev, B.E. Kehrel, and K.J. Clemetson. 2001. Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. *Blood.* 97:929–936.
117. Dosquet C1, Weill D, Wautier JL. Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1992;34 Suppl:S55-9.
118. Drexler H, Zeiher AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo: focus on hypercholesterolemia. *Hypertension.* 1991;18: II90 –II99.
119. Du, X., E. Magnenat, T.N. Wells, and K.J. Clemetson. 2002.
120. Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. and Springer, T.A. Induction of IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 1986; 137:245-254.
121. Dustin, M.L., Staunton, D.E. and Springer, T.A. Supergene families meet in the immune system. *Immunol. Today.* 1988; 9:213-215.

122. Dyer CM, Lew AM. Antigen targeted to secondary lymphoid organs via vascular cell adhesion molecule (VCAM) enhances an immune response. *Vaccine*. 2003;21:2115–2121.
123. Ebnet, K., Brown, K.D., Siebenlist, U.K., Simon, M.M. and Shaw, S. *Borrelia burgdorferi* activates nuclear factor-B and is a potent inducer of chemokine and adhesion molecule gene expression in endothelial cells and fibroblasts. *J. Immunol.* 1997; 158:3285-3292.
124. Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Lusinskas FW, Lopez J, Plow E, Simon DI (2003). Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Iba1. *J Exp Med* 198 (7): 1077-88.
125. Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G. and Endres, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol. Today*. 1997; 18:487-491.
126. Eine Bindung ist nicht genug - wie Leukozyten an Blutgefäße binden, MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT Presseinformation, B 22 / C 14 / 2004 (49) (PNAS, Early Edition, 20. April 2004.
127. Eisenbarth, C.A., Haynes, B.F., Schroer, J.A. and Fauci, A.S. Production of monoclonal antibodies reacting with peripheral blood mononuclear cell surface differentiation antigens. *J. Immunol.* 1980; 124:1237-1244.
128. Elliott M. Antman, MD, FACC, FAHA, Chair ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction, American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association, Inc.2004.
129. Endothelial junctional adhesion molecule-1 guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. Schmitt MM, Megens RT, Zerneck A, Bidzhekov K, van den Akker M, Rademakers T, van Zandvoort MA, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C, Frenkel IM, Gafencu AV. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology*. 2013 Nov;218(11):1376-84.
130. Eric T. Choi, MD; M. Faisal Khan, MD; Jeremy E. Leidenfrost, BA; Emily T. Collins, BS; Kenneth P. Boc, BS; Brian R. Villa, BA; Deborah V. Novack, MD; William C. Parks, PhD; Dana R. Abendschein, PhD,  $\beta$ 3-Integrin Mediates Smooth Muscle Cell Accumulation in Neointima After Carotid Ligation in Mice, *Circulation*. 2004;109:1564-1569.
131. Esaki T, Hayashi T, Muto E, Yamada K, Kuzuya M, Iguchi A. Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 1997;128:39–46.
132. Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM (1999). Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood* 94 (10): 3281-8.
133. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, et al: Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 103: e28-e34, 2008, extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74 (3): 541-54.

134. F. Bestaa, I. Muñllera, M. Lorenza, S. Massberga, A. Buñltmanna, N. Cabezaa, T. Richterb, E. Kremmerc, C. Nothdurfterd, K. Brandd, M. Gawaza,e, Reduced B3-endonexin levels are associated with enhanced urokinase-type plasminogen activator, doi:10.1016/j.thromres.2004.02.021.
135. Falk, E., Shah, P.K. and Fuster, V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Atherosclerosis and coronary artery disease (ed. by Fuster, V., Ross, R. & Topol, E.J.), Vol.1, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1996; 492-510.
136. Fawcett, J., Holness, C.L., Needham, L.A., Turley, H., Gatter, K.C., Mason, D.Y. and Simmons, D.L. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature*. 1992; 360:481-484.
137. Federici, C., Camoin, L., Hattab, M., Strosberg, A.D. and Courand, P.-O. Association of the cytoplasmic domain of intercellular-adhesion molecule-1 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and -tubulin. *Eur. J. Biochem*. 1996; 238:173-180.
138. Feige E, Yacov N, Salem Y, Levi I, Mendel I, Propheta-Meirán O, Shoham A, Hait-Darshan R, Polonsky O, George J, Harats D, Breitbart E. Inhibition of monocyte chemotaxis by VB-201, a small molecule lecinoxoid, hinders atherosclerosis development in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):430-9.
139. Forlow SB, Ley K (2001). Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2): H634-41.
140. Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP, Plow EF (2001). Integrin alpha(M)beta(2)-mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *J Exp Med* 193 (10): 1123-33.
141. Freedman, A.S., Munro, J.M., Rice, G.E., Bevilacqua, M.P., Morimoto, C., McIntyre, B.W., Rhyhart, K., Pober, J.S. and Nadler, L.M. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. *Science*. 1990; 249:1030-1033.
142. Frenette PS, Wagner DD (1996). Adhesion molecules-Part I. *N Engl J Med* 334 (23): 1526-9.
143. Frenette PS, Wagner DD (1996). Adhesion molecules-Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 335 (1): 43-5.
144. Frenette, P.S. and Wagner, D.D. Adhesion molecules – part I. *N. Engl. J. Med*. 1996; 334:1526-1529.
145. Frenette, P.S. and Wagner, D.D. Adhesion molecules – part II: blood vessels and blood cells. *N. Engl. J. Med*. 1996; 335:43-45.
146. Fressinaud E, Meyer D. Von Willebrand factor and platelet interactions with the vessel wall. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991;2:333–340.
147. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res*. 2003;93:980–989.

148. Furie, M.B., Tancinco, M.C. and Smith, C.W. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood*. 1991; 78:2089-2097.
149. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque, part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:937–954.
150. Gal D, Rongione AJ, Slovenkai GA, et al. Atherosclerotic Yucatan microswine: an animal model with high-grade fibrocalcific, nonfatty lesions suitable for testing catheter-based interventions. *Am Heart J* 1990; 119:291–300.
151. García-Vicuña, R., Díaz-González, F., González-Alvaro, I., del Pozo, M.A., Mollinedo, F., Cabañas, C., González-Amaro, R. and Sánchez-Madrid, F. Prevention of cytokine-induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from oxycam family. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:143- 153.
152. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schomig A. Vitronectin receptor ( $\alpha_3$ ) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells. *Circulation*. 1997;96: 1809–1818.
153. Gearing, A.J.H. and Newman, W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today*. 1993; 14:506-512.
154. Gerszten, R.E., Lim, Y.-C., Ding, H.T., Snapp, K., Kansas, G., Dichek, D.A., Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Gimbrone, M.A., Jr., Rosenzweig, A. and Lusinskas, F.W. Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion 6. Literature 130 molecule-1-transduced human endothelial cells. Implications for atherogenesis. *Circ. Res*. 1998; 82:871-878.
155. Gilat, D., et al., Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or Heparitinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol*, 1994. 153(11): p. 4899-906.
156. Gimbrone, M.A., Jr., Cotran, R.S. and Folkman, J. Human vascular endothelial cells in culture, growth and DNA synthesis. *J. Cell. Biol*. 1974; 60:673-684.
157. Gimbrone, M.A., Jr., Nagel, T. and Topper, J.N. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J. Clin. Invest*. 1997; 99:1809-1813.
158. Giuffre, L., et al., Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol*, 1997. 136(4): p. 945-56.
159. Giunzioni, I., et al. 2014. Cigarette smoke condensate affects monocyte interaction with endothelium. *Atherosclerosis*. 234(2):383-90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.029. Epub 2014 Apr 1.
160. Glakov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunavicius, R. and Kolettis G.J. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med*. 1987;316:1371-1375.

161. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41: 1769–1775.
162. González-Alvaro, I., Carmona, L., Díaz-González, F., González-Amaro, R., Mollinedo, F., Sánchez-Madrid, F., Laffon, A. and García-Vicuña, R. Aceclofenac, a new nonsteroidal antiinflammatory drug, decreases the expression and function of some adhesion molecules on human neutrophils. *J. Rheumatol.* 1996; 23:723-729.
163. González-Amaro, R., Díaz-González, F. and Sánchez-Madrid, F. Adhesion molecules in inflammatory disease. *Drugs.* 1998; 56:977-988.
164. Goodhart DM, Anderson TJ. Role of nitric oxide in coronary arterial vasomotion and the influence of coronary atherosclerosis and its risks. *Am J Cardiol.* 1998;82:1034 –1039.
165. Goon PK, Boos CJ, Lip GY. Circulating endothelial cells: markers of
166. Göran K. Hansson, Inflammation, Atherosclerosis and Coronary Artery Disease, *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
167. Göran K. Hansson Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease, *N Engl J Med* 2005; 352:1685-1695.
168. Gossen, M. and Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89:5547-5551.
169. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. and Bujard, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 1995; 268:2723- 2739.
170. Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E. and McClelland, A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell.* 1989; 56:839-847.
171. Griendling, K.K. and Alexander, R.W. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997; 96:3264-3265.
172. Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* 1995; 9:1–14.
173. Gurtner, G.C., Davis, V., Li, H., McCoy, M.J., Scarpe, A. and Cybulsky, M.I. Targeted disruption of the murine VCAM-1 gene: essential role of VCAM-1 chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* 1995; 9:1-14.
174. Gurtner, G.C., et al. 1995. Targeted disruption of the murine VCAM-1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev.* 9:1–14.
175. Gutstein D.E., Fuster V., Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture; *Cardiovascular Research* 41; 1999; 323-333;
176. Haber E (1986). In vivo diagnostic and therapeutic uses of monoclonal antibodies in cardiology. *Annu Rev Med* 37: 249-61.

177. Hansson GK, Zhou X, Tornquist E, Paulsson G. The role of adaptive immunity in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:53– 64.
178. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685–1695.
179. Harris, J.D., Graham, I.R., Schepelmann, S., Stannard, A.K., Roberts, M.L., Hodges, B.L., Hill, V.J., Amalfitano, A., Hassall, D.G., Owen, J.S., and Dickson, G. Acute regression of advanced and retardation of early aortic atheroma in immunocompetent apolipoprotein-E (apoE) deficient mice by administration of a second generation (E1-, E3-, polymerase) adenovirus vector expressing human apoE. *Human Molecular Genetics*, Vol. 2002; 11, No.1, 43-58.
180. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med*, 1991. 174(4): p. 785-90.
181. Hayes M. Dansky, Courtenay B. Barlow, Chris Lominska, John L. Sikes, Catherine Kao, Jonathan Weinsaft, Myron I. Cybulsky, Jonathan D. Smith, Adhesion of Monocytes to Arterial Endothelium and Initiation of Atherosclerosis Are Critically Dependent on Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Gene Dosage, (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1662-1667.
182. Haynes, B.F. and Heinly, C.S. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* 1995; 181:1445-1458.
183. Haynes, B.F., Mann, D.L., Hemler, M.E., Schroer, J.A., Shelhamer, J.H., Eisenbarth, G.S., Strominger, J.L. Thomas, C.A., Mostowski, H.S. and Fauci, A.S. Charakterization of a monoclonal antibody that defines an immunoregulatory T cell subset for immunoglobulin synthesis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77:2914-2918.
184. Haynes, B.F., Metzgar, R.S., Minna, J.D. and Bunn, P.A. Phenotypic characterization of cutaneous T-cell lymphoma. Use of monoclonal antibodies to compare with other malignant T cells. *N. Engl. J. Med.* 1981; 304:1319-1323.
185. Heinly, C.S., Sempowski, G.D., Lee, D.M., Patel, D.D., McDermott, P.M., Scarce, R.M., Thompson, C.B. and Haynes, B.F. Comparison of thymocyte development and cytokine production in CD7-deficient, CD28- deficient and CD7/CD28 double-deficient mice. *Int. Immunol.* 2001; 13:157-166.
186. Heiska, L., Alftan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A. and Carpén, O. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). *J. Biol. Chem.* 1998; 273:21893-21900.
187. Hemler, M.E. Integrin associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998; 10:578-585.
188. Henriksen, P.A., Hitt, M., Xing, Z., Wang, J., Haslett, C., Riemersma, R.A., Webb, D.J., Kotelevtsev, Y.V. and Sallenave, J.M. Adenoviral Gene Delivery of Elafin and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Attenuates NF- $\kappa$ B-Dependent Inflammatory Responses of Human

- Endothelial Cells and Macrophages to Atherogenic Stimuli *The Journal of Immunology*, 2004; 172: 4535–4544.
189. Henseleit, U., Steinbrink, K., Sunderkotter, C., Goebeler, M., Roth, J. and Sor, C. Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp. Dermatol.* 1994; 3:249-256.
  190. Hernandez, R., Allen NB., Liu, K., Association of depressive symptoms, trait anxiety, and perceived stress with subclinical atherosclerosis: results from the Chicago Healthy Aging Study (CHAS), *Prev Med.* 2014 Apr;61:54-60. doi: 10.1016/j.ypmed.2013.12.032. Epub 2014 Jan 13.
  191. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J.* 1997;11:955–964.
  192. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593– 600.
  193. Hogg, N. and Landis, R.C. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5:383-390.
  194. Hu G, Liu J, Zhen YZ, Wei J, Qiao Y, Lin YJ, Tu P. Rhein inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule 1 in human umbilical vein endothelial cells with or without lipopolysaccharide stimulation. *Am J Chin Med.* 2013;41(3):473-85.
  195. Huber, S.A. VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells. *J. Virol.* 1994; 68:3453-3458.
  196. Hundelshausen P, Weber KSC, Huo Y, Proudfoot AEI, Nelson PJ, Ley K, Weber C. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 2001; 103:1772–1777.
  197. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2000;87:153–159.
  198. Huo Y, Ley K: 2001. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 173: 35–43.
  199. Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A. and Ley, K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and Fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* 2000; 87:153-159.
  200. Huo, Y., Hafezi-Moghadam, A., Ley, K., Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions; *Circ Res.* 2000;87:153-159.
  201. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and

- incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;16:96:4219–4225.
202. Hynes RO (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 (1): 11-25.
  203. Hynes, R.O. and Lander, A.D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*. 1992; 68:303-322.
  204. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992; 69:11-25.
  205. Iademarco, M.F., McQuillan, J.J. and Dean, D.C. Vascular cell adhesion molecule 1: contrasting transcriptional control mechanisms in muscle and endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90:3943-3947.
  206. Iademarco, M.F., McQuillan, J.J., Rosen, G.D. and Dean, D.C. Characterization of the promoter for vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem*. 1992; 267:16323-16329.
  207. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999;9: 215–219.
  208. Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B.D. and Cybulsky, M.I. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res*. 1999; 85:199-207.
  209. Ikeda, T.I., Takahashi, T.M., Shimada, K., Monocyte-Endothelid Cell Interaction in Atherogenesis and , *Clin. Cardiol*.1998; 21, 11-14.
  210. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease, *N Engl J Med* 2005; 352:1685-1695.
  211. Inoue T, Uchida T, Yaguchi I, Sakai Y, Takayanagi K, Morooka S (2003). Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin Mac-1 is associated with neointimal thickening and restenosis. *Circulation* 107: 1757-1763.
  212. Isner, J.M., Baumgartner, I., Rauh, G., Schainfeld, R., Blair, R., Manor, O., Razvi, S. and Symes, J.F. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J. Vasc. Surg*. 1998; 28:964-975.
  213. Isner, J.M., Vale, P.R., Symes, J.F. and Losordo, D.W. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ. Res*. 2001; 89:389-400.
  214. Issekutz AC, Issekutz TB (1995). Monocyte migration to arthritis in the rat utilizes both CD11/CD18 and very late activation antigen 4 integrin mechanisms. *J Exp Med* 181 (3): 1197-203.
  215. J. Kunz: The role of the vascular extracellular matrix and the age-related changes of arteries *Gerontology* 2002, 48: 267-278.



216. Jackson, L.A., Campbell, L.A. and Schmidt, R.A. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am. J. Pathol.* 1997; 150:1785-1790.
217. Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood.* 1996;87:73– 82.
218. Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, G.C. and Minick, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.* 1973; 52:2745-2754.
219. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ (1994). Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24 (7): 1591-601.
220. Jan-Olaf Gebbers Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins –a critical review, *GMS German Medical Science* 2007, Vol. 5, ISSN 1612-3174.
221. Javier Mestas, Klaus Ley, Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:228–232.
222. Javier Mestas, Klaus Ley, Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis, *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:228–232.
223. Jiang G, Valen G, Tokuno S, Thoren P, Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1255–1261.
224. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91: 1314–1319.
225. John E. Deanfield, Julian P. Halcox and Ton J. Rabelink Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance *Circulation.* 2007;115:1285-1295.
226. John E., Julian P., Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance; *Circulation*; 2007; 115:1285-1295;
227. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1037–1043.
228. Jono S, McKee MD, Murry CE, *et al*: Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87: E10-E17, 2000.
229. Jordan J, Beneke R, Hutler M, Veith A, Luft FC, Haller H (1999). Regulation of Mac-1 (CD11b/CD18) expression on circulating granulocytes in endurance runners. *Med Sci Sports Exerc* 31: 362-367.
230. Joyce DE, Grinnell BW (2002). Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating NF-kappaB, *Crit Care Med* 30: S288-293.

