

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DOLORES HRUŠOVAR

**VPLIV POGOSTO UPORABLJENIH ZDRAVIL V  
REVMATOLOGIJI NA VNETNI ODZIV GOJENIH  
ČLOVEŠKIH ENDOTELIJSKIH CELIC**

**THE EFFECT OF COMMONLY USED MEDICATIONS IN  
RHEUMATOLOGY ON THE INFLAMMATORY RESPONSE  
OF CULTURED HUMAN ENDOTHELIAL CELLS**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma na Kliničnem oddelku za revmatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Borutu Božiču, za možnost opravljanja diplomskega dela na področju, ki me najbolj veseli, ter za vse strokovne nasvete pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi somentorici, doc. dr. Snežni Sodin-Šemrl, za prijaznost, vzpodbudo in nasvete pri opravljanju eksperimentalnega dela. Posebno in iskreno se za vso pomoč, potrpežljivost, pripombe, vzpodbudo, usmerjanje pri delu ter za vse nadure, ki jih je občasno preživljala v moji družbi zahvaljujem Katji Lakota. Hvala za nenehno dobro voljo in optimizem. Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, ker so mi, ko je bilo potrebno, brez oklevanja priskočili na pomoč med opravljanjem eksperimentalnega dela.

Prav tako se zahvaljujem tudi mami Lidiji in vsem svojim bližnjim, ki so mi tekom študija vedno stali ob strani. Zahvaljujem pa se tudi prijateljem, za vse lepe in zabavne trenutke, ki smo jih v študentskih letih preživeli skupaj.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Snežne Sodin-Šemrl.

Ljubljana, november 2012

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član komisije: asist. dr. Nace Zidar

# KAZALO

<b>KAZALO</b>	<b>III</b>
<b>POVZETEK</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>VII</b>
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ATEROSKLEROZA</b>	<b>1</b>
1.1.2 Aterogeneza	1
<b>1.2 SISTEMSKE AVTOIMUNSKE BOLEZNI</b>	<b>3</b>
<b>1.3 VNETJE</b>	<b>4</b>
1.3.1 Biosinteza prostaglandinov	5
1.3.2 Serumski amiloid A	5
<b>1.4 NEKATERE KLJUČNE MOLEKULE, KI SODELUJEJO PRI PROCESU ATEROSKLEROZE</b>	<b>7</b>
1.4.1 Molekule z vplivom na iniciacijo ateroskleroze	7
1.4.2 Molekule, ki sodelujejo v končni fazi ateroskleroze	9
1.4.3 Nekater druge molekule, ki sodelujejo pri vnetju	10
<b>1.5 ZDRAVILA, UPORABLJENA PRI REVMATIČNIH IN NEKATERIH KRONIČNIH BOLEZNIH</b>	<b>11</b>
1.5.1 Deksametazon	13
1.5.2 Fluvastatin	13
1.5.3 Inhibitorji dejavnika tumorske nekroze $\alpha$ (TNF- $\alpha$ inhibitorji)	14
1.5.4 Kaptopril	16
1.5.5 Metotreksat	17
1.5.6 Nesteroidni antirevmatiki (NSAR)	17
1.5.7 Rosiglitazon	18
<b>2. NAMEN, HIPOTEZA IN CILJI</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b>	<b>21</b>

<b>3.1 MATERIALI</b>	<b>21</b>
3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL	21
3.1.2 ANALIZNI KOMPLETI	22
3.1.3 REAGENTI	26
3.1.4 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL	28
<b>3.2 METODE</b>	<b>30</b>
3.2.1 DELO S CELIČNIMI KULTURAMI	30
3.2.2 IZOLACIJA NUKLEARNIH EKSTRAKTOV	33
3.2.3 DOLOČANJE PPAR $\gamma$ TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA	33
3.2.4 PANEL CITOKINOV	34
3.2.5 ENCIMSKOIMUNSKA METODA	35
3.2.6 ANALIZA RNA	37
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>42</b>
<b>5.1 CITOKINSKI PANEL</b>	<b>42</b>
<b>5.2 VNETNI ODZIV HCAEC NA STIMULACIJO S SAA</b>	<b>43</b>
5.2.1 ČASOVNA ODVISNOST IZRAŽANJA NEKATERIH GENOV	44
<b>5.3 VNETNI ODZIV HCAEC NA STIMULACIJO S SAA OB DODATKU ZDRAVIL</b>	<b>45</b>
5.3.1 DMARD IN KORTIKOSTEROIDI (METOTREKSAT IN DEKSAMETAZON)	45
5.3.2 INHIBITORJI TNF- $\alpha$	49
5.3.3 ZDRAVILA ZA ZNIŽANJE HOLESTEROLA IN KRVNEGA TLAKA (FLUVASTATIN IN KAPTOPRIL)	53
5.3.4 NSAR (DIKLOFENAK, MELOKSIKAM IN ETORIKOKSIB)	57
5.3.5 ANTIDIABETIKI (ROSIGLITAZON)	62
<b>5.4 AKTIVNOST TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA PPAR<math>\gamma</math> V HCAEC</b>	<b>65</b>
<b>6. SKLEPI</b>	<b>68</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>70</b>

# POVZETEK

Približno 5 % svetovne populacije ima eno izmed kroničnih vnetnih avtoimunskih bolezni. Ti bolniki imajo večje tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni, do katerih pride zaradi napredovane ateroskleroze, ki je poglaviti vzrok srčno-žilnih bolezni in posledično smrti v zahodnem svetu. Njena značilna patofiziološka karakteristika je kronični vnetni proces arterijske stene. S pomočjo vnetja se iz telesa odstranijo patogene snovi, pride pa tudi do zacelitve tkiva. Namen naše naloge je bil preveriti vpliv zdravil za zdravljenje kroničnih vnetnih avtoimunskih in drugih kroničnih bolezni na človeške endotelijske celice koronarnih arterij (HCAEC). Celice smo po dodatku zdravil stimulirali s človeškim rekombinantnim serumskim amiloidom A (SAA), ki je pri njih izzval vnetje. Nato smo preverili vpliv zdravil na vnetne citokine, kemokine ter adhezivne molekule na proteinskem in mRNA nivoju.

Dobljeni rezultati so pokazali, da metotreksat in deksametazon, eni izmed najpogosteje uporabljenih zdravil v revmatologiji, zelo učinkovito znižata koncentracijo vseh vnetnih parametrov, razlikujeta pa se pri vplivu na inhibitor aktivatorja plazminogena 1 (PAI-1), kar je možni vzrok njunega različnega vpliva na pojav srčno-žilnih dogodkov. Inhibitorji faktorja tumorske nekroze- $\alpha$  na HCAEC delujejo različno. Certolizumab pegol koncentracijo večine vnetnih mediatorjev poveča, adalimumab pa jo zmanjša. Zdravili sta za razliko od ostalih zdravil neučinkoviti pri zaviranju izražanja mRNA SAA po stimulaciji HCAEC s SAA. Fluvastatin in kaptopril nista protivnetni zdravili, vendar naši rezultati kažejo, da vnetje zelo uspešno zavirata. Fluvastatin se po učinkovitosti na celičnem modelu lahko primerja z zdravili iz skupine zdravil, ki modificirajo potek bolezni (DMARD). Tudi zdravila iz skupine nesteroidnih protivnetnih zdravil (NSAR) na celice ne delujejo enako. Meloksikam občutno poveča koncentracijo skoraj vseh vnetnih mediatorjev, etorikoksib in diklofenak pa jo učinkovito zmanjšata. Vendar pa meloksikam močno zniža koncentracijo PAI-1, kar je možni razlog za manjše število trombotičnih zapletov pri bolnikih, ki se zdravijo z meloksikamom, v primerjavi s tistimi, ki prejema diklofenak. Meloksikam tudi pomembno poveča izražanje PPAR $\gamma$  in na vnetje verjetno deluje tudi preko te signalne poti. Rosiglitazon na HCAEC deluje protivnetno, saj zniža koncentracijo vseh vnetnih molekul, vendar močno poveča koncentracijo PAI-1, kar bi lahko bil razlog za njegov umik iz prodaje. SAA poveča aktivnost PPAR $\gamma$  v enaki meri kot sintetični ligand PPAR $\gamma$ , rosiglitazon, in s tem potencialno vpliva na zmanjšanje vnetja.

# ABSTRACT

About 5 % of the world's population suffers from autoimmune rheumatic diseases, which are associated with higher risks of cardiovascular diseases, secondary to accelerated atherosclerosis. Atherosclerosis is the main cause of cardiovascular diseases and deaths in the Western world. Its main pathophysiological characteristic is chronic inflammation of the arterial wall. Inflammation is a protective attempt by the organism to eliminate pathogens and it also leads to tissue repair. Our aim was to examine the effect of medications used for the treatment of autoimmune rheumatic and some other chronic diseases on human coronary artery endothelial cells (HCAEC). Cells were stimulated with human recombinant serum amyloid A following incubation with specific medications. We verified the effects of the medications on the inflammatory response of HCAEC at the protein and mRNA levels.

Our results show that medications, commonly used for the treatment of autoimmune rheumatic diseases - methotrexate and dexamethasone, both efficiently inhibited all the inflammatory markers, but differed in their effect on plasminogen activator inhibitor (PAI-1). This may also be the reason for their differential effects on cardiovascular events. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitors have diverse effects on HCAEC. Certolizumab pegol induces the concentration of almost all inflammatory mediators and adalimumab inhibits them. Both medications unlike others, do not inhibit mRNA expression of SAA after the stimulation of HCAEC with SAA. Fluvastatin and captopril are primarily not antiinflammatory medications, but we showed that they are both very successful as inhibitors of inflammation. At the cellular level, fluvastatin is as efficient as some DMARD in attenuating inflammation. The effects of different nonsteroidal antiinflammatory drugs on HCAEC are also very interesting. Meloxicam highly induces levels of almost all inflammatory mediators, while etoricoxib and diclofenac inhibit them. However, contrary to diclofenac, meloxicam inhibits the production of PAI-1 which may result in fewer thrombotic complications among patients in comparison to diclofenac. Meloxicam also induces PPAR $\gamma$  expression which may affect inflammation. Rosiglitazone inhibits all the inflammatory mediators, but it also induces PAI-1, which may be the reason for why it was suspended from the European market. SAA induces PPAR $\gamma$  activity as much as rosiglitazone, the synthetic ligand of PPAR $\gamma$ , which may result in inhibition of inflammation, despite the fact, that it is a highly responsive acute phase protein.

# SEZNAM OKRAJŠAV

- 15d-PGJ<sub>2</sub> – 15-deoksi- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub>
- cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina
- COX – ciklooksigenaza
- CRP – C reaktivni protein
- DMARD – antirevmatiki, ki modificirajo potek bolezni
- DMSO – dimetilsulfoksid
- ELISA – encimskoimunski test na trdnem nosilcu (enzyme linked immunosorbent assay)
- FBS – fetalni goveji serum
- GMC – gladko mišične celice
- GM-CSF – granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik
- HCAEC – humane endotelijske celice koronarne arterije
- HDL – lipoprotein visoke gostote
- HRP – hrenova peroksidaza
- HUVEC – humane endotelijske celice umbilikalne vene
- ICAM-1 – intercelularna adhezijska molekula 1
- IL-6 – interlevkin 6
- IL-8 – interlevkin 8
- LDL – lipoprotein nizke gostote
- MI – miokardni infarkt
- MMP – matriks metaloproteinaze
- mRNA – informacijska ribonukleinska kislina
- NSAR – nesteroidni antirevmatiki
- qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
- PAI-I – plazminogen aktivator inhibitor I
- PPAR $\gamma$  – receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov  $\gamma$
- RA – revmatoidni artritis
- RT-PCR – obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
- SAA – serumski amiloid A
- TNF- $\alpha$  – dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$
- VCAM-1 – žilno-celična adhezijska molekula 1

# 1. UVOD

## 1.1 ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je kronična bolezen arterij mišičnega in elastičnega tipa, za katero je značilno napredujoče kopičenje lipidov, veziva, krvi in krvnih sestavin, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi, ter spremljajoče vnetje, ki poleg intime zajame tudi medijo. V zahodnem svetu povzroči več smrti, kot katerakoli druga bolezen (1). Ateroskleroza je poglavitni vzrok srčno-žilnih boleznih in boleznih koronarne arterije, saj povzroča počasno oblikovanje maščobnih, ter nato vezivnih leh in zožitev premera arterij. Preoblikovanje žil vodi do trombotičnih zapletov, kot sta miokardni infarkt (MI) in kap. Znano je, da je ateroskleroza vnetna bolezen, saj je njena značilna patofiziološka karakteristika kronični vnetni proces arterijske stene. Ker ostali dejavniki tveganja, kot so hipertenzija, debelost in diabetes v populaciji naraščajo, je zelo pomembno, da poskušamo obvladati vnetno komponento ateroskleroze ter s tem zmanjšati smrtnost in izboljšati zdravje ljudi (2).

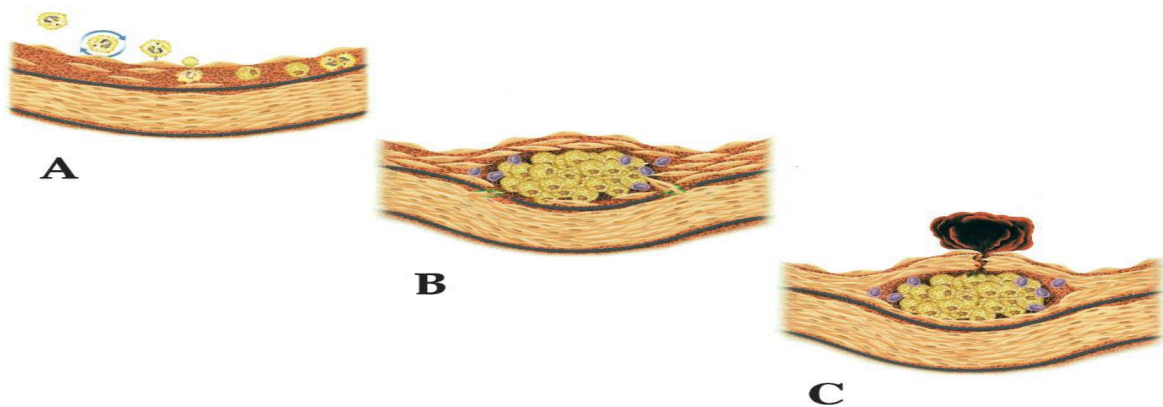
Vnetni označevalci imajo pri iniciaciji in napredovanju ateroskleroze velik vpliv. Prve vnetne karakteristike aterosklerotičnih leh so evropski kirurgi odkrili že pred 200 leti, ateroskleroza pa je postala okarakterizirana kot vnetna bolezen leta 1999 (3).

### 1.1.2 Aterogeneza

Prvi dogodek pri nastanku ateroskleroze je aktivacija endotelija. Zdrav endotelij regulira tonus žil in njihovo zgradbo, ima antikoagulantne in fibrinolitične lastnosti, ter preprečuje zlepljanje trombocitov. Sprošča številne vazodilatorske in vazokonstriktorske substance. Najpomembnejši vazodilatatorji so dušikov oksid (NO), bradikinin in prostaciklini, pomembnejša vazokonstriktorja pa sta angiotenzin II in endotelin. Zaradi delovanja strižnih sil ali proaterogenih faktorjev, kot so spremenjeni lipoproteini in vnetni citokini, pride do aktivacije endotelija. Ob tem pride tudi do porušitve ravnotežja med vazokonstriktorji in vazodilatatorji, kar se nato lahko odrazi v endotelijski disfunkciji. Raziskave so pokazale, da je sama disfunkcija endotelija neodvisni napovedni znak za napredovanje ateroskleroze in pojav srčno-žilnih dogodkov (3). Po aktivaciji endotelija se na njegovi površini izrazijo adhezijske molekule, kot je na primer žilno-celična adhezijska



molekula 1 (VCAM-1). Pride do izločanja citokinov in kemokinov, ki privabljajo levkocite, ti pa preko adhezivnih molekul vstopijo v intimo. Monociti se zberejo na mestu ateroma, migrirajo v žilno steno, ter dozoriijo v makrofage (4). Ti začnejo izražati odstranjevalne (ang. scavenger) receptorje, požirati spremenjene lipoproteine, ter se na koncu spremenijo v penaste celice (slika 1A). Pridružijo se jim tudi limfociti T. Aktivirani makrofagi v intimi proliferirajo, ter vzdržujejo, ali celo spodbujajo vnetje s sproščanjem rastnih faktorjev in citokinov, ki vplivajo na razmnoževanje in migracijo gladko mišičnih celic (GMC) v rastočo aterosklerotično leho (slika 1B). Vplivajo tudi na izražanje encimov, kot so metaloproteinaze matriksa (MMP), ki razgrajujejo arterijski zunajcelični matriks in z razgradnjo kolagena mehčajo fibrozni čep na površini ateroma, ter ga s tem naredijo dovzetnega za to, da počí. Zmanjša se tudi sama sinteza kolagena. Makrofagi in limfociti T izločajo tkivni faktor, ki je ena pglavitnih koagulantnih substanc. Če aterosklerotična leha počí, tkivni faktor ob stiku s krvjo povzroči nastanek tromba, ki je povzročitelj večine akutnih zapletov, ki nastanejo pri aterosklerozi (slika 1C) (5).



**Slika 1: Vloga vnetja v vseh stopnjah ateroskleroze. 1A: Zbiranje monocitov na mestu ateroma, njihova migracija v intimo in nastanek penastih celic. 1B: Proliferacija GMC in njihova migracija v intimo. 1C: Nastanek fibroznega čepa, ki lahko pod vplivom različnih citokinov počí. Ob stiku tkivnega faktorja s krvjo nastane tromb. (Prirejeno po (5))**

Študije, ki so bile izvedene v zadnjem času, so pokazale da imajo številni vnetni označevalci napovedno vrednost za nastanek sprememb v žilju, ter imajo sinergistično delovanje z že znanimi faktorji tveganja za nastanek ateroskleroze, kot so dislipidemija, kajenje, debelost in hipertenzija. Oksidacija LDL in modifikacija ostalih lipoproteinov povzroči povečano izražanje vnetnih citokinov in drugih mediatorjev vnetja v žilah. Angiotenzin II lahko preko aktivacije vnetne kaskade in aterogeneze vodi do hipertenzije, hiperglikemija pri diabetesu pa je povezana s povečano produkcijo vnetnih citokinov, ki jih

proizvajajo žilne endotelijske celice. Pri debelosti adipozno tkivo proizvaja citokine kot sta dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) in interleukin-6 (IL-6), ter tako spodbuja aterogenezo (6).

Študije pa so pokazale tudi, da lahko z zavrtjem vnetnih mediatorjev aterosklerozo upočasnimo. Modifikacije znanih faktorjev tveganja lahko znižajo koncentracijo krožečih vnetnih mediatorjev in izboljšajo funkcijo endotelija (7).

## **1.2 SISTEMSKE AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI**

Med sistemske avtoimunske bolezni prištevamo več kot 200 bolezni in sindromov. Revmatične bolezni brez prisotnosti vnetja, kot je osteoartroza, so pogostejše kakor vnetne sistemske avtoimunske bolezni in imajo boljšo prognozo. Približno 5 % populacije trpi za kroničnimi vnetnimi avtoimunskimi boleznimi, kamor spada tudi revmatoidni artritis (RA) (8). Bolniki, posebej tisti s poudarjeno vnetno komponento, imajo večje tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni, ter večjo smrtnost zaradi le-teh. Do njih pride zaradi napredovane ateroskleroze, ki je pogosto prisotna pri sistemskih avtoimunskih boleznih. Za njen nastanek so lahko odgovorni tradicionalni faktorji tveganja, ki so prisotni tudi pri zdravi populaciji, kot tudi drugi, na primer hiperkoagulabilno stanje krvi, zaradi česar obstaja večja možnost razvoja komplikacij, bolniki pa imajo pogosto tudi spremenjen serumski lipidni profil v aterogenega. Potrebno je upoštevati tudi kumulativno dozo prejetih kortikosteroidov, ki imajo učinke na nivo trigliceridov, metotreksata (poviša nivo homocisteina) in ostalih zdravil, saj je terapija pri revmatskih boleznih ponavadi doživljenjska. Pri revmatičnih bolnikih zasledimo vrsto protiteles, ki so jih povezali z razvojem ateroskleroze, poleg tega sami imunski kompleksi aktivirajo endotelijske celice (9, 10). V zadnjem desetletju se je močno povečalo razumevanje patofiziološkega ozadja teh obolenj, zato je prišlo do vpeljave številnih novih pristopov za zdravljenje. Danes so poleg antirevmatikov, ki modificirajo potek bolezni (disease modifying antirheumatic drugs – DMARD), kot je metotreksat, v uporabi biološka zdravila, katerih tarča so različni citokini in celični receptorji, in s katerimi dosežemo remisijo pri približno 70 % bolnikov. Vendar pa je za izboljšanje kvalitete in trajanja življenja pacientov najpomembnejša zgodnja diagnoza, s katero preprečimo poškodbe posameznih organov, ki nastanejo tekom bolezni (8).

## 1.3 VNETJE

Vnetje je aktiven odziv imunskega sistema na okužbo ali poškodbo. Lahko ima različne morfološke posebnosti, ki so odvisne od vnetnega povzročitelja, jakosti vnetnega dražljaja in lokacije v telesu. Nastanek vnetja je del naravnega imunskega odziva organizma. Na takšen način se iz telesa odstranijo patogene snovi, pride pa tudi do zacelitve tkiva in povrnitve njegove fiziološke funkcije. V akutni fazi vnetja, takoj po poškodbi, se razširijo žile, poveča pa se tudi njihova prepustnost. Aktivirajo se nevtrofilci, ki fagocitirajo patogene mikrobe in sproščajo mediatorje, ki prispevajo k vnetju. Sledijo jim monociti, ki nato dozoriijo v vnetne makrofage in kasneje proliferirajo. Makrofagi izločajo citokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), ki povzročijo vidne znake vnetja, kot so rdečina, toplota, otekanje in bolečina. Ko je vnetni stimulus odstranjen iz telesa s fagocitozo, se vnetna reakcija zmanjša in nato izgine. Med umiritvijo vnetja se granulociti izločijo, makrofagi in limfociti se vrnejo v stanje pred vnetjem, njihovo število pa se zmanjša. Izid akutnega vnetja je večinoma uspešna zacelitev tkiva, lahko pa pride tudi do nadaljevanja vnetja in disfunkcije v vnetnem odzivu, kar lahko vodi k brazgotinjenju in do izgube funkcije organa. Motnje v prekinitvi akutnega vnetnega odziva lahko vodijo k avtoimunosti, prehodu v kronično vnetje in obsežni poškodbi tkiva. Kronično vnetje je značilno za številne avtoimunske bolezni, kjer lastni antigeni neprestano aktivirajo celice T. Za razvoj kroničnega vnetja sta najpomembnejša citokina interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Najpomembnejša lastnost IFN- $\gamma$  je njegova zmožnost aktivacije makrofagov, njihovo nakopičenje pa pri kroničnem vnetju veliko prispeva k okvari tkiva v okolici, saj sproščajo hidrolitične encime in dušikove presnovke. TNF- $\alpha$  spodbudi žilne endotelijske celice k izražanju adhezivnih molekul, kar povzroči nakopičenje levkocitov v vnetišču in jih tudi aktivira, ter spodbudi mononuklearne fagocite k izločanju citokinov in kemokinov (11) (12).

Prostaglandini imajo pomembno vlogo pri vnetnem odzivu. Njihova sinteza v vnetem tkivu je močno povečana, pripomorejo pa tudi k primarnim kliničnim znakom vnetja.

### 1.3.1 Biosinteza prostaglandinov

Prostaglandini in tromboksan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), ki jih skupaj imenujemo prostanoidi, nastanejo, ko aktivirana fosfolipaza  $A_2$  iz plazemske membrane odcepi arahidonsko kislino, s katero je zaestren glicerol v fosfolipidih, gradnikih celičnih membran. Prostaglandin G/H sintetaza oziroma ciklooksigenaza (COX) jo nato lahko metabolizirata naprej. Nastajajo štiri osnovne vrste prostaglandinov: prostaglandin  $E_2$ , ( $PGE_2$ ), prostaciklin ( $PGI_2$ ), prostaglandin  $D_2$  ( $PGD_2$ ) in prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). Prisotni so vsepovsod, navadno pa posamezen celični tip proizvaja en ali dva dominantna produkta. Delujejo kot avtokrini in parakrini lipidni mediatorji in vzdržujejo homeostazo v telesu. Med akutnim vnetjem, tik pred prihodom levkocitov in infiltracijo imunskih celic, se njihova sinteza močno poveča, medtem ko je njihova produkcija v tkivu, kjer ni vnetja, navadno majhna. Posamezni prostaglandini se razlikujejo v svojih učinkih, vendar imajo kot skupina značilno protivnetno delovanje z vazodilatacijo, zvečano kapilarno permeabilnostjo in bolečino, potencirajo pa tudi delovanje drugih mediatorjev vnetja. Arahidonska kislina se pod vplivom lipoksigenaz lahko metabolizira tudi do levkotrienov (LT), ki delujejo podobno (zvečajo vaskularno permeabilnost in so močni kemotaktični agensi) (1, 12) ali do lipoksinov, ki delujejo protivnetno (13).

### 1.3.2 Serumski amiloid A

Serumski amiloid A (SAA) je družina visoko ohranjenih akutno-faznih proteinov, ki se sintetizirajo predvsem v jetrih, kot odziv na stimulacijo s citokini, kot so  $TNF-\alpha$ , IL-1 in IL-6. Vendar pa SAA sintetizirajo tudi celice, ki imajo vlogo pri razvoju ateroskleroze, kot so gladke mišične celice (GMC), endotelijske celice, makrofagi in adipociti (14). SAA ima pri človeku relativno molekulsko maso približno 12 kDa in je dolg 104-112 aminokislin. SAA družina vsebuje dve inducibilni akutno fazni izoobliki, SAA-1 in SAA-2, ki so ju v preteklosti s skupnim imenom imenovali akutno-fazni SAA (A-SAA, danes imenovan SAA 1/2) in konstitutivno izoobliko SAA-4, ki je le 52 % podoben akutno-faznima (15). Izoobliko SAA-3 so pri ljudeh našli izraženo le v mlečnih žlezah in ni del akutno-faznega odziva organizma. Pri nastanku reakcije akutne faze se količina SAA lahko poveča za sto do tisočkrat in v krvi doseže koncentracijo tudi 1 mg/mL. V tem stanju lahko ostane do štiri dni po pričetku vnetja, koncentracija pa se na osnovno raven navadno vrne po enem do dveh tednih. Povečana produkcija SAA je vsota povečane transkripcije in povečane

stabilnosti mRNA (14). Med akutno fazo vnetja SAA postane najbolj prevalenten apolipoprotein vezan na lipoprotein visoke gostote (HDL), kjer nadomesti apoAI in predstavlja do 80 % proteinov, vezanih na HDL. Pri tem ima kompleks SAA/HDL večjo afiniteto za makrofage in manjšo za hepatocite. Kompleksiran SAA v makrofagu povzroči zavrtje encima acetil koencim A holesterol acetittransferaze (ACAT) in aktivacijo nevtralne holesterol ester hidrolaze (nCEH), večja izražanje ATP-vezočega kasetnega transporterja 1 (ABCA1) in zvišuje še druge od ABCA neodvisne poti izločanja holesterola. Rezultat tega je večje izločanje ne-esterificiranega holesterola iz celice in manjše shranjevanje holesterolnih estrov. Tako naj bi imel SAA pospeševalno vlogo pri reverznem transportu holesterola, s čimer pomaga organizmu v akutni fazi in je zaščiten pri procesu ateroskleroze (16). Potrebno je omeniti tudi druge funkcije HDL delca, ki so v akuti fazi lahko spremenjene zaradi vezanega SAA. HDL ima antioksidativno in protivnetno aktivnost, deluje citoprotektivno ter igra vlogo v agregaciji in vazomotoriki. Sprememba teh funkcij HDL ima lahko patološke posledice. Znano je, da stanja s spremenjenim HDL (vnetje, infekcije, oksidativni stres, dislipidemije) spodbujajo napredovanje ateroskleroze. Mogoče je torej, da spremembe v HDL zaradi SAA igrajo vlogo v napredovanju ateroskleroze, kljub verjetni pomoči pri reverznem transportu holesterola (17). Vendar pa kljub vsem navedenim dejstvom še vedno ni dokončno pojasnjeno, kakšna je vloga SAA v razvoju ateroskleroze.

