



IL-9 ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom

**Masteroppgave
av Ida Gregersen**

Avdeling for
ernæringsvitenskap

Institutt for medisinske
basalfag
Det medisinske fakultet
Universitetet i Oslo

IL-9 ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom

Masteroppgave

Ida Gregersen



Veiledere: Bente Halvorsen ved Institutt for
indremedisinsk forskning, UiO, OUS Rikshospitalet
og Kirsten B. Holven ved Avdeling for
ernæringsvitenskap, UiO

Avdeling for ernæringsvitenskap
Institutt for medisinske basalfag
Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

© Ida Gregersen

2011

IL-9 ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom

Ida Gregersen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: CopyCat

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført fra august 2010 til juni 2011 ved Institutt for indremedisinsk forskning, Oslo universitetssykehuset, Rikshospitalet. Det har vært en helt spesiell opplevelse å skrive masteroppgave – både på godt og vondt. Jeg har lært utrolig mye, både faglig og om meg selv. Jeg vil gi en stor takk til mine veiledere Bente Halvorsen og Kirsten B. Holven for å ha introdusert meg for dette spennende feltet og for god veiledning og hjelp. Takk for den inspirasjonen dere gir og det engasjementet dere viser. Tusen takk til alle på IIF ved Rikshospitalet for å ha tatt meg så godt i mot, svart på alle spørsmål og veiledet meg inn i lab-livet. Særlig takk til alle på ”Aterosklerosegruppa” for opplæring, hjelp og julekalender.

Tusen takk til alle mine kjære medstudenter - mastertiden hadde ikke vært den samme uten god stemning og skravling på lesesalen. Takk for kaffepauser, vaffelsteking, lunsjpauser, kakelunsjer og felles frustrasjon og latterkramper ☺ Spesielt takk til Siv Hilde for korrekturlesing, faglige diskusjoner og koselige samtaler over utallige måltider.

Takk til mamma, pappa, farmor, farfar, Einar og Elisiv for alltid å tro på meg og for at dere er så snille mot meg. Takk til Elisiv for lesing av korrektur og for å være reservemamma og hobbypsykolog. Veldig glad i dere alle sammen!

Tellef, tusen takk for at du er så tålmodig, for all støtte du gir og for alle morsomheter som får livet til å bli så mye bedre. Takk for alle middager som har stått klare etter lange skoledager, gode klemmer og oppmuntrende ord. Du er fantastisk!

Takk til alle mine flotte venninner som alltid heier på meg og for at vi alltid har det så gøy sammen. ”Venner er den familien man velger selv” – og dere vet hvem dere er.

Tusen takk til alle andre som på en eller annen måte har medvirket, vært i mitt nærvær i frustrerende perioder eller på annen måte har hatt innflytelse på dette resultatet – takk og beklager ☺ Nå er jeg endelig i havn!

Oslo, mai 2011
Ida Gregersen

Sammendrag

Kardiovaskulær sykdom forårsaket av aterosklerose er den hyppigste dødsårsaken i vestlige land, samtidig som forekomst og dødelighet også øker i resten av verden. Tross en nedgang de siste 40 årene er hjerte- og karsykdom, sammen med kreft, fortsatt hovedårsaken til mortalitet og morbiditet i Norge.

Det er nå godt dokumentert at aterosklerose er en inflammasjonsdrevet prosess, der både det medfødte og det adaptive immunforsvaret spiller en sentral rolle. Balansen mellom pro- og antiinflammatoriske cytokiner er sentralt for sykdomsprogresjon og utfall, men funksjonen til og betydningen av de ulike faktorene er ikke fullstendig kartlagt. Ettersom plakkstabilitet og kardiovaskulære hendelser er linket til grad av inflammasjon, er markører som reflekterer denne prosessen ønskelig. Økt kunnskap om cytokiner og andre medvirkende inflammatoriske signalstoffer vil bidra til forståelsen av sykdommens etiologi, samt til utvikling av eventuelle nye risikomarkører og behandlingsmuligheter.

Interleukin 9 (IL-9) er assosiert med patogenesen av astmatisk og allergisk sykdom, og er også assosiert med ulike kreftsykdommer og autoimmune tilstander. IL-9s rolle i aterosklerose er mindre utforsket, og betydningen i human hjerte- og karsykdom er uklar. Vi ønsket derfor å undersøke tilstedeværelse og regulering av IL-9 og interleukin 9-reseptor (IL-9R) ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom. IL-9 og IL-9R ble målt i biologiske prøver fra pasienter med carotid og koronar aterosklerotisk arteriesykdom, klassifisert etter tilstedeværelse av symptomer og plakkmorfologi, og sammenliknet med prøver fra friske kontroller. For å studere reguleringen av IL-9 nærmere undersøkte vi også nivåer av IL-9 i humane celler, samt effekten av IL-9 på frigjøring av pro- og antiaterogene cytokiner etter aktivering av humane peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Hovedresultatene fra denne studien viste at pasienter med asymptomatisk og symptomatisk carotisstenose har signifikant høyere plasmanivåer av IL-9 enn friske kontroller. Vi viste også at plakk fra carotisåren uttrykker genet for IL-9R, noe som ikke ble funnet i nyrearterie hentet fra friske kontroller. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene når vi sammenliknet med hensyn på plakkmorfologi. Vi fant imidlertid at pasienter med angina pectoris har signifikant høyere genuttrykk av IL-9R i CD3⁺-T-celler enn friske kontroller, og

vi så en ikke-signifikant tendens til høyere genuttrykk av IL-9R i CD3+-T-celler hentet fra pasienter med ustabil angina, sammenliknet med pasienter med stabil angina. Vi viste at stimulerte blodplater frigir IL-9, men vi kunne derimot ikke finne noen effekt av IL-9 på cytokinfrigjøring fra LPS- og PHA-stimulerte PBMC.

Vi konkluderer derfor med at IL-9 og IL-9R er til stede ved aterosklerotisk sykdom, men at effekten av IL-9 på humane immunceller og rollen i aterosklerosen fortsatt er ukjent.

Innholdsfortegnelse

Forkortelser og forklaringer	XII
1 Introduksjon	1
1.1 Aterosklerose og kardiovaskulær sykdom.....	1
1.1.1 Koronar aterosklerose	1
1.1.2 Carotid aterosklerose.....	2
1.1.3 Aterosklerose i andre arteriegrener	2
1.2 Risikofaktorer og risikoevaluering	2
1.2.1 Biomarkører for kardiovaskulær sykdom	4
1.3 Utvikling av aterosklerotiske plakk.....	6
1.3.1 Plakkstadier	7
1.3.2 Plakkstabilitet.....	8
1.4 Immunmekanismer i aterosklerose.....	8
1.4.1 Monocyttter og makrofager.....	9
1.4.2 T-celler	10
1.4.3 Cytokiner.....	11
1.5 Interleukin 9 (IL-9).....	14
1.5.1 IL-9-ekspresjon i murine modeller.....	14
1.5.2 IL-9-ekspresjon i humane celler.....	14
1.5.3 IL-9R	15
1.5.4 IL-9s målceller	16
1.5.5 Signaliseringsveier	17
1.5.6 Regulering av IL-9R.....	18
1.5.7 IL-9 i relasjon til sykdom	18
2 Mål og problemstillinger.....	21
3 Metode.....	22
3.1 Testpersoner.....	22
3.2 Isolering og stimulering av PBMC.....	23
3.2.1 Bakgrunn	23
3.2.2 Protokoll for isolering	24
3.2.3 Stimulering	25
3.3 Isolering og stimulering av blodplater.....	25

3.3.1	Bakgrunn	25
3.3.2	Protokoll	25
3.4	ELISA	26
3.4.1	Bakgrunn	26
3.4.2	ELISA for mål av IL-9	27
3.4.3	ELISA-protokoll for mål av MCP-1 og IL-8	28
3.5	Bio-Plex	29
3.5.1	Bakgrunn	29
3.5.2	Protokoll	30
3.6	Isolering av RNA	31
3.6.1	Bakgrunn	31
3.6.2	Protokoll	31
3.7	Syntese av cDNA	32
3.7.1	Bakgrunn	32
3.7.2	Protokoll	32
3.8	qPCR – Quantitive real time polymerase chain reaction	33
3.8.1	Bakgrunn	33
3.8.2	Protokoll	36
3.9	Statistisk analyse	37
3.9.1	Karakteristikk av testpersoner	37
3.9.2	Forsøksresultater	37
4	Resultater	38
4.1	Vevs- og celledistribusjon av IL-9 og IL-9R	38
4.2	IL-9 og IL-9R hos pasienter med klinisk aterosklerose	39
4.2.1	Karakteristikk av testpersoner	39
4.2.2	Sirkulerende IL-9 hos pasienter med carotisstenose	41
4.2.3	Genuttrykk av IL-9R i carotisplakk	44
4.2.4	Genuttrykk av IL-9R i T-celler fra pasienter med stabil og ustabil angina pectoris	46
4.3	Regulering av IL-9 i humane celler og effekt av IL-9 på cytokinfrigjøring	46
4.3.1	IL-9 i stimulerte blodplater	47
4.3.2	Effekt av IL-9 på produksjon av pro- og antiinflammatoriske cytokiner fra PBMC	48

5	Diskusjon.....	50
5.1	Diskusjon av metode	50
5.1.1	Testpersoner og referansegrupper	50
5.1.2	Antall og statistikk	50
5.1.3	Blodprøvetakning, lagring av prøver og celleisolering	51
5.1.4	Mål av cytokin-proteinkonsentrasjoner.....	52
5.1.5	Mål av cytokin-geneekspressjon	53
5.1.6	Mål av genuttrykk versus proteinnivå.....	54
5.1.7	Hva måler vi egentlig?	55
5.2	Diskusjon av resultater	55
5.2.1	IL-9 og IL-9R hos pasienter – en rolle i aterosklerosen?.....	55
5.2.2	IL-9 i humane celler	56
5.2.3	Effekt av IL-9	57
5.2.4	Hva har vi funnet?	58
6	Fremtidsperspektiv	60
6.1	Biomarkører for aterosklerotisk hjerte- og karsykdom	60
6.1.1	IL-9 – en fremtidig biomarkør?.....	60
6.1.2	Behandling av aterosklerotisk hjerte- og karsykdom – med fokus på inflammasjon.....	61
6.1.3	IL-9 som terapeutisk mål?.....	62
6.1.4	Videre arbeid	62
7	Konklusjon	64
	Litteraturliste	65
8	Vedlegg	77
8.1	Liste over materiell.....	77
8.2	Protokoll: <i>Human CCL2/MCP-1 DuoSet kit</i> (R&D Systems, katalognr. DY279).....	82
8.3	Protokoll: <i>Human CXCL8/IL-8 DuoSet kit</i> (R&D Systems, katalognr. DY208)	85

Figurer

Figur 1. Ultralydbilde av høyekkoget og lavekkogent carotisplakk.....	6
Figur 2. Den cellulære sammensetningen av det aterosklerotiske plaket.....	7
Figur 3. IL-9s hovedfunksjoner i murine målceller.	17
Figur 4. IL-9R og IL-9-signalveier.....	17
Figur 5A. En Ficoll-Hypaque-gradient. 5B. En Ficoll-Hypaque-gradient i en faktisk celleprepareringstube.	24
Figur 6. Standard dobbel-antistoff sandwich-ELISA-reaksjon.	27
Figur 7. Bio-plex-reaksjon: Kompleks av mikrokule, antistoff, cytokin, sekundært antistoff og substrat.	30
Figur 8. PCR-temperatursyklus.....	34
Figur 9. PCR-responskurver.....	35
Figur 10. TaqMan-assay-reaksjon.....	36
Figur 11. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos friske kontrollere, pasienter med asymptomatisk og symptomatisk carotisstenose.....	42
Figur 12. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos kontrollere og pasienter med carotisstenose klassifisert etter måneder siden siste kliniske symptom.....	43
Figur 13. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos friske kontrollere og hos pasienter med lavekkogene og høyekkogete plakk.	44
Figur 14. Gennuttrykk av IL-9R i carotisplakk hos pasienter med asymptomatisk og symptomatisk tilstand, og lavekkogene og høyekkogete plakk.	45
Figur 15. Gennuttrykk av IL-9R i carotisplakk fra pasienter klassifisert etter måneder siden siste kliniske symptom	45
Figur 16. Gennuttrykk av IL-9R i CD3+T-celler fra kontrollere, pasienter med stabil og ustabil angina.	46
Figur 17. Frigjøring av IL-9 (pg/ml) fra ustimulerte blodplater og blodplater stimulert med 7,5, 10 eller 100 µM SFLLRN alene og i kombinasjon med 1 mM ASA	47
Figur 18. Frigjøring av IL-9 (pg/ml) fra ustimulerte blodplater, blodplater stimulert med 7,5 µM SFLLRN og 100 µM SFLLRN.....	48
Figur 19. Proteinkonsentrasjoner av MCP-1, IL-8, IL-10, IFN-γ og IP-10 i PBMC stimulert med IL-9 (10 ng/ml), LPS (5 ng/ml), LPS+IL-9, PHA (20 ng/ml) eller PHA+IL-9.	49
Figur 20. Oppsummering av hovedfunnene.....	58
Figur 21. Potensielle strategiske mål for modifisering av interleukin-aktivitet for behandling av aterosklerose.	62

Tabeller

Tabell 1. IL-9- og IL-9R-genekspresjon ved screening av celler og vev sentralt i den aterosklerotiske prosessen.	38
Tabell 2. Karakteristikk av carotisstenose-populasjon.	40
Tabell 3. Karakteristikk av angina-populasjon.	41

Forkortelser og forklaringer

AD	assay diluent, buffer til fortynning
Apo (a)	apolipoprotein a (“lille-a”)
Apo E	apolipoprotein E
ASA	acetylsalisylsyre
B-celle	benmarg-lymfocytt, antigenpresenterende celle i det humorale immunforsvaret
CC	kjemokiner, betegnelse på kjemokin-familien og på en av kjemokin-familiens undergrupper
CD	cluster of differentiation, overflatemolekyl på hvite blodceller, brukes som identitetsmarkører
CD3/4/8 +	cluster of differentiation 3/4/8-positive
cDNA	complementary (komplementær) deoksyribonukleinsyre
CRP	C-reaktivt protein
Ct	cycle threshold, syklusterskel
DNA	deoksyribonukleinsyre
DNase	deoksyribonuklease
dNTP	deoksyribonukleotid trifosfat
ECM	ekstracellulær matriks
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	gravitasjon
GMC	glattmuskelcelle
H ₂ O ₂	hydrogenperoksid
H ₂ SO ₄	svovelsyre
HDL	high density lipoprotein
hIL-9R	human interleukin 9-reseptor
HRP	horseradish-peroxidase, peroksidase fra pepperrot
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells, humane endotelceller isolert fra navlestreng
IFN	interferon
IFN- γ	interferon gamma
Ig E,G	immunoglobulin E,G

IL	interleukin
IL-1,-2,-9 osv.	interleukin 1, 2, 9 osv.
IL-2R	interleukin 2-reseptor
IL-9R	interleukin 9-reseptor
IP-10	interferon γ -inducible protein 10
IRF-4	interferon regulatory factor 4
IRS-PI3	insulin receptor substrate-1 phosphatidylinositol 3
JAK	janus kinase
KHS	koronar hjertesykdom
KMI	kroppsmasseindeks, kg/m^2
KO	knock out
KVS	kardiovaskulær sykdom
LDL	low density lipoprotein
LDLr	low density lipoprotein receptor
LPS	lipopolysakkarid
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MHC-II	major histocompatibility complex II
MI	myokardialt infarkt
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid, budbringer ribonukleinsyre
N	normalitet
NaCl	natriumklorid
ng	nanogram
nm	nanometer
NK-celle	natural killer celle
OD	optical density
OUS	Oslo universitetssykehus
PBMC	peripheral blood mononuclear cell, mononukleære celler fra perifert blod
PBS	phosphate buffered saline
pg	picogram

PHA	phytohaemagglutinin
PRP	platerikt plasma
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RA	reumatoid artritt
RIN	RNA integrity number, betegner RNA-kvalitet
RNA	ribonukleinsyre
RNase	ribonuklease
rpm	revolutions per minute, omdreiningstall
rRNA	ribosomal ribonukleinsyre
RT	revers transkriptase
SCORE	systemic coronary risk evaluation
SD	standard deviation, standardavvik
SEM	standard error of the mean, standardfeilen til gjennomsnittet
SFLLRN	thrombin receptor activation peptide, trombinagonist-peptid
STAT	signal transducers and activators of transcription
Taq	thermus aquaticus
T-celle	tymus-celle, lymfocytt i det cellemedierte immunforsvaret
TGF- β	transforming growth factor beta
Th1,-2,-9,-17-celle	T-hjelpecelle type 1,2,9,17
TMB	tetrametylbenzidin
TNF	tumornekrosefaktor
Treg	T-regulatorisk celle
μ g	mikrogram
μ l	mikroliter
μ M	mikromolar

1 Introduksjon

1.1 Aterosklerose og kardiovaskulær sykdom

Komplikasjoner fra aterosklerose er den hyppigste dødsårsaken i vestlige land [1, 2] og iskemisk hjertesykdom forventes å være den fremste sykdomsbyrden på verdensbasis innen 2020 [3]. I USA har kardiovaskulær sykdom (KVS) vært den ledende dødsårsaken hvert år fra 1900 og frem til i dag, kun med unntak av 1918. Sykdomsgruppen koster landet mer enn noen annen [4]. I Norge har det, som i de fleste andre europeiske land, vært en positiv epidemiologisk utviklingen for hjerte- og karsykdom de siste årene. Siden 70-tallet har vi hatt en halvering av dødsfall som følge av iskemisk hjertesykdom og plutselig død [5]. Det har også vært en sterk nedgang i dødelighet fra slag, både internasjonalt og nasjonalt [6, 7]. På tross av dette er hjerte- og karsykdom fremdeles, sammen med kreft, hovedårsaken til sykdom og død i Norge. I 2008 skyldtes 34 % av dødsfallene i landet iskemisk hjertesykdom, hjerneslag og andre sykdommer i blodårene [8, 9].

1.1.1 Koronar aterosklerose

Aterosklerotiske plakk i koronare arterier gir en kronisk tilstand med stabile og ustabile perioder. Ustabile perioder kan karakteriseres ved angina pectoris eller myokardialt infarkt (MI) [10]. Angina pectoris er definert som ”smerter i brystet grunnet mangel på myokardialt oksygen” og skyldes økt myokardialt oksygenbehov eller redusert tilførsel. Stabil angina refererer til ”forutsigbare brystmerter under fysisk aktivitet som blir borte ved hvile eller administrasjon av nitroglyserin”. Ustabil angina beskriver en akutt iskemisk hendelse og omfatter nyoppdagede brystmerter, angina ved hvile, angina etter MI og akselererende mønster av tidligere stabil angina [11]. Ustabil angina skyldes som oftest koronare plakk som går gjennom gjentatte faser med ødeleggelse og reparasjon [12]. MI, eller hjerteinfarkt, betegner celledød i hjertemuskelen grunnet ubalanse i behov og tilførsel av oksygen. Det kan forekomme gjentatte ganger hos en pasient med etablert sykdom, eller være første indikasjon på koronar aterosklerose. Alvorligheten av et infarkt varierer fra små uoppdagede infarkt til akutte, alvorlige og dødelige [10].

1.1.2 Carotid aterosklerose

Hjerneinfarkt utgjør ca. 85 % av hjerneslagene, og det er estimert at omtrent halvparten av disse skyldes arterie-til-arterie-embolisme fra aterosklerotiske plakk i aorta, precerebrale eller interkraniale arterier. Omtrent 25 % av dem er lakunære infarkt som skyldes tilstopping av små, penetrerende arterier. Carotisplakk kan være asymptomatiske i en årrekke, og hjerneinfarkt er ofte første kliniske manifestasjon [13]. I en studie av 5000 kvinner og menn ble aterosklerose i store hjernearterier klassifisert som nest fremste årsaken til hjerneslag, etter kardioembolisme, men som den fremste årsaken blant middelaldrene pasienter fra 40 til 75 år [14].

1.1.3 Aterosklerose i andre arteriegrener

Dersom aterosklerose forekommer i andre arteriegrener kan dette, avhengig av hvilke årer som rammes, gi skade på nyrer, hypertensjon, abdominale aorta-aneurismer og iskemi i underekstremiteter [15]. Pasienter med symptomatisk trombose i én vaskulær seng har økt risiko for hendelse i en annen [16]. Det er godt kjent at carotisstenose (>70 %) gir vesentlig økning for residivslag og for vaskulære hendelser utenfor hjernen [13, 17]. Det er mindre kjent at aterosklerotiske plakk i aorta er assosiert med hjerneinfarkt. Plakk i aorta ser ut til å være en sterk, uavhengig risikofaktor for slag [18].

1.2 Risikofaktorer og risikoevaluering

Grundig epidemiologisk forskning har etablert røyking [19], hyperlipidemi [20], hypertensjon [21] og diabetes [22] som de fire ”tradisjonelle” risikofaktorene for utvikling av koronar hjertesykdom (KHS). De siste 30 års nedgang i antall dødsfall grunnet kardiovaskulære hendelser kan i stor grad skyldes redusert røyking, en bedre blodlipidprofil grunnet en sunnere fettfordeling i kosten [5, 23], samt bedre medisinske behandlingsmetoder [24]. Verdens største internasjonale epidemiologiske studie, “WHO MONICA (MONItoring trends and determinants in Cardiovascular disease) Project” samlet fra midten av 80- til midten av 90-tallet inn data for risikofaktorer og forekomsten av koronar hjertesykdom i 38 populasjoner fra 22 land. Forandringer i tradisjonelle risikofaktorer forklarte 46 % av nedgangen i koronare hendelser hos menn og 19 % hos kvinner [25]. Kvaliteten på den medisinske behandlingen ble assosiert både med nedgangen i koronare hendelser og med nedgangen i dødelighet. Hele

72 % av nedgangen i dødelighet hos menn, og 56 % hos kvinner, kunne forklares med bruken av moderne, dokumentert medisinsk og kirurgisk behandling [24].

Det har imidlertid vært en skjev utvikling i betydningen av de ulike risikofaktorene. I sterk kontrast til røyking og fettprofil, har kroppsmasseindeksen (KMI) i den norske befolkningen hatt en helsemessig negativ utvikling. Nordmenns vekt har økt siden 60-tallet for menn og siden 70-tallet for kvinner. Andelen overvektige, definert som $KMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$, var på slutten av 90-tallet 15 % blant menn og 12,5 % blant kvinner [26, 27]. Ut fra undersøkelser gjort i fem fylker på starten av 2000-tallet ser man at over halvparten av norske menn har overvekt ($KMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) eller fedme ($KMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$) [26, 28]. Det samme gjelder kvinner, med unntak av 30-åringene, der andelen er litt lavere [28]. Overvekt har økt i alle deler av samfunnet, hos kvinner og menn, unge og gamle, og på tvers av utdanning, fysisk aktivitet og røykestatus [27]. Det har også vært en økende forekomst av insulinresistens og diabetes [29], som sammen med hypertensjon og overvekt er del av det ”metabolske syndromet” [30]. Hvorfor denne utviklingen ennå ikke har påvirket hyppigheten av KVS, er uklart. En forklaring kan være at risikoreduksjonen knyttet til redusert kolesterolnivå og røyking er større enn risikøkningen knyttet til økt forekomst av overvekt og metabolsk syndrom. Det kan også skyldes at utvikling av det metabolske syndrom må manifesteres i sykdom i flere år før det gir en risikøkning. Begrenset effekt grunnet medikamentell bruk er en annen faktor som kan påvirke denne sammenhengen [31].

Ved evaluering av total risiko for utvikling av koronar og carotid sykdom, er det viktig å merke seg diskusjonen rundt den faktiske betydningen av de tradisjonelle risikofaktorene. Det er estimert i flere studier at over 50 % av pasienter med KHS mangler én eller flere av disse [32, 33]. Khot og medarbeidere analyserte data fra over 120 000 pasienter som deltok i 14 internasjonale studier, og så at dette gjaldt mellom 10 og 20 % [34]. Andre har estimert at de tradisjonelle risikofaktorene kan forklare omtrent 75 % av koronare hendelser i en populasjon [35].

Flere av metodene for å estimere kardiovaskulær risiko tar utgangspunkt i de tradisjonelle risikofaktorene, og disse metodene er dermed også verdt å vurdere. Flere studier har eksempelvis sett en overestimert risiko for KVS ved bruk av Framingham scoringssystem [36, 37]. Dette førte til utvikling av SCORE-systemet (Systemic COronary Risk Evaluation) som estimerer ti års risiko for fatal KVS i høy- og lavrisikoregioner i Europa. Skjemaene tar utgangspunkt i enten totalkolesterol eller total/high density lipoprotein (HDL)-kolesterol-

ratio. Røyking, blodtrykk og kjønn benyttes i tillegg i utregningen [38]. Høyrisikoevalueringen ut fra dette systemet er imidlertid sett å overestimere død fra KVS hos norske menn og kvinner, noe som viser tydelige behov for nasjonale tilpasninger [39]. Det er derfor utviklet en modell for estimering av kardiovaskulær risiko basert på norske data, NORRISK, som passer bedre til norske forhold [40].

Selv om regionale og nasjonale tilpasninger er gjort, bør også nye risikomarkører som reflekterer viktige patologiske prosesser være en del av risikoevalueringen. Dette bør være faktorer som kan si noe om utviklingsstadiet av aterosklerosen og plakkstabiliteten. Det er også viktig å etablere nye metoder for å oppdage disse, noe som vil bidra til å fange opp et bredere spekter av dem i risiko for utvikling av KHS [41]. Å fortsatt ha et stort fokus på de tradisjonelle risikofaktorene er imidlertid viktig for å kunne redusere denne epidemien [34].

1.2.1 Biomarkører for kardiovaskulær sykdom

Serummarkører og non-invasive tester er eksempler på verktøy som kan benyttes til å identifisere og monitorere aterosklerose hos asymptotiske personer. Ved å bruke dem som supplement til eksempelvis Framingham, SCORE- eller NORRISK-systemet vil man kunne identifisere personer også i moderat risiko [42, 43].

Serummarkører

Lipider og lipoproteinfraksjoner som små, tette low density lipoprotein (LDL)-partikler, apolipoprotein (Apo) A1 og B, HDL-subfraksjoner og Apo (a) er sett i sammenheng med vaskulær sykdom og er også benyttet i klinisk praksis for estimering av risiko [44, 45].

Inflammasjon er en viktig trigger av plakkruptur og akutte vaskulære hendelser, og inflammasjonsmarkører kan derfor være viktig for å predikere plakkstabilitet og kardiovaskulær risiko [45]. De viktigste akutfaseproteinene hos mennesker er serum amyloid A (SAA) og C-reaktivt protein (CRP). De forekommer vanligvis i svært lave konsentrasjoner i blodet og øker dramatisk ved inflammasjon. Andre systemiske endringer som feber, hyperkortisolemi og hypoferreemi oppstår for å danne et miljø bedre rustet for å takle vevsskade eller infeksjon [46]. CRP er nokså nøye studert som markør for hjerte- og karsykdom [43]. CRP produseres hovedsakelig i leverceller i respons til cytokiner som interleukin (IL)-6 og tumornekrosefaktor (TNF)- α (mer om cytokiner i avsnitt 1.4.3). Den

fysiologiske rollen til CRP er ikke fullstendig forstått, men en av hovedfunksjonene er trolig at CRP kan gjenkjenne patogener og nekrotiske celler, og på den måten bidra til å aktivere immunresponsen [46, 47]. Klinisk brukes CRP som en uspesifikk markør for vevsskade og inflammasjon [47], men flere studier har vist at såkalt "high-sensitivity" CRP (hs-CRP) kan brukes som uavhengig prediktor for kardiovaskulære hendelser [48]. I tillegg er plasma-CRP vist å kunne diskriminere mellom stabil og ustabil koronar arteriesykdom ettersom konsentrasjonen er signifikant høyere ved ustabil tilstand [49]. I "Reykjavik-studien" viste CRP seg derimot moderat som prediktor for KHS [50]. Lund Håheim og medarbeidere viste i en tverrsnittstudie av over 5000 menn i alderen 48-77 år at CRP-nivåer ikke bare var forhøyet hos de som hadde gjennomgått hjerteinfarkt, men også hos dem med astma, diabetes, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS), osteoporose, fibromyalgi og andre kroniske lidelser [51]. At CRP viser manglende evne til å skille mellom ulike tilstander, reduserer funksjonen som screeningverktøy betydelig.

