

Oja Prelovšek¹

Vpliv dejavnika tumorske nekroze- α na izločanje interlevkina-6 iz človeške mišice v kulturi²

The Influence of Tumor Necrosis Factor- α on the Secretion of Interleukin-6 from the Cultured Human Muscle

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mioblasti skeletnih mišic – učinki zdravil – sekrecija, tumorska nekroza faktor, interlevkin-6

Dejavnik tumorske nekroze- α (TNF- α) je pleiotropni citokin, ki kot del kompleksnega citokinskega sistema uravnava sintezo in ekspresijo drugih citokinov in njihovih receptorjev prek aktivacije citokinskih kaskad. Namen naše naloge je bil proučiti učinek TNF- α na izločanje interlevkina-6 (IL-6) iz človeške mišice v kulturi, in sicer na stopnjah pred fuzijo mioblastov v mišične cevčice in po njej. Kulturam, pripravljenim iz satelitskih celic, ki smo jih izolirali iz koščkov skeletnih mišic, ki se po doktrini odstranijo in zavržejo pri nekaterih ortopedskih operacijah, smo dajali TNF- α v treh različnih koncentracijah. Ugotovili smo, da TNF- α koncentracijsko odvisno pospešuje izplavljanje IL-6. Količine izplavljenega IL-6 so bile v primeru mišičnih cevčic večje kot v primeru mioblastov, kar kaže na odvisnost učinka TNF- α od stopnje mišične diferenciacije. Prisotnost receptorjev za TNF- α smo dokazali s tehniko Western blot. Morebitne pospešene apoptoze, ki smo jo ugotavljali s fragmentacijo DNA, nismo ugotovili. Naši rezultati podpirajo domnevo o aktivni vlogi skeletne mišice pri citokinskem signaliziranju v kritičnih kliničnih stanjih.

ABSTRACT

KEY WORDS: myoblasts skeletal – drug effects – secretion, tumor necrosis factor, interleukin-6

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a pleiotropic cytokine which, as a part of complex cytokine system, controls the synthesis and expression of other cytokines and their receptors through the activation of cytokine cascades. The aim of our study was to test the effects of TNF- α on the secretion of interleukin-6 (IL-6) from cultured human muscle. We studied these effects before and after the fusion of myoblasts into multinucleated myotubes. Cultures, prepared from satellite cells isolated from the muscle pieces routinely discarded at some orthopaedic operations were treated with TNF- α at three different concentrations. We found that TNF- α increases the IL-6 secretion in a concentration dependent manner. Quantitatively, secretion from myotubes exceeded the secretion from myoblasts indicating that secretion is differentiation stage-dependent. The presence of TNF- α receptor was confirmed by Western blot. Apoptosis, followed by DNA fragmentation, remained unchanged. Our results support the concept that skeletal muscles actively participate in cytokine signalling in critical clinical conditions.

¹ Oja Prelovšek, univ. dipl. biol., mlada raziskovalka, Laboratorij za molekularno nevrobiologijo, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

² Delo je bilo nagrajeno s Krkino nagrado za študente v letu 2003.

UVOD

Razvoj skeletne mišice in njena vloga v imunskih reakcijah

Skeletne mišice predstavljajo velik del mase človeškega organizma. Dolgo časa je veljalo, da ima to tkivo le pasivno vlogo v različnih imunskih in drugih obrambnih reakcijah, ki se odvijajo na ravni celotnega organizma. Novejše raziskave pa vse bolj poudarjajo aktivno vlogo skeletnih mišic v imunskih reakcijah, predvsem v smislu njihove sposobnosti sintetiziranja in izločanja različnih dejavnikov, ki sodelujejo pri tej obrambi, med katerimi so tudi regulacijski proteini, imenovani citokini. Sposobnost skeletnih mišic, da sodelujejo pri citokinskem signaliziranju, bi utegnila razložiti za zdaj še nejasno patofiziologijo miopatičnih sprememb, ki spremljajo nekatera kritična stanja, kot so septični šok, hipertermija in kaheksija. Pri uravnavanju sinteze in izločanja citokinov ima pomembno vlogo dejavnik tumorske nekroze- α (angl. »*tumor necrosis factor α* «, TNF- α). Za ta pleiotropni citokin je znano, da ima v organizmu vlogo koordinacije obrambnih mehanizmov imunskega sistema proti vdoru tujih patogenov.

Skeletna mišična vlakna so mezodermalnega izvora. Razvoj mišic od izvornih celic do mišičnega vlakna poteka prek več stopenj, s postopnim vključevanjem mišično specifičnih genov, t. i. miogenov, kot so *myf-5*, *myf-6*, *myoD*, miogenin in drugi (1, 2). Produkti teh miogenov so regulatorji transkripcije, ki usmerijo celico v smer diferenciacije v mišično vlakno. Predstopnjo v razvoju skeletnih mišičnih celic imenujemo mioblast, ki je enojedrna celica. Po obdobju intenzivnih delitev mioblasti preidejo v proces zlivanja celic – fuzije, ki vodi do nastanka večjedrnih mišičnih cevč (mišični sincicij). Po fuziji pride do oživčenja mišične cevčice, temu pa sledi dolgotrajen proces razvoja oziroma zorenja mišične cevčice v končno funkcionalno obliko mišičnega vlakna. Fuzija in oživčenje sta osnovna mejnika v razvoju skeletne mišice. Zanju so značilne velike spremembe pri izražanju genov, kar vodi do sinteze različnih, za mišično vlakno značilnih proteinov.

V procesu mišične regeneracije gre za podoben proces, kjer imajo ključen pomen

satelitske celice. Satelitske celice so t. i. speči mioblasti, ki po procesu fuzije ostanejo na stopnji enojedrne celice in so vse življenje v tesni povezavi z mišičnim vlaknom (3). Ohranijo zmožnost delitve, njihova proliferacija, ki poteka enako kot med mišično ontogenezo v embrionalnem razvoju, je povečana v primeru poškodbe ali ob hudih fizičnih naporih. Delitveni potencial satelitskih celic uporabimo pri pripravi celičnih kultur mioblastov (4).

Sinteza in struktura TNF- α ter njegova vloga v reakcijah naravne imunosti

TNF- α je eden glavnih mediatorjev akutnega vnetnega odgovora; še posebej to velja, kadar so povzročitelji gramnegativne bakterije in drugi infektivni mikrobi. Prav zaradi svojega delovanja pa je odgovoren tudi za mnoge sistemske zaplete, ki jih povzročijo hude okužbe. Prvič so TNF- α prepoznali kot substanco, ki se je po obdelavi miši z bakterijskim lipopolisaharidom (endotoksinom) pojavila v serumu teh živali, kar je povzročilo nekrozo tumorjev *in vivo*. Skleпали so, da TNF- α uravnava z endotoksinom povzročeno nekrozo tumorjev in da je morda odgovoren za supresijo transformiranih celic zaradi aktivacije makrofagov (5).

Glavni vir TNF- α v krvi so aktivirani mononuklearni fagociti, torej nevtrofilci, krvni monociti in različne celice mononuklearnega fagocitnega sistema, ki so porazdeljene povsod po telesu (tkivni makrofagi, Kupfferjeve celice jeter, mikroglijske celice možganov in fagociti ledvic). Zadnje raziskave pa so pokazale, da ga sintetizira in izloča tudi vrsta drugih celic, od katerih ene sodelujejo pri imunskem odzivu, npr. aktivirani limfociti T, celice NK in mastociti (6), druge pa, vsaj po klasični predstavi, ne. Tako so Starkie in sodelavci (7) ugotovili, da koncentracija TNF- α v plazmi po dolgotrajni mišični aktivnosti (npr. teku) naraste, izvor tega TNF- α pa gre, kot so ugotovili, prej kot krožečim monocitom, pripisati skeletnim mišicam.