Veliko raziskav povezuje bolezni, pri katerih je prisotno kronično vnetje, kot so metabolični sindrom, diabetes, RA in SLE s povečano koncentracijo SAA. Prav tako so te bolezni povezane s povečanim tveganjem za nastanek srčno-žilnih bolezni, ki jih ne moremo pojasniti s tradicionalnimi faktorji tveganja. Zvečane vrednosti SAA so dokazali pri nestabilni angini pektoris (18). Pri akutnem koronarnem sindromu SAA napoveduje umrljivost (19). SAA je tudi neodvisni napovedni dejavnik smrtnosti po MI (20). Biološki učinki SAA še vedno niso popolnoma raziskani, vendar bi naj imel nekatere potencialno aterogene lastnosti (14). Spodbuja kemotakso monocitov, fagocitov, T celic in mastocitov na mesto vnetja, ter stimulira produkcijo vnetnih citokinov, kot sta IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$ , kemokinov (IL-8), vnetnega regulatorja nuklearnega faktorja- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ter produkcijo ciklooksigenaz v endotelijskih celicah, sinoviocitih in fibroblastih. SAA inducira zunajcelične MMP in kolagenaze, ki razgrajujejo zunajcelični matriks, kar lahko prispeva k nestabilnosti aterosklerotične lehe in pretrganju ateroma. Spodbujal naj bi tudi trombozo z vplivom na tkivni faktor (18).

## **1.4 NEKATERE KLJUČNE MOLEKULE, KI SODELUJEJO PRI PROCESU ATEROSKLEROZE**

### **1.4.1 Molekule z vplivom na iniciacijo ateroskleroze**

#### **1.4.1.1 Interlevkin 6 (IL-6)**

Je 19–26 kDa velik multifunkcionalen citokin, ki ima pomembno vlogo pri regulaciji imunskega odziva, pri vnetju in hematopoezi. Motnje v njegovi regulaciji lahko vplivajo na nastanek imunsko pogojenih vnetnih bolezni, kot je RA (21). Izločajo ga različni celični tipi, kot so celice T in B, monociti, fibroblasti in endotelijske celice, v odziv na različne vnetne stimulse. Je poglavitni stimulator nastanka večine proteinov akutne faze v jetrih. Ti so odgovorni za imunski odziv organizma preko aktivacije komplemента, spodbujanja nastanka protivnetnih citokinov in stimulacije kemotakse nevtrofilcev. IL-6 je vpleten tudi pri nastanku povišane telesne temperature, imel pa naj bi tudi eno ključnih vlog pri prehodu akutnega vnetja v kronično (22). IL-6 inducira nastanek drugih vnetnih označevalcev, predvsem C reaktivnega proteina (CRP). Ta stimulira produkcijo MMP, ki destabilizirajo aterosklerotične lehe ter monocitnega kemotaktičnega proteina 1 (MCP-1). CRP prav tako zmanjša aktivnost endotelijske sintetaze dušikovega oksida (eNOS), kar zmanjša od endotelija odvisno vazodilatacijo. IL-6 pa naj bi imel tudi nekaj protivnetnih lastnosti, kot je zaustavitev sinteze vnetnih citokinov IL-1 in TNF- $\alpha$ . Je dobro poznan dejavnik tveganja za nastanek srčno-žilnih bolezni. Povečan je pri stenozi koronarnih žil, njegove povečane koncentracije pa najdemo tudi v aterosklerotičnih lehah. Dokazano je, da je napovedni faktor za nastanek ishemičnih dogodkov (7, 23).

#### **1.4.1.2 Interlevkin 8 (IL-8)**

Je 8–10 kDa velik vodotopen peptid, ki spada v družino kemokinov CXC. Proizvajajo ga skoraj vse celice z jedrom, vendar so njegov glavni vir aktivirani monociti in makrofagi, ki ga izločajo kot odziv na različne patofiziološke pogoje in druge vnetne citokine. Je močan kemoatraktant, povzroči pa tudi direktno migracijo nevtrofilcev, bazofilcev in limfocitov T na mesto vnetja ter sproščanje histamina in levkotrienov iz bazofilcev. Njegova posebnost je, da se na mestu akutnega vnetja pojavi hitro ob začetku imunskega odziva in tam ostane zelo dolgo, celo nekaj tednov (24). Pri RA njegova povečana koncentracija povzroči kopičenje nevtrofilcev v sinovijski tekočini in s tem prispeva k njenemu vnetju (25). Ker ima pomembno vlogo v imunskem odzivu in pri avtoimunosti, je v organizmu močno

reguliran. V normalnem tkivu je njegova količina zelo majhna ali celo nezaznavna. Njegove povečane vrednosti v organizmu so prav tako povezane s povečanim tveganjem za koronarno arterijsko bolezen. Produkcijo IL-8 povečajo IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , lipopolisaharidi (LPS), reaktivne kisikove spojine in celični stres. Glavna inhibitorja njegove produkcije sta IL-4 in IL-10 (26).

#### **1.4.1.3 Granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (GM-CSF)**

GM-CSF je multifunkcionalen citokin, ki ga proizvajajo makrofagi, fibroblasti, endotelijske celice, alveolarne epiteljske celice in aktivirane celice T, kot odziv na vnetne citokine. Je mitogen in kemoatraktant. Spada med hematopoetske rastne dejavnike in je odgovoren za preživetje, proliferacijo, diferenciacijo in delovanje mieloidnih celic (27). V zadnjih letih je bilo ugotovljeno, da je tudi eden ključnih vnetnih citokinov med vnetno reakcijo in med odzivom na okužbo. Vpliva na nastanek granulocitov in monocitov iz matičnih celic, ki nato dozoriijo v makrofage in dendritične celice, pri makrofagih tudi zavira apoptozo. Prav tako lahko GM-CSF aktivira fagocite in vpliva na njihovo delovanje (28). Ker je GM-CSF del imunskega odziva, se v velikih količinah nahaja v vnetih sklepkih pri RA. Sodeluje pri sproščanju signalnih molekul (iz granulocitov in makrofagov), ki preko kaskade reakcij aktivirajo limfocite B in T, kar še poveča produkcijo vnetnih molekul. Zaradi njegove vloge pri vnetju in pri avtoimunskih boleznih je nevtralizacija GM-CSF postala nova možna tarča za zdravljenje RA in nekaterih drugih vnetnih boleznih (25).

#### **1.4.1.4 Adhezijske molekule**

Specifične interakcije med molekulami na površini levkocitov in molekulami na površini potencialnih tarč, so pomemben mehanizem medcelične komunikacije. Te molekule imenujemo adhezijske molekule in imajo pomembno vlogo pri vnetju in pri nastanku nekaterih neoplazem (29). So transmembranski glikoproteini, razdelimo pa jih v tri družine: selektine, imunoglobulinsko superdružino in integrine. Proces adhezije levkocitov na endotelij je sestavljen iz več korakov, njegov končni cilj pa je čvrsta adhezija tarčne molekule na endotelijske celice (30).

##### **a) Intercelularna adhezijska molekula 1 (ICAM-1)**

ICAM-1 poznana tudi kot skupek diferenciacije 54 (CD54) je transmembranski celični glikoprotein, ki je v fizioloških pogojih v majhnih količinah konstitutivno izražen na endotelijskih in epiteljskih celicah, levkocitih in fibroblastih. Zgrajen je iz petih

imunoglobulinskih domen (D1-D5), kratkega transmembranskega dela in C-terminalnega citoplazemskega dela. Vloga ICAM-1 je zagotavljanje adhezije med endotelijskimi celicami in levkociti po poškodbi, zato se njeno izražanje močno poveča ob stimulaciji s citokini, kot so IFN- $\gamma$ , IL-1 in TNF- $\alpha$ , kar poveča adhezijo levkocitov na endotelijske celice na mestu vnetja (29). Izražanje ICAM-1 je dokazano povečano v aterosklerotičnih lezah, z njeno inhibicijo pa lahko aterogenezo upočasnimo (7).

#### **b) Žilno celična adhezivna molekula 1 (VCAM-1)**

VCAM-1, poznana tudi kot skupek diferenciacije 106 (CD106), povzroča adhezijo večine vnetnih celic, kot so monociti, limfociti, eozinofilci na endotelijske celice in privablja monocite na mesta, kjer se je proces ateroskleroze že začel (7). Vsebuje šest ali sedem imunoglobulinskih predelov, izražajo pa jo aktivirane endotelijske celice. Njeno ekspresijo prav tako, kot ekspresijo ICAM-1 povečajo nekateri citokini. Povečana ekspresija VCAM-1 je značilna za številne bolezni, med drugim RA in ateroskleroza (29).

### **1.4.2 Molekule, ki sodelujejo v končni fazi ateroskleroze**

#### **1.4.2.1 Inhibitor aktivatorja plazminogena 1 (PAI-1)**

Inhibitor aktivatorja plazminogena 1, poznan tudi kot serpin E1, spada v skupino inhibitorjev serinskih proteaz in je 50 kDa velik glikoprotein. Je inhibitor tkivnega in krvnega aktivatorja plazminogena (u-PA in t-PA), ki pretvarjata neaktiven plazminogen v aktiven plazmin, ta pa nato razgrajuje vezi fibrina v procesu fibrinolize. Zmanjšuje tudi od plazmina odvisno aktivacijo MMP (31). Povečane koncentracije PAI-1 v plazmi prispevajo k nastanku trombotičnih zapletov, kot sta MI in hipertromboza, kot tudi k nastanku fibrotičnih zapletov, kot je ateroskleroza. Odgovoren naj bi bil tudi za spodbujanje napredovanja žilnih bolezni. PAI-1 proizvajajo številne celice v telesu, kot so hepatociti, žilne endotelijske celice in GMC. Navadno je v plazmi prisoten v majhnih koncentracijah, njegova koncentracija pa se poveča pri stimulaciji s fibrotičnimi dejavniki, kot je tkivni rastni dejavnik  $\beta$  (TGF $\beta$ ) in ob prisotnosti nekaterih vnetnih mediatorjev, kot so TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in LPS (32).



### **1.4.3 Nekatere druge molekule, ki sodelujejo pri vnetju**

#### **1.4.3.1 Ciklooksigenaza (COX)**

COX je bifunkcionalni encim, s ciklooksidadno in peroksidazno aktivnostjo. Nahaja se v dveh izooblikah, COX-1 in COX-2. Oba izoencima pripomoreta k avtoregulaciji in homeostazi nastanka prostanooidov in oba imata vlogo pri njihovem sproščanju ob vnetju.

COX-1 je konstitutivna izoforma encima ciklooksigenaze, prisotna v večini tkiv. Je glavni vir prostanooidov, ki uravnavajo osnovne telesne funkcije, kot so homeostaza, citoprotektivna funkcija in vzdrževanje funkcije črevesnih epitelnih celic.

COX-2 je inducibilna izoforma encima ciklooksigenaze. Pojavlja se na mestu vnetja in pri proliferativnih boleznih, njen nastanek pa stimulirajo vnetni mediatorji, hormoni in rastni dejavniki. Je torej pomemben vir nastanka prostanooidov pri vnetju kakor tudi pri raku (12).

#### **1.4.3.2 Receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )**

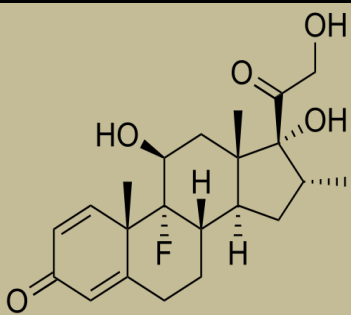
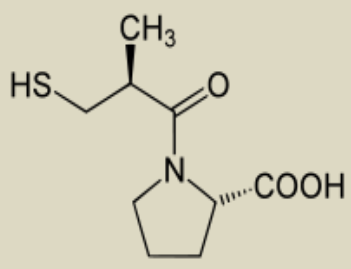
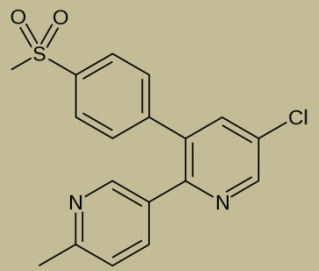
PPAR $\gamma$  je transkripcijski faktor, ki ga aktivirajo ligandi. Spada v družino jedrnih receptorjev. Poznamo tri vrste receptorjev PPAR -  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  in  $\gamma$ . Vsi igrajo pomembno vlogo pri metabolizmu, vendar vsak deluje drugače. Zgrajeni so iz domen, ki so podobne kot pri drugih članih družine nuklearnih receptorjev in vključujejo: N-terminalno AF1 trans aktivacijsko domeno, domeno za vezavo DNA in domeno za vezavo liganda, ki se nahaja na C terminalnem delu.

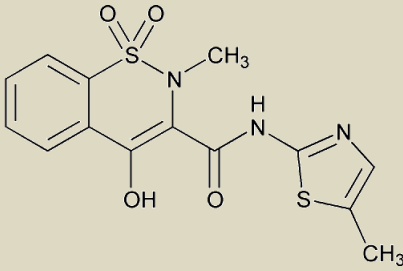
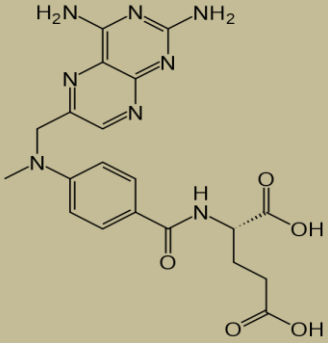
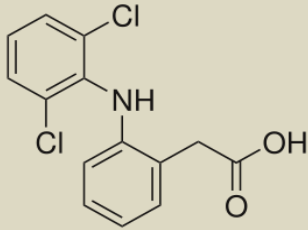
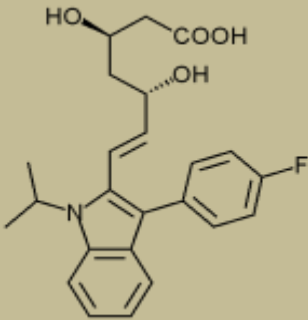
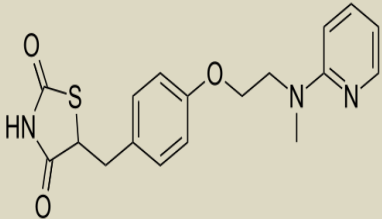
PPAR $\gamma$  se nahaja v štirih izoformah, ki se izražajo v številnih tkivih in v endotelijskih celicah ( $\gamma$ 4). Strukturno so podobni steroidnim in tiroidnim hormonskim receptorjem, stimulirajo pa jih majhni lipofilni ligandi, kot so na primer nasičene maščobne kisline, 15-deoksi- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) in oksidiran LDL (2). Njihovi potencialni sintetični agonisti so tiazolidindioni (TZD) in substituirane karboksilne kisline. Imajo pomembno vlogo pri diferenciaciji adipocitov in pri rezistenci na inzulin. Ker pa se PPAR $\gamma$  izražajo tudi v žilnih endotelijskih celicah, gladkih mišičnih celicah, makrofagih in kardiomiocitih, ter ker imajo posamezniki z diabetesom tipa 2 povečano tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni, je srčno-žilna funkcija PPAR pod drobnogledom (33) (34).

## 1.5 ZDRAVILA, UPORABLJENA PRI REVMATIČNIH IN NEKATERIH KRONIČNIH BOLEZNIH

Revmatični bolniki pri zdravljenju prejemajo kombinacije različnih zdravil. Najpogosteje so to zdravila iz skupine DMARD, nesteroidni antirevmatiki (NSAR), kortikosteroidi in inhibitorji TNF $\alpha$ . Poleg tega pogosto prejemajo še druga zdravila za kronične bolezni, ki imajo potencialno protivnetno delovanje (preglednica I, II).

**Preglednica I: Učinkovina, molska masa, molekulska formula, strukturna formula in tarča delovanja proučevanih zdravil, ter zdravila, registrirana v Sloveniji, ki to učinkovino vsebujejo.**

Učinkovina, molska masa in molekulska formula	Zdravila	Strukturna formula	Tarča delovanja
<b>deksametazon</b> $C_{22}H_{29}FO_5$ Mr = 392,5 g/mol	Dexamethason Krka		glukokortikoidni in mineralokortikoidni receptorji
<b>kaptopril</b> $C_9H_{15}NO_3S$ Mr = 217,3 g/mol	Kaptopril Krka Kaptopril Alkaloid		angiotenzin konvertaza
<b>etorikoksib</b> $C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$ Mr = 358,8 g/mol	Arcoxia		COX-2

<p><b>meloksikam</b>  <math>C_{14}H_{13}N_3O_4S_2</math>  <math>Mr = 351,4 \text{ g/mol}</math></p>	<p>Movalis  Celomix  Lormed  Meloxan  Mel. Arrow  Mel. Mylan</p>		<p>(COX-1)  COX-2</p>
<p><b>metotreksat</b>  <math>C_{20}H_{22}N_8O_5</math>  <math>Mr = 454,4 \text{ g/mol}</math></p>	<p>Methotrexat  Ebewe  Metotreksat  Lederle  Metoject</p>		<p>dihidrofolat  reduktaza</p>
<p><b>natrijev  diklofenakat</b>  <math>C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2</math>  <math>Mr = 318,1 \text{ g/mol}</math></p>	<p>Naklofen duo  Diclo Duo  DicloJet  Olfen  Voltaren</p>		<p>(COX-1)  COX-2</p>
<p><b>natrijev  fluvastatinat</b>  <math>C_{24}H_{25}FNNaO_4</math>  <math>Mr = 433,4 \text{ g/mol}</math></p>	<p>Lescol  Fluvastatin  Actavis  Fluvastatin  Mylan  Galistat  Vuyator</p>		<p>HMG-CoA  reduktaza</p>
<p><b>rosiglitazon</b>  <math>C_{18}H_{19}N_3O_3S</math>  <math>Mr = 357,428</math>  <math>\text{g/mol}</math></p>	<p>/</p>		<p>PPAR<math>\gamma</math></p>

### **1.5.1 Deksametazon**

Uporablja se za zdravljenje revmatskih bolezni pri bolnikih, kjer z nesteroidnimi antirevmatiki (NSAR) nismo dosegli zadovoljivega učinka, ter za zdravljenje številnih drugih bolezni, povezanih s prekomernim imunskim odzivom organizma (35).

Deksametazon je sintetični kortikosteroid z glukokortikoidnim delovanjem, ki deluje na celični ravni preko spreminjanja izraznosti številnih genov. Preko glukokortikoidnih receptorjev uravnavajo kortikosteroidi protivnetno in imunosupresivno delovanje ter glukozno homeostazo. Ker se glukokortikoidni receptorji nahajajo v vseh tkivih, hormoni delujejo na večino telesnih celic (35).

Transkripcijska faktorja NF- $\kappa$ B in aktivatorski protein 1 (AP-1) sta najpomembnejša pri indukciji genov molekul, udeleženih pri vnetju ter poškodbi sklepov. Udeležena sta tudi pri nastanku številnih bolezni, povezanih s kroničnim vnetjem (ateroskleroza) in pri nastanku avtoimunskih obolenj, kot je RA. Glukokortikoidi z njima fizično reagirajo in na ta način blažijo vnetni odziv. Zavirajo nastajanje nekaterih vnetnih citokinov, kot so IL-6, IL-12 in TNF- $\alpha$  in stimulirajo nastanek protivnetnih citokinov, kot so IL-4, IL-10 in TGF- $\beta$  (36). Zavirajo pa tudi delovanje fosfolipaze A<sub>2</sub> preko sinteze lipokortina-1 in s tem zmanjšajo nastanek levkotrienov ter prostaglandinov. Zavirali naj bi tudi samo ciklooksigenazo, kar še potencira njihovo protivnetno delovanje (37). Vendar pa je bilo ugotovljeno tudi, da velike koncentracije deksametazona povečajo ekspresijo adhezijskih molekul (ICAM, VCAM) in PAI-1 ter s tem vplivajo na koagulacijo. Dolgotrajna uporaba večjih koncentracij deksametazona zato poveča možnost za nastanek trombotičnih zapletov in nastanka srčno-žilnih bolezni (38).

### **1.5.2 Fluvastatin**

Uporablja se za zdravljenje primarne hiperholesterolemije ali mešane dislipidemije, ter sekundarno za preprečevanje nastanka ishemičnih srčno-žilnih bolezni.

Fluvastatin je kompetitiven zaviralec HMG-CoA reduktaze, ki je odgovorna za pretvorbo HMG-CoA v mevalonat, predstopnjo sterolov, med katere sodi tudi holesterol. Zaviranje biosinteze holesterola zmanjšuje količino holesterola v jetrnih celicah, kar spodbuja sintezo receptorjev LDL in povečuje privzem LDL-a. Končni rezultat teh mehanizmov je znižanje plazemske koncentracije holesterola (35).

Klinične raziskave so pokazale, da statini znižujejo smrtnost zaradi srčno-žilnih dogodkov in pogostost pojavljanja srčno-žilnih dogodkov, ki niso življenjsko ogrožajoči. Njihov pleiotropni efekt naj bi bil razlog za kardioprotektivno delovanje, ki ga imajo in za zmanjšanje vnetnega odziva organizma. Preko njega naj bi statini izboljšali endotelijsko funkcijo žil, zmanjšali vnetni odziv v njih in celo stabilizirali aterosklerotične lehe. Ti njihovi učinki naj bi bili pogojeni s sposobnostjo zaviranja sinteze izoprenoidov, ki je pomembna za celične signalne molekule, kot sta proteina G - Rho in Rac. Ta vplivata na številne celične procese, kot so apoptoza, celična diferenciacija in proliferacija. Statini prav tako inhibirajo proliferacijo GMC. Z inhibicijo sinteze izoprenoidov povečajo tudi ekspresijo eNOS, katere zmanjšane koncentracije so eden prvih znakov ateroskleroze. Statini lahko protivnetne učinke izkazujejo tudi z zmanjšanjem ekspresije endotelijskih adhezivnih molekul, kot so ICAM-1, VCAM-1 in E-selektin v aterosklerotičnih lehah. S povečanjem produkcije NO zmanjšajo tudi adhezijo levkocitov in njihovo migracijo v žilno steno. Zmanjšujejo pa tudi agregacijo trombocitov, saj povečajo koncentracijo trombomodulina in t-PA v žilah (39-41). Statini značilno znižajo koncentracijo CRP, neodvisno od znižanja koncentracije LDL holesterola ter inducirajo tudi transkripcijsko aktivnost PPAR $\gamma$  v makrofagih. Inhibirajo TNF- $\alpha$  in MCP-1, ter zavrejo transkripcijsko aktivnost NF- $\kappa$ B in AP-1 preko PPAR $\alpha$  in PPAR $\gamma$ , njihova sočasna aplikacija s PPAR $\gamma$  agonisti pa naj bi vplivala na regresijo aterosklerotičnih leh. Preko PPAR $\alpha$  in PPAR $\gamma$  statini povečajo tudi izražanje ABCA1 in CD36 mRNA, kar vpliva na reverzni transport holesterola (42). Fluvastatin v terapevtski koncentraciji poveča izražanje COX-1 mRNA in zniža izražanje COX-2 mRNA, pri večjih koncentracijah pa zmanjša izražanje obeh izoencimov (43).

### **1.5.3 Inhibitorji dejavnika tumorske nekroze $\alpha$ (TNF- $\alpha$ inhibitorji)**

Inhibitorji dejavnika tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) so protivnetna zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje različnih vrst revmatoidnih obolenj. So monoklonska protitelesa, razlikujejo se po načinu izdelave in po zgradbi. V telesu se vežejo na TNF- $\alpha$ , ki sodeluje pri vnetjih in ga v velikih količinah najdemo pri bolnikih z RA, ter s tem ublažijo vnetje in druge simptome bolezni (preglednica II) (35).

**Preglednica II: Pregled TNF  $\alpha$  inhibitorjev glede na učinkovino, zgradbo in molekulska ali molska masa, ter zdravila, registrirana v Sloveniji, ki to učinkovino vsebujejo.**

Učinkovina	Zdravilo	Zgradba	Molekulska ali molska masa
<b>adalimumab</b>	Humira	Rekombinantno človeško antiTNF IgG1 monoklonsko protitelo	Mr = 144190,3 g/mol
<b>certolizumab pegol</b>	Cimzia	Rekombinanten humaniziran Fab' fragment, konjugiran s polietilenglikolom	Mr = 47,75 kDa
<b>etanercept</b>	Enbrel	Dimer receptorja TNFR2/p75 in Fc fragmenta IgG1	Mr = 51234,9 g/mol
<b>golimumab</b>	Simponi	Človeško IgG1 $\kappa$ monoklonsko protitelo, proizvedeno z rekombinantno DNA metodo	Mr = 147 kDa

TNF- $\alpha$  je 17 kDa velik pluripotenten citokin, ki je v telesu prisoten v topni obliki, ali pa je vezan na celično membrano (44). Izločajo ga številne celice, na primer makrofagi, celice T in celice ubijalke, kot odziv na različne vnetne dražljaje. Odgovoren je za oblikovanje in posredovanje številnih bioloških učinkov. Pri majhnih koncentracijah spodbudi žilne endotelijske celice k izražanju površinskih adhezivnih molekul, aktivira vnetne levkocite in spodbudi mononuklearne fagocite k izločanju vnetnih citokinov in kemokinov. V velikih koncentracijah deluje kot endokrini hormon. TNF- $\alpha$  je udeležen v patogenezi RA. Njegovo transgensko izražanje povzroči razvoj artritisa, protitelesa proti TNF- $\alpha$  pa njegov nastanek preprečijo, kar kaže na to, da je eden ključnih citokinov pri nastanku RA (11).

TNF- $\alpha$  inhibitorji imajo tudi velik vpliv na ožilje. Vplivajo na lipidni profil, zvečajo koncentracijo HDL holesterola, povečajo razmerje LDL/HDL, značilno zmanjšajo produkcijo CRP in IL-6, kar vpliva na zmanjšano tveganje za srčno-žilne zaplete pri

bolnikih s kroničnimi vnetnimi boleznimi. Prav tako se ob njihovi uporabi znižajo plazemske koncentracije nekaterih adhezijskih molekul (E-selektin, ICAM), s čimer se izboljša funkcija endotelija (45). Izboljšajo tudi celokupno debelino intime in medije pri aterosklerozi karotidne arterije (ccIMT) in vplivajo na zatrditev arterije, ki ima veliko napovedno vrednost za nastanek srčno-žilnih dogodkov. Raziskave kažejo, da značilno zmanjšajo pojav MI in podaljšajo čas do nastanka prvega srčno-žilnega zapleta. V večini primerov je njihova kratkotrajna uporaba izboljšala endotelijsko funkcijo, vendar pa so ob dolgotrajni uporabi učinki izzveneli (46).

#### **1.5.4 Kaptopril**

Namenjen je zdravljenju vseh oblik arterijske hipertenzije, srčnega popuščanja, disfunkcije levega prekata in preprečevanju ledvične odpovedi pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo. Njegovo pozitivno delovanje na uravnavanje pritiska, in s tem posredno tudi na aterogenezo, je rezultat delovanja na reninsko-angiotenzinsko-aldosteronski sistem (35). Kaptopril je specifični kompetitivni zaviralec angiotenzin konvertaze (ACE), encima, ki se nahaja predvsem v endotelijskih celicah in pretvarja dekapeptid angiotenzin I v oktapeptid angiotenzin II, ki je močan vazokonstriktor (47). Angiotenzin II stimulira tudi izločanje aldosterona ter s tem prispeva k retenciji natrija in tekočine. Posledica inhibicije ACE je zmanjšana koncentracija angiotenzina II v plazmi ter povečana plazemska aktivnost renina, s čimer pride do izločanja natrija in vode iz telesa. ACE je identičen bradikinazi, zato kaptopril zmanjša tudi razgradnjo vazopresivnega peptida bradikinina, ki ima antihipertenzivne, antitrombogene, antiproliferativne in antifibriogene učinke. Bradikinin sodeluje tudi pri vnetju, saj aktivira endotelijske celice, kar poveča vazodilatacijo in žilno prepustnost, pri čemer pride do nastanka klasičnih simptomov vnetja (48). Molekulska formula kaptoprila ima podobnosti s formulo D-penicilamina - obe vsebujeta tiolno skupino, zato ima kaptopril tudi rahlo imunosupresivno delovanje, kar je ugodno pri zdravljenju RA (49). V nekaterih študijah je kaptopril znižal infiltracijo z vnetnimi celicami in vplival na koncentracije TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, NO in MCP-1 v telesnih tekočinah, kar nakazuje na to, da naj bi kaptopril zaviral vnetje z vplivom na aktivacijo NF- $\kappa$ B (50). ACE inhibitorji povečajo tudi izražanje COX-2 v endotelijskih celicah, na COX-1 pa nimajo znanega učinka (51).