231. Julia Bauer, Martin Daniel, Sebastian Sieber Expressionsinhibitor AGI-1067 zur Behandlung der Atherosklerose, Seminarvortrag im Rahmen der Pharmazeutischen Chemie, SS 2004.
232. Juliano, R.L. and Haskill, S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 1993.; 120:577-585.
233. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Ronnema T, Raitakari OT. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns study. *Circulation* 2004;110:2918–2923.
234. Jürgen R. Braun, Thomas E. Willnow, Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell, Prinzipien und klinische Relevanz, *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 26, 28. Juni 1996 (35) A-1765.
235. Kaapa, A., Peter, K. and Yläne, J. Effects of mutations in the cytoplasmic domain integrin beta(1) to talin binding and cell spreading. *Exp. Cell. Res.* 1999; 250:524-534.
236. Kacso IM1, Kacso G. Endothelial cell-selective adhesion molecule in diabetic nephropathy. *Eur J Clin Invest.* 2012 Nov;42(11):1227-34. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02715.x. Epub 2012 Sep 8.
237. Kansas, G.S. and Pavalko, F.M. The cytoplasmic domains of E- and Pselectin do not constitutively interact with -actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 1996; 157:321-325.
238. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996; 88:3259-3287.
239. Kaplan EJ, Moon DG, Weston LK, Minnear FL, Del Vecchio PJ, Shepard JM, Fenton JW. Platelets adhere to thrombin-treated endothelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1989;257:H423–H433.
240. Kaplanski, G., Marin, V., Fabrigoule, M., Boulay, V., Benoliel, A.-M., Bongrand, P., Kaplanski, S. and Farnarier, C. Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998; 92:1259-1267.
241. Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, Xie A, Aldred P, Sarembock IJ, Lindner JR. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation.* 2007;116:276–284.
242. Keith M. Channon, HuSheng Qian, Scot A. Youngblood, Ercument Olmez, Geetha A. Shetty, Valentina Neplioueva, Michael A. Blazing, Samuel E. George Acute Host-Mediated Endothelial Injury After Adenoviral Gene Transfer in Normal Rabbit Arteries Impact on Transgene Expression and Endothelial Function, *Circ Res.* 1998;82:1253-1262.
243. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:1262–1270.
244. Khan JA, Cao M, Kang BY, Liu Y, Mehta JL, Hermonat PL. Systemic human Netrin-1 gene delivery by adeno-associated virus type 8 alters leukocyte accumulation and atherogenesis in vivo. *Gene Ther* 2011;18:437-44.

245. Kienzle, G. and Kempis, J. Vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) on primary human articular chondrocytes: functional regulation of expression by cytokines and comparison with intercellular adhesion molecule 1 (CD54) and very late activation antigen 2. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:1296-1305.
246. Kirchhofer, D., M.A. Riederer, and H.R. Baumgartner, Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood*, 1997. 89(4): p. 1270-8.
247. Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. and Nishizuka, Y. Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J.Biol. Chem.* 1985; 260:12492-12499.
248. Kitayama, J., et al., The C-C chemokine receptor CCR3 participates in stimulation of eosinophil arrest on inflammatory endothelium in shear flow. *J Clin Invest*, 1998. 101(9): p. 2017-24.
249. Klebba, AJ. Mortality From Diseases Associated With Smoking: United States, 1960-77. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics;1982. Vital and Health Statistics, Series 20, No. 17. Available at: [http://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr\\_20/sr20\\_017.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_20/sr20_017.pdf).
250. Knowles, M.R., Hohneker, K.W., Shou, Z., Olsen, J.C., Noah, T.L., Hu, P.-C., Leigh, M.W., Engelhardt, J.F., Edwards, L.J., Jones, K.R., Grossman, M., Wilson, J.M., Johnson, L.G. and Boucher, R.C. A controlled study of adenoviralvector- mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333:823-831.
251. Ko, S.C., Gotoh, A., Thalmann, G.N., Zhau, H.E., Johnston, D.A., Zhang, W.W., Kao, C. and Chung, L.W. Molecular therapy with recombinant p53 adenovirus in an androgen-independent, metastatic human prostate cancer model. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7:1683-1691.
252. Koch, A.E., Halloran, M.M., Haskell, C.J., Shah, M.R. and Polverini, P.J. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature.* 1995; 376:517-519.
253. Kojima H, Kanada H, Shimizu S, Kasama E, Shibuya K, Nakauchi H, Nagasawa T, Shibuya A. CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278: 36748–36753.
254. Koni PA, Joshi SK, Temann UA, Olson D, Burkly L, Flavell RA. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med.* 2001;193:741–754.
255. Koni, P.A., et al. 2001. Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice. impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J. Exp. Med.* 193:741–754.
256. Koopman, G., Parmentier, H.K., Schuurman, H.J., Newman, W., Meijer, C.J. and Pals, S.T. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways. *J. Exp. Med.* 1991; 173:1297-1304.

257. Kratzer EI, Tian Y, Sarich N, Wu T, Meliton A, Leff A, Birukova AA. Oxidative stress contributes to lung injury and barrier dysfunction via microtubule destabilization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Nov;47(5):688-97. doi: 10.1165/rcmb.2012-0161OC. Epub 2012 Jul 27.
258. Kritchevsky D, Davidson LM, Kim HK, et al. Influence of semi-purified diets on atherosclerosis in African green monkeys. *Exp Mol Pathol* 1977; 26:28–51.
259. Kritchevsky D. Diet and atherosclerosis. *Am J Pathol* 1976; 84: 615–632.
260. Kubes P, Reinhardt PH (1998). Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* 92 (12): 4691-99.
261. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation.* 2001;103:3099–3104.
262. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ (1997). Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood* 89 (1): 166-75.
263. Kukreti, S., et al., Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1beta- stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood*, 1997. 89(11): p. 4104-11.
264. Kullo, I.J., Gau, G.T. and Tajik, A.J. Novel risk factors for atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 2000;102:145-152.
265. Kwee, L., Baldwin, H.S., Shen, H.M., Stewart, C.L., Buck, C., Buck, C.A. and Labow, M.A. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development.* 1995; 121:489-503.
266. Lalor P, Nash GB. Adhesion of leukocytes to immobilised platelets. *Br J Haematol.* 1995;89:725–732.
267. Landry, D.B., Couper, L., Bryant, S.R. and Linder, V. Activation of the NF- $\kappa$ B and IRF3 system in smooth muscle cells after rat arterial injury: induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am. J. Pathol.* 1997; 151:1085-1095.
268. Lang D, Smith JA, Lewis MJ. Induction of a calcium-independent NO synthase by hypercholesterolaemia in the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1993; 108:290–292.
269. Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC (1993). Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* 73 (7): 1423-34.
270. Languino, L.R., Duperray, A., Joganic, K.J., Fornaro, M., Thornton, G.B. and Altieri, D.C. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:1505-1509.
271. Lau, S.K., Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden humanen Monozyten bei essentieller Hypertonie, Dissertation, Universitätsmedizin Berlin; 2004.

272. Lawrence MB, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV (1990). Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood* 75 (1): 227-37.
273. Lawrence, M.B. and Springer, T.A. Neutrophils roll on E-selectin. *J. Immunol.* 1991; 151:6338-6346.
274. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 1991. 65(5): p. 859- 73.
275. Lee, Y.S. Hemmung der Zelladhäsion durch Inhibition der Zytoskelettverankerung von Adhäsionsmolekülen mittels Gentransfer. Dissertation, Ruprecht- Karls-Universität Heidelberg; 1997.
276. Leuker CE, Labow M, Muller W, Wagner N. Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med.* 2001;193:755–768.
277. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74 (3): 541-54.
278. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 2001;98: 1289–1297.
279. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:197–204.
280. Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, Michelson AD. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J Surg Res.* 1996;61:543–548.
281. Li, H., Cybulsky, M., Gimbrone, M.A., Jr. and Libby, P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am. J. Pathol.* 1993; 143:1551-1559.
282. Libby P., Theroux P., Pathophysiology of coronary artery disease; *Circulation*; 2005; 111(25):3481-8;
283. Libby, P. and Ross, R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: *Atherosclerosis and coronary artery disease* (ed. by Fuster, V., Ross, R. & Topol, E.J.), Vol.1, Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996; pp. 585-594.
284. Libby, P., Egan, D. and Skarlatos, S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation.* 1997; 96:4095-4103.
285. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 1994;121:936 –941.