V mononuklearnih fagocitih se TNF- α sintetizira kot membranski protein, ki se izrazi kot homotrimer (velikost vsake podenote je 17 kDa). Membranske metaloproteinaze proteolitično odcepijo vsako od posameznih

podenot homotrimerja s plazmaleme. Protein, ki se na ta način sprosti, je topna oblika TNF- α , ki potuje po krvi kot stabilen homotrimer velikosti 51 kDa. Nativen TNF- α naj bi po svoji molekularni strukturi imel trikotno piramidalno obliko. Vežavna mesta za receptorje so na bazi piramide, kar omogoča sočasno vezavo ene molekule na več receptorjev (8).

Od številnih učinkov TNF- α je sorazmerno dobro raziskano njegovo delovanje med vnetno reakcijo. Glavna vloga TNF- α v tem procesu je privlačenje nevtrofilcev in monocitov na mesto okužbe in aktivacija teh celic za opravljanje naloge odstranitve mikrobov. TNF- α posreduje ta učinek preko različnih mehanizmov na celice žilnega endotelija in levkocite.

Delovanje TNF- α na endotelij in levkocite je ključno za lokalni vnetni odgovor na okužbo z mikrobi. Če so količine TNF- α nezadostne, se pomembno zmanjša sposobnost organizma obvladati okužbo, kar se je pokazalo pri živalih, ki so jim vbrizgali protitelesa proti TNF- α (9), kot tudi pri miših, ki so jim odstranili gen za TNF- α (10). Poleg sodelovanja TNF- α v lokalnih vnetnih reakcijah so njegovi učinki znani tudi pri reakcijah, ki so škodljive za organizem, npr. pri avtoimunih boleznih (6, 9).

TNF- α vpliva predvsem na tri tipe mezenhimskih celic: adipocite, fagocite in skeletne mišice (11). Pomen teh vplivov za organizem bi lahko bil mobilizacija lipidnih rezerv, povečanje fagocitoze in priprava satelitskih celic na odgovor na poškodbo v smislu mišične regeneracije.

Hude okužbe z gramnegativnimi, pa tudi z grampozitivnimi bakterijami in kvasovkami, predstavljajo močan dražljaj za produkcijo TNF- α in drugih citokinov. Kadar se citokini izločajo v večjih količinah, lahko vstopijo v krvni obtok in delujejo endokrinno, čemur lahko sledi šok. Pogost vzrok šoka je sepsa – takrat govorimo o septičnem šoku. Novejše raziskave kažejo, da je z endotoksini posredovana aktivacija mononuklearnih fagocitov in posledično sproščanje TNF- α ključen dogodek v patogenezi septičnega šoka (12). Kot smo že omenili, ta citokin vpliva na sintezo in izločanje sekundarnih sporočevalcev, med njimi tudi prostaglandinov in trombocite-aktivirajočih dejavnikov. Pojave, ki spremljajo

septični šok, kot so tahikardija, metabolna acidoza, hemokoncentracija in hipotenzija, lahko sprožimo z vbrizganjem TNF- α v poskusne živali (12), kar so ugotovili pri podganah in psih (13, 14). S protitelesi proti TNF- α lahko te pojave preprečimo (9). Visoke koncentracije TNF- α so povezane z visoko umrljivostjo bolnikov s septičnim šokom. Raziskave kinetike citokinov med septikemijo so tudi pokazale, da 15 minut potem, ko doseže serumska koncentracija TNF- α vrh, pride do povečanja serumskega interleukina 6 (IL-6) (16).

Vpliv TNF- α na skeletne mišice

Svoje celične učinke, kot so diferenciacija, proliferacija in celično preživetje oz. citotoksičnost, sproži TNF- α prek dveh receptorjev: TNF-receptorja 1 in TNF-receptorja 2 (TNF-R1 in TNF-R2). TNF-R1 je znan tudi pod oznako p55TNFR, ker naj bi imel maso nekje pri 55 kDa, TNF-R2 pa so zaradi mase med 70 in 80 kDa poimenovali tudi p75TNFR. Po vezavi TNF- α na TNF-R1 in TNF-R2 pride do aktivacije številnih kinaznih poti. Raziskave so pokazale, da TNF- α aktivira jedrni dejavnik- κ B (NF- κ B za angl. »nuclear factor- κ B«), ki je ključni dejavnik pri uravnavanju inducibilnega izražanja mnogih genov. Visoke koncentracije TNF- α povzročijo programirano celično smrt v razmerah *in vitro* in v *in vivo*. Dodatek TNF- α v koncentraciji 20 ng/ml kulturam mišjih skeletnih mioblastov je močno povečal delež apoptotičnih celic s fragmentirano DNA (17). Ko med sepo pride do povišanja koncentracije TNF- α v plazmi, pride do pospešenega odmiranja hitrih skeletnih mišic, medtem ko so počasne manj podvržene apoptozi (18). S poskusi na podganjih kardiomiocitih je bilo potrjeno tudi, da je s TNF- α posredovana apoptoza, ki spremlja mnoge bolezni srca, posledica sproščanja sfgingolipidov. TNF- α naj bi v tem primeru deloval prek TNF-R1 (19).

Miller in sodelavci (11) so proučevali vpliv TNF- α na človeško miogenezo *in vitro*. Mioblaste in mišične cevčice so v pogojih *in vitro* obdelali s TNF- α in ugotovili, da sta vezava TNF- α in njegovi učinki odvisna od tega, v kateri od teh dveh razvojnih stopenj je mišica. Ker je za TNF- α znano, da ima pri sesalcih vlogo v odgovoru na stres in v patogenezi endo-

toksičnega šoka, avtorji razlagajo svoje ugotovitve tako, da v primeru poškodbe mišice TNF- α inhibira diferenciacijo hitro delečih se satelitskih celic in pospešuje njihovo proliferacijo (17). Na ta način se zagotovi več prekursorjskih celic za mišično regeneracijo, že diferencirano mišično tkivo pa se ohranja. Po nekaterih ugotovitvah naj bi bil v mehanizme, prek katerih TNF- α vpliva na razvoj skeletne mišice, vpleten tudi IL-6. Tako se domneva, da je *in vitro* proliferacija satelitskih celic človeške mišice nadzorovana z avtokrinim izločanjem IL-6 (20). Vnetje je ključen odgovor na poškodbo in je nujen za regeneracijo mišice (21). V poškodovani mišici, pri Duchennovi mišični distrofiji in vnetnih miopatiyah je ekspresija TNF- α povečana (22). Za nestimulirane mišične celice pa ni značilno konstitutivno izražanje TNF- α in IL-1 (23). V intaktnih skeletnih mišicah se TNF- α ne izraža, kar pomeni, da njegova vloga ni vzdrževanje homeostaze (10).

IL-6 kot odgovor na mišično aktivnost in njegove biološke vloge

Doslej je veljalo, da je IL-6 citokin z imunomodulativnimi učinki, katerega glavni vir naj bi bile celice, ki neposredno sodelujejo pri imunskem odzivu. Raziskave, ki so pokazale, da se raven IL-6 v obtoku med telesno aktivnostjo poveča tudi do 100-krat, pa govorijo v prid razlagi, da se IL-6 izloča tudi iz skeletnih mišic (24). Nekateri raziskovalci so trdili, da naj bi bila povišana raven IL-6 v obtoku posledica poškodbe mišice (25) in odgovora imunskih celic, vendar so novejša raziskave jasno pokazale, da že sama mišična krčenja brez kakršnekoli poškodbe inducirajo znatno povišanje IL-6 v plazmi (26). Biološke vloge mišičnega IL-6 so proliferacija (20) in sodelovanje v vzdrževanju homeostaze ogljikovih hidratov – ko upadejo zaloge glikogena v mišicah, se zviša koncentracija IL-6 mRNA, njeno prepisovanje v jedru in izločanje proteinov iz skeletne mišice (27). Z naraščanjem koncentracije IL-6 v mišici pa pada koncentracija mišičnega glikogena, kar kaže na vlogo IL-6 pri vzdrževanju glukozne presnove v mišici med aktivnostjo.