### **1.5.5 Metotreksat**

Je pogosto uporabljeno zdravilo za zdravljenje artritisa pri odraslih bolnikih, pri katerih so indicirana zdravila iz skupine DMARD in kadar zdravljenje z NSAR ne zadošča.

Je antagonist folne kisline, ki spada v razred citotoksičnih sredstev - antimetabolitov. Deluje s pomočjo kompetitivne inhibicije encima dihidrofolat reduktaze. Ni še povsem znano, ali je učinkovitost metotreksata pri obvladovanju vnetnih bolezni posledica protivnetnega ali imunosupresivnega učinka (35). Njegov glavni protivnetni učinek je povečanje zunajcelične koncentracije adenzina, ki je endogen protivnetni mediator, na mestih vnetja (52). Metotreksat izkazuje ateroprotektivne lastnosti s preprečevanjem kopičenja penastih celic in s povečanjem števila ABCA1 transporterjev, ki pomagajo pri izločanju odvečnega holesterola, kar izboljša lipidni profil ter zmanjša možnost za nastanek srčno-žilnih bolezni pri RA (53). Novejše raziskave kažejo, da zavira tudi nastanek adhezijskih molekul ICAM-1 in VCAM-1 v žilnih endoteljskih celicah.(54)

### **1.5.6 Nesteroidni antirevmatiki (NSAR)**

Ciklooksigenaza je encim, odgovoren za sintezo prostaglandinov. Poznamo dve izoobliki encima, COX-1 in COX-2. Zaradi neželenih učinkov zaviranja COX-1 so novejša zdravila usmerjena v selektivno zaviranje COX-2, kar se kaže kot zmanjšanje gastrointestinalne toksičnosti in agregacije trombocitov. Vendar pa je pri tem prišlo do povečanega tveganja za nastanek srčno-žilnih dogodkov pri bolnikih (55). COX-2 je odgovorna tudi za sintezo 15d-PGJ<sub>2</sub>, ki je endogeni ligand PPAR $\gamma$  in zavira aktivnost vnetnih transkripcijskih faktorjev NF- $\kappa$ B, STAT3 in AP-1 (56). Povečane količine COX-2 najdemo tudi v aterosklerotičnih lezah, po navadi v kombinaciji z MMP, ki vplivajo na mehčanje lehe in tudi sama aktivnost COX-2 naj bi pospeševala nastanek ateroskleroze (57). V mišjih modelih so selektivni COX-2 inhibitorji zmanjšali ali celo odpravili zgodnje aterosklerotične lehe (58).

#### **a) Etorikoksib**

Spada v drugo generacijo selektivnih inhibitorjev COX-2, imenovanih koksibi (35). Pomaga ublažiti bolečino in vnetje sklepov in mišic pri bolnikih z revmatološkimi obolenji. V območju kliničnih odmerkov je peroralni selektivni zaviralec COX-2 – ima 106  $\times$  večjo selektivnost za COX-2. Vendar pa se je izkazalo, da etorikoksib do določene mere zavira antiagregatorni učinek aspirina na trombocite (55). Zavira tudi aktivacijo



transkripcijskih faktorjev NF- $\kappa$ B in CREB, kar zniža ekspresijo iNOS in COX-2 vendar nima vpliva na AP-1 (59).

#### **b) Natrijev diklofenakat**

Je nesteroidni antirevmatik, derivat fenilacetne kisline, namenjen za zdravljenje vseh oblik revmatskih obolenj in lažšanju različnih bolečin (35). Ima večjo afiniteto do COX-2 in tako kot večina COX-2 selektivnih inhibitorjev povečuje možnost za nastanek MI (60). Zavre z rosiglitazonom posredovano aktivacijo PPAR $\gamma$  in zniža izražanje adhezijskih molekul ICAM-1, VCAM-1 in E-selektina v nekaterih endotelijskih celicah (61, 62).

#### **c) Meloksikam**

Je NSAR iz skupine enolne kisline, indiciran za simptomatsko zdravljenje osteoartroze, RA in ankilozirajočega spondilitisa. *In vivo* meloksikam močneje zavira biosintezo prostaglandinov na mestu vnetja, kot v želodčni sluznici in ledvicah, kar pomeni, da ima večjo afiniteto do COX-2 (35). V primerjavi z diklofenakom imajo bolniki, ki se zdravijo z meloksikamom, manj trombotičnih zapletov (63).

### **1.5.7 Rosiglitazon**

Rosiglitazon se je uporabljal za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 pri odraslih. Je selektivni agonist za jedrni receptor PPAR $\gamma$  in sodi v tiazolidindionsko (TZD) skupino antidiabetikov. Glikemijo zmanjšuje tako, da zmanjšuje rezistenco adipoznega tkiva, skeletnih mišic in jeter na inzulin (35).

TZD so najbolj preučevani ligandi PPAR $\gamma$  receptorja, katerega naravni ligand je tudi 15d-PGJ<sub>2</sub>. Delujejo tako, da se vežejo na jedrne PPAR receptorje v tarčnih genih in vplivajo na njihovo transkripcijo. Novejše raziskave kažejo, da ima rosiglitazon tudi protivnetne učinke. Znižuje ekspresijo vnetnih citokinov in usmerja diferenciacijo imunskih celic k protivnetnemu fenotipu (33). NF- $\kappa$ B je signalna molekula, ki spodbuja vnetni odziv, njegovi inhibitorji pa ga zavirajo. Opazili so, da se ob jemanju rosiglitazona zmanjša količina NF- $\kappa$ B in poveča količina NF- $\kappa$ B inhibitorjev (64). V različnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da PPAR $\gamma$  agonisti znižajo koncentracije CRP, SAA, E-selektina, IL-6, MCP-1, TNF $\alpha$ , in IL-1 $\beta$  in s tem tudi aktivacijo makrofagov (65, 66). Z znižanjem izražanja adhezijskih molekul VCAM-1 in ICAM-1 zmanjšajo vnetje v endotelijskih celicah. Ekspresija PPAR $\gamma$  v makrofagih vpliva na proces ateroskleroze. *In vivo* študije so

pokazale, da PPAR $\gamma$  agonisti povečajo izločanje holesterola iz makrofagov in zavrejo nastanek penastih celic. Povečajo tudi ekspresijo CD36, ki je odgovoren za prevzem oksidirane LDL. TDZ zavirajo proliferacijo, fibrozo in migracijo žilnih GMC ter pospešujejo njihovo apoptozo, kar je prav tako pomemben proces pri nastanku ateroskleroze. Povečajo tudi stabilnost aterosklerotičnih leh, s povečanjem količine kolagena in zmanjšanjem koncentracije MMP2 in MMP9 (34). Kljub vsemu so rezultati kliničnih študij vpliva PPAR agonistov na MI in število smrti, povezanih s srčno-žilnimi boleznimi nasprotujoči (2).

## 2. NAMEN, HIPOTEZA IN CILJI

Bolniki s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (kot npr. revmatoidni artritis (RA)) imajo povečano tveganje za aterosklerozo in posledično tudi za razvoj srčno-žilnih bolezni. Veliko raziskav povezuje bolezni, pri katerih je prisotno kronično vnetje, kot je RA, s povečano koncentracijo SAA. Ker so bolniki z RA tudi na doživljenjski terapiji z antirevmatiki, je bil namen diplomske naloge testirati najpogosteje uporabljena zdravila, ki jih uporabljajo in preveriti njihov vpliv na vnetni odziv SAA-stimuliranih humanih endotelijskih celic koronarne arterije.

### **Naša hipoteza je sledeča:**

Zdravila, kot so DMARD, kortikosteroidi, TNF $\alpha$  inhibitorji, NSAR, zdravila za znižanje holesterola, krvnega tlaka in antidiabetiki, modulirajo vnetni odziv SAA-stimuliranih HCAEC v kulturi.

### **Specifični CILJI:**

- I. Določitev vplivov:
  1. DMARD in kortikosteroidov (metotreksat in deksametazon)
  2. TNF $\alpha$  inhibitorjev (certolizumab pegol, adalimumab, golimumab in etanercept)
  3. zdravil za zniževanje holesterola ter krvnega tlaka (fluvastatin in kaptopril)
  4. NSAR (diklofenak, meloksikam in etorikoksib)
  5. antidiabetikov (rosiglitazon)

na proteinske nivoje izločenih molekul IL-6, IL-8, GM-CSF, sICAM-1, sVCAM-1 ter PAI-1 iz SAA-stimuliranih HCAEC, izmerjenih z metodo ELISA.

- II. Določitev vplivov opisanih zdravil na izražanje mRNA molekul IL-6, VCAM-1, SAA, COX-2 ter PPAR $\gamma$  iz SAA-stimuliranih HCAEC izmerjenih s qPCR.
- III. Primerjava odzivov s SAA stimuliranih HCAEC na različne skupine zdravil.

Proučiti smo nameravali tudi mehanizme za aktivacijo endotelija, ki bi nam lahko dali vpogled, v do sedaj še neopisane učinke zdravil in SAA na zgodnji stadij razvoja ateroskleroze. Rezultati bi lahko bili pomembni predvsem za bolnike s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi, ki imajo povečano tveganje za razvoj ateroskleroze.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL

- rekombinantni liofiliziran človeški apo-serumski amiloid A, 1g/L, Peprotech, New Jersey, ZDA
- človeške endotelijske celice koronarne arterije (human coronary artery endothelial cells (HCAEC)), Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA
- goveji serumski albumin brez esencialnih maščobnih kislin, BSA Cohn Fraction V, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ZDA
- serum govejega ploda (Fetal Bovine Sera, FBS), Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA
- gojišče za HCAEC, Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA, (Preglednica III)

**Preglednica III : Sestava gojišča za človeške endotelijske celice koronarnih arterij (HCAEC).**

GOJIŠČE		SESTAVINA GOJIŠČA	KOLIČINA
popolno gojišče za HCAEC s 5 % FBS	popolno gojišče za HCAEC z 0 % FBS	osnovno gojišče EBM-2 (Endothelial Cell Basal medium- 2)	500 mL
		rekombinantni humani epidermalni rastni dejavnik (hEGF)	0,5 mL
		Hidrokortizon	0,2 mL
		gentamicinijev sulfat in amfotericin B (GA-1000)	0,5 mL
		rekombinantni humani fibroblastni rastni dejavnik (hFGF-B)	2 mL
		rekombinantni humani žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF)	0,5 mL
		dolgi R3 rekombinantni inzulinu podobni rastni dejavnik 1 (R3-IGF-1)	0,5 mL
	askorbinska kislina	0,5 mL	
	+	serum govejega ploda (Fetal Bovine Sera, FBS)	25 mL

### 3.1.2 ANALIZNI KOMPLETI

- analizni komplet za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human IL-6), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
  - rekombinantni človeški IL-6 (Hu IL-6 Standard); 3,8 pg/1,51 mL
  - pufer za redčenje standarda ( Standard Diluent Buffer); 25 mL
  - mikrotitrsko ploščo, prekrito z rekombinantnimi monoklonskimi protitelesi proti človeškemu IL-6 (Hu-IL-6 Antibody Coated-Wells (96WP))
  - rekombinantno monoklonsko protitelo proti človeškemu IL-6, konjugirano z biotinom (Hu-IL-6 Biotin Conjugate); 6 mL
  - kompleks streptavidin – hrenova peroksidaza (Streptavidin-Peroxidase (HRP)), 100x koncentrirana raztopina; 0,125 mL
  - pufer za redčenje kompleksa streptavidin - peroksidaza (Streptavidin-Peroxidase (HRP) Diluent); 25 mL
  - spiralni pufer 25 × koncentrirana raztopina (Wash Buffer Concentrate); 100 mL
  - kromogen tetrametilbenzidin (Stabilized Chromogen tetramethylbenzidine); 25 mL
  - raztopina za zaustavitev reakcije (Stop Solution), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 25 mL
  
- analizni komplet za določanje človeškega IL-8 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human IL-8), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
  - rekombinantni človeški IL-8 (Hu IL-8 Standard); 18,3 ng/1,83 mL
  - ostale sestavine kompleta so enake kot pri analiznem kompletu za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo, prilagojene za IL-8
  
- analizni komplet za določanje človeškega sVCAM-1 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human sVCAM-1), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
  - rekombinantni človeški sVCAM-1 (Hu sVCAM-1 Standard); 870 ng/1,60 mL
  - ostale sestavine kompleta so enake kot pri analiznem kompletu za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo, prilagojene za sVCAM-1
  
- analizni komplet za določanje človeškega GM-CSF z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human GM-CSF), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:

- rekombinantni človeški GM-CSF (Hu GM-CSF Standard); 600 pg/mL
- ostale sestavine kompleta so enake kot pri analiznem kompletu za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo, prilagojene za GM-CSF
- analizni komplet za določanje človeškega PAI-1 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human PAI-1), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
  - rekombinantni človeški PAI-1 (Hu PAI-1 Standard); 7200 pg/1,830 mL
  - ostale sestavine kompleta so enake kot pri analiznem kompletu za določanje človeškega IL-6 z encimskoimunsko metodo, prilagojene za PAI-1
- analizni komplet za določanje človeškega sICAM-1 z encimskoimunsko metodo (Immunoassay Kit Human sICAM-1), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA, ki vsebuje:
  - standard sICAM-1 (sICAM-1 Standard); 10 ng/mL
  - analizni pufer (Assay Buffer 20×), PBS z 1 % Tween 20 in 10% BSA, 5 mL; 0,20 mL
  - monoklonska anti-sICAM-1 protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP-Conjugated anti-sICAM-1 monoclonal (murine) antibody), 60 × koncentrirana raztopina; 0,125 mL
  - mikrotitrsko ploščo, prekrito z monoklonskimi protitelesi proti človeškemu sICAM-1 (Hu-sICAM-1 Antibody Coated-Wells (96WP))
  - spiralni pufer (Wash Buffer), PBS z 1 % Tween 20; 50 mL
  - raztopino za redčenje vzorcev (Sample Diluent); 50 mL
  - substrat (Substrat Solution); 15 mL
  - raztopino za zaustavitev reakcije (Stop Solution), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 15 mL
  - Modro in zeleno barvilo; 0,4 mL
- komplet za izolacijo RNA (RNeasy® Plus Micro Kit), Qiagen, Hilden, Nemčija
  - lizirajoči pufer z gvanidinijevo soljo (RLT plus pufer)
  - pufer za spiranje I (RW1 Buffer)
  - pufer za spiranje II (RPE Buffer)
  - voda brez RNaz
  - kolone za odstranitev gDNA (gDNA eliminator Mini Spin Columns)
  - kolone za RNA (RNeasy MinElute® Spin Columns)

- zbiralne epruvetke (Collection Tubes): 1,5 mL, 2 mL
- komplet za reverzno transkripcijo (Reverse Transcription System), Promega, Madison, WI, ZDA
  - reverzna transkriptaza AMV (AMV Reverse Transcriptase (High Conc.))
  - rekombinantni ribonukleazni inhibitor (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor)
  - začetni oligonukleotidi (Oligo(dT)15 Primer (0.5 µg/µL))
  - mešanica deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP Mixture, 10 mM)
  - pufer za reverzno transkripcijo, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100 (Reverse Transcription 10 X Buffer)
  - magnezijev klorid (MgCl<sub>2</sub>, 25 mM)
  - voda brez nukleaz
- komplet za verižno reakcijo s polimerazo Power SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix), Applied Biosystems, Warrington, VB, ki vsebuje:
  - SYBR® Green barvilo številka I (SYBR® Green I Dye)
  - DNA polimerazo AmpliTaq Gold® (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase)
  - deoksiribonukleotidtrifosfat z deoksiuridintrifosfatom (dNTPs with dUTP)
  - pasivno referenco (Passive Reference)
  - Pufer za optimizacijo (optimized buffer components)
- panel A za določanje človeških citokinov (Human Cytokine Array Panel A), R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA, ki vsebuje:
  - nitrocelulozno membrano z vezanimi protitelesi za detekcijo citokinov (Human Cytokine Array Panel A)
  - pufer za analizo 4 (Array Buffer 4)
  - pufer za analizo 5 (Array Buffer 5)
  - pufer za spiranje, 25 x koncentrirana raztopina (Wash Buffer Concentrate (25 ×))
  - streptavidin-HRP
  - mešanica protiteles za detekcijo citokinov (Detection Antibody Cocktail, Human Cytokine Array Panel A )
  - štiriprekatna posoda (4-Well Rectangular Multi-dish)

- komplet za izolacijo nuklearnih ekstraktov (Nuclear Extraction Kit), Cayman Chemical Company, Ann Arbour, MI, ZDA
  - hipotoničen pufer, 10 × koncentrirana raztopina (Nuclear Extraction Hypotonic Buffer (10 X))
  - ditiotreitol (1M) (Nuclear Extraction Dithiothreitol (1M))
  - s fosfatnim pufrom pufrana slanica (PBS), 10 × koncentrirana raztopina (Nuclear Extraction PBS (10 ×))
  - fosfatazni inhibitorji, 50 × koncentrirana raztopina (Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitors (50X))
  - proteazni inhibitorji, 100 × koncentrirana raztopina (Nuclear Extraction Protease Inhibitor Cocktail (100 X))
  - ekstrakcijski pufer, 2 × koncentrirana raztopina (Nuclear Extraction Buffer (2 ×))
  - Nonidet P-40 (NP-40) Assay Reagent, 10 % raztopina NP-40 detergenta
  
- Komplet za transkripcijsko aktivnost PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$  Transcription Factor Assay Kit), Cayman Chemical Company, Ann Arbour, MI, ZDA
  - Reagent A (Transcription Factor Reagent A)
  - PPAR $\gamma$  pozitivna kontrola (Transcription Factor PPAR $\gamma$  Positive Control)
  - vezavni pufer, 4 × koncentrirana raztopina (Transcription Factor Binding Assay Buffer (4 X))
  - pufer za vezavo protiteles, 10 × koncentrirana raztopina (Transcription Factor Antibody Binding Buffer (10 X))
  - PPAR $\gamma$  primarna protitelesa (Transcription Factor PPAR $\gamma$  Primary Antibody)
  - pufer za spiranje , 400 × koncentrirana raztopina (Wash Buffer Concentrate (400 X))
  - polisorbat 20 (Polysorbate 20)
  - PPAR specifična kompetitorska dsDNA (Transcription Factor PPAR Competitor dsDNA)
  - kozja in anti-zajčja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo (Transcription Factor Goat Anti-Rabbit HRP Conjugate)
  - mikrotitrna plošča (Transcription Factor PPAR 96-Well Strip Plate)
  - razvijalna raztopina (Transcription Factor Developing Solution)
  - raztopina za zaustavitev reakcije (Transcription Factor Stop Solution)



- o liofilizirani začetni oligonukleotidi (Small Sequence, Detection Primers), Applied Biosystems, Warrington, VB

Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov so navedena v preglednici IV.

**Preglednica IV: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v verižni reakciji s polimerazo v realnem času (qPCR).**

Gen	Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov	T prileganja (° C)
β aktin	F: 5'-ATCTGGCACCACACCTCCTACAATGAGCTGCG-3' R: 5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	59,0
IL-6	F:5'-GAGGCTCATTCTGCCCTCGAGCC-3' R:5'-CTGTCTGTGTGGGGCGGCTACA-3'	61,0
IL-8	F:5'-ACAAGAGCCAGGAAGAAACCACCGG-3' R:5'-GTGTTGGCGCAGTGTGGTCCAC-3'	60,9
PPAR-γ	F: 5'-GGGATGTCTCATAATGCCATCA-3' R: 5'-CGCCAACAGCTTCTCCTTCT-3'	60,2
COX-1	F:5'-GACCCAGAGCTGCTGTTTCGGTGT-3' R:5'-TCCGGCCAGCAATCTGGCGAG-3'	61,2
COX-2	F:5'-AAGCGAGGGCCAGCTTTCACCA-3' R:5'-CCAAAGACCTCCTGCCCCACAGC-3'	61,2
SAA	F: 5'-CGAAGCTTCTTTTCGTTTCCTT-3' R: 5'-CAGGCCAGCAGGTCGGAAGTG-3'	50,0
vCAM-1	F:5'-GGATTCTGTGCCACAGTA-3' R:5'-CCTGGCTCAAGCATGTCATA-3'	60,0
CLA-1	F:5'- GAACTTCTGGGCAAATGTGG-3' R:5'-TTCACAGAGCAGTTCATGGG-3'	58,0

### 3.1.3 REAGENTI

- o barvilo Coomassie Brilliant Blue®, Sigma®, St. Louis, ZDA
- o dimetil sulfoksid (DMSO), Antibioticos, Carlo Erba reagenti, Arese (MI), Italija
- o etanol, 96 %, Lex, Portorož, Slovenija
- o fiksir Kodak GBX, koncentrirana raztopina, Carestream Health, Rochester, NY, ZDA
- o razkužilo; Bode Chemie, Hamburg, Nemčija
- o raztopina za nevtralizacijo tripsina (Trypsin neutralising solution, TNS), Clonetics™, Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA
- o raztopina za zaščito celic ob zmrzovanju (Cryoprotective Medium), Lonza, Walkersville, Maryland, ZDA

- razvijalec Kodak GBX, koncentrirana raztopina, Carestream Health, Rochester, NY, ZDA
- tekoči dušik (N<sub>2</sub>), 200 bar, Linde Gras
- tripsin 10 x raztopina (Trypsin/Versene EDTA), Cambrex, East Rutherford, New Jersey, ZDA
- fosfatni pufer PBS in PBS-citrat (pH=7.4) (preglednica V)

**Preglednica V: Sestava pufrov PBS in PBS-citrat.**

PUFER		SESTAVINA	KOLIČINA
PBS - citrat	PBS	NaCl	0,137M
		KCl	0,0027 M
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,0065 M
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0015 M
		H <sub>2</sub> O	do 1L
	+	Na <sub>3</sub> citrat x 2H <sub>2</sub> O	0,0109 M

- Arcoxia, 90 mg filmsko obložene tablete, Merck Sharp & Dohme B.V., Haarlem, Nizozemska
- Cimzia 200 mg/mL, raztopina za injiciranje, UCB Pharma SA, Bruselj, Belgija
- Dexamethason Krka 4 mg/1 mL, raztopina za injiciranje, Krka, tovarna zdravil, d. d., Novo mesto, Slovenija
- Enbrel 50 mg/mL, raztopina za injiciranje, Pfizer Limited, Kent, Velika Britanija
- Simponi 50 µg/0,5 mL, raztopina za injiciranje, Janssen Biologics B.V., Leiden, Nizozemska
- Humira 40 mg/0,8 mL, raztopina za injiciranje, Abbott Biotechnology GmbH, Wiesbaden, Nemčija
- Kaptopril Krka, 25 mg tablete, Krka, tovarna zdravil, d. d., Novo mesto, Slovenija
- Lescol, 40 mg trde kapsule, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Nemčija
- Methotrexat 2,5 mg tablete, Cyanamid International Corporation Limited, Zurich, Švica
- Movalis, 15 mg tablete, Boehringer Ingelheim International GmbH, Ingelheim am Rhein, Nemčija
- Naklofen duo, 75 mg kapsule, Krka, tovarna zdravil, d. d., Novo mesto, Slovenija
- Rosiglitazon, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, ZDA

### 3.1.4 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL

- aparatura za PCR v realnem času, Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cambridge, Velika Britanija
- aseptična komora z laminarnim pretokom zraka, LaminAir scan 1.2, Heto Holten, Allerød, Danska
- avtoklav A-11, Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
- avtomatske pipete (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtomatski števec celic-Countess, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- celični inkubator, Heto-Holten Cellhouse 154, Astel, Francija
- centrifuga 3K30, Sigma, Saint Louis, Missouri, ZDA
- centrifuga 5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- centrifugirne epruvete (15 mL, 50 mL), TPP, Trasadingen, Švica
- čitalec mikrotitrskih plošč, Sunrise, Tecan, Männedorf, Švica
- epruvetke 1,5 mL, Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- epruvetke 250 µL, PCR Tubes, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- inverzni mikroskop, Eclipse TS100, Nikon, Japonska
- mikrotitrne plošče Costar 3591 polysytrene medium binding, Corning Inc, New York, ZDA
- multipipete (100 µL, 300 µL), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- nastavki za pipetiranje (10 µL, 200 µL, 300 µL in 1000 µL), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipete (10 µL, 100 µL, 1000 µL), Research, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- pipete (10 µL, 100 µL, 1000 µL), Biohit Mechanical Pippetes, Biohit, Helsinki, Finska
- platenke za tkivne kulture 25, 75, 150 cm<sup>2</sup>, TPP, Trasadingen, Švica
- stekelca za štetje celic, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
- spektrofotometer za mikrotitrne plošče, Sunrise Tecan, Tecan Tradin AC, Männedorf, Švica
- sterilni filtri za enkratno uporabo, Minisart®, velikost por 0,20 µm
- stresalnik, Promax 1020, Heidolph zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- strgalo za celice (13 mm), TPP, Trasadingen, Švica
- šest prekatne plošče TPP, Trasadingen, Švica

- UV/VIS enožarkovni spektrofotometer M501, Camspec, Leeds, Velika Britanija
- kvarčna kiveta, QS, 10.00 mm, Campsec, Cambrige, velika Britanija
- vakuumaska črpalka, Vacuum Pump XF54 230 50, Millipore, Francija
- vibracijski mešalnik, vrtinčnik, Vortex, Assister, Sondheim, Nemčija
- vodna kopel, Water Bath TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija

## 3.2 METODE

### 3.2.1 DELO S CELIČNIMI KULTURAMI

Eksperimente smo izvajali na celični kulturi primarnih človeških arterijskih endotelijskih celic (HCAEC). Celice, ki smo jih dobili, so bile v tretji pasaži, poskuse pa smo izvajali na celicah v peti ali šesti pasaži. Ker smo izvedli veliko poskusov, so bile celice različnih serij, kar pomeni, da so bile izolirane iz različnih ljudi. Vse poskuse smo izvajali v komori z laminarnim pretokom zraka, s čimer smo zagotovili čim večjo sterilnost. Komora se nahaja v laboratoriju za delo s celičnimi kulturami, kamor je vstop dovoljen le z ustrezno zaščitno opremo, ki smo jo oblekli v predprostoru, s čimer smo možnost kontaminacije celičnih kultur zmanjšali na minimum, prav tako pa nas oprema ščiti pred potencialno nevarnimi snovmi, s katerimi se lahko srečamo pri delu. Ves pribor, ki smo ga uporabljali, je bil sterilen. Pribor, za katerega sam proizvajalec ni jamčil, da je steril, smo avtoklavirali po predpisanem postopku, delovne površine in pripomočke za večkratno uporabo smo pred pričetkom in koncem dela obrisali s 70 % etanolom in razkužilom, v aseptični komori in v inkubatorju pa smo za razkuževanje uporabljali tudi UV lučko.

#### **Priprava gojišča, odmrzovanje, nasaditev in gojenje celic**

Preden smo celice vzeli iz tekočega dušika, smo pripravili ustrezne medije. Osnovnemu mediju za gojišče EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2) smo v aseptični komori dodali predpisano količino dodatkov in tako dobili popolno gojišče za HCAEC z 0 % FBS. Če smo temu mediju dodali še predpisano količino seruma govejega ploda (FBS), smo dobili popolno gojišče za HCAEC s 5 % FBS (preglednica III). Medij smo v vodni kopeli pred uporabo vedno segreli na 37° C.

Celice so v posebnih zamrzovalnih plastenkah obdane z zamrzovalnim medijem, shranjene v tekočem dušiku. Na vsaki steklenički je napisana vrsta in približno število celic, številka pasaže celic in datum zamrznitve. Celice smo po tem, ko smo jih vzeli iz tekočega dušika, minuto ali dve segrevali v vodni kopeli, da se odtalijo. Nato smo jih pomešali s predhodno preračunano količino popolnega gojišča za HCAEC s 5 % FBS, segretega na 37° C in s suspenzijo napolnili prekate na plošči. Uporabljali smo šestprekatne plošče, površina enega prekata pa je 9,6 cm<sup>2</sup>. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 2 mL suspenzije. Gostota nasaditve celic je bila od 2000 do 5000 celic/cm<sup>2</sup>, odvisno od tega, kako hitro smo hoteli,

da celice postanejo ustrezno prekrivne in od razpoložljive količine celic v zamrzovalnih plastenkah.

