Navorsings- en oorsigartikels

'n *In vitro*-vloeikamer as model om die hemostatische funksie van lewende *in situ*-endoteelselle te bepaal

S.M. Meiring*, H.F. Kotzé, G.H.J. Pretorius en P.N. Badenhorst

Departement Hematologie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, Posbus 339 (G2), Bloemfontein, 9300

Ontvang 12 Oktober 1995; aanvaar 30 Oktober 1995

UITTREKSEL

Gekweekte umbilikale endoteelselle word meestal gebruik om endoteelselfunksie *in vitro* te bestudeer. Die nadele hiervan is dat die kweekproses selfunksie nadelig kan beïnvloed en dat die funksie van endoteelselle verskil na gelang van hulle anatomiese ligging. Na aanleiding hiervan het ons 'n vloeikamer ontwikkel om die funksie van vars endoteelselle te bestudeer. Die vloeikamer is so ontwerp dat 'n stukkie bobbejaanaorta (5 cm lank) in 'n geslote vloeibaar geplaas word. Twee stukke bobbejaanaorta is gebruik. Die een is vir 6 ure by 37 °C met Ringer-laktaatoplossing geperfuseer en die ander met dieselfde buffer wat 1 eenheid (E)/ml trombin bevat. Na die perfusie is die perfusate by -70 °C weggevries. 'n Normale aftas-elektronmikroskopiese voorkoms en die afwesigheid in die perfusate van trombomodulin, 'n merker van endoteelskade, het daarop gedui dat die perfusieproses nie die selle beskadig het nie. Die trombiengestimuleerde en ongestimuleerde selle het onderskeidelik $20,7 \pm 13,4$ en $11,8 \pm 10,3$ µg proteïen/ml/cm² vrygestel. Gelyke hoeveelhede antitrombin III (AT III), von Willebrandfaktor (vWF), plasminogeenaktiveerderinhibeerder tipe 1 (PAI-1), weefselfaktorbaan-inhibeerder (TFPI) en prostasiklien (PGI₂) is in die perfusate van sowel die gestimuleerde as ongestimuleerde selle gemeet. Die bevinding dat die gestimuleerde selle betekenisvol meer fibrinogeen vrygestel het as die ongestimuleerde selle, $0,6 \pm 0,2$ teenoor $0,3 \pm 0,2$ µg/ml/cm² is insiggewend. Funksionele studies het getoon dat die vrygestelde antitrombin III (AT III) en weefselfaktorbaan-inhibeerder (TFPI), trombin en geaktiveerde stollingsfaktore VII en X inhibeer. Die resultate bevestig dat die vloeikamer gebruik kan word om endoteelselfunksie te ondersoek.

ABSTRACT

An in vitro flow chamber as model to investigate the haemostatic function of fresh endothelial cells

Cultured human umbilical cord endothelial cells are mostly used to study the response of endothelium to various stimuli. The effect of the culture process on cell function is however, not known and the function of endothelial cells from different anatomical loci differs. In view of this we developed a flow chamber to study the function of fresh endothelium. The flow chamber was designed to accommodate a five cm piece of baboon aorta in a closed circuit where six hours of perfusion of the aorta with Ringer's lactate/dextrose buffer at 37 °C was maintained by a peristaltic pump. Two pieces of baboon aorta were used. One was perfused with buffer (control) and the other (experimental) with buffer containing 1 Unit (U)/ml thrombin. After perfusion the perfusates were frozen at -70 °C until assayed. Scanning electron microscopy and the absence of thrombomodulin, an indicator of endothelial cell damage, in the perfusate showed that the cells were not damaged by perfusion. Stimulated and unstimulated cells secreted $20,7 \pm 13,4$ and $11,8 \pm 10,3$ µg protein/ml/cm² respectively. The concentration of several individual proteins was equivalent in the perfusates of stimulated and unstimulated cells. It is noteworthy that the stimulated cells released significantly more fibrinogen than the unstimulated cells, i.e. $0,6 \pm 0,2$ versus $0,3 \pm 0,2$ µg/ml/cm². Functional studies indicated that the released antithrombin III (AT III) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) were effectively able to inhibit thrombin and activated coagulation factors VII and X. The results showed that the flow chamber can be used to study endothelial cell function.

INLEIDING

Endoteelselle is tot en met die middel van die sewentigerjare beskou as 'n inerte oppervlak wat verhoed dat die bloed met die subendoteel (kollageen) in aanraking kom om só bloedstolling te voorkom.¹ Hierdie siening het egter

verander toe endoteelselkulture beskikbaar geword het.² Dit is nou duidelik dat die antitrombogenisiteit van die endoteelseloppervlak bewerkstellig word deur 'n delikate balans tussen pro- en antistollingsmeganismes wat op die seloppervlak funksioneer.³ Hierdie meganismes sluit in die beheerde beskikbaarstelling van reseptore op die

*Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word.

seloppervlak en die sekresie van produkte in respons op stimuli. Die responspatroon is afhanklik van die stimulus. In die teenwoordigheid van byvoorbeeld trombien, stel die endoteelsel meer prostollingsfaktore vry.⁴