Poleg glukoregulatorne vloge se domneva, da je IL-6 v skeletnih mišicah vpleten tudi

v druge metabolne procese. Sočasno s povečanim izločanjem glukoze iz jeter se je med infuzijo IL-6 pojavilo tudi zvišanje koncentracije prostih maščobnih kislin v krvi. Ker pa je v tej raziskavi pri preiskovancih prišlo tudi do povečanja krvnega adrenalina, za katerega je znana lipolitična aktivnost, avtorji niso mogli zaključiti, da deluje IL-6 neposredno na adipocite (26).

Vpliv TNF- α na izločanje IL-6

TNF- α in IL-6 sta tesno povezana, saj TNF- α spodbuja produkcijo IL-6 (6). Študije *in vitro* (28) in *in vivo* (29) so pokazale, da IL-6 povratno zavre produkcijo TNF- α . Na modelu hepatitisa pri glodalcih je bilo ugotovljeno, da je TNF- α ključen za razvoj poškodbe jeter in da IL-6 zaščiti tkivo preko različnih mehanizmov, vključno z inhibicijo produkcije TNF- α (29). Novejše raziskave so pokazale, da tudi pri človeku mišična aktivnost in z njo povezano povišanje IL-6 ter infuzija rekombinantnega humanega IL-6 inhibirata produkcijo TNF- α , ki jo je sprožila endotoksemija (30).

NAMEN DELA IN HIPOTEZI

Raziskovalno področje raziskovalne naloge je v širšem smislu vloga človeške skeletne mišice pri obrambnem odgovoru organizma in preučevanje molekularnih mehanizmov, ki v tem oziru uravnavajo delovanje skeletne mišice. Sposobnost TNF- α , da se specifično vpleta v ekspresijo mišičnih beljakovin ob različnih stopnjah razvoja skeletne mišice, bi utegnila pojasniti tudi vlogo TNF- α pri spremembah v skeletni mišici, ki se dogajajo v stanjih, kot so vnetje, septični šok, kaheksija in hipertermija. Patofiziologija omenjenih miopatičnih sprememb je nejasna. Kot razlaga so se v preteklosti omenjale periferne nevropatije in motnje v živčno-mišičnem prenosu, danes pa se poudarja aktivna vloga samih skeletnih mišic. Odločili smo se preveriti naslednji dve hipotezi:

1. Izločanje IL-6 iz človeške mišice v kulturi se uravnava s TNF- α in se poveča pri višjih koncentracijah TNF- α .
2. S TNF- α inducirano izločanje IL-6 je izrazitejše na višji stopnji diferenciacije skeletne mišice.

METODE IN MATERIALI

Priprava kultur človeških mišic

Poskuse smo opravili v Laboratoriju za mišične kulture na Inštitutu za patološko fiziologijo MF v Ljubljani. Za vse poskuse, ki smo jih izvedli, je bilo pridobljeno dovoljenje etične komisije v Sloveniji (Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo Republike Slovenije, št. 63/01/99).

Pri delu s človeškim tkivom smo upoštevali vse varnostne ukrepe, ki jih zahteva tako delo (Pravilnik o delu z biološkim materialom, Uradni list: 04/2002, 18/01/2002). V opisanih poskusih smo uporabili koščke človeške mišice *abductor hallucis*, ki se po doktrini odstranijo pri operacijah ekvinovarusa. Dobili smo jih v sodelovanju z asist. dr. Janezom Brecljem z Ortopedske klinike Kliničnega centra v Ljubljani.

Koščke mišic, ki smo jih uporabili kot vir satelitskih celic, smo pred obdelavo shranili v 15 ml rastnega medija z minimalno sestavo (angl. »Minimal Essential Medium«, MEM) (Gibco, Maryland, ZDA) z dodanim 15 % telečjim serumom (angl. »Fetal Bovine Serum«, FBS) (Gibco, Maryland, ZDA) pri 4 °C. Tkivo smo pred pripravo celičnih kultur očistili veziva in drugih primesi in razrezali na manjše, 0,5 do 1 mm velike koščke. Koščke tkiva smo nato tripsinizirali (0,25 % tripsin (Gibco, Maryland, ZDA) v raztopini EBSS (angl. »Earl Balanced Salt Solution«, EBSS) pri 37 °C, čas tega postopka pa je bil odvisen od količine tkiva. Tripsinizirane mišične satelitske celice smo gojili do klonalne gostote v petrijevkah (d = 100 mm) in to v mediju MEM z dodanim 15 % FBS in drugimi substancami. Petrijevke smo prenesli v inkubator z nasičeno vlago (T = 37 °C) in mešanico zraka in 5 % CO₂. Po dveh do treh tednih rasti brez menjave medija in pred fuzijo mioblastov v mišične cevčice smo ločili mioblastne kolonije od fibroblastnih in jih nadalje gojili v posodah za celične kulture (75 cm²). Ko je rast dosegla konfluentnost in pred fuzijo mioblastov, smo celice tripsinizirali in prenesli v posode (d = 35 mm) z vstavljenim krovnim stekelcem. Krovna stekelca smo pred tem prevlekli z mešanico želatine (Sigma, Missouri, ZDA) in krvne plazme v razmerju 1 : 2.

Obdelava celičnih kultur s TNF- α

Človeške mišične celice smo obdelali s TNF- α na dveh stopnjah razvoja: na stopnji mioblastov in na stopnji mišičnih cevčic.

Mioblasti preidejo v konfluentno rast po desetih dneh od začetka kulture. Primernost kulture (konfluentna rast, morfologija celic, odsotnost okužbe) za obdelavo s TNF- α smo določili s fazno-kontrastno mikroskopijo. Medij (MEM) smo do pridobitve kulture mioblastov in do pridobitve kulture cevčic menjali na tri dni. Homogena monokultura mišičnih cevčic pa je dosežena po treh tednih od začetka kulture. Kriterij za dobro kulturo mišičnih cevčic je poleg morfologije in odsotnosti okužbe miogeni indeks, ki je definiran kot povprečno število jeder na mišično cevčico.

Pred obdelavo s TNF- α smo iz gojitvenih posodic odstranili prvotni medij, nato pa dodali medij (MEM) z dodanim človeškim TNF- α (Sigma, Missouri, ZDA), in sicer v koncentracijah 1 ng/ml, 10 ng/ml in 100 ng/ml. V vsako posodico smo dodali 1,5 ml medija z dodanim TNF- α in kulture inkubirali 24 ur. Po 24-urni obdelavi smo zbrali vzorce medija (supernatant) in celic za analizo.

Poskuse s TNF- α smo opravili na kulturah treh različnih darovalcev (n = 3) človeškega mišičnega tkiva, kontrolne poskuse pa na kulturah štirih darovalcev (n = 4). Celice iz kultur vsakega od teh darovalcev smo pred poskusom (24-urno obdelavo s TNF- α oz. 24-urna inkubacija v MEM za kontrolo) razdelili v 6 posodic (d = 36 mm), ki so torej predstavljale paralelne poskuse. Tako smo za obdelavo s TNF- α naredili 3 × 6 poskusov za vsako koncentracijo TNF- α , za kontrolo pa 4 × 6 poskusov.