Ploščo z nasajenimi celicami smo rahlo potresli in dali v inkubator (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % relativna vlažnost). Po 4 urah smo gojišče odsesali, s čimer smo odstranili tudi celice, ki se niso prijele, in ga nadomestili s svežim (CA-PM s 5 % FBS). Celicam smo nato gojišče menjali vsak drugi dan, pri čemer smo jih vsakodnevno opazovali pod mikroskopom. Ko so dosegle 80-90 % prekrivnost, smo na njih izvedli poskus.

### **Izvedba poskusa in kolekcija celic**

Pred stimulacijo celic smo naredili načrt poskusa, ki smo mu nato sledili. Dve uri pred stimulacijo smo vsem celicam zamenjali gojišče in jim dodali predhodno segreto popolno gojišče CA-PM z 0 % FBS (2 mL/vdolbinico), s čimer smo preprečili vpliv FBS na rezultat. Neposredno pred stimulacijo smo ponovno zamenjali gojišče in spet dodali popolno gojišče CA-PM z 0 % FBS (1 mL/vdolbinico). Nato smo celicam najprej dodali izračunano količino pripravka iz zdravil (glej dalje), po določenem času - odvisno od lipofilnosti uporabljenega zdravila - vendar najpogosteje po dveh urah, pa še preračunano količino SAA, da smo dobili ustrezno koncentracijo SAA in zdravil v gojišču. Prekatom, ki so bili določeni za negativno kontrolo, nismo v gojišče dodali ničesar.

Osnovno raztopino SAA (c = 1,0 mg/mL) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Uporabljali smo različne serije istega proizvajalca. Plošče s celicami smo po dodatku zdravil in SAA vrnili v inkubator (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % relativna vlažnost) za 2, 4, 8, 16 ali 24 ur, odvisno od načrtanega poskusa.

Po koncu poskusa smo supernatante odpipetirali v avtoklavirane epruvetke ter jih 5 minut vrteli na 5000 g. Zgornjih 850 µL supernatanta smo prenesli v nove epruvetke, jih označili, ter shranili v zmrzovalnik na -20° C. Na celice, ki so ostale pritrjene v vdolbinicah, pa smo nalili 350 µL lizirajočega pufra iz analiznega kompleta za izolacijo RNA, jih s strgalcem postrgali in prenesli v avtoklavirane epruvetke ter shranili v skrinjo, na -80° C. Ker lizirajoči pufer vsebuje gvanidinijev tiocianat, ki prepreči encimsko aktivnost RNAz, so bile celice zaščitene pred razgradnjo RNA.

### **Priprava zdravil za aplikacijo na celice**

Pred izvedbo poskusov smo v literaturi poiskali podatke o topilu, v katerem so učinkovine topne in njihovo topnost (preglednica VI). Uporabljena zdravila smo najprej raztopili v ustreznem mediju, ter jih filtrirali skozi sterilne filtre, z velikostjo por 0,20 µm. Poiskali

smo tudi podatke o koncentraciji učinkovin, uporabljenih v drugih raziskavah in pri drugih celičnih tipih, ki za celice dokazano niso toksične. S preračunom smo dobili količino učinkovine, raztopljene v ustreznem volumnu topilu, ki je ustrezala želeni koncentraciji učinkovine na celicah. Raztopljeno učinkovino smo nato aplicirali na celice.

**Preglednica VI: Učinkovina in uporabljeno zdravilo, topilo in topnost učinkovin v izbranem topilu, koncentracija učinkovine na celicah in uporabljena prostornina.**

<b>Učinkovina in uporabljeno zdravilo</b>	<b>Topilo in topnost učinkovine</b>	<b>Koncentracija na celicah (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Uporabljen V (<math>\mu\text{L}/1\text{ mL}</math> medija)</b>
<b>adalimumab:</b> Humira 40 mg/0,8 mL, raztopina za injiciranje	/	100	2
<b>certolizumab pegol:</b> Cimzia 200 mg/mL, raztopina za injiciranje	/	100	5
<b>deksametazon:</b> Dexamethason Krka 4 mg/ mL, raztopina za injiciranje	/	5	5,9
<b>etanercept:</b> Enbrel 50 mg/mL, raztopina za injiciranje	/	100	2
<b>etorikoksib:</b> Arcoxia, 90 mg filmsko obložene tablete	DMSO: prosto	100	3
<b>golimumab:</b> Simponi 50 $\mu\text{g}/0,5\text{ mL}$ , raztopina za injiciranje	/	100	1
<b>kaptopril:</b> Kaptopril Krka, 25 mg tbl.	medij: 160 mg/mL	10	4,4
<b>meloksikam:</b> Movalis, 15 mg tablete	DMSO: 25 mg/mL	100	3,5
<b>metotreksat:</b> Methotrexat 2,5 mg tablete	DMSO: topen	1	3,6
<b>natrijev diklofenakat:</b> Naklofen duo, 75 mg kapsule	DMSO: 35 mg/mL	10	4
<b>natrijev fluvastatinat:</b> Lescol, 40 mg trde kapsule	medij: prosto	10	10,3
<b>rosiglitazon:</b> rosigl. Cayman Chemicals	DMSO: 25 mg/mL	30	4,3

### **Štetje celic**

Celice smo pred nadaljnjo analizo tudi prešteli, s čimer smo se prepričali, da nobeno od zdravil ni imelo citotoksičnega učinka. Za štetje smo uporabili Countess avtomatski števec celic. 10  $\mu$ L vzorca smo premešali z 10  $\mu$ L tripanskega modrila in 10  $\mu$ L mešanice odpipetirali v odprtino na objektnem stekelcu ter ga vstavili v aparat. Z gumbom »zoom« smo prilagodili sliko, tako da so bile žive celice temne s svetlo sredino, mrtve celice pa so bile popolnoma temne, brez svetle sredine, saj je v njih vstopilo barvilo. S pritiskom na gumb »count cells« se prične avtomatsko štetje celic. Aparat nam poda celotno številčno koncentracijo celic, ter posebej tudi število živih in mrtvih celic v vzorcu.

### **3.2.2 IZOLACIJA NUKLEARNIH EKSTRAKTOV**

Nuklearne ekstrakte smo izolirali po navodilih proizvajalca iz 75 mm posode. Celice smo dali v ohlajeno 15 mL epruvetko, ter jih 5 minut centrifugirali na  $300 \times g$  pri  $4^{\circ} C$ . Nato smo jih resuspendirali v 5 mL ledeno hladnega PBS – raztopina s fosfatnimi inhibitorji (Nuclear Extraction PBS  $10 \times$  / destilirana voda / Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitors  $50 \times$ ), ter ponovno 5 minut centrifugirali na  $300 \times g$  pri  $4^{\circ} C$ . Ves postopek smo še enkrat ponovili. Celicam smo dodali 500  $\mu$ L ledeno hladnega hipotoničnega pufra (Nuclear Hypotonic Buffer  $10 \times$  / destilirana voda / Nuclear Extraction Phosphatase Inhibitors  $50 \times$  / Nuclear Extraction Protease Inhibitors  $100 \times$ ), premešali s pipetiranjem in usedlino resuspendirali v ohlajeni 1,5 mL epruvetki. Celice smo 15 minut inkubirali na ledu, da so nabrekli, jim dodali 100  $\mu$ L reagenta 10 % Nonidet P-40 Assay Reagent in premešali s pipetiranjem ter jih 30 s centrifugirali na  $4^{\circ} C$ . Supernatant, ki vsebuje citosolno frakcijo smo prenesli v novo, ohlajeno epruvetko in shranili na  $-80^{\circ} C$ . Usedlino smo resuspendirali v 50  $\mu$ L ledeno hladnega ekstrakcijskega pufra in 15 s vrtinčili pri najvišji hitrosti. Epruvetko smo nato na ledu nežno zibali 15 minut, vrtinčili 30 s pri najvišji hitrosti in ponovno 15 minut zibali na ledu. Na koncu smo ekstrakte še 10 minut centrifugirali pri  $14000 \times g$  na  $4^{\circ} C$ , supernatante alikvotirali v nove, ohlajene epruvetke in jih, če nismo takoj nadaljevali s poskusom, shranili na  $-80^{\circ} C$ .

### **3.2.3 DOLOČANJE PPAR $\gamma$ TRANSKRIPCIJSKEGA FAKTORJA**

Pred odprtjem smo komplet segreti na sobno temperaturo in pripravili CTFB (Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer) pufer. V eno luknjico smo dali:

- 73  $\mu$ L UltraPure Water



- 25  $\mu\text{L}$   $4 \times$  transcription Factor Binding Assay Buffer
- 1  $\mu\text{L}$  Reagent A
- 1  $\mu\text{l}$  300 mM DTT

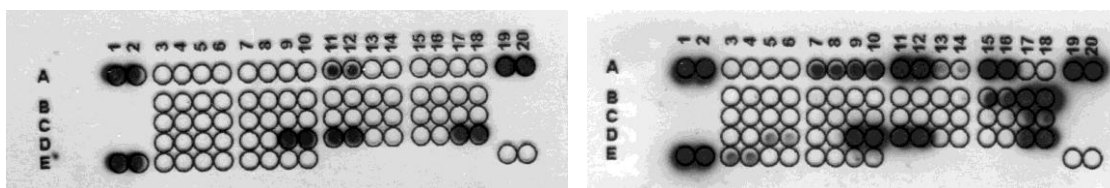
Napipetirali smo:

- **BLK** – 100  $\mu\text{L}$  CTFB
- **NSB** – 100  $\mu\text{L}$  CTFB
- **C1** – 80  $\mu\text{l}$  CTFB+10  $\mu\text{L}$  Transcription Factor PPAR Specific Competitor dsDNA + 10  $\mu\text{L}$  neznanega vzorca
- **S1-S44** – 90  $\mu\text{L}$  CTFB + 10  $\mu\text{L}$  nuklearnega ekstrakta
- **PC** – 90  $\mu\text{L}$  CTFB + 10  $\mu\text{L}$  pozitivne kontrole

Pokrito ploščo smo inkubirali čez noč na  $4^\circ\text{C}$  ali dve uri na sobni temperaturi. Ugotovili smo, da smo boljše rezultate dobili pri dvourni inkubaciji na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vdolbinice izpraznili in jih  $5 \times$  sprali z 200  $\mu\text{L}$  pufru za spiranje. Razredčili smo primarna protitelesa PPAR $\gamma$  (1:100 v  $1 \times$  ABB) in dodali 100  $\mu\text{L}$  v vse vdolbinice, razen v slepo. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in vdolbinice ponovno  $5 \times$  sprali s spiralnim pufrom. Razredčili smo kozja in anti-zajčja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo in dodali 100  $\mu\text{L}$  v vse vdolbinice, razen v slepo, ter ponovno inkubirali 1 h pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo ponovno sprali in v vsako dodali 100  $\mu\text{L}$  raztopine za razvijanje transkripcijskega faktorja. Inkubirali smo 45 minut na sobni temperaturi z rahlim zibanjem in zaščiteno pred svetlobo. Dodali smo 100  $\mu\text{L}$  raztopine za zaustavitev reakcije in v roku 5 minut izmerili absorbanco pri 450 nm.

### 3.2.4 PANEL CITOKINOV

Uporabili smo komercialno dostopen komplet, pri katerem so na nitrocelulozno membrano vezana protitelesa proti 36 citokinom, kemokinom in proteinom akutne faze vnetja. Protitelesa na membrani vežejo specifična protitelesa iz dodanega vzorca, detekcija pa poteka po principu kemiluminescentne reakcije (slika 2).



Slika 2: Citokinski panel po nanosu supernatanta iz netretiranih HCAEC in celic, stimuliranih s SAA.

Pred uporabo smo vse reagente segreli na sobno temperaturo. V prekat smo za vsak vzorec najprej odpipetirali 2 mL pufru, ki preprečuje nespecifično vezavo drugih molekul, dodali nitrocelulozno membrano z naborom citokinov in jo ob zibanju eno uro inkubirali na sobni temperaturi. Med tem smo pripravili vzorce. 800  $\mu$ L našega vzorca smo dodali, 500  $\mu$ L pufru 4 in 200  $\mu$ L pufru 5. Vzorcju smo nato dodali še 15  $\mu$ L rekonstruirane mešanice z biotinom konjugiranih protiteles, premešali in na sobni temperaturi inkubirali eno uro. Iz prekata smo odsesali prejšnji pufer, ter membrano potopili v vzorec, ki smo ga pripravili, ter inkubirali čez noč na 2-8° C z rahlim stresanjem. Naslednji dan smo membrane potopili v 20 mL spiralnega pufru in jih 10 minut zibali na stresalniku, postopek smo ponovili 3  $\times$ , med tem pa smo prekate temeljito umili in posušili. Vanje smo nato odpipetirali 1,5 mL predhodno redčenega kompleksa streptavidin-hrenova peroksidaza ter jih 30 minut stresali pri sobni temperaturi. Nato smo jih ponovno 3  $\times$  sprali s spiralnim pufrom, nanесли kemiluminescentni reagent ter membrane s fotografskim filmom slikali v različnih časovnih presledkih (slika 2).

### **3.2.5 ENCIMSKOIMUNSKA METODA**

Encimskoimunska metoda (ELISA) je biokemijska metoda za kvalitativno in kvantitativno določanja protiteles ali antigenov v vzorcju, ki jo odlikujeta hitrost in visoka analizna občutljivost. Če želimo določiti količino iskane molekule v vzorcju, moramo najprej pripraviti umeritveno krivuljo s pomočjo dodanega standarda in predpisanih redčenj tega. Za določevanje naših tarčnih molekul smo uporabljali metodo sendvič ELISE. V supernatantu smo določali prisotnost šestih različnih molekul, citokinov IL-6 in GM-CSF, kemokina IL-8, adhezivnih molekul sICAM in sVCAM, in proteaznega inhibitorja PAI-1, ki so nam služili kot pokazatelji vnetnega odziva celic ob dodatku zdravil in SAA. Natančen postopek analiz je predstavljen v preglednici VII. Vzorce smo pred uporabo odmrznili, segreli na sobno temperaturo, premešali in pred nanosom po potrebi redčili z dodanim pufrom za redčenje. Princip metode je v vseh primerih enak. Specifična primarna monoklonska protitelesa so pritrjena na dno mikrotitrne plošče, kamor smo odpipetirali ustrezno količino vzorca. Drugo specifično monoklonsko protitelo, ki je usmerjeno proti drugemu epitopu iskane molekule, je označeno z biotinom. Na biotin se z močno nekovalentno vezjo veže še kompleks streptavidin – hrenova peroksidaza (HRP). Encim peroksidaza nato kvantitativno pretvori substrat, ki ga dodamo, v modro obarvan produkt,

ki po dodatku žveplove (VI) kisline (STOP solution) postane rumen in ga lahko spektrofotometrično določimo. Z vmesnimi spiranji preprečimo nespecifično vezavo protiteles, zato je intenziteta obarvanja v vsaki vdolbinici mikrotitrsko ploščice sorazmerna koncentraciji iskanega proteina v vzorcu. S pomočjo umeritvene krivulje iz znanih koncentracij standardov, na koncu dobimo koncentracijo iskanega proteina v našem vzorcu.

**Preglednica VII: Pregled postopka pri encimskoimunskem testu na trden nosilcu za določanje koncentracije IL-6, IL-8, sICAM-1, sVCAM-1, PAI-1 in GM-CSF.**

Postopek	IL-6 ELISA	IL-8 ELISA	sICAM-1 ELISA	sVCAM-1 ELISA	PAI-1 ELISA	GM-CSF ELISA
<b>nanos standardov in vzorcev na mikrotitrsko ploščo</b>	100 µL	50 µL	najprej 2× spereš 100 µL	100 µL	100 µL+ 120 min inkubacije na sobni T	50 µL
<b>spiranje</b>	/	/	/	/	4-krat	/
<b>nanos biotina s protitelesi</b>	50 µL	50 µL	/	50 µL	100 µL	150 µL
<b>inkubacija (sobna T)</b>	120 min	90 min	/	37°C 120 min,	120 min	90 min
<b>spiranje</b>	4-krat	4-krat	/	4-krat	4-krat	4-krat
<b>nanos kompleksa streptavidin-HRP</b>	100 µL	100 µL	HRP konjugat 50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>inkubacija</b>	30 min	30 min	120 min	30 min	30 min	30 min
<b>spiranje</b>	4-krat	4-krat	3-krat	4-krat	4-krat	4-krat
<b>nanos substrata</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>inkubacija v temi</b>	30 min	30 min	10 min	30 min	15 min	30 min
<b>nanos STOP raztopine</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>merjenje absorbance</b>	450 nm	450 nm	450 nm	450 nm	450 nm	450 nm

S supernatantom, ki smo ga dobili po 24 h stimulaciji HCAEC s SAA in z zdravili, smo nato z metodo ELISA izvedli analizo količine izločenih molekul. Supernatante smo morali ustrezno redčiti, da smo prišli v območje detekcije metode (preglednica VIII)

**Preglednica VIII: Koncentracija standarda v analiznem kompletu ter redčitve samih zdravil in zdravil v kombinaciji s SAA.**

ELISA	C standarda	Redčenje-zdravila	Redčenje-zdravila+SAA
IL-6	500 pg/mL	/ in 1:10	1:50
IL-8	1000 pg/mL	/ in 1:10	1:50
GM-CSF	500 pg/mL	1:2	1:2
PAI-1	4000 pg/mL	1:80 in 1:50	1:80 in 1:50
sICAM-1	10 ng/mL	/	/
sVCAM-1	75 ng/mL	1:2	1:2

### 3.2.6 ANALIZA RNA

Vpliv stimulacije celic s SAA in z učinkovinami smo poleg proteinskega preverili tudi na nivoju informacijske RNA (mRNA). Za razliko od encimskoimunskega testa, kjer smo koncentracijo nastalih proteinov navadno merili po 24 urah, saj za njihovo sintezo celica potrebuje nekaj časa in se akumulirajo v supernatantu, so poskusi, pri katerih smo analizirali RNA, trajali od 2-8 ur, ker se RNA za mnoge gene po 24 urah že razgradi. RNA iz celic smo izolirali s pomočjo kompleta za izolacijo RNA po priloženih navodilih proizvajalca (glej naprej), količino in čistost izolirane RNA pa smo določili spektrofotometrično iz razmerja absorbanca pri 260 in 280 nm. RNA je občutljiva na delovanje RNaz, ki pa jih s hlajenjem na ledu upočasnimo, zato smo tudi poskrbeli, da je bila izolacija izvedena v najkrajšem možnem času. Po izolaciji smo izvedli reverzno transkripcijo, s čimer smo RNA pretvorili v komplementarno DNA (cDNA), ki je bolj stabilna in smo jo namesto na -80° C lahko shranjevali na -10° C. Na koncu smo izvedli še kvantitativno reakcijo s polimerazo v realnem času (qPCR), s čimer smo določili izražanje tarčnih genov v celicah. Da ne bi prišlo do onesnaženja vzorca, smo pri delu uporabljali posebno določen prostor, rokavice in pipetne nastavke s sterilnimi filtri.

#### Izolacija RNA

RNA smo izolirali iz celic z analiznim kompletom za izolacijo RNA (RNeasy® Plus Micro kit) po navodilih proizvajalca. Komplet vsebuje kolono z membrano, ki veže RNA, proteine, DNA in druge nečistote pa speremo iz vzorca. Na koncu z dodatkom vode brez RNaz izperemo RNA iz membrane.

Celični lizat, shranjen na  $-80^{\circ}\text{C}$  smo najprej odtalili in močno vrtinčili. Lizat smo prenesli na posebno kolono, s katero smo iz lizata odstranili DNA, ki vsebuje celoten genski material, zaradi česar bi kasneje prišlo do napačnih rezultatov pri verižni reakciji s polimerazo. Ker so nas zanimali le določeni tarčni geni, ki so se izražali pod pogoji, v katerih je bil izveden poskus, smo iz celice izolirali le celoten nabor molekul mRNA. Lizat smo 30 s centrifugirali na  $12000 \times g$  in kolono zavrgli. Vzorcju smo dodali  $350\ \mu\text{L}$  70 % EtOH, kar obori RNA in dobro premešali s pipetiranjem. Prenesli smo ga na drugo kolono (Rneasy MinElute spin column), jo postavili v 2 mL zbiralno epruvetko in centrifugirali 30 s na  $12000 \times g$ . Tekočino smo zavrgli in na kolono nanesti  $700\ \mu\text{L}$  pufru Buffer RW1, zaprli pokrovček in centrifugirali 30 s na  $12000 \times g$ . Zavrgli smo tekočino in na kolono nanesti  $500\ \mu\text{L}$  pufru Buffer RPE, nežno zaprli pokrovček in ponovno centrifugirali 30 s na  $12000 \times g$ . Zavrgli smo tekočino in na kolono nanesti  $500\ \mu\text{L}$  80 % EtOH, zaprli pokrovček in centrifugiraj 2 min na  $12000 \times g$ . Kolono smo prenesli v novo 2 mL zbiralno epruvetko in odprto kolono centrifugirali na maksimalni hitrosti 2 min, da je izhlapel ostanek etanola. Zbiralno epruvetko smo zavrgli. Kolono smo prenesli v novo označeno 1,5 ml epruvetko, dodali  $14\ \mu\text{L}$  vode brez RNaz direktno na sredino membrane in centrifugirali 1 min na maksimalni hitrosti. Naredili smo še redčitev RNA za merjenje absorbance. Epruvetke z RNA smo zamrznili na  $-80^{\circ}\text{C}$  ali neposredno nadaljevali s pretvorbo RNA v cDNA.

### **Določanje koncentracije RNA**

Količino RNA smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. Vzorec, ki vsebuje  $40\ \mu\text{g/mL}$  RNA, ima pri 260 nm vrednost absorbance 1. Da bi določili količino izolirane RNA, smo  $2,3\ \mu\text{L}$  vzorca RNA redčili s  $67,7\ \mu\text{L}$  vode brez RNaz, s čimer smo raztopino RNA razredčili 30 krat. Iz izmerjene absorbance in ustrezne redčitve smo izračunali količino RNA v vzorcju po enačbi 1:

$$\text{količina RNA v vzorcju} = 40\ \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{faktor redčenja}$$

**Enačba 1: Izračun količine RNA v vzorcju na podlagi izmerjene absorbance.**

**$A_{260}$ -izmerjena absorbanca vzorca pri 260 nm.**

Čistost RNA smo približno ocenili iz razmerja absorbanc vzorca RNA pri 260 in 280 nm. S tem lahko ocenimo prisotnost nečistot, ki absorbirajo v UV spektru, kot so na primer proteini in DNA. Po dosedanjih izkušnjah razmerje med 1,7 in 2,0 pomeni relativno dobro čistost RNA, izolirane po izbrani poti.

## Reverzna transkripcija

Z reverzno transkripcijo (RT) smo pretvorili enoverižno RNA, ki je zelo občutljiva na delovanje RNaz in jo hitro razgradijo, v bolj stabilno komplementarno DNA (cDNA). Encim reverzna transkriptaza najprej prepíše verigo RNA v cDNA in nato razgradi RNA. Reakcijski mešanici za RT (14,4  $\mu$ L), ki je predstavljena v preglednici VII smo dodali raztopino RNA, ki vsebuje 1  $\mu$ g RNA in vodo brez RNaz, do skupne prostornine 15,6  $\mu$ L ter vzorec uporabili v reakciji RT.

Reakcija RT je potekala pod naslednjimi pogoji:

30 minut pri 43° C

30 minut pri 53° C

5 minut pri 94° C.

cDNA smo shranili na -20° C ali pa takoj nadaljevali s PCR v realnem času.

**Preglednica IX: Sestava in vloga sestavin v reakcijski mešanici za reverzno transkripcijo.**  
dNTP – deoksiribonukleotidtrifosfati, AMV RT – encim reverzna transkriptaza virusa ptičje mieloblastoze.

Sestavina	Vloga	Količina za 1 vzorec	
10x RT pufer	vzdržuje pH	3 $\mu$ L	= 14,4 $\mu$ L
dNTP	gradniki nove verige	3 $\mu$ L	
MgCl <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> je kofaktor encima AMV RT	6 $\mu$ L	
oligo dT	oligonukleotidni začetniki	1 $\mu$ L	
inhibitor RNaz	zaviranje RNaz	0,75 $\mu$ L	
AMV RT	encim, odgovoren za izgradnjo cDNA	0,6 $\mu$ L	
voda brez nukleaz	dopolni prostornino reakcijske mešanice	0,05 $\mu$ L	= 30 $\mu$ L
+ vzorec z 1 $\mu$ g RNA	vir RNA	15,6 $\mu$ L	

### Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) nam omogoča pomnoževanje točno določenega fragmenta in hkrati spremljanje količine DNA v vzorcu v posameznem ciklu. Uporabili smo jo za določitev izražanja naslednjih genov v celicah: IL-6, IL-8, SAA, COX-1, COX-2, PPAR $\gamma$  in VCAM-1. Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je natančno opisana v preglednici X. Komercialno dostopna mešanica vsebuje vse potrebne elemente za potek reakcije: termostabilno DNA-polimerazo za pomnoževanje, deoksiribonukleotidtrifosfate (dNTP) in barvilo Sybr Green I za detekcijo, ki fluorescira, ko se interkalira v dvojno vijačnico. Mešanici smo dodali še začetne oligonukleotide, ki so odgovorni za pomnoževanje izbranega gena in vodo brez nukleaz.

**Preglednica X: Sestava reakcijske mešanice za qPCR**

Sestavina	Količina za en vzorec
Power Sybr Green PCR Master Mix	12,5 $\mu$ L
oligonukleotidni začetnik F (10 pmolov/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
oligonukleotidni začetnik R (10 pmolov/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L
voda brez nukleaz	10,5 $\mu$ L

cDNA smo pred analizo iz 30  $\mu$ L z vodo brez nukleaz razredčili na 120  $\mu$ L, da smo namesto 1  $\mu$ L v vdolbinice lahko odpipetirali 4  $\mu$ L in s tem močno zmanjšali napako zaradi pipetiranja. Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo nanесли v vdolbinice na ploščici (21  $\mu$ L/vdolbinico) in ji dodali cDNA (4  $\mu$ L/vdolbinico), v primeru slepe kontrole pa 4  $\mu$ L vode brez nukleaz. Pripravili smo tudi standarde, kar je povzeto v naslednji preglednici XI:

**Preglednica XI: Redčitev standardov za qPCR. (ST 1 je sestavljen iz 20  $\mu$ L DNA iz različnih vzorcev.)**

Standard	Faktor	Redčitev	Uporabimo
ST 1	1:1 (1)	/	4 $\mu$ L + 21 $\mu$ L PCR Master Mix
ST 2	1:2 (0,5)	10 $\mu$ L ST1+10 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	
ST 3	1:4 (0,25)	10 $\mu$ L ST2+10 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	
ST 4	1:8 (0,125)	10 $\mu$ L ST3+10 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	
ST 5	1:16 (0,062)	10 $\mu$ L ST4+10 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	

Uporabili smo računalniški program StepOne (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, ZDA), s pomočjo katerega smo pred pričetkom pomnoževanja določili razporeditev vzorcev, standardov in slepih kontrol na ploščici – vse smo vedno nanašali v dvojnikih ter pogoje reakcije. Najprej se reakcijska mešanica 10 minut segreva na 95° C. Sledi 40 ciklov, od katerih je vsak cikel sestavljen iz treh korakov:

- v prvem koraku (15 sekund, 95° C) se cDNA denaturira
- v drugem koraku (1 minuta, temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov) se oligonukleotidni začetniki prilegajo na odsek cDNA
- v tretjem koraku (1 minuta, 60° C) se veriga cDNA pomnoži

Računalniški program je v vsakem ciklu izmeril fluorescenco vzorca in izrisal krivuljo, ki podaja odvisnost fluorescence signala posameznega vzorca od časa. Na eksponentnem delu krivulje smo določili linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto fluorescenco, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Za vsak vzorec smo nato določili tisti cikel (Ct), v katerem je fluorescenca vzorca presegla nastavljeno linijo fluorescenčnega praga. Vrednosti Ct so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij tarčne cDNA, kar pomeni, da več, kot je v vzorcu začetnih molekul DNA, hitreje se preseže prazna vrednost.