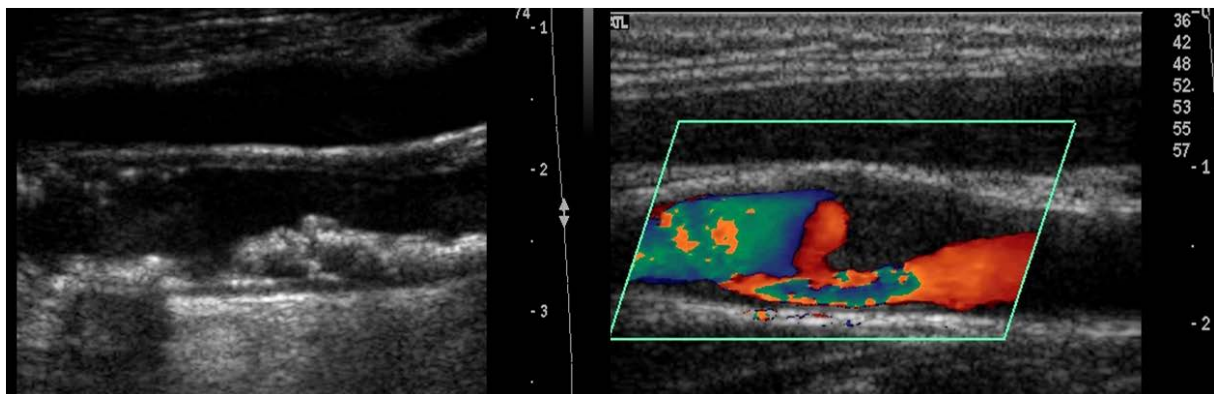
I tillegg til CRP har flere cytokiner vært studert som mulige inflammasjonsmarkører for KVS og studier har vist forskjeller i cytokinuttrykk mellom stabile og ustabile carotisplakk [45]. Som CRP, er IL-6 også vist å kunne predikere kardiovaskulære komplikasjoner hos pasienter med moderat risiko [52]. IL-18 er sett assosiert med ustabile carotisplakk og plakkstabilitet [53], og serumnivåer av IL-18 har også vist seg som mulig prognostisk faktor for fremtidige koronare hendelser hos friske [54]. IL-18 er imidlertid ikke sett å ha en slik prediktiv verdi for personer med moderat risiko [52]. Myeloperoxidase (MPO), pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) og det antiinflammatoriske cytokinet transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) er også sett i sammenheng med risikoevaluering, men også disse med varierende resultater [45].

En annen sentral serummarkør er homocystein. Forhøyede nivåer er sett å korrelere med KVS i epidemiologiske studier, men prospektive studier har vist varierende resultater [55]. Screening av "normale" populasjoner er derfor ikke anbefalt, men testing bør vurderes på hjertepasienter uten kjente risikofaktorer og asymptomatiske personer med prematur hjertesykdom i familien [56]. Serum homocystein kan reduseres ved tilskudd av folsyre og vitamin B12 [57], men de norske studiene "The Norwegian Vitamin Trial" (NORVIT) og "Western Norway B-Vitamin Intervention Trial" (WENBIT) har vist at slike tilskudd ikke ga redusert risiko for sekundære kardiovaskulære hendelser. De så derimot en mulig skadelig effekt av tilskuddene [58, 59].

Det er viktig å merke seg at mange av biomarkørene som er studert, kun er testet ut på koronar eller carotid arteriesykdom. Selv om det er store likheter, kan patofysiologiske mekanismer ved slag og MI, og ved carotid og koronar plakkdannelse, som nevnt være ulike. Det kan derfor være behov for arterie- og sykdomsspesifikke biomarkører [45].

Ultralydundersøkelse av plakkmorfologi

Ultralydundersøkelse er en velegnet non-invasiv metode for å undersøke plakkmorfologi *in vivo* og brukes både i studiesammenheng og i klinikken (for detaljer om plakkmorfologi se avsnitt 1.3.2). Metoden er basert på ultralydbølger som sendes inn i vevet der en del av dem blir absorbert, mens noen reflekteres tilbake. Den reflekterte ultralyden – ekkot – blir tolket av en datamaskin. Plakk som reflekterer lite ultralyd, kalles lavekkogene plakk, mens plakk som reflekterer mye ultralyd, kalles høyekkgogene, som vist i figur 1 [60]. Lavekkogene plakk har høyt lipidinnhold, mens høyekkgogene plakk typisk består av tett, fibrøst bindevev og kalk [61]. Personer med carotisstenose forårsaket av lavekkogene plakk har høyere risiko for hjerneslag enn personer med høyekkgogene plakk, uavhengig av stenosegrad og andre risikofaktorer [62, 63].

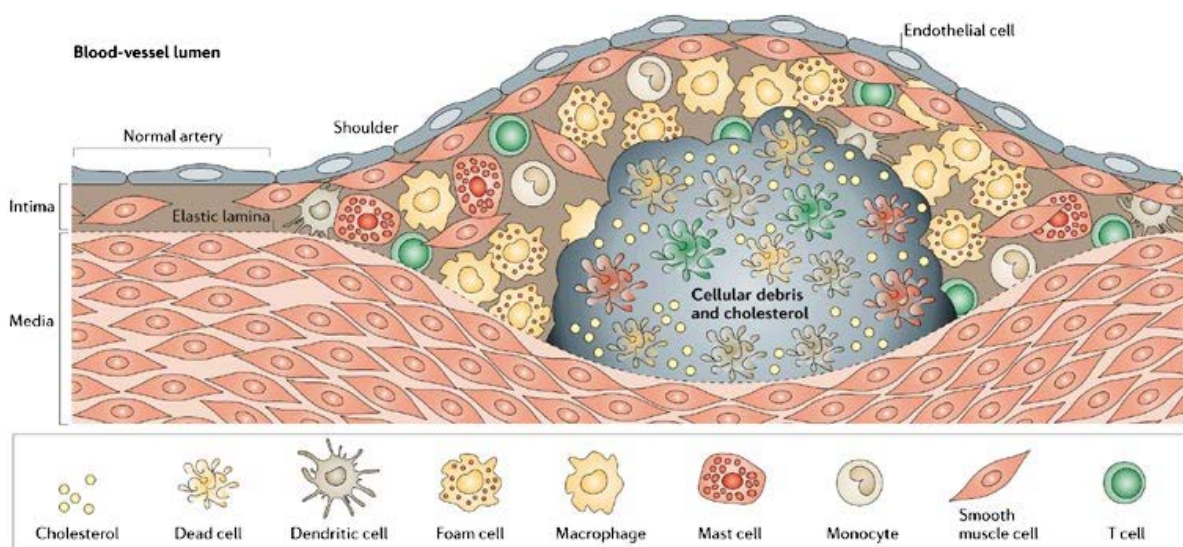


Figur 1. Ultralydbilde til venstre av høyekkgent carotisplakk, og til høyre, lavekkogen carotisplakk. Det høyekkgogene plaket er lyst og kalkholdig, mens det lavekkogene plaket har høyt lipidinnhold og vises mørkt på bildet. (Mona Skjelland, MD, overlege, OUS Rikshospitalet)

1.3 Utvikling av aterosklerotiske plakk

Hos mennesker er det aterosklerotiske plaket bestående av immunceller, vaskulære endotelceller, glattmuskelceller (GMC), ekstracellulær matriks (ECM), lipider og acellulære fettresten. Disse foreligger typisk som en fortykning av intima (figur 2) [15]. Aterosklerose kan utvikle seg i respons til endotelskade forårsaket av ulike stimuleringer som diabetes mellitus,

hypertensjon og dyslipidemi; den såkalte ”respons to injury”-hypotesen. Hypotesen ble først foreslått av Ross & Glomset i 1973 [64] og senere revidert av Ross i 1986 [65]. Hypotesen peker på at skadet endotel blir dysfunksjonelt og addherer monocytter, makrofager og T-celler. Disse kan migrere inn i intima der makrofagene akkumulerer lipider og danner skumceller som utgjør såkalte fettstreker – starten på et aterosklerotisk plakk. Frigjøring av ulike vekstfaktorer og cytokiner av immuncellene i plakket fører til progresjon av den aterosklerotiske lesjonen. Hypotesen peker også på vekstfaktorer, cytokiner og optimalisering av den inflammatoriske responsen som mål for forebygging og behandling av aterosklerotisk sykdom [66].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Figur 2. Den cellulære sammensetningen av det aterosklerotiske plakket. Plakket har en kjerne som består av lipider og rester fra døde celler. Over denne ligger en stabiliserende fibrøs kappe som består av glattmuskelceller og kollagenfibre. Plakket er fylt av immunceller som makrofager, T-celler og mastceller. Disse produserer cytokiner, proteaser, protrombotiske molekyler og vasoaktive substanser som alle påvirker plakkinflamasjon og vaskulær funksjon. Frem til en eventuell komplikasjon oppstår, er plakket dekket av et intakt endotellag. [15]

1.3.1 Plakkstadier

Forløperne for avanserte aterosklerotiske lesjoner, såkalte fettstreker, deles inn i tre morfologisk forskjellige typer. Type I- og II-lesjoner har små lipiddepoter i intima, mens type III-lesjoner markerer overgangen fra en type II-lesjon til et avansert plakk. Hvert stadium kan stabiliseres midlertidig eller permanent, og utvikling til neste stadium krever stimulering [67].

Avanserte plakk kan også deles inn i tre undergrupper: type IV-, V-, og VI-lesjoner. En type IV-lesjon, også kalt et aterom, består av en lipidkerne uten fibrøs kappe. Lipidkjernen er

videreutviklet fra de små lipiddepotene i type III-plakket. Ruptur eller trombosedannelse forekommer ikke, og lumen er sjelden betydelig redusert. Når lipidkjernen gradvis dekkes av fibrøst vev, først og fremst kollagen, er dette overgangen til en type V-lesjon. Type V- og VI-lesjoner er såkalt fibrøse. Morbiditet og mortalitet som følge av aterosklerose er først og fremst knyttet til IV- og V-lesjoner der overflaten ødelegges og hematom, blødning eller trombose oppstår. Lesjoner med en av disse egenskapene kalles en type VI-lesjon, eller en komplisert lesjon [68].

1.3.2 Plakkstabilitet

Initieringsfase, fart på utviklingen og fenotypisk uttrykk av aterosklerotiske plakk er arterie- og tilstandsspesifikt [16, 69]. Stabil angina er assosiert med glatte, fibrøse koronararterieplakk, mens akutt koronar arteriesykdom er assosiert med irregulære eller rupterte plakk. Ved MI kan små lesjoner danne store tromboser som fører til et infarkt, mens i carotis kan man ofte ha små til middels lesjoner uten symptomer og store lesjoner med kun små tromboser. Her kan imidlertid mikroembolier som dannes i overflaten av plakket, gi infarkter. Koronare plakk er fibrotiske og stabile, mens carotisarterier med høy stenose ofte er såraktige, inflammatoriske, har stor lipidkerne, blødninger inne i plakket og er ustabile. Carotide plakk oppstår ved en mye senere alder enn koronare, noe som tyder på en mulig beskyttende mekanisme for carotisårene [16]. Plakkmorfologi hos pasienter med høye grader av ustabil angina likner plakk hos pasienter med MI. Plakk hos pasienter med lavere grad av ustabil angina likner plakk hos pasienter med stabil angina [70]. Molekylære prosesser som lipidakkumulering, apoptose, proteolyse, trombose, angiogenese og inflammasjon er nøye relatert til plakkets sårbarhet og dermed også til alvorlige vaskulære hendelser [45]. Terapeutisk mål ved aterosklerotisk sykdom er derfor flyttet fra utvidelse av lumen til patofysiologiske mekanismer og plakkstabilisering [71, 72].

1.4 Immunmekanismer i aterosklerose

Det er mange kjente sammenhenger mellom systemisk inflammasjon og inflammasjon i koronare og carotide kar. Et eksempel er pasienter med reumatoid artritt (RA) som er preget av en systemisk inflammasjon, vist med forhøyet serum CRP. Pasienter med denne og andre bindevevssykdommer har høyere risiko for utvikling av KVS [73]. Slik korrelasjon ses også ved mer vanlige tilstander. Vintermånedene er høysesong for forekomst av hjerteinfarkt og

hjerneslag, når frekvensen av øvre luftveisinfectionsjoner og influensa også er høyere [47]. En stor epidemiologisk studie av Smeeth og medarbeidere viste at akutt infeksjon i øvre luftveier gir omtrent fem ganger økt risiko for hjerteinfarkt og tre ganger høyere risiko for hjerneslag de første tre dagene. Deretter avtar risikoen gradvis [74]. Selv om noen studier har vist risikoreduksjon for koronare hendelser etter vaksine mot influensa, foreligger det ingen randomisert studie av tilfredsstillende størrelse som viser denne effekten [47]. *American Heart Association* anbefaler influensavaksine til alle pasienter med koronar hjertesykdom [75], mens *European Society of Cardiology* begrenser anbefalingene til pasienter med symptomatisk hjertesvikt [76].

I tillegg til den systemiske inflammasjonen er lokal inflammasjon sentralt for utvikling av aterosklerose og vaskulære hendelser. Det er nå klare bevis for at inflammasjon er en nøkkelprosess som linker flere av de kjente risikofaktorene for aterosklerose sammen og bidrar i hele den aterosklerotiske utviklingen. Den inflammatoriske responsen i aterosklerose involverer elementer både fra det medfødte og det adaptive immunforsvaret som både kan virke positivt og negativt på den aterosklerotiske prosessen [77]. Humane plakk er vist å inneholde flere ulike grupper av immunceller. Makrofager og monocytter er uttrykt i hele plakket, men spesielt i lipidkjernen der de er vist å utgjøre ca. 60 % av cellene. Cluster of differentiation 3-positive (CD3+) T-celler er akkumulert i den fibrøse kappen der om lag 20 % av cellene er av denne typen [78].

At immunmekanismer spiller en sentral rolle i aterosklerose, er ikke lenger kontroversielt, men de patologiske konsekvensene samt enkeltkomponentenes rolle og betydning er ikke fullstendig forstått [71].

1.4.1 Monocytter og makrofager

Monocyttraktering er anerkjent som en tidlig prosess i plakkdannelse. Flere inflammatoriske mediatorer som monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) bidrar til at monocytterne trekkes inn i intima der de modner til makrofager og multipliseres. Som nevnt adherer sirkulerende leukocytter dårlig til normalt endotel, men når endotelet er inflammet, uttrykker det adhesjonsmolekyler som binder leukocytterne. Kjemokiner uttrykt i ateromet gir en kjemotaksisk stimuli som gjør at leukocytterne migrerer inn i intima. Det finnes også holdepunkter for at denne monocytt-influksen ikke bare finner sted i startfasen av plakkdannelsen, men også i etablerte plakk. Makrofagene i plakket tar opp oksidert LDL ved

hjelp av scavenger-reseptorer. Dette gir dannelse av fettstreker som stimulerer til migrasjon av glattmuskelceller inn i intima. I tillegg frigir makrofagene proinflammatoriske cytokiner og vekstfaktorer som øker og opprettholder det proinflammatoriske miljøet i plakket [77, 79, 80].

1.4.2 T-celler

Immunceller fra det adaptive immunforsvaret har også en nøkkelregulatorisk rolle i utviklingen av aterosklerotiske plakk [77]. T-celler spiller en avgjørende rolle i organiseringen av denne delen av kroppens forsvar, og denne funksjonen utøver de i hovedsak gjennom sekresjon av cytokiner og kjemokiner, som aktiverer og rekrutterer andre celler [81]. T-celler er alltid til stede i en aterosklerotisk lesjon, og størstedelen er CD4+T-celler som gjenkjenner antigener i major histocompatibility complex (MHC)-II på antigenpresenterende celler [78, 82]. CD4+T-celler eller T-hjelpeceller (Th) deles inn i undergrupper ut fra hvilke cytokiner de sekreterer og deres funksjoner. T-hjelpecelle type 1 (Th1) bidrar til intracellulær fjerning av virus og bakterier, og forsterker vanligvis proinflammatoriske responser ved å sekretere cytokiner som interferon gamma (IFN- γ), lymfotoksin α og IL-2. Hos mennesker er Th1-celler viktige i beskyttelse mot myobakterielle infeksjoner, samt utvikling av noen typer autoimmune sykdommer [81], i tillegg til at de ser ut til å forverre den aterosklerotiske prosessen [77, 83, 84]. T-hjelpecelle type 2 (Th2) er viktig i forsvaret mot parasitter, og deltar både i utvikling av og i beskyttelse mot allergi og astma. De sekreterer blant annet IL-4 og IL-5 og bidrar i fjerning av cellulære patogener [81, 85]. T-hjelpecelle type 17 (Th17)-celler bidrar i beskyttelsen mot sopp og ekstracellulære bakterier og produserer cytokiner som IL-17, IL-6 og IL-8 [81, 86]. De er også ansvarlige for, eller deltakende i, utviklingen av mange autoimmune sykdommer [86]. T-regulatoriske celler (Tregs) er nødvendig for utvikling av selvtoleeranse og for regulering av immunrespons [87]. Å øke antallet av Tregs eller fremme deres immunosuppressive funksjon kan være fordelaktig for å hindre utvikling av autoimmun sykdom. På den andre siden kan mangel eller hemmet funksjon av disse cellene øke kroppens forsvar mot tumorer eller infeksjon. Den immunosuppressive funksjonen av Tregs kan blant annet tilskrives produksjon av TGF- β og IL-10 [81].

I store trekk ser aterosklerose ut til å være en Th1-celledreven sykdom [15, 77, 83, 84].

1.4.3 Cytokiner

Cytokiner er små proteiner som produseres av nesten alle celletyper i menneskekroppen. I motsetning til hormoner, som er en del av den daglige homeostatiske syklusen, aktiveres cytokiner først og fremst av stressfaktorer og er i hovedsak involvert i respons til sykdom [88]. Disse celleregulatoriske proteinene er nøkkelspillere i initiering og kontroll av inflammasjon. De kan kategoriseres i seks hovedfamilier: interleukiner (IL), interferoner (IFN), kolonistimulerende faktorer (CSF), tumornekrosefaktorer (TNF), vekstfaktorer og kjemokiner (CC) – men det er betydelig overlapp mellom gruppene. Cytokiner fra alle familiene er sett involvert i aterosklerose, og alle celletypene i det aterosklerotiske plakk kan produsere og respondere på cytokinsignalisering [89].

Interleukiner er per definisjon ”cytokiner som produseres av én leukocyt, og som virker på en annen”, men det er også kjent at andre celletyper som GMC og endotelceller uttrykker flere interleukiner og deres reseptorer. Interleukinfamilien kan igjen deles inn i undergrupper etter homologitet i aminosyresekvens eller etter reseptoren de binder [89].

Kjemokiner er små, proinflammatoriske peptider som fasiliterer passasjen av leukocytter fra blod og inn i inflammet vev [88]. Familien deles igjen i fire undergrupper (CC, CXC, CX₃C og C) etter plasseringen til de to cysteinmolekylene nærmest N-terminalen i polypeptidkjeden. I CXC-familien er de to aminosyrene separert av én aminosyre, mens i CC-familien sitter de to cysteinene ved siden av hverandre. Det er, som nevnt, ingen klar grense mellom de ulike gruppene av cytokiner, og eksempelvis kan IL-8 også betegnes etter kjemokin-nomenklatur, med navn CXCL8 [90].

Funksjonen til et enkelt cytokin avhenger av hvilken biologisk prosess det er involvert i, og kan derfor variere. Cytokinene kan dermed også deles inn i grupper ut fra hvilken effekt de har i ulike situasjoner, for eksempel gjennom deres egenskaper i inflammasjon og immunrespons [88]. De er i hovedsak primært proinflammatoriske eller primært antiinflammatoriske, men også her er det overlapp mellom gruppene [88, 89]. Balansen mellom pro- og antiinflammatoriske cytokiner er viktig for utvikling og behandling av sykdom [89, 91-93]. Flere studier har vist økte nivåer av cytokiner ved aterosklerose, både systemisk og i plakk [41, 53, 91, 93-95].

Inflammatoriske cytokiner involvert i vaskulær inflammasjon stimulerer generering av endoteliale adhesjonsmolekyler, proteaser og andre mediatorer som driver den

aterosklerotiske prosessen. Blant annet fører produksjon av tidlige proinflammatoriske cytokiner til ekspresjon av IL-6 som igjen øker CRP-produksjon fra leveren som en akutfase-respons [96]. Musemodeller med genetisk eller farmakologisk blokkering av spesifikke kjemokiner og adhesjonsmolekyler har vist hemmet aterosklerotisk utvikling [97-100]. I tillegg til cytokinkonsentrasjon er også cytokinreseptornivåer sett regulert i inflammatorisk og aterosklerotisk sykdom. Fiotti og medarbeidere så økte nivåer av løselige reseptorer til TNF- α og IL-6 hos pasienter med perifer arteriesykdom, sammenliknet med kontroller [101]. Økt frigjøring av løselig IL-2-reseptor (IL-2R) i serum er observert hos pasienter med ustabil angina sammenliknet med pasienter med stabil tilstand [102].

Selv om det er godt dokumentert at inflammasjon har en viktig rolle i den aterosklerotiske utviklingen, er som nevnt betydningen av de ulike inflammatoriske mediatoene fremdeles uklart [71].

Proinflammatoriske og aterogene cytokiner

Den potensielle patogenetiske effekten av proinflammatoriske cytokiner påvirkes av ulike endogene modulatorer og antiinflammatoriske cytokiner [89, 93]. De viktigste proinflammatoriske cytokinene som opptrer tidlig i den aterosklerotiske prosessen, er IL-1 α , IL-1 β , TNF- α og IL-6 [103]. TNF- α produseres blant annet av T-celler og makrofager. Cytokinet har mange funksjoner som bidrar til den aterosklerotiske utviklingen, blant annet å hemme lipoprotein lipase og å aktivere monocytter. Aterosklerotiske musemodeller har vist at mangel på TNF- α gir reduserte lesjoner [103, 104]. I tillegg reduseres risikoen for aterosklerotisk karsykdom hos pasienter med RA ved anti-TNF- α -behandling [105]. IL-1 α og -1 β er også viktige mediatorer av inflammasjon [106] og har en essensiell rolle i patogenesen av flere KVS-er [107]. Økt inntak av marine fettsyrer er assosiert med redusert risiko for alle koronare og carotide hjertesykdommer [108], og monocytter isolert fra testpersoner som mottok supplement med marint omega-3 hadde redusert IL-1- og TNF- α -produksjon etter aktivering *in vitro*. Dette kan være en mulig forklaring på deler av den antiinflammatoriske og sykdomsreduserende effekten av omega 3 [109].

Andre sentrale proinflammatoriske cytokiner er IL-12 [106, 110], IL-18 [53, 103] og IL-8. IL-8 er beskrevet som en viktig mediator av aterosklerotisk sykdom *in vitro* og i dyrestudier, og også som mulig prediktor av KVS i flere kasus-kontroll-studier [111, 112].

Antiinflammatoriske og antiaterogene cytokiner

IL-10 produseres blant annet av makrofager og har en hemmende effekt på deres sekresjon av proinflammatoriske cytokiner, samt ekspresjon av MHC-II [113]. IL-10 er i flere dyremodeller vist å være viktig i utviklingen av plakket og IL-10-knock out (KO)-mus har vist økt utvikling av aterosklerotiske lesjoner sammenliknet med kontroller. Overekspresjon av IL-10 har i dyremodeller vist å gi reduserte lesjoner sammenliknet med kontroller [114]. Mallat og medarbeidere viste at IL-10-messenger ribonukleinsyre (mRNA) og protein er til stede i humant aterosklerotisk plakk, men ikke i friske kontrollarterier. I tillegg ble høye nivåer av IL-10 assosiert med redusert celledød i plakket, noe som tyder på en beskyttende effekt [115]. Wæhre og medarbeidere viste en økt TNF- α :IL-10-ratio hos pasienter med ustabil angina. Denne ubalansen er foreslått å være assosiert med patogenesen bak tilstanden [93], og er også sett i andre inflammatoriske og immunrelaterte sykdommer [116, 117]. Biswas og medarbeidere observerte også en lavere IL-10:TNF- α - samt IL-10:IL-6-ratio hos pasienter med akutt MI, enn hos kontroller [91]. I klinisk setting kan IL-10 gi en hemmet immunrespons og er derfor foreslått som terapeutisk agent i kronisk inflammasjon ved irriterbar tarm og psoriasis [116, 118]. IL-10 er også sett å øke produksjon av IL-9 fra humane CD4+T-celler. Etersom IL-10 er en kjent hemmer av cytokin-ekspresjon i T-celler er dette et atypisk aspekt ved IL-10s funksjoner [119].

TGF- β er et annet typisk antiinflammatorisk cytokin, som kan redusere utviklingen av aterosklerose gjennom mange ulike mekanismer. Så godt som alle celler kan respondere på TGF- β -signalisering og cytokinet kan derfor påvirke alle cellene i og utenfor plakket. Blant annet kan TGF- β hindre rekruttering og aktivering av lymfocytter, redusere skumcelledannelse, samt fremme plakkstabilitet gjennom stimulering av kollagensyntese og GMC-proliferasjon [103]. Serumkonsentrasjoner av aktivt TGF- β er sett å være lavere hos pasienter med avansert aterosklerose enn hos pasienter med normale arterier [120]. En antiaterogen funksjon av TGF- β er også illustrert ved *in vivo*-blokkering av TGF- β -signalisering i Apo E $-/-$ -mus, som resulterte i akselererende aterosklerotisk plakkutvikling og dannelse av mer inflammatoriske plakk [121]. Det er sett høyere ekspresjon av TGF- β i plakk fra pasienter med ustabil enn med stabil angina, og TGF- β er også grunnet dette foreslått å ha sammenheng med plakkstabilitet [122].

1.5 Interleukin 9 (IL-9)

Interleukin 9 (IL-9) er et 14 kilodalton (kD) stort glykoprotein. Det modne proteinet består av 144 aminosyrer, der 18 aminosyrer står for signalsekvensen. Homologitet mellom humant og murint IL-9 er 69 % på nukleotidnivå og 55 % på proteinnivå. IL-9 utøver sine effekter gjennom binding til interleukin 9-reseptoren (IL-9R) [123] og ble først identifisert hos mus som en T-celle-vekstfaktor kalt P40 [124]. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) ble også senere identifisert som IL-9 [125]. Nyere forskning har vist at IL-9 både produseres av og har effekter på langt flere celletyper enn dette, både murine og humane.

1.5.1 IL-9-ekspressjon i murine modeller

IL-9 ble først sett på som et Th2-derivert cytokin [126], men nyere rapporter har beskrevet en ny Th-populasjon som produserer IL-9, kalt T-hjelpecelle type 9 (Th9). Denne populasjonen er karakterisert ved produksjon av IL-9 og IL-10, og utvikles fra naive CD4⁺T-celler i respons til TGF- β og IL-4 [127, 128]. KO-modeller har imidlertid vist IL-9-ekspressjon i T-celler uavhengig av IL-4, noe som indikerer at ulike signalveier er involvert [129]. På den andre siden ser IL-2 ut til å være essensiell for syntese av IL-9, og IL-4 er avhengig av IL-2 og TGF- β for sterkt å øke IL-9-frigjøring. IFN- γ er sett å kunne redusere produksjonen av IL-9, trolig gjennom nøytralisering av IL-4 [130]. Nowak og medarbeidere identifiserte IL-9 som et Th17-derivert cytokin som kan bidra til utvikling av inflammatorisk sykdom. Det er også sett at IL-9 produseres av Th1-celler og Treg-celler, det vil si celletyper som spiller en rolle i både proinflammasjon og nedregulering av immunrespons [126, 131]. En vet lite om transkripsjonsfaktorene involvert i regulering av IL-9-ekspressjon, men Staudt og medarbeidere har vist til interferon regulatory factor 4 (IRF-4) som nødvendig for utvikling av murine Th9-celler [132]. En annen studie på musemodeller viste også nylig at T-cellespesifikk mangel av transkripsjonsfaktoren PU.1 ga redusert produksjon av IL-9 grunnet redusert antall Th9-celler [133]. Frigjøring av IL-9 er også observert fra aktiverte mastceller og sett å eskalere etter stimulering med IL-10 og IL-1 [134]. Murine natural killer T-celler (NKT-celler) viser genuttrykk av IL-9 etter stimulering med IL-2 [135].

1.5.2 IL-9-ekspressjon i humane celler

Hvilke humane celler som produserer IL-9, er mindre utforsket, men Beriou og medarbeidere så indikasjon på at TGF- β -indusert IL-9-sekresjon er en egenskap ved flere CD4⁺T-

cellegrupper også hos mennesker. Disse inkluderer Th9-, Th17-, Th2- og mulig Th1-celler [136]. Human inducible regulatory T cells (iTregs) er også sett å uttrykke IL-9 [137]. Beriou og medarbeidere viste også at humane naive CD4+T-celler stimulert med TGF- β differensierte til Th9-celler som produserer IL-9, men fikk hemmet IL-10-ekspressjon. TGF- β gir en CD4+T-celle-respons som er dominert av IL-17 og IL-9, men med tap av Th1- og Th2-cytokiner [136]. Dette er i kontrast til murine modeller der stimulering med TGF- β på Th2-celler, som nevnt, gir produksjon av både IL-9 og IL-10 [127, 128]. TGF- β er vist å være essensiell for differensiering av IL-9-produksjon fra både naive T-celler og hukommelses-T-celler [136], og Kajiyama og medarbeidere viste indikasjon på at IL-2 også var essensiell for IL-9-produksjon av humane Th-kloner [138]. Det er foreslått en cytokinkaskade for ekspressjon av IL-9 som involverer IL-2, IL-4 og IL-10 [119]. Flere andre cytokiner, som IL-1 β , IL-12, IL-21 og IL-23 virker sammen med TGF- β og IL-4 for å øke IL-9-ekspressjon [136, 137]. Etersom IL-4 og IL-12 fremmer differensiering av henholdsvis Th2- og Th1-celler [81], kan deres felles effekt på IL-9 tyde på at IL-9 virker i både Th2- og Th1-cellemedierte systemer. Flere studier har i tillegg vist IL-9-produksjon fra humane eosinofile, oppregulert av IL-1 β og TNF- α [139, 140].