Ons kennis van endoteelselbiochemie en -funksie is grootliks gebaseer op studies wat met gekweekte endoteelsisteme van die umbilicale vene gedoen is. Alhoewel *in vivo*-studies die resultate in 'n sekere mate bevestig het, is daar nog steeds kommer oor die geldigheid daarvan. Daar is bewyse dat die funksie van die endoteelselle van verskillende dele van die vaskulêre stelsel van mekaar verskil.⁵ Eksogene groeifaktore wat gebruik word om gekweekte selle in stand te hou, kan ook hulle funksie beïnvloed.⁶ So byvoorbeeld kan tripsien, wat gebruik word om die endoteelselle te subkultiveer, aan die trombienreseptor op endoteelselle bind om hulle te stimuleer aangesien die struktuur van tripsien en trombien baie ooreenkomste toon.⁷ Die omgewing van endoteelselle in kultuur verskil ook drasties van die omgewing *in vivo*. Die belangrike invloed van onderliggende gladdespierselle en sirkulerende bloedkomponente op endoteelselfunksie word dus geïgnoreer.⁸ Die ouderdom van gekweekte endoteelselle beïnvloed ook die funksie van die selle. Eienskappe soos die aantal lewende selle, die tempo van proteïenvrystelling en die transkripsievlakke van sekere gene verander met veroudering en die aantal seldelings.^{7,9,10}

Na aanleiding van bogenoemde nadele van gekweekte endoteelselle was dit nodig om *in vivo*- of *in vitro*-toetsstelsels te ontwikkel waarmee die funksie van vars endoteelselle bestudeer kan word.⁸ 'n Vloeikamer is ontwerp om die funksie van vars aorta-endoteelselle *in vitro* te bestudeer, en bobbejaanaorta is gebruik omdat die bloedstollingsmeganisme van hierdie diere grootliks met dié van mense ooreenstem.¹¹ Die studie is in twee fases gedoen om te kan onderskei tussen die funksie van die gestimuleerde en ongestimuleerde endoteelselle. Die endoteelselle is met trombien gestimuleer aangesien dit 'n belangrike rol in hemostase speel¹² en omdat dit 'n bekende stimulant van endoteelselle is.¹³ Die konsentrasie van verskeie pro- en antistollings- en fibrinolitiese proteïene is

ook bepaal. Hierdie studie dui daarop dat die model geskik is om die funksie van lewende endoteelselle *in situ* te bestudeer.

EKSPERIMENTELE PROSEDURE

Proefdiere

Sewe normale bobbejane (*Papio ursinus*, 5 mannetjies, 2 wyfies) is as proefdiere gebruik in 'n projek wat deur die Etiekkomitee vir Proefdiernavorsing van die Vrystaatse Provinsiale Administrasie en die Universiteit van die Oranje-Vrystaat goedgekeur is. Ketamienhidrochloried (10 mg/kg liggaamsmassa, Warner Park Davis Research Laboratories, Kaapstad) is intramuskulêr toegedien en die aorta is met standaardprosedure blootgelê. Die sytakke van die aorta is versigtig met sydraad afgebind en die aorta van die aanliggende weefsels losgesny en dadelik in Ringer-laktaatbuffer (6 g/l NaCl, 40 mg/l KCl, 3.25 g/l Na-laktaat, 400 mg/l Ca-heksahidraat, pH=6.0) met 1% dekstroze geplaas (SABAX Bpk, Suid Afrika). Die aorta is deeglik met die Ringer-laktaatbuffer gespoel om kontaminasie van plasma te voorkom. Daarna is dit in die oplossing geplaas om te verhoed dat dit uitdroog en aan lug blootgestel word. Nadat die aorta verwyder is, is die bobbejane met 'n oordosis pentabarbitoonnatrium (Maybaker SA Bpk) intraveneus gespuit.

Vloeikamers

Die perspex-vloeikamer is só ontwerp dat 'n stuk bobbejaanaorta (5 cm lank) in 'n geslote vloeibaar geplaas kan word (fig. 1). 'n Peristaltiese pomp (Sarns Inc, Ann Arbor, Michigan, VSA) is gebruik om die vloeie deur die baan te handhaaf. 'n Bobbejaanaorta is in twee 5 cm-segmente verdeel, een vir die eksperimentele studie en die ander as kontrole. Nadat die aorta met sydraad aan die glaspypies vasgemaak is en die Tygon-buis aan die pomp gekonnekteer is, is die vloeibaar met ongeveer 5 ml Ringer-laktaatbuffer gevul. Sorg is gedra dat geen lug in die

geslote sisteem ingelaat is nie en dat die aortas op geen stadium met lug in aanraking gekom het nie. Die vloeikamer is met buffer gevul, met 'n deksel geseël en in 'n waterbad by 37 °C geplaas. In die kontrolestudie is die endoteel aaneenlopend vir ses uur met 'n oplossing van Ringer-laktaaten 1% dekstrose teen 'n vloeitempo van 110 ml/min geperfuseer. In die eksperimentele studie is die endoteel vir ses uur met 1 U/ml beestrombien (Baxter Diagnostics, VSA) wat by die Ringer/dekstrose-oplossing gevoeg is, geperfuseer. Die skuifkrigte op die aortawand het tussen 3 en 8 dynes/cm² gevarieer. Die perfusate is nie geëksigeneer nie.