Podatke, ki smo jih dobili, smo obdelali s pomočjo računalniškega programa QGENE. V tabele smo vnesli podatke o tarčnem in referenčnem genu, program pa je izračunal relativno izražanje tarčnih genov v HCAEC, glede na referenčni gen. Referenčni gen, v našem primeru  $\beta$ -aktin, se v endotelijskih celicah izraža enakomerno in neodvisno od zunanjih dražljajev. Program nam je najprej iz naklona standardne krivulje (graf odvisnosti Ct od logaritma začetne količine DNA v standardu) za vsako reakcijo izračunal učinkovitost pomnoževanja (E), nato pa še normalizirano izražanje tarčnega gena glede na referenčni gen (enačba 2).

$$\text{Normalizirano izražanje} = \frac{E(\text{tarčni gen})^{dCt(\text{tarčni gen})}}{E(\text{referenčni gen})^{dCt(\text{referenčni gen})}}$$

**Enačba 2: Normalizirano izražanje tarčnega gena glede na referenčni gen.**

Po obdelavi podatkov smo dobili graf, ki prikazuje na  $\beta$ -aktin normalizirano, povprečno izražanje tarčnega gena v vsakem vzorcu.



## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Ateroskleroza je kompleksna, kronična bolezen, na katero vplivajo številni faktorji tveganja. Za njo so značilni mnogi procesi, vključno s kopičenjem lipidov v žilni steni in kroničnim vnetjem. Proces ateroskleroze se prične s poškodbo endotelija in konča s tvorbo strdka, ko endotelij razkrije pod njim ležečo leho (52). Ker je pri bolnikih z RA večja verjetnost za razvoj tako ateroskleroze, in kasneje tudi srčno-žilnih bolezni, je relevantno proučevati vpliv zdravil, ki jih uporabljajo bolniki z RA, na potencialno modulacijo spodbujenih vnetnih parametrov endotelialnih celic koronarne arterije.

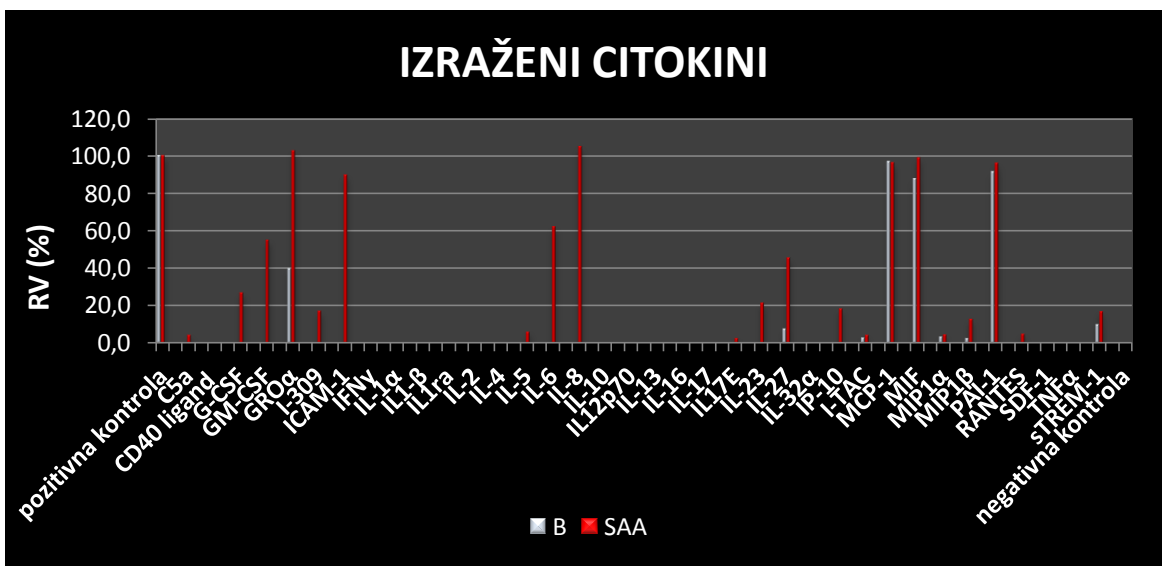
Za proučevanje vnetnega odziva HCAEC smo najprej pregledali nabor 36 različnih citokinov, kemokinov in proteinov akutne faze vnetja pri nestimuliranih HCAEC in HCAEC stimuliranih s SAA.

### 5.1 CITOKINSKI PANEL

Na nitrocelulozno membrano, ki se nahaja v reakcijskem kompletu, so nanesena protitelesa proti nekaterim najpogostejšim vnetnim mediatorjem, ki specifično vežejo določeno tarčo. Večja je količina tarčne molekule v vzorcu, večji in intenzivneje obarvan je krog, ki se pojavi po slikanju membrane s fotografskim filmom. Rezultate smo nato z denzitometrijo pretvorili v relativne vrednosti glede na pozitivno kontrolo (slika 3). Ugotovili smo, da HCAEC ob stimulaciji s SAA povečajo produkcijo G-CSF, GM-CSF, GRO- $\alpha$ , ICAM-1, IL-6, IL-8, IL-23, IL-27, MCP-1, MIF IN PAI-1. Glede na to, da smo dobili največje razlike v rezultatih med nestimuliranimi celicami in SAA-stimuliranimi HCAEC prav pri adhezivni molekuli ICAM-1, citokinoma IL-6 in GM-CSF ter kemokinu IL-8, smo se odločili, da bomo podrobneje pogledali odziv HCAEC v kombinaciji s SAA in zdravili na izločanje teh molekul (z dodatkom VCAM-1) ter inhibitorja serinske proteaze PAI-1, ki ga sicer v enaki meri izločajo tudi nestimulirane celice.

V razvoj ateroskleroze so vpletene tudi druge molekule kot so od rasti odvisni onkogen  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), kemokin, ki naj bi imel vpliv na destabilizacijo aterosklerotične lehe, monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1), ki vpliva na nalaganje monocitov v žilno steno pri procesu ateroskleroze in na oksidacijo holesterola ter inhibitorni dejavnik migracije makrofagov (MIF), ki ima številne učinke, med drugim tudi spodbuja proliferacijo endotelialskih celic (7, 67, 68). Tudi te citokine HCAEC izločajo v večjih količinah, vendar

njihovih učinkov v sklopu našega raziskovalnega dela nismo preverjali, vsekakor pa bi jih bilo smiselno vključiti v nadaljnje poskuse.



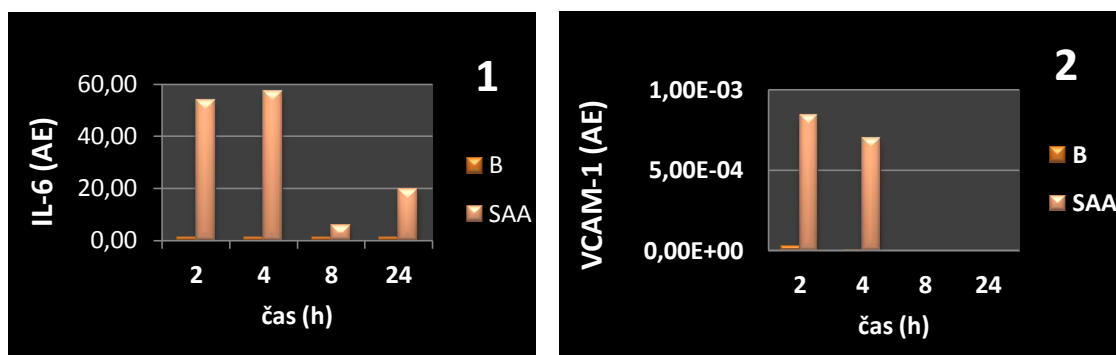
Slika 3: Citokini izraženi v netretiranih HCAEC(B) in v HCAEC ob dodatku 1000nM SAA (SAA). RV – relativna vrednost, glede na pozitivno kontrolo.

## 5.2 VNETHNI ODZIV HCAEC NA STIMULACIJO S SAA

Vnetni odziv celic lahko ovrednotimo na različne načine. Najpogosteje ga določamo preko izločanja molekul, za katere je že znano, da imajo vlogo v procesu vnetja. Vnetni odziv v endotelijskih celicah lahko določamo preko povečanega izražanja adhezijskih molekul (ICAM-1, VCAM-1, E selektin), SAA, različnih interlevkinov (IL-1, IL-6, IL-8), prostaglandinov in drugih dejavnikov. Po predhodnih podatkih je bilo jasno, da bo pri metodi ELISA največja koncentracija proteinov v supernatantu po 24 urah stimulacije, saj pri metodi izmerimo celokupno količino nastalih proteinov, ki s časom seveda tudi narašča. Izražanje mRNA različnih molekul pa ob istem času ni enako intenzivno. Da bi vedeli, kako smiselno oblikovati poskuse za analizo izražanja genov, smo najprej preverili, kdaj se geni posameznih molekul ob stimulaciji s SAA najbolj izražajo. Rezultate smo dobili podane relativno na negativno kontrolo, ki so jo predstavljale nestimulirane celice (B).

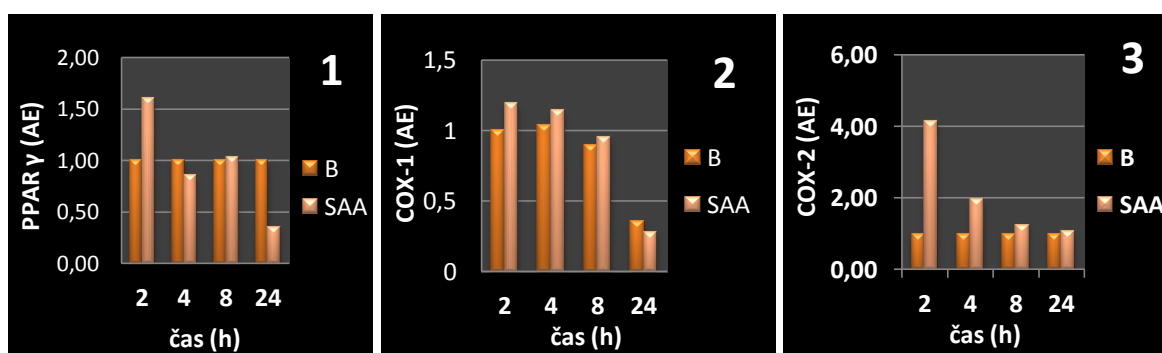
## 5.2.1 ČASOVNA ODVISNOST IZRAŽANJA NEKATERIH GENOV

Izražanje gena za IL-6 je bilo največje po štirih urah, nato pa je produkcija padla, vendar je bilo glede na ostale proučevane molekule, relativno na  $\beta$ -aktin, njegovo izražanje veliko tudi po 24 urah (slika 4-1). Adhezivna molekula VCAM-1 pa se po več kot štirih urah ni več izražala, zato smo načrtovanje nadaljnjih poskusov glede na to prilagodili (slika 4-2).



Slika 4: Izražanje genov za IL-6 (1) in VCAM-1 (2), v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). B – nestimulirane celice SAA – celice, stimulirane s SAA AE – arbitrarne enote

SAA je na izražanje transkripcijskega faktorja  $PPAR\gamma$  (slika 5-1) vplival po 2 urah stimulatorno, po 24 urah pa SAA inhibira mRNA  $PPAR\gamma$ . Pri vmesnih časih 4 in 8 ur pa so molekulo celice izražale približno enako pri stimulaciji s SAA kakor tudi brez nje, kar kaže na to, da sam SAA na njihovo izražanje takrat ni imel večjega vpliva. Ciklooksigenaza-1 (COX-1) je konstitutivna izoforma encima, konstantno prisotna v večini tkiv. Encim se je v HCAEC približno enakomerno izražal prvih osem ur, potem pa je njegovo izražanje padlo za več kot polovico (slika 5-2). Nestimulirane celice (B), so ga vseskozi izražale približno enako, kot celice stimulirane s SAA.



Slika 5: Izražanje genov za  $PPAR\gamma$  (1), COX-1 (2) in COX-2 (3), v odvisnosti od časa stimulacije HCAEC s SAA (1000 nM). B – nestimulirane celice SAA – celice, stimulirane s SAA AE – arbitrarne enote

Pričakovan pa je vpliv SAA na izražanje COX-2 v HCAEC, ki se sicer izraža le ob vnetju. COX-2 se je v SAA-stimuliranih HCAEC izražala veliko bolj intenzivno, kot v nestimuliranih. Izražanje je bilo največje dve uri po dodatku SAA, nato pa je s časom upadalo in se po 24 urah zmanjšalo skoraj za štirikrat (slika 5-3). Kot kaže, je inducibilna COX-2 izoforma hitro odzivna in najbolj aktivna v prvih urah po izpostavitvi vnetnemu dražljaju (SAA). Ti podatki so podobni objavljenim podatkom od Zhao in sodelavcev (69), kjer je bilo mRNA izražanje COX-2 sicer najvišje pri 4h.

### **5.3 VNETNI ODZIV HCAEC NA STIMULACIJO S SAA OB DODATKU ZDRAVIL**

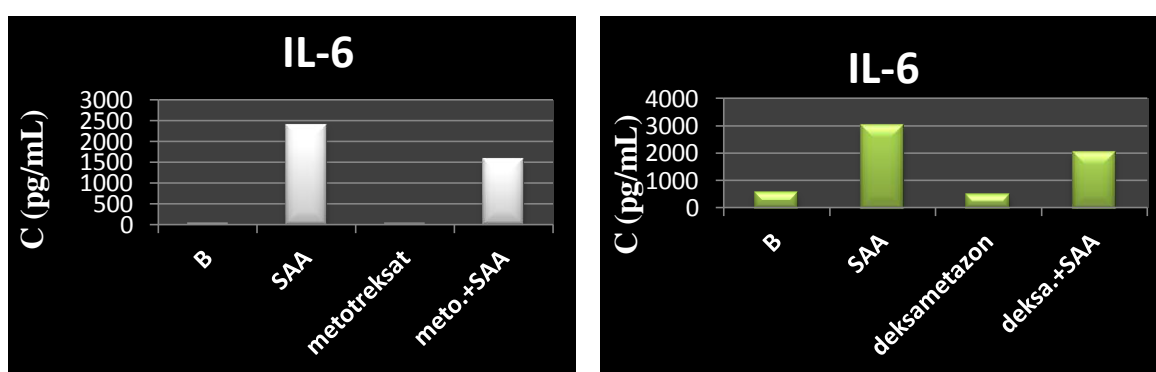
Ker smo v topilu raztapljali zdravila v obliki tablet, ali pa so bila zdravila v obliki raztopine za injiciranje, pripravki, ki smo jih aplicirali na celice, poleg učinkovine vsebujejo tudi pomožne snovi, ki bi v manjši meri lahko vplivale na dobljene rezultate. Vendar pa je zelo malo verjetno, da bi pomožne snovi iz registriranega zdravila imele tako močan vnetni ali protivnetni učinek, da bi prekrile osnovno delovanje učinkovine, zato v nadaljevanju lahko govorimo o vplivu posameznih učinkovin na vnetni odziv HCAEC.

#### **5.3.1 DMARD IN KORTIKOSTEROIDI (METOTREKSAT IN DEKSAMETAZON)**

Metotreksat je zdravilo iz skupine DMARD, ki se za zdravljenje RA uporablja najpogosteje, zelo pogoste pa so tudi njegove kombinacije z biološkimi zdravili. Mehanizmi njegovega delovanja in njegovi učinki so kompleksni, vendar v koncentracijah, v katerih se uporablja za zdravljenje RA deluje protivnetno, preko sproščanja adenozina (52, 70). Deksametazon se za zdravljenje RA uporablja že od leta 1948 in je prav tako zelo pogosto predpisano zdravilo (38). Deluje tako, da fizično reagira s transkripcijskim faktorjem NF- $\kappa$ B, ki je vpleten v regulacijo imunskega in vnetnega odziva pri sesalcih (71). V literaturi najdemo podatke, da je pri bolnikih, ki se zdravijo z metotreksatom (ki velja za enega najvarnejših zdravil za zdravljenje RA) manj možnosti za nastanek srčno-žilnih bolezni, medtem ko je tveganje za njihov nastanek, predvsem pri dolgotrajni uporabi večjih koncentracij glukokortikoidov, povečano (2)(72). Vendar pa v literaturi nismo

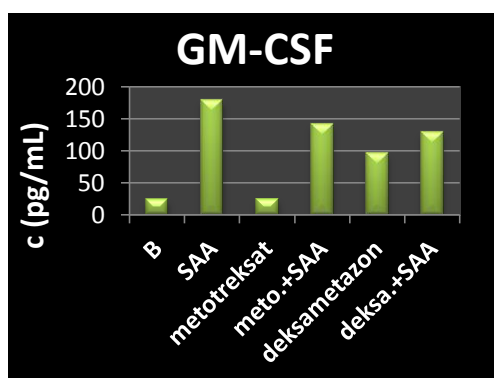
zasledili podatkov o vplivu metotreksata in deksametazona na HCAEC. Izvedli smo poskus, kjer smo preverili njun vpliv na s SAA-stimulirano produkcijo nekaterih vnetnih mediatorjev in drugih molekul udeleženih pri nastanku ateroskleroze. HCAEC smo tretirali z 1  $\mu$ M koncentracijo metotreksata, oziroma s 5  $\mu$ M koncentracijo deksametazona, ki za same celice nista toksični, in odgovarjata koncentraciji v serumu bolnikov, ki prejemajo terapevtske odmerke zdravil (54). Produkcijo proteinov smo po 24 urah preverili z metodo ELISA.

Ugotovili smo, da je metotreksat zmanjšal s SAA stimulirano produkcijo IL-6 za 34 %, deksametazon pa za 33 % (slika 6).



Slika 6: Koncentracija IL-6 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku deksametazona in metotreksata.

Koncentracija GM-CSF se ob dodatku metotreksata zmanjša za 21 %, ob dodatku deksametazona pa za 28 % (slika 7).

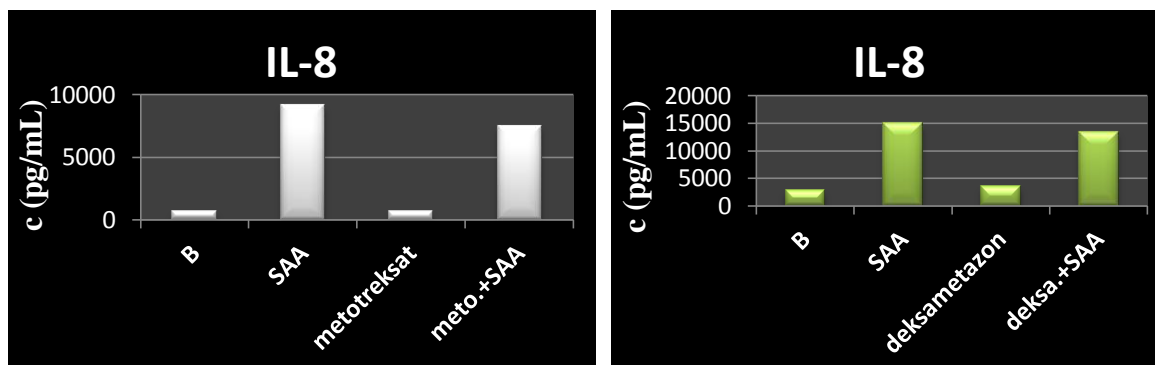


Slika 7: Koncentracija GM-CSF v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku deksametazona in metotreksata.

Rezultati nam kažejo, da je njuno delovanje na produkcijo citokinov precej podobno. Za tretjino zmanjšata produkcijo IL-6, ki ima pomembno vlogo pri vnetju, saj sproži nastanek in sproščanje številnih vnetnih mediatorjev in dokazano poveča možnost nastanka srčno-žilnih bolezni. Tudi njuno zmanjšanje produkcije GM-CSF je izredno pomembno. V zadnjem času ta vnetni citokin pridobiva na pomembnosti, glede njegove vloge pri vnetju, ker prav tako vpliva na sproščanje molekul, ki ga pospešujejo. Naši rezultati so v

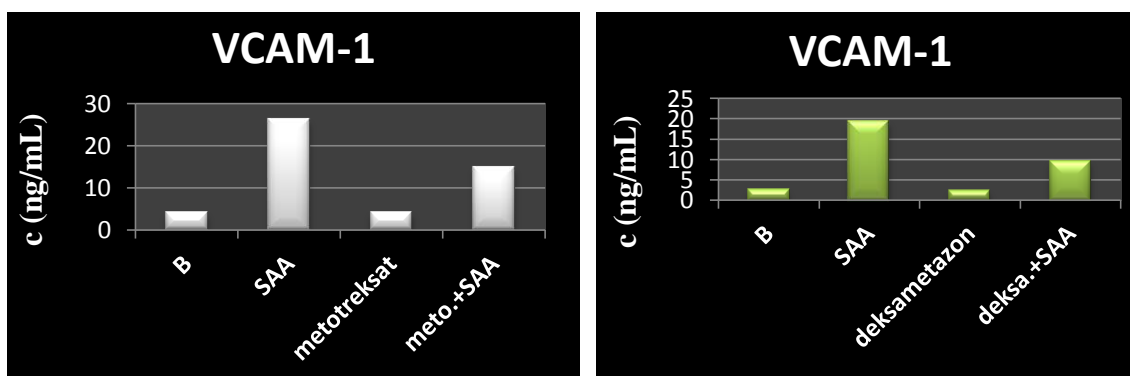
skladu s študijami, ki so bile narejene na drugem tipu endotelijskih celic (HUVEC) in so pokazali, da deksametazon zniža produkcijo IL-6 in nekoliko tudi IL-8 (73).

Njun vpliv na produkcijo kemokina je nekoliko manjši. Metotreksat je količino IL-8 zmanjšal za 18 %, deksametazon pa za 10 % (slika 8). Iz rezultatov je razvidno, da imata oba večji učinek na vnetne citokine in preko zaviranja produkcije IL-8 najbrž ne pripomoreta k zmanjšanju vnetja in k tveganju za nastanek srčno-žilnih bolezni.



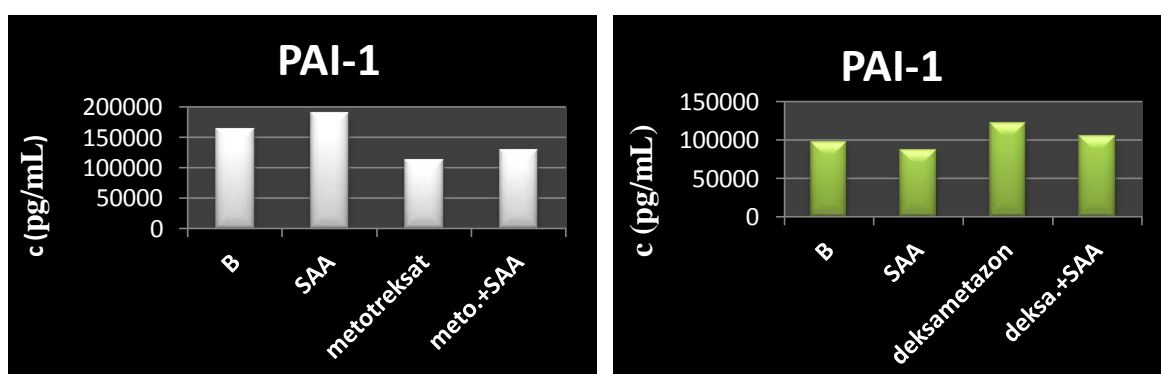
Slika 8: Koncentracija IL-8 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku deksametazona in metotreksata.

Največji vpliv sta obe učinkovini imeli na adhezijske molekule. Produkcija VCAM-1 je ob dodatku metotreksata manjša za 42 %, ob dodatku deksametazona pa za 47 % (slika 9). To seveda znatno prispeva k procesu ateroskleroze, saj zmanjšanje izražanja adhezivnih molekul dokazano upočasni aterogenezo. Metotreksat je v nekaterih študijah zavrl s TNF- $\alpha$  inducirano ekspresijo ICAM-1 in VCAM-1 v HUVEC (54), medtem, ko so Kerchian in sodelavci pri njih dokazali, da je deksametazon v večjih koncentracijah povečal TNF- $\alpha$  stimulirano ekspresijo genov adhezijskih molekul (ICAM-1, VCAM-1 in E-selektin), vendar je v manjši - 1  $\mu$ M koncentraciji povečal le produkcijo E selektina (38).



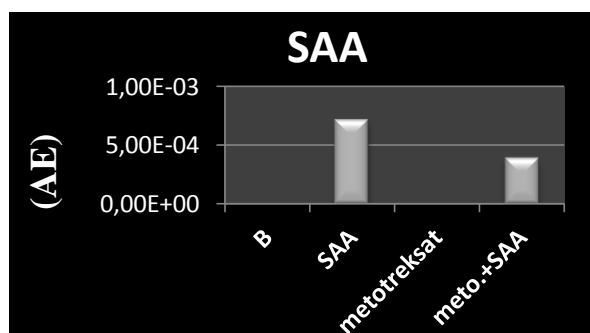
Slika 9: Koncentracija sVCAM-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku deksametazona in metotreksata.

Ugotovili smo tudi pozitivne učinke metotreksata na produkcijo PAI-1, ki ga tudi nestimulirane HCAEC izločajo v velikih količinah. Stimulacija celic s SAA ne vpliva na njegovo produkcijo. Povečane koncentracije PAI-1 povzročijo aterosklerotične zaplete, metotreksat pa zmanjša njegovo produkcijo tako pri stimuliranih, kot nestimuliranih celicah. Proizvodnja je v celicah, katerim je v gojišče dodan metotreksat, približno 32 % manjša, medtem ko je deksametazon povečal njegovo koncentracijo tako v stimuliranih kot nestimuliranih HCAEC, in sicer za približno 20 % (slika 10). Pri našem poskusu se pri produkciji PAI-1 učinkovini torej najbolj razlikujeta in mogoče je, da je to razlog njenega različnega vpliva na tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni.



Slika 10: Koncentracija PAI-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku deksametazona in metotreksata.

Glukokortikoidi dokazano vplivajo na razvoj trombotičnih procesov. V nižjih koncentracijah naj bi zavirali arterijsko trombozo z zaviranjem agregacije trombocitov, medtem ko naj bi v večjih koncentracijah inhibirali fibrinolizo. Na zaviranje fibrinolize naj bi vplivali z zmanjšanjem aktivnosti t-PA in povečanjem koncentracije PAI-1, kar se je izkazalo tudi pri našem poskusu (38).



Slika 11: Izražanje genov za SAA po 24 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku metotreksata. AE – arbitrarne enote

Preverili pa smo tudi izražanje mRNA SAA ob stimulaciji s SAA, ki so ga Lakota in sodelavci v HCAEC prvič pokazali in tako nakazali prisotnost pozitivne povratne zanke (74). Z naraščanjem izražanja gena za SAA lahko narašča tudi izločanje SAA iz celic. Izločen SAA lahko prispeva k

aktivaciji celic s SAA, kar lahko vodi v kronični ireverzibilni krog vnetja in aktivacijo endotelijskih celic ter s tem lahko pripomore k razvoju in pospeševanju ateroskleroze. Metotreksat je izražanje SAA zmanjšal kar za 44 %, kar pomembno vpliva k zmanjšanju vnetja (slika 11).

Številne klinične študije dokazujejo značilno zmanjšanje tveganja za nastanek srčno-žilnih bolezni s smrtnim izidom pri bolnikih z RA, ki se zdravijo z metotreksatom (pregled v 69). Njegova zgodnja uporaba upočasni potek bolezni, zniža pa tudi tveganje za kolateralno škodo, kot je nastanek ateroskleroze. Glede na dobljene rezultate metotreksat zniža produkcijo vseh mediatorjev, prisotnih pri vnetju oziroma kasneje, pri nastanku ateroskleroze. Deksametazon prav tako zniža večino vnetnih mediatorjev, vendar pa poveča koncentracijo PAI-1, kar je lahko tudi eden od razlogov za povečano pojavljanje trombotičnih zapletov pri bolnikih z RA, ki se zdravijo z večjimi dozami glukokortikoidov.