Zbiranje supernatanta in celic za nadaljnje analize

Po končani 24-urni obdelavi smo iz gojitvenih posodic vzeli supernatante, jih takoj zamrzili na -70 °C in tako shranili za kasnejše merjenje laktatne dehidrogenaze (LDH) in izločenega IL-6.

Mišične celice, ki so ostale po odstranitvi supernatanta, smo uporabili za ugotavljanje gostote celic, analizo Western-blot in ugotav-

ljanje fragmentacije DNA kot posledico apoptoze.

Analiziranje supernatanta

Analiza količine IL-6

Analiza količine IL-6 v supernatantu je bila opravljena z metodo ELISA (angl. »enzyme-linked immunosorbent assay«) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo MF v sodelovanju z dr. Branko Wraber. Postopek poteka takole: na ploščico (nosilec reakcije) se nanese z biotinom označena protitelesa proti človeškemu IL-6 (Endogen Inc., ZDA), ki se jim doda že pripravljene standardne raztopine z znanimi količinami IL-6, s pomočjo katerih se nato napravi umeritveno krivuljo in tako določi količino IL-6 v testnih vzorcih. Testne vzorce so predhodno redčili 1 : 100 in 1 : 1000 v MEM. Sledi dvourni inkubacija pri sobni temperaturi in spiranje nevezanih primarnih protiteles s pufrom. Nato se doda v pufru redčena sekundarna protitelesa, označena s streptavidinom (streptavidin se s štirimi mesti veže na biotin). Na ta protitelesa je vezana peroksidaza iz hrena (angl. »horseradish peroxidase«, HRP), ki reagira s kasneje dodanim tetrametil benzidinom. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi traja 30 minut pri sobni temperaturi. Spiranju s pufrom sledi dodajanje substrata tetrametil benzidina (TMB). Reakcija s substratom poteka 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Reakcijo se ustavi s spiranjem nosilca z raztopino »stop«. Absorbanco se odčita pri 450–550 nm in se iz umeritvene krivulje izračuna koncentracije IL-6. Končno koncentracijo IL-6 se nato preračuna na določeno število jeder.

Analiza laktatne dehidrogenaze

Laktatna dehidrogenaza (LDH) je citosolni encim, ki se sintetizira v večjih količinah v tkivih, ki so velik porabnik energije, kot so skeletne mišice, srčna mišica ter možgani. V klinični praksi se LDH pogosto uporablja kot označevalec nekroze tkiv. Njegovo prisotnost v krvi se testira z občutljivimi metodami. V bolezenskih stanjih izmerjeni nivoji LDH v plazmi se gibljejo v razredu nekaj 100 IU/l, dosežejo pa tudi koncentracije, višje od 1000 IU/l. V mikrokatalih izražene normalne koncentracije LDH so 0,17–2,08 μ kat/l plaz-

me (vir: Černe D). Količina LDH v supernatantu (EC 1.1.1.27) je bila izmerjena z encimatsko metodo na aparaturi Vitros 950 (Ortho-Clinical Diagnostics, Neckardgemünd, Nemčija) v Urgentnem biokemičnem laboratoriju Kliničnega centra, v sodelovanju z dr. Darkom Černetom. Količina LDH v vseh zbranih posameznih vzorcih supernatantov po koncu obdelave s TNF- α , je bila določena istočasno v eni seriji meritev. Vzorci so bili pred merjenjem shranjeni pri -70°C največ mesec dni. Za vsak vzorec so bile izvedene tri vzporedne meritve, verjetnost napake trojne določitve vrednosti je bila pod 2,1%.

Analiziranje celične frakcije

Določanje gostote celic v kulturi

Celotno število celic v kulturah mioblastov in v kulturah mišičnih cevčic smo določili tako, da smo njihova jedra obarvali s fluorescenčnim barvilom Hoechst 33258 (Molecular Probes, Oregon, ZDA). Celice, ki so predhodno rasle na krovnih stekelcih, smo pred 10-minutnim fiksiranjem z raztopino 4% PFA (paraformaldehid, pH 7; Sigma, St. Louis, MO, ZDA) za kratek čas spirali z na 37°C ogretim fosfatnim pufrom (PBS) (1,3 M NaCl, 70 mM Na_2HPO_4 , 30 mM NaH_2PO_4 ; pH 7,4). Fiksaciji je sledilo 2- do 3-kratno spiranje po 10 minut s PBS in petminutna inkubacija v raztopini barvila Hoechst 33258 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v PBS). Ta je potekala v za to pripravljenih vlažnih kopelih. Nato smo krovna stekelca spirali 2- do 3-krat po 10 minut v PBS-u in jih vklopili v 70% glicerol ter pritrtili na objektna stekelca. Jedra smo opazovali s fluorescentno mikroskopijo z ultravijoličnim filtrom ($\lambda = 365\text{ nm}$). Za vsako kulturo in koncentracijo TNF- α smo prešteli jedra v 20 vidnih poljih, izračunali povprečno število jeder na površino vidnega polja in preračunali število jeder na površino posodice.

Analiza receptorjev za TNF- α s tehniko Western blot

Konstitutivno in od TNF- α odvisno izražanje TNF-R2 v mišičnih celicah na stopnji mioblastov in na stopnji mišičnih cevčic smo testirali s tehniko Western blot. Tehnika omogoča tudi semikvantitativno primerjavo količine določenega proteina med posameznimi vzorci

proteinov. V tem smislu smo ocenili prisotnost TNF-R2 v naših vzorcih. V žepke gela smo vzporedno nanесли vzorce proteinov neobdelanih kontrolnih kultur in vzorce proteinov kultur, obdelanih s TNF- α . Nanešena masa proteinov v posameznem žepku je bila 50 μ g.

Vzorce celic iz kultur za analizo Western blot smo najprej takoj po odstranitvi medija in kratkem spiranju z na 37 °C ogretim PBS-om prenesli na led ter lizirali in homogenizirali v pufru (20 mM TRIS pH = 7,4), ki je vseboval 10% saharozo, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, in 0,1 mM PMSF. Dodani so bili tudi inhibitorji proteinaz: leupeptin, aprotinin in pepstatin (vsi proizvajalca Sigma, Missouri, ZDA), vsi v koncentracijah 10 μ g/ml. Temperatura pufra je bila 4 °C. Tkivo smo homogenizirali 30 minut na ledu. Po lizi in homogenizaciji smo netopne ostanke celic odstranili s centrifugiranjem pri 13000 \times g in pri -4 °C za 10 minut. Po centrifugiranju smo odstranili supernatante, jih shranili na -20 °C in postopek še enkrat ponovili na ostanku celic. Tako pridobljeni supernatant smo združili s prvim. V združenemu supernatantu smo določili koncentracijo proteinov po Lowryjevi metodi s kompletom za določevanje proteinov (Sigma, Missouri, ZDA). Absorpcijo smo izmerili pri valovni dolžini 750 nm. Najprej smo naredili umeritveno krivuljo z vzorci znane koncentracije beljakovin, nato smo izmerili absorpcijo pri našem beljakovinskem vzorcu. Koncentracijo proteinov v naših supernatantih smo določili s pomočjo ustrezne umeritvene krivulje.