286. Lim LH (2000). Glucocorticoid receptor activation reduces CD11b and CD49d Levels on murine eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 693-701.
287. Lo, S.K., Golenbock, D.T., Sass, P.M., Maskati, A., Xu, H. and Silverstein, R.L. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood*. 1997; 89:307-314.
288. Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J.M., Tedesco, F. and Dobrina, A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J. Cell Biol.* 1998;142:1381-1391.
289. Losordo, D.W., Vale, P.R., Symes, J., Dunnington, C., Esakof, D., Maysky, M., Ashare, A., Lathi, K. and Isner, J.M. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998; 98:2800-2804.
290. Lu, B., et al., Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*, 1998. 187(4): p. 601-8.
291. Luo BH, Carman CV, Springer TA: 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25: 619–647.
292. Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, et al: 1994. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2- integrins. *J Cell Biol* 125:1417–1427.
293. Luscinskas, F.W., Ding, H., Tan, P., Cumming, D., Tedder, T.F. and Gerritsen, M.E. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow in vitro. *J. Immunol.* 1996; 157:326-335.
294. Luscinskas, F.W., et al., L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol*, 1996. 157(1): p. 326-35.
295. Ma YQ, Plow EF, Geng JG: 2004. P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood* 104: 2549–2556.
296. Machelska, H., Cabot, P.J., Mousa, S.A., Zhang, Q. and Stein, C. Pain control in inflammation governed by selectins. *Nature Med.* 1998; 4:1425-1428.
297. Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Ginther Luce, G.E., Gugel, E.A., Dustin, M.L., Springer, T.A., Clark, E.A., Mannoni, P. and Shaw, S. ICAM-1 is a ligand for LFA-1 dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*. 1988; 31:86-88.
298. Mammariño E., Pirro M., *Endothelial Injury and Repair: A Novel Theory for Atherosclerosis; Angiology*; 2008; 69S-72S;
299. Manka, D.R., et al. 1999. Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein-E-deficient mice. *J. Vasc. Res.* 36:372–378.

300. Mann, M.J., Whittemore, A.D., Donaldson, M.C., Belkin, M., Conte, M.S., Polak, J.F., Orav, E.J., Ehsan, A., Dell'Acqua, C. and Dzau, V.J. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT singlecentre, randomised controlled trial. *Lancet*. 1999; 354:1493-1498.
301. Marchese, P., E. Saldivar, J. Ware, and Z.M. Ruggeri. 1999. Adhesive properties of the isolated amino-terminal domain of platelet glycoprotein Ibalpha in a flow field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:7837–7842.
302. Marlin, S.D. and Springer, T.A. Purified intercellular cell adhesion molecule- 1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. 1987; 51:813-819.
303. Marta Michalska, Lina Machtoub, Helga D. Manthey, Elisabeth Bauer, Volker Herold, Georg Krohne, Gunthard Lykowsky, Markus Hildenbrand, Thomas Kampf, Peter Jakob, Alma Zerneck and Wolfgang R. Bauer Visualization of Vascular Inflammation in the Atherosclerotic Mouse by Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Specific Nanoparticles, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2350-2357;
304. Masinovsky, B., Urdal, D. and Gallatin, W.M. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Immunol*. 1990; 145:2886-2895.
305. Matheny, H.E., Deem, T.L. and Cook-Mills, J.M. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol*. 2000;164:6550-6559.
306. May AE, Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, Walter H, Schomig A (1997). Reduction of monocyteplatelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 18: 1913-1920.
307. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993). Leukocyte rolling and
308. Mazo, I.B., Gutierrez-Ramos, J.C., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D. and von Andrian, U.H. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med*. 1998; 188:465-474.
309. McGill HC Jr. Persistent problems in the pathology of atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1984; 4:443– 451.
310. Meddell, J.R., Kissel., J.T., Amato, A.A., King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P.E., Rice, R., Nagaraja, H., Stephens, R., Lantry, L., Morris, G.E. and Burghes, A.H.M. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med*. 1995; 333:832-838.
311. Meerschaert, J. and Furie, M.B. Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. *J. Immunol*. 1994; 152:1915-1926.

312. Mesri M, Plescia J, Altieri DC (1998). Dual regulation of ligand binding by CD11b I domain. Inhibition of intercellular adhesion and monocyte procoagulant activity by a factor X-derived peptide. *J Biol Chem* 273 (2): 744-8.
313. Messner B., Bernard D., Smoking and Cardiovascular Disease: Mechanisms of Endothelial Dysfunction and early atherogenesis; *ATheroscler Thromb Vasc Biol*, 2014; 509-15;
314. Mestas J1, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 Aug;18(6):228-32. doi: 10.1016/j.tcm.2008.11.004.  
matrix metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;100(5):533–540.
315. Miyake, K., Medina, K., Ishihara, K., Kimoto, M., Auerback, R. and Kincade, P.W. VCAM-1-like adhesion molecule on bone marrow stromal cells mediates binding of lymphocyte precursors in culture. *J. Cell Biol*. 1991; 114:557-565.
316. Morishita, R., Sugimoto, T., Aoki, M., Kida, I., Tomita, N., Moriguchi, A., Maeda, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Higaki, J. and Ogihara, T. In vivo transfection of cis element „decoy“ against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat. Med*. 1997; 3:894-899.
317. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1994;266:E829–E839.
318. Mould, A.P., Askari, J.A., Craig, S.E., Garratt, A.N., Clements, J. and Humphries, M.J. Integrin-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced CS region of fibronectin. *J. Biol. Chem*. 1994; 269:27224-27230.
319. Munro, J.M. and R.S. Cotran, The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest*, 1988. 58(3): p. 249-61.
320. Murata T., Hori, M., Lee,S., Nakamura, A., Kohama, K., Karaki,H., Ozaki, H., Vascular Endothelium Has a Local Anti-Adenovirus Vector System and Glucocorticoid Optimizes Its Gene Transduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1796-1803.
321. Murata T., Hori, M., Lee,S., Nakamura, A., Kohama, K., Karaki,H., Ozaki, H., Vascular Endothelium Has a Local Anti-Adenovirus Vector System and Glucocorticoid Optimizes Its Gene Transduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1796-1803.
322. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567–2578.
323. Nagata, K. et al.: Effects of blockade of the renin – angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertens* 2001; 19: 776-789.
324. Nageh, M.F., et al. 1997. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 17:1517–1520.



325. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Weissleder R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation*. 2006;114:1504–1511.
326. Nahrendorf M, Keliher E, Panizzi P, Zhang H, Hembrador S, Figueiredo JL, Aikawa E, Kelly K, Libby P, Weissleder R. 18F-4V for PET-CT imaging of VCAM-1 expression in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging*. 2009;2:1213–1222.
327. Nakashima, Y., Raines, E.W., Plump, A.S., Breslow, J.L. and Ross, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1998; 18:842-851.
328. Nandalur KR, Baskurt E, Hagspiel KD, Phillips CD and Kramer CM: Calcified carotid atherosclerotic plaque is associated less with ischemic symptoms than is noncalcified plaque on MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 184: 295-298, 2005.
329. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051–3064.
330. National Center for Health Statistics. Data Warehouse, Mortality Tables. Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/datawh/statab/unpubd/mortabs.htm>.
331. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2010. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics; 2011. Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/hs.htm>.
332. National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). Bethesda, Md.: National Heart, Lung, and Blood Institute, 1993. (NIH publication no. 93-3095.)
333. National Heart, Lung, and Blood Institute. Incidence and Prevalence: 2006 Chart Book on Cardiovascular and Lung Diseases. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2006.
334. National Heart, Lung, and Blood Institute. Unpublished Tabulations of National Health Interview Survey, 1965-2010. Available at: [http://www.cdc.gov/nchs/nhis/nhis\\_questionnaires.htm](http://www.cdc.gov/nchs/nhis/nhis_questionnaires.htm).
335. National Heart, Lung, and Blood Institute. Unpublished Tabulations of National Vital Statistics System Mortality Data, 2008. Available at: [http://www.cdc.gov/nchs/nvss/mortality\\_public\\_use\\_data.htm](http://www.cdc.gov/nchs/nvss/mortality_public_use_data.htm).
336. Nehler, M.R., Taylor, L.M., Jr. and Porter, J.M. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc. Surg*. 1997; 6:559-567.
337. Neish, A.S., Williams, A.J., Palmer, H.J., Whitley, M.Z. and Collins, T. Functional analysis of the human vascular adhesion molecule 1 promoter. *J. Exp. Med*. 1992;176:1583-1593.
338. Neumann, E., Schaeffer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982; 1:841-845.
339. Neumann, F.J., Zohlnhofer D. et al.: Effect of Glykoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin MAC-1 in acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 1999; 34 (5):1420-1426.