Bepaling van die proteïenkonsentrasie in die perfusate

Die proteïenkonsentrasie van sowel gestimuleerde as ongestimuleerde perfusate van die sewe bobbejane is kolorimetries volgens die Bradford-metode bepaal (14). 'n Direkte ELISA-tegniek is gebruik om die AT III-konsentrasie te bepaal. Die perfusate is met 'n natriumkarbonaat-bikarbonaatbuffer verdun in die verhouding 1:3 (pH=9,6) en 200 µl hiervan is in 'n mikrotiterput (NUNC mikrotiterplaat, Intermed, RSA) gevoeg en oornag in 'n koelkamer by 4 °C geïnkubeer. Daarna is die putte baie deeglik met PBS (fosfaatgebufferde soutoplossing)-Tween-20-buffer (0,5%) gewas (Sigma, St Louis, VSA). Vier en sewentig µg van 'n muis-anti-mens AT III-monoklonale teenliggaam (Sigma, St Louis, VSA), wat verdun is in 'n fosfaatbuffer wat 1% beësserumalbumien (Sigma, St Louis, VSA) bevat, is in elke put gevoeg en vir 1 uur by 37 °C geïnkubeer. Daarna is die putte weer gewas en 'n alkaliese fosfatasegekonjugeerde teenliggaam (Boehringer Mannheim, Jhb) bygevoeg. Na nog 'n uur is die putte gewas en 'n alkaliese fosfatasesubstraat (0,01%, Boehringer Mannheim, Suid-Afrika) bygevoeg. Die optiese

digtheid is by 405 nm met 'n spektrofotometer gemeet. Standaardkrommes is opgestel deur suiwer AT III en die antigeenspesifieke teenliggaam (Sigma, St Louis, VSA) te gebruik.

Die Von Willebrandfaktor (vWF), plasminogeenaktiveerder-inhibeerder tipe 1 (PAI-1)- en weefselfaktorbaan-inhibeerder (TFPI)-konsentrasies is m.b.v. die toebroodjie-ELISA-tegniek bepaal waar die kleurreaksie met peperwortelperoksidase (HRPO)-teenliggaamkonjugaat uitgevoer is. Die vWF en PAI-1 standaardproteïene en onderskeie antigeenspesifieke poliklonale teenliggame (konyn-anti-mens vWF en PAI) en teenliggaamkonjugate (bok-anti-konyn) is goedgunstiglik deur drs. Hans Deckmyn en Paul Declerck (Kortrijk, België) verskaf. Mikrotiterputte is oornag by 4 °C met 100 µl van die antigeenspesifieke teenliggaam geïnkubeer. Die verdunnings van die teenliggame was 1:5 000 vir vWF en 1:10 000 vir PAI-1 onderskeidelik. Honderd µl van die peroksidase gekonjugeerde teenliggame (1:10 000 verdunning) is dan bygevoeg en vir twee ure by 37 °C geïnkubeer. Die reaksie is daarna gestop deur 1 M swawelsuur (100 µl/put) by te voeg. Na drie verdere wasprosesse is tetrametielbensidiensubstraat bygevoeg en die kleurverandering by 492 nm met 'n spektrofotometer gemeet. Tetrametielbensidien, die wasoplossing en die stopoplossing is van Behring (Suid-Afrika) verkry.

ELISA-kitsstelle is gebruik om TFPI (American Diagnostics, USA) en prostasiklien (Amersham, VK) in die perfusate te meet volgens die instruksies van die vervaardigers. Die fibrinogeenkonsentrasie in die perfusate is met 'n roetiene "Automatic Coagulation Laboratory" stollingsmonitor (Ilex, Italië) bepaal. Al die bepalings is in duplikaat gedoen.

TABEL 1 Proteïenvrystelling deur gestimuleerde en ongestimuleerde aorta-endoteel. Waardes word gegee as gemiddeld $\pm$ 1 standaardafwyking

	GESTIMULEERD	ONGESTIMULEERD
Totale proteïene (µg/ml/cm ²)	20,7 $\pm$ 13,4	11,8 $\pm$ 10,3
AT III (µg/ml/cm ²)	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
vWF (ng/ml/cm ²)	1,6 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,4
PAI-1 (pg/ml/cm ²)	9,7 $\pm$ 5,2	9,1 $\pm$ 4,1
TFPI (pg/ml/cm ²)	60,8 $\pm$ 28,1	56,9 $\pm$ 36,6
PGI ₂ (pg/ml/cm ²)	91,5 $\pm$ 12,6	105,0 $\pm$ 23,8
Fibrinogeen (µg/ml/cm ²)	0,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2*

*p < 0,05: Student se t-toets vir gepaarde data.

Immuunkladanalise

Immuunkladanalise is gedoen om die teenwoordigheid van trombomodulien in die perfusaat te bepaal. 'n Monoklonale teenliggaam teen menst trombomodulien (Celsus Laboratories, VSA) is gebruik.

Aftaselektronmikroskopie

Verteenwoordigende 1 cm^2 stukkie van die gestimuleerde en ongestimuleerde aortas is voorberei vir aftaselektronmikroskopie.¹⁷ Gluteraldehyd in fosfaatbuffer is as fikseermiddel gebruik. Na alkoholdehidrasie en kritiese vriesdroging is die materiaal met goudpartikels m.b.v. 'n metaaldampapparaat (Biorad SEM-coating system) bedek. Aftaselektronmikroskopie is op sowel die gestimuleerde as ongestimuleerde aortas voor en na die sesuur-perfusieperiode gedoen. 'n Jeol-JSM-6400-Winsem-aftaselektronmikroskoop is gebruik.

