

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA KURET

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TADEJA KURET

**BIOLOŠKI OZNAČEVALCI POMEMBNI PRI SPREMLJANJU BOLNIKOV Z
GIGANTOCELIČNIM ARTERITISOM**

**BIOMARKERS IMPORTANT FOR MONITORING PATIENTS WITH GIANT
CELL ARTERITIS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, na Kliničnem oddelku za revmatologijo, UKC Ljubljana, pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom dr. Katje Lakota. Del analiz je bil opravljen v Centru za tipizacijo tkiv, Zavoda RS za transfuzijsko medicino.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svoji mentorici, doc. dr. Saši Čučnik, za priložnost opravljanja magistrske naloge, za vso strokovno pomoč in vodenje skozi raziskovalno delo in pisanje naloge. Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorici, dr. Katji Lakota, za odlično uvajanje v laboratorijsko delo, za vso pomoč pri nastajanju magistrske naloge, za vse koristne napotke in spodbudo. Posebna zahvala gre še doc. dr. Snežni Sodin-Šemrl za vso spodbudo med eksperimentalnim delom, za pomoč in nasvete pri pisanju naloge in za vse prijazne besede. Zahvalila bi se tudi vsem ostalim sodelavkam v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, ki so mi vedno priskočile na pomoč, ko je bilo potrebno. Magistrske naloge ne bi bilo mogoče opravljati brez odlično klinično opredeljenih bolnikov in njihovih vzorcev, za kar gre zahvala zdravnikom na KO za revmatologijo, predvsem mag. Alojziji Hočevnar, dr. med., Žigi Rotarju, dr. med. in prof. dr. Matiju Tomšiču, dr. med. Prav tako magistrske naloge ne bi bilo moč opraviti brez sodelovanja s Centrom za tipizacijo tkiv, Zavoda RS za transfuzijsko medicino, za kar se zahvaljujem doc. dr. Blanki Vidan-Jeras, mag. farm. in ostalim zaposlenim, ki so nam analize omogočili.

Nenazadnje se iz srca zahvaljujem svoji družini za vso finančno in moralno podporo skozi vsa leta študija. Posebna zahvala gre še vsem prijateljem, brez katerih si študentskih let sploh ne morem predstavljati.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Saše Čučnik in somentorstvom dr. Katje Lakota.

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC	III
KAZALO SLIK	IV
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VIII
SEZNAM SIMBOLOV IN OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA	1
1.2 NASTANEK VNETJA.....	2
1.3 KLINIČNA SLIKA	3
1.4 IMUNOPATOLOGIJA	4
1.5 REVMATIČNA POLIMIALGIJA	9
1.6 DIAGNOSTIKA GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA.....	10
1.7 ZDRAVLJENJE GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA	12
2. NAMEN DELA.....	14
2.1 HIPOTEZE	14
2.2 CILJI	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.2 METODE.....	20
4 REZULTATI.....	28
4.1 SERUMSKE VREDNOSTI ANALITOV	28
4.2 RAZLIKE V IZRAŽANJU GENOV	39
5 RAZPRAVA.....	45
5.1 CITOKINI.....	45
5.2 MATRIKS METALOPROTEINAZE IN NJIHOVI TKIVNI INHIBITORJI	49