1.5.3 IL-9R

En spesifikk høyaffinitetsreseptor for murint IL-9 ble først identifisert i T-celler, mastceller og makrofager [141]. IL-9R er medlem av superfamilien hemapoietiske reseptorer sammen med reseptorer for andre interleukiner som IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7 og IL-10. Reseptoren er satt sammen av en spesifikk IL-9R α -kjede og en γ -kjede som er felles for IL-9, IL-2, IL-4, IL-7 og IL-15 (figur 4) [142, 143]. Grasso og medarbeidere fant flere strukturelle varianter av human IL-9R (hIL-9R), der en av dem så ut til å ha nedregulerende effekt på signalisering, ettersom den ikke responderte på humant IL-9 [144]. IL-9 virker på mange humane celler involvert i inflammatoriske prosesser og IL-9R er observert på humane T-celler [145], B-celler [146, 147], mastceller [123], hematopoietiske forløpere [148], neutrofile [149], eosinofile [150], luftveiseepitelceller [151] og luftveis-GMC [152, 153], mikroglia [154] og monocytter [155].

1.5.4 IL-9s målceller

Mastceller

IL-9 ble, som nevnt, tidlig identifisert som en mastcelle-vekstfaktor, og disse cellene er interleukinets hovedmålceller. Dyreforsøk har vist at IL-9 er viktig for ekspansjon og rekruttering av mastceller ved immunaktivering [125, 156]. IL-9 er sett å øke ekspresjon av IL-1, IL-5, IL-6, IL-10 og IL-13 etter ionomycin-aktivering, samt å indusere ekspresjon av TGF- β fra mastceller. IL-9 påvirker dermed uttrykk av både pro- og antiinflammatoriske aktører og har også en positiv feedback på egen ekspresjon i disse cellene [157, 158].

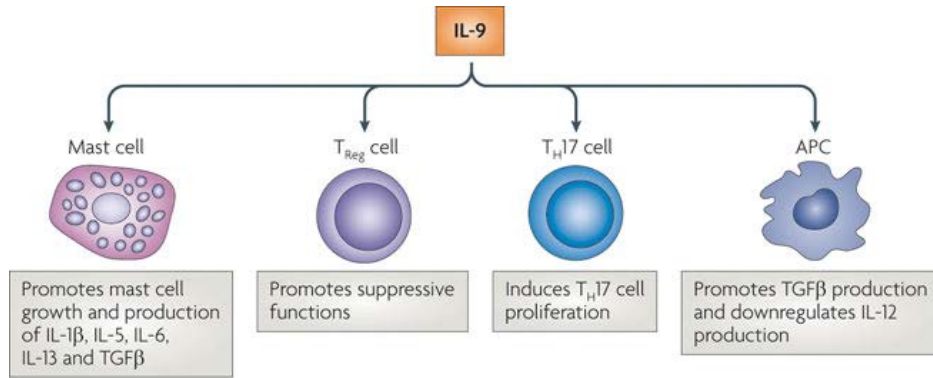
T-celler

Ferskt isolerte T-celler responderer ikke på IL-9, men celler som er aktivert med phytohaemagglutinin (PHA) og IL-2 prolifere etter IL-9-stimulering [123]. Th17-celler kan selv produsere IL-9 som virker som en autokrin vekstfaktor *in vitro*. IL-9 er også sett å fremme den immunosuppressive effekten av Treg-celler i dyrestudier *in vitro* og *in vivo* [159].

Antigenpresenterende celler

Det er ikke gjort noen grundig analyse av hvilke undergrupper av antigenpresenterende celler som uttrykker IL-9R, men det ser ut til at flere av disse er målceller for IL-9 [160]. Gjennom produksjon av TGF- β kan IL-9 hemme produksjon av H₂O₂ og TNF- α , samt redusere IL-10-produksjon fra lipopolysakkarid (LPS)-aktiverte humane monocyttter [155]. IL-9 er også sett å endre cytokinrespons fra peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (som inneholder B-celler, monocyttter og makrofager) hos pasienter med tuberkulose [161]. IL-9 er dessuten sett å potensierte immunoglobulin (Ig)-produksjon induisert av IL-4 i humane B-lymfocytter [146, 147]. Interleukinet er med andre ord både sett å øke og å redusere kapasiteten til antigenpresenterende celler.

Hovedeffekter av IL-9 i murine målceller er presentert i figur 3.

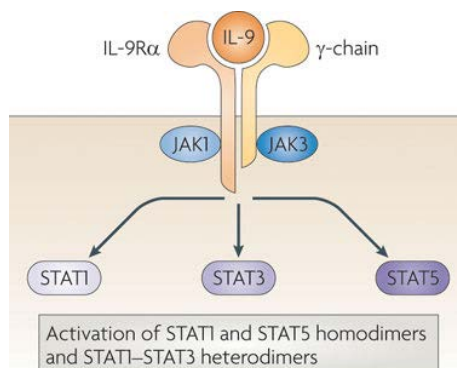


Nature Reviews | Immunology

Figur 3. IL-9s hovedfunksjoner i murine målceller. IL-9s reseptor er observert på disse cellene også hos menneske, men IL-9s funksjoner i humane celler er mindre kartlagt. [160]

1.5.5 Signaliseringsveier

Signalisering via human IL-9R involverer tyrosin kinasene *Janus kinase* (JAK) 1 og JAK3 samt transkripsjonsfaktorene *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 1, 2 og 3. JAK-STAT-signalveiene er felles for IL-2-cytokinfamilien [162]. IL-9 aktiverer også signalveier som inkluderer *insulin receptor substrate-1 phosphatidylinositol 3* (IRS-PI3)-kinase og *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Etter høyaffinitetsbinding til IL-9R skjer en auto- eller transfosforylering av JAK-kinaser, fosforylering av reseptoren og aktivering av en IL-9-signaliseringsvei. IRS-PI3-kinase- og STAT 1,2,3-signalveiene går gjennom JAK1 og MAPK-signalveien gjennom JAK3 [163]. IL-9 er vist å ha negativ feedback-effekt på egen signalisering *in vitro* gjennom overekspressjon av *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-3 [164].



Nature Reviews | Immunology

Figur 4. IL-9R består av en spesifikk IL-9Rα-kjede og en γ-kjede felles for IL-2-reseptorfamilien. Signaler fra IL-9 går gjennom IL-9R og JAK-STAT-signalveier. [160]

1.5.6 Regulering av IL-9R

IL-9R-ekspresjon kan moduleres av andre cytokiner, og IL-10 gir redusert ekspresjon av IL-9R på humane neutrofile i nærvær av Th2-cytokiner. IFN- γ oppregulerer IL-9R, men denne effekten ble fjernet i nærvær av Th2-cytokiner [165]. IFN- γ er tidligere sett å oppregulere IL9R på luftveiseepitel hos astmatikere *in vitro* [166]. Det er observert flere potensielle regulatoriske elementer i den ikke-kodende regionen av IL-9R-genet, og det er mulig at genekspresjon av IL-9R reguleres forskjellig i ulike celletyper [167]. Proteinet 14-3-3 ζ er sett å interagere med det intracellulære domenet av human IL-9R α (hIL-9R α) avhengig av serin- eller threonin-fosforylering. Det ble ikke observert interaksjon mellom 14-3-3 ζ og human IL-4-reseptor α (hIL-4R α), noe som kan tyde på en potensiell rolle i cytokin-spesifisering. Den fysiologiske rollen er imidlertid igjen å kartlegge [168].

1.5.7 IL-9 i relasjon til sykdom

IL-9 er trolig involvert i patogenesen av flere tilstander, og er blant annet sett i sammenheng med inflammatorisk og allergisk sykdom hos både dyr og mennesker [126, 131, 160, 161, 169]. Flere pågående studier jobber for å utvikle behandling rettet mot IL-9s funksjon blant annet gjennom bruk av anti-IL-9-spesifikke antistoffer og tyrosin-kinase-hemmere av IL-9R [126, 131, 170, 171].

IL-9 er vist å beskytte mus mot *Pseudomonas*-indusert septisk sjokk, trolig gjennom reduksjon av proinflammatoriske cytokiner og induksjon av IL-10 [172]. Arendse og medarbeidere så på den andre siden IL-9 som en skadelig faktor i utvikling av *L.major*-infeksjon hos mus, gjennom økt Th2- til Th1-responsratio [170]. Økte nivåer av IL-9 er også sett i humane celler fra pasienter med tuberkulose, og er også her assosiert med hemmet Th1-respons [161]. Disse og andre studier peker på betydningen av IL-9 i ulike infeksjonsrelaterte tilstander.

IL-9 er også i flere studier relatert til utvikling av astma hos både mennesker og dyr. Det er blant annet sett at IRF-4 $-/-$ mus ikke kan utvikle astmasymptomer grunnet manglende IL-9-produserende Th9-celler [132]. En studie gjort på PBMC fra atopiske astmatikere viste økt produksjon av IL-9 fra CD4 $^+$ T-celler i respons til allergen [173] og i samme pasientgruppe er det sett et økt antall av IL-9-mRNA-positive celler i bronkialt vev [174, 175]. Ekspresjon av IL-9R er observert i luftveiseepitel hos astmatikere, noe som indikerer at astmatiske luftveier

ikke bare har evnen til å produsere, men også til å respondere på IL-9. Luftveiseepitel fra friske kontroller viste ingen ekspresjon, noe som tyder på at IL-9 og IL-9R er relatert til sykdomstilstanden [166, 175].

Dugas og medarbeidere viste at IL-9 potensierer IL-4-indusert produksjon av IgE og IgG fra humane B-lymfocytter, noe som indikerer en rolle i reguleringen av allergisk reaksjon gjennom Ig-produksjon [146]. En studie av Fujisawa og medarbeidere viste IL-9-frigjøring fra humane eosinofile i respons til "house dust mite extract" [140] og IL-9-ekspresjon er også sett induert i huden til atopiske pasienter etter allergenstimulering [174]. Flere andre studier har vist økte nivåer av IL-9 ved astmatisk og allergisk inflammasjon, men rollen i den humane patogenesen er ukjent [169].

IL-9s rolle som vekstfaktor i T-celler og mastceller åpner for en rolle i onkogenese, som også er observert i flere murine og humane modeller. Nagato og medarbeidere så økt ekspresjon av IL-9 i serum og biopsier fra pasienter med nasal NK/T-celle-lymfom sammenliknet med kontroller, og uttrykk av IL-9R viser til en autokrin regulering i disse kreftcellene [176]. Flere studier indikerer at IL-9 har en rolle i patogenesen av Hodgkins lymfom [177, 178] og storcellet anplastisk lymfom [178]. IL-9-uttrykket er sett positivt korrelert med økt eosinofil- og mastcelleantall i Hogkins lymfom [179], som igjen er assosiert med dårlig prognose i denne tilstanden [180, 181].

IL-9 er også sett i forbindelse med ulike autoimmune tilstander som diabetes type 1 [136] og RA [126, 182], samt assosiert med transplant-toleranse. I murine modeller har IL-9 vist positiv korrelasjon med hjertegrft-rejeksjon [183], men som mulig fremmer av toleranse ved hudtransplantasjon [184].

IL-9 og aterosklerose

Sprague & Khalil beskrev i 2009 IL-9 som et antiaterogent interleukin ut fra egenskaper identifisert gjennom *in vitro*-forsøk [185]. Svært få studier er gjort på IL-9 i direkte relasjon til human aterosklerotisk inflammasjon og vaskulær sykdom forårsaket av aterosklerose. Det er imidlertid nylig gjort en studie på pasienter med kronisk hjertesvikt der en så økte plasmanivåer av IL-9, sammenliknet med kontroller. Økte nivåer av IL-9 ble også positivt assosiert med redusert ventrikulær dysfunksjon og sykdomsprogresjon ved iskemisk kardiomyopati [186].

Von der Thüsen og medarbeidere viste i et forsøk der LDL-reseptor (LDLr)-KO-mus fikk en vestlig diett og aterosklerose induisert ved avklemning av carotis, at IL-9-behandling ga sterk reduksjon i aterosklerotisk utvikling. IL-9-behandlingen ga reduksjon i LPS-induserte plasmanivå av TNF- α og reduksjon i plakkstørrelse, men ikke plakksammensetning. Behandlingen ga ikke påvirkning på kolesterolverdier, men redusert lagring av fett i peritoneale makrofager. Vaksinasjon mot endogent IL-9 ga en dobbelt risiko for aterosklerose i den samme modellen og viser dermed til en beskyttende vaskulær effekt av IL-9 hos disse musene. Forfatterne diskuterer ut fra dette IL-9s mulige terapeutiske potensial, men poengterer at flere studier er nødvendig for å kartlegge om denne terapeutiske effekten også er aktuelt for mennesker (upubliserte data, von der Thüsen og medarbeidere, Universiteit Leiden, Nederland).

IL-9 kan på grunnlag av dagens kunnskap ikke klassifiseres som enten pro- eller antiinflammatorisk [131, 160], heller ikke som pro- eller antiaterogen. IL-9 er foreslått som en immunmodulator [172], men rollen i human sykdom generelt, og i human aterosklerotisk sykdom spesielt, er ukjent.

2 Mål og problemstillinger

Inflammasjon er en viktig del av den aterosklerotiske utviklingen og er sterkt relatert til forekomst av vaskulære hendelser. Cytokinnettverket er en sentral del av denne inflammasjonen, og endrede cytokin- og cytokinreseptor-konsentrasjoner er observert ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom. Det er grunnet dette interessant å kartlegge funksjonene av de ulike cytokinene i den aterosklerotiske prosessen. Økt kunnskap kan gi mulighet for å benytte målemetoder for spesifikke cytokiner og cytokinreseptorer til å fastslå risiko for eller tilstedeværelse av aterosklerotisk sykdom, også hos asymptotiske pasienter. Inflammasjonsmarkører kan benyttes som et tillegg til eksisterende risikoevalueringer som scoringssystemer og ultralyddiagnostikk. Det er også tenkelig at behandling rettet mot cytokiner og cytokinreseptorer kan være med på å bidra til en redusert epidemiologisk utvikling av aterosklerotiske hjerte- og karsykdommer.

Svært få studier har tatt for seg IL-9s rolle i aterosklerotisk sykdom. Vår hypotese er at IL-9 kan være en ny og sentral mediator i den aterosklerotiske prosessen, med spesiell betydning for utviklingen av plakkruptur. På lengre sikt kan IL-9 mulig bli en viktig markør for aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom og et viktig tilskudd til dagens behandling av disse tilstandene.

For å øke kunnskapen på dette feltet var derfor de spesifikke målene ved studien:

1. Å måle genuttrykk og proteinnivåer av IL-9 og IL-9R i celler og vev sentralt i den aterosklerotiske prosessen.
2. Å sammenlikne genuttrykk og sirkulerende nivåer av IL-9, samt genuttrykk av IL-9R hos pasienter med carotid og koronar sykdom, klassifisert etter symptomer og plakk morfologi, med friske kontroller.
3. Å undersøke eventuelle pro- eller antiinflammatoriske effekter av IL-9 i humane celler.

3 Metode

3.1 Testpersoner

Pasienter med carotisstenose vurdert ut fra kliniske og ultralydmessige kriterier, ble rekruttert via samarbeidspartnere ved Nevrologisk avdeling og Thorax kirurgisk avdeling ved Oslo universitetssykehus (OUS), Rikshospitalet. Fra tilgjengelige pasienter (n=143) ble fire ekskludert grunnet manglende diagnose og/eller operasjon. To ble ekskludert under analysene grunnet for lite prøvevolum. De resterende prøvene ble inkludert i studien og gruppert etter tilstedeværelse av asymptomatisk (n=50) og symptomatisk (n=87) stenose. Pasientene ble også delt inn i grupper etter måneder siden siste kliniske symptom: a) under eller lik to måneder siden siste symptom (n=52), b) tre til seks måneder siden siste symptom (n=35) og c) fravær av symptomer de siste seks måneder (n=49). Pasienter i denne siste gruppen tilsvarte pasienter klassifisert med asymptomatisk stenose, ettersom inklusjonskriteriene for symptomfrihet var like for disse gruppene. Der informasjon var tilgjengelig er også disse pasientene klassifisert ut fra plakkmorfologi, med tilstedeværelse av lavekkogene (n=27) eller høyekkgene (n=59) plakk. Plasma fra frivillige, friske testpersoner ble benyttet som kontroller (n=28).

Carotisplakk fra den samme pasientpopulasjonen ble også analysert. Tilgjengelige prøver fra asymptomatiske (n=17) og symptomatiske (n=51) pasienter ble sammenliknet med kontrollprøver. Kontrollprøvene var nyrearterie-karvegg fra organdonorer som var friske ved dødstidspunktet (n=28). Ytterligere informasjon var ikke tilgjengelig fra denne gruppen. Pasientpopulasjonen ble, som for plasmaprøvene, delt i grupper etter antall måneder siden siste kliniske symptom: a) under eller lik to måneder siden siste symptom (n=37), b) tre til seks måneder siden siste symptom (n=20) og c) fravær av symptomer de siste seks måneder (n=13). Også her var inklusjonskriterier for sistenevnte gruppe og gruppen "asymptomatisk" like, satt ved fravær av symptomer siste seks måneder. Der informasjon var tilgjengelig om plakkmorfologi, ble også disse prøvene sammenliknet etter tilstedeværelse av lavekkogene (n=18) og høyekkgene (n=33) plakk.

Det er også rekruttert pasienter med etablert aterosklerotisk koronarsykdom som har vært innlagt ved Hjertemedisinsk avdeling, OUS Rikshospitalet. Pasientene er diagnostisert med stabil (n=40) eller ustabil (n=40) angina pectoris. Det er samlet inn plasmaprøver fra disse

pasientene og fra friske kontroller (n=20). Fra plasma er det isolert CD3+T-celler som det igjen er isolert ribonukleinsyre (RNA) og syntetisert complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) fra. Det ble benyttet tilgjengelig cDNA fra pasienter med stabil (n=11), pasienter med ustabil (n=18) angina og fra friske kontroller (n=11).

Materialet fra pasientpopulasjonene og celleprøver er samlet inn av Halvorsen og medarbeidere og oppbevart i biobank på OUS Rikshospitalet. Biobank er godkjent av regional etisk komité (REK): carotisstenose [REK 2769] og angina pectoris [REK:S-06172]. Alle pasientene er velbeskrevet både klinisk, ernæringsfysiologisk, biokjemisk (CRP, lipider o.l.) og angiografisk.

I tillegg til eksisterende prøver i biobank ble venøst blod samlet inn fra friske, frivillige blodgivere (n=11) ansatt ved Institutt for indremedisinsk forskning (IIF), Rikshospitalet og studenter ved Avdeling for ernæringsvitenskap ved Universitet i Oslo (UiO). Blodprøvene ble tatt ved ordinær venepunksjon. Det ble fra disse prøvene isolert PBMC (n=4) og blodplater (n=7) til cellestimuleringsforsøk. Ytterligere informasjon er ikke samlet inn fra disse pasientene ettersom prøvene kun skulle benyttes i mekanistiske celleforsøk.

Diskrepans i antall mellom grupper som per definisjon skal være like, skyldes mangelfull informasjon om noen av medlemmene. For eksempel er det diskrepans i antall mellom asymptomatiske carotispasienter (n=50) og carotispasienter med fravær av symptomer de siste seks månedene (n=49) grunnet manglende merking av antall måneder siden symptom hos én pasient, har denne falt utenfor sistnevnte gruppe.

3.2 Isolering og stimulering av PBMC

3.2.1 Bakgrunn

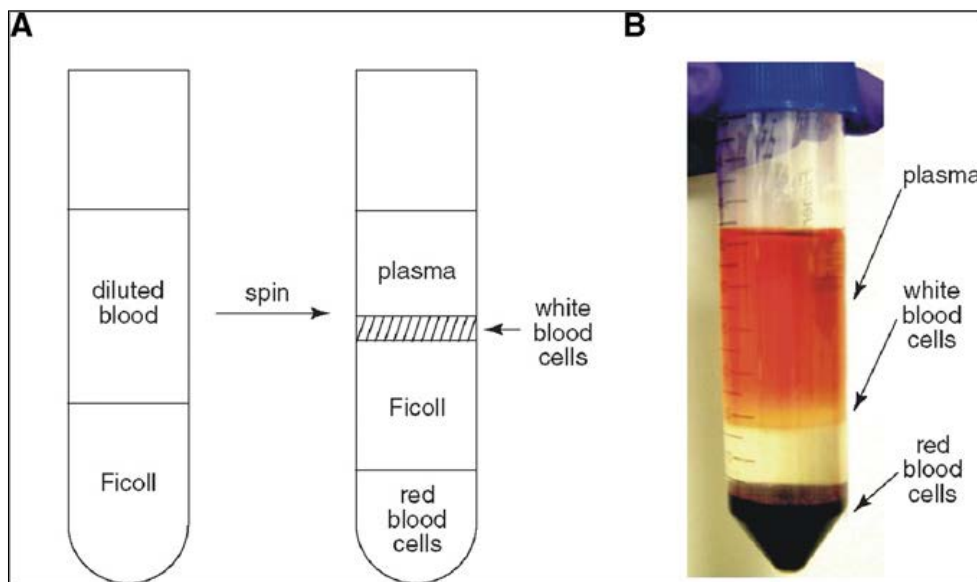
Perifert blod er hovedkilde til lymfoide celler som brukes i studier av det humane immunforsvaret. En stor fordel med disse cellene er at de er lett tilgjengelige, og *in vitro*-studier av PBMC kan gi viktige mål på et individs immunokapasitet [187, 188]. Det finnes flere ulike metoder for isolering av PBMC fra perifert blod. Et eksempel er en såkalt Ficoll-Hypaque-gradient som utnytter tetthetsforskjellen mellom mononukleære celler og andre elementer i blodet. Mononukleære celler og blodplater, som har lavere tetthet, samler seg på

toppen av gradienten mens røde blodceller og granulocytter samles på bunnen. Deretter renses de mononukleære cellene ut ved hjelp av gjentatte vaskesteg [189, 190].

3.2.2 Protokoll for isolering

Venøst blod (5x9 ml) ble tappet fra friske givere (n=4). Blodet ble fordelt i to Falcon-rør per person og tilsatt lik mengde fysikalsk saltvann (0,9 % NaCl, Braun) som mengde blod. 10 ml Lymfoprep (Axis-Shield, prod.nr.1114544) ble tilsatt hvert rør gradvis. Rørene ble så sentrifugert på 1600 rpm i 25 minutter. Det ble dannet et cellesjikt bestående av PBMC (figur 5A), som ble pipettert ut og over i et nytt Falcon-rør – ett per person. Rørene ble sentrifugert på 1800 rpm i 15 minutter. Supernatanten ble kastet og bunnfallet ble løst opp ved kraftig pipettering med et lite volum av cellemediet RPMI1640 (PAA, katalognr. E15-842). Deretter ble 20 ml RPMI1640 tilsatt hvert rør før sentrifugering ved 1800 rpm i ti minutter. Vaskesteget ble gjentatt og rørene sentrifugert på nytt under samme betingelser. 4 ml RPMI1640 ble så tilsatt bunnfallet og blandet inn ved pipettering. 25 μ l av blandingen ble pipettert ut til et NUNC-rør, tilsatt 475 μ l metylfiolett og kjørt i en whirlmikser. 50 ruter i et Bürcker-tellekammer ble telt og antall celler per ml regnet om ved hjelp av formelen:

X talte celler/10 = X millioner celler/ml [191].



Figur 5A. En Ficoll-Hypaque-gradient dannes etter sentrifugering med Ficoll/Lymfoprep. **5B.** En Ficoll-Hypaque-gradient i en faktisk celleprepareringstube. [189]

3.2.3 Stimulering

Ferskt isolerte PBMC (1 mill/ml) (avsnitt 3.2.2) ble inkubert 24 timer i RPMI-1640 (PAA, katalognr. E15-842) med 5 % føtalt kalveserum (FCS) i flatbunnede 96-brønners plater. To prøver ble tillaget per testperson (n=4) slik at hver stimuli-gruppe hadde n=8 prøver:

- 10 ng/ml IL-9 (n=8)
- 5 ng/ml LPS (n=8) med eller uten 10 ng/ml IL-9 (n=8)
- 20 ng/ml PHA (n=8) med eller uten 10 ng/ml IL-9 (n=8)
- Ustimulerte kontroller (n=8).

Cellene og cellemediet ble deretter høstet og produksjon av pro- og antiinflammatoriske markører målt i mediet ved hjelp av "Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) (avsnitt 3.4.3) og Bio-Plex (avsnitt 3.5). Resultatene er presentert som gjennomsnitt av de to prøvene som ble tillaget per testperson.

3.3 Isolering og stimulering av blodplater

3.3.1 Bakgrunn

Blodplater kan i tillegg til sin kjente rolle i trombose dannelse bidra i den inflammatoriske delen av den aterosklerotiske patogenesen. Når de aktiveres, kan de friggi inflammatoriske mediatorer som vekstfaktorer og cytokiner, og på den måten inducere inflammatorisk respons hos nærliggende celler [192]. Det er derfor ønskelig å studere blodplatenes rolle og regulering i den aterosklerotiske utviklingen for bedre å forstå prosessen og fremme utvikling av nye markører og behandlingsmetoder for aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom.

3.3.2 Protokoll

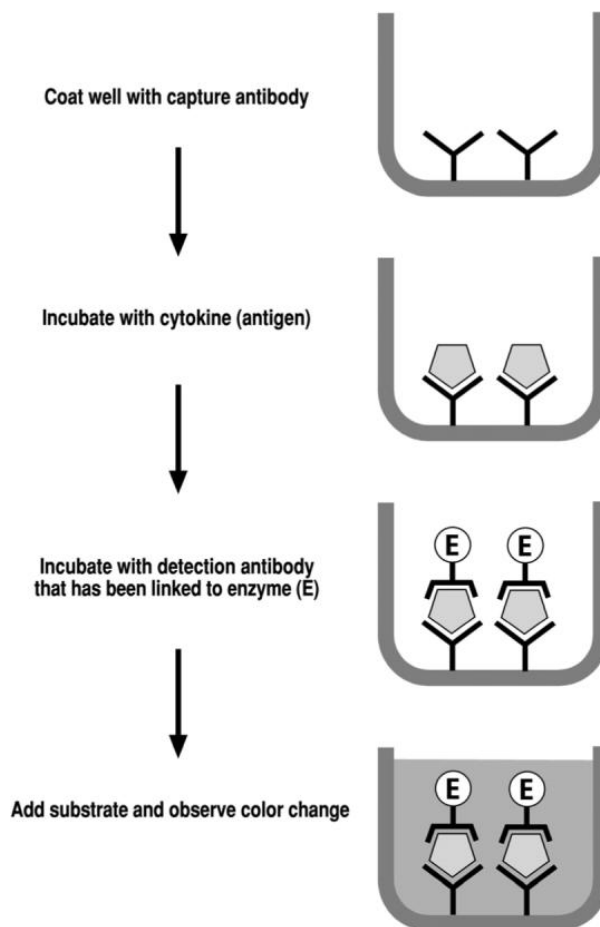
Isolering og stimulering av blodplater ble utført som tidligere beskrevet av Otterdal og medarbeidere [193]. Fullblod fra friske givere (n=7) ble tappet på citrat og sentrifugert ved 250g i åtte minutter ved 20 °C. Det øvre sjiktet med platerikt plasma (PRP) ble overført til nye rør og blodplatekonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av *ABX Micros cell counter*. PRP ble deretter stimulert med 7,5, 10 eller 100 µM av trombinagonist-peptidet SFLLRN (løst i

phosphate buffered saline (PBS); syntetisert ved Bioteknologisenteret i Oslo) ved 22 °C i 90 minutter. Platene var på forhånd preinkubert med 1mM acetylsalisylsyre ((ASA), (Sigma-Aldrich, katalognr. A-5376) eller metanol som kontroll, i 20 minutter. Etter stimulering ble platene fjernet ved sentrifugering av PRP ved 13 000g i fem minutter, ved 22 °C. Det platefrie plasmaet (PFP) ble overført til nye rør og fryst ved -18 °C [193].

3.4 ELISA

3.4.1 Bakgrunn

ELISA er den mest brukte målemetoden for cytokinkonsentrasjoner i kliniske laboratorier og biokjemisk forskning. Den er også den best validerte metoden for å måle individuelle cytokiner. Reaksjonen utføres vanligvis i en 96-brønners mikrotiterplate. Prosessen er en stegvis tilsetning av reaktanter til brønnene, der substansene reagerer med et bundet substrat. Mellom stegene vaskes platen for å fjerne ubundne molekyler [194, 195]. I et typisk dobbel-antistoff sandwich-ELISA vil et spesifikt antistoff, som finnes i bunnen av brønnene, binde det ønskede cytokinet. Et sekundært antistoff gir deteksjon av antistoff-antigen-komplekset. Det sekundære antistoffet er festet til et enzym som avgir signalisering i form av fargeendring ved tilsetning av et substrat (figur 6). Reaksjonen stoppes etter en gitt tid ved hjelp av et sekundært substrat (eks. 2N H₂SO₄) for å unngå utjevning av fargesignalet mellom prøvene. Signalet kvantifiseres ved hjelp av spektrofotometri ved spesifikke bølgelengder, avhengig av det enzym-substratkomplekset som benyttes [194]. Resultatene relateres til en standardkurve tillaget med rekombinant cytokin i kjente konsentrasjoner, som anbefalt av den respektive leverandøren [196].