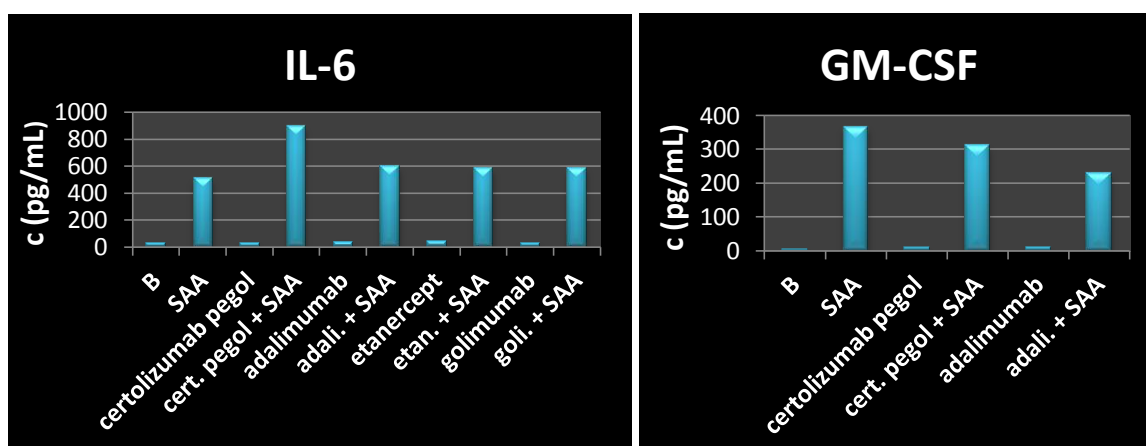
### **5.3.2 INHIBITORJI TNF- $\alpha$**

Pri zdravljenju RA se je za zelo učinkovito metodo izkazalo usmerjeno ciljanje posameznih citokinov s specifičnimi zdravili, na primer uporaba protiteles proti faktorju tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Blokada TNF- $\alpha$  zmanjša izražanje vnetnih molekul in kemotaktičnih citokinov na endoteliju in posledično zmanjša prehajanje vnetnih celic v sinovijsko tekočino vnetih sklepov (75). Inhibitorji TNF- $\alpha$  so se izkazali za veliko prednost pri zdravljenju RA, saj so številne študije pokazale, da močno ublažijo bolečino in pozitivno vplivajo na izboljšanje funkcije prizadetih sklepov. Vendar pa v literaturi še ni zadostnih podatkov o njihovem vplivu na srčno-žilne bolezni, predvsem ob dolgotrajni uporabi. Nekatere študije nakazujejo, da naj bi zmanjšali tveganje za nastanek srčno-žilnih bolezni že zaradi samega zaviranja TNF- $\alpha$ , ki ima dokazan pleiotropni učinek in učinkuje tudi na srčno-žilni sistem. Mogoče je tudi, da TNF- $\alpha$  inhibitorji stabilizirajo aterosklerotične lehe in preprečijo njihovo predrtje (76). TNF- $\alpha$  protitelesa lahko reagirajo tudi s Fc receptorji na celici in tudi z membransko vezanim TNF- $\alpha$ , ki prav tako lahko sproži aktivacijo celic.

Za naš poskus smo na začetku izbrali štiri najpogostejša biološka zdravila za zdravljenje RA in sicer Cimzio (certolizumab pegol), Humiro (adalimumab), Simponi (golimumab) in Embrel (etanercept). Koncentracija vseh štirih učinkovin na celicah je bila 100  $\mu$ M.

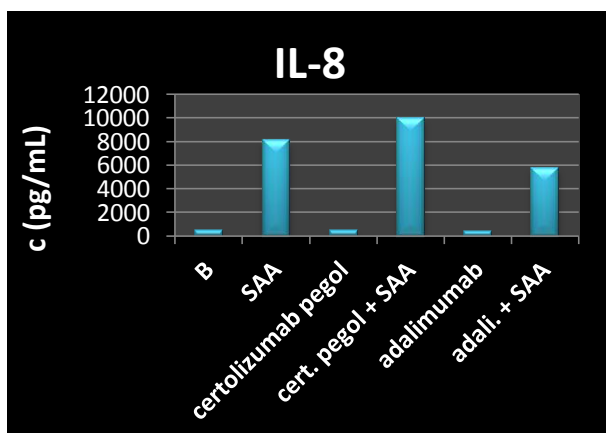


Izkazalo se je, da učinkovine, z izjemo certolizumab pegola, na produkcijo IL-6 vplivajo približno enako. V kombinaciji učinkovin s SAA smo opazili rahlo zvišanje njegove produkcije (približno 13 %), certolizumab pegol pa je njegovo produkcijo povečal za 43 % (slika 12). Izbrana biološka zdravila, z izjemo certolizumab pegola, na celičnem nivoju bistveno ne vplivajo na koncentracijo IL-6. Glede na rezultate, certolizumab pegol njegovo produkcijo celo poveča, s čimer vnetje še potencira in je zato morda bolj aterogene narave od ostalih učinkovin. Popa in sodelavci so ugotovili, da so se koncentracije IL-6 in CRP v serumu bolnikov, ki se zdravijo z adalimumabom signifikantno zmanjšale, izboljšal pa se jim je lipidni profil, zato so sklepali na pozitiven vpliv inhibitorjev TNF- $\alpha$  na srčno-žilne bolezni (77). Naši rezultati kažejo, da izbrana biološka zdravila preko produkcije IL-6 na endotelijske celice nimajo bistvenega vpliva.



Slika 12: Koncentracija IL-6 in GM-CSF v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ .

Glede na dobljene rezultate smo se odločili, da bomo za nadaljnje poskuse uporabljali le certolizumab pegol, ki je pri tem poskusu močno izstopal, ker pa je učinek ostalih učinkovin na produkcijo IL-6 tako podoben, smo si med njimi izbrali adalimumab, ostalih dveh učinkovin pa nismo več uporabljali. Za razliko od IL-6 sta učinkovini zmanjšali produkcijo drugega citokina - GM-CSF. Adalimumab je bil pri tem uspešnejši, saj jo je zmanjšal za 37 %, certolizumab pegol pa le za 15 % (slika 12). Ponovno se je izkazalo, da so učinki adalimumaba pri morebitnem vplivu na pojav srčno-žilnih bolezni ugodnejši, saj je njegovo znižanje danega vnetnega citokina več kot enkrat večje od certolizumab pegola, ki glede na rezultat preko zaviranja GM-CSF na aterosklerozo nima nobenega vpliva.



**Slika 13: Koncentracija IL-8 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ .**

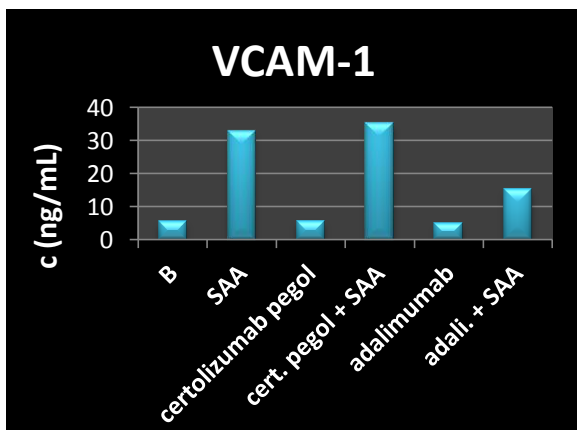
Opazna razlika med učinkovinama je nastala tudi pri vplivu na kemokin IL-8. Adalimumab je njegovo produkcijo zavrnil za slabih 30 %, medtem ko jo je certolizumab pegol povečal za slabih 20 % (slika 13). Ponovno se je izkazalo, da adalimumab na endotelijske celice vpliva protivnetno, certolizumab pegol pa, glede na rezultate, vnetje še spodbuja.

Učinkovini pa se razlikujeta tudi pri vplivu na produkcijo VCAM-1.

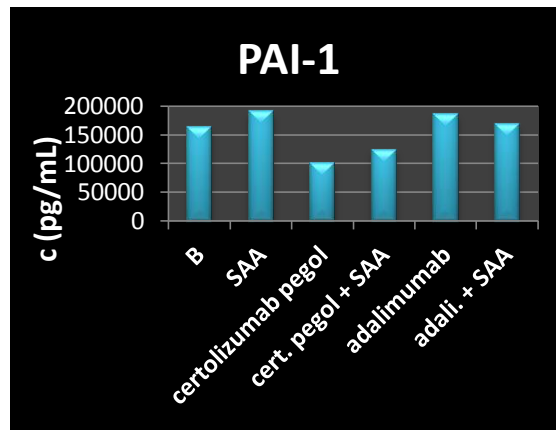
Adalimumab je njeno količino zmanjšal

kar za 55 %, medtem ko certolizumab pegol nanjo ni imel večjega učinka, oziroma jo je rahlo povečal in sicer za 6 % (slika 14). Adalimumab količino adhezivne molekule zmanjša za več kot polovico, kar na celičnem nivoju nedvomno lahko prispeva k zmanjšanju tveganja za nastanek ateroskleroze in srčno-žilnih bolezni. Uporaba certolizumab pegola se je iz tega vidika ponovno izkazala za manj ustrezno. V eni izmed študij je bilo dokazano, da inhibitorji TNF- $\alpha$  zmanjšajo koncentracijo adhezivnih molekul E selektin, VCAM-1 in ICAM-1 v serumu, vendar imajo najmanjši vpliv ravno na VCAM-1, zato bi bilo morda smiselno narediti dodaten poskus in preveriti vpliv zdravil na produkcijo preostalih dveh adhezivnih molekul (75).

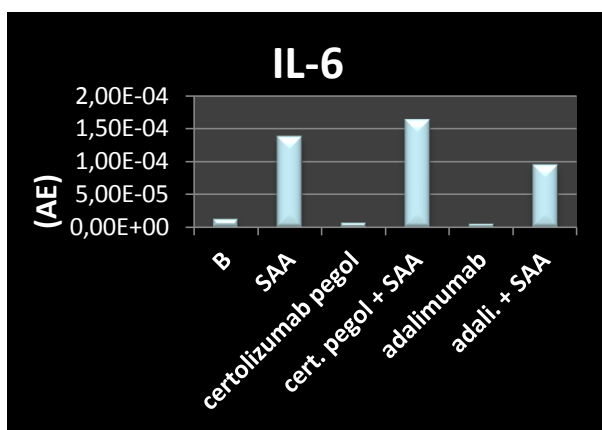
Pri vplivu na PAI-1 pa se je razmerje med učinkovinama obrnilo in se je za boljšo izbiro izkazal certolizumab pegol. V nestimuliranih celicah je njegovo produkcijo zmanjšal za kar 39 % in v SAA-stimuliranih za 35 %. Adalimumab je njegovo produkcijo povečal za 11 % v nestimuliranih celicah in zmanjšal za 12 % v stimuliranih, kar pomeni, da v celoti na PAI-1 ni imel večjega učinka (slika 15). Glede na dobljene rezultate imajo bolniki, ki se zdravijo s certolizumab pegolom (na celičnem nivoju) verjetno manjše tveganje za nastanek trombotičnih zapletov, v primerjavi s tistimi, ki dobivajo adalimumab, ki na tveganje nima bistvenega vpliva.



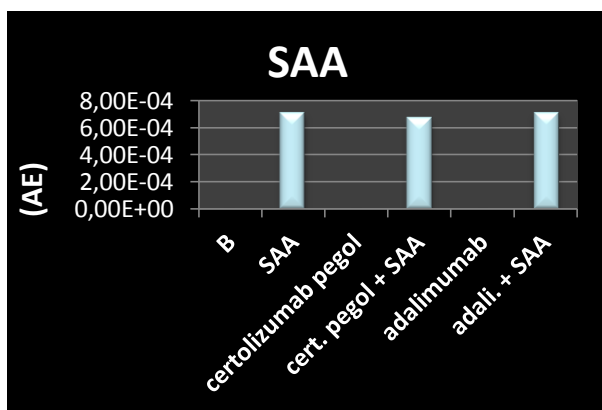
Slika 14: Koncentracija sVCAM-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ .



Slika 15: Koncentracija PAI-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ .



Slika 16: Izražanje genov za IL-6 po 24 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ . AE – arbitrarne enote



Slika 17: Izražanje genov za SAA po 24 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku inhibitorjev TNF- $\alpha$ . AE – arbitrarne enote

Pogledali smo tudi vpliv učinkovin na izražanje gena za IL-6. Izvedli smo qPCR analizo in ugotovili, da certolizumab pegol po 24 urah poveča ekspresijo gena za 16 %, adalimumab pa jo za 30 % zmanjša (slika 16). Dobljeni rezultati se za certolizumab pegol skladajo z rezultati, ki smo jih dobili pri metodi ELISA, saj je tam močno povečal koncentracijo IL-6. Kot kaže, pa se ekspresija gena za IL-6 ob dodatku adalimumaba po 24 urah že zmanjša in je glede na koncentracijo IL-6 v supernatantu očitno večja v prvih urah po aplikaciji, nato pa za razliko od certolizumab pegola upade in produkcija citokina se zmanjša.

Zanimivo pa je, da nobena od učinkovin ni vplivala na ekspresijo SAA ob stimulaciji HCAEC s SAA, kar je iz vidika zmanjšanja vnetja nedvomno slabost (slika 17).

Glede na dobljene rezultate o vplivu izbranih bioloških zdravil na morebitni pojav ateroskleroze, se je za boljšo izbiro izkazalo zdravilo z učinkovino adalimumab, ki je znižalo večino vnetnih molekul, vendar je bilo pri tem manj uspešno kot večina drugih uporabljenih učinkovin. Dopustiti pa je potrebno tudi možnost, da je vsaj do nekaterih razlik med učinkovinama prišlo tudi zaradi vpliva pomožnih snovi v zdravilu, s katerim smo poskus dejansko izvedli.

Veliko raziskav predvideva, da naj bi imeli inhibitorji TNF- $\alpha$  na pojav srčno-žilnih bolezni pozitiven učinek, vendar še vedno ni znano, kaj je glavni razlog za to. Za certolizumab pegol se je pri našem poskusu izkazalo, da vnetje na celičnem nivoju in posledično aterosklerozo lahko celo pospešuje, vendar pozitivno vpliva na produkcijo PAI-1.

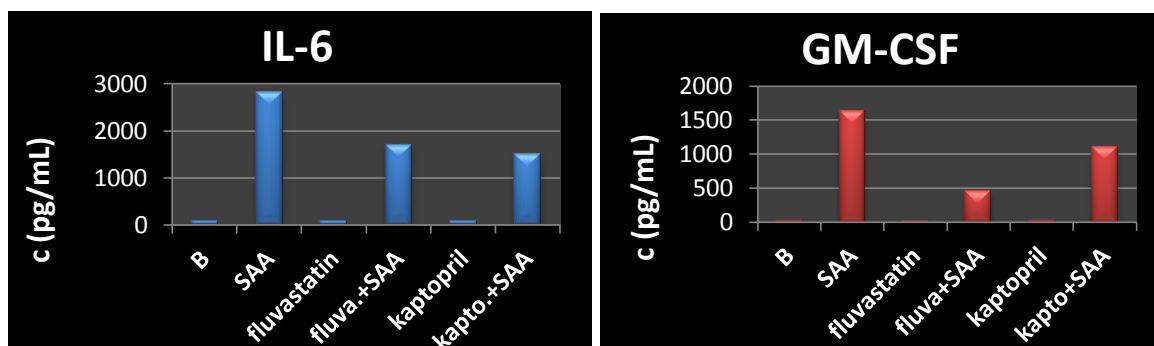
### **5.3.3 ZDRAVILA ZA ZNIŽANJE HOLESTEROLA IN KRVNEGA TLAKA (FLUVASTATIN IN KAPTOPRIL)**

Fluvastatin in kaptopril primarno nista protivnetni učinkovini, vendar pa je vedno več dokazov, da imata oba tudi protivnetne učinke (39) (50). Fluvastatin je inhibitor HMG-CoA reduktaze in s tem znižuje koncentracijo holesterola v krvi. Dokazano zmanjšuje pogostost pojavljanja srčno-žilnih bolezni in z njimi povezano smrtnost (78). Vedno več je tudi podatkov, da je zelo učinkovito protivnetno zdravilo, saj med drugim zmanjša sproščanje vnetnih citokinov in povzroči nitrozilacijo COX-2 (ki zato - podobno kot po acetilaciji z acetilsalicilno kislino) proizvaja epi-lipoxin (39). McCarey in sodelavci so ugotovili, da bi statini lahko bili potencialno učinkoviti pri zdravljenju RA, saj se je aktivnost bolezni ob njihovi uporabi zmanjšala (79).

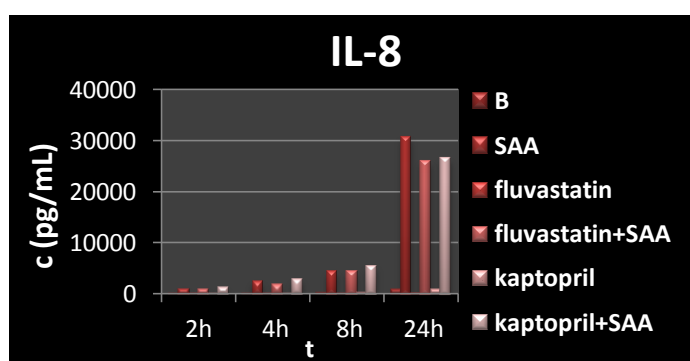
Kaptopril je inhibitor encima angiotenzin konvertaze (ACE) in spada v prvo skupino inhibitorjev ACE. Vsebuje tiolno skupino, ki je naslednje generacije ne vsebujejo več, zato ima več antioksidantnih lastnosti. Njegova molekulska formula je podobna formuli D-penicilamina, zato naj bi izboljšal simptome RA, česar pri ostalih ACE inhibitorjih ni opaziti (80). Kaptopril se v osnovi uporablja za zniževanje krvnega pritiska, s čimer direktno vpliva na aterogenezo. Protivnetne učinke kaptoprila gre pripisati njegovemu zaviranju aktivacije NF- $\kappa$ B, o njegovem vplivu na sproščanje molekul, povezanih z vnetjem pri HCAEC pa nismo zasledili nobenih podatkov. Ker obe zdravili prejema veliko bolnikov, smo se odločili preveriti njun potencialen vpliv na zaviranje vnetja in

posledičnega nastanka ateroskleroze. Koncentracija na celicah je bila pri obeh učinkovinah 10  $\mu$ M.

Učinkovini močno vplivata na produkcijo citokinov v stimuliranih celicah HCAEC. Njun učinek na IL-6 je podoben, saj fluvastatin njegovo koncentracijo zmanjša za 39 %, kaptopril pa za 46 %. Znižanje GM-CSF je pri fluvastatinu še opaznejše, saj njegovo produkcijo zniža za kar 72 %, kaptopril pa za 32 % (slika 18). Zanimivo je, da nobena od učinkovin primarno ni namenjena zdravljenju vnetja, vendar sta pri zmanjšanju citokinskega odziva na vnetni dražljaj, v našem primeru SAA-stimulirane HCAEC uspešnejši kot učinkovine, ki so temu v osnovi namenjene, kot so metotreksat, deksametazon in inhibitorji TNF- $\alpha$ .



Slika 18: Koncentracija IL-6 in GM-CSF v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku fluvastatina in kaptoprila.



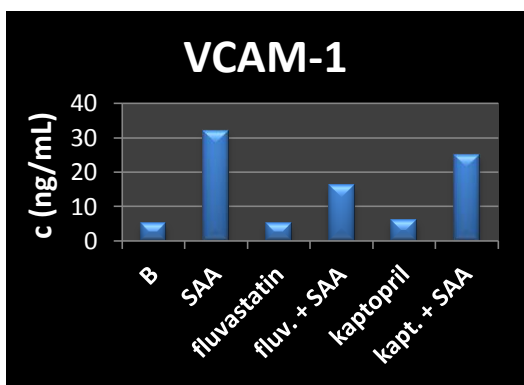
Slika 19: Koncentracija IL-8 v supernatantu v odvisnosti od časa pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku fluvastatina in kaptoprila. (čas – t)

samo produkcijo IL-8 nimata večjega vpliva, saj jo zmanjšata zgolj za nekaj več kot 10 %, kar je iz rezultatov lepo razvidno v vseh časovnih obdobjih. Medtem ko obstaja veliko

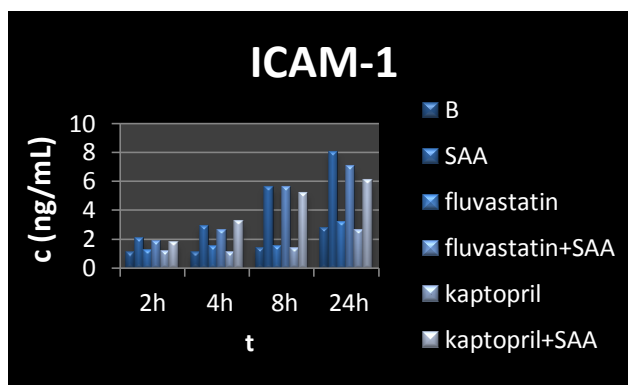
Pri ugotavljanju njenega vpliva na izločanje kemokina smo se odločili, da bomo preverili tudi časovno odvisnost njegovega nastajanja v celicah. Iz rezultatov je razvidno, da celice potrebujejo nekaj ur za produkcijo IL-8 (slika 19), saj je njegova količina opazno večja šele po 24 urah. Vendar pa učinkovini na

podatkov o tem, da fluvastatin znižuje izražanje in koncentracijo IL-6 tako v cirkulaciji, kot v HUVEC, podatkov o njegovem vplivu na IL-8 nismo zasledili.

Pri vplivu na adhezijsko molekulo VCAM-1 sta se učinkovini močno razlikovali. Fluvastatin je njeno produkcijo zmanjšal kar za 50 %, kaptopril pa le za 22 % (slika 20). Rezultati so v skladu s številnimi študijami, ki dokazujejo, da fluvastatin zmanjša izražanje adhezivnih molekul VCAM-1 in ICAM-1, v HUVEC, inducira pa tudi eNOS, kar močno izboljša funkcijo endotelija in zmanjša vnetje (39). Ker je zmanjšanje koncentracije VCAM-1 zelo izrazito, lahko sklepamo, da fluvastatin preko tega mehanizma vpliva na zmanjšanje možnosti za nastanek ateroskleroze. Kaptopril na produkcijo adhezivnih molekul nima takšnega vpliva.

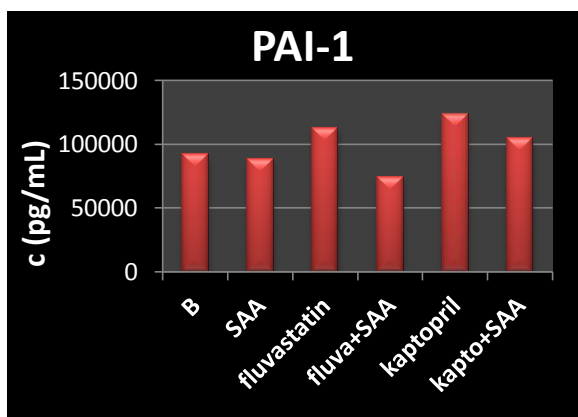


**Slika 20:** Koncentracija sVCAM-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku fluvastatina in kaptoprila.



**Slika 21:** Koncentracija sICAM-1 v supernatantu v odvisnosti od časa pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku fluvastatina in kaptoprila. (čas – t)

Pri zaviranju izločanja druge adhezivne molekule, ICAM-1 fluvastatin ni bil tako učinkovit, kot pri VCAM-1. Znižal jo je zgolj za 13 %, kaptopril pa je imel na njo podoben vpliv, kot na VCAM-1, saj je njeno produkcijo v stimuliranih celicah znižal za 25 % (slika 21). Je pa iz rezultatov razvidno, da celice ICAM-1 začnejo proizvajati bistveno prej, kot IL-8, saj je po 8 urah stimulacije celic s SAA koncentracija ICAM-1 v supernatantu že dokaj velika. V predhodnem poskusu smo ugotovili, da HCAEC gene za VCAM-1 izražajo zgolj štiri ure po stimulaciji s SAA, nato pa se izražanje ustavi (slika 4-2). Morda bi bilo smiselno preveriti tudi izražanje mRNA ICAM-1.



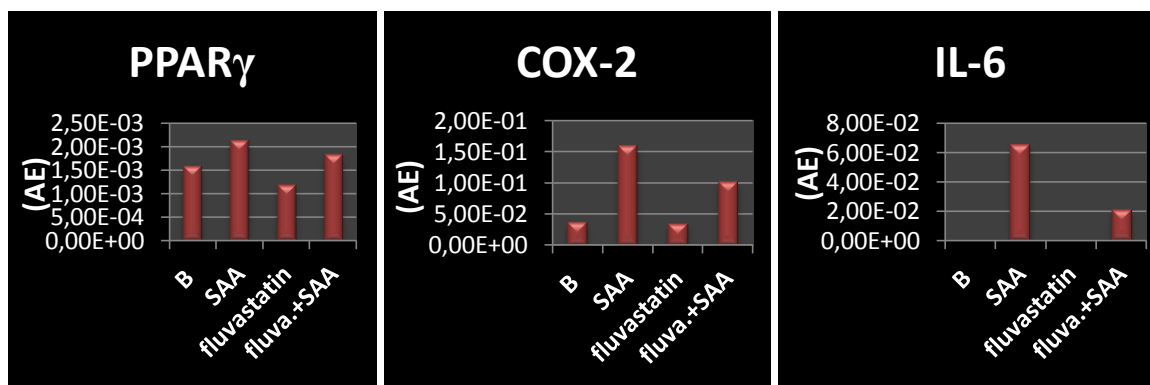
Slika 22: Koncentracija PAI-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM) ob dodatku fluvastatina in kaptoprila.

PAI-1 je v naši študiji kontrolna molekula, saj SAA v HCAEC nanj nima nikakršnega vpliva. Sami učinkovini (brez dodatne stimulacije) njegovo izločanje v supernatant HCAEC rahlo zvišata. Fluvastatin njegovo produkcijo poveča za 19 %, v kombinaciji s SAA pa jo zmanjša za 15 % (slika 22).

Kaptopril njegovo produkcijo sam poveča za 26 % in v kombinaciji s SAA za 16 %. Kaptopril na produkcijo PAI-1

deluje podobno kot deksametazon. Sicer naj bi statini inducirali trombomodulin in koncentracijo tPA v HUVEC, ter zmanjšali koncentracijo TF, s čimer pozitivno vplivajo na koagulabilnost krvi (39). Kaptopril naj bi v gladkih mišičnih celicah zavrl aktivnost PAI-1, vendar v našem primeru njegovo izločanje v HCAEC rahlo poviša (81).

Preverili smo tudi izražanje nekaterih genov ob dodatku obeh učinkovin (slika 23). Poskus je trajal dve uri, saj smo ugotovili, da je izražanje COX-2 takrat največje.

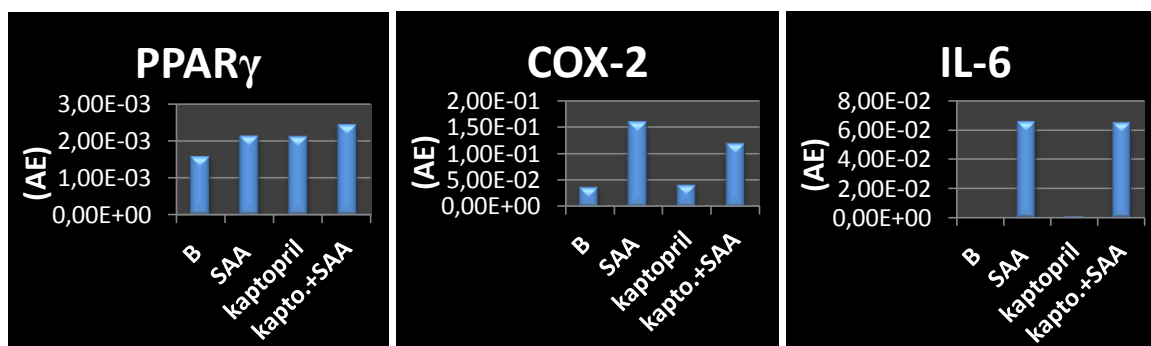


Slika 23: Izražanje genov za PPAR- $\gamma$ , COX-2 in IL-6 po 2 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku fluvastatina. AE – arbitrarne enote

Fluvastatin je njegovo izražanje znižal za 36 %, kar je skladno s podatki iz literature, dobljenimi pri HUVEC (43). Verjetno je, da so protivnetni učinki fluvastatina v HCAEC v večji meri odvisni od njegovega vpliva na COX-2. Izražanje mRNA PPAR $\gamma$  je fluvastatin rahlo znižal tako v nestimuliranih, kot v stimuliranih HCAEC. V literaturi najdemo podatke, da naj bi fluvastatin povečal aktivacijo PPAR $\gamma$  v makrofagih, vendar je njegov

učinek na HCAEC očitno drugačen (42). Je pa fluvastatin močno (kar za 68 %) znižal izražanje mRNA IL-6. Glede na to, da smo z metodo ELISA ugotovili, da je koncentracija samega proteina na koncu manjša za približno 40 %, je fluvastatin očitno najbolj učinkovit v prvih urah po aplikaciji, nato pa njegov učinek pada.