5.3 ADHEZIJSKE MOLEKULE	51
5.4 PROTEINI AKUTNE FAZE	52
5.5 HITINAZI 3 PODOBEN PROTEIN 1	54
5.6 MAKROFAGNI RECEPTOR S KOLAGENSKO STRUKTURO	55
5.7 CELIČNI TIPI	56
5.8 PREDNOSTI IN OMEJITVE ŠTUDIJE	57
6 SKLEPI	59
7 LITERATURA	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reakcijska mešanica za obratno transkripcijo RNA	23
Preglednica II: Reakcijska mešanica za QPCR reakcijo	24
Preglednica III: Gensko izražanje citokinov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	39
Preglednica IV: Gensko izražanje MMP in TIMP v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	40
Preglednica V: Gensko izražanje ICAM-1 in VCAM-1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	42
Preglednica VI: Gensko izražanje feritina in apoA1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	42
Preglednica VII: Gensko izražanje SOD1 in SOD2 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	43
Preglednica VIII: Gensko izražanje označevalcev različnih celičnih tipov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij pri posameznih preiskovancih	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Imunski odziv usmerjen v Th17	6
Slika 2: Imunski odziv usmerjen v Th1	7
Slika 3: Prikaz priprave standardov za QPCR reakcijo	25
Slika 4: Neustrezna talilna krivulja oligonukleotidnih začetnikov	27
Slika 5: Koncentracije IL-6 v serumih posameznih preiskovancev	28
Slika 6: Koncentracije TNF- α v serumih posameznih preiskovancev	29
Slika 7: Koncentracije TNF- α v serumih bolnikov z GCA.	29
Slika 8: Koncentracije IL-8 v serumih posameznih preiskovancev	30
Slika 9: Koncentracije IL-8 v serumih bolnikov z GCA	30
Slika 10: Koncentracije IL-10 v serumih posameznih preiskovancev	31
Slika 11: Koncentracije MMP-2 v serumih posameznih preiskovancev	32
Slika 12: Koncentracije MMP-2 v serumih bolnikov z GCA	32
Slika 13: Koncentracije MMP-9 v serumih posameznih preiskovancev	33
Slika 14: Koncentracije MMP-9 v serumih bolnikov z GCA	33
Slika15: Koncentracije ICAM-1 v serumih posameznih preiskovancev	34
Slika 16: Koncentracije ICAM-1 v serumih bolnikov z GCA	34
Slika 17: Koncentracije VCAM-1 v serumih posameznih preiskovancev	35
Slika 18: Koncentracije VCAM-1 v serumih bolnikov z GCA	35
Slika 19: Koncentracije L-selektina v serumih posameznih preiskovancev	36
Slika 20: Koncentracije L-selektina v serumih bolnikov z GCA	36
Slika 21: Koncentracije SAA v serumih posameznih preiskovancev	37
Slika 22: Koncentracije CHI3-L1 v serumih posameznih preiskovancev	38
Slika 23: Koncentracije CHI3-L1 v serumih bolnikov z GCA	38

Slika 24: Gensko izražanje citokinov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	39
Slika 25: Gensko izražanje MMP in TIMP v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	40
Slika 26: Razmerje izražanja genov za MMP in TIMP v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	41
Slika 27: Gensko izražanje ICAM-1 in VCAM-1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	42
Slika 28: Gensko izražanje feritina in apoA1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	43
Slika 29: Gensko izražanje označevalcev različnih celičnih tipov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	44
Slika 30: Gensko izražanje MARCO v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev	44

POVZETEK

Gigantocelični arteritis (GCA) je vnetna sistemska avtoimunska bolezen, ki prizadene stene velikih in srednje velikih žil. Posledica vnetja je obsežna hiperplazija intime in zmanjšan pretok arterijske krvi, kar lahko vodi do nepovratne izgube vida, srčne ali možganske kapi in drugih resnih zapletov. Zlati standard za postavitev diagnoze je biopsija temporalne arterije, čeprav je metoda invazivna za bolnike in pogosto lažno negativna. Zaradi možnosti nevarnih zapletov bolezni, je nujno čim hitreje postaviti ustrezno diagnozo in začeti z zdravljenjem. Kljub zdravljenju pa se pri bolnikih lahko pojavi poslabšanje bolezni, ki ga trenutno ne moremo vnaprej napovedati. Namen naloge je zato določiti nove, zgodnje označevalce v serumu in tkivu temporalnih arterij, ki so povezani s patologijo bolezni in bi nam služili kot pomoč pri postavitvi diagnoze, pri spremljanju zdravljenja in za napoved poslabšanja bolezni. V prvem delu naloge smo, z uporabo metode hkratne analize več različnih analitov (Luminex xMAP), določali serumske koncentracije 17 različnih proteinov, vključno z izbranimi citokini, kemokini, matriks metaloproteinazami in adhezijskimi molekulami, v serumu bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA, brez kasnejšega poslabšanja bolezni ($n=18$), s kasnejšim poslabšanjem bolezni ($n=22$), tako ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanje še ni bilo prisotno (t_0) kot tudi ob času poslabšanja bolezni (t_1), preiskovancev s histološko ovrženo diagnozo GCA, pri katerih je obstajal sum na GCA ($n=8$) in zdravih krvodajalcev ($n=8$). Serumske koncentracije IL-8, TNF- α , MMP-9, VCAM-1 in CHI3-L1 so bile statistično značilno višje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z zdravimi krvodajalci. Serumske koncentracije MMP-2 in MMP-9 so bile statistično značilno višje pri bolnikih ob času poslabšanja bolezni (t_1) v primerjavi z bolniki, ki se jim bolezen ni poslabšala. Serumske koncentracije MMP-2 so bile statistično značilno višje, serumske koncentracije SAA pa statistično značilno nižje pri bolnikih ob času poslabšanja bolezni (t_1) v primerjavi s časom ob postavitvi diagnoze, ko poslabšanje še ni bilo prisotno (t_0). V drugem delu naloge smo s tehniko kvantitativne verižne reakcije s polimerazo določali razlike v izražanju genov 19 različnih molekul, vključno s citokini, kemokini, matriks metaloproteinazami in njihovimi tkivnimi inhibitorji, adhezijskimi molekulami, označevalci oksidativnega stresa, proteini akutne faze in označevalci različnih celičnih tipov, v bioptičnem tkivu temporalnih arterij bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA, brez kasnejšega poslabšanja bolezni ($n=4$), s kasnejšim poslabšanjem bolezni ($n=2$) in preiskovancev s histološko ovrženo diagnozo