340. Nickening, G. , Böhm, M. et al.: Bedeutung des Angiotensin-II-Rezeptors AT1 für die Entstehung von arterieller Hypertonie und Arteriosklerose. *Dtsch. med. Wschr.* 1997; 122: 1009- 1013.
341. Nicole Daum & Claus-Michael Lehr , *Grundlagen der tierischen Zellkultur, Grundpraktikum, WS 2006/07.*
342. Nizamutdinova IT1, Kim YM, Jin H, Son KH, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. Tanshinone IIA inhibits TNF- $\alpha$ -mediated induction of VCAM-1 but not ICAM-1 through the regulation of GATA-6 and IRF-1. *Int Immunopharmacol.* 2012;14(4):650-7.
343. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol.* 2006;101:545–548.
344. O. Dwir, A. Solomon, S. Mangan, G. S. Kansas, U. S. Schwarz and R. Alon Avidity enhancement of L-selectin bonds by flow: shear-promoted rotation of leukocytes turn labile bonds into functional tethers. *J. Cell. Biol.* 2003; 163: 649-59.
345. O. Dwir, A. Solomon, S. Mangan, G. S. Kansas, U. S. Schwarz and R. Alon Avidity enhancement of L-selectin bonds by flow: shear-promoted rotation of leukocytes turn labile bonds into functional tethers *J. Cell. Biol.* 163: 649-59, November 10, 2003.
346. O'Brien, K.D., McDonald, T.O., Chait, A., Allen, M.D. and Alpers, C.E. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996; 93:672-682.
347. O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Du, X.P., Glass, A.A., Ruggeri, Z.M., Shattil, S.J., Plow, E.F. and Ginsberg, M.H. Affinity modulation of the  $\alpha$  b  $\beta$  3 integrin (platelet GPb-a) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1990; 1:883-893.
348. Ockenhouse, C.F., Betageri, R., Springer, T.A. and Staunton, D.E. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell.* 1992; 68:63-69.
349. Ockenhouse, C.F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K.E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M. and Lobb, R.R. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 1992; 176:1183-1189.
350. Oguchi, S., Dimayuga, P., Zhu, J., Chyu, K.-Y., Yano, J., Shah, P.K., Nilsson, J. and Cercek, B. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20:1729- 1736.
351. Oguchi, S., et al. 2000. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1729–1736.

352. Oguchi, S., et al. 2000. Monoclonal antibody against vascular cell adhesion molecule-1 inhibits neointimal formation after periadventitial carotid artery injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1729–1736.
353. Onoue H, Tsutsui M, Smith LA, O'Brien T, Katusic ZS. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 1998; 29:1959–1966.
354. Op den Buijs J, Musters M, Verrips T, Post JA, Braam B, Van Riel N. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing and telomere shortening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H2651–H2658.
355. Osborn, L., et al. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 59:1203–1211.
356. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 1989; 59:1203- 1211.
357. Osborn, L., Vassallo, C. and Benjamin, C.D. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Exp. Med.* 1992; 176:99-107.
358. Osborn, L., Vassallo, C., Browning, B.G., Tizard, R., Haskard, D.O., Benjamin, C.D., Dougas, I. and Kirchhausen, T. Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1). *J. Cell Biol.* 1994;124:601-608.
359. Pamukcu B., Lip GY., The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease; *Ann Med.* 2010; 42(6): 394-403;
360. Park JG, Ryu SY, Jung IH, Lee YH, Kang KJ, Lee MR, Lee MN, Sonn SK, Lee JH, Lee H, Oh GT, Moon K, Shim H. Evaluation of VCAM-1 antibodies as therapeutic agent for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Atherosclerosis.* 2013 Feb;226(2):356-63.
361. Park YI, Rempel WE, Boylan WJ, et al. Comparative growth curves of miniature and conventional pigs. *Genetics* 1976; 83:557
362. Parks, W.M., Gingrich, R.D., Dahle, C.E. and Hoak, J.C. Identification and characterization of an endothelial, cell-specific antigen with a monoclonal antibody. *Blood.* 1985; 66:816-823.
363. Patel, S.S., Thiagarajan, R., Willerson, J.T., and Yeh, E.T.H. 1998. Inhibition of  $\alpha 4$  integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation.* 97:75–81.
364. Patel, S.S., Thiagarajan, R., Willerson, J.T., and Yeh, E.T.H. 1998. Inhibition of  $\alpha 4$  integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation.* 97:75–81.

365. Pavalko, F.M. and Otey, C.A. Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997; 205 :282-293.
366. Peter, K. and O'Toole, T.E. Modulation of cell adhesion by changes in L2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J. Exp. Med.* 1995; 181:315-326.
367. Peter, K., Weirich, U., Nordt, T., Ruef, J. and Bode, C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as a potential marker of atherosclerosis. *Thromb. Hemost.* 1999; 82:38-43.
368. Pigott, R., Dillon, L.P., Hemingway, I.H. and Gearing, A.J. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 187:584- 589.
369. Plescia J, Altieri DC , Plow EF (1993). The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem* 268 (3): 1847-53.
370. Plescia, J., Conte, M.S. et al.: Molecular identification of the cross-reacting epitope on  $\alpha M \beta 2$  Integrin I Domain recognized by the Anti-  $\alpha IIb \beta 3$  monoclonal antibody 7E3 and its involvement in leucocyte adherence. *J of Biological Chemistry* 1998, 273(32): 20372-20377.
371. Porter, J.C. and Hogg, N. Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters 41- and 51-mediated Function. *J. Cell Biol.* 1997; 138:1437-1447.
372. Postigo, A.A., Teixidó, J. and Sánchez-Madrid, F. The 41/VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res. Immunol.* 1993; 144:723-735.
373. Potter, D. D., Sobey C.G. et al.: Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain Angiotensin II. *Circulation* 1998; 98: 800-807.
374. Potter, H. Electroporation in biology: methods, application and instrumentation. *Anal. Biochem.* 1988;174:361-373.
375. Poussin C., Gallitz I., Schlage WK., Steffen Y., Stolle K., Lebrun S., Hoeng J., Peitsch MC., Lietz M. Mechanism of an indirect effect of aqueous cigarette smoke extract on the adhesion of monocytic cells to endothelial cells in an in vitro assay revealed by transcriptomics analysis. *in Vitro.* 2014; pii: S0887-2333.
376. Powell-Braxton, L., et al. 1998. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat. Med.* 4:934–938.
377. Prabhakaran S, Singh R, Zhou X, Ramas R, Sacco RL and Rundek T: Presence of calcified carotid plaque predicts vascular events: the Northern Manhattan Study. *Atherosclerosis* 195: e197-e201, 2007.
378. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM and Weissberg PL: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87: 1055-1062, 2000.

379. Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A. Genetics of somatic mammalian cells: III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* 1958; 108:945-956.
380. Rabinowich, H., Pricop, L., Herberman, R.B. and Whiteside, T.L. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. *J. Immunol.* 1994;152:517- 526.
381. Radbruch, A. Immunofluorescence: basic considerations. In: *Flow cytometry and cell sorting* (ed. by Radbruch, A.), Springer Verlag, Berlin, 1992; pp. 34-46.
382. Radomski M, Palmer R, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2: 1057–1058.
383. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12:87– 88.
384. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987;92:639–646.
385. Radomski MW, Valance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1380 –1382.
386. Rafii S, Dias S, Meeus S, Hattori K, Ramachandran R, Feuerback F, Worgall S, Hackett NR, and Crystal RG. Infection of endothelium with E1(-)E4( ), but not E1(-)E4(-), adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ Res.* 2001;88:903–910.
387. Raines, E.W. and Ross, R. Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays.* 1996; 18:271-282.
388. Raines, E.W., Rosenfeld, M.E. and Ross, R. The role of macrophages. In: *Atherosclerosis and coronary artery disease* (ed. by Fuster, V., Ross, R. & Topol, E.J.), Vol.1, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; pp. 539-555.
389. Rainger GE, Nash GB. Cellular pathology of atherosclerosis. Smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res.* 2001;88:615– 622.
390. Rainger GE, Stone P, Morland CM, Nash GB. A novel system for investigating the ability of smooth muscle cells and fibroblasts to regulate adhesion of flowing leukocytes to endothelial cells. *J Immunol Methods.* 2001;255:73– 82.
391. Ramos, C.L., et al. 1999. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res.* 84:1237–1244.
392. Ramos, C.L., et al., Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E- deficient mice. *Circ Res*, 1999. 84(11): p. 1237-44.
393. Randolph, G.J. , Luther, T., Muller, et al.: Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92(11): 4167-4177.