Figur 6. Standard dobbel-antistoff sandwich-ELISA-reaksjon. Brønnene inneholder et "capture antibody" som er spesifikt for cytokinet (antigenet) som skal måles. Et deteksjonsantistoff tilsettes brønnene, gjenkjenner antistoff-antigen-komplekset og fester seg til det. Et enzym som er festet til antistoffet, endrer farge ved tilsetning av et substrat. Fargesignalet leses av ved hjelp av spektrofotometri, og mengden av antigenet beregnes ut fra en standardkurve basert på kjente konsentrasjoner. [195]

3.4.2 ELISA for mål av IL-9

Valg av ELISA-kit

Ferdige ELISA-kit for de "vanligste" cytokinene finnes kommersielt tilgjengelig, ofte fra flere leverandører. Vi hadde ingen erfaring med IL-9 og flere kit ble testet før prøvematerialet ble gjennomkjørt. Vi testet først *Legend Max – ELISA kit* fra Biolegend (katalognr. 88-7958-22), men grunnet usikkerhet rundt spesifisiteten ble det utført et søk på søkemotoren *Google* etter alternativer. *Human IL-9 ELISA Ready-set-go!* fra eBioScience (katalognr. 887958) ble valgt grunnet høyest oppgitt sensitivitet (1pg/ml). Et utvalg av prøver ble analysert for å vurdere spesifisiteten. Deteksjonen var bedre enn for *Legend Max* fra Biolegend, og en fortynningskurve av prøver med rekombinant IL-9 ga god spesifisitet og grunnlag for valg av dette kitet. For protokoll, se under.

Protokoll: Human IL-9 ELISA Ready-set-go!, eBioScience

Alle brønnene på en *Corning Costar 9018*-plate ble inkubert med 100 µl hIL-9 capture antibody fortynnet i coating buffer. Platen ble forseglet og inkubert over natten ved 4 °C. Etter inkubering ble platen vasket med vaskebuffer (1 x PBS, 0,05 % Tween-20) og aspirert etter protokoll. Brønnene ble blokkert med 200 µl 1X assay diluent (AD), forseglet og deretter inkubert én time i romtemperatur. En "standard-stock" ble fortynnet og en syvpunkts standardkurve med høyeste standard på 100 pg/ml og to gangers fortynninger i duplikater ble tillaget, som anbefalt av leverandør. Standardkurven ble fortynnet med 1X AD. 100 µl standard eller prøve ble tilsatt de respektive brønnene og platen ble forseglet og inkubert over natten ved 4 °C. Der nok prøvevolum var tilgjengelig, ble prøvene analysert ufortynnet, som anbefalt av leverandør. Platen ble deretter vasket og aspirert og hver brønn ble tilsatt 100 µl deteksjonsantistoff (pretitrert biotin-konjugert antistoff) fortynnet i 1X AD. Platen ble så forseglet og inkubert én time i romtemperatur. Platen ble vasket og hver brønn ble tilsatt 100 µl av pretitrert avidin-horseradish-peroksidase (avidin-HRP) fortynnet i 1X AD. Etter 30 minutter forseglet i romtemperatur, ble platen vasket og aspirert etter protokoll. 100 µl ferdig fortynnet tetrametylbenzidin (TMB) substratløsning ble tilsatt hver brønn. Platen ble igjen forseglet og inkubert 15 minutter i romtemperatur. 50 µl 2N H₂SO₄ (stoppløsning) ble så tilsatt hver brønn for å stoppe reaksjonen [196]. Bølgelengden (Optical density (OD)) ble lest av ved 540/570 nm, og konsentrasjoner ble beregnet ved hjelp av databasert kurvetilpasning, *Multiscan Ascent* (Thermo LabSystems) og *Abscent Software for Multiscan Ascent* (Applied Biosystems). All platevask ble utført ved bruk av *Wash 430 automatic strip well washer* (Microwell Systems).

3.4.3 ELISA-protokoll for mål av MCP-1 og IL-8

Kommersielt tilgjengelige og kjente kit ble benyttet til analyse av MCP-1- og IL-8-proteinkonsentrasjon, henholdsvis *Human CCL2/MCP-1 DuoSet kit* (R&D Systems, katalognr. DY279) og *Human CXCL8/IL-8 DuoSet kit* (R&D Systems, katalognr. DY208). Kitene inneholder alle hovedkomponentene nødvendig for analysene, og kun standard løsninger må tilføres. For protokoller se Vedlegg 8.2 og 8.3.

OD ble avlest ved 540/570 nm. Konsentrasjoner ble beregnet ved hjelp av databasert kurvetilpasning, *Multiscan Ascent* (Thermo LabSystems) og *Abscent Software for Multiscan Ascent* (Applied Biosystems). All platevask ble utført ved bruk av *Wash 430 automatic strip*

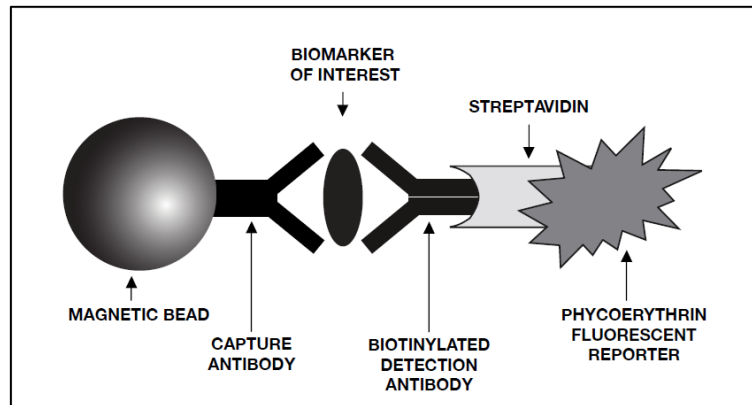
well washer (Microwell Systems). Metoden ble benyttet for mål av cytokinkonsentrasjoner etter cellostimuleringsforsøk, og resultatene ble relatert til ustimulerte kontrollprøver for beregning av relative endringer i proteinkonsentrasjoner. Prøver der resultatene kom utenfor standardkurven ble fortynnet og analysert på nytt.

3.5 Bio-Plex

3.5.1 Bakgrunn

I motsetning til ELISA kan Bio-Plex multiplex-analyse måle opptil 100 ulike cytokiner i én enkelt brønn av en 96-brønners mikrotiterplate. Bio-Plex-systemet er basert på fargekodete magnetiske mikrokuler og er designet til å måle cytokiner, kjemokiner eller vekstfaktorer i serum, plasma eller vevs-supernatanter. 12,5 µl serum eller plasma, eller 50 µl løst vevs-supernatant er tilstrekkelig reaksjonsvolum.

Prinsippet for reaksjonen er likt som for sandwich-ELISA (avsnitt 3.4.1). Et antistoff mot et spesifikt cytokin, kjemokin eller en vekstfaktor er festet til en mikrokule. Det kan være opptil 100 ulike kuler i én reaksjon, og hver kule har sin fargekode. Kulene interagerer med prøven og vaskes for å fjerne ubudne proteiner. For hver kule dannes det et antigen-antistoff-kompleks med det antigenet som kulen bærer antistoffet til. Så tilsettes et deteksjonsantistoff, og det dannes et "sandwich"-kompleks. Et streptavidin-phycoerytherin reporter-kompleks binder deteksjonsantistoffet på overflaten av kulen (figur 7). Ved hjelp av et databasert avlesningssystem blir kulene fra platen dratt opp og inn i avleseren. To lasere står for avlesningen. En rød laser (635 nm) leser av fargekodene til hver kule for å identifisere og klassifisere kulene og dermed målmolekylet. En grønn laser (532 nm) stimulerer phycoerytherin til å generere et reportersignal. Intensiteten av dette signalet indikerer den relative konsentrasjonen av målmolekylene i prøven. Bio-Plex software prosesserer denne fluoresens-intensiteten og kalkulerer de respektive konsentrasjonene [195, 197].



Figur 7. Kompleks av mikrokule, antistoff, cytokin, sekundært antistoff og substrat. [197]

3.5.2 Protokoll

Et *Bio-Plex Pro Reagent Kit* (Bio Rad, katalognr. 171-304070) ble benyttet for analyse av cytokinene IL-10 (katalognr. 171-B5010M), IFN- γ (katalognr. 171-B5019M), interferon γ -inducible protein 10 (IP-10) (katalognr. 171-B5020M), IL-17 (katalognr. 171-B5014M) og IFN α -2 (katalognr. 171-B6010M). Prøvene ble tint på is og standardene rekonstruert i cellemediet, som anbefalt av leverandør. En nipunkts standardkurve ble tillaget etter protokoll. Working concentration av mikrokuler (1X) ble tillaget i assay buffer, tilsvarende 5 μ l av hvert kuleslag til hver brønn. En 96-brønners filterplate ble vasket med 100 μ l assay buffer, og væske ble fjernet ved vakuumfiltrasjon. Brønnene ble gjennomlyst for å forsikre at all væske hadde trukket gjennom. Mikrokulene ble tilsatt hver brønn og vaskesteget gjentatt to ganger. 50 μ l standard eller prøve ble tilsatt de respektive brønnene og inkubert 30 minutter i romtemperatur under risting. Platen ble så vasket tre ganger før deteksjonsantistoffet (fortynnet etter protokoll) ble tilsatt. Inkuberingssteg og vask ble gjentatt før 50 μ l streptavidin-phycoerytherin (fortynnet etter protokoll) ble tilsatt hver brønn. Platen ble så inkubert ved romtemperatur i ti minutter under risting og deretter vasket tre ganger. Etter tilsetning av 125 μ l assay buffer til hver brønn ble platen avlest ved hjelp av *Bio-Plex System* (Bio Rad) og konsentrasjoner kalkulert ved hjelp av *Bio-Plex Manager* software (Bio Rad). Systemet var på forhånd kalibrert og kontrollert etter protokoll [197]. Metoden ble benyttet i celledimensjoneringsforsøk, og resultatene ble relatert til ustimulerte kontrollprøver for beregning av relative endringer i proteinkonsentrasjoner.

3.6 Isolering av RNA

3.6.1 Bakgrunn

Isolering av RNA ved bruk av kolonner er en metode som kombinerer de spesifikke bindingsegenskapene av en silikabasert membran med farten av mikrospin-teknologi. Et buffersystem med høy saltkonsentrasjon gjør at opptil 100 µg av RNA kan feste seg til membranen. Ved bruk av et *RNeasy-kit* (Qiagen) vil kun RNA-sekvenser lengre enn 200 nukleotider feste seg til silikamembranen og renses ut. Dette gir en ”beriking” av mRNA ettersom de fleste RNA-molekyler av mindre størrelse, som 5.8S, 5S ribosomalt RNA (rRNA) og transport RNA (tRNA), blir ekskludert. En denaturerende guanidine-thiocyanat-buffer renser de biologiske prøvene for ribonuklease (RNase) slik at RNA-et som isoleres er intakt. Etanol tilsettes så for optimale bindingsforhold. I en minispinn-kolonne fester totalt RNA seg til membranen og forurensinger vaskes bort [198].

3.6.2 Protokoll

RNeasy Mini kit (Qiagen, katalognr.74104) ble benyttet for isolering av RNA. Før start ble merkapttoetanol tilsatt RLT-buffer og RPE-bufferkonsentrat løst i etanol etter protokoll. Cellepelletten ble tint og cellene ble løst opp ved tilsetning av 350 µl RLT-buffer (etter protokoll for $<5 \times 10^6$ pelleterte celler). Blandingen ble mikset ved pipettering, vortexet og deretter fryst til -80 °C for fullstendig homogenisering. 350 µl 70 % etanol ble så tilsatt løsningen som ble blandet godt ved pipettering. Deretter ble 700 µl av prøven overført til en *RNeasy spin-kolonne* i et 2 ml stort samlerør. Røret ble lukket og spunnet 15 sekunder ved $>8000g$.

Det ble gjort deoksyribonuklease (DNase)-behandling av alle prøvene for å forsikre fullstendig ødeleggelse av genomisk deoksyribonukleinsyre (DNA). *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, katalognr. 79254) ble benyttet:

350 µl RW1-buffer ble tilsatt kolonnen som så ble spunnet 15 sekunder ved $8000g$ for vask av kolonnemembranen. ”Flow through” ble kastet. 10 µl DNase I-løsning ble tilsatt 70 µl RDD-buffer og blandingen mikset forsiktig ved kort sentrifugering. DNase I er spesielt sensitiv for fysisk denaturering og må derfor ikke vortexes. 80 µl DNase I-inkubasjonsmiksb ble tilsatt direkte på membranen, og kolonnen inkubert i 15 minutter ved romtemperatur. Deretter ble

350 µl RW1-buffer tilsatt og kolonnen spunnet ved >8000g i 15 sekunder. "flow through" ble kastet.

Etter DNase-behandlingen ble 700 µl RW1 tilsatt og røret ble spunnet 15 sekunder ved >8000g for vask av kolonnemembranen. 500 µl RPE-buffer tilsatt før kolonnen igjen ble spunnet ved 8000g i 15 sekunder. Samme mengde RPE-buffer ble igjen tilsatt og kolonnen spunnet på samme hastighet i to minutter. "Flow through" ble kastet mellom alle vaskestegene. Kolonnen ble deretter overført til et nytt rør og 30-50 µl RNase-fritt vann tilsatt. Røret ble til slutt spunnet i ett minutt ved 8000g for å eluere RNA [198].

RNA-konsentrasjon ble målt ved hjelp av *NanoDrop* og RNA-integriteten testet ved hjelp av *Bioanalyzer*. Kun RNA med tilfredsstillende kvalitet (RNA integrity number (RIN)>8) ble benyttet videre til cDNA-syntese.

3.7 Syntese av cDNA

3.7.1 Bakgrunn

Før genuttrykk kan måles ved hjelp av *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR), må RNA-et først kopieres til cDNA av enzymet revers transkriptase (RT). En presis syntese er viktig, ettersom mengden cDNA som dannes må reflektere mRNA-et fra prøven nøyaktig. Det anbefales derfor å optimalisere dette steget ved alltid å bruke samme primerstrategi og betingelser for prøver som skal sammenliknes. De tre standardmetodene for primerbruk er basert på oligo dT-primere, såkalte "random sequence" primere og genspesifikke primere [199].

3.7.2 Protokoll

Syntese av cDNA ble utført ved bruk av *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (tidligere: *High-Capacity cDNA Archive Kit*, Applied Biosystems, katalognr. 4368813). Kitet inneholder alle reagenser nødvendig for syntese av enkeltrådet cDNA fra total-RNA. 2X RT-mastermiks ble tillaget av 10X RT-buffer, 10X RT-"random sequence"-primere, 25X deoksyribonukleotid trifosfat (dNTP)-miks, Multiscribe reverse transkriptase, RNase-hemmer og nuklease-fritt H₂O, etter protokoll. 10 µl 2X RT-mastermiks og 10 µl RNA (100/150 ng) ble pipettert ut i hver brønn av en 96-brønners plate. Innholdet ble blandet ved pipettering.

Platen ble deretter forseglet og sentrifugert kort for å eliminere luftbobler. Den reverse transkripsjonen ble startet med optimal temperatursyklus for *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* i en "thermal cycler" og reaksjonsvolumet ble satt til 20 µl. Det ferdige cDNA-et ble deretter lagret i RT-platen ved -18 °C [200].

3.8 qPCR – Quantitative real time polymerase chain reaction

3.8.1 Bakgrunn

Med qPCR kan i prinsippet enhver nukleinsyresekvens amplifiseres i en syklisk prosess for å generere et stort antall identiske kopier, som så kan analyseres. qPCR er en etablert teknikk for kvantifisering av mRNA i biologiske prøver. Den er spesielt egnet til immunologisk forskning fordi mange av målproteinene, som cytokiner, finnes i så små konsentrasjoner at det er den eneste måten som sikkert kan måle uttrykket *in vivo* [201, 202].

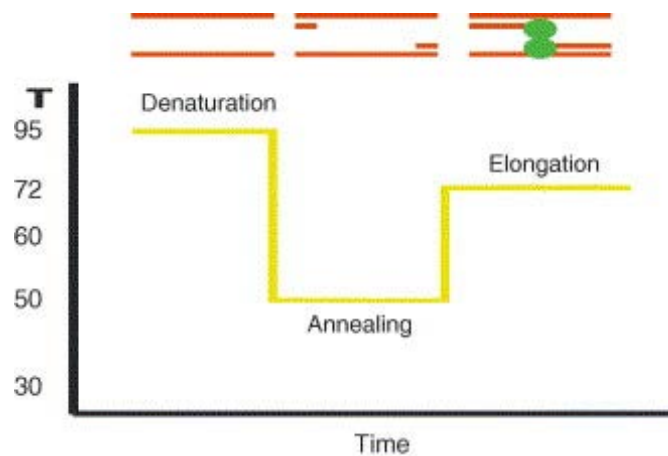
Reaksjonen skjer på et DNA-templat, som kan være enkel- eller dobbeltrådet, ved hjelp av en varmestabil DNA-polymerase, to sekvensspesifikke primere, de fire nukleotidbasene og en buffer med magnesiumioner. Det er også nødvendig med en fluoriserende reporter som binder seg til produktet som dannes og gir mulighet for detektering [202]. Med qPCR karakteriseres reaksjonen ved den tiden i en syklus der amplifisering kommer over et visst terskelnivå, kalt "threshold". Dette er i motsetning til end-time PCR som måler antall amplifiseringer etter et visst antall sykluser. Reaksjonen skjer gjennom temperatursykluser med en initial høy temperatur som bryter trådene fra hverandre. Deretter reduseres temperaturen så primerne kan feste seg til trådene, og deretter økes temperaturen for syntese (figur 8). Optimal temperatur for *Thermus aquaticus* (Taq)-polymerasen er 72 °C og den elongeringstemperaturen som brukes i de fleste trestegs PCR-forsøk. Ved 100 % effektivitet vil det for hver syklus skje en fordobling av målsekvensen. Reporteren genererer et fluoriserende signal som reflekterer mengden produkt som er dannet. I de første syklusene er signalet svakt, men øker så eksponentielt før det flater av når reaksjonen mettes. Metningen skyldes at ett eller flere av substratene i reaksjonen går tomme.

Som vist i figur 9 registreres fluoriseringen når den kommer over et visst terskelnivå. Antallet sykluser som trengs for å nå denne verdien, gis benevnningen Ct (cycle threshold). Jo høyere

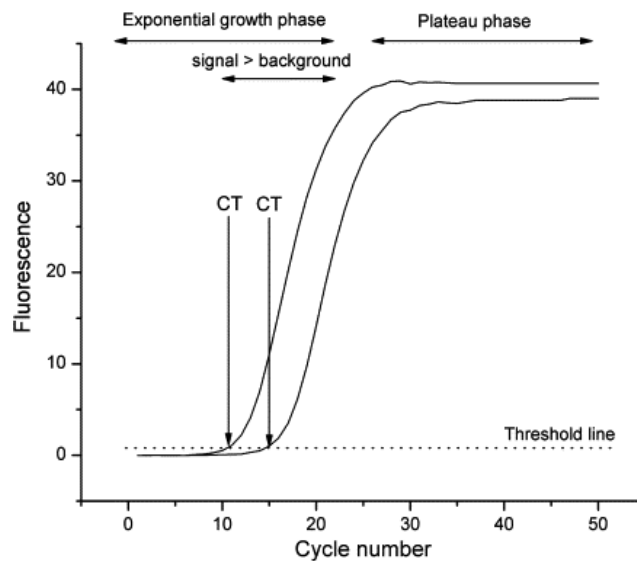
antall av kopier som produseres av målsekvensen, jo tidligere kan en signifikant fluorisering observeres [202].

Det vil si at hvis et gen er høyt uttrykt, vil et høyt antall kopier produseres, fluoriseringen vil nå terskelnivået raskt, og man får en lav Ct-verdi.

Kvantifisering av genuttrykk ved bruk av real time-PCR krever spesifikke likninger og betingelser. En standardkurve av kjente konsentrasjoner kan brukes som kalibrator for å generere verdier av det målte genuttrykket. Eventuelt kan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -metoden benyttes til å beregne relative verdier for genekspressjon. Metoden går ut på at genuttrykket som måles, relateres til et internt referansegen og normaliseres til en kalibrator. Meningen med det interne referansegenet er å relatere resultatene til mengden RNA som er tilført revers transkriptase-reaksjonen. Standard referansegener som β -actin er som regel tilstrekkelig som intern kontroll. Det enkleste valget av kalibrator er ubehandlede kontroller [203].



Figur 8. PCR-temperatursyklus: En initiell økning i temperaturen til ca. 95 °C bryter DNA-trådene fra hverandre. Deretter reduseres temperaturen så primerene kan feste seg til hver sin enkelttråd. Temperaturen er avhengig av hvilke primere som benyttes og skal ligge noen få grader under de respektive smeltepunktene. Temperaturen økes så til 72 °C for syntese. Temperatur er optimal for DNA-polymerasen fra *Thermus aquaticus* (Taq-polymerase). [202]



Figur 9. PCR-responskurver. Et terskelnivå ("threshold line") settes over bakgrunnen, og antall sykluser som trengs for å nå terskelverdien, registreres. Denne verdien betegnes cycle threshold (Ct). [202]

TaqMan PCR

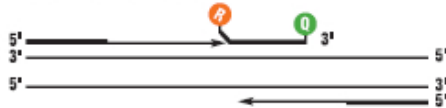
Det finnes mange ulike reportere, både sekvensspesifikke og ikke-spesifikke [202]. I motsetning til SYBR Green, der den fluoriserende fargen kan feste seg til alt dobbeltrådet DNA, bruker TaqMan en sekvensspesifikk probe. Den fluoriserende proben er en enkelttrådet oligonukleotid av 20-26 nukleotider. Som figur 10 viser, inneholder sekvensen et "reporter"-molekyl og et "quencer"-molekyl som kovalent fester seg til henholdsvis 5`-og 3`-enden av den respektive DNA-tråden. Når proben er intakt, hemmes reporter-fluoriseringen. Under reaksjonen, når proben er festet til sin komplementære sekvens mellom primerene, vil DNA-polymerasen kløyve proben. Dette skiller "reporter"-molekylet og "quencer"-molekylet fra hverandre, og fluoriseringen til reporteren øker. Denne prosessen skjer for hver PCR-syklus, men påvirker ikke den eksponensielle amplifiseringen av produktet. Akkumuleringen av produktet kan dermed måles direkte ved å måle det fluoriserende signalet. Fordi proben er sekvensspesifikk, vil ingen uspesifikke amplikoner detekteres i en TaqMan-qPCR [204, 205].

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

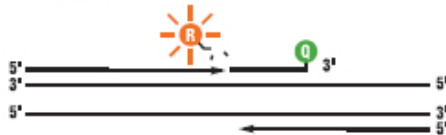
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



Figur 10. TaqMan-sekvensen inneholder et "reporter"-molekyl (R) og et "quencher"-molekyl (Q) som kovalent fester seg til henholdsvis 5' - og 3' - enden av DNA-tråden. Når proben er intakt, hemmes reporter-fluoriseringen. Under reaksjonen, når proben er festet til sin komplementære sekvens mellom primerene, vil DNA-polymerasen kløyve proben. Dermed skilles "reporter"-molekylet og "quencher"-molekylet fra hverandre, og dette øker fluoriseringen til reporteren slik at den kan detekteres. [206]

3.8.2 Protokoll

qPCR ble utført ved bruk av *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) og *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). cDNA ble tint på is og sentrifugert før bruk. Mastermiks ble tillaget av *TaqMan Universal PCR Expression Mastermix* (Applied Biosystems, part nr. 4304437), 20 X sekvensspesifikke primere og probe samt RNase-fritt H₂O (5 Prime, katalognr.2500000). Mengden som ble tillaget, tilsvarte 10 µl *TaqMan Universal PCR Expression Mastermix*, 1 µl 20 X primere og probe, og 6,5 µl RNase-fritt H₂O til hver prøve. Prøvene ble kjørt i duplikater, og mengdene ble derfor doblet før tillaging. Det ble også regnet med et 10 % slingringsmonn ved tillaging av mastermiksen. Tuben med ferdig mastermiks ble blandet i en vortexmikser. Hver brønn i en 96-brønners plate (*MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems, part nr. 4366932) ble tilsatt 2,5 µl

cDNA og 17,5 μ l mastermiks. Volumet i radene ble blandet forsiktig med en åttekanals pipette. Platen ble forseglet med en *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems, part nr. 4360954) og sentrifugert for homogenisering og eliminering av luftbobler [205].

2- $\Delta\Delta$ Ct-metoden ble valgt til å beregne relative konsentrasjoner for genuttrykk. Friske kontroller ble brukt som kalibrator der dette var mulig, og β -actin og 18S ble brukt som referansegener avhengig av hvilke prøver som ble analysert.

3.9 Statistisk analyse

3.9.1 Karakteristikk av testpersoner

For sammenlikning av karakteristika for asymptotiske og symptomatiske carotispasienter (tabell 2) er det benyttet t-test for kontinuerlige data. For anginpasientene (tabell 3) er Mann-Whitney *U*-testen benyttet for sammenlikning av gruppene. Dataene er presentert med gjennomsnitt og "standard error of the mean" (SEM). For kategoriske data er det benyttet Khikvadrettest og Fischers exact-test for begge pasientpopulasjonene. Disse dataene er presentert som andel i prosent eller som antall. Mann-Whitney *U*- og t-tester ble utført ved hjelp av graf- og statistikkprogrammet *GraphPad Prism 5* og Khikvadrat- og Fischers exact-tester ble utført ved hjelp av statistikkprogrammet *PASW Statistics 17*. Statistisk signifikans ble bestemt ved en p-verdi på $<0,05$.

3.9.2 Forsøksresultater

Den ikke-parametriske Mann-Whitney *U*-testen ble brukt til bestemmelse av eventuelle signifikante forskjeller mellom kontinuerlige data i uavhengige grupper. For celledstimuleringsforsøk ble den ikke-parametriske Wilcoxon rangnummertesten benyttet. Resultatene er presentert med gjennomsnitt og SEM. Statistisk analyse og generering av figurer ble utført ved hjelp av graf- og statistikkprogrammet *GraphPad Prism 5*. Statistisk signifikans ble bestemt ved en p-verdi på $<0,05$.

4 Resultater

4.1 Vevs- og celledistribusjon av IL-9 og IL-9R

Som nevnt vet man betydelig mindre om hvilke humane celler som uttrykker IL-9 og IL-9R, sammenliknet med hvilke murine celler som uttrykker dem (se avsnitt 1.5). Vi utførte derfor en screening av celler og vev sentralt i den aterosklerotiske prosessen for å kartlegge IL-9- og IL-9R-geneekspressjon. For IL-9 ble genuttrykk målt i TNF- α -stimulerte monocytter (n=4), carotisplakk (n=4), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (n=2), PBMC (n=2), CD8+T-celler (n=1), CD3+T-celler (n=4) og blodplater (n=1). Som vist i tabell 1 så vi lav geneekspressjon i PBMC og blodplater, men ingen detekterbar geneekspressjon i de andre celle- og vevstypene.

For IL-9R ble genuttrykk målt i TNF- α -stimulerte monocytter (n=3), carotisplakk (n=3), HUVEC (n=2), PBMC (n=2), CD8+T-celler (n=1), CD3+T-celler (n=4), blodplater (n=1), samt GMC (n=4) (tabell 1). Vi fant geneekspressjon av IL-9R i carotisplakk, PBMC, CD8+T-celler og CD3+T-celler. De øvrige celletypene viste ingen detekterbar geneekspressjon.

Tabell 1. IL-9- og IL-9R-geneekspressjon ved screening av celler og vev sentralt i den aterosklerotiske prosessen.

Vev/celletype	Genuttrykk av IL-9	Genuttrykk av IL-9R
TNF-α-stimulerte monocytter	-	-
Carotisplakk	-	(+)
HUVEC	-	-
PBMC	(+)	+
CD8+T-celler	-	(+)
CD3+T-celler	-	(+)
Blodplater	(+)	-
GMC	(ikke testet)	-

"-" tilsvarer ingen detekterbar geneekspressjon, "(+)" tilsvarer Ct \geq 30, "+" tilsvarer Ct \geq 25. Ct=cycle threshold, TNF- α =tumornekrosefaktor α , HUVEC=human umbilical vein endothelial cells, PBMC=peripheral blood mononuclear cell, CD=cluster of differentiation, GMC=glattmuskelcelle.

4.2 IL-9 og IL-9R hos pasienter med klinisk aterosklerose

Cytokin- og cytokinreseptor-konsentrasjoner er sett endret ved aterosklerotisk sykdom (avsnitt 1.4.3). For å undersøke om en slik regulering også finnes for IL-9 og dens reseptor, ble tilstedeværelse av IL-9 og IL-9R målt hos pasienter med etablert koronar og carotid aterosklerotisk hjerte- og karsykdom.

4.2.1 Karakteristikk av testpersoner

Karakteristika av carotisstenose-populasjon og kontroller som er inkludert i studien, er beskrevet i tabell 2. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppen av pasienter med asymptomatisk og gruppen av pasienter med symptomatisk carotisstenose når vi sammenliknet alder, kjønn, KMI, stenosegrad, andelen med lavekkogene plakk eller andelen av røykere, pasienter med diabetes eller hypertensjon. Heller ikke for CRP, medikamentbruk eller blodlipidverdier.

Tabell 2. Karakteristikk av carotisstenose-populasjon.