Funksionele studies

Trombien-en faktor VIIa-aktiwiteitsbepalings is op beide perfusate gedoen om die funksionele aktiwiteit van die proteïene wat deur die endoteelselle vrygestel is, te bepaal. Die trombienaktiwiteit is met 'n eenstapreaksie, aangepas vir mikrotiterplate, gemeet. Die reaksiemengsel het $50\text{ }\mu\text{l}$ perfusaat en $20\text{ }\mu\text{l}$ van 'n chromogeniese substraat, tosiel-Gly-Pro-Arg-4-nitro-aniliedasetaat ($0,02\text{ U}$, Boehringer Mannheim, Suid-Afrika) bevat. Die verandering in optiese digtheid is dinamies vir 40 minute met 'n gerekenariseerde Biotek El 312-kinetiese leser by 405 nm gemonitor (Biotek, VSA). 'n Kontrolereaksie is ook gedoen waar $50\text{ }\mu\text{l}$ van 'n trombien-oplossing ($0,714\text{ U/ml}$, finale konsentrasie) in die plek van die perfusaat gebruik is. Al die reaksies is in duplikaat uitgevoer.

Die faktor VIIa-aktiwiteit van die twee perfusate is ook kineties bepaal. 'n Faktor VIIa-kitsstel (Kabi Diagnostics, Stockholm, Swede) is hiervoor gebruik. Suiwer faktor VII (Sigma, St Louis, VSA) is as kontrole gebruik. Vyftig μl van die perfusaat is vir 4 minute by 37°C in 'n mikrotiterplaat geïnkubeer. Daarna is $50\text{ }\mu\text{l}$ van 'n gekombineerde reagens van tromboplastien, faktor X (17 nM) en CaCl_2 (40 nM) in die verhouding 1:5:3 bygevoeg. Die reaksiemengsel is weer vir 7 minute by 37°C geïnkubeer. Laastens het ons vyftig μl van 'n chromogeniese substraat, S 2765 ($1,6\text{ mM}$, Sigma, St Louis, VSA) bygevoeg. Die optiese digtheid is dinamies vir 40 minute by 405 nm gemeet. 'n Kontrole-eksperiment is ook gedoen waar $5\text{ }\mu\text{l}$ suiwer faktor VII ($4,4\text{ nM}$, Sigma, St Louis, VSA) in die plek van die perfusaat gebruik is.

Die effek van 'n oormaat AT III en rekombinante TFPI (r-TFPI) op trombien-en faktor VIIa-aktiwiteit is ook gemeet in dieselfde reaksiemengsel wat in die kontrolestudies gebruik is. Voordat die substraat bygevoeg is, is $5\text{ }\mu\text{l}$ AT III ($3,27\text{ nM}$,

Sigma, St Louis, VSA) en $5\text{ }\mu\text{l}$ r-TFPI ($1,68\text{ }\mu\text{M}$, Novo Nordisk, Denemarke) bygevoeg.

Statistiese analise

Student se t-toets is gebruik om te toets vir statisties betekenisvolle verskille in die resultate. Verskille waar $p < 0,05$ was, is as beduidend beskou. Resultate in die teks is uitgedruk as die gemiddeld ± 1 standaardafwyking (SA).

RESULTATE

Proteïen- en prostasiklien-vrystelling

Die resultate word in tabel 1 opgesom. Trombien-gestimuleerde endoteelselle het $8,9 \pm 10,1\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ meer proteïene as die ongestimuleerde selle vrygestel. Die 95% vertrouensinterval het van $-1,0\text{ }\mu\text{g/ml/cm}^2$ tot $18,7\text{ }\mu\text{g/ml/cm}^2$ gewissel. Alhoewel die verskil nie statisties betekenisvol was nie ($p > 0,05$), dui die vertrouensinterval tog dat daar 'n neiging by die gestimuleerde selle was om meer proteïene vry te stel. Van die individuele proteïene het die gestimuleerde selle betekenisvol meer ($p < 0,05$) fibrinogeen vrygestel.

FIGUUR 2: Skandeerelektronmikrograwe ($782\times$ vergroot) van aorta-endoteelselle na die sesuur-perfusieperiode met trombien (A) en sonder trombien (B). Let op na die fibrienetwerk op die gestimuleerde aorta-endoteelselle.

Aftaselektronmikroskopie

Figuur 2 toon verteenwoordigende aftaselektronmikrograwe van gestimuleerde (A) en ongestimuleerde (B) aortas. Fibriendrade op die oppervlak van die gestimuleerde aorta is duidelik sigbaar. Die endoteelmonolaag was minimaal beskadig tydens die 6 uur perfusie.

Immuunkladanalise

Immuunkladanalise van die gestimuleerde en ongestimuleerde perfusate het aangetoon dat daar nie trombomodulien in die perfusate teenwoordig was nie. Die resultate word derhalwe nie weergegee nie.

Funksionele studies

Die invloed van AT III en r-TFPI op trombien- en faktor VIIa/Xa-aktiwiteit: Die resultate word in fig. 3 opgesom. 'n Oormaat AT III (3,27 nM) en r-TFPI (1,68 μ M) is by

chromogeniese substrate vir trombien (0,02 U) en faktor VIIa/Xa (1,6 mM) gevoeg. AT III het die trombienaktiwiteit volledig geïnhibeer, terwyl r-TFPI geen inhiberende werking op trombien gehad het nie (fig. 3A). Die faktor VIIa/Xa-aktiwiteit was met ongeveer 20% deur AT III geïnhibeer, terwyl r-TFPI die faktor VIIa/Xa aktiwiteit volledig geïnhibeer het (fig. 3B).