394. Randolph, G.J. , Luther, T., Muller, et al.: Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92(11): 4167-4177.
395. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular cell adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74:225-234.
396. Reininger AJ, Korndorfer MA, Wurzinger LJ. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point in vitro is mediated by the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Thromb Haemost.* 1998;79:998 –1003.
397. Rice, G.E. and Bevilacqua, M.P. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 1989; 246:1303-1306.
398. Rice, G.E., Munro, J.M., Corless, C. and Bevilacqua, M.P. Vascular and nonvascular expression of ICAM-110: a target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues. *Am. J. Pathol.* 1991; 138:385-393.
399. Robert E. Gerszten, Andrew M. Tager, The Monocyte in Atherosclerosis — Should I Stay or Should I Go Now?, *n engl j med*, 2012; 366:18.
400. Roitt, I, Brostoff, J., Male, D.: *Immunology.* Mosby-Verlag. London 1998.
401. Roitt, I, Brostoff, J., Male, D.: *Immunology.* Mosby-Verlag. London 1998.
402. Rose G., *Epidemiology of Atherosclerosis; BMJ, Volume 303; 1991; 1537-1539;*
403. Rösen P, Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose, *Journal für Kardiologie* 2002; 9 (12), 556-562.
404. Rosen, S.D. and Bertozzi, C.R. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6:663-373.
405. Rosenberg HM, Maurer JD, Sorlie PD, et al. Quality of Death Rates by Race and Hispanic Origin: A Summary of Current Research, 1999. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics;
406. Rosenfeld, M.E., et al., Macrophages, endothelial cells, and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Toxicol Pathol*, 1990. 18(4): p. 560-71.
407. Ross, R. and Glomset, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973; 180:1332-1339.
408. Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340:115-126.
409. Ross, R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 38: 71-79
410. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362: 801-809.
411. Rothlein R, Czajkowski M, Kishimoto TK (1991) A intercellular adhesion molecule in the inflammatory response Hogg N (ed): *Integrins and ICAM-1-1 in immune responses Chem. Immunol.* 50; 135-142.

412. Rothlein R, Scharschmidt LA (1994) Leukocyte adhesion in inflammation: from discovery to the clinic. In: Wegner CD (ed) *The landsoohof immunopharmacology adhesion molecules* Academic Press London.
413. Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M.M., Marlin, S.D., Mainolfi, E. and Merluzzi, V.J. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *J. Immunol.* 1988; 141:1665-1669.
414. Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D. and Springer, T.A. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 1986; 137:1270-1274.
415. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Dachet C, Chapman MJ. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of
416. Rubio, M., Sotillos, M., Jochems, G. et al.: Monocyte activation: rapid induction of  $\alpha 1/\beta$  (VLA4) integrin expression by LPS and interferon. *Eur J Immunol.* 1995 ;25 :2701-2705.
417. Rubio, M., Sotillos, M., Jochems, G. et al.: Monocyte activation: rapid induction of  $\alpha 1/\beta$  (VLA4) integrin expression by LPS and interferon. *Eur J Immunol.* 1995 ;25 :2701-2705.
418. Saerens D, Pellis M, Loris R, Pardon E, Dumoulin M, Matagne A, Wyns L, Muyltermans S, Conrath K. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel singledomain antibodies. *J Mol Biol.* 2005;352:597– 607.
419. Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J. and Furie, B. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993; 75:1179-1186.
420. Salomon DR, Crisa L, Mojcik CF, Ishii JK, Klier G, Shevach EM. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion: implications for the function of alpha4beta1 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood.* 1997;89:2461–2471.
421. Salomon, D.R., Crisa, L., Mojcik, C.F., Ishii, J.K., Klier, G. and Shevach, E.M. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed by cortical thymic epithelial cells and mediates thymocyte adhesion: implications for the function of 41 (VLA4) integrin in T-cell development. *Blood.* 1997; 89:2461-2471.
422. Sánchez-Mateos, P., Cabañas, C. and Sánchez-Madrid, F. Regulation of integrin function. *Semin. Cancer Biol.* 1996; 7:99-109.
423. Sandrin, M.S., Vaughan, H.A., Loverting, K.E., Curnow, K., Deacon, N.J. and McKenzie, I.F. Characterization of the gene coding for the human lymphocyte surface antigen HuLy-m2(CD7) in Leucocyte Typing III. Oxford University Press, p. 216. Sans, E., Delachanal, E. and Duperray, A. 2001. Analysis of the roles of ICAM-1 in neutrophil transmigration using a reconstituted

- mammalian expression model: implication of ICAM-1 cytoplasmic domain and Rho-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 1987;166:544-551.
424. Sato J, Mohacsi TG, Noel A, Jost C, Gloviczki P, Mozes G, Katusic ZS, O'Brien T. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to carotid arteries from hypercholesterolemic rabbits enhances endothelium-dependent relaxations. *Stroke.* 2000;31:968-975.
  425. Scannell, G., Waxmann, K. et al.: Hypoxia-induced alteration of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res* 1995; 59: 141-145.
  426. Scannell, G., Waxmann, K. et al.: Hypoxia-induced alteration of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res* 1995; 59: 141-145.
  427. Scazec JY, Durand F, Benhamon JP, Feldmann G (1994) Expression of cytokine dependent adhesion molecules in postperfusion Biopsy specimens of liver allografts. *Gastroenterology* 107; 1094-1102.
  428. Schmitz, G., Herr, Rothe et al.: T-Lymphozyten und Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose. *Herz* 1998; 23: 168-177.
  429. Schmitz, G., Herr, Rothe et al.: T-Lymphozyten und Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose. *Herz* 1998; 23: 168-177.
  430. Scholz, D., Devaux, B., Hirche, A., Pötsch, B., Kropp, B., Schaper, W. and Schaper, J. Expression of adhesion molecules is specific and timedependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* 1996; 284:415-423.
  431. Schwarz M, Nordt T, Bode C, Peter K (2002). The GP IIb/IIIa inhibitor abciximab (c7E3) inhibits the binding of various ligands to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18, alphaMbeta2). *Thromb Res* 107: 121-8.
  432. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y. and Matsushima, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature.* 1993; 365:654-657.
  433. Sen T, Aksu T. Endothelial progenitor cell and adhesion molecules determine the quality of the coronary collateral circulation/Endothelial progenitor cells (CD34+KDR+) and monocytes may provide the development of good coronary collaterals despite the vascular risk factors and extensive atherosclerosis. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2012;12(5):447; series/sr\_02/sr02\_128.pdf.
  434. Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Angoli L, Valentini P, Boschetti E, Specchia G. Expression of neutrophil and monocyte CD11B/CD18 adhesion molecules at different sites of the coronary tree in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 1996; 78 (5): 564-8.
  435. Shanberge JN, Kajiwarara Y, Quattrociochi-Longe T. Effect of aspirin and iloprost on adhesion of platelets to intact endothelium in vivo. *J Lab Clin Med.* 1995;125:96-101.
  436. Shang, X.-Z., Lang, B.J. and Issekutz, A.C. Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late



- antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29), and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). *J. Immunol.* 1998; 60:467-474.
437. Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. Integrin signaling in vascular biology. *J.Clin. Invest.* 1997; 100:91-95.
438. Shen, Y., Rattan, V.: Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transmigration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; 270: H1624-1633.
439. Sherry L., Murphy B.S., Kenneth D.,Deaths: FInal data for 2010; National Vital Statistics Report; Volume 61, Number 4; 2013;
440. Shih, P.T., et al. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 84:345–351.
441. Shih, P.T., et al. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 84:345–351. Shih, P.T., et al. 1999. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet.*Circ. Res.* 84:345–351.
442. Shih, P.T., et al. 1999. Minimally modified lowdensity lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta 1 integrin. *J. Clin. Invest.* 103:613–625.
443. Shih, P.T., et al. 1999. Minimally modified lowdensity lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta 1 integrin. *J. Clin. Invest.* 103:613–625. 9.
444. Silverstein, R.L. Cell adhesion molecules. *Cancer Invest.* 1998;16:175-182.
445. Silvestro1,A.,Brevetti1,G.,Schiano1,V.,Scopacasa,F., Chiariello,M.Adhesion molecules and cardiovascular risk in peripheral arterial disease Soluble vascular cell adhesion molecule-1 improves risk stratification *Thromb Haemost* 2005; 93: 559-63
446. Simon BC., Noll B., Maisch B., Endothelial dysfunction-assessment of current status and approaches to therapy; *Herz*; 1999; 24(1):62-71;
447. Simon, B., Noll, Maisch et al.: Endotheliale Dysfunktion - eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999; 24: 62 – 71.
448. Simon, B., Noll, Maisch et al.: Endotheliale Dysfunktion - eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999; 24: 62 – 71.
449. Simon, B., Noll, Maisch et al.: Endotheliale Dysfunktion - eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999; 24: 62 – 71.
450. Simon, D.I., Xu, H. et al. : 7 E3 monoclonal antibody directed against the platelet Glykoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leucocyte integrin MAC-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(3): 528-535.
451. Simovic, D., Isner, J.M., Ropper, A.H., Pieczek, A. and Weinberg, D.H. Improvement in chronic ischemic neuropathy following intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch. Neurol.* 2001; 58:761-768.

452. Slepian, M.J., Fritz, A. and Dehdashti, B. Smooth muscle cell 41 integrinmatrix interactions participate in migration and neointimal thickening following injury. 1998; *Circulation* 98 (supl.): 227. Abstract.
453. Sluiter W, Pietersma A, Lamers JM, Koster JF (1993). Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 4: S37-44.
454. Sluiter, W., Pietersma, A., Lamers, J.M.J. and Koster, J.F. Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 22:37-44.
455. Smaglik, P. Viral vs. nonviral in gene therapy: which vector will prevail? *Scientist.* 1998; 12:5-6.
456. Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y: 2005. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1976–H1984.
457. Smith JD. Mouse models of atherosclerosis. *Lab Anim Sci.* 1998;48: 573–579.
458. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K (2003). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 197 (10): 1355-63.
459. Spertini, O., et al., Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med.* 1992. 175(6): p. 1789-92.
460. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990; 346:425-434.
461. Springer, T.A. and Cybulsky, M.I. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. In: *Atherosclerosis and coronary artery disease* (ed. by Fuster, V., Ross, R. & Topol, E.J.), Vol.1, Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 1996; 511-538.
462. Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76:301-314.
463. Springer, TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76 (2): 301-14.
464. Strydom HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 1992; 85:391–405.
465. Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thromb* 1994; 5:840–856.
466. Strydom, H.C., et al., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1994. 89(5): p. 2462-78.
467. Staunton, D.E., Dustin, M.L. and Springer, T.A. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 1989; 339:61-64.

468. Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. and Springer, T.A. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and supergene family. *Cell*. 1988; 56:925-933.
469. Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B. and Vestweber, D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*. 1995; 373:615-620.
470. Steffen Massberg, Korbinian Brand, Sabine Grüner, Sharon Page, Elke Müller, Iris Müller, Wolfgang Bergmeier, Thomas Richter, Michael Lorenz, Ildiko Konrad, Bernhard Nieswandt, and Meinrad Gawaz, A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation, *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press • 0022-1007/2002/10/887/10.
471. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:20963-20966.
472. Steinhoff G, Behrend M, Wonigeit K (1990) Expression of adhesion molecules on lymphocytes, monocytes and hepatocytes in human liver grafts.
473. Stepkowski, S.M., Tu, Y., Condon, T.P. and Bennett, C.F. Blocking of heart allograft rejection by intercellular cell adhesion molecule-1 anti-sense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities. *J. Immunol.* 1994; 153:5336-5346.
474. Stohlawetz, P., Hahn, P., Koller, M.: Immunophenotypic characteristics of monocytes in elderly subjects. *Scand J Immunol* 1998; 48(3): 324-326.
475. Strawn, W., Gallagher, P., Talant, E.: Angiotensin II AT 1-Rezeptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)27 rats. *J of Cardiovascular pharmacology* 1999; 33: 341-351.
476. Strawn, W., Gallagher, P., Talant, E.: Angiotensin II AT 1-Rezeptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)27 rats. *J of Cardiovascular pharmacology* 1999; 33: 341-351.
477. Strecker, R.C., Expression des Interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) im Lebergewebe während und nach einer Lebertransplantation Eberhard-Karls- Universität zu Tübingen; 2006.
478. Stuart D. Christenson, MD; Kristy D. Lake, PhD; Hiroaki Ooboshi, MD, PhD; Frank M. Faraci, PhD; Beverly L. Davidson, PhD; Donald D. Heistad, MD Adenovirus-Mediated Gene Transfer In Vivo to Cerebral Blood Vessels and Perivascular Tissue in Mice, (*Stroke*. 1998;29:1411-1416.
479. Sukharev, S.I., Titomirov, A.V. and Klenchin, V.A. Electrically-induced DNA transfer into cells. Electrotransfection in vivo. In: *Gene Therapeutics. Methods and Applications of Direct Gene Transfer* (ed. by Wolff, J.A.), Birkhäuser, Boston, pp. 1994; 210-232.
480. Suzette J. Bielinski<sup>1</sup>, James S. Pankow<sup>1</sup>, Na Li<sup>2</sup>, Fang-Chi Hsu<sup>3</sup>, Sara D. Adar<sup>4</sup>, Nancy Swords Jenny<sup>5</sup>, Donald W. Bowden<sup>6</sup>, Bruce A. Wasserman<sup>7</sup>, and Donna Arnett<sup>8</sup>, ICAM1 and VCAM1 polymorphisms, coronary artery calcium, and circulating levels of soluble ICAM-1: The Multi-

- Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), Atherosclerosis. Author manuscript; available in PMC 2009.
481. Suzuki, K., Masawa, N. et al.: The pathogenesis of cerebrovascular lesions in hypertensive rats. *Med Elektron Microsc* 2001; 34(4): 230-239.
  482. Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ. Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1988; 1:65–79.
  483. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al: 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117:185–194.
  484. Takahisa Murata, Masatoshi Hori, Sheng Lee, Akio Nakamura, Kazuhiro Kohama, Hideaki Karaki, Hiroshi Ozaki, Vascular Endothelium Has a Local Anti-Adenovirus Vector System and Glucocorticoid Optimizes Its Gene Transduction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1796-1803.
  485. Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *J Lip Res* 1986; 27:361– 367.
  486. Theilmeyer, G., et al., Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood*, 1999. 94(8): p. 2725-34.
  487. Theuer, J., Dechend, R. et al.: Angiotensin II induced inflammation in the kidney and the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovascular Disorders* 2002, 2:3.
  488. Thiagarajan, R-R, Winn RK, Harlan JM (1997) The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury; *Thrombosis and haemostasis* 78(1) 310-314.
  489. Thornhill, M.H., Wellicome, S.M., Mahiouz, D.L., Lanchbury, J.S., Kyan-Aung, U. and Haskard, D.O. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells: the contribution of vascular cell adhesion molecule-1 dependent and independent binding mechanisms. *J. Immunol.* 1991; 146:592-598.
  490. Tiefenbacher CP, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kubler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation.* 2000;102:2172–2179.
  491. Timothy M. Carlos and John M. Harlan, Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules, *Blood*, Vol 84, No 7 (October 1), 1994: pp 2068-2101.
  492. Tokuhira, M., Hosaka, S., Volin, M.V., Haines, G.K. 3rd, Katschke, K.J., Jr., Kim, S. and Koch, A.E. Soluble vascular cell adhesion molecule 1 mediation of monocyte chemotaxis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1122-1133.
  493. Toth PP; Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about; *Int J Clin Pract.* 2008;1246-54;
  494. Travis, J. Biotech gets a grip on cell adhesion. *Science.* 1993; 260:906-908.
  495. Triezenberg, S.J., LaMarco, K.L. and McKnight, S.L. Evidence of DNA:protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. 1988;

496. Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3781-6.
497. Tsao, Ph. et al.: Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular biology* 1998; 18: 947-953.
498. Tsouknos A, Nash GB, Rainger GE. Monocytes initiate a cycle of leukocyte recruitment when cocultured with endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2003;170:49–58.
499. Tsouknos A1, Nash GB, Rainger GE. Monocytes initiate a cycle of leukocyte recruitment when cocultured with endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2003 Sep;170(1):49-58.
500. Tummala, P., Chen, X., Sundell, C.: Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculatur. *Circulation* 1999; 100: 1223-1229.
501. Turunen R, Andersson S, Nupponen I, Kautiainen H, Siitonen S, Repo H (2005). Increased CD11b-density on circulating phagocytes as an early sign of late-onset sepsis in extremely low-birth-weight infants. *Pediatr Res* 57 (2): 270-5.
502. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Luscis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002;106(4):484–490.
503. U. S. Schwarz and R. Alon L-selectin mediated leukocyte tethering in shear flow is controlled by multiple contacts and cytoskeletal anchorage facilitating fast rebinding events *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 10.1073/pnas.0305822101, Early Edition.
504. U. S. Schwarz and R. Alon; L-selectin mediated leukocyte tethering in shear flow is controlled by multiple contacts and cytoskeletal anchorage facilitating fast rebinding events *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 10.1073/pnas.0305822101, Early Edition, April 20, 2004.
505. Ulrich Schwarz, Eine Bindung ist nicht genug - wie Leukozyten an Blutgefäße binden, *PNAS*, 2004; Early Edition, 20.
506. V.G. Khurana<sup>1,2</sup>, D.A. Weiler<sup>3</sup>, T.A. Witt<sup>6</sup>, L.A. Smith<sup>3</sup>, L.S. Kleppe<sup>6</sup>, J.E. Parisi<sup>4</sup>, R.D. Simari<sup>6</sup>, T. O'Brien<sup>5</sup>, S.J. Russell<sup>6</sup> and Z.S. Katusic<sup>1,3A</sup> A direct mechanical method for accurate and efficient adenoviral vector delivery to tissues, *Gene Therapy* (2003) 10, 443–452. doi:10.1038/sj.gt.3301907.
507. Vale, P.R., Losordo, D.W., Milliken, C.E., Maysky, M., Esakof, D.D., Symes, J.F. and Isner, J.M. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF165 gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2000; 102:965-974.
508. Van de Stolpe, A. and van der Saag, P.T. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 1996; 74:13-33.

509. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1–E7.  
vascular dysfunction. *Clin Lab.* 2005;51:531–538.
510. Verbeek, M., Westphal, J.R., Ruiters, D.J. and de Waal, R.M. T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions. *J. Immunol.* 1995; 154:5876-5884.
511. Vessilionovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 1011–1017.
512. Violi, F. et al.: Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. *Atherosclerosis* 1996; 120: 25-35.
513. Vodinelich, L., Tax, W., Bai, Y., Pegram, S., Capel, S. and Greaves, M.F. A monoclonal antibody (WT1) for detecting leukemias of T-cell precursors. *Blood.* 1983; 62:1108-1113.
514. Vogel, R.A.: Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis. *Clin. Cardiol.* 1997; 20: 426-432.
515. Vogel, R.A.: Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis. *Clin. Cardiol.* 1997; 20: 426-432.
516. Vogetseder, W. and Dierich, M.P. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) is associated with actin-filaments. *Immunobiol.* 1991; 182:143-151.
517. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991). Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (17): 7538-42.
518. Vonderheide, R.H., Tedder, T.F., Springer, T.A. and Staunton, D.E. Residues within a conserved amino acid motif of domains 1 and 4 of VCAM-1 are required for binding VLA-4. *J. Cell Biol.* 1994; 125:215-222.
519. Vučević D1, Radak D, Radosavljević T, Mladenović D, Milovanović I. Inflammatory process in atherogenesis: new facts about old flame, *Med Pregl.* 2012 Sep-Oct;65(9-10):388-95.
520. Wagner, E., Zatloukal, K., Cotten, M., Kirlappos, H., Mechtler, K., Curiel, D.T. and Birnstiel, M.L. Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89:6099-6103.
521. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017–3024.

522. Wambach, G., Fritschka, E.: *Arterielle Hypertonie und vaskuläres System*. Upjohn GmbH. 1994  
Wernicke, K.: *Medizinische Biometrie, Scriptum*, Institut für Medizinische Biometrie HU Berlin. 1999.
523. Wang Y, Sakuma M, Chen Z, Ustinov V, Shi C, Croce K, Zago AC, Lopez J, Andre P, Plow E, Simon DI (2005). Leukocyte Engagement of Platelet Glycoprotein Ib{alpha} via the Integrin Mac-1 Is Critical for the Biological Response to Vascular Injury. *Circulation* 112: 2993-3000.
524. Wang, P.H., Lau, J. and Chalmers, T.C. Meta-analysis of effects of intensive blood-glucose control on late complications of type diabetes. *Lancet*. 1993; 341:1306- 1309.
525. Weber, C. and Springer, T.A. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J. Immunol.* 1998; 161:6825-6834.
526. Weber, C. and T.A. Springer, Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest*, 1997. 100(8): p. 2085-93.
527. Weber, K.S.C., Klickstein, L.B., Weber, P.C., and Weber, C., Chemokine-induced monocyte transmigration requires cdc42-mediated cytoskeletal changes, *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 245–2251.
528. Weidinger F, Frick M Mechanismen und Bedeutung der Endothelfunktion bei koronarer Herzkrankheit, *Journal für Kardiologie* 2000; 7 (1), 2-8.
529. Weigert AL, Higa EM, Niederberger M, McMurtry IF, Reynolds M, Schrier RW. Expression and preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase in aortas of endotoxemic rats. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5:2067–2072.
530. WHO health statistic report 2014 update;
531. Wick, G. et al.: Is arteriosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995; 16(1): 27-33.
532. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2479–2488.
533. Wiznerowicz, M., Fong, A.Z.C., Mackiewicz, A. and Hawley, R.G. Doublecopy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development. *Gene Ther.* 1997; 4:1061-1068.
534. Wójciak-Stothard, B., Williams, L. and Ridley, A.J. Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell Biol.* 1999; 145:1293-1307.
535. Woodgett, J.R., Gould, K.L. and Hunter, T. Substrate specificity of protein kinase C: use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.* 1986; 161:177-184.

536. World CJ, Garin G, Berk B: 2006. Vascular shear stress and activation of inflammatory genes. *Curr Atheroscler Rep* 8:240–244.
537. Xu H1, Wang D, Peng C, Huang X, Ou M, Wang N, Wang P, Zhou L, Ye X. Rabbit Sera Containing Compound Danshen Dripping Pill Attenuate Leukocytes Adhesion to TNF-Alpha-Activated Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Suppressing Endothelial ICAM-1 and VCAM-1 Expression Through NF-KappaB Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(4):323-32.
538. Yadon Arad, Kenneth J. Goodman, Marguerite Roth, David Newstein, and Alan D. Guerci Coronary Calcification, Coronary Disease Risk Factors, C-Reactive Protein, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events: The St. Francis Heart Study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;46:158-165.
539. Yan ZQ, Hansson GK. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998;82:21–29.
540. Yang JC1, Huang F, Wu CJ, Chen YC, Lu TH, Hsieh CH. Simvastatin reduces VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells exposed to lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* 2012;61(5):485-91. doi: 10.1007/s00011-012-0435-9.
541. Yang XP, Mattagajasingh S, Su S, et al: 2007. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway. *Circ Res* 101:1001–1008.
542. Yang, J.P. and Huang, L. Direct gene transfer to mouse melanoma by intratumor injection of free DNA. *Gene Ther.* 1996; 3:542-548.
543. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res.* 2004;95(11):1075–1081.
544. Yi Chu, Donald D. Heistad, Myron I. Cybulsky and Beverly L. Davidson, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Augments Adenovirus-Mediated Gene Transfer, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:238-242.
545. Yoshida, M., Westlin, W.F., Wang, N., Ingber, D.E., Rosenzweig, A., Resnick, N. and Gimbrone, Jr., M.A. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 1996;133:445-455.
546. Yusuf, S., Sleight P. et al.: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; Jan 20, 342(3): 145-153.
547. Yutaka Nakashima, Elaine W. Raines, Andrew S. Plump, Jan L. Breslow, Russell Ross Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:842-851.



548. Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves endothelium-dependent relaxations in aorta from diabetic rabbits. *Diabetologia*. 2000;43:340–347.
549. Zapolska-Downar, D., Naruszewicz, M., Zapolski-Downar, A., Markiewski, M., Bukowska, H. and Millo, B. Ibuprofen inhibits adhesiveness of monocytes to endothelium and reduces cellular oxidative stress in smokers and non-smokers. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000; 30:1002-1010.
550. Zhao, Z.Q., Lefer, D.J., Sato, H., Hart, K.K., Jefforda, P.R. and Vinten-Johansen, J. Monoclonal antibody to ICAM-1 preserves postischemic blood flow and reduces infarct size after ischemia/reperfusion in rabbit. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62:292- 300.