Trideset do petdeset mikrogramov proteinov iz vsakega vzorca smo ločili z elektroforezo 10% SDS-PAGE, nakar smo jih iz gela prenesli na membrano PVDF (Immobilon, Millipore, Massachusetts, ZDA). Pred detekcijo smo membrano inkubirali 30 min v pufru »blocking«, ki smo ga pripravili v 1 \times PBS-u z dodatkom 3% I-Block (Tropix, Massachusetts, ZDA) in 3% Tween-20 (Sigma, Missouri, ZDA). Sledila je 60-minutna inkubacija s primarnimi protitelesi, specifičnimi za receptor TNF-R2 (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Kanada), ki smo jih redčili v razmerju 1:250 v pufru »blocking«. Nato smo membrano spirali 3-krat po 5 minut v pufru »blocking«. Sledila je 60-minutna inkubacija s sekundarnimi protitelesi, konju-

giranimi z alkalno fosfatazo (DAKO, Glostrup, Danska). Protitelesa so bila razredčena 1:1000 v pufru »blocking«. Inkubaciji je sledilo spiranje znova v pufru »blockings«, nakar smo membrano spirali še v 1 \times pufru »assay« (Tropix, Massachusetts, ZDA). Na membrano smo nato nanесли tanek sloj raztopine »CDP-Star« (Tropix, Massachusetts, ZDA) in po petminutni inkubaciji dali membrano v prozorno vrečko. Kemiluminescenco, ki se razvije v reakciji s tem substratom, smo merili prek počrnitve rentgenskega filma (Kodak, X-OMAT, ZDA), ki smo ga izpostavili kemiluminescenci za 20 sekund v temnici. Rentgenski film smo 3 minute razvijali v razvijalcu Ilford PQ Univerzal (Ilford, Mobberley, Anglija), razredčenem 1:10 v vodi. Za tem smo film spirali 5 min v vodi in fiksirali 4 minute v fiksativu Ilford Hypam (Ilford, Mobberley, Anglija), razredčenem 1:4 v vodi. Po končani fiksaciji smo film spirali v vodi in posušili.

Analiza fragmentacije DNA

Izolacijo celokupne DNA smo naredili z uporabo kompleta reagentov za izolacijo genske DNA (Promega, Wisconsin, ZDA) po priloženih navodilih proizvajalca. Elektroforeza DNA je potekala v 1% agaroznem gelu, pripravljenem iz agaroze (Sigma, Missouri, ZDA) in pufra TAE (tris acetat EDTA) z dodatkom etidijevega bromida. V vsak žepok smo nanесли 20 μ l vzorca z različnimi koncentracijami DNA, redčenimi v destilirani vodi.

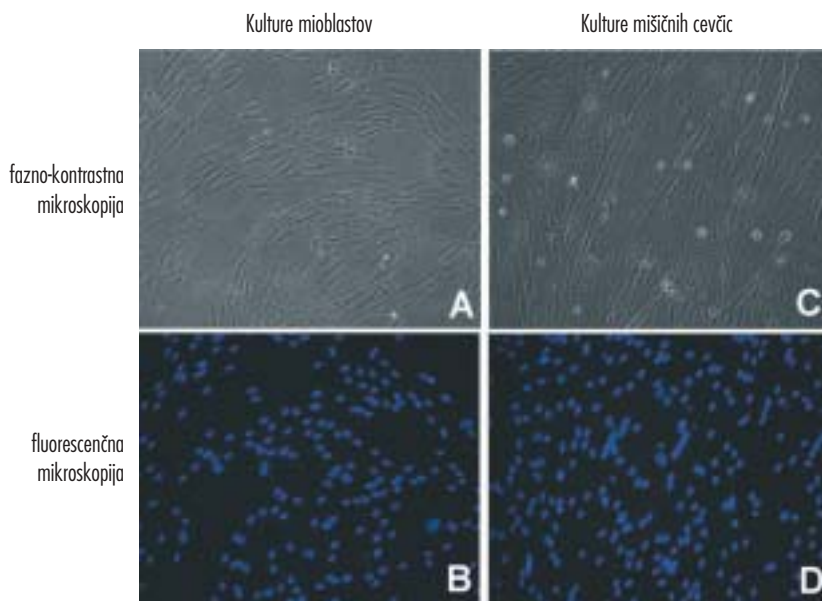
Statistične metode

Za statistično vrednotenje rezultatov smo uporabili program SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA). Rezultate smo primerjali s Studentovim t-testom za neodvisne vzorce, pri čemer smo razlike šteli za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ ali manj.

REZULTATI

Opis in razvoj kultur

Za poskuse, v katerih smo merili vpliv TNF- α , smo uporabili tri različne mišične kulture, ki so izhajale iz satelitskih celic treh različnih darovalcev. Pred samim poskusom smo preverili, kakšne so fuzijske sposobnosti celic. Na ta način smo že predhodno izločili tiste celič-



Slika 1. Prikaz kultur. Kultura mioblastov, opazovana po enem tednu s fazno-kontrastno (A) in fluorescenčno mikroskopijo (B). Kultura mišičnih cevčic, opazovana po treh tednih s fazno-kontrastno (C) in fluorescenčno mikroskopijo (D).

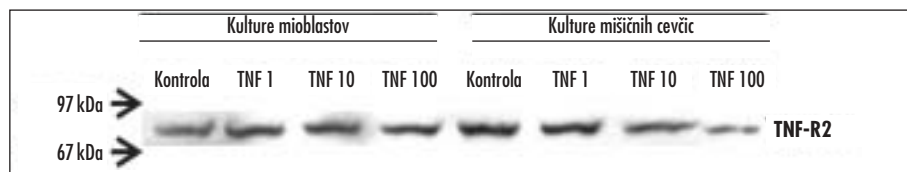
ne linije, kjer je bila fuzijska sposobnost nizka. V nadaljnjih poskusih smo uporabili le tiste linije, ki so pokazale dobro fuzijsko sposobnost. Homogenost kultur in fuzijsko sposobnost smo preverjali s fazno-kontrastno mikroskopijo. Obdelavo mioblastnih kultur s TNF- α smo pričeli takrat, ko so le-te dosegle konfluentno rast (slika 1). Za zrele kulture mišičnih cevčic smo smatrali tiste kulture, kjer je bila večina celic fuziranih in je bil miogeni indeks (povprečno število jeder na mišično cevčico) vsaj 4 in kjer je od pričetka fuzije pa do obdelave v kulturi minilo vsaj 10 dni.

Analiza prisotnosti receptorjev za TNF- α

Po elektroforetski ločitvi proteinov, prenosu na PVDF-membrano in izpostavitvi membra-

ne primarnim in sekundarnim protitelom ter razvijanju produkta smo v vseh kolonah z nanešenimi vzorci proteinov našli dobro viden specifičen signal (slika 2). S pomočjo beljakovinskih označevalcev smo ocenili velikost proteina v našem signalu med 67 kDa in 97 kDa. Ta velikost ustreza dejanski velikosti beljakovine TNF-R2, ki je po podatkih iz literature 75 kDa.

Ker smo v vse žepke nanesli enako maso proteinov, lahko s primerjavo intenzitete signalov ocenimo relativne količine specifičnega proteina v vzorcih. Primerjava intenzitete signalov nam pokaže, da je intenziteta barvanja v kontrolnem vzorcu mioblastov šibkejša kot v kontrolnem vzorcu mišičnih cevčic, iz česar lahko ocenimo, da je v normalnih razmerah količina TNF-R2 večja v mišičnih cevčicah kot



Slika 2. Količine TNF-R2 v vzorcih proteinov, izoliranih iz neobdelanih in s TNF- α obdelanih kultur mioblastov in mišičnih cevčic, določene z metodo Western blot. Na start so bile nanešene enake mase proteinov (50 μ g) za vse vzorce.

v mioblastih. Primerjava signalov med kontrolnimi in obdelanimi kulturami pa pokaže, da so v primeru mioblastnih kultur signali v obdelanih kulturah intenzivnejši kot v kontrolni kulturi, česar pa ne moremo reči za kulture mišičnih cevčic, kjer smo ugotovili pri kulturi, obdelani z 100 ng/ml TNF- α , celo šibkejši signal kot v kontrolni kulturi (slika 2).