	Kontroller* (n=28)	n**	Asymptomatisk carotisstenose (n=52)	n	Symptomatisk carotisstenose (n=87)	n	p-verdi
Alder, år	58±2	27	66±1	52	67±1	87	0,489
Kjønn, K/M	9/19	28	15/37	52	32/55	87	0,404
KMI, kg/m ²	24,5±0,5	28	26,9±0,6	43	25,7±0,5	67	0,207
Stenosegrad (prosent stenose)	-	-	77,8±2,6	50	81,2±1,2	82	0,160
Lavekkogene plakk, %	-	-	17	52	31	87	0,784
Røykere, %	17	27	87	52	56	76	0,449
Hypertensjon,%***	-	-	67	52	63	80	0,720
CRP, mg/l	1,2±0,2	11	7,2±1,5	45	5,1±0,7	81	0,150
Diabetes, %	-	-	14	49	16	84	0,716
Medikamenter, %							
ASA	-	-	77	48	83	82	0,476
Statiner	-	-	85	49	85	84	0,765
Totalkolesterol, mmol/l	6,1±0,2	26	4,2±0,1	39	4,5±1,2	49	0,349
LDL-kolesterol, mmol/l	3,9±0,2	26	2,5±1,1	37	2,7±1,7	44	0,324
HDL kolesterol, mmol/l	1,7±0,1	26	1,3±0,5	38	1,3±0,5	47	0,913
Triglyserider, mmol/l	1,0±0,1	26	1,5±0,1	38	1,5±0,1	41	0,786

Dataene er presentert som gjennomsnitt±SEM eller som andel i prosent (%). Kjønn er presentert som antall. P-verdier viser til forskjeller mellom asymptotiske og symptomatiske pasienter. To av pasientene med asymptotisk carotisstenose som er inkludert i tabellen, er ikke analysert grunnet for lite prøvevolum. K=kvinner, M=menn, KMI=kroppsmasseindeks, CRP=C-reaktivt protein, ASA=acetylsalisylsyre, Statiner=hydroksymetyl-glutaryl coenzym A reduktase-hemmere, LDL=low density lipoprotein, HDL=high density lipoprotein. *Kontroller for carotisplasmaprøver. n** viser til antall personer der informasjon var tilgjengelig for gjeldende egenskap. *** Hypertensjon er definert som bruk av antihypertensive medikamenter.

Karakteristika og sammenlikning av testpersoner med stabil og ustabil angina, samt kontroller er beskrevet i tabell 3. Det var ingen signifikant forskjell mellom gruppen av pasienter med stabil og gruppen av pasienter med ustabil angina når vi sammenliknet alder, kjønn, andel røykere, forekomst av hypertensjon eller diabetes. Sammenlikning av blodlipidverdier eller bruk av medikamenter viste heller ingen signifikante forskjeller. Vi så imidlertid en signifikant høyere andel av personer med forhøyet CRP (klassifisert som CRP > 5 mg/l [44]), i gruppen av pasienter med ustabil angina sammenliknet med stabil angina.

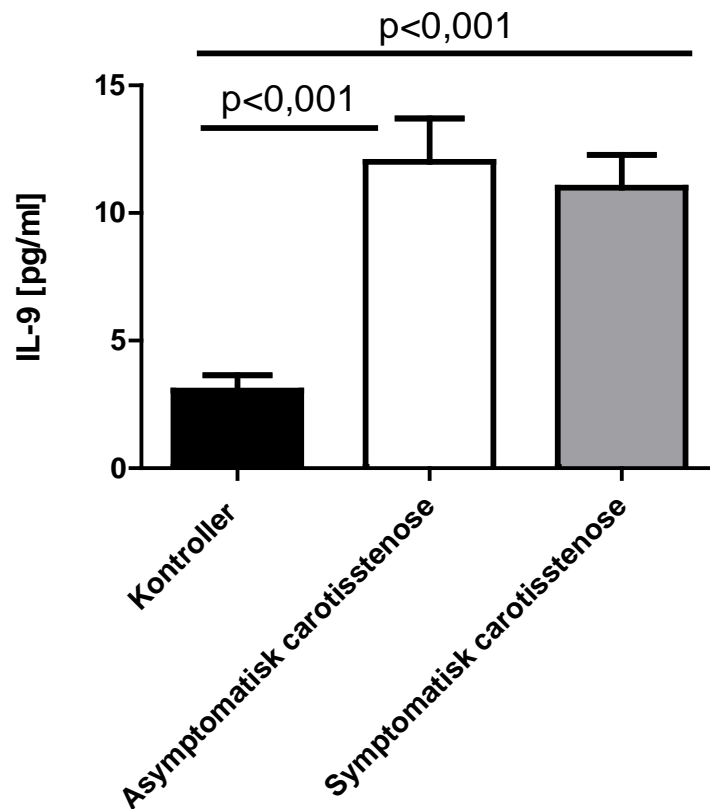
Tabell 3. Karakteristikk av angina-populasjon.

	Kontroller (n=11)*	Stabil angina pectoris (n=11)	Ustabil angina pectoris (n=18)	p-verdi
Alder, år	59±2	69±3	68±3	0,823
Kjønn, K/M	3/8	2/9	6/12	0,671
Røykere, %	10	18	39	0,412
Hypertensjon, %	0	18	28	0,677
Diabetes, %	0	18	6	0,539
CRP>5mg/l, %	-	22	79	<0,01
Medikamenter, %				
Beta-blokkere	0	82	94	0,539
ASA	0	82	94	0,539
Statiner	0	55	78	0,237
Ca-ant.	0	9	17	1,000
LMWH		0	17	0,268
Warfarin	0	9	6	1,000
Klopidogrel		36	72	0,112
Gp IIa/IIb-ant.	0	0	6	1,000
Totalkolesterol, mmol/l	4,3±0,6	4,3±0,2	4,6±0,3	0,469
LDL-kolesterol, mmol/l	2,6±0,6	2,6±0,2	3,1±0,2	0,288
HDL kolesterol, mmol/l	1,4±0,3	1,5±0,1	1,4±0,1	0,245
Triglyserider, mmol/l	1,5±0,4	1,4±0,3	1,4±0,1	0,721

Dataene er presentert som gjennomsnitt±SEM eller andel i prosent (%). Kjønn er presentert som antall. P-verdier viser til forskjeller mellom stabil og ustabil angina pectoris. CRP-verdier var kun tilgjengelig fra ni pasienter med stabil angina pectoris. K=kvinner, M=menn, CRP=C-reaktivt protein, ASA=acetylsalisylsyre, Statiner=hydroksymetyl-glutaryl coenzym A reduktase-hemmere, Ca-ant.=kalsium antagonist, LMWH=low molecular weight heparin, Gp IIa/IIb-ant=glykoprotein IIa/IIb-antagonist, LDL=low density lipoprotein, HDL=high density lipoprotein. *Pasientinformasjon fra kontrollgruppen er tidligere beskrevet av Smith og medarbeidere [207], og gjennomsnittsverdiene for kontrollpersoner i tabellen er derfor basert på den opprinnelige kontrollpopulasjonen (n=20).

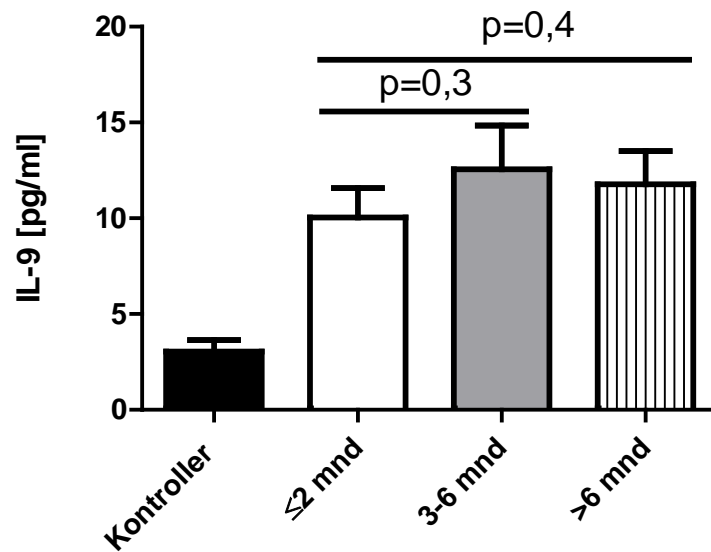
4.2.2 Sirkulerende IL-9 hos pasienter med carotisstenose

Plasmanivåer av IL-9 ble analysert hos pasienter med asymptomatisk (n=50) og symptomatisk (n=87) carotisstenose. Plasma fra friske testpersoner ble brukt som kontroller (n=28). Vi så signifikant høyere konsentrasjon av IL-9 i plasma hos syke (både asymptomatiske og symptomatiske) sammenliknet med friske kontroller (p<0,001), men ingen signifikant forskjell mellom asymptomatisk og symptomatisk tilstand (figur 11). For kontroller var gjennomsnittlig plasmaverdi 3,0 (±0,6) pg/ml og for asymptomatiske og symptomatiske pasienter var verdiene henholdsvis 12,0 (±1,7) pg/ml og 10,9 (±1,3) pg/ml.



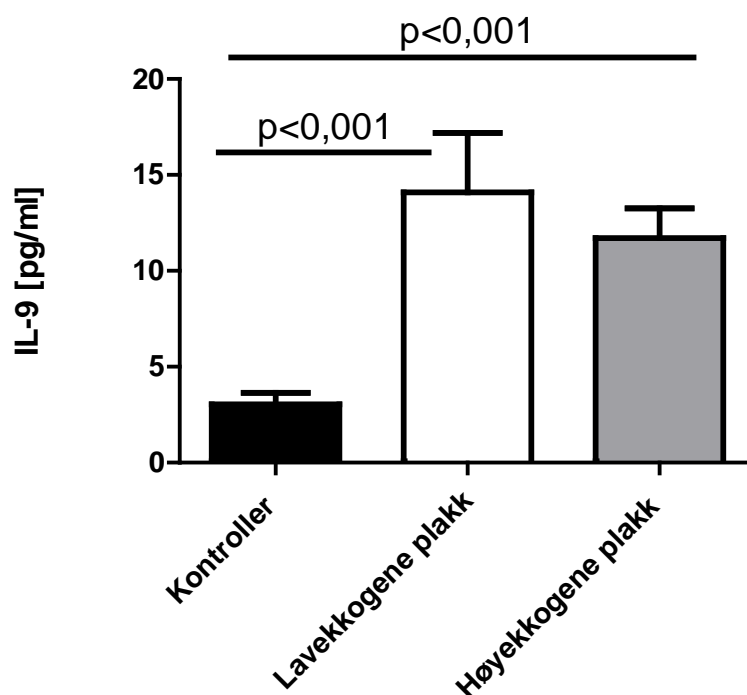
Figur 11. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos friske kontroll (n=28), pasienter med asymptomatisk (n=50) og symptomatisk (n=87) carotisstenose. Resultatene er presentert som gjennomsnitt±SEM.

Pasientene ble også delt inn i grupper etter antall måneder siden siste kliniske symptom. Som presentert i figur 12, så vi ingen signifikante forskjeller mellom pasientene når de var klassifisert etter måneder siden siste symptom: under eller lik to måneder siden siste symptom (n=52), tre til seks måneder siden siste symptom (n=35) eller fravær av symptomer de siste seks månedene (n=49) (per definisjon asymptomatiske). Gjennomsnittlige plasmanivåer for de ulike gruppene var henholdsvis 10,0 (±1,5), 12,6 (±2,3) og 11,8 (±1,7) pg/ml. Kontrollene (n=28) hadde, som nevnt, gjennomsnittlige plasmanivå av IL-9 på 3,0 (±0,6) pg/ml.



Figur 12. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos kontroller og pasienter med carotisstenose klassifisert etter måneder (mnd) siden siste kliniske symptom. Fra venstre kontroller (n=28), pasienter med under eller lik to måneder siden siste symptom (n=52), tre til seks måneder siden siste symptom (n=35) og pasienter som har vært symptomfrie i over seks måneder (n=49) (asymptomatiske). Resultatene er presentert som gjennomsnitt±SEM.

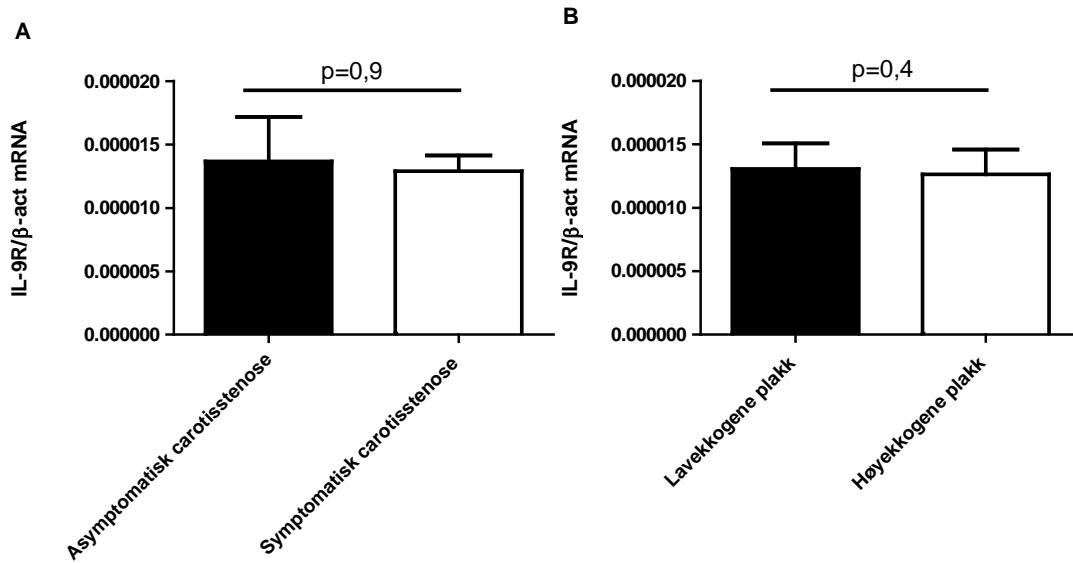
Som nevnt har pasienter med lavekkogene plakk høyere risiko for hjerneslag sammenliknet med pasienter som har høyekkgogene plakk (avsnitt 1.2.1). Vi sammenliknet derfor også plasmaverdier av IL-9 hos pasienter klassifisert etter plakkmorfologi. Vi så en signifikant høyere konsentrasjon av IL-9 i plasma fra pasienter med lavekkogene (n=27) og høyekkgogene (n=59) plakk, sammenliknet med kontroller (n=28), $p < 0,001$ (figur 13). Vi så ingen signifikant forskjell i plasmanivå mellom pasienter med lavekkogene og høyekkgogene plakk. For kontroller var gjennomsnittlig plasmanivå 3,0 ($\pm 0,6$) pg/ml, og for pasienter med lavekkogene og høyekkgogene plakk var verdiene henholdsvis 14,1 ($\pm 3,0$) pg/ml og 11,7 ($\pm 1,6$) pg/ml.



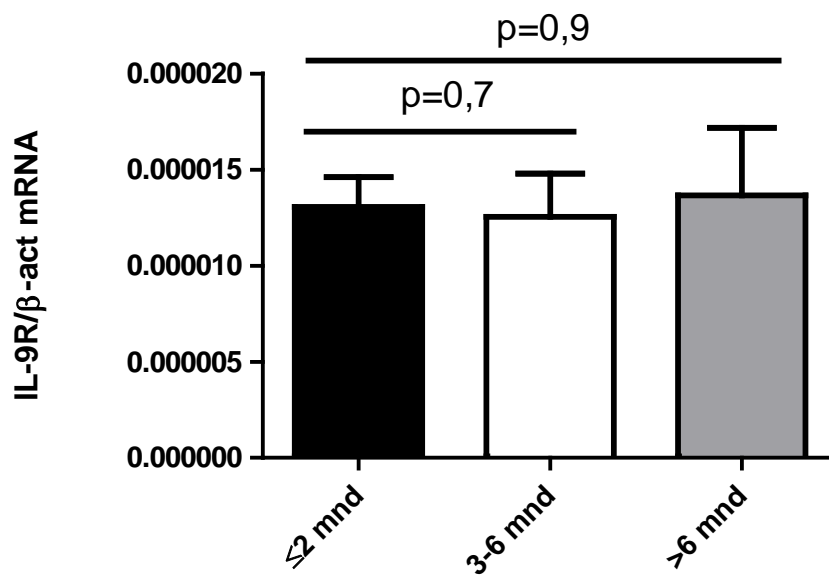
Figur 13. Plasmanivåer av IL-9 (pg/ml) hos friske kontroller (n=28) og hos pasienter med lavekkogene (n=27) og høyekkogene (n=59) plakk. Resultatene er presentert som gjennomsnitt±SEM.

4.2.3 Genuttrykk av IL-9R i carotisplakk

Screeningen med qPCR viste genuttrykk av IL-9R i carotisplakk, noe som tyder på at plakkene kan respondere på IL-9. For å undersøke dette nærmere ble genuttrykk av IL-9R kvantifisert i carotisplakk fra pasienter med påvist carotisstenose. Resultatene ble relatert til β -actin. Vi så ingen signifikant forskjell i genuttrykk av IL-9R i plakk hos pasienter med asymptomatisk (n=17) sammenliknet med symptomatisk (n=51) carotisstenose, $p=0,9$ (figur 14A). Vi så heller ingen signifikant forskjell i genuttrykk for IL-9R når vi sammenliknet lavekkogene (n=18) og høyekkogene (n=33) plakk, $p=0,4$ (figur 14B). Pasientene ble også delt inn etter måneder siden siste kliniske symptom, som vist i figur 15. Gruppen bestod av, som beskrevet, pasienter med under eller lik to måneder siden siste symptom (n=37), tre til seks måneder siden siste symptom (n=20) og symptomfrihet i minst seks måneder (asymptomatiske) (n=13). Disse resultatene er ikke normalisert mot kontroller, ettersom IL-9R-mRNA ikke ble detektert i kontrollprøvene hentet fra friske nyrearterier.



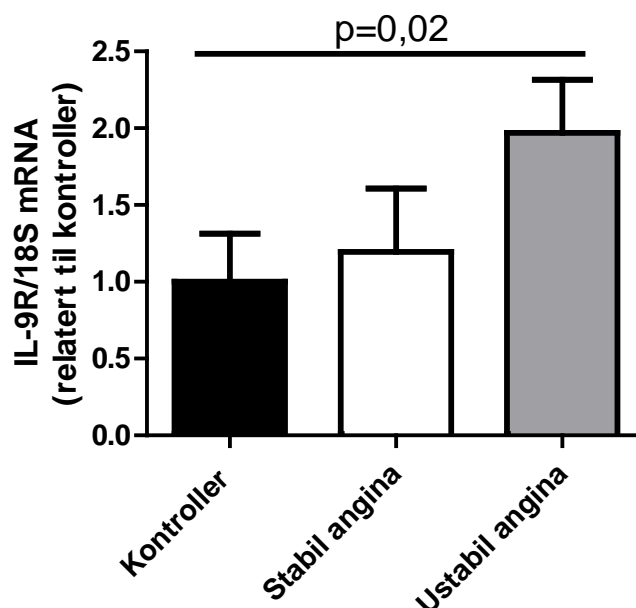
Figur 14. Genuttrykk av IL-9R i carotisplakk hos pasienter med asymptomatisk (n=17) og symptomatisk (n=51) tilstand (A), og lavekkogene (n=18) og høyekogene (n=33) plakk (B). Resultatene er relatert til β-actin (β-act) og presentert som gjennomsnitt±SEM.



Figur 15. Genuttrykk av IL-9R i carotisplakk fra pasienter med under eller lik to måneder siden siste symptom (n=37), tre til seks måneder siden siste symptom (n=20) og pasienter som har vært symptomfrie i minst seks måneder (asymptomatiske) (n=13). Resultatene er relatert til β-actin (β-act) og presentert som gjennomsnitt±SEM.

4.2.4 Genuttrykk av IL-9R i T-celler fra pasienter med stabil og ustabil angina pectoris

CD4⁺-T-celler er trolig hovedkilden til IL-9 hos mennesker [173], og humane T-celler er også sett å respondere på IL-9 *in vitro* (avsnitt 1.5.4). CD3⁺-T-celler består av både CD4⁺- og CD8⁺-T-celler [78, 92] og vi så indikasjon på genuttrykk av IL-9R i disse cellene i qPCR-screeningen (tabell 1). Vi ønsket videre å sammenlikne dette uttrykket i celler hentet fra pasienter med aterosklerotisk hjerte- og karsykdom, med friske individer. mRNA-nivået for IL-9R ble derfor kvantifisert i CD3⁺-T-celler fra pasienter med stabil (n=11) og ustabil (n=18) angina, samt friske kontrollere (n=11). Genuttrykk av IL-9R var signifikant høyere hos pasienter med ustabil angina sammenliknet med friske, p=0,02. Det så også ut til å være en ikke-signifikant trend der genuttrykk av IL-9R var positivt korrelert med alvorlighetsgrad av tilstand (figur 16). Resultatene ble relatert til 18S rRNA og normalisert mot friske kontrollere.



Figur 16. Genuttrykk av IL-9R i CD3⁺-T-celler fra kontrollere (n=11), pasienter med stabil (n=11) og ustabil (n=18) angina. Resultatene er relatert til referanseggen 18S rRNA og deretter normalisert mot kontrollere.

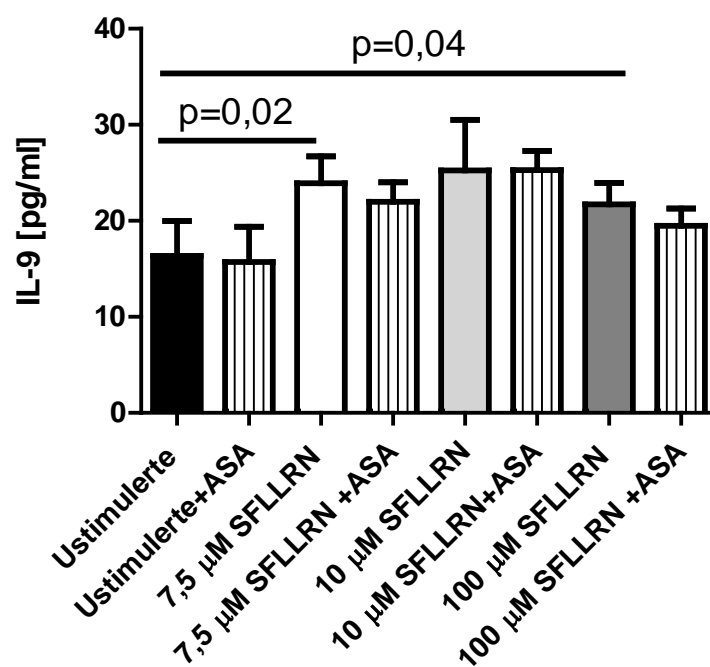
4.3 Regulering av IL-9 i humane celler og effekt av IL-9 på cytokinfrigjøring

For å forstå betydningen av IL-9 er det viktig å forstå hvordan cytokinet selv blir regulert og hvordan det påvirker andre faktorer. Det ble derfor utført celledimensjonerte forsøk på humane

celler for å måle frigjøring av IL-9 og for å undersøke effekten av IL-9-stimulering. Cellene benyttet til disse mekanistiske forsøkene er samlet inn fra friske, frivillige blodgivere (n=11) ansatt ved IIF, Rikshospitalet og studenter ved Avdelingen for ernæringsvitenskap, UiO.

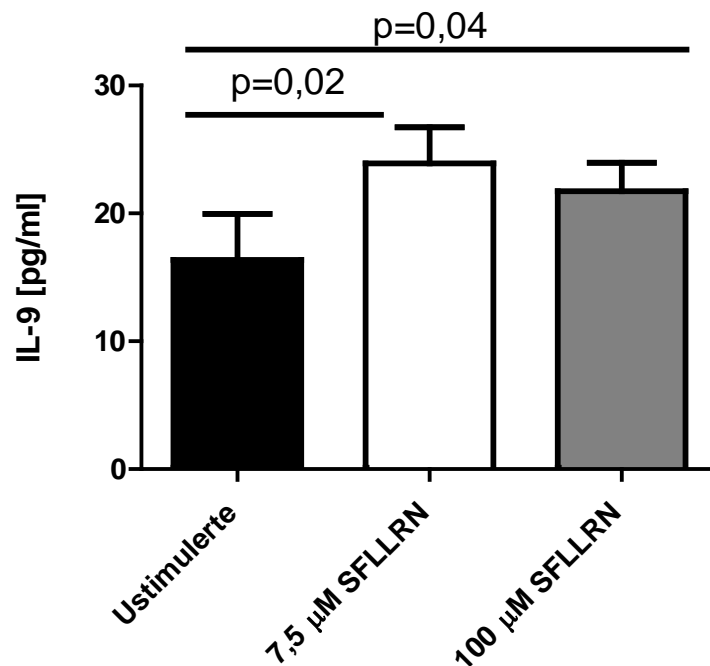
4.3.1 IL-9 i stimulerede blodplater

Det er nå veletablert at platederivert inflammasjon bidrar til den aterosklerotiske utviklingen, og vi ønsket derfor å undersøke om blodplater produserer IL-9. I qPCR-screeningen så vi genuttrykk av IL-9 i disse cellene (tabell 1) og IL-9-proteinfrigjøring ble derfor målt i ustimulerte blodplater og blodplater stimulert med 7,5, 10 eller 100 μ M SFLLRN alene og i kombinasjon med 1 mM ASA (figur 17). Trombinagonist-peptidet SFLLRN aktiverer platene, mens ASA hindrer aktivering ved å hemme tromboksan-dannelse.



Figur 17. Frigjøring av IL-9 (pg/ml) fra ustimulerte blodplater (n=7) og blodplater stimulert med 7,5 (n=7), 10 (n=3) eller 100 μ M (n=7) SFLLRN alene og i kombinasjon med 1 mM ASA (henholdsvis n=7, n=3 og n=7). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. ASA=acetylsalisylsyre, SFLLRN=trombinagonist-peptid.

Som vist i figur 17 og 18 så vi en signifikant forskjell i IL-9-frigjøring fra de ustimulerte cellene og fra celler stimulert med 7,5 μ M (p=0,02) og 100 μ M SFLLRN (p=0,04). Gjennomsnittlig plasmanivå for de ustimulerte prøvene var 16,4 (\pm 3,6) pg/ml, for celler stimulert med 7,5 og 100 μ M SFLLRN henholdsvis 23,9 (\pm 2,8) pg/ml (p=0,02) og 21,7 (\pm 2,2) pg/ml (p=0,04).



Figur 18. Frigjøring av IL-9 (pg/ml) fra ustimulerte blodplater (n=7), blodplater stimulert med 7,5 μM SFLLRN (n=7) og 100 μM SFLLRN, (n=7). Resultatene er presentert som gjennomsnitt±SEM. SFLLRN=trombinagonist-peptid.

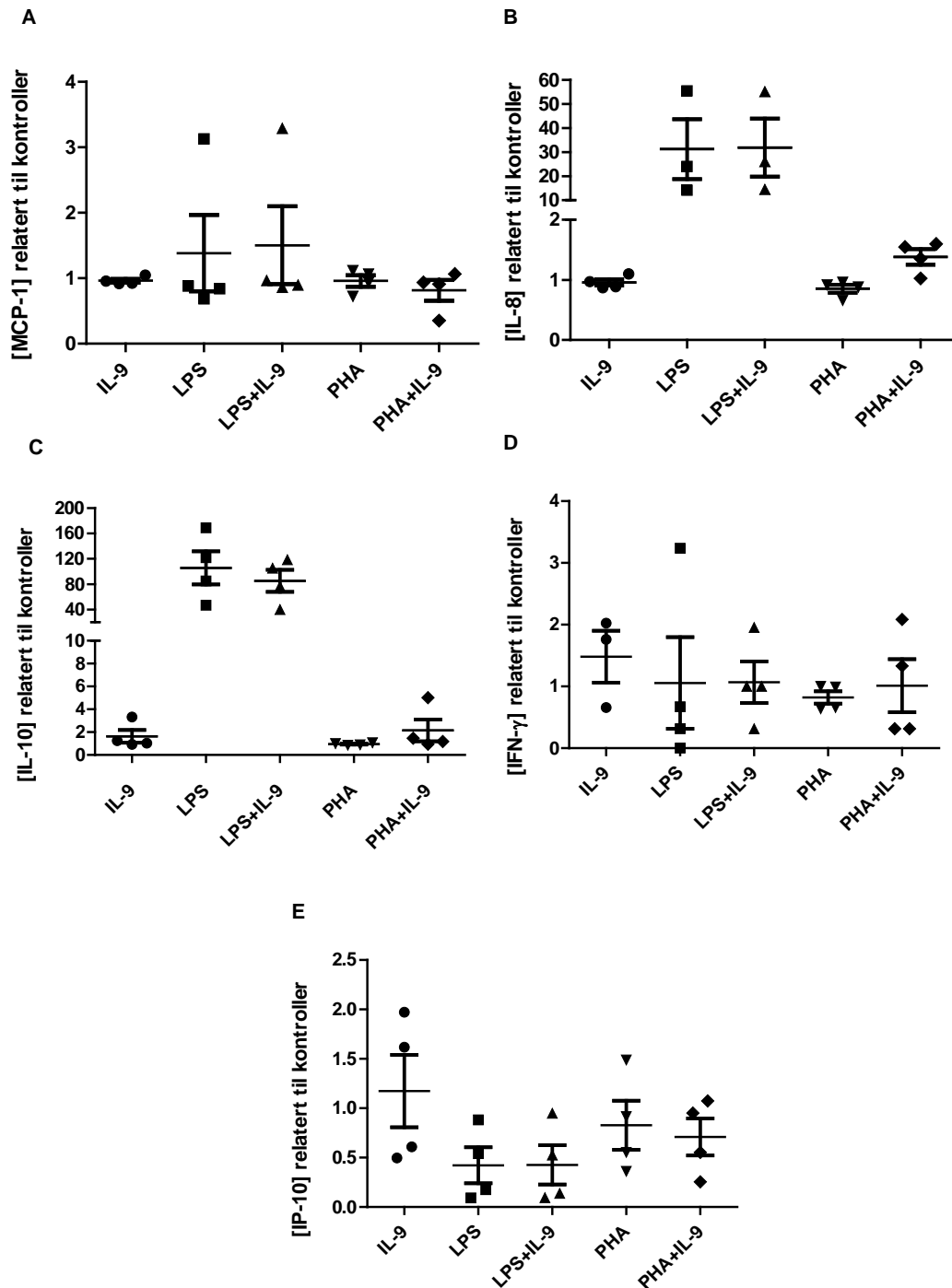
4.3.2 Effekt av IL-9 på produksjon av pro- og antiinflammatoriske cytokiner fra PBMC

Vi ønsket å se om IL-9 hadde en effekt på cytokinfrigjøring fra stimulerte humane celler hentet fra sirkulasjon. PBMC ble stimulert med IL-9 (10 ng/ml) med eller uten LPS (5 ng/ml) eller PHA (20 ng/ml), og pro- og antiinflammatoriske mediatorer ble målt ved hjelp av ELISA og Bio-Plex. Endotoksinet LPS frembringer en immunrespons gjennom aktivering av immunceller. PHA er et lektin som virker spesielt aktiverende på T-celler. Vi testet effekten på de proinflammatoriske og proaterogene cytokinene IL-8, IL-17, IP-10, IFN- γ , IFN α -2, samt MCP-1, og det antiaterogene cytokinet IL-10 [80, 112, 185, 208, 209].