Die invloed van die perfusate op trombien- en faktor VIIa/Xa-aktiwiteit: Die perfusate van sowel gestimuleerde as ongestimuleerde endoteelselle het trombien- en faktor VIIa/Xa-aktiwiteit merkbaar geïnhibeer (fig. 4). In die afwesigheid van inhibiteurs (kontrolestudie) was die reaksiesnelheid van trombien 5,4 %/min. Die reaksiesnelhede van trombien nadat die gestimuleerde en ongestimuleerde perfusate bygevoeg is, onderskeidelik $2,91 \pm 1,43$ en $4,09 \pm 0,71$ %/minuut, was merkbaar stadiger as die kontrole. Die gemiddelde verskil was $1,18 \pm 1,79$ %/minuut en die 95% vertrouwensinterval van $-0,56$ tot $2,92$ %/minuut. Die verskil was statisties nie betekenisvol nie ($p > 0,05$). Die reaksiesnelheid van faktor VIIa/Xa in die kontrolestudie was 5,30 %/minuut. Wanneer die perfusate van die gestimuleerde en ongestimuleerde endoteelselle bygevoeg is, was die reaksiesnelhede merkbaar stadiger, onderskeidelik $1,43 \pm 0,50$ en $2,66 \pm 1,12$ %/min. Die gemiddelde verskil was $1,23 \pm 0,82$ %/min en die 95% vertrouwensinterval van $0,43$ tot $2,03$ %/min. Die verskil was statisties betekenisvol ($p < 0,05$).

FIGUUR 3: Die effek van 'n oormaat AT III en TFPI op trombien- (A) en faktor VIIa/Xa-aktiwiteit (B).

BESPREKING

Die geldigheid van die resultate van hierdie studie berus op die beginsel dat die endoteelselle minimaal beskadig was tydens die tydperk van perfusie. Dit is op twee maniere bevestig. Eerstens het die endoteelselle morfologies normaal met skandeerelektron-mikroskopie vertoon (fig. 3). Daar word algemeen aanvaar dat die vrystelling van trombomodulien deur die endoteelselle in die omringende medium op endoteelselbeskadiging dui.¹⁸ Tweedens was daar geen trombomodulien in die perfusate teenwoordig nie. Hierdie resultate dui aan dat die endoteelselle minimaal beskadig was tydens die sesuur-perfusieperiode.

Sowel die trombiengestimuleerde as ongestimuleerde endoteelselle het proteïene vrygestel (tabel 1). Die gestimuleerde selle het ongeveer 43% meer proteïene as die ongestimuleerde selle vrygestel. Alhoewel die verskil nie statisties betekenisvol was nie, suggereer die 95%-vertrouensinterval tog dat die gestimuleerde selle meer proteïene vrygestel het. Die teenwoordigheid van proteïene in die perfusaat van die ongestimuleerde selle was onverwags. Daar is 'n paar moontlike verklarings hiervoor. Rustende endoteelselle in kultuur stel proteïene vry.^{18,19,20} Die proteïene wat in die ongestimuleerde perfusaat gemeet word, kan dus 'n deel wees van hierdie verskynsel. Meganiese spanning kan ook endoteelselle aktiveer en sodoende endoteelvrystelling verhoog.²⁰ Die hantering van die aortas kan dus verhoogde vrystelling meebring. Dit is verbasend dat die gestimuleerde selle nie

drasties meer proteïene as die ongestimuleerde selle vrygestel het nie. As endoteelselle in kultuur met 1 U/ml trombien gestimuleer word, stel hulle aansienlik meer proteïene vry.^{8,23-26,28} Daar is moontlike verklarings vir die bevinding. Die fibrinogeen wat in die perfusaat teenwoordig is (tabel 1) kan die aktiveringsnelheid van die selle deur die trombien/trombomodulien kompleks verminder.²² Verder kan die AT III in die perfusaat aan trombien bind en so sy vermoë om die selle te stimuleer, verlaag. Dit is verder ook moontlik dat 1 eenheid/ml trombien te min was om die endoteelselle genoegsaam te stimuleer, veral in die lig van die feit dat trombien aan AT III en trombomodulien bind. In 'n loodsstudie is endoteelselle met 2 E/ml trombien gestimuleer. Onder hierdie omstandighede is 'n totaal van 345 µg proteïene/ml perfusaat vrygestel. In dieselfde studie het die ongestimuleerde selle 'n totaal van 111 µg/

ml proteïene vrygestel. Die gestimuleerde selle het dus ongeveer drie keer soveel proteïene vrygestel. Om die resultate van hierdie studie egter te vergelyk met dit wat in studies met gekweekte selle verkry is, moes 1 E/ml trombien gebruik word.

Die vars gestimuleerde endoteelselle het aansienlik minder vWF, PAI-1 en PGI_2 vrygestel as endoteelselle in kultuur wat ook met 1 U/ml trombien gestimuleer is.^{8,23,28,29} Die rede is onbekend. Dit is wel bekend dat endoteelselle *in vivo*-aansienlik laer vlakke van DNA en mRNA het as gekweekte selle.³⁰ Tripsien, wat gebruik word om endoteelselle te subkultiveer is ook in staat om endoteelselle te stimuleer²⁹ en so vrystelling van proteïene te verhoog. Dit is dus moontlik dat proteïenvrystelling deur gekweekte endoteelselle nie die *in vivo*-funksie van die selle weerspieël nie.