Učinki kaptoprila na izražanje genov po dveh urah še niso bili tako izraženi (slika 24).



Slika 24: Izražanje genov za PPAR- $\gamma$ , COX-2 in IL-6 po 2h v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku kaptoprila. AE – arbitrarne enote

Za razliko od fluvastatina je blago povečal izražanje PPAR $\gamma$ , izražanje COX-2 pa je zmanjšal za 26 %. Na izražanje IL-6 kaptopril po dveh urah ni imel nobenega učinka, ker pa je koncentracijo izločenega proteina vseeno občutno zmanjšal, njegovi učinki na proteinskem nivoju očitno nastopijo kasneje.

Glede na rezultate imata obe učinkovini pomembne protivnetne učinke. Obe občutno znižata produkcijo vnetnih citokinov in s tem zmanjšata možnost za nastanek srčno-žilnih bolezni. Fluvastatin na to vpliva tudi z zmanjšanjem ekspresije COX-2 in se glede na naše rezultate lahko primerja s protivnetnimi zdravili.

### 5.3.4 NSAR (DIKLOFENAK, MELOKSIKAM IN ETORIKOKSIB)

V to skupino spadajo zdravila, ki na vnetje učinkujejo preko zaviranja encima ciklooksigenaze. So izjemno pogosto uporabljena zdravila, saj imajo protivnetno in protibolečinsko delovanje. Bolniki s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi so pogosto na doživljenjski terapiji z zdravili iz te skupine. Nesteroidne antirevmatike (NSAR) razdelimo v dve skupini. V prvo skupino spadajo neselektivni inhibitorji ciklooksigenaze (inhibitorji COX), kamor spadata tudi diklofenak in meloksikam. Ti zavirajo tako COX-1, kot COX 2, kar ima številne negativne posledice, kot so poškodbe gastrointestinalnega (GIT) trakta. Da

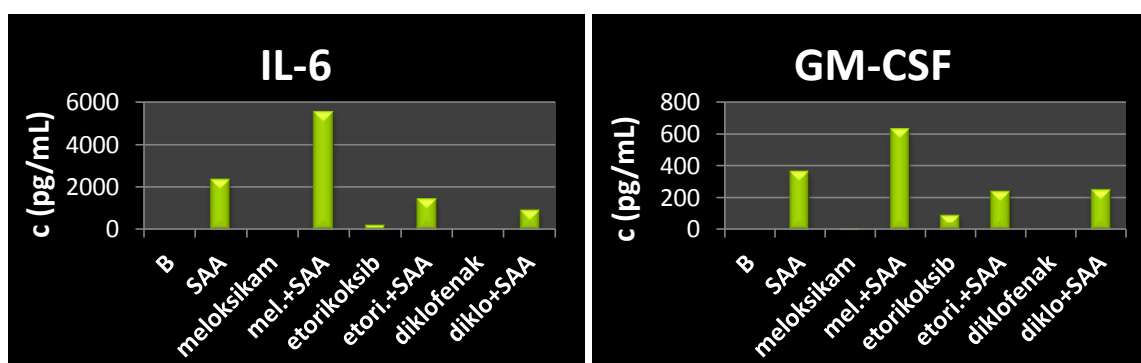


bi omilili neželene učinke neselektivnih COX inhibitorjev so razvili selektivne COX-2 inhibitorje, koksibe. Pri njihovi uporabi se je vpliv na GIT sicer zmanjšal, vendar pa so številne klinične raziskave pokazale povečano tveganje za nastanek srčno-žilnih dogodkov. Nekatera zdravila iz te skupine so bila zaradi tega razloga celo umaknjena iz prometa.

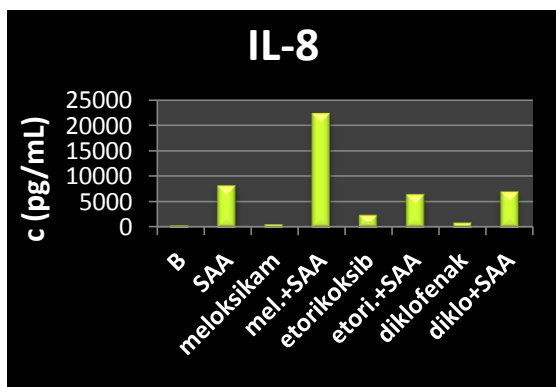
Koncentracija COX-2 se v telesu drastično poveča v odgovor na vnetne mediatorje. Proizvajati prične prostaglandine, levkotriene in tromboksane, mediatorje, ki so vpleteni v nastanek vnetja in bolečine (60). COX-2 je odgovorna tudi za sintezo 15d-PGJ<sub>2</sub>, ki je endogeni ligand PPAR $\gamma$  in zavira aktivnost vnetnih transkripcijskih faktorjev. Pri našem poskusu smo se osredotočili na tri različna, za zdravljenje RA pogosto uporabljena zdravila iz skupine NSAR. Vsa tri imajo večjo afiniteto do COX-2, vendar je selektivni COX-2 inhibitor le etorikoksib. Koncentracija diklofenaka na celicah je znašala 10  $\mu$ M, etorikoksiba in meloksikama pa 100  $\mu$ M.

Rezultati, ki smo jih dobili, so bili izjemno zanimivi. Meloksikam je skoraj v vseh primerih deloval popolnoma nasprotno od ostalih dveh učinkovin. Rezultati so bili konstantni, čeprav so bile analize narejene v različnih časovnih obdobjih, pri različnih serijah celic in zdravila.

Meloksikam je v nasprotju s pričakovanjem močno povečal izražanje vnetnih citokinov. Produkcija IL-6 je narasla za 230 %, GM-CSF pa za 170 %. Ostali dve učinkovini sta delovali tako, kot smo predvidevali, in produkcijo IL-6 zmanjšali, etorikoksib za 38 %, diklofenak pa kar za 60%. Obe sta tudi zmanjšali produkcijo GM-CSF in sicer za približno 30 % (slika 25). Pri zmanjševanju citokinskega odziva sta bili učinkovini približno tako učinkoviti, kot deksametazon in metotreksat.



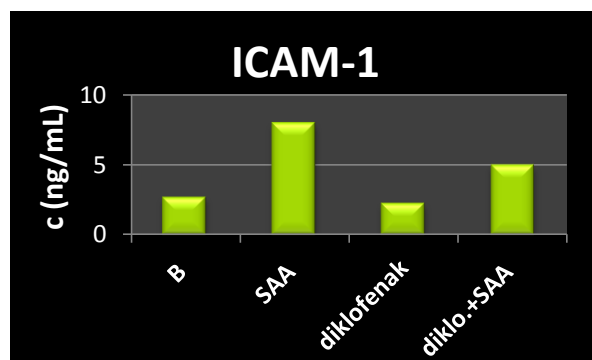
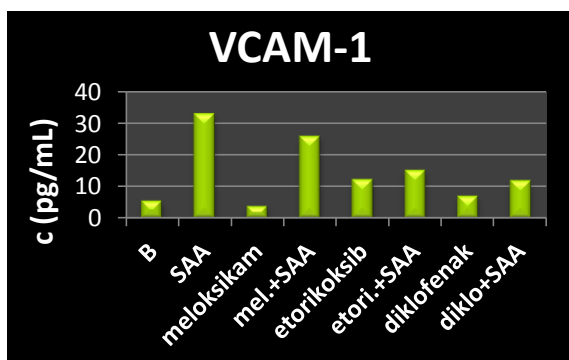
Slika 25: Koncentracija IL-6 in GM-CSF v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov.



Slika 26: Koncentracija IL-8 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov.

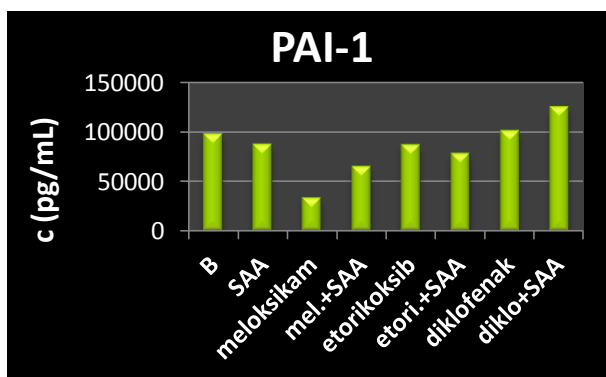
Meloksikam je enako kot na citokine deloval na IL-8 in njegovo produkcijo povečal za 270 %. Etorikoksib je njegovo koncentracijo zmanjšal za 21%, diklofenak pa za 18% (slika 26), kar je prav tako primerljivo z učinkom metotreksata in deksametazona. Ponovno pa smo ugotovili, da učinkovine veliko bolj vplivajo na produkcijo citokinov v primerjavi s kemokini, tako kot večina proučevanih učinkovin.

Učinkovine, z izjemo meloksikama, so močno znižale koncentracijo VCAM-1. Etorikoksib jo je znižal za 55 %, diklofenak pa za 63 %. Meloksikam je bil pri tem manj uspešen in je njeno produkcijo zmanjšal za 21 % (slika 27). Se je pa tako, kot pri fluvastatinu ponovno izkazalo, da ima diklofenak, ki je močno znižal VCAM-1, na ICAM-1 manjši vpliv in je njeno produkcijo znižal za 38 % (slika 27). Naši rezultati so potrdili rezultate iz literature na drugem tipu endotelijskih celic, kjer je diklofenak znižal ekspresijo vseh adhezijskih molekul (61). Podatkov o njihovem vplivu na HCAEC do sedaj v literaturi nismo našli.



Slika 27: Koncentracija sVCAM-1 in sICAM-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov.

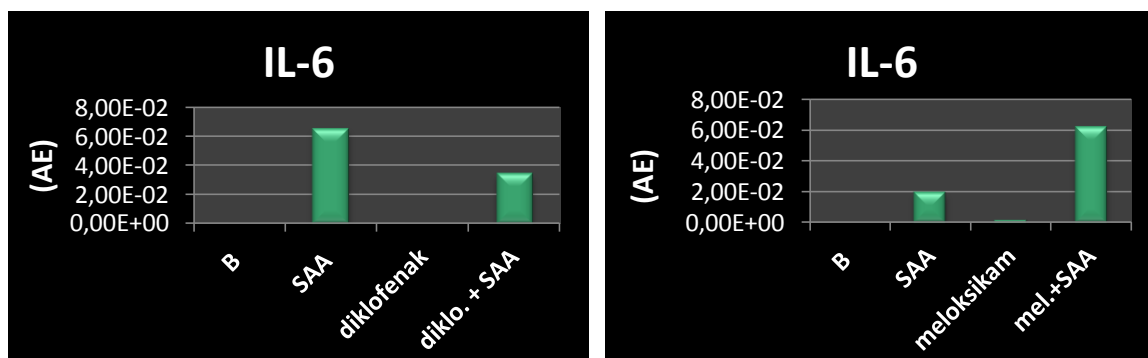
Zelo zanimivi so bili učinki NSAR na produkcijo PAI-1. Meloksikam je izločanje proteina iz HCAEC močno znižal, sam za kar 65 % in v kombinaciji s SAA za 25%. Etorikoksib je koncentracijo v kombinaciji s SAA znižal za 10 %, diklofenak pa jo je povečal za 30 % (slika 28). Meloksikam je iz tega vidika izjemno ugodno zdravilo, saj zmanjša možnost



Slika 28 : Koncentracija PAI-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov.

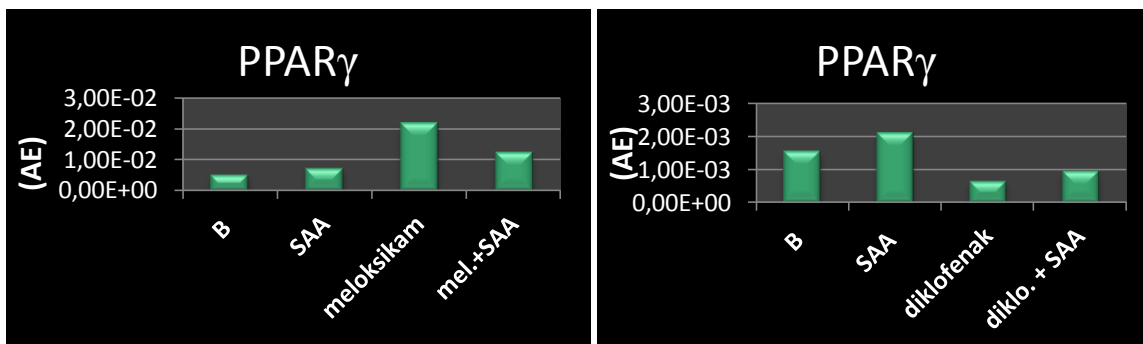
trombotičnih zapletov. Koksibi, pri katerih je veliko raziskav poročalo o povečanju tveganja za nastanek SŽ dogodkov, na njihov nastanek očitno ne vplivajo preko delovanja na PAI-1, saj nanj v HCAEC nimajo bistvenega vpliva. Diklofenak pa produkcijo PAI-1 občutno poveča, kar bi lahko bil razlog za njegov vpliv na povečanje tveganja za nastanek MI (60).

Tudi na nivoju izražanja genov smo potrdili nasproten trend delovanja meloksikama, saj je po dveh urah prav tako pospešil ekspresijo IL-6 in sicer za trikrat, kar je v skladu z rezultati, dobljenimi pri metodi ELISA. Diklofenak po dveh urah zmanjša ekspresijo IL-6 za 47 % (slika 29). Meloksikam v nasprotju s predvidevanji resnično močno poveča produkcijo vnetnih citokinov in s tem pospešuje vnetje.



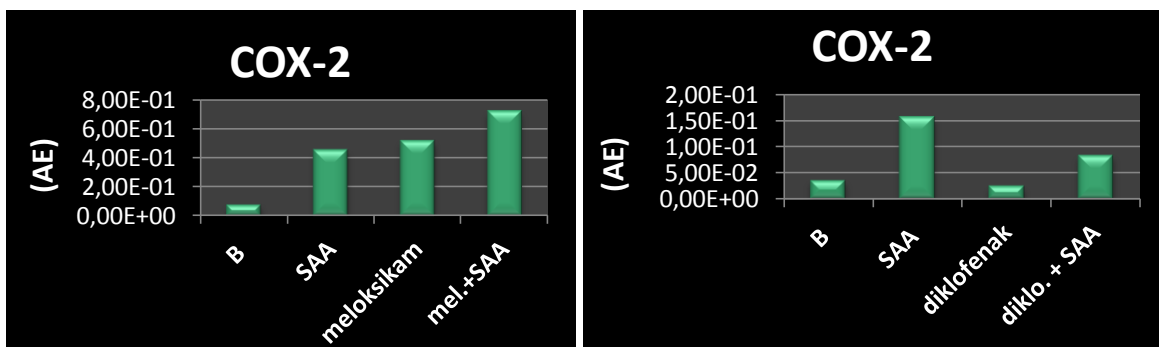
Slika 29: Izražanje gena za IL-6 po 2 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov. AE – arbitrarne enote

Ekspresijo PPAR $\gamma$  je diklofenak močno zmanjšal (za 54 %), meloksikam pa povečal (slika 30), v nestimuliranih celicah kar za štirikrat, kar je možen razlog njegovega protivnetnega delovanja, ki ga kljub našim rezultatom očitno ima, saj je pri nas zelo pogosto predpisano zdravilo za zdravljenje revmatskih obolenj. Smo pa v literaturi zasledili študije, ki nakazujejo, da diklofenak izniči agonistične učinke antidiabetika rosiglitazona ob vezavi na PPAR $\gamma$  in deluje kot kompetitivni antagonist, s čimer kontradiktorno poveča intenzivnost vnetja (60). Naši rezultati lahko ponudijo razlago za te ugotovitve (slika 30).

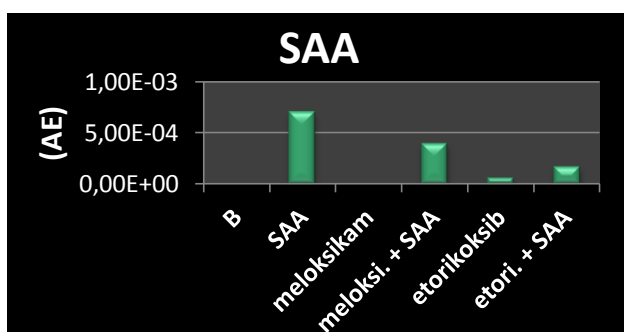


Slika 30: Izražanje gena za PPAR $\gamma$  po 2 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov. AE – arbitrarne enote

Tudi na izražanje samega encima COX-2 učinkovini delujeta nasprotno. Meloksikam v kombinaciji s SAA le to poveča za 37 %, v nestimuliranih celicah pa kar za 85 %. Diklofenak izražanje za 53 % zmanjša (slika 31). S tem diklofenak, deluje na zmanjšanje vnetja tudi preko zmanjšanja ekspresije in produkcije encima COX-2, kar je njegov osnovni namen, medtem ko meloksikam glede na naše podatke po dveh urah ekspresijo COX-2 še poveča in s tem svojemu osnovnemu namenu nasprotuje na celičnem modelu HCAEC (slika 31).



Slika 31: Izražanje gena za COX-2 po 2 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov. AE – arbitrarne enote



Slika 32: Izražanje gena za SAA po 24 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku nesteroidnih antirevmatikov. AE – arbitrarne enote)

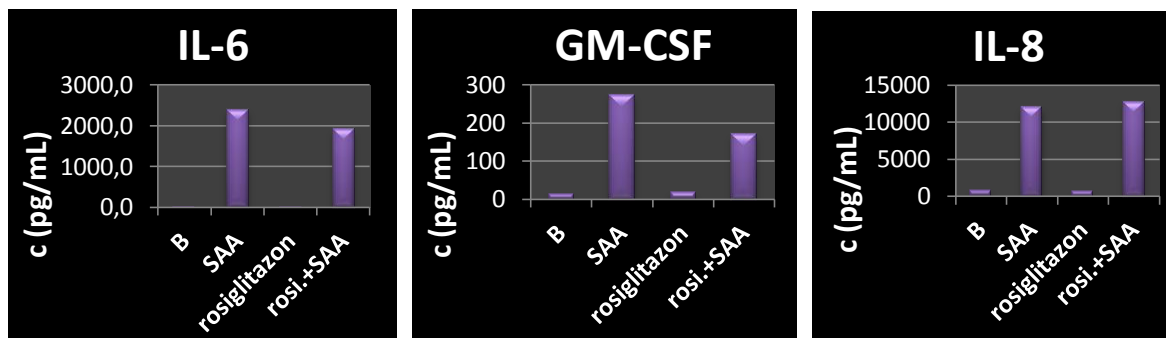
Sta pa etorikoksib in meloksikam po 24 urah zavrla ekspresijo SAA ob stimulaciji s SAA, etorikoksib kar za 75 %, kar pomeni, da je pri tem najučinkovitejši od vseh proučevanih zdravil, meloksikam pa za 44 %. To seveda pri obeh zdravilih pripomore k zmanjšanju vnetja (slika 32).

Iz rezultatov lahko sklepamo, da sta diklofenak in etorikoksib učinkovini, ki vnetje zavirata preko zmanjšanja izražanja številnih vnetnih mediatorjev. So pa skrb vzbujajoči rezultati o vplivu meloksikama na vnetje v HCAEC, saj ga glede na naše rezultate močno pospešuje tako na mRNA, kot na proteinskem nivoju. Vendar pa ima za razliko od ostalih dveh učinkovin veliko prednost v tem, da zmanjša koncentracijo PAI-1 in poveča ekspresijo PPAR $\gamma$ . Iz rezultatov je tudi razvidno, da zdravila, čeprav spadajo v isto skupino nesteroidnih antirevmatikov vnetje očitno zmanjšujejo preko različnih mehanizmov, saj na HCAEC ne delujejo enako.

### 5.3.5 ANTIDIABETIKI (ROSIGLITAZON)

Veliko študij se v zadnjih letih posveča proučevanju transkripcijskega faktorja PPAR $\gamma$  in njegovim učinkom, saj je bilo ugotovljeno, da igra izjemno pomembno vlogo pri vnetnem odzivu. PPAR $\gamma$  zavre ekspresijo nekaterih vnetnih citokinov in diferenciacijo imunskih celic usmeri v protivnetne fenotipe. Vedno več je tudi študij, ki proučuje vpliv PPAR $\gamma$  na pojav srčno-žilnih bolezni, posebej na aterosklerozo. Ugotovljeno je bilo, da je ekspresija PPAR $\gamma$  med formacijo aterosklerotične lehe močno povečana. *In vitro* študije dokazujejo, da imajo PPAR $\gamma$  in njegovi agonisti ateroprotektivno vlogo preko vpliva na vnetje, proliferacijo in lipidni metabolizem v makrofagih, endotelijskih celicah in GMC. Tiazolidindioni (TZD), v osnovi antidiabetične učinkovine, ki izboljšujejo občutljivost perifernih tkiv na inzulin, kamor spada tudi rosiglitazon, so sintetični ligandi PPAR $\gamma$ . Eden izmed njegovih naravnih ligandov je 15-deoksi- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), ki smo ga prav tako uporabili pri poskusu. PPAR $\gamma$  uravnavajo številne mehanizme celične signalizacije, ki so povezani s SŽ dogodki, vendar pa so rezultati kliničnih študij o vplivu TZD na aterosklerozo kljub pozitivnim rezultatom pri poskusih *in vitro* še vedno nasprotujoči in nedokončni (82).

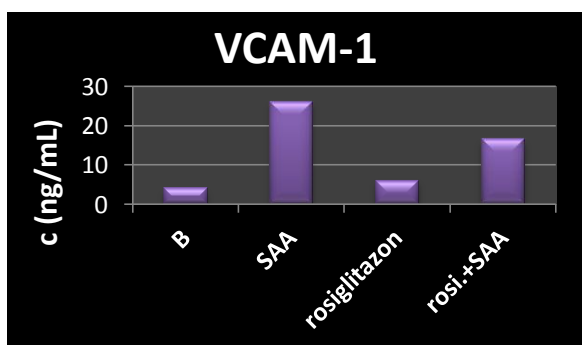
Rosiglitazon, katerega koncentracija na celicah je bila 30  $\mu$ M, je v SAA stimuliranih celicah znižal produkcijo IL-6 za 20 % in GM-CSF za 37 % (slika 33).



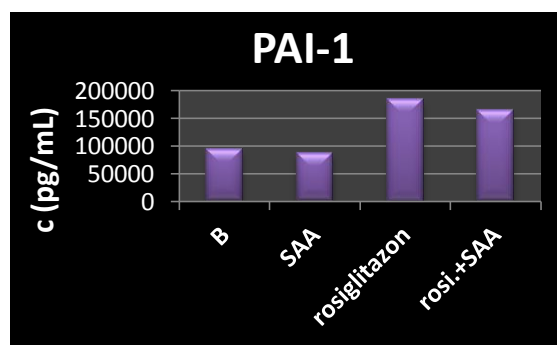
Slika 33: Koncentracija IL-6, GM-CSF in IL-8 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku rosiglitazona.

V monocitih PPAR $\gamma$  oziroma njegovi agonisti zmanjšajo ekspresijo genov za IL-6, TNF- $\alpha$  in IL-1 $\beta$ , vendar pa pri HCAEC znižanje IL-6 ni bilo zelo opazno (2). Je pa rosiglitazon znatno znižal produkcijo drugega vnetnega citokina, GM-CSF, kar nedvomno pripomore k zmanjšanju vnetja. Na produkcijo IL-8 rosiglitazon ni imel nikakršnega vpliva (slika 33). Glede na ta rezultat lahko sklepamo, da protivnetni učinki PPAR $\gamma$  agonistov v endotelijskih celicah niso povezani z vplivom na sproščanje kemokinov.

Rosiglitazon je znižal količino VCAM-1 v supernatantu s SAA stimuliranih HCAEC za 35 % (slika 34). Rezultate lahko vsaj delno pripišemo tudi temu, da aktiviran PPAR $\gamma$  v endotelijskih celicah zmanjša ekspresijo genov za AP-1 in NF- $\kappa$ B (82).



Slika 34: Koncentracija sVCAM-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku rosiglitazona.



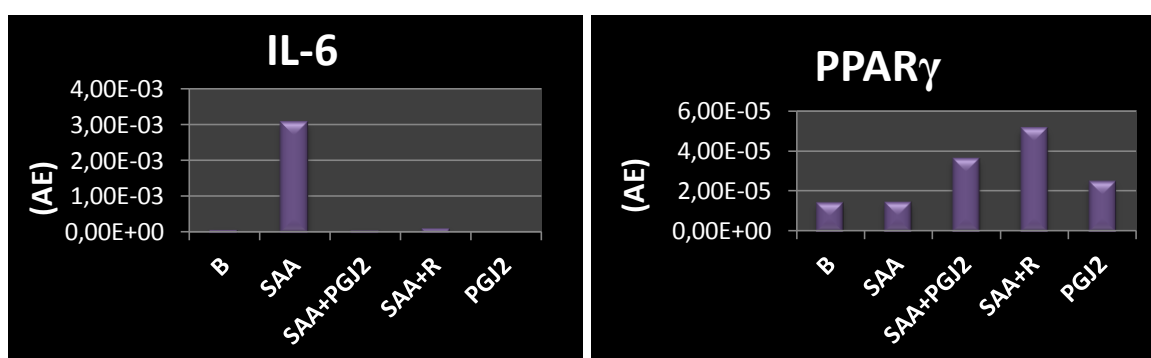
Slika 35: Koncentracija PAI-1 v supernatantu po 24 urah pri nestimuliranih celicah (B) in po stimulaciji HCAEC s SAA (1000 nM), ob dodatku rosiglitazona.

Rosiglitazon pa je močno, kar za 46 %, povečal produkcijo PAI-1 (slika 35), kar znatno poveča tveganje za nastanek MI in tromboze. Po vpogledu v literaturo smo ugotovili, da so PPAR- $\gamma$  agonisti dokazano povečali produkcijo PAI-1 v HUVEC, kar bi lahko bil eden izmed razlogov povečanega tveganja za nastanek MI in smrti zaradi srčno-žilnih

dogodkov, ki jih povezujejo z uporabo rosiglitazona (82). Evropska agencija za zdravila (EMA) je leta 2010 izdala zahtevo za suspenz dovoljenja za promet z zdravili za antidiabetike, ki vsebujejo rosiglitazon. Izvedene so bile dodatne klinične študije o srčno-žilni varnosti teh zdravil, ki so bila nato dokončno umaknjena iz prodaje (83).

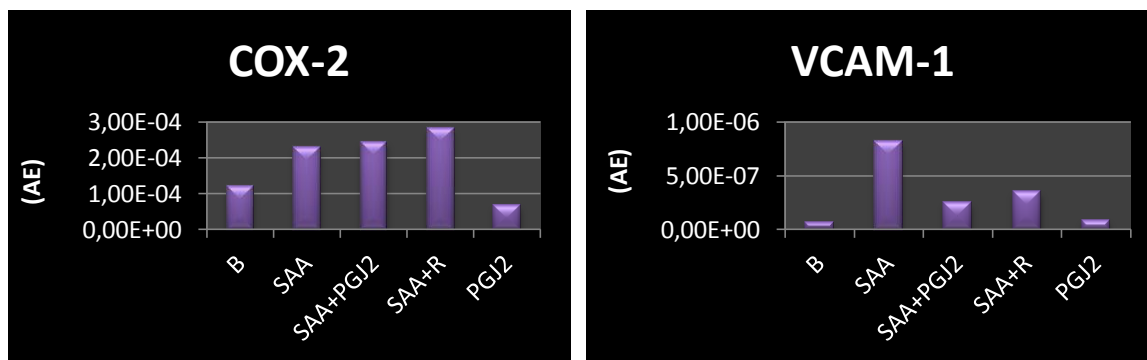
Na nivoju izražanja genov smo pri poskusu, ki smo ga izvedli, dobili zelo zanimive rezultate. Poskus smo izvedli tako, da smo 18 ur pred dodatkom rosiglitazona ( $30 \mu\text{M}$ ) ali  $15\text{d-PGJ}_2$  ( $3\mu\text{M}$ ), na celice aplicirali SAA ter ju na celicah nato skupaj pustili še dve uri, nato pa smo poskus končali. Rezultat, ki nas je najbolj presenetil, je bila skoraj popolna redukcija izražanja gena za IL-6 tako ob dodatku rosiglitazona, kot  $15\text{d-PGJ}_2$  (slika 36). Iz rezultata lahko sklepamo, da v prvih dveh urah po aktivaciji  $\text{PPAR}\gamma$  v endotelijskih celicah delujejo učinkoviti mehanizmi, ki zavrejo ekspresijo IL-6, ki pa kasneje izzvenijo, saj znižanje koncentracije IL-6 v supernatantu HCAEC ni občutno manjše. Vsekakor bi bilo smiselno izvesti še nadaljnje poskuse, s katerimi bi poskusili raziskati mehanizme, ki vplivajo na to ekspresijo.