Vi så ingen signifikante forskjeller i MCP-1- og IL-8-frigjøring fra celler stimulert med LPS og celler stimulert med LPS og IL-9, eller mellom celler stimulert med PHA og en kombinasjon av PHA og IL-9 (figur 19A og B).

Vi så heller ingen signifikante effekter av IL-9 på frigjøringen av IL-10, IFN- γ og IP-10, verken med eller uten stimulering med PHA og LPS. Resultatene er presentert i figur 19C-E. Det var imidlertid en ikke-signifikant indikasjon på at IL-9 gir redusert IL-10-frigjøring fra

LPS-stimulerte celler (figur 19C). Nivåene av IL-17 og IFN α -2 var under deteksjonsgrensene for analysens standardkurve, og resultater fra disse er derfor ikke presentert.



Figur 19. Proteinkonsentrasjoner av MCP-1 (A), IL-8 (B), IL-10 (C), IFN- γ (D) og IP-10 (E) i PBMC stimulert med IL-9 (10 ng/ml), LPS (5 ng/ml), LPS+IL-9, PHA (20 ng/ml) eller PHA+IL-9, (n=4). Resultatene er relatert til ustimulerte prøver og presentert som gjennomsnitt \pm SEM. LPS=lipopolysakkarid, PHA=phytohaemagglutinin.

5 Diskusjon

5.1 Diskusjon av metode

5.1.1 Testpersoner og referansegrupper

Alder og kjønn er faktorer som er kjent å påvirke immunfunksjon og cytokinnivåer [210, 211]. Alders- og kjønnsfordelingen i pasient- og kontrollgruppene er derfor matchet. Kontrollindividene i studien var imidlertid i snitt omtrent ti år yngre enn pasientene de ble sammenliknet med, noe som kan virke inn på resultatene.

Der blodprøver er hentet fra friske frivillige, kan sykdomsrelatert påvirkning av cytokinnivåer virke inn på resultatene, ettersom individene er selvrapporert friske og ikke er kontrollert for sykdom. Individene er heller ikke ytterligere kontrollert, og røyking, medikamentbruk og andre faktorer som påvirker inflammasjon kan være skjulte feilkilder. I tillegg er det en stor overvekt av kvinner i denne populasjonen. Prøvene er brukt til celleisolering og cellestimuleringsforsøk, men også som kontroller til pasientprøvene.

Vi så ingen signifikante forskjeller når vi sammenliknet personkarakteristika for gruppen av pasienter med asymptomatisk og gruppen med pasienter av symptomatisk carotisstenose. Når vi sammenliknet karakteristika hos pasienter med stabil og ustabil angina pectoris så vi imidlertid at pasientgruppen med ustabil angina hadde signifikant høyere andel med forhøyet CRP ($> 5\text{mg/l}$) enn pasientgruppen med stabil angina, $p < 0,01$. Dette er også observert tidligere [49], og viser at den systemiske inflammasjonen er oppregulert ved ustabil KVS.

5.1.2 Antall og statistikk

Noen av pasient- og kontrollgruppene hadde få deltakere relativt til gruppene de ble sammenliknet med, og noen signifikante funn er mulig uteblitt grunnet dette. På den andre siden er det trolig en sterk assosiasjon der det tross lite deltakerantall er gjort signifikante funn. Der kravene for lavest aksepterte verdi i Khikvadrattesting av kategoriske data ikke ble innfridd, ble Fischers exact-test benyttet for å korrigere for dette.

I qPCR-screeningen for genuttrykk av IL-9 og IL-9R er svært få prøver inkludert, for noen celletyper kun én. Dette fordi screeningen kun skulle gi indikasjon på tilstedeværelse av

genuttrykk som et utgangspunkt for videre arbeid. I tillegg var det kun tilgjengelige, nedfryste prøver som ble benyttet. Dette kan ha ført til at resultater har uteblitt, men ingen konklusjoner er gjort kun på bakgrunn av disse screeningene, ettersom observasjon av genuttrykk er testet videre med et større utvalg av prøver.

5.1.3 Blodprøvetakning, lagring av prøver og celleisolering

Et viktig element i denne studien var å undersøke cytokinnivåer i plasma hos pasienter med påvist aterosklerotisk hjerte- og karsykdom og sammenlikne dem med friske kontroller. Vi undersøkte også cytokinfrigjøring fra blodceller isolert fra friske testpersoner. I blodprøvetaking og behandling av blod er det mange faktorer som kan føre til aktivering av cellene og dermed utslag i cytokinnivåene som måles. Disse faktorene inkluderer blant annet prosedyrer for selve blodprøvetakningen, tid på dagen blodprøven tas, forurensning av prøverørene, forurensning av buffere og media, tid før lagring, samt fryse- og tinesykluser. Også testpersonens fysiologiske tilstand kan påvirke prøveresultatene, som stress, faste versus ikke-faste og fysisk aktivitet [212].

Påvirkningen kan imidlertid minimaliseres ved å følge faste, standardiserte protokoller og retningslinjer for prøvetakning og lagring. Dette vil redusere interanalyse-variasjonene og generere sammenlignbare resultater. Med hensyn til blodprøvetakning og oppbevaring bør blodprøver tappes i sterile rør med antikoagulanter, plasseres på is straks etter tapping og spinnes raskt ned. Blodcellene bør isoleres raskt fra plasma eller serum for å unngå påvirkning på cytokinnivåene. Man bør også unngå flere enn tre fryse- og tinesykluser ettersom mange cytokiner degraderes raskt [212]. Ved blodprøvetakningen er også viktig å fjerne stasen så snart nålen er plassert i venen for å unngå påvirkning på prøven. Stase eller stuvning kan føre til utsivning av plasma i blodbanen, som kan gi høyere konsentrasjon av høymolekylære og cellulære partikler, endret pH og omfordeling av intra- og ekstracellulære bestanddeler [44].

For minst mulig aktivering av cellene ble blodplater og PBMC isolert straks etter tapping, og de isolerte blodcellene ble raskt fryst ved henholdsvis $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ og $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ved isolering av PBMC er presisjon særlig viktig ved oppsugingen av cellesjiktet som dannes etter sentrifugering med Lymphoprep. Eventuelle feilkilder kan også knyttes til manuell telling, da dette krever øvelse. Det er imidlertid positivt at man ”med egne øyne” får forsikret seg om at celler er blitt isolert. Celletellingen ble her utført ved hjelp av trent personell.

I denne studien ble mange celletyper benyttet for mål av genekspressjon, inkludert TNF- α -stimulerte monocytter, HUVEC, PBMC, CD8+T-celler, CD3+T-celler, blodplater og GMC. I tillegg til at disse nivåene kan påvirkes av blodprøvetakning, isolering av celler og RNA, er det også viktig å være klar over at monokint og lymfokint mRNA påvirkes ulikt av *in vitro*-forholdene i cellekulturer, selv under kontrollerte betingelser [187, 213].

5.1.4 Mål av cytokin-proteinkonsentrasjoner

Kommersielt tilgjengelige ELISA-kit ble benyttet for å måle proteinnivåer av cytokinene IL-9, MCP-1 og IL-8. ELISA er en svært spesifikk og som regel reproducerbar metode for å måle proteinkvantitet, og er den metoden som er best validert for å måle konsentrasjonen av ett enkelt cytokin [195]. Resultatene er imidlertid avhengig av faktorer som antistoffkvalitet, leverandør, samt erfaring og kunnskap hos den som utfører forsøket [214]. Ved bruk av ELISA-metoden kan man kun måle konsentrasjoner innenfor et relativt lite område, satt ved en standardkurve. Prøver med konsentrasjoner utenfor dette området må fortynnes, noe som reduserer konsentrasjonen av cytokinet selv, men også av eventuelle antagonist av cytokinet. Dette kan gi forskjeller i resultatene mellom prøver som må fortynnes og prøver som ikke trenger fortynning. Et annet aspekt som kan by på problemer, er vanskelighet med å sammenlikne cytokinkonsentrasjoner målt med ulike ELISA-kit, ettersom betingelsene er forskjellige [195]. For eksempel kan cytokiner bundet til løselige reseptorer bli fanget opp av noen ELISA-kit, men ikke av andre [214]. Det er grunnet dette viktig å bruke samme kit til analyse av alle prøver i et forsøk.

Vi hadde ingen tidligere erfaring med IL-9 og gjorde derfor en utprøving av kommersielle ELISA-kit for å måle IL-9-konsentrasjoner (avsnitt 3.4.2). Kitene vi prøvde, ga svært forskjellige resultater på de samme prøvene, og vi utførte derfor en spesifisitetstest ved hjelp av rekombinant IL-9. Ut fra dette valgte vi det kitet som viste høyest spesifisitet og som oppga høyest sensitivitet. For MCP-1 og IL-8 ble det benyttet allerede utprøvde og kjente kit. De samme kitene ble brukt i alle forsøkene. For data som er direkte sammenliknet (eks. pasienter og kontroller) er så mange prøver som mulig kjørt på samme plate for å minimalisere kjøring-til-kjøring-variasjoner.

Kommersielt tilgjengelige Bio-Plex-assay ble benyttet for å måle proteinnivåer av IL-10, IFN- γ , IP-10, IL-17 og IFN α -2. Sammenliknet med tradisjonell ELISA har multiplex-metoder, som Bio-Plex, flere fordeler. ELISA kan kun detektere ett antigen av gangen, mot 100 ved

bruk av Bio-Plex. Dette gir også mulighet for sammenlikning av flere cytokiner i samme kontekst. En annen fordel er at mye mindre prøvevolum er nødvendig til Bio-Plex-analyse enn til ELISA, og standardkurvene har ofte større spenn, noe som reduserer behovet for fortykning. For begge metoder kan imidlertid en dårlig standardkurve gi villedende resultater. Et annet element er at nødvendig utstyr for Bio-Plex er svært kostbart, noe som nødvendiggjør en større investering ved bruk av Bio-Plex, enn ved bruk av ELISA [195].

Uavhengig av hvilken metode som brukes, kan unøyaktige resultater også oppstå hvis den respektive protokollen ikke følges, eksempelvis hvis man ikke benytter anbefalt inkubasjonstid- eller temperatur.

5.1.5 Mål av cytokin-geneekspressjon

qPCR er en etablert teknikk for å kvantifisere genuttrykk i biologiske prøver. Den er svært sensitiv, kan måle svært lave og svært høye verdier, og er nøyaktig [201]. Gode rutiner og nøyaktighet ved utføring av metoden er imidlertid svært viktig for et reproducerbart resultat. Det finnes flere fallgruver i stegene før, under og etter et qPCR-forsøk [204].

Før et genuttrykk kan kvantifiseres i en qPCR, må RNA fra prøven som skal undersøkes kopieres til cDNA av enzymet revers transkriptase (RT). Dette steget er avgjørende ettersom mengden cDNA som går inn i reaksjonen må tilsvare mengden mRNA fra prøven nøyaktig. Ståhlberg og medarbeidere så at RT-reaksjonen bidro med mesteparten av variasjonen i mRNA-kvantifisering ved qPCR [199]. Både kvalitet og kvantitet av RNA bør derfor måles før cDNA-syntese [204]. I denne studien ble kvantitet av RNA målt ved bruk av *NanoDrop* og RNA-kvalitet ved hjelp av *Bioanalyzer*. Kun RNA med tilfredsstillende RIN ble benyttet for cDNA-syntese. I tillegg ble alle RNA-prøver behandlet med DNase I for å eliminere forurensing av små mengder DNA. Det er også svært viktig å utføre cDNA-syntese samtidig på alle prøver som skal sammenliknes for å være sikker på at betingelsene er like, for å minimere dag-til-dag-variasjon og for å sikre samme effektivitet på syntesen av de ulike prøvene [199].

I planleggingen av selve qPCR-forsøket kan flere tekniske mangler påvirke resultatet. Disse omfatter blant annet utilfredsstillende lagring og bearbeiding av prøvemateriale, dårlig valg av RT-primere, samt primere og probe til PCR-en [215]. Valg av templat spesifiske reportere som Taq-Man gir fordeler ved at man unngår uspesifikk deteksjon. På den andre siden er det

mye dyrere enn ikke-spesifikke deteksjonsmetoder som SYBR Green, som også på grunn av sin uspesifisitet kan inkorporeres i optimaliserte og varige flerbruksprotokoller. Disse binder imidlertid alt dobbeltrådet DNA, og en smeltekurve er nødvendig for å utelukke uspesifikk binding, noe som kompliserer dataanalysene [204]. For å unngå feiltolkning av data grunnet forsøk-til-forsøk-variasjoner ble alle prøver fra ett eksperiment analysert samtidig, der dette var mulig. Bruk av Taq-Man forenklet planleggingen og dataanalysene, samt ga forsikring om spesifikk deteksjon.

En ofte benyttet metode for å kontrollere for interne feil i qPCR er å normalisere mengden RNA til et internt referansegen. Referansegenet skal uttrykkes likt i celler fra ulike vev og mellom ulike eksperimentelle forhold. Valg av intern kontroll er imidlertid et stort problem. Hvis for eksempel uttrykket av referansegenet gir ulike målinger mellom prøvene, vil man kunne miste små forskjeller i genuttrykket som er av interesse, når det normaliseres til den ustabile referansen [216]. Blant annet er dette observert i en studie av astmatikere der målgenuttrykkene ble påvirket av variasjon i β -actinuttrykket mellom prøvene [217]. Vi erfarte også dette da vi fikk svært varierende resultater av β -actin ved analyse av T-celler. Vi hadde mistanke om T-celle-aktivering av β -actinuttrykket og valgte derfor i stedet 18S rRNA grunnet mer stabil ekspresjon. 18S rRNA er også anbefalt som referansegen ved mål av genuttrykk i humane lymfocytter [218]. Da uttrykket var stabilt mellom prøvene for de øvrige qPCR-forsøkene, ble β -actin benyttet som referansegen her.

Med hensyn til presentasjon og publikasjon av resultater fra qPCR, er standardisert nomenklatur viktig. Ustandardisert nomenklatur og manglende dokumentasjon av metode gir vanskeligheter med å stole på, sammenlikne og tolke resultater. Ved bruk av spesifikke retningslinjer for nomenklatur, som “The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines”, kan man fremme reproducerbarhet og troverdighet av qPCR-resultater [215].

5.1.6 Mål av genuttrykk versus proteinnivå

Å måle både genuttrykk og proteinfrigjøring er ønskelig, ettersom mRNA-syntese ikke nødvendigvis resulterer i syntese av protein. mRNA-nivå korrelerer kun delvis med proteinnivå, grunnet stor grad av posttranskripsjonell regulering [219]. Vi har målt begge variabler for IL-9, men kun genuttrykk for IL-9R, og kun proteinnivå for øvrige cytokiner.

5.1.7 Hva måler vi egentlig?

I tolkningen av resultatene fra qPCR, ELISA og Bio-Plex er et sentralt element det såkalte ”øyeblikksbildet” som disse målingene gir av den inflammatoriske prosessen.

Generelt har cytokiner kort halveringstid, og tilstedeværelse av antagonister og andre hemmere i blodet gjør at plasma- og serumnivåer ikke nødvendigvis reflekterer cytokinproduksjons-statusen i immuncellene. Som et alternativ kan cytokinproduksjon fra PBMC være et bedre mål på dette [188]. Uavhengig av hvilken kilde man måler fra er imidlertid inflammasjon en dynamisk prosess av kaskadereaksjoner [220], og den absolutte konsentrasjonen av et cytokin er trolig mindre viktig enn balansen mellom cytokinet og dets naturlige antagonister. Proteinkonsentrasjonen av ett cytokin reflekterer derfor ikke nødvendigvis denne komplekse prosessen [221]. I tolkningen av resultatene er det i tillegg også viktig å kunne vise til om økt nivå av et cytokin er i relasjon til den aterosklerotiske prosessen. Hvis ja, er det ønskelig å vite om det er kompensatorisk til eller deltakende i utviklingen, eller kun assosiert med sykdommen. Det er også viktig å skille mellom systemiske og lokale variasjoner i cytokinnivå [89], men systemiske konsentrasjoner er imidlertid sett å reflektere lokale prosesser indirekte [95].

5.2 Diskusjon av resultater

5.2.1 IL-9 og IL-9R hos pasienter – en rolle i aterosklerosen?

Vi så signifikant høyere plasmakonsentrasjon av IL-9 hos pasienter med etablert carotisstenose, sammenliknet med friske kontroller. Tilstedeværelse av IL-9 ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom er svært lite studert, men det er imidlertid nylig publisert en studie av Cappuzzello og medarbeidere som målte økte plasmanivåer av IL-9 hos pasienter med kronisk hjertesvikt. I samme studie ble IL-9 også funnet mulig assosiert med sykdomsprogresjon hos dem med iskemisk kardiomyopati, sett ved invers korrelasjon til ejejsjonsfraksjon hos disse pasientene [186]. Om en slik korrelasjon også gjelder ved carotisstenose eller angina pectoris, er ukjent.

Genuttrykk av IL-9R ble påvist i plakk hentet fra carotisarterien, noe som tyder på at plakket kan respondere på IL-9. Disse funnene kan tyde på at IL-9-IL-9R-aksen er oppregulert i patogenesen ved aterosklerose. Kontrollprøvene som kom fra nyrearterie viste ikke deteksjon

av genet, noe som kan være en indikasjon på at IL-9R ikke uttrykkes i frisk karvegg. En kan tenke seg en liknende regulering for IL-9 som for IL-18, der man har sett tilstedeværelse av reseptoren i arterier med aterosklerotiske plakk, men lav ekspresjon i friske arterier [53]. Hos astmatikere har man sett IL-9R-ekspresjon i luftveiseepitel, men ikke hos friske kontroller [166, 175], noe som tyder på at det eksisterer en slik regulering i IL-9-mediert sykdom. Det er imidlertid svært sentralt at kontrollarterien i denne studien ikke kommer fra carotis, men fra nyre, og det er nødvendig å utføre målinger av IL-9R-genuttrykk i friske carotisårer før man trekker en endelig slutning. Uansett viser dette at det aterosklerotiske plaket kan respondere på IL-9, noe som åpner for at IL-9 har en rolle i plakk. Genuttrykk av IL-9 ble imidlertid ikke funnet i carotisplaket (tabell 1).

Genekspresjon av IL-9R ble også målt i CD3⁺-T-celler, og det var et signifikant høyere nivå i celler fra pasienter med stabil og ustabil angina, sammenliknet med kontroller. Vi så også en indikasjon på høyere genuttrykk hos pasienter med ustabil tilstand, sammenliknet med pasienter med stabil tilstand (ikke signifikant). Vi så imidlertid ikke genuttrykk av IL-9 i disse cellene (tabell 1). Alle T-celler uttrykker CD3-komplekset og CD3⁺-T-celler består av både CD4⁺- og CD8⁺-celler. Begge disse undergruppene er som kjent til stede i det aterosklerotiske plaket, først og fremst i den fibrøse kappen [78]. CD4⁺-T-celler er trolig hovedkilden til IL-9 [173], men begge undergruppene ser ut til å kunne respondere på interleukinet [123]. At reseptoren er oppregulert ved sykdom, kan være en indikasjon på et økt behov for ligand hos cellene og dermed økt opptak. Det kan også tyde på en kompensatorisk beskyttende mekanisme mot IL-9 i form av økt klarering fra sirkulasjonen, noe som også indikeres av vår manglende observasjon av genuttrykk for ligand. Flere studier er nødvendige for å kartlegge denne sammenhengen.

5.2.2 IL-9 i humane celler

Vi observerte både genuttrykk og proteinfrigjøring av IL-9 i blodplater, noe som etter vår oppfatning ikke er vist tidligere. De siste årene har flere studier foreslått at blodplater spiller en viktig rolle i aterosklerose, ikke bare som del av trombedannelse, men som inflammatorisk aktive celler [222, 223]. Som nevnt er det nå veletablert at platerderivert inflammasjon bidrar til den aterosklerotiske utviklingen, både i tidlig og sen fase [192]. Vi så signifikant høyere IL-9-frigjøring fra aktiverte, sammenliknet med fra ustimulerte celler. Dette kan være en

indikasjon på IL-9 som en del av platederivert inflammasjon, men det er imidlertid igjen å undersøke om IL-9 er relatert til platenes proaterogene rolle.

Stimulering av blodplater gir et konstruert bilde av forholdene *in vivo* ved aterosklerotisk sykdom, og disse funnene indikerer dermed en mulig oppregulering av IL-9 ved en slik tilstand. Plasmaanalysene bekrefter at det proaterogene miljøet i sirkulasjonen er karakterisert med forhøyet IL-9 hos pasienter med carotisstenose og at IL-9R er uttrykt i plakkk hos samme pasientgruppe. Det er tidligere vist at CD4⁺-T-celler er den største kilden til IL-9 i PBMC isolert fra astmatiske pasienter [173], og PBMC er trolig en hovedkilde til IL-9 i sirkulasjonen. Vi fant imidlertid ikke genuttrykk av IL-9 i CD3⁺-T-celler fra pasienter med angina i denne studien, men så genuttrykk av IL-9 i PBMC som blant annet består av T-celler (tabell 1).

5.2.3 Effekt av IL-9

IL-9 er vist å ha både pro- og antiinflammatoriske egenskaper og påvirker ekspresjon og syntese av både pro- og antiinflammatoriske cytokiner [155, 157, 158]. Vi ønsket derfor å se om IL-9 hadde en effekt på LPS- og PHA-indusert inflammatorisk respons fra PBMC. IL-8, IL-17, IP-10, IFN- γ , IFN α -2 og MCP-1, er kjente proinflammatoriske mediatorer, mens IL-10 er prototypisk antiaterogen. Tidligere studier har vist både positiv og negativ effekt av IL-9 på flere av disse cytokinene. I murine endotelceller er IL-9 sett å redusere LPS-indusert MCP-1-uttrykk (upubliserte data, von der Thüsen og medarbeidere, Universiteit Leiden, Nederland), men å indusere IL-8-frigjøring fra humane neutrofile [149] og fra humane TNF- α -stimulerte GMC-supernatanter [153]. I tillegg er IL-9 vist å redusere IFN- γ -genuttrykk i PBMC fra pasienter med tuberkulose [161] og å nedregulere IL-10-frigjøring fra humane monocytter stimulert med LPS [155]. På den andre siden er IL-9 vist å øke genuttrykk av IL-10 i aktiverte murine mastceller gjennom induksjon av IL-1 β [158] og er assosiert med økt IL-10-mRNA i murine inflammasjonsmodeller [172].

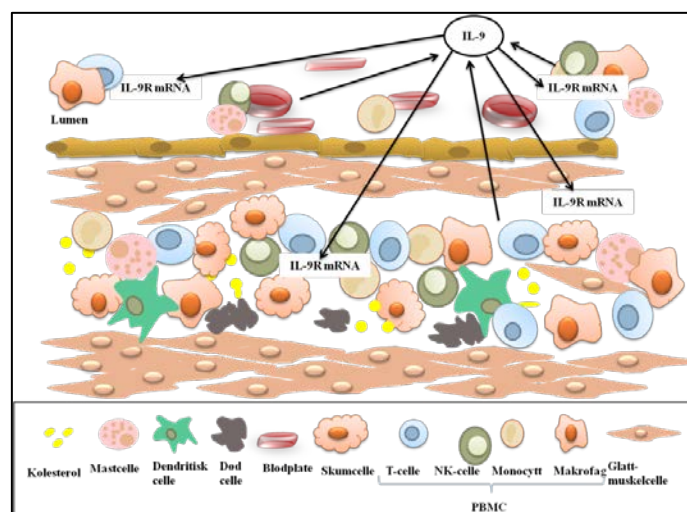
Vårt forsøk viste ingen signifikant effekt av IL-9 på verken LPS- eller PHA-indusert produksjon av MCP-1, IL-8, IL-10, IFN- γ , IP-10, IL-17 eller IFN α -2 fra PBMC. Vi så imidlertid en indikasjon på at IL-9 gir reduksjon (ikke-signifikant) av LPS-induserte IL-10-nivåer, som tidligere observert i humane monocytter.

Det er ut fra dette fremdeles uklart om IL-9 har pro- eller antiinflammatorisk effekt på disse og andre humane celler med relevans for ateroskleroseutviklingen.

5.2.4 Hva har vi funnet?

Endret cytokin- og cytokinreseptor-ekspresjon er observert ved aterosklerotisk sykdom, både systemisk og i plakk [41, 91, 94, 95, 101, 208]. Balansen mellom pro- og antiinflammatoriske mediatorer ser ut til å være avgjørende for sykdomsprogresjon [91-93]. Ekspresjon av antiaterogene cytokiner i aterosklerotiske plakk [115] og i serum [95] tyder på en kompensatorisk mekanisme for å redusere sykdomsutviklingen. Fordi både pro- og antiaterogene cytokiner og deres reseptorer er sett oppregulert ved sykdom, er ikke bekreftelse på tilstedeværelsen nok til å bestemme hvilken rolle cytokinet eventuelt spiller i patogenesen.

Våre funn (oppsummert i figur 20) indikerer at IL-9 og IL-9R har en rolle i human aterosklerose, men våre data er så langt ikke sterke nok til å klassifisere IL-9 som pro- eller antiaterogen. Det vi kan konkludere med er at både ligand og reseptor er oppregulert ved aterosklerotisk hjerte- og karsykdom, noe som kan tyde på et aktivert system der behovet for IL-9 er stort og både frigjøring og opptak/signalisering må øke. På den andre siden kan oppregulert reseptoraktivitet, som nevnt, være en beskyttende mekanisme mot skadelige cytokiner ved å fjerne dem fra sirkulasjonen. Det kan også tenkes at IL-9 har ulike funksjoner på ulike celler, og dermed også både pro- og antiaterogen funksjon. Effekten av IL-9 *in vivo* er fortsatt ukjent.



Figur 20. Oppsummering av hovedfunnene. Cellulær sammensetning av et aterosklerotisk plakk med aktive immunceller, døde cellerester og kolesterol. Vi detekterte IL-9R-mRNA i carotisplakk, i CD3+-T-celler isolert

fra pasienter med aterosklerotisk hjerte- og karsykdom, samt i humane PBMC. IL-9-mRNA ble detektert i humane PBMC og i blodplater. Proteinfrigjøring ble også målt i aktiverte blodplater hentet fra friske kontroller. Vi så også økt plasmakonsentrasjon av IL-9 hos pasienter med aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom, sammenliknet med friske kontroller. Figuren viser en mulig kommunikasjon mellom IL-9 i immunceller og blodplater i sirkulasjon og celler i det aterosklerotiske plakket. (Egenprodusert, Gregersen)

6 Fremtidsperspektiv

6.1 Biomarkører for aterosklerotisk hjerte- og karsykdom

Hjerte- og karsykdom er en av de viktigste årsakene til død i Norge og utgjør en tredjedel av dødsfallene [8, 9]. Man trodde lenge at behandling mot høyt kolesterol og hypertensjon skulle eliminere denne sykdomsgruppen, men optimismen har snudd, og kardiovaskulær sykdom ser nå ut til å bli hovedårsaken til sykdom på verdensbasis innen 2020 [3, 82]. Tradisjonelle biomarkører kan klassifisere personer med høy eller lav risiko, men det er også viktig å kunne identifisere dem med moderat risiko, for å kunne generere intensiv forebyggende behandling [224]. Det er også uenighet om betydningen av de tradisjonelle risikofaktorene, og det er trolig ikke alle med høy risiko for hjerte- og karsykdom som kan klassifiseres ut fra disse [32-35]. Inflammasjon er nå anerkjent som en nøkkelprosess i utvikling av aterosklerotisk hjerte- og karsykdom [77], og dette har gjort sirkulerende risikomarkører aktuelle for risikoevaluering og utvikling av nye behandlingsmetoder [224]. En biomarkør stilles imidlertid mange krav til, og må blant annet være stabil, enkel å måle og ideelt endres ved sykdomsutvikling. Når en markør kan bidra med informasjon som ikke gis av andre risikofaktorer i risikovurderingen av en pasient, har den en klinisk nytte [96, 224, 225]. En biomarkør trenger imidlertid ikke å være en mediator av patogenese [96].