Sowel die gestimuleerde as ongestimuleerde perfusate het gelyke hoeveelhede AT III, vWF, PAI-1, TFPI en prostasiklien vrygestel. Daar is verskeie redes hiervoor. Die lae AT III-konsentrasie in die gestimuleerde perfusaat kan toegeskryf word aan die funksie van AT III. AT III bind aan trombien om sy funksie te inhibeer.²⁷ Omdat die ELISA-tegniek wat gebruik is slegs die vry AT III in die perfusaat meet en nie dié wat in kompleks met trombien is nie, kan die AT III-konsentrasie wat in die gestimuleerde perfusaat gemeet is, dus 'n vals resultaat wees. Gekweekte endoteelselle stel vWF binne die eerste vyf minute na stimulasie vry. Daarna vind endositose van vWF plaas.²⁸ Indien dit die geval was in hierdie studie, is die meeste vWF weer opgeneem deur die endoteelselle tydens die sesuur perfusieperiode. Die feit dat gelyke hoeveelhede PGI_2 deur die gestimuleerde en ongestimuleerde selle vrygestel is, kan moontlik deur die kinetika van die sintese- en vrystelling van PGI_2 deur endoteelselle verklaar word. PGI_2 -sintese en -vrystelling in reaksie op 'n stimulus is vinnig en duur ongeveer 2-3 minute.²⁹ Wanneer die endoteelsel vir 'n paar minute of langer aan 'n stimulus blootgestel word, verlaag die intrasellulêre kalsium-vlakke wat tot inhibisie van PGI_2 -sintese lei.³⁰ Dit is dus moontlik dat die endoteelselle tydens die sesuur-perfusieperiode baie min PGI_2 gesintetiseer het.

Die teenwoordigheid van fibrinogeen in die perfusaat van sowel die gestimuleerde as ongestimuleerde endoteelselle was onverwags (tabel 1). Dit is nie bekend of endoteelselle fibrinogeen sintetiseer en vrystel en of die endoteelsel 'n reseptor vir fibrinogeen op sy oppervlak het nie. Gekweekte endoteelselle vertoon wel 'n tipe fibrinogeen-endoteelsel-interaksie.³¹ Endoteelselle reageer egter slegs op fibrinogeen by gebiede waar weefsel-skade, trombose, embolisme en metastase voorkom. Onder normale toestande waar endoteelselle *in vivo* aan fibrinogeen blootgestel word, lok dit geen selreaktiwiteit uit nie.³²

Ons het chromogeniese substrate vir trombien en faktor VIIa/Xa gebruik om die funksionele aktiwiteit van die vrygestelde AT III en TFPI te bepaal. Eerstens moes die effek van suiwer AT III en TFPI op trombien- en faktor VIIa/Xa-aktiwiteit bepaal word. Die resultate (fig. 3) stem ooreen met gepubliseerde data^{33,34} wat toon dat AT III trombien-aktiwiteit maksimaal inhibeer en dat dit faktor

VIIa/Xa-aktiwiteit slegs gedeeltelik inhibeer. TFPI darenteën het geen effek op trombien-aktiwiteit nie, maar blokkeer faktor VIIa/Xa-aktiwiteit volledig. Die AT III en TFPI in die perfusate van sowel gestimuleerde as ongestimuleerde aortas was funksioneel. Sowel trombien-as faktor VIIa/Xa-aktiwiteit is merkbaar geïnhibeer (fig. 4). Gesien in die lig van die resultate in fig. 3 kan ons aflei dat die trombienaktiwiteit deur die vrygestelde AT III geïnhibeer is (fig. 4A). Dit is so aangesien 'n oormaat TFPI geen invloed op trombienaktiwiteit het nie (fig. 3A). In die geval van inhibisie van faktor VIIa/Xa-aktiwiteit moet 'n mens aflei dat TFPI grootliks verantwoordelik was vir hierdie verskynsel. 'n Oormaat AT III (190 ng/ml) inhibeer faktor VIIa/Xa-aktiwiteit slegs met ongeveer 20% (fig. 3b). Om saam te vat, hierdie vloei-kamer kan gebruik word om die funksie van vars endoteelselle te ondersoek. Die perfusiesisteen beskadig nie die selle wesenlik nie, en verskeie proteïene word tydens perfusie en na trombienstimulasie vrygestel. Die proteïene wat vrygestel is was funksioneel; AT III het trombienaktiwiteit en TFPI het faktor VIIa/Xa-aktiwiteit geïnhibeer. 'n Belangrike bevinding was die fibrinogeen wat in die perfusate aangetoon is. Na ons wete is dit die eerste keer dat daar aangetoon word dat endoteelselle op een of ander wyse fibrinogeen bevat en/of vrystel.

SUMMARY

INTRODUCTION

The progress in our knowledge of endothelial cell biochemistry is largely based on studies with cultured umbilical endothelial cell systems. Although the results were to some extent confirmed by *in vivo* studies, there is still some concern regarding its validity. It is known that the function of endothelial cells from different parts of the vascular tree differ⁵. Exogenous growth factors that may affect their function are used to maintain the cultures⁶ and trypsin which are used to subculture the cells can stimulate them⁷. All these factors may contribute to the possibility that the function of cultured cells is different from that of fresh endothelial cells. In view of this, we designed a flow chamber to investigate the haemostatic function of fresh aortic endothelial cells.