GCA, pri katerih je obstajal sum na GCA (n=6). Gensko izražanje MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VCAM-1, feritina in MARCO je bilo večje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z bolniki z ovrženo diagnozo GCA, medtem ko je bilo izražanje genov za MMP-2 in apoA1 manjše.

Ključne besede: gigantocelični arteritis, vzorec seruma, metoda hkratne analize več različnih analitov, biopsija temporalne arterije, gensko izražanje.

ABSTRACT

Giant cell arteritis (GCA) is an inflammatory, systemic autoimmune disease affecting large- and medium-sized arteries. Inflammation in the vessel wall leads to intimal hyperplasia, occlusion of the arterial lumen and reduces blood flow. Luminal occlusion results in ischemia which can lead to severe clinical complications, such as visual loss and cardio-vascular complications. Although invasive and often false negative, the temporal artery biopsy (TAB) is still the gold standard for diagnosis of GCA. In order to prevent dangerous complications, the prompt recognition and treatment of disease are required. However, although therapy is well established, patients can still experience unpredicted relapses and symptoms flare-ups. Therefore, the aim of our study was to determine new and early markers in the sera and artery tissue of patients with GCA, which are involved in the pathology of the disease and could be useful for diagnosis of GCA and monitoring the disease and treatment which would be able to predict relapses. In the first part of the study, we determined concentrations of 17 different proteins, among others, selected cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases and adhesion molecules in the sera of patients. Patients were divided into three groups, which were compared to healthy donors (n=8): patients without TAB confirmed diagnosis of GCA but with symptoms, typical for GCA (n=18), patients with TAB confirmed diagnosis of GCA without relapses (n=8) and GCA patients who experienced relapses (n=22). Sera samples of the latest group were collected at the time of TAB when relapse has not been present yet (t_0), as well as at the time of relapse (t_1). Sera samples were tested with multiplex assay (Luminex xMAP). Serum concentrations of IL-8, TNF- α , MMP-9, VCAM-1 and CHI3-L1 were significantly higher in the sera of all patients with GCA compared to healthy donors. Serum concentrations of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in the sera of patients with GCA at the time of relapse (t_1) compared to patients without relapses. Serum concentrations of MMP-2 were significantly higher in the sera of patients at the time of relapse (t_1) compared to serum concentrations at the time of TAB (t_0), while on the other hand, serum concentrations of SAA were significantly lower. In the second part of the study, we determined mRNA levels of 19 different molecules, including selected cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, adhesion molecules, acute phase proteins, oxidative-stress and different cell types markers with quantitative polymerase chain reaction in TAB specimens of patients with TAB confirmed diagnosis of

GCA without relapses (n=4), GCA patients with relapses (n=2) and patients without TAB confirmed diagnosis of GCA (n=6). mRNA levels of MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VCAM-1, ferritin and MARCO were increased in TAB specimens of patients with GCA compared to patients without GCA, while, mRNA levels of MMP-2 and apoA1 were decreased.

Key words: Giant cell arteritis, sera samples, multiplex assay, temporal artery biopsy, mRNA expression.