Det har vist seg vanskelig å identifisere en inflammasjonsmarkør for evaluering av risiko for fremtidig aterosklerotisk hjerte- og karsykdom. Selv om sirkulerende konsentrasjon av mange inflammatoriske mediatorer korrelerer med kardiovaskulær risiko, er få klare til klinisk bruk. Bortsett fra CRP har ingen av de nye inflammasjonsmarkørene vist evne til å tilføre ekstra verdifull informasjon som et tillegg til eksempelvis Framingham scoringssystem. Få har også tilgjengelige kommersielle metoder for enkel og standardisert måling i klinikken [96].

6.1.1 IL-9 – en fremtidig biomarkør?

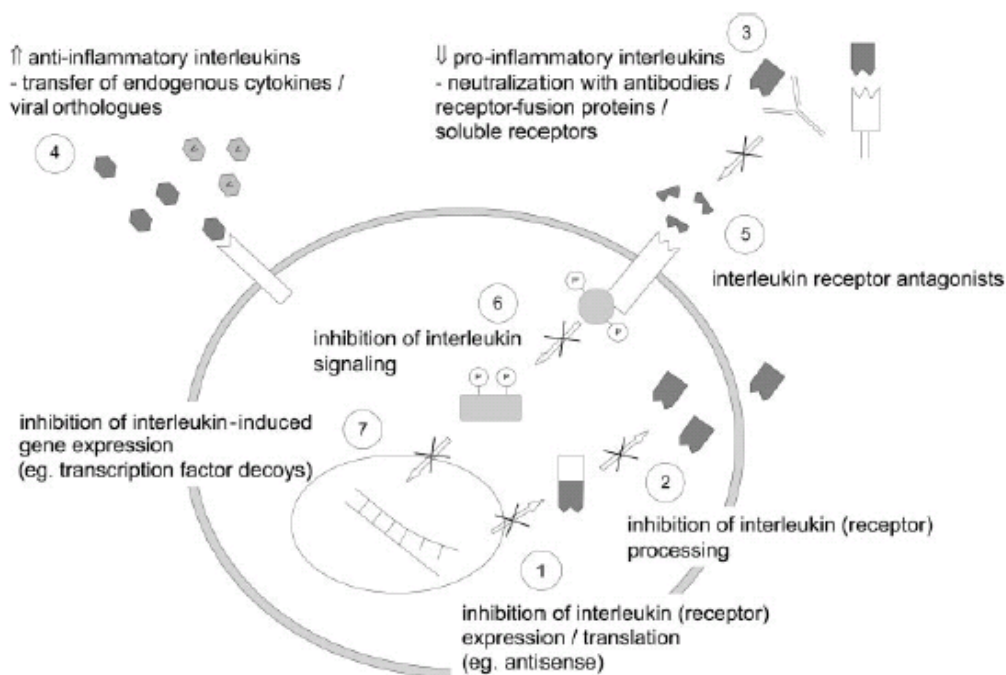
Vi så signifikant høyere plasmanivåer av IL-9 hos pasienter med carotisstenose enn hos friske kontroller. Vi så imidlertid ingen signifikant forskjell mellom pasienter med asymptomatisk og symptomatisk tilstand. Å kunne skille mellom ustabile og stabile plakk er viktig for å kunne predikere plakkruptur og kardiovaskulære hendelser. Flere studier og større utvalg

trenings for å fastslå om IL-9 har denne prediktive verdien. Et annet viktig element er at IL-9, som CRP (avsnitt 1.2.1), er vist forhøyet ved flere ulike sykdomstilstander. Det er viktig å kunne skille disse tilstandene fra hverandre hvis en faktor skal brukes som markør. Det er imidlertid mulig at IL-9 i fremtiden kan brukes som et tillegg til andre markører som mer spesifikt reflekterer plakkmorfologi, for eksempel som et tillegg til ultralyddiagnostikk.

6.1.2 Behandling av aterosklerotisk hjerte- og karsykdom – med fokus på inflammasjon

Det er et stort behov for effektiv forebygging av kardiovaskulære hendelser og andre kliniske manifestasjoner av aterosklerose. Det er også behov for bedre terapeutiske muligheter når en hendelse har inntruffet, for å begrense konsekvensene [226]. Statiner har vist antiinflammatorisk effekt, i tillegg til sin lipidsenkende virkning. Og pasienter med reduserte CRP-nivåer etter statinbehandling er sett å ha bedre klinisk utfall enn de med høyere CRP-nivåer, uavhengig av lipidstatus [227]. Andre inflammatoriske behandlingsmetoder har også vært under utprøving. Som nevnt er anti-TNF- α -behandling assosiert med reduksjon i kardiovaskulære hendelser hos RA-pasienter [105]. Administrasjon av antagonister av IL-1-reseptoren har vist redusert inflammasjon og bedre klinisk utfall hos pasienter etter akutt slag [228] og er et potensielt terapeutisk mål ved flere andre hjerte- og kartilstander [107].

Funksjonen av cytokiner er nøye regulert på ulike nivåer av syntese, prosessering og signalkaskader. De som unnslipper endogene reguleringsmekanismer, kan binde seg til en reseptor. Tilstedeværelse av reseptoren reguleres blant annet av endocytose og degradering, i tillegg er signaliseringsveiene kontrollert av spesifikke signalveihemmere. Signaliseringen i seg selv kulminerer i aktiveringen av spesifikke gener som resulterer i den biologiske funksjonen av cytokinet. I teorien kan alle disse stegene til et enkelt cytokin representere potensielle mål for terapi rettet mot den respektive biologiske aktiviteten (figur 21). Utvikling av terapi rettet mot cytokiner eller deres reseptorer for forebygging av aterosklerose og andre sykdommer har vist seg vanskelig – særlig grunnet de mange ulike oppgavene hvert enkelt cytokin har [89].



Figur 21. Potensielle strategiske mål for modifisering av interleukin-aktivitet for behandling av aterosklerose. [89]

6.1.3 IL-9 som terapeutisk mål?

For at IL-9 skal være et terapeutisk mål for behandling av aterosklerose må først rollen i patogenesen fastslås. Flere studier der man har sett at IL-9 har en rolle i patogenesen foreslår IL-9 som mål for behandling av disse tilstandene, blant annet gjennom anti-IL-9-spesifikke antistoffer og hemmere av IL-9R [126, 131, 170, 171]. Hos mus er behandling med IL-9 vist å redusere aterosklerotisk utvikling og plakkstørrelse (upubliserte data, von der Thüsen og medarbeidere, Universiteit Leiden, Nederland). Dosene er imidlertid svært høye (1µg/dag/mus), og eventuelle toksiske effekter er ikke undersøkt nærmere. Det er heller ikke undersøkt om administrasjon av IL-9 har en slik effekt hos mennesker. Om IL-9 kan benyttes som terapeutisk mediator av human aterosklerotisk hjerte- og karsykdom, er uklart, ikke minst på grunn av IL-9s kjente sykdomsfremmende effekter (avsnitt 1.5.7).

6.1.4 Videre arbeid

Mye arbeid gjenstår for å kartlegge om IL-9 har en rolle i aterosklerotisk hjerte- og karsykdom. Lite forskning er gjort på dette feltet, og studier på IL-9 er i stor grad utført *in vitro* og i dyremodeller – det er svært få studier på humane celler og humane *in vivo*-

prosesser. IL-9 er assosiert med flere sykdommer både som positiv og negativ mediator i patogenesen. Vi ønsket å undersøke rollen i human aterosklerose, og våre resultater viser en tilstedeværelse ved sykdom, men sier lite om IL-9s rolle.

For å undersøke IL-9s biologiske betydning videre vil det blant annet være ønskelig å gjøre cellostimuleringsforsøk på ulike subpopulasjoner av humane T-celler, som er vist å være hovedkilde til IL-9. Det vil være ønskelig å måle proteinkonsentrasjoner av IL-9 etter både pro- og antiaterogen stimuli. I tillegg vil det være interessant å undersøke om inflammasjonsmodulerende medikamenter som statiner påvirker disse effektene.

Å måle effekten av IL-9 på ekspresjon av andre mediatorer enn det som er gjort i denne studien, vil også bidra med verdifull informasjon. For eksempel er IL-9 sett å redusere IFN- γ -mRNA i PBMC fra pasienter med tuberkulose [161], et interessant funn som også kan ha relevans for aterosklerosepasienter. IL-9 er assosiert med økt Th2- til Th1-cellerespons hos tuberkulose-pasienter [161] og ved infeksjon i murine modeller [170]. Etersom aterosklerose i stor grad er en Th1-celledreven sykdom [15, 77, 83, 84], vil det være spennende å undersøke om det finnes en slik ratio-korrelasjon til IL-9 hos pasienter med aterosklerotisk sykdom.

Andre celler og vev som er sentrale for den aterosklerotiske prosessen, bør også undersøkes. Blant annet vil det være spennende å undersøke nærmere effekten av IL-9 på TNF- α -produksjon fra monocytter, ettersom IL-9 er vist å stimulere denne gjennom TGF- β [155]. IL-9-injeksjon er også vist å redusere plasmanivåer av TNF- α i LDLr-KO-mus. I denne modellen ble IL-9 også vist å redusere LPS-indusert uttrykk av MCP-1 på endotelceller (upubliserte data, von der Thüsen og medarbeidere, Universiteit Leiden, Nederland), og det er ønskelig å undersøke om dette også er tilfelle på tilsvarende humane celler.

Vi har ikke analysert proteinkonsentrasjoner av IL-9R, og det vil være ønskelig å undersøke nivåer av denne før og etter aterogen stimulering. Høysensitivitets flow-cytometri er den beste metoden for proteindeteksjon av cytokinreseptorer ettersom disse ofte uttrykkes i svært lave konsentrasjoner som er under sensitivitetsnivået til tradisjonelle immunoassay [229]. Det vil i tillegg være viktig å studere hvordan genuttrykk av reseptoren reguleres, for eksempel om reseptor-ekspresjonen påvirkes av inflammatoriske mediatorer. Videre vil det være interessant å gjøre immunohistokjemi på plakk fra pasienter med stabil og ustabil tilstand for å lokalisere IL-9 og IL-9R i plakket.

7 Konklusjon

Hovedfunnene i denne studien er:

- IL-9-mRNA uttrykkes i humane PBMC og blodplater. IL-9R-mRNA uttrykkes i humant carotisplakk, samt humane PBMC, CD8+T-celler og CD3+T-celler.
- Humane blodplater frigir IL-9 etter aktivering.
- Pasienter med asymptomatisk og symptomatisk carotisstenose har høyere plasmanivåer av IL-9 enn friske kontroller.
- mRNA for IL-9R er uttrykt i plakk fra carotisåren, men ikke i nyrearterie hentet fra friske kontroller.
- Pasienter med angina pectoris har høyere genuttrykk av IL-9R i CD3+-T-celler enn friske kontroller.
- Det var en ikke-signifikant tendens til høyere genuttrykk av IL-9R i CD3+-T-celler hos pasienter med ustabil angina pectoris, sammenliknet med pasienter med stabil angina pectoris.
- IL-9 viste ingen effekt på LPS- eller PHA-indusert frigjøring av MCP-1, IL-8, IL-10, IFN- γ , IP-10, IL-17 eller IFN α -2 fra PBMC.

Vi har med denne studien dokumentert tilstedeværelse av IL-9 og IL-9R i humane celler og vev sentralt i den aterosklerotiske prosessen. Vi viser med dette en mulig rolle av IL-9 i aterosklerotisk hjerte- og karsykdom, og det vil videre være ønskelig å studere eventuelle effekter av IL-9 i humane celler og vev i relasjon til den aterosklerotiske prosessen.

Litteraturliste

1. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*, 2001. 104(4): p. 503-516.
2. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe - Task force of the European society of cardiology on cardiovascular mortality and morbidity statistics in Europe. *Eur Heart J*, 1997. 18(8): p. 1231-1248.
3. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*, 1998. 4(11): p. 1241-3.
4. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2010. 121(7): p. e46-e215.
5. Pedersen JI, Tverdal A, Kirkhus B. Diet changes and the rise and fall of cardiovascular disease mortality in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2004. 124(11): p. 1532-6.
6. Bonita R, Stewart A, Beaglehole R. International trends in stroke mortality: 1970-1985. *Stroke*, 1990. 21(7): p. 989-992.
7. Ellekjer H, Holmen J, Indredavik B et al. Epidemiology of Stroke in Innherred, Norway, 1994 to 1996 : Incidence and 30-Day Case-Fatality Rate. *Stroke*, 1997. 28(11): p. 2180-2184.
8. Folkehelseinstituttet N. Helsetilstanden i Norge: Hjerte- og karsykdommer. 2010; <http://www.fhi.no/artikler/?id=70806> (22.11. 2010).
9. Statistisk sentralbyrå sfh. Dødsårsaker 2008: Hjerte- og karsykdommer og kreft viktigste dødsårsaker. 2010; <http://www.ssb.no/emner/03/01/10/dodsarsak/> (22.11. 2010).
10. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of the myocardial infarction. *Kardiol Pol*, 2008. 66(1): p. 47-62.
11. Tobin KJ. Stable Angina Pectoris: What Does the Current Clinical Evidence Tell Us? *J Am Osteopath Assoc*, 2010. 110(7): p. 364-370.
12. Depré Md PC, Wijns Md PW, Robert PhD AM et al. Pathology of Unstable Plaque: Correlation With the Clinical Severity of Acute Coronary Syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 1997. 30(3): p. 694-702.
13. Dahl A, Lund C, Russell D. Atherosclerosis and cerebral infarction. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2007. 127(7): p. 892-6.
14. Grau AJ, Weimar C, Buggle F et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke*, 2001. 32(11): p. 2559-66.
15. Hansson GrK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(7): p. 508-519.
16. Slevin M, Wang Q, Font MA et al. Atherothrombosis and Plaque Heterology: Different Location or a Unique Disease? *Pathobiology*, 2008. 75(4): p. 209-225.
17. Kronzon I, Tunick PA. Aortic Atherosclerotic Disease and Stroke. *Circulation*, 2006. 114(1): p. 63-75.
18. Amarenco P, Cohen A, Tzourio C et al. Atherosclerotic Disease of the Aortic Arch and the Risk of Ischemic Stroke. *N Engl J Med*, 1994. 331(22): p. 1474-1479.
19. Samet JM. The 1990 Report of the Surgeon General - the Health Benefits of Smoking Cessation. *Am Rev Respir Dis*, 1990. 142(5): p. 993-994.
20. Verschuren WMM, Jacobs DR, Bloemberg BPM et al. Serum Total Cholesterol and Long-term Coronary Heart Disease Mortality in Different Cultures: Twenty-five--Year Follow-up of the Seven Countries Study. *N Engl J Med*, 1995. 274(2): p. 131-136.

21. MacMahon S, Peto R, Collins R et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease : Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*, 1990. 335(8692): p. 765-774.
22. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, 1993. 16(2): p. 434-444.
23. Strom A, Jensen RA. Mortality from circulatory diseases in Norway 1940-1945. *Lancet*, 1951. 1(6647): p. 126-9.
24. Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M et al. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 2000. 355(9205): p. 688-700.
25. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 2000. 355(9205): p. 675-687.
26. WHO. Global Database on Body Mass Index, BMI classification. 2004; http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (18.03. 2011).
27. Meyer HE, Tverdal A. Development of body weight in the Norwegian population. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. 73(1): p. 3-7.
28. Folkehelseinstituttet. Helsetilstanden i Norge: Overvekt og fedme. 2008; <http://www.fhi.no/artikler/?id=70834> (12.02. 2011).
29. Midthjell K, Kruger O, Holmen J et al. Rapid changes in the prevalence of obesity and known diabetes in an adult Norwegian population - The Nord-Trøndelag Health Surveys: 1984-1986 and 1995-1997. *Diabetes Care*, 1999. 22(11): p. 1813-1820.
30. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 1998. 15(7): p. 539-53.
31. Klemsdal TO, Tonstad S, Hjermann I. How to identify individuals with elevated cardiovascular risk? *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2004. 124(6): p. 799-801.
32. Fager G, Wiklund O. Cholesterol reduction and clinical benefit. Are there limits to our expectations? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(12): p. 3527-33.
33. Futterman LG, Lemberg L. Fifty percent of patients with coronary artery disease do not have any of the conventional risk factors. *Am J Crit Care*, 1998. 7(3): p. 240-4.
34. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT et al. Prevalence of Conventional Risk Factors in Patients With Coronary Heart Disease. *JAMA*, 2003. 290(7): p. 898-904.
35. Magnus P, Beaglehole R. The real contribution of the major risk factors to the coronary epidemics: time to end the "only-50%" myth. *Arch Intern Med*, 2001. 161(22): p. 2657-60.
36. Hense HW, Schulte H, Lowel H et al. Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany--results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts. *Eur Heart J*, 2003. 24(10): p. 937-45.
37. Thomsen TF, McGee D, Davidsen M et al. A cross-validation of risk-scores for coronary heart disease mortality based on data from the Glostrup Population Studies and Framingham Heart Study. *Int J Epidemiol*, 2002. 31(4): p. 817-22.
38. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*, 2003. 24(11): p. 987-1003.
39. Lindman AS, Veierød MB, Pedersen JI et al. The ability of the SCORE high-risk model to predict 10-year cardiovascular disease mortality in Norway. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2007. 14(4): p. 501-7.

40. Selmer R, Lindman AS, Tverdal A et al. Model for estimation of cardiovascular risk in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2008. 128(3): p. 286-90.
41. Aukrust P, Halvorsen B, Yndestad A et al. Chemokines and Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(11): p. 1909-1919.
42. Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP et al. Prevention Conference V : Beyond Secondary Prevention : Identifying the High-Risk Patient for Primary Prevention : Noninvasive Tests of Atherosclerotic Burden : Writing Group III. *Circulation*, 2000. 101(1): p. e16-22.
43. Pearson TA. New tools for coronary risk assessment: what are their advantages and limitations? *Circulation*, 2002. 105(7): p. 886-92.
44. Ullevål Universitetssykehus U. Brukerhåndboka 2004. <http://www.uus.no/brukerhandbok/> (18.03. 2011).
45. Hermus L, Lefrandt JD, Tio RA et al. Carotid plaque formation and serum biomarkers. *Atherosclerosis*, 2010. 213(1): p. 21-9.
46. Kushner I, Rzewnicki DL. The acute phase response: General aspects. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994. 8(3): p. 513-530.
47. Munk PS, Larsen AI. Inflammation and C-reactive protein in cardiovascular disease. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2009. 129(12): p. 1221-4.
48. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE et al. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *N Engl J Med*, 2000. 342(12): p. 836-843.
49. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1990. 65(3): p. 168-72.
50. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM et al. C-Reactive Protein and Other Circulating Markers of Inflammation in the Prediction of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*, 2004. 350(14): p. 1387-1397.
51. Lund Håheim L, Nafstad P, Olsen I et al. C-reactive protein variations for different chronic somatic disorders. *Scand J Public Health*, 2009. 37(6): p. 640-646.
52. Koenig W, Khuseynova N, Baumert J et al. Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(12): p. 2745-51.
53. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A et al. Expression of Interleukin-18 in Human Atherosclerotic Plaques and Relation to Plaque Instability. *Circulation*, 2001. 104(14): p. 1598-1603.
54. Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation*, 2003. 108(20): p. 2453-9.
55. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*, 1999. 99(1): p. 178-82.
56. Grundy SM, Bazzarre T, Cleeman J et al. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: medical office assessment: Writing Group I. *Circulation*, 2000. 101(1): p. E3-E11.
57. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration: R Clarke et al. Dose-dependent effects of folic acid on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials. *Am J Clin Nutr*, 2005. 82(4): p. 806-12.
58. Løland KH, Bleie Ø, Blix AJ et al. Effect of Homocysteine-Lowering B Vitamin Treatment on Angiographic Progression of Coronary Artery Disease: A Western

- Norway B Vitamin Intervention Trial (WENBIT) Substudy. *Am J Cardiol* 2010. 105(11): p. 1577-1584.
59. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006. 354(15): p. 1578-88.
 60. Mathiesen EB. Risk of stroke in carotid stenosis--what is the role of plaque morphology? *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2003. 123(6): p. 782-4.
 61. Wolverson MK, Bashiti HM, Peterson GJ. Ultrasonic tissue characterization of atheromatous plaques using a high resolution real time scanner. *Ultrasound Med Biol*, 1983. 9(6): p. 599-609.
 62. Johnson JM, Kennelly MM, Decesare D et al. Natural history of asymptomatic carotid plaque. *Arch Surg*, 1985. 120(9): p. 1010-2.
 63. Mathiesen EB, Bønaa KH, Joakimsen O. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the tromso study. *Circulation*, 2001. 103(17): p. 2171-5.
 64. Ross R, Glomset JA. 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(93): p. 1332-9.
 65. Ross R. The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update. *N Engl J Med*, 1986. 314(8): p. 488-500.
 66. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
 67. Stary HC, Chandler AB, Glagov S 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. 2462-2478.
 68. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis - a Report from the Committee on Vascular-Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American-Heart-Association. *Circulation*, 1995. 92(5): p. 1355-1374.
 69. Dalager S, Paaske WP, Bayer Kristensen I et al. Artery-Related Differences in Atherosclerosis Expression: Implications for Atherogenesis and Dynamics in Intima-Media Thickness. *Stroke*, 2007. 38(10): p. 2698-2705.
 70. Hamm CW, Braunwald E. A Classification of Unstable Angina Revisited. *Circulation*, 2000. 102(1): p. 118-122.
 71. Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB et al. Atherosclerotic Plaque Stability--What Determines the Fate of a Plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 2008. 51(3): p. 183-194.
 72. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(2): p. 456S-460.
 73. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB et al. Cardiovascular Morbidity and Mortality in Women Diagnosed With Rheumatoid Arthritis. *Circulation*, 2003. 107(9): p. 1303-1307.
 74. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ et al. Risk of Myocardial Infarction and Stroke after Acute Infection or Vaccination. *N Engl J Med*, 2004. 351(25): p. 2611-2618.
 75. Smith SC, Jr., Allen J, Blair SN et al. AHA/ACC Guidelines for Secondary Prevention for Patients With Coronary and Other Atherosclerotic Vascular Disease: 2006 Update: Endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*, 2006. 113(19): p. 2363-2372.
 76. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *Eur Heart J*, 2008. 29(19): p. 2388-2442.

77. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(23): p. 2129-2138.
78. Jonasson L, Holm J, Skalli O et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 1986. 6(2): p. 131-8.
79. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, 2009. 7(2): p. 77-86.
80. Ikeda U, Matsui K, Murakami Y et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*, 2002. 25(4): p. 143-7.
81. Zhu JF, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 2008. 112(5): p. 1557-1569.
82. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*, 2005. 352(16): p. 1685-1695.
83. Gupta S, Pablo AM, Jiang X et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*, 1997. 99(11): p. 2752-61.
84. Zhou X, Nicoletti A, Elhage R et al. Transfer of CD4+ T Cells Aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice. *Circulation*, 2000. 102(24): p. 2919-2922.
85. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 1989. 7: p. 145-73.
86. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 2006. 24(6): p. 677-88.
87. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 531-62.
88. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest*, 2000. 118(2): p. 503-508.
89. Von der Thüsen JH, Kuiper J, Van Berkel TJC et al. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. *Pharmacological Reviews*, 2003. 55(1): p. 133-166.
90. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*, 1997. 90(3): p. 909-928.
91. Biswas S, Ghoshal PK, Mandal SC et al. Relation of anti- to pro-inflammatory cytokine ratios with acute myocardial infarction. *Korean J Intern Med*, 2010. 25(1): p. 44-50.
92. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 1999. 145(1): p. 33-43.
93. Wæhre T, Halvorsen B, Damås JK et al. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF α in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest* 2002. 32(11): p. 803-810.
94. de Oliveira RT, Mamoni RL, Souza JR et al. Differential expression of cytokines, chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 2009. 136(1): p. 17-26.
95. Mizia-Stec K, Mandecki T, Zahorska-Markiewicz B et al. Selected cytokines and soluble forms of cytokine receptors in coronary artery disease. *Eur J Intern Med*, 2002. 13(2): p. 115-122.
96. Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem*, 2008. 54(1): p. 24-38.
97. Boring L, Gosling J, Cleary M et al. Decreased lesion formation in CCR2 $^{-/-}$ mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 894-897.

98. Gu L, Okada Y, Clinton SK et al. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Mol Cell*, 1998. 2(2): p. 275-281.
99. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1 ^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. 111(3): p. 333-340.
100. Lutters BCH, Leeuwenburgh MA, Appeldoorn CCM et al. Blocking endothelial adhesion molecules: a potential therapeutic strategy to combat atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2004. 15(5): p. 545-552.
101. Fiotti N, Giansante C, Ponte E et al. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 1999. 145(1): p. 51-60.
102. Simon AD, Yazdani S, Wang WZ et al. Elevated plasma levels of interleukin-2 and soluble IL-2 receptor in ischemic heart disease. *Clin Cardiol*, 2001. 24(3): p. 253-256.
103. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2009. 134(1): p. 33-46.
104. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M et al. Inhibition of Tumor Necrosis Factor-alpha Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 2137-2142.
105. Avouac J, Allanore Y. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: effects of anti-TNF drugs. *Expert Opin Pharmacother*, 2008. 9(7): p. 1121-1128.
106. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996. 87(6): p. 2095-2147.
107. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp* 2009. 57(3): p. 165-76.
108. Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*, 2006. 98(4A): p. 3i-18i.
109. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE et al. The Effect of Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Synthesis of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by Mononuclear Cells. *N Engl J Med*, 1989. 320(5): p. 265-271.
110. Lee T-S, Yen H-C, Pan C-C et al. The Role of Interleukin 12 in the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(3): p. 734-742.
111. Inoue T, Komoda H, Nonaka M et al. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2008. 124(3): p. 319-325.
112. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V et al. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 2009. 84(3): p. 353-60.
113. Malefyt RD, Abrams J, Bennett B et al. Interleukin-10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes - an Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med* 1991. 174(5): p. 1209-1220.
114. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T et al. Interleukin-10 Blocks Atherosclerotic Events In Vitro and In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(12): p. 2847-2853.
115. Mallat Z, Heymes C, Ohan J et al. Expression of Interleukin-10 in Advanced Human Atherosclerotic Plaques : Relation to Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Cell Death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(3): p. 611-616.
116. Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Med.*, 2000. 51: p. 289-298.

117. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D et al. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*, 1999. 116(1): p. 115-20.
118. Asadullah K, Docke W-D, Ebeling M et al. Interleukin 10 Treatment of Psoriasis: Clinical Results of a Phase 2 Trial. *Arch Dermatol*, 1999. 135(2): p. 187-192.
119. Houssiau FA, Schandene L, Stevens M et al. A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. Involvement of IL-2, IL-4, and IL-10. *J Immunol*, 1995. 154(6): p. 2624-2630.
120. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC et al. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med*, 1995. 1(1): p. 74-79.
121. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C et al. Inhibition of Transforming Growth Factor-beta Signaling Accelerates Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype in Mice. *Circulation*, 2001. 89(10): p. 930-934.
122. Cipollone F, Fazia M, Mincione G et al. Increased Expression of Transforming Growth Factor-beta1 as a Stabilizing Factor in Human Atherosclerotic Plaques. *Stroke*, 2004. 35(10): p. 2253-2257.
123. Renaud JC, Houssiau F, Louahed J et al, Interleukin-9, in *Advances in Immunology* 1993, Academic Press. p. 79-97.
124. Vansnick J, Goethals A, Renaud JC et al. Cloning and Characterization of a Cdna for a New Mouse T-Cell Growth-Factor (P40). *J Exp Med* 1989. 169(1): p. 363-368.
125. Hültner L, Druez C, Moeller J et al. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol* 1990. 20(6): p. 1413-1416.
126. Li H, Rostami A. IL-9: Basic Biology, Signaling Pathways in CD4+ T Cells and Implications for Autoimmunity. *JNIP*, 2009. 5(2): p. 198-209.
127. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*, 2008. 9(12): p. 1347-55.
128. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 2008. 9(12): p. 1341-1346.
129. Monteyne P, Renaud JC, Van Broeck J et al. IL-4-independent regulation of in vivo IL-9 expression. *J Immunol*, 1997. 159(6): p. 2616-2623.
130. Schmitt E, Germann T, Goedert S et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol*, 1994. 153(9): p. 3989-3996.
131. Nowak EC, Weaver CT, Turner H et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *JEM*, 2009. 206(8): p. 1653-1660.
132. Staudt V, Bothur E, Klein M et al. Interferon-Regulatory Factor 4 Is Essential for the Developmental Program of T Helper 9 Cells. *Immunity*, 2010. 33(2): p. 192-202.
133. Chang H-C, Sehra S, Goswami R et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*, 2010. 11(6): p. 527-534.
134. Stassen M, Arnold M, Hultner L et al. Murine Bone Marrow-Derived Mast Cells as Potent Producers of IL-9: Costimulatory Function of IL-10 and kit Ligand in the Presence of IL-1. *J Immunol*, 2000. 164(11): p. 5549-5555.
135. Lauwerys BR, Garot N, Renaud J-C et al. Cytokine Production and Killer Activity of NK/T-NK Cells Derived with IL-2, IL-15, or the Combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol*, 2000. 165(4): p. 1847-1853.