METHODS

A perspex flow chamber was designed to accommodate a five cm piece of baboon aorta. Tygon tubing was connected to both ends of the chamber to form a closed circuit and the flow through the circuit was maintained by a peristaltic pump. A segment of aorta was divided into two pieces, one was used for the experimental part of the study and the other as control. After the aorta had been secured to the chamber and the tubing was filled with buffer, the chamber was sealed with a lid and submerged in a waterbath at 37 °C. In the control study, the endothelium was continuously perfused for six hours with a solution of Ringer's lactate and 1 % dextrose at a flow rate of 1 l/min.

min. In the experimental study, the endothelium was stimulated for 6 hours with 1 U/ml bovine thrombin added to the Ringer's/dextrose solution. The total protein concentration of both stimulated and unstimulated perfusates were colorimetrically determined by the Bradford method¹. The individual protein concentrations were also determined. A direct ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) technique was used to determine the antithrombin III (AT III) concentration. The concentrations of von Willebrand factor (vWF), plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) were determined using a sandwich ELISA technique. ELISA-kits were used to determine the TFPI and prostacyclin (measured as 6-keto prostaglandin F¹ α) in the perfusate. The clottable fibrinogen concentration was determined using a routine automated coagulation laboratory clotting monitor. We used chromogenic substrates for thrombin and factor VIIa/Xa to assess the functionality of the released AT III and TFPI. In order to test for the effect of AT III and TFPI on the activity of thrombin and factor VIIa/Xa, purified inhibitors were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Although the difference in total released proteins was not significant, the thrombin-stimulated cells released approximately 43 % more proteins than the unstimulated cells. Protein release by the unstimulated cells can be explained in a number of ways. Resting endothelial cells in culture maintain a baseline secretion of proteins.^{18,19,20} Mechanical stress can also activate endothelial cells and so increase protein secretion.²¹

Both the stimulated and unstimulated cells release equal amounts of AT III, vWF, PAI-I, TFPI and prostacyclin. There may be several reasons for this finding. The low concentration of AT III in the stimulated perfusate may be due to its ability to bind thrombin.²⁷ Since the ELISA method only measures free AT III in the perfusate, the concentration would have been low. In culture, endothelial cells secrete vWF within the first five minutes after activation. Thereafter, endocytosis of vWF takes place.²⁸ If this was the case in our study, much of the vWF could have been taken up by the endothelial cells during the six hours of perfusion and causing the lower vWF concentration in the stimulated perfusate. In the case of PGI₂, a slightly different mechanism may be in operation. Stimulated cells in culture rapidly release PGI₂.²⁹ However, with continuous stimulation, intracellular calcium levels decrease and this leads to inhibition of PGI₂ synthesis²⁰. It is therefore possible that, after six hours of stimulation, very little PGI₂ was synthesized by the cells.

An important finding was the presence of fibrinogen in the perfusate of stimulated and unstimulated endothelial cells and the fact that the perfusate of stimulated cells contained significantly more fibrinogen than the perfusate of the unstimulated cells. The source of the fibrinogen is not known. We do not know if it is synthesized and secreted by endothelial cells or whether there is a receptor for fibrinogen on the cell surface.

The results of the thrombin- and factor VIIa/Xa-activity determinations confirmed published results,^{33,34} which

show that AT III maximally inhibit thrombin and only partially inhibit factor VIIa/Xa. TFPI on the other hand, had no effect on thrombin activity, but completely blocked factor VIIa/Xa activity. The AT III and TFPI in the perfusate of both stimulated and unstimulated aortas were functional since both thrombin and factor VIIa/Xa activity were inhibited. From the results, it is reasonable to assume that the inhibition of thrombin activity was due to inhibition by AT III. In the case of factor VIIa/Xa activity, we propose that the inhibition was mainly due to the actions of TFPI.

In conclusion, we have shown that the flow chamber can be used to study the function of fresh endothelial cells. The perfusion system did not adversely affect the endothelial cells. Various proteins were released by the cells. Although there was no marked difference between the individual proteins in the perfusate of the stimulated and unstimulated cells, we feel that a higher concentration of thrombin will cause an increased protein release. We could also show that released AT III and TFPI were functional. An important finding of this study was the presence of fibrinogen in the perfusate. To our knowledge, it is the first time that this has been shown.

BEDANKINGS

Ons bedank graag vir dr. L. Duyvené de Wit, Departement Anatomiese Patologie, Universiteit van die Oranje-Vrystaat, vir die voorbereiding van die aortaweefsel vir aftaselektronmikroskopie en mnr. Jimmy Brummer vir tegniese hulp tydens die operasieprosedures om die aortas te bekom. Hierdie projek is finansiële ondersteun deur die sentrale navorsingsfonds van die Universiteit van die Oranje-Vrystaat en die Mediese Navorsingsraad.

LITERATUURVERWYSINGS

1. Gimbrone, M.A. (1986). Vascular endothelium: Nature's blood container. In *Vascular endothelium in haemostasis and thrombosis*, Gimbrone, M.A. ed. (Churchill Livingstone, New-York) pp. 1-9.
2. Jaffe, E.A., Hayer, L.W. & Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, 52, 2757-2764.
3. Stern, D.M., Kaiser, E. & Nawroth, P.P. (1988). Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells. *Haemostasis*, 18, 202-214.
4. Pearson, J.D. (1993). The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. *Baillieres Clin. Haematol.*, 6(3), 629-644.
5. Simionescu, N. & Simionescu, N. (1991) Endothelial transport macromolecules: transcytosis and endocytosis, *Cell. Biol. Rev.*, 25, 5-80.
6. Yamamoto, C., Kaji, T., Furuy, A. M., Sekamoto, M., Kozuka, H. & Koizumi, F. (1994). Basic fibroblast growth factor suppresses tissue plasminogen activator release from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb. Res.*, 73, 255-263.
7. Eldor, A., Vlodowsky, I., Hy-Am, E., Atzmon, R., Weksler, B.B., Raz, A. & Fuks, Z. (1993). Cultured endothelial cells increase their capacity to synthesize prostacyclin following the formation of a contact-inhibited all monolayer, *J. Cell. Physiol.*, 114, 179-183.