Izločanje IL-6 iz kultur mišičnih celic

Izločanje IL-6 v kulturah mioblastov

Količino IL-6, ki se izloči iz kultur mišičnih celic, smo ugotavljali z metodo ELISA. Količino izločenega IL-6 v kontrolnih, neobdelanih kulturah mioblastov smo primerjali s količino izločenega IL-6 v kulturah mioblastov, ki smo jih 24 ur obdelovali z različnimi koncentracijami TNF- α . V vzorcih supernatantov, odvzetih iz kontrolnih kultur mioblastov, smo izmerili povprečno $156,9 \pm 6,5$ pg IL-6/ 10^4 jeder. V vseh vzorcih, odvzetih iz s TNF- α obdelanih kultur, smo našli statistično značilno večjo količino izločenega IL-6. Količina izločenega IL-6 v kulturi mioblastov, obdelanih z 1 ng/ml TNF- α , ($254,8 \pm 30,9$ pg/ 10^4 jeder), je bila 1,6-krat večja kot v kontrolni kulturi. V kulturah, obdelanih z 10 ng/ml TNF- α , je bila količina izločenega IL-6 ($602,6 \pm 67,9$ pg/ 10^4 jeder) 3,9-krat, v kulturah s 100 ng/ml TNF- α ($664,2 \pm 222,0$ pg/ 10^4 jeder) pa 4,2-krat večja kot v kontrolnih kulturah (slika 3A). Primerjava količin izločenega IL-6 glede na različne koncentracije TNF- α nam je pokazala statistično značilno razliko, ko smo primerjali učinke TNF- α pri koncentracijah 1 ng/ml in 10 ng/ml in 100 ng/ml (slika 3A).

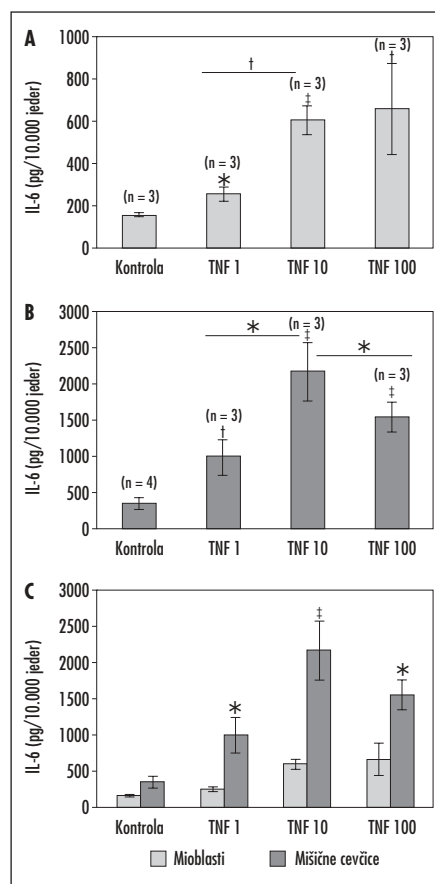
Izločanje IL-6 v kulturah mišičnih cevčic

Tudi v kulturah mišičnih cevčic smo potrdili od odmerka TNF- α odvisno izločanje IL-6. Neobdelane cevčice so izločile povprečno $350,5 \pm 78,1$ pg/ 10^4 jeder. Po obdelavi z 1 ng/ml TNF- α je bilo izločanje 2,8-krat večje ($996,6 \pm 241,2$ pg/ 10^4 jeder), po obdelavi z 10 ng/ml pa kar 6,2-krat večje ($2167,9 \pm 401,9$ pg/ 10^4 jeder) v primerjavi s kontrolno kulturo. Kulture cevčic, obdelane s 100 ng/ml TNF- α , pa so izločile $1550,1 \pm 209,3$ pg/ 10^4 jeder, kar je 4,4-krat več od kontrolnih, vendar 1,4-krat manj od kultur cevčic, obdelanih z 10 ng/ml

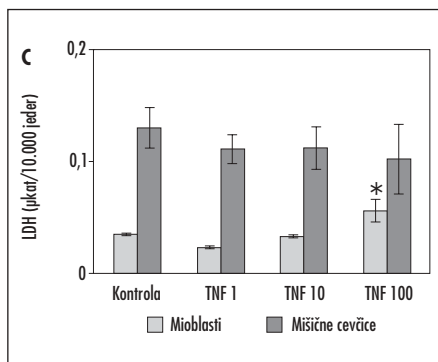
TNF- α (slika 3B). V primerjavi s kontrolno smo ugotovili statistično značilen porast v izločanju IL-6 po obdelavi z vsemi tremi koncentracijami TNF- α . Ko smo primerjali izločanje IL-6 glede na posamezne koncentracije TNF- α , smo ugotovili statistično značilno razliko med koncentracijama 1 ng/ml in 10 ng/ml. Med koncentracijama 1 ng/ml in 100 ng/ml pa razlika ni statistično značilna (slika 3B).

Primerjava med količinami IL-6, ki se izločijo iz mioblastov in iz mišičnih cevčic

Kontrolne mišične cevčice so izločale 2,2-krat več IL-6 od kontrolnih mioblastov. Pri vseh



Slika 3. Vpliv različnih koncentracij TNF- α na izločanje IL-6 iz kulture mioblastov (A) in kulture mišičnih cevčic (B) človeške skeletne mišice ter primerjava stopnje izločanja IL-6 med mioblasti in mišičnimi cevčicami (C). * $p < 0,05$; † $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$. Oznake nad stolpci pomenijo primerjavo s kontrolno; oznaka na črti pomeni primerjavo med stolpcema.



Slika 4. Vpliv TNF- α na sproščanje LDH iz mioblastov in iz mišičnih cevčic. Znak * pri s TNF 100 obdelanimi mioblasti pomeni statistično značilen porast LDH ($p < 0,05$) glede na kontrolne mioblaste. Na stopnji mišičnih cevčic ni statistično značilnih razlik med obdelanimi in kontrolnimi vzorci.

kulturah mišičnih cevčic, ki smo jih obdelali s TNF- α , je bila količina izločenega IL-6 večja kot v obdelanih kulturah mioblastov. Tako so pri obdelavi z 1 ng/ml TNF- α cevčice izločale 3,9-krat več IL-6, pri obdelavi z 10 ng/ml TNF- α 3,4-krat več, pri obdelavi s 100 ng/ml TNF- α pa 2,3-krat več IL-6 kot mioblasti. V vseh primerih je bila razlika statistično značilna.

Količina LDH v supernatantih

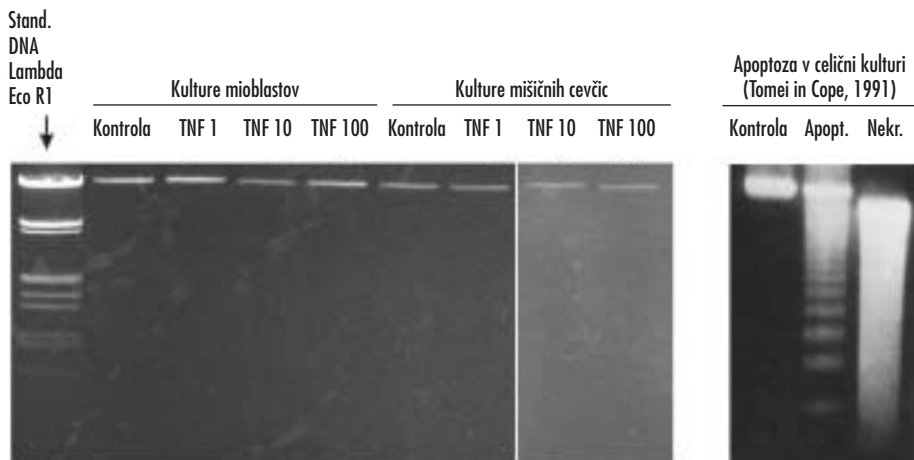
Encimska aktivnost LDH v supernatantih, testirana z metodo Vitros 950 v Urgentnem