136. Beriou G, Bradshaw EM, Lozano E et al. TGF-beta Induces IL-9 Production from Human Th17 Cells. *J Immunol*, 2010. 185(1): p. 46-54.
137. Putheti P, Awasthi A, Popoola J et al. Human CD4+ Memory T Cells Can Become CD4+IL-9+T Cells. *PLoS ONE*, 2010. 5(1): p. e8706.
138. Kajiyama Y, Umezu-Goto M, Kobayashi N et al. IL-2-Induced IL-9 Production by Allergen-Specific Human Helper T Cell Clones. *Int Arch Allergy Immunol* 2007. 143(Suppl. 1): p. 71-75.
139. Gounni AS, Nutku E, Koussih L et al. IL-9 expression by human eosinophils: Regulation by IL-1-beta and TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 2000. 106(3): p. 460-466.
140. Fujisawa T, Katsumata H, Kato Y. House Dust Mite Extract Induces Interleukin-9 Expression in Human Eosinophils. *Allergol Int*, 2008. 57(2): p. 141-146.
141. Druetz C, Coulie P, Uyttenhove C et al. Functional and biochemical characterization of mouse P40/IL-9 receptors. *J Immunol*, 1990. 145(8): p. 2494-2499.
142. Hauber HP, Bergeron C, Hamid Q. IL-9 in Allergic Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2004. 134(1): p. 79-87.
143. Kimura Y, Takeshita T, Kondo M et al. Sharing of the IL-2 receptor gamma chain with the functional IL-9 receptor complex. *Int. Immunol*, 1995. 7(1): p. 115-120.
144. Grasso L, Huang M, Sullivan CD et al. Molecular Analysis of Human Interleukin-9 Receptor Transcripts in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *JBC*, 1998. 273(37): p. 24016-24024.
145. Houssiau FA, Renauld JC, Stevens M et al. Human T cell lines and clones respond to IL-9. *J Immunol*, 1993. 150(7): p. 2634-40.
146. Dugas B, Renauld JC, Pène J et al. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993. 23(7): p. 1687-1692.
147. Fawaz LM, Sharif-Askari E, Hajoui O et al. Expression of IL-9 receptor alpha chain on human germinal center B cells modulates IgE secretion. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(5): p. 1208-15.
148. Donahue RE, Yang YC, Clark SC. Human P40 T-cell growth factor (interleukin-9) supports erythroid colony formation. *Blood*, 1990. 75(12): p. 2271-2275.
149. Abdelilah S, Latifa K, Esra N et al. Functional expression of IL-9 receptor by human neutrophils from asthmatic donors: role in IL-8 release. *J Immunol*, 2001. 166(4): p. 2768-74.
150. Gounni AS, Gregory B, Nutku E et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*, 2000. 96(6): p. 2163-2171.
151. Louahed J, Toda M, Jen J et al. Interleukin-9 Upregulates Mucus Expression in the Airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000. 22(6): p. 649-656.
152. Gounni AS, Hamid Q, Rahman SM et al. IL-9-Mediated Induction of Eotaxin1/CCL11 in Human Airway Smooth Muscle Cells. *J Immunol*, 2004. 173(4): p. 2771-2779.
153. Baraldo S, Faffe DS, Moore PE et al. Interleukin-9 influences chemokine release in airway smooth muscle: role of ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. 284(6): p. L1093-102.
154. Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res*, 2002. 69(1): p. 94-103.
155. Pilette C, Ouadrhiri Y, Van Snick J et al. IL-9 Inhibits Oxidative Burst and TNF-alpha Release in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes Through TGF-beta. *J Immunol*, 2002. 168(8): p. 4103-4111.

156. Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ et al. IL-9-Deficient Mice Establish Fundamental Roles for IL-9 in Pulmonary Mastocytosis and Goblet Cell Hyperplasia but Not T Cell Development. *Immunity*, 2000. 13(4): p. 573-583.
157. Mespès B, Fontaine RH, Lelièvre V et al. Neuronal TGF-beta1 mediates IL-9/mast cell interaction and exacerbates excitotoxicity in newborn mice. *Neurobiol Dis* 2005. 18(1): p. 193-205.
158. Wiener Z, Falus A, Toth S. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine*, 2004. 26(3): p. 122-130.
159. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *PNAS*, 2009. 106(31): p. 12885-12890.
160. Noelle RJ, Nowak EC. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(10): p. 683-687.
161. Wu B, Huang C, Kato-Maeda M et al. IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol* 2008. 126(2): p. 202-210.
162. Demoulin JB, Uyttenhove C, Van Roost E et al. A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptotic activity, and growth regulation by IL-9. *Mol. Cell. Biol.*, 1996. 16(9): p. 4710-4716.
163. Knoops L, Renault J-C. IL-9 and its Receptor: From Signal Transduction to Tumorigenesis. *Growth Factors*, 2004. 22(4): p. 207-215.
164. Lejeune D, Demoulin JB, Renault JC. Interleukin 9 induces expression of three cytokine signal inhibitors: cytokine-inducible SH2-containing protein, suppressor of cytokine signalling (SOCS)-2 and SOCS-3, but only SOCS-3 overexpression suppresses interleukin 9 signalling. *Biochem J*, 2001. 353(Pt 1): p. 109-116.
165. Dragon S, Takhar MK, Shan L et al. TH2 cytokines modulate the IL-9R expression on human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2009. 384(2): p. 167-172.
166. Bhatena PR, Comhair SAA, Holroyd KJ et al. Interleukin-9 receptor expression in asthmatic airways in vivo. *Lung*, 2000. 178(3): p. 149-160.
167. Chang MS, Engel G, Benedict C et al. Isolation and characterization of the human interleukin-9 receptor gene. *Blood*, 1994. 83(11): p. 3199-3205.
168. Sliva D, Gu M, Zhu YX et al. 14-3-3zeta interacts with the alpha-chain of human interleukin 9 receptor. *Biochem. J.*, 2000. 345(3): p. 741-747.
169. Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology*, 2009. 127(4): p. 450-458.
170. Arendse B, Van Snick J, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in Leishmania major infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. *J Immunol*, 2005. 174(4): p. 2205-11.
171. Chen J, Petrus M, Bryant BR et al. Induction of the IL-9 gene by HTLV-I Tax stimulates the spontaneous proliferation of primary adult T-cell leukemia cells by a paracrine mechanism. *Blood*, 2008. 111(10): p. 5163-72.
172. Grohmann U, Van Snick J, Campanile F et al. IL-9 Protects Mice from Gram-Negative Bacterial Shock: Suppression of TNF-alpha, IL-12, and IFN-gamma, and Induction of IL-10. *J Immunol*, 2000. 164(8): p. 4197-4203.
173. Umezū-Goto M, Kajiyama Y, Kobayashi N et al. IL-9 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Atopic Asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol* 2007. 143(Suppl. 1): p. 76-79.
174. Ying S, Meng Q, Kay AB et al. Elevated expression of interleukin-9 mRNA in the bronchial mucosa of atopic asthmatics and allergen-induced cutaneous late-phase

- reaction: relationships to eosinophils, mast cells and T lymphocytes. *Clin Exp Allergy* 2002. 32(6): p. 866-871.
175. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: Increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000. 105(1): p. 108-115.
 176. Nagato T, Kobayashi H, Kishibe K et al. Expression of interleukin-9 in nasal natural killer/T-cell lymphoma cell lines and patients. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(23): p. 8250-7.
 177. Fischer M, Bijman M, Molin D et al. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, 2003. 17(12): p. 2513-6.
 178. Merz H, Houssiau FA, Orscheschek K et al. Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood*, 1991. 78(5): p. 1311-7.
 179. Glimelius I, Edström A, Amini RM et al. IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*, 2006. 76(4): p. 278-83.
 180. Molin D, Edström A, Glimelius I et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 2002. 119(1): p. 122-4.
 181. von Wasielewski R, Seth S, Franklin J et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood*, 2000. 95(4): p. 1207-13.
 182. Khan IH, Krishnan VV, Ziman M et al. A comparison of multiplex suspension array large-panel kits for profiling cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis patients. *Cytometry B Clin Cytom.*, 2009. 76B(3): p. 159-168.
 183. Poulin LF, Richard M, Le Moine A et al. Interleukin-9 promotes eosinophilic rejection of mouse heart allografts. *Transplantation*, 2003. 76(3): p. 572-577.
 184. Lu L-F, Lind EF, Gondek DC et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 2006. 442(7106): p. 997-1002.
 185. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009. 78(6): p. 539-552.
 186. Cappuzzello C, Di Vito L, Melchionna R et al. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN-gamma in patients with chronic heart failure. *J Transl Med*, 2011. 9(1): p. 28.
 187. Barth S, Kleinhappl B, Gutsch A et al. In vitro cytokine mRNA expression in normal human peripheral blood mononuclear cells. *Inflamm Res*, 2000. 49(6): p. 266-74.
 188. Friberg D, Bryant J, Shannon W et al. In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of immunocompetence or the state of activation. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994. 1(3): p. 261-8.
 189. Lan K, Verma SC, Murakami M et al, Isolation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), in *Curr Protoc Microbiol* 2007. p. Appendix 4C.
 190. Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*, 1976. Suppl 5: p. 9-15.
 191. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1968. 97: p. 77-89.
 192. Aukrust P, Halvorsen B, Ueland T et al. Activated platelets and atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010. 8(9): p. 1297-307.
 193. Otterdal K, Pedersen TM, Solum NO. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase. *Thromb Res*, 2004. 114(3): p. 167-77.

194. Crowther JR, The ELISA guidebook 2001, Totowa: Humana Press. XI, 421 s.
195. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD et al. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008. 63(8): p. 879-84.
196. eBioscience, Human IL-9 ELISA Ready-SET-Go!, Protocol 2009.
197. Bio-Rad, Bio-Plex Pro Assays. Cytokine, Chemokine, and Growth Factors. Instruction Manual., 2011.
198. Qiagen, RNeasy Mini Handbook, 2010.
199. Ståhlberg A, Hakansson J, Xian X et al. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem*, 2004. 50(3): p. 509-15.
200. Applied-Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Protocol, 2010.
201. Huggett J, Dheda K, Bustin S et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 2005. 6(4): p. 279-84.
202. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 2006. 27(2-3): p. 95-125.
203. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
204. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 2004. 15(3): p. 155-66.
205. Applied-Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assays, Protocol, 2004.
206. Applied-Biosystems. TaqMan® and SYBR® Green Chemistries. <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html?ICID=EDI-Lrn4> (27.01. 2011).
207. Smith C, Damas JK, Otterdal K et al. Increased levels of neutrophil-activating peptide-2 in acute coronary syndromes: possible role of platelet-mediated vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(8): p. 1591-9.
208. Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Tromb Haemost* 2007. 97(5): p. 714-721.
209. Tilg H, Peschel C. Interferon-alpha and its effects on the cytokine cascade: a pro- and anti-inflammatory cytokine. *Leuk Lymphoma*, 1996. 23(1-2): p. 55-60.
210. Cannon JG, St Pierre BA. Gender differences in host defense mechanisms. *J Psychiatr Res*, 1997. 31(1): p. 99-113.
211. Tarazona R, Solana R, Ouyang Q et al. Basic biology and clinical impact of immunosenescence. *Exp Gerontol* 2002. 37(2-3): p. 183-189.
212. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE et al. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. 13(5): p. 541-7.
213. Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M et al. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J*, 2004. 4(3): p. 193-207.
214. Aziz N, Nishanian P, Mitsuyasu R et al. Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999. 6(1): p. 89-95.
215. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 2009. 55(4): p. 611-22.

216. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 2004. 37(1): p. 112-4, 116, 118-9.
217. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ et al. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 2002. 57(9): p. 765-70.
218. Bas A, Forsberg G, Hammarström S et al. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 2004. 59(6): p. 566-73.
219. Brockmann R, Beyer A, Heinisch JJ et al. Posttranscriptional expression regulation: what determines translation rates? *PLoS Comput Biol*, 2007. 3(3): p. e57.
220. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 846-852.
221. Cannon JG, Nerad JL, Poutsika DD et al. Measuring circulating cytokines. *J Appl Physiol*, 1993. 75(4): p. 1897-902.
222. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(3): p. s5-10.
223. von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 2007. 100(1): p. 27-40.
224. Corson MA. Emerging inflammatory markers for assessing coronary heart disease risk. *Curr Cardiol Rep*, 2009. 11(6): p. 452-9.
225. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr. et al. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med*, 2008. 27(2): p. 157-72; discussion 207-12.
226. Klingenberg R, Hansson GK. Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies. *Eur Heart J*, 2009. 30(23): p. 2838-44.
227. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*, 2005. 352(1): p. 20-8.
228. Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF et al. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005. 76(10): p. 1366-72.
229. Zola H. Detection of cytokine receptors by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, 2001. Chapter 6: p. Unit 6 21.

8 Vedlegg

8.1 Liste over materiell

Isolering av PBMC

15 og 50 ml rør (Sarstedt)
Bürcker-tellekammer (VWR)
Fysikalsk saltvann (0,9 % NaCl) (Braun)
Lymfoprep (Axis-Shield)
Metylfiolett (Sigma-Aldrich)
RPMI1640 (PAA)

Stimulering av PBMC

5 % føtalt kalveserum (PAA)
Flatbunnet 96-brønners plate (Costar)
Lipopolysakkarid (LPS) (Sigma-Aldrich)
Phytohaemagglutinin (PHA) (OXOID)
Rekombinant IL-9 (R&D Systems)
RPMI-1640 (PAA)

Isolering av blodplater

Acetylsalisylsyre (ASA) (Sigma-Aldrich)
Citrat (Sigma-Aldrich)
Metanol (Sigma-Aldrich)
PBS (Sigma-Aldrich)
Trombinagonist-peptidet SFLLRN (Bioteknologisenteret, Oslo)

ELISA, IL-9

Human IL-9 ELISA Ready-set-go! (eBioScience):

96-brønners Corning Costar 9018 plate

Assay diluent (AD)

Capture Antibody: pretitrert, rensset antistoff

Deteksjonsantistoff : pretitrert biotin-konjugert antistoff

Deteksjonsenzym: pretitrert avidin-horseradish-peroksidase (avidin-HRP)

Standard: rekombinant IL-9

Substratløsning: tetrametylbenzidin (TMB)

Annet nødvendig materiell:

Stoppløsning: 2N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich)

Vaskebuffer: 1 x PBS, 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich)

ELISA, MCP-1

Human CCL2/MCP-1 DuoSet kit (R&D Systems):

Capture Antibody: murint anti-human MCP-1

Deteksjonsantistoff : biotinykert geit-anti-humant MCP-1

Deteksjonsenzym: streptavidin-horseradish-peroxidase (streptavidin-HRP)

Standard: rekombinant MCP-1

Annet nødvendig materiell:

96 brønners Corning Costar 9018 plate (eBioScience)

Reagent diluent: 1,0 % BSA, 0,05 % Tween 20 i PBS (Sigma-Aldrich)

Stoppløsning: 2N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich)

Substratløsning: 1:1-blanding av H₂O₂ og tetramethylbenzidine (TMB) (R&D Systems)

Vaskebuffer: 0,05 % Tween 20 i PBS (Sigma-Aldrich)

ELISA, IL-8

Human CXCL8/IL-8 DuoSet kit (R&D Systems):

Capture Antibody: murint anti-human IL-8

Deteksjonsantistoff : biotinyleret geit-anti-humant IL-8 (streptavidin-HRP)

Deteksjonsenzym: streptavidin-horseradish-peroxidase

Standard: rekombinant IL-8

Annet nødvendig materiell:

96-brønners Corning Costar 9018 plate (eBioScience)

Block buffer: 1 % BSA i PBS (Sigma-Aldrich)

Reagent diluent: 0,1 % BSA, 0,05 % Tween 20 i PBS (Sigma-Aldrich)

Stoppløsning: 2N H₂SO₄ (Sigma-Aldrich)

Substratløsning: 1:1-blanding av H₂O₂ og tetramethylbenzidine (TMB) (R&D Systems)

Vaskebuffer: 0,05 % Tween 20 i PBS (Sigma-Aldrich)

Bio-plex

Bio-Plex Pro Reagent Kit (Bio Rad):

96-brønners filterplate

Assay buffer

Deteksjonsantistoff-diluent

Forseilingstape

Magnetiske kuler, standarder og deteksjonsantistoffer: IL-10, IFN- γ , IP-10, IL-17, IFN α -2

Sample diluent

Standard diluent

Streptavidin- Phycoerythrin (PE)

Vaskebuffer

Annet nødvendig materiell:

Bio-Plex Manager, software (Bio Rad)

Bio-Plex System (Bio Rad)

Platerister (Heidolph)

Vakuumtrykkvasker (Millipore)

Isolering av RNA

RNeasy Mini kit (Qiagen):

RLT-buffer

RNase-fritt H₂O

RNeasy Minispinn-kolonner

RPE-buffer

RW1-buffer

Samlerør 1,5 ml/2ml

RNase-Free DNase Set (Qiagen):

DNase I-løsning

RDD-buffer

RNase-fritt H₂O

Annet nødvendig materiell:

14,3 M β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)

70 % etanol (Sigma-Aldrich)

RNase-fritt H₂O (5 Prime)

Syntese av cDNA

High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems):

dNTP-miks

MultiScribe™ Reverse Transkriptase

RNase-hemmer

RT-buffer

RT-random primere

Annet nødvendig materiell:

Nuklease-fritt H₂O (Qiagen)

Thermal Cycler (Applied Biosystems)

TaqMan-qPCR

Primere og probe, IL-9/IL-9R/ β -actin/18S (Applied Biosystems)

RNase-fritt H₂O (5 Prime)

TaqMan Gene Expression Assays, IL-9/IL-9R (Applied Biosystems)

TaqMan Universal PCR Expression Mastermix (Applied Biosystems)

Øvrig materiell

7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Abscent Software for Multiscan Ascent (Applied Biosystems)

ABX Micros cell counter (Labnovation, Inc.)

Bioanalyzer (Agilent)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)

Eppendorf-rør (Eppendorf)

GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc.)

MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)

MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)

MicroAmp™ Optical Caps, 8 Caps/Strip (Applied Biosystems)

Multiscan Ascent (Thermo Labsystems)

Nanodrop-måler (Sareen Werner)

PASW Statistics 17.0 (IBM)

Phosphate buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM

KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)

Sentrifuge/Mikrosentrifuge (Eppendorf)

Vortexmikser (Heidolph)

Wash 430 automatic strip well washer (Microwell Systems)

8.2 Protokoll: *Human CCL2/MCP-1 DuoSet kit* (R&D Systems, katalognr. DY279)

human CCL2/MCP-1 Catalog Number: DY279

This DuoSet ELISA Development kit contains the basic components required for the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1). DuoSets are designed for the analysis of cell culture supernates. Other sample types, such as serum and plasma, need to be validated prior to use in this DuoSet.¹ Each kit contains sufficient materials to run ELISAs on approximately fifteen 96-well plates, provided that the following conditions are met:²

- The assay is run as summarized in the General ELISA protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

MATERIALS PROVIDED

Bring all reagents to room temperature before use.

Capture Antibody (Part 840204, 1 vial) - 180 µg/mL of mouse anti-human MCP-1 when reconstituted with 1.0 mL of PBS. After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 60 days or aliquot and store at -20° C to -70° C in a manual defrost freezer for up to 6 months.³ Dilute to a working concentration of 1.0 µg/mL in PBS,⁴ without carrier protein.

Detection Antibody (Part 840205, 1 vial) - 18 µg/mL of biotinylated goat anti-human MCP-1 when reconstituted with 1.0 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 60 days or aliquot and store at -20° C to -70° C in a manual defrost freezer for up to 6 months.³ Dilute to a working concentration of 100 ng/mL in Reagent Diluent.⁴

Standard (Part 840206, 2 vials) - Each vial contains 90 ng/mL of recombinant human MCP-1 when reconstituted with 0.5 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Aliquot and store reconstituted standard at 2 - 8° C for up to 60 days.³ **DO NOT FREEZE.** A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent, and a high standard of 1000 pg/mL is recommended.

Streptavidin-HRP (Part 890803, 1 vial) - 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Store at 2 - 8° C for up to 6 months after initial use.³ **DO NOT FREEZE.** Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent (see Solutions Required section).⁴

SOLUTIONS REQUIRED

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

Wash Buffer - 0.05% Tween® 20 in PBS, pH 7.2 - 7.4 (R&D Systems Catalog # WA126).

Reagent Diluent¹ - 1% BSA⁵ in PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered (R&D Systems Catalog # DY995).

Quality of BSA is critical (see Technical Hints).

Substrate Solution - 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999).

Stop Solution - 2 N H₂SO₄ (R&D Systems Catalog # DY994).

Tween is a registered trademark of ICI Americas.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate⁹ with 100 μ L per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μ L) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 μ L of Reagent Diluent to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 μ L of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 μ L of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 μ L of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

TECHNICAL HINTS AND LIMITATIONS

- The use of high quality Bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.
- We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent (Catalog # DY995) or the use of Millipore Bovine Serum Albumin, Fraction V, Protease free (Catalog # 82-045), to prepare your own Reagent Diluent.
- This DuoSet should not be used beyond the expiration date on the label.
- It is important that the diluents selected for reconstitution and for dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured. The diluent suggested in this protocol should be suitable for most cell culture supernate samples. Validate diluents for specific sample types prior to use.
- The type of enzyme and substrate and the concentrations of capture/detection antibodies used can be varied to create an immunoassay with a different sensitivity and dynamic range. A basic understanding of immunoassay development is required for the successful use of these reagents in immunoassays.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Use a fresh reagent reservoir and pipette tips for each step.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers. This may interfere with the sensitivity of the assay. Buffers containing a large quantity of protein should be made under sterile conditions and stored at 2 - 8° C or be prepared fresh daily.

PRECAUTION

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density.

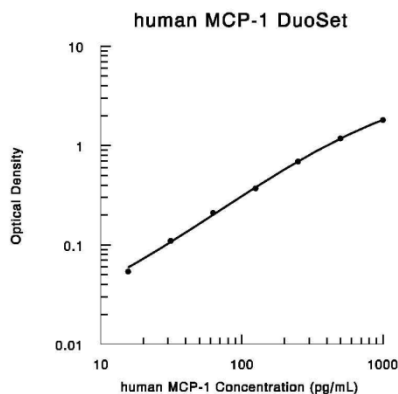
Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the MCP-1 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes.

A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

The graph below represents typical data generated when using this human MCP-1 DuoSet. The standard curve was calculated using a computer generated 4-PL curve-fit.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference.

Recombinant human:	Recombinant mouse:
MCP-2	JE/MCP-1
MCP-3	MCP-5
MCP-4	MARC

CALIBRATION

This DuoSet is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant human MCP-1 produced at R&D Systems.

¹If assaying sample types other than cell culture supernates, each laboratory should develop and validate its own diluent. We suggest starting with PBS supplemented with 10 - 50% fetal calf serum. The diluent must not be used to dilute the Detection Antibody or the Streptavidin-HRP.

²Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.

³Provided this is within the expiration date of the kit.

⁴Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

⁵All buffers containing BSA must be stored at 2 - 8° C.

⁶Costar EIA Plate (Costar Catalog # 2592 or R&D Systems Catalog # DY990) is suggested. R&D Systems ELISA Plate Sealers (Catalog # DY992) are also available.

**FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

USA & Canada | R&D Systems, Inc.
614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.
19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420

China | R&D Systems China Co., Ltd.
24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road
Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001

8.3 Protokoll: *Human CXCL8/IL-8 DuoSet kit* (R&D Systems, katalognr. DY208)

human CXCL8/IL-8 Catalog Number: DY208

This DuoSet ELISA Development kit contains the basic components required for the development of sandwich ELISAs to measure natural and recombinant human Interleukin 8 (IL-8). DuoSets are designed for the analysis of cell culture supernates. Other sample types, such as serum and plasma, need to be validated prior to use in this DuoSet.¹ Each kit contains sufficient materials to run ELISAs on approximately fifteen 96-well plates, provided that the following conditions are met:²

- The assay is run as summarized in the General ELISA protocol.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

MATERIALS PROVIDED

Bring all reagents to room temperature before use.

Capture Antibody (Part 890804, 1 vial) - 720 µg/mL of mouse anti-human IL-8 when reconstituted with 1.0 mL of PBS. After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 60 days or aliquot and store at -20° C to -70° C in a manual defrost freezer for up to 6 months.³ Dilute to a working concentration of 4.0 µg/mL in PBS,⁴ without carrier protein.

Detection Antibody (Part 890805, 1 vial) - 3.6 µg/mL of biotinylated goat anti-human IL-8 when reconstituted with 1.0 mL of Reagent Diluent (see Solutions Required section). After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 60 days or aliquot and store at -20° C to -70° C in a manual defrost freezer for up to 6 months.³ Dilute to a working concentration of 20 ng/mL in Reagent Diluent.

Standard (Part 890806, 1 vial) - 110 ng/mL of recombinant human IL-8 when reconstituted with 0.5 mL of distilled or deionized water. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Store reconstituted standard at 2 - 8° C for up to 60 days or aliquot and store at -70° C for up to 6 months.³ A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions in Reagent Diluent, and a high standard of 2000 pg/mL is recommended.

Streptavidin-HRP (Part 890803, 1 vial) - 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Store at 2 - 8° C for up to 6 months after initial use.³ **DO NOT FREEZE.** Dilute to the working concentration specified on the vial label using Reagent Diluent (see Solutions Required section).⁴

SOLUTIONS REQUIRED

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

Wash Buffer - 0.05% Tween[®] 20 in PBS, pH 7.2 - 7.4 (R&D Systems Catalog # WA126).

Block Buffer - 1% BSA, in PBS with 0.05% NaN₃.

Reagent Diluent¹ - 0.1% BSA,⁵ 0.05% Tween 20 in Tris-buffered Saline (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl), pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

Quality of BSA is critical (see Technical Hints).

Substrate Solution - 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems Catalog # DY999).

Stop Solution - 2 N H₂SO₄
(R&D Systems Catalog # DY994).

Tween is a registered trademark of ICI Americas.

GENERAL ELISA PROTOCOL

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to the working concentration in PBS without carrier protein. Immediately coat a 96-well microplate[®] with 100 μ L per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μ L) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 μ L of Block Buffer to each well. Incubate at room temperature for a minimum of 1 hour.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 μ L of sample or standards in Reagent Diluent, or an appropriate diluent, per well. Cover with an adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Add 100 μ L of the Detection Antibody, diluted in Reagent Diluent, to each well. Cover with a new adhesive strip and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Add 100 μ L of the working dilution of Streptavidin-HRP to each well. Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2.
7. Add 100 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 μ L of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

TECHNICAL HINTS AND LIMITATIONS

- The use of high quality Bovine Serum Albumin (BSA) for the Reagent Diluent and Block Buffer is crucial for the optimum performance of the DuoSet ELISA Development kit. Impurities such as proteases, binding proteins, soluble receptors or other interfering substances can be found to varying degrees in virtually all BSA preparations and can inhibit or interfere with the detection of certain analytes. If the standard curve appears suppressed, consider evaluating a different preparation of BSA.
- We recommend the use of R&D Systems' Reagent Diluent (Catalog # DY995) or the use of Millipore Bovine Serum Albumin, Fraction V, Protease free (Catalog # 82-045), to prepare your own Reagent Diluent and Block Buffer.
- This DuoSet should not be used beyond the expiration date on the label.
- It is important that the diluents selected for reconstitution and for dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured. The diluent suggested in this protocol should be suitable for most cell culture supernate samples. Validate diluents for specific sample types prior to use.
- The type of enzyme and substrate and the concentrations of capture/detection antibodies used can be varied to create an immunoassay with a different sensitivity and dynamic range. A basic understanding of immunoassay development is required for the successful use of these reagents in immunoassays.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Use a fresh reagent reservoir and pipette tips for each step.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers. This may interfere with the sensitivity of the assay. Buffers containing a large quantity of protein should be made under sterile conditions and stored at 2 - 8° C or be prepared fresh daily.

PRECAUTION

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density.

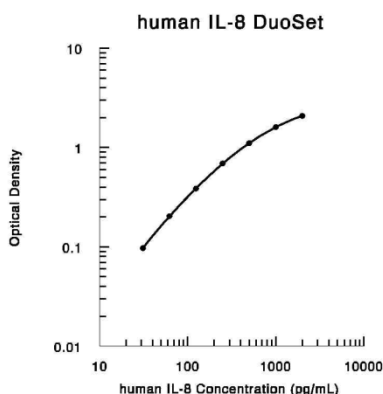
Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the IL-8 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

This standard curve is only for demonstration purposes.

A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

The graph below represents typical data generated when using this human IL-8 DuoSet. The standard curve was calculated using a computer generated 4-PL curve-fit.



SPECIFICITY

The following factors prepared at 50 ng/mL were assayed and exhibited no cross-reactivity or interference.

Recombinant human:		Recombinant mouse:	
GRO α	IP-10	MIP-1 α	KC
GRO β	MCP-1	MIP-1 β	
GRO γ	MCP-2	RANTES	
I-309	MCP-3		

CALIBRATION

This DuoSet is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed 72 amino acid (monocyte) form of recombinant human IL-8 produced at R&D Systems.

¹If assaying sample types other than cell culture supernates, each laboratory should develop and validate its own diluent. We suggest starting with PBS supplemented with 10 - 50% fetal calf serum. The diluent must not be used to dilute the Detection Antibody or the Streptavidin-HRP.

²Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.

³Provided this is within the expiration date of the kit.

⁴Allow all components to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation after initial reconstitution. Working dilutions should be prepared and used immediately.

⁵All buffers containing BSA must be stored at 2 - 8° C.

⁶Costar EIA Plate (Costar Catalog # 2592 or R&D Systems Catalog # DY990) is suggested. R&D Systems ELISA Plate Sealers (Catalog # DY992) are also available.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

USA & Canada | R&D Systems, Inc.
614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.
19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420

China | R&D Systems China Co., Ltd.
25/G Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road
Shanghai PRC 200050
TEL: (800) 988-1270 FAX: 86 (21) 52371001