8. Gallicchio, M., Argyrior, S., Filonzi, E.L., Zoellner, H., Hamilton, J.A., McGrath, K. & Wojta, J. (1993). Stimulation of PAI expression in endothelial cells by cultured vascular smooth muscle cells, *Arterioscler. Thromb.*, 14, 815-823.
9. Goldsmith, J.C., McCormick, J.J. & Yen, A. (1984). Endothelial cell cycle kinetics: changes in culture and correlation with endothelial properties, *Lab. Invest.* 51, 643-647.
10. Dichek, D. & Quertermous, T. (1989). Variability in messenger RNA levels in human umbilical vein endothelial cells of different lineage and time in culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, 289-292.
11. Hampton, J.W. & Matthews, C. (1966). Similarities between baboon and human blood clotting, *J. Appl. Physiol.* 21, 1713-1716.
12. Musci, G., Berliner, L.J. & Esmon, C.T. (1988). Evidence for multiple changes in the active centre of thrombin induced by complex formation with thrombomodulin: an analysis employing nitroxide spin-labels, *Biochemistry*, 27, 769-773.
13. Vu, T-KH., Wheaton, V.I., Hung, D.T. & Couglin, S.R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor activation, *Cell*, 64, 1057-1068.
14. Bradfort, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
15. Tubbs, R.R., Gephardt, G.N., Petras, R.E. (1986). *Atlas of Immunohistology*. Chicago: American Society of Clinical Pathologists.
16. Salinovich, O. & Montelaro, R. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by SDS-PAGE, *Anal. Biochem.*, 156, 341-347.
17. Hyat, M.A. (1970). *Principles and techniques of electronmicroscopy*. (Van Nostrand Reinhold, New York).
18. Ishii, H., Uchiyama, H. & Kazama, M. (1991). Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelium, *Thromb. Haemost.*, 65, 618-623.
19. Rees, D.P., Palmer, R.M.J. & Moncada, S. (1989). Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure, *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA*, 86, 3375-3378.
20. Carter, T.D., Newton, J.S., Jacob, R. & Pearson, J.D. (1990). Homologous desensitization of ATP mediated elevations in cytoplasmic calcium and prostacyclin release in human endothelial cells does not involve protein kinase C, *Biochem. J.*, 272, 217-221.
21. MacArthur, H., Warner, T.D., Wood, E.G., Corder, R. & Vane, J.R. (1994). Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200, 395-400.
22. Lerant, I., Kovacs, T., Papp, B., Mandl, J., Lambin, P., Machovich, R. (1990). Interaction of thrombin with endothelial cells in the presence of fibrinogen and alpha 2-macroglobulin, *Haematologica (Hungary)*, 23, 161-169.
23. Weksler, B.B., Ley, C.W. & Jaffe, E.A. (1978). Stimulation of endothelial cell PGI₂ production by thrombin, trypsin and ionophore A23187. *J. Clin. Invest.*, 62, 923-938.
24. Heaton, J.H., Dame, M.K. & Gelehrter, T.D. (1990). Thrombin induction of plasminogen activator inhibitor mRNA in human umbilical vein endothelial cells in culture, *J. Lab. Clin. Med.*, 120, 222-228.
25. Yang, Z., Arnet, U., Bauer, E., Von Segesser, L., Siebenmann, R., Turina, M. & Lüscher, T. (1994). Thrombin-induced endothelium-dependent inhibition and direct activation of platelet-vessel wall interaction, *Circulation*, 89, 2266-2272.
26. Akai, T., Kaji, T., Hayakawa, Y., Hayashi, T. & Sakuragawa, N. (1991). Antithrombin III modulates the effect of thrombin in cultured endothelial cells, *Thromb. Res.*, 62, 707-716.
27. Franzen, L.E., Svensson, S. & Larm, O. (1986). Structural studies on the carbohydrate portion of human antithrombin III, *J. Biol. Chem.*, 255, 5090-5093.
28. Collins, P.W., Macey, M.G., Cahill, M.R. & Newland, A.C. (1993). Von Willebrand factor release and p-selectin expression is stimulated by thrombin and trypsin but not by IL-1 in cultured human endothelial cells, *Thromb. Haemost.*, 70, 346-350.
29. Hallam, T.J., Pearson, J.D. & Needham, L.A. (1988). Thrombin-stimulated elevation of endothelial cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production, *Biochem. J.*, 251, 243-249.
30. Schwartz, B.S. & Bradshaw, J.D. (1992). Regulation of plasminogen activator inhibitor mRNA levels in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. Correlation with production of the protein, *J. Biol. Chem.*, 267, 7089-7094.
31. Barsigian, C. & Martinez, J. (1990). Binding and covalent processing of fibrinogen by hepatocytes and endothelial cells, *Blood Coag. Fibrinolysis.*, 1, 551-555.
32. Francis, C.W., Bunce, L.A., Sporn, L.A. (1993). Endothelial cell responses to fibrin mediated by FPB cleavage and the amino terminus of the β chain, *Blood Cells*, 19, 21-307.
33. Scully, M.F. (1992). Kinetic considerations of the physiologic control of thrombin by factor Xa. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 18, 218-223.
34. Broze, G.J., Likert, K. & Higuchi, D. (1993). Inhibition of factor VIIa/TF by AT III and TFPI, *Blood*, 82, 1679-1680.