SEZNAM SIMBOLOV IN OKRAJŠAV

apoA1	apolipoprotein A1 (angl. apolipoprotein A1)
cDNA	komplementarna veriga mRNA (angl. complementary DNA)
CHI3-L1	hitinazi 3 podoben protein 1 (angl. chitinase 3-like protein 1)
CCL	kemokinski ligand (angl. chemokine (C-C motif) ligand)
CCR	kemokinski receptor (angl. chemokine (C-C motif) receptor)
CRP	C-reaktivni protein (angl. C-reactive protein)
DC	dendritične celice (angl. dendritic cells)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ESR	hitrost sedimentacije eritrocitov (angl. erythrocyte sedimentation rate)
FGF	fibroblastni rastni dejavnik (angl. fibroblast growth factor)
GCA	gigantocelični arteritis (angl. giant cell arteritis)
GS	glukokortikosteroidi (angl. glucocorticosteroids)
HCAEC	človeške endotelijske celice koronarne arterije (angl. human coronary artery endothelial cells)
HLA	humani levkocitni antigen (angl. human leukocyte antigen)
ICAM-1	medcelična adhezijska molekula-1 (angl. intercellular adhesion molecule-1)
IFN- γ	interferon gama (angl. interferon gamma)
IL	interlevkin (angl. interleukin)
MARCO	makrofagni receptor s kolagensko strukturo (angl. macrophage receptor with collagenous structure)
MMP	matriks metaloproteinaze (angl. matrix metalloproteinases)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
NK celice	naravne celice ubijalke (angl. natural killer cells)
PBS	s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (angl. phosphate-buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PDGF	trombocitni rastni dejavnik (angl. platelet-derived growth factor)

PMR	revmatična polimialgija (angl. polymyalgia rheumatica)
QPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. quantitative polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (angl. reactive nitrogen species)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
SAA	serumski amiloid A (angl. serum amyloid A)
SOD	superoksidna dismutaza (angl. superoxide dismutase)
TAB	biopsija temporalne arterije (angl. temporal artery biopsy)
TGF- β	transformirajoči rastni dejavnik beta (angl. transforming growth factor beta)
Th celice	celice T pomagalk (angl. T helper cells)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. tumor necrosis factor alpha)
TLR	tollu podobni receptor (angl. toll-like receptor)
VCAM-1	žilno celična adhezijska molekula-1 (angl. vascular cell adhesion molecule-1)
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)
VZ	vzorec

1 UVOD

1.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA

Gigantocelični arteritis (GCA), pogosto imenovan tudi temporalni arteritis ali Hortonova bolezen, je kronična vnetna sistemska avtoimunska bolezen, ki prizadene stene velikih in srednje velikih žil (1). Klinične znake bolezni je prvič opisal Hutchinsonson že leta 1890 (2), nato pa so Horton in sod. leta 1930 opisali še histopatološke značilnosti GCA (3). Vnetje se pojavlja predvsem v kranialnih vejah arterij, ki izvirajo iz aortnega loka in imajo dobro opredeljeno zunanjo in notranjo elastično membrano. Najpogostejše je tako prizadeta žilna stena temporalne, oftalmične, vertebralne, subklavijske, posteriorne ciliarne arterije in torakalne aorte (4). Običajno se pojavlja le pri ljudeh, starejših od 50 let (1).

GCA je eden izmed najpogostejših primarnih sistemskih vaskulitisov v razvitem svetu, čeprav je njegova pojavnost na splošno zelo nizka. Najbolj pogost je v skandinavskih državah in Združenih državah Amerike, kjer je incidenca večja kot 17 na 100.000 prebivalcev, med prebivalci starejšimi od 50 let. V Sredozemlju je incidenca nižja, manjša od 12 na 100.000 prebivalcev, starejših od 50 let, medtem ko se pri Azijcih in temnopoltih skoraj ne pojavlja. Povprečna starost bolnikov je okrog 70 let (najpogostejše med 70 in 79 let), ženske pa zbolevajo dva do trikrat pogostejše kot moški (5, 6). Vzrok bolezni še ni poznan, domnevajo pa, da so v patogenezo bolezni vpleteni tako genetski dejavniki in dejavniki okolja kot tudi imunski odziv posameznika (7). Pri bolnikih so, pogostejše kot pri zdravi populaciji, prisotni humani levkocitni antigeni HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4 in HLA-DR5 (8).