Na ekspresijo gena za  $\text{PPAR}\gamma$  sam SAA ni imel učinka (slika 36). Se je pa njegova ekspresija  $3,5 \times$  povečala ob dodatku rosiglitazona, nekaj manj pa ob dodatku  $15\text{d-PGJ}_2$ . Pokazali smo, da TZD in endogeni ligandi  $\text{PPAR}\gamma$  v endotelijskih celicah dejansko zvišajo njegovo ekspresijo, medtem ko SAA sam na njo ne vpliva bistveno.



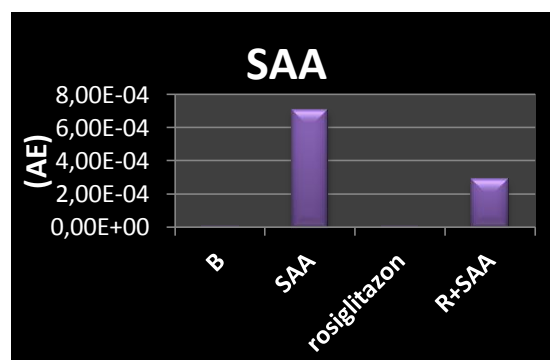
Slika 36: Izražanje gena za IL-6 in  $\text{PPAR}\gamma$  v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku  $\text{PPAR}\gamma$  agonistov. (R - rosiglitazon;  $\text{PGJ}_2$  - 15-deoksi- $\Delta 12,14$ -prostaglandin  $\text{J}_2$ ) AE – arbitrarne enote

Oba  $\text{PPAR}\gamma$  agonista sta močno znižala ekspresijo genov za VCAM-1,  $15\text{d-PGJ}_2$  kar za trikrat, vendar oba rahlo povečata ekspresijo COX-2, ki sta jo denimo fluvastatin in kaptopril zavrla (slika 37).



Slika 37: Izražanje genov za COX-2 in VCAM-1 v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku PPAR $\gamma$  agonistov. (R - rosiglitazon; PGI $_2$  - 15-deoksi- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J $_2$ ) AE – arbitrarne enote

Je pa rosiglitazon kar za 59 % znižal ekspresijo SAA ob stimulaciji s SAA po 24 urah (slika 38), pri tem je bil od njega uspešnejši le meloksikam. To pomeni, da ima poleg domnevno negativnih vplivov na srčno-žilni sistem, zaradi katerih je bil rosiglitazon umaknjen iz prodaje, nedvomno tudi protivnetne lastnosti, ki bi jih bilo smiselno podrobneje proučiti.



Slika 38: Izražanje gena za SAA po 24 urah v nestimuliranih HCAEC (B), ob stimulaciji s SAA (1000 nM) in ob dodatku rosiglitazona. AE – arbitrarne enote

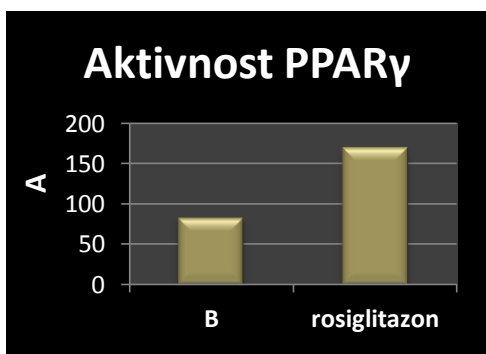
## 5.4 AKTIVNOST TRANSKRIPCijskega FAKTORJA PPAR $\gamma$ V HCAEC

Naši rezultati so pokazali, da PPAR $\gamma$  agonisti zmanjšajo vnetne učinke SAA, v literaturi pa smo zasledili podatek, da SAA zviša aktivnost PPAR $\gamma$  v hepatocitih (84), zato smo se v nadaljevanju osredotočili na aktivnost PPAR $\gamma$  v endotelijskih celicah. Podatkov o aktivnosti PPAR $\gamma$  v njih v literaturi nismo našli. Uporabili smo rosiglitazon v koncentraciji 30  $\mu$ M in 1000 nM SAA. Najprej smo iz celic izolirali nuklearne ekstrakte, nato pa v njih preverili aktivnost PPAR $\gamma$ .

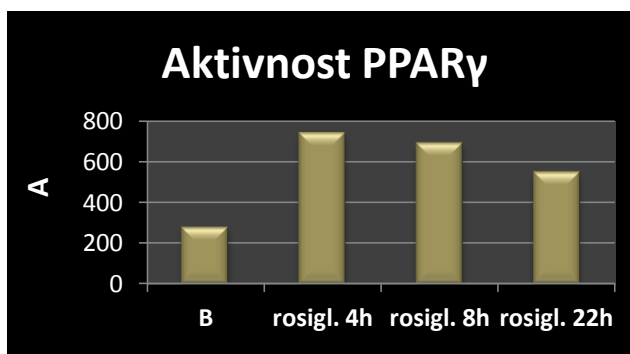
Nameravali smo preveriti ali rosiglitazon, sintetični agonist PPAR $\gamma$ , v HCAEC poveča aktivnost PPAR $\gamma$ . Prvi poskus smo izvedli po štirih urah in ugotovili, da rosiglitazon za dvakrat poveča aktivnost PPAR $\gamma$  v endotelijskih celicah (slika 39). Ker nismo vedeli, kdaj



je, ob stimulaciji z rosiglitazonom, aktivnost PPAR $\gamma$  največja, smo preverili tudi časovno odvisnost njene aktivnosti ob dodatku rosiglitazona. Izkazalo se je, da je aktivnost resnično največja štiri ure po dodatku PPAR $\gamma$ , nato pa začne padati (slika 40).

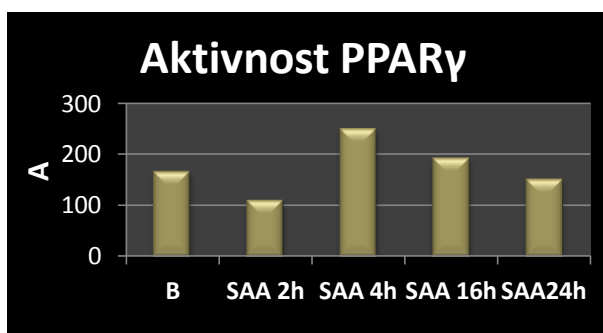


**Slika 39:** Aktivnost PPAR $\gamma$  po štirih urah v nestimuliranih HCAEC (B) in ob dodatku rosiglitazona. A – absorbanca



**Slika 40:** Aktivnost PPAR $\gamma$  v nestimuliranih HCAEC (B) in v odvisnosti od časa stimulacije z rosiglitazonom. A – absorbanca

Nato smo preverili vpliv SAA na aktivnost PPAR $\gamma$  in ugotovili, da jo v nasprotju s pričakovanji za 33 % poveča (slika 41) in sicer prav tako najbolj po štirih urah, nato pa aktivnost upade. SAA ima iz tega vidika pozitiven vpliv na vnetje, saj ima PPAR $\gamma$ , kot smo že dejali, pri njegovem zaviranju predvidoma pomemben vpliv.



**Slika 41:** Aktivnost PPAR $\gamma$  ob dodatku SAA (1000 nM) v odvisnosti od časa. A – absorbanca

Li in sodelavci so preverili vpliv SAA na aktivnost PPAR $\gamma$  v hepatocitih (84). Njihovi rezultati so prav tako pokazali, da SAA aktivnost PPAR $\gamma$  v hepatocitih poveča, vendar je bilo povečanje aktivnosti PPAR $\gamma$  po stimulaciji s SAA veliko bolj intenzivno, kot pri HCAEC, kar kaže na to, da ima PPAR $\gamma$  v drugih celičnih tipih predvidoma večjo vlogo, kot v

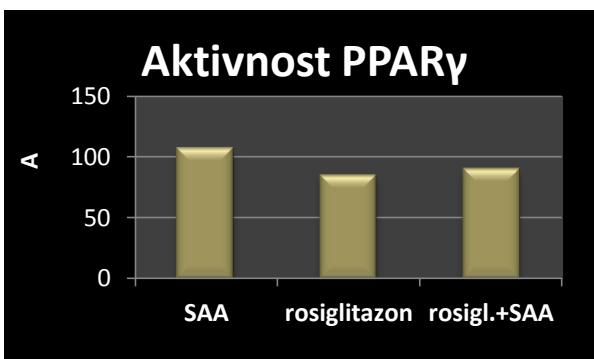
endotelijskih celicah, saj se celice na stimulacijo odzivajo intenzivneje.

Pri zadnjem poskusu smo primerjali aktivacijo PPAR $\gamma$  s SAA v prisotnosti in odsotnosti rosiglitazona. Razvidno je, da SAA vpliva na aktivnost PPAR $\gamma$  v približno enaki meri, kot rosiglitazon (slika 42).

Njuna kombinacija pa na celice očitno ne deluje sinergistično, saj aktivnost PPAR $\gamma$  ostane na enakem nivoju, kot ob dodatku vsakega stimulatorja posebej.

S tem smo torej potrdili, da ima SAA tudi nekatere potencialno protivnetne lastnosti, ki jih izkazuje s povečanjem aktivacije PPAR $\gamma$ , transkripcijskega faktorja, ki preko različnih mehanizmov deluje protivnetno.

Če povzamemo, smo pri naših poskusih prišli do številnih zanimivih ugotovitev, ki v literaturi še niso bile objavljene. Pokazali smo, da sta pri zniževanju koncentracije IL-6 med najuspešnejšimi učinkovinami fluvastatin in kaptopril, katerih primarna uporaba ni namenjena blaženju vnetja. Izkazalo se je tudi, da učinkovine v nekaterih primerih bolj kot na IL-6 delujejo na GM-CSF. Ta citokin naj bi imel celo pomembnejšo vlogo pri nastanku avtoimunskih bolezni, kot IL-6, zato je njegovo zmanjšanje pri revmatičnih bolnikih lahko zelo pozitivno. Na IL-8 so vse učinkovine razen adalimumaba delovale v občutno manjši meri kot na citokine. Večinoma so bile vse učinkovine zelo uspešne pri zniževanju koncentracije adhezivne molekule VCAM-1, najuspešnejši pri tem pa je bil diklofenak. Na inhibitor serinske proteaze PAI-1 so učinkovine delovale zelo različno. Njegovo koncentracijo je najbolj povečal rosiglitazon, kar morda pripomore k neželenim učinkom, zaradi katerih je bil tudi umaknjen iz prodaje. Najbolj pa je koncentracijo PAI-1 znižal meloksikam, ki sicer v naši študiji s HCAEC v negativnem smislu odstopa od ostalih učinkovin, in preko določenih mehanizmov vnetje močno pospešuje. Pri tem mu je malo podoben tudi certolizumab pegol. Ugotovili smo, da je bil pri zaviranju izražanja mRNA SAA po stimulaciji HCAEC s SAA poleg inhibitorjev ciklooksigenaze zelo učinkovit tudi rosiglitazon, ki ima, kot se je izkazalo, vseeno nekatere protivnetne lastnosti. Ugotovili pa smo tudi, da SAA povečuje aktivnost transkripcijskega faktorja PPAR $\gamma$  celo v enaki meri kot njegov sintetični ligand rosiglitazon in s tem poleg že znanih vnetnih lastnosti SAA izkazuje tudi nekatere protivnetne. Pri naši diplomski nalogi smo nakazali nekatere mehanizme, preko katerih različne učinkovine lahko vplivajo na vnetje. Model vnetja HCAEC bi lahko služil za proučevanje potencialnih pozitivnih kakor tudi negativnih učinkov zdravil na razvoj ateroskleroze in srčno-žilnih bolezni.



Slika 42: Aktivnost PPAR- $\gamma$  ob dodatku SAA (1000 nM) in rosiglitazona. A –absorbanca

## 6. SKLEPI

Ker imajo bolniki z revmatoidnim artritidom (RA) večje tveganje za razvoj ateroskleroze in srčno-žilnih bolezni, smo na modelu SAA inducirane vnetja v HCAEC, proučili učinke nekaterih zdravil, ki jih pri zdravljenju najpogosteje uporabljajo, in še nekaterih drugih zdravil, ki se pogosto uporabljajo kot kronična terapija ter potencialno vplivajo na vnetje in zaključili:

1. Metotreksat in deksametazon zelo učinkovito znižata koncentracijo vseh vnetnih parametrov. Na zmanjšanje vnetja vplivata preko zaviranja citokinov in adhezivnih molekul, metotreksat tudi preko izražanja genov za SAA. Razlikujeta se pri vplivu na PAI-1. Metotreksat njegovo koncentracijo zmanjša, deksametazon pa jo poveča, kar je možni vzrok njunega različnega vpliva na pojav srčno-žilnih dogodkov.
2. Inhibitorji TNF- $\alpha$  na HCAEC ne delujejo enako. Certolizumab pegol koncentracijo večine vnetnih mediatorjev poveča, adalimumab pa jo zmanjša. Vendar pa certolizumab pegol izrazito zmanjša koncentracijo PAI-1, na katerega adalimumab ne učinkuje. Učinkovini sta za razliko od ostalih zdravil neučinkoviti pri inhibiciji mRNA izražanja SAA po stimulaciji HCAEC s SAA.
3. Fluvastatin in kaptopril nista protivnetni učinkovini, vendar vnetje zelo uspešno zavirata. Fluvastatin se po učinkovitosti na celičnem modelu lahko primerja z učinkovinami iz skupine DMARD. Oba na vnetje vplivata tudi preko znižanja izražanja genov za COX-2.
4. Tudi NSAR na celice ne delujejo enako. Meloksikam občutno poveča koncentracijo skoraj vseh vnetnih mediatorjev na proteinskem in mRNA nivoju, etorikoksib in diklofenak pa jo učinkovito zmanjšata. Vendar pa meloksikam močno zniža koncentracijo PAI-1, kar je možni razlog za manjše število trombotičnih zapletov pri bolnikih, ki se zdravijo z meloksikamom, v primerjavi z diklofenakom. Meloksikam tudi pomembno poveča izražanje PPAR $\gamma$  in na vnetje najbrž deluje tudi preko tega mehanizma. Etorikoksib je od vseh zdravil najbolj učinkovit pri zmanjšanju izražanja mRNA SAA.
5. Rosiglitazon na HCAEC deluje protivnetno, saj zniža koncentracijo vseh vnetnih molekul na mRNA in proteinskem nivoju, vendar močno poveča koncentracijo PAI-1, kar bi lahko bil razlog za njegov umik iz prodaje. Zelo učinkovito zniža izražanje mRNA SAA, vendar ne vpliva na izražanje mRNA COX-2.

6. SAA poveča aktivnost PPAR $\gamma$  v enaki meri kot njegov sintetični ligand rosiglitazon in s tem lahko vpliva na zmanjšanje vnetja.

Z dobljenimi rezultati smo nakazali nekatere mehanizme, preko katerih lahko različna zdravila vplivajo na vnetje in posledično na razvoj srčno-žilnih bolezni. Model vnetja SAA-stimuliranih HCAEC bi lahko služil za proučevanje potencialnih pozitivnih, kakor tudi negativnih učinkov zdravil na razvoj ateroskleroze in srčno-žilnih bolezni.

## 7. LITERATURA

1. Ribarič S: **Temelji patološke fiziologije**, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2009.
2. Ohshima K, Mogi M, Horiuchi M: **Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma in Vascular Inflammation**. *Int J Vasc Med*. 2012; 508416.
3. Davignon J, Ganz P: **Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis**. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1): III27-32.
4. Libby P, DiCarli M, Weissleder R: **The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets**. *J Nucl Med*. 2010; 51 Suppl 1: 33S-37S.
5. Libby P, Ridker PM, Maseri A: **Inflammation and atherosclerosis**. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135-1143.
6. Libby P: **Inflammation in atherosclerosis**. *Nature*. 2002; 420(6917): 868-874.
7. Abbasi SH, Boroumand MA: **Expanded network of inflammatory markers of atherogenesis: where are we now?** *Open Cardiovasc Med J*. 2010; 4: 38-44.
8. Schirmer M, Dejaco C, Duftner C: **Advances in the evaluation and classification of chronic inflammatory rheumatic diseases**. *Discov Med*. 2012; 13(71): 299-304.
9. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, et al.: **Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases**. *Circulation*. 2005; 112(21): 3337-3347.
10. Thomas GN, Tam LS, Tomlinson B, Li EK: **Accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus: a review of the causes and possible prevention**. *Hong Kong Med J*. 2002; 8(1): 26-32.
11. Marjan Vozelj: **Temelji imunologije**, Ljubljana: DZS; 2000.
12. Ricciotti E, FitzGerald GA: **Prostaglandins and inflammation**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(5): 986-1000.
13. Ryan A, Godson C: **Lipoxins: regulators of resolution**. *Curr Opin Pharmacol*. 2010; 10(2): 166-172.
14. King VL, Thompson J, Tannock LR: **Serum amyloid A in atherosclerosis**. *Curr Opin Lipidol*. 2011; 22(4): 302-307.
15. Uhlar CM, Burgess CJ, Sharp PM, Whitehead AS: **Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily**. *Genomics*. 1994; 19(2): 228-235.

16. Kisilevsky R, Manley PN: **Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles.** *Amyloid.* 2012; 19(1): 5-14.
17. Kontush A, Chapman MJ: **Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis.** *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3): 342-374.
18. Zhao Y, Zhou S, Heng CK: **Impact of serum amyloid A on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression and activity in endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(7): 1645-1650.
19. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, et al.: **Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: A TIMI 11A substudy.** *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35(2): 358-362.
20. Katayama T, Nakashima H, Takagi C, Honda Y, Suzuki S, Iwasaki Y, et al.: **Prognostic value of serum amyloid A protein in patients with acute myocardial infarction.** *Circ J.* 2005; 69(10): 1186-1191.
21. Nishimoto N, Kishimoto T: **Interleukin 6: from bench to bedside.** *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006; 2(11): 619-626.
22. Gabay C: **Interleukin-6 and chronic inflammation.** *Arthritis Res Ther.* 2006; 8 Suppl 2: S3.
23. Cronstein BN: **Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis.** *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007; 65 Suppl 1: S11-15.
24. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA: **Interleukin 8 and cardiovascular disease.** *Cardiovasc Res.* 2009; 84(3): 353-360.
25. <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/mor103/>.(september 2012)
26. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG: **The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis.** *Neuro Oncol.* 2005; 7(2): 122-133.
27. Paine R, 3rd, Preston AM, Wilcoxon S, Jin H, Siu BB, Morris SB, et al.: **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice.** *J Immunol.* 2000; 164(5): 2602-2609.
28. Khameneh HJ, Isa SA, Min L, Nih FW, Ruedl C: **GM-CSF signalling boosts dramatically IL-1 production.** *PLoS One.* 2011; 6(7): e23025.
29. Elangbam CS, Qualls CW, Jr., Dahlgren RR: **Cell adhesion molecules--update.** *Vet Pathol.* 1997; 34(1): 61-73.

30. Frijns CJ, Kappelle LJ: **Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease.** Stroke. 2002; 33(8): 2115-2122.
31. Abderrahmani R, Francois A, Buard V, Tarlet G, Blirando K, Hneino M, et al.: **PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury.** PLoS One. 2012; 7(4): e35740.
32. Chen Y, Kong J, Sun T, Li G, Szeto FL, Liu W, et al.: **1,25-Dihydroxyvitamin D(3) suppresses inflammation-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by blocking nuclear factor-kappaB activation.** Arch Biochem Biophys. 2011; 507(2): 241-247.
33. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S: **The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases.** J Adv Pharm Technol Res. 2011; 2(4): 236-240.
34. Wang N, Yin R, Liu Y, Mao G, Xi F: **Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in atherosclerosis: an update.** Circ J. 2011; 75(3): 528-535.
35. <http://www.zdravila.net/>. (september 2012)
36. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G: **The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression.** Endocr Rev. 2003; 24(4): 488-522.
37. Goppelt-Struebe M, Wolter D, Resch K: **Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclooxygenase/PGE isomerase.** Br J Pharmacol. 1989; 98(4): 1287-1295.
38. Kerachian MA, Cournoyer D, Harvey EJ, Chow TY, Neagoe PE, Sirois MG, et al.: **Effect of high-dose dexamethasone on endothelial haemostatic gene expression and neutrophil adhesion.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2009; 116(3-5): 127-133.
39. Jain MK, Ridker PM: **Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms.** Nat Rev Drug Discov. 2005; 4(12): 977-987.
40. Zhou Q, Liao JK: **Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy.** Curr Pharm Des. 2009; 15(5): 467-478.
41. Corsini A: **Fluvastatin: effects beyond cholesterol lowering.** J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2000; 5(3): 161-175.
42. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, et al.: **Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular**

- signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages.** *Circ Res.* 2007; 100(10): 1442-1451.
43. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S, et al.: **Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells.** *Life Sci.* 2000; 67(8): 863-876.
44. Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, et al.: **Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents.** *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(11): 1323-1332.
45. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, et al.: **Influence of anti-TNF-alpha infliximab therapy on adhesion molecules associated with atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24(4): 373-379.
46. Kerekes G, Soltesz P, Der H, Veres K, Szabo Z, Vegvari A, et al.: **Effects of biologics on vascular function and atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis.** *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173: 814-821.
47. Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N, et al.: **Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells.** *Cardiovasc Res.* 2003; 57(1): 238-243.
48. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, et al.: **New topics in bradykinin research.** *Allergy.* 2011; 66(11): 1397-1406.
49. Martin MF, Surrall KE, McKenna F, Dixon JS, Bird HA, Wright V: **Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis?** *Lancet.* 1984; 1(8390): 1325-1328.
50. Ilieva I, Ohgami K, Jin XH, Suzuki Y, Shiratori K, Yoshida K, et al.: **Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats.** *Exp Eye Res.* 2006; 83(3): 651-657.
51. Kohlstedt K, Busse R, Fleming I: **Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells.** *Hypertension.* 2005; 45(1): 126-132.
52. Coomes E, Chan ES, Reiss AB: **Methotrexate in atherogenesis and cholesterol metabolism.** *Cholesterol.* 2011; 2011: 503028.



53. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, et al.: **Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages.** *Arthritis Rheum.* 2008; 58(12): 3675-3683.
54. Yamasaki E, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M: **Methotrexate inhibits proliferation and regulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by cultured human umbilical vein endothelial cells.** *Br J Dermatol.* 2003; 149(1): 30-38.
55. Stichtenoth DO: **The second generation of COX-2 inhibitors: clinical pharmacological point of view.** *Mini Rev Med Chem.* 2004; 4(6): 617-624.
56. Surh YJ, Na HK, Park JM, Lee HN, Kim W, Yoon IS, et al.: **15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2), an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling.** *Biochem Pharmacol.* 2011; 82(10): 1335-1351.
57. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, Carluccio MA, Storelli C, Distanto A, et al.: **Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability.** *Cardiovasc Res.* 2010; 86(2): 311-320.
58. Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, et al.: **Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice.** *J Mol Cell Cardiol.* 2005; 39(3): 443-452.
59. Niederberger E, Manderscheid C, Geisslinger G: **Different COX-independent effects of the COX-2 inhibitors etoricoxib and lumiracoxib.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342(3): 940-948.
60. Gan TJ: **Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile.** *Curr Med Res Opin.* 2010; 26(7): 1715-1731.
61. Sakai A: **Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide.** *Life Sci.* 1996; 58(26): 2377-2387.
62. Adamson DJ, Frew D, Tatoud R, Wolf CR, Palmer CN: **Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling.** *Mol Pharmacol.* 2002; 61(1): 7-12.

63. Singh G, Lanes S, Triadafilopoulos G: **Risk of serious upper gastrointestinal and cardiovascular thromboembolic complications with meloxicam.** *Am J Med.* 2004; 117(2): 100-106.
64. Na HK, Surh YJ: **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation.** *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(8): 1381-1391.
65. Dasu MR, Park S, Devaraj S, Jialal I: **Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice.** *Endocrinology.* 2009; 150(8): 3457-3464.
66. Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K, Walcher D, Kratzer W, Hombach V, et al.: **Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(9): 1804-1809.
67. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J: **Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker?** *Clin Chim Acta.* 2007; 383(1-2): 21-29.
68. Breland UM, Halvorsen B, Hol J, Oie E, Paulsson-Berne G, Yndestad A, et al.: **A potential role of the CXC chemokine GROalpha in atherosclerosis and plaque destabilization: downregulatory effects of statins.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(5): 1005-1011.
69. Zhao Y, Zhou S, Heng CK: **Celecoxib inhibits serum amyloid a-induced matrix metalloproteinase-10 expression in human endothelial cells.** *J Vasc Res.* 2009; 46(1): 64-72.
70. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al.: **The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review.** *Rheumatology (Oxford).* 2010; 49(2): 295-307.
71. Eggert M, Schulz M, Neeck G: **Molecular mechanisms of glucocorticoid action in rheumatic autoimmune diseases.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 77(4-5): 185-191.
72. Atzeni F, Turiel M, Caporali R, Cavagna L, Tomasoni L, Sitia S, et al.: **The effect of pharmacological therapy on the cardiovascular system of patients with systemic rheumatic diseases.** *Autoimmun Rev.* 2010; 9(12): 835-839.
73. Asgeirsdottir SA, Kok RJ, Everts M, Meijer DK, Molema G: **Delivery of pharmacologically active dexamethasone into activated endothelial cells by**

- dexamethasone-anti-E-selectin immunoconjugate.** *Biochem Pharmacol.* 2003; 65(10): 1729-1739.
74. Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Kveder T, Tomšič M, Sodin-Šemrl S. **Serum amyloid A activation of inflammatory and adhesion molecules in human coronary artery and umbilical vein endothelial cells.** *European Journal of Inflammation.* 2007; 5(2): 73-81.
75. Paleolog E: **Target effector role of vascular endothelium in the inflammatory response: insights from the clinical trial of anti-TNF alpha antibody in rheumatoid arthritis.** *Mol Pathol.* 1997; 50(5): 225-233.
76. Greenberg JD, Furer V, Farkouh ME: **Cardiovascular safety of biologic therapies for the treatment of RA.** *Nat Rev Rheumatol.* 2012; 8(1): 13-21.
77. Popa C, Netea MG, Radstake T, Van der Meer JW, Stalenhoef AF, van Riel PL, et al.: **Influence of anti-tumour necrosis factor therapy on cardiovascular risk factors in patients with active rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(2): 303-305.
78. Marasini B, Massarotti M: **Statins and cardiovascular risk in rheumatic diseases.** *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; 25(1): 25-30.
79. McCarey DW, Sattar N, McInnes IB: **Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases?** *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(2): 55-61.
80. Wood PL, Khan MA, Moskal JR: **Mechanism of action of the disease-modifying anti-arthritic thiol agents D-penicillamine and sodium aurothiomalate: restoration of cellular free thiols and sequestration of reactive aldehydes.** *Eur J Pharmacol.* 2008; 580(1-2): 48-54.
81. Xiong YL, Zhao HY: **Effect of captopril on proliferation of aortic smooth muscle cells.** *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1996; 17(6): 503-506.
82. Hamblin M, Chang L, Fan Y, Zhang J, Chen YE: **PPARs and the cardiovascular system.** *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(6): 1415-1452.
83. <http://www.theheart.org/article/1125181.do>. (september 2012)
84. Li H, Zhao Y, Zhou S, Heng CK: **Serum amyloid A activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellularly regulated kinase 1/2 and COX-2 expression in hepatocytes.** *Biochemistry.* 2010; 49(44): 9508-9517.