laboratoriju Kliničnega centra v Ljubljani, je bila v več vzorcih pod mejo detekcije. Vrednosti v $\mu\text{kat/l}$ smo preračunali na $\mu\text{kat}/10^4$ jader. Na stopnji mioblastov je bila v kontrolnih vzorcih določena koncentracija $0,035 \pm 0,0003 \mu\text{kat}/10^4$ jader, v obdelanih pa $0,023 \pm 0,001 \mu\text{kat}/10^4$ jader pri TNF- α 1 ng/ml; $0,033 \pm 0,001 \mu\text{kat}/10^4$ jader pri TNF- α 10 ng/ml in $0,056 \pm 0,010 \mu\text{kat}/10^4$ jader pri TNF- α 100 ng/ml. Statistično značilen porast koncentracije LDH smo ugotovili le pri kulturi mioblastov, in sicer med kontrolno kulturo in kulturo, ki smo jo obdelali s TNF- α v koncentraciji 100 ng/ml (slika 4). Na stopnji mišičnih cevčic so bile povprečne koncentracije LDH v vseh kulturah sicer višje kot v kulturah mioblastov, vendar pa med kontrolnimi in obdelanimi kulturami mišičnih cevčic ni bilo statistično značilnih razlik (slika 4).

Ugotavljanje morebitne apoptoze po obdelavi s TNF- α

V sedANJI fazi raziskav smo ugotavljali apoptozo z metodo fragmentacije DNA. S postopkom elektroforeze celokupne DNA, ki smo jo izolirali iz vzorcev celic posameznih kultur, nismo potrdili za apoptozo značilnih fragmentov DNA. DNA je nefragmentirana ostala na startu tako v kontrolnih poskusih kot tudi v poskusih, kjer so bile kulture obdelane s TNF- α . Med vzorci mioblastov in vzorci mišičnih cevčic pri tem ni bilo razlik. Treba

72



Slika 5. Elektroforeza DNA iz mišičnih celic v kulturah. V nobenem vzorcu niso vidni fragmenti. Primer iz vira Tomei in Cope (31) kaže pozitivno kontrolo apoptotičnih celic.

pa je dodati, da nam iz še nepojasnjenih vzrokov ni uspel poizkus pozitivne kontrole, kjer smo apoptozo sprožili z dimetilsulfoksidom in staurosporinom. Na sliki 5 je za primerjavo prikazana pozitivna kontrola iz vira Tomei in Cope (31).

RAZPRAVLJANJE

V naših poskusih smo uporabili *in vitro* model človeške skeletne mišice. Ta model ima pred nekaterimi drugimi metodami in modeli vrsto prednosti. Tako npr. daje možnost natančnega uravnavanja in nadzorovanja poskusnih razmer in s tem natančno kontrolo celičnega okolja. Prednost je tudi fenotipska podobnost celic, sorazmerno nizka pa je tudi cena teh poskusov. Ne nazadnje ni potrebe po žrtvovanju in bolečem ravnanju s poskusnimi živalmi, ko pa gre za človeško mišico, pa je model *in vitro* sploh edini, ki za take poskuse pride v poštev.

Svoje učinke TNF- α proži prek dveh receptorjev: TNF-R1 in TNF-R2 (32). V tej nalogi smo ugotavljali zgolj prisotnost TNF-R2 v mišični kulturi, ker naj bi bil predvsem preko tega receptorja posredovan učinek TNF- α na prepisovanje genov prek aktivacije NF- κ B (33), kar naj bi v končni fazi vplivalo tudi na izločanje IL-6. Za delovanje TNF- α prek TNF-R1 so namreč verjetnejši proapoptotski učinki po signalni poti, ki naj bi prek vezave TRADD (angl. »TNF receptor – associated death domain« – TRADD) aktivirala kaspazo 8. Naši poskusi so potrdili prisotnost TNF-R2 v kontrolnih in obdelanih kulturah, iz česar lahko sklepamo, da so učinki TNF- α na izločanje IL-6, ki smo jih ugotovili v naših poskusih, posledica aktivacije TNF-R2, ne moremo pa izključiti možnosti, da je za del učinkov odgovorna tudi aktivacija TNF-R1.

Semikvantitativna analiza Western blot kaže na nekoliko povišano izražanje TNF-R2 v obdelanih v primerjavi s kontrolnimi kulturami, kar pa velja bolj za nižje koncentracije TNF- α in bolj za mioblaste kot za mišične cevčice, kjer je izražanje pri koncentraciji 100 ng/ml celo manjše kot v kontrolnih cevčicah. Povečano izražanje TNF-R2 pod vplivom TNF- α so ugotovili tudi Zhang in sodelavci (34) v kvantitativnih študijah indukcije citokinskih receptorjev na tkivu skeletnih mišic in v kul-

turi mišičnih cevčic glodalcev. Za TNF-R1 avtorji take indukcije niso ugotovili. Podoben rezultat so Kalthoff in sodelavci (35) dobili v človeških malignih epitelijskih celicah, kjer so ugotovili, da TNF- α poveča ekspresijo TNF-R2, ne pa tudi TNF-R1. Večja raven TNF-R2 v kontrolnih mišičnih cevčicah v primerjavi s kontrolnimi mioblasti je verjetno posledica na splošno drugačne ravni ekspresije genov na tej razvojni stopnji (2).

Odmerki TNF- α , ki smo jih uporabili v naših poskusih, so bili izbrani na osnovi poskusov, ki so jih objavili drugi avtorji (23, 34). V razmerah *in vivo* v primeru sepse so bile izmerjene plazemske koncentracije TNF- α v razredu nekaj ng/ml (36), bazalna raven TNF- α v plazmi pa je v razredu pikogramov (37).

Tudi količine IL-6, ki smo jih izmerili v naših poskusih, so primerljive z rezultati drugih študij. S testom ELISA so ugotovili konstitutivno izločanje IL-6 iz človeških mioblastov v kulturi, po obdelavi s TNF- α pa se je raven izločanja povečala (38), kombinacija TNF- α in IFN- γ pa je raven izločenega IL-6 povečala kar za osemkrat. Podobne študije na mišičnih cevčicah še niso bilo opravljene, zato primerjava z našimi rezultati ni možna.

Za preverjanje hipoteze, da je izločanje IL-6 odvisno od razvojne stopnje mišičnih celic, je bilo treba rezultate, izražene v pg/ml, za mioblaste in mišične cevčice preračunati na skupni imenovalc, ki ga v naših poskusih predstavlja število jeder. Sami podatki o koncentracijah (pg/ml) nam namreč ne podajo realnega razmerja med izločanjem IL-6 na stopnji mišičnih cevčic in izločanjem IL-6 na stopnji mioblastov, saj bi bile razlike lahko odsev večjega števila jeder in s tem genskih produktov v volumski enoti mišičnih cevčic, ne pa povečane sinteze ob posameznem jedru v mišičnem sinciciju, kar naj bi bil učinek TNF- α .

Primerjava izločanja IL-6 pod vplivom TNF- α med mioblasti in mišičnimi cevčicami nam je potrdila, da se obe razvojni stopnji razlikujeta v odzivih na določene signale okolja. O tem razpravljajo tudi drugi avtorji: Tako Mantegazza in sodelavci (39) menijo, da je stopnja diferenciacije mišičnih celic pomemben dejavnik pri sposobnosti mišičnih celic, da sintetizirajo molekule imunskega sistema,

kot so npr. citokini. Nekateri avtorji tudi menijo, da je TNF- α zmožen razlikovati med nediferenciranimi in diferenciranimi mišičnimi celicami in se na ta način usmerjeno vplesti v ekspresijo mišičnih beljakovin ob različnih stopnjah razvoja skeletne mišice (11, 40).