Za bolezen je značilno granulomatozno vnetje v žilni steni arterije, ki se začne v adventiciji, kasneje pa napreduje v vse plasti žilne stene. V vneti žilni steni so prisotni limfociti T, predvsem celice T pomagalk (Th), aktivirani makrofagi in večjedralne celice velikanke. Žilna stena na vnetje oziroma poškodbo odgovori s popravilanjem le-te, kar vključuje spremembe v zgradbi žilne stene, predvsem hiperplazijo intime. Povečanje debeline intime lahko nato vodi v zaporo lumna žile, s čimer se zmanjša pretok krvi, kar lahko privede do različnih ishemičnih zapletov. Med hujše zaplete bolezni uvrščamo

izgubo vida, nevrološke zaplete in razširitev ter anevrizmo aorte (9). Najbolj resen in nevaren zaplet bolezni je trajna in nepovratna izguba vida, ki v večini primerov nastane zaradi zožanja posteriorne ciliarne arterije in ishemije vidnega živca (4). Prav zaradi tveganja nepovratne izgube vida je nujno potrebna hitra in ustrezna prepoznavna bolezn, postavitve diagnoze in takojšnja uvedba zdravljenja. Zaradi možnosti pojava hudih zapletov bolezni in potrebe po takojšnji prepoznavi in začetku zdravljenja, le-to uvrščamo med nujna revmatološka stanja (1, 8).

1.2 NASTANEK VNETJA

V proces nastanka GCA sta vključena tako prirojeni oziroma nespecifični imunski odgovor kot tudi pridobljeni oziroma specifični imunski odgovor. Posledica prirojenega imunskega odgovora je močna sistemska vnetna reakcija in reakcija akutne faze v jetrih ter pojav nespecifičnih oziroma splošnih kliničnih znakov (10). Z reakcijo akutne faze organizem odgovori na motnjo oziroma porušeno homeostazo in aktivacijo imunskih celic. Imunske celice nato začnejo izločati številne vnetne citokine in kemokine, ki potujejo v krvni obtok in lahko povzročijo sistemske reakcije, kar ima za posledico razvoj različnih kliničnih znakov vnetja, med drugimi vročine, hujšanja in katabolizma mišic. Vnetni citokini prav tako vplivajo na nastanek reakcije akutne faze, ki se kaže v spremembi koncentracije proteinov akutne faze v serumu in spremlja sistemske vnetne reakcije. Pri tem sodelujejo predvsem interleukini (IL-6 in IL-1), dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) in kemokin IL-8. Proteini, katerih koncentracija se ob prisotnosti vnetja zviša, so pozitivni proteini akutne faze, koncentracija negativnih proteinov akutne faze pa se zniža. Glavna pozitivna proteina akutne faze sta C-reaktivni protein (CRP) in serumski amiloid A (SAA), ki se zvišata za več kot 25% v štirih urah, ob prisotnosti ustreznega dražljaja. Ostali pozitivni proteini akutne faze so še: α 1 kisli glikoprotein, haptoglobin, fibrinogen, α 1 antihimotripsin, α 1 antitripsin, ceruloplazmin in feritin. Med negativne proteine akutne faze pa spadajo albumin, transektin, transferin in apolipoprotein A1 (apoA1) (11-13). Antigensko specifičen imunski odgovor, ki se odvija v žilni steni, pa je odgovoren za ishemične zaplete bolezni (10).

1.3 KLINIČNA SLIKA

Začetek GCA je pogosto nenaden, bolniki pa imajo lahko prisotne tako splošne znake vnetja kot tudi bolj specifične znake bolezni. Splošni znaki so sistemski in vključujejo izgubo teka in hujšanje, povišano telesno temperaturo, utrujenost in otopelost, vrtoglavico, omotico in bolečine v mišicah. Bolj specifični znaki bolezni pa vključujejo hud glavobol, zvijugano, odebeljeno in na pritisk bolečo temporalno arterijo, pojav klavdikacij v žvekalnih mišicah in jeziku, ki se kažejo kot bolečina v mišicah pri govorjenju ali žvečenju, občutljivost lasišča in bolečine med česanjem las. Med hujše znake oziroma zaplete bolezni sodijo motnje vida, nenadna izguba vida, mono- ali poli- nevritis okončin in prehodni ishemični napad ali kap. Če je prizadeta aorta lahko pride do zapletov, kot so anevrizma, razširitev ali ruptura aorte (1, 14, 15).

Pri 30-75% bolnikov z GCA običajno pride do pojava različnih kliničnih znakov na očeh. Pri približno 15% takšnih bolnikov pride kasneje tudi