Aktivnost LDH, ki je v naši študiji služila kot pokazatelj morebitne poškodbe celičnih membran, ki bi nastala zaradi destruktivnega delovanja TNF- α v brezceličnih supernatantih, je bila majhna in v razredu 1 μ kat/l, v nekaterih vzorcih pa celo pod mejo detekcije, ki je pri naši metodi 0,85 μ kat/l. Rezultat kaže na to, da v prisotnosti TNF- α v naših poskusnih razmerah in v uporabljenih koncentracijah ni prišlo do poškodb membran mišičnih celic, kar bi v načelu prav tako lahko razložilo večje količine IL-6 in drugih molekul v supernatantu. Rahel dvig LDH v primerjavi s kontrolo je bil opazen le v kulturi mioblastov, ki smo jo obdelali z najvišjo koncentracijo (100 ng/ml) TNF- α , kjer pa izločanje IL-6 ni bilo statistično značilno zvečano glede na nižjo (10 ng/l) koncentracijo.

TNF- α bi lahko, poleg ugotovljenih učinkov, povzročil tudi apoptozo. Z našo metodo nismo uspeli dokazati fragmentacije DNA, značilne za apoptozo (31). Fragmentacije DNA nam ni uspelo pokazati niti v pozitivni kontroli, kjer smo mišične celice obdelali z DMSO in staurosporinom. Vzrok je lahko v izboru gela, ki ni omogočil ločitve 180–200 bp dolgih fragmentov, ki so značilni za apoptozo. Uporabljen 1 % agarozni gel namreč zadrži le fragmente, večje od 200 bp, manjših pa ne. V nadaljnjih študijah bi bilo za ugotavljanje apoptoze primerneje uporabiti metodo TUNEL (angl. »TdT-mediated dUTP nick end labeling«) in novejšo metodo, t. i. kometni test na minigelu (19). Po drugi strani pa naša ugotovitev ni presenetljiva, saj je znano, da se apoptotični učinek TNF- α izrazito dvigne

po daljši obdelavi (približno 48 ur), medtem ko po 24-urni obdelavi indukcije apoptoze včasih še ni mogoče zaznati (17).

ZAKLJUČKI

- Ugotovili smo, da TNF- α spodbuja izločanje IL-6 iz človeške skeletne mišice v kulturi in da je ta učinek odvisen od koncentracije dodanega TNF- α . V območju nižjih koncentracij TNF- α se ob zvišanju koncentracije jasno pokaže povečanje njegovih učinkov, v območju višjih koncentracij pa ta odvisnost ni več opazna.
- Potrdili smo tudi našo drugo hipotezo, saj smo ugotovili, da je izločanje IL-6 na stopnji mišičnih cevčic večje kot na stopnji mioblastov, to pa pomeni, da je povečan odgovor na TNF- α , ki se kaže kot povečano izločanje IL-6, del diferenciacijskega procesa skeletne mišice, ki se zgodi na stopnji fuzije.

ZAHVALA

Za natančno vodenje in branje te naloge se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Zoranu Grubiču in somentorju asist. dr. Tomažu Maršu z Inštituta za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. V veliko pomoč pri izvedbi naloge so mi bili dr. Matej Podbregar z intenzivnega oddelka Splošne bolnišnice v Celju, doc. dr. Branka Wraber z Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, doc. dr. Darko Černe z Urgentnega biokemičnega laboratorija Kliničnega centra v Ljubljani in asist. dr. Janez Breclj z Ortopedske klinike Kliničnega centra v Ljubljani. Da so mi bile ure v laboratoriju krajše in delo v veselje, gre zahvala Zvonki, Marku in Katarini.

LITERATURA

1. Gilbert SF. *Developmental biology*. 6th ed. Philadelphia: Sunderland-Sinauer Associates; 2000.
2. Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genetics* 2000; 57: 16–25.
3. Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1994. p. 97–114.
4. Miranda AF. Disease muscle in tissue culture. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology*. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1994. p. 1046–71.
5. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666–70.

6. Vozelj M. *Temelji imunologije*. Ljubljana: DZS; 2000. p. 239–59.
7. Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C769–74.
8. Abbas AK. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. ZDA: Elsevier Science; 2003. p. 243–74.
9. Illei GG, Lipsky P. Novel, non-antigen-specific therapeutic approaches to autoimmune/inflammatory diseases. *Curr Opin Immunol* 2000; 2: 712–8.
10. Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor-alpha in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF- α (-/-) and TNF- α (-/-)/LT (-/-) mice. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 989–1001.
11. Miller SC, Ito H, Blau HM, Torti FM. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2295–301.
12. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 166: 147–53.
13. Tracey KJ, Lowry SF, Beutler B, Cerami A, Albert JD, Shires GT. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. *J Exp Med* 1986; 164: 1368–73.
14. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 415–22.
15. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470–4.
16. Van Deventer SJ, Buller HR, Ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990; 76: 2520–6.
17. Foulstone EJ, Meadows KA, Holly JM, Stewart CE. Insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) inhibit C2 skeletal myoblast differentiation and enhance TNF- α -induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2001; 189: 207–15.
18. Libera LD, Zennaro R, Sandri M, Ambrosio GB, Vecovo G. Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am J Physiol* 1999; 277: C982–6.
19. Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996; 98: 2854–65.
20. Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, Carraro U. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 49–53.
21. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1022–32.
22. De Bleecker JL, Meire VI, Declercq W, Van Aken EH. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscular Disord* 1999; 9: 239–46.
23. Baron P, Galimberti D, Meda L, Scarpini E, Conti G, Cogiamanian F, Scarlato G. Production of IL-6 by human myoblasts stimulated with Abeta: relevance in pathogenesis of IBM. *Neurology* 2001; 57: 1561–5.
24. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002; 16: 1335–47.
25. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 1997; 499: 833–41.
26. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 2003; 446: 9–16.
27. Keller C, Steensberg A, Pilgaard H, et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 2001; 15: 2748–50.
28. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 1991; 285: 199–212.
29. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factor and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 1: 1529–37.
30. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB J* 2003; 17 (8): 884–6.
31. Tomei LD, Cope FO. Apoptosis: The molecular basis of cell death. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999. p. 21.
32. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002; 14: 477–92.
33. McFarlane SM, Pashmi G, Connell MC, et al. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett* 2002; 515: 119–26.
34. Zhang Y, Pilon G, Marette A, Baracos VE. Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E196–205.

35. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M, Thiele HG, Schmiegel W. Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993; 268: 2762-6.
36. Offner F, Philippe J, Vogelaers D, et al. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. *J Lab Clin Med* 1990; 116 (1): 100-5.
37. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, et al. Prognostic values of tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1, interferon-alpha, and interferon-gamma in the serum of patients with septic shock. *J Infect Dis* 1990; 161 (5): 982-7.
38. De Rossi M, Bernasconi P, Baggi F, de Waal Malefyt R, Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 2000; 12: 1329-35.
39. Mantegazza R, Hughes SM, Mitchell D, Travis M, Blau HM, Steinman L. Modulation of MHC class II antigen expression in human myoblasts after treatment with IFN-gamma. *Neurology* 1991; 41: 1128-32.
40. Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, Quiles MT, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Tumor necrosis factor- α exerts interleukin-6-dependent and - independent effects on cultured skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1542: 66-72.

Prispelo 15. 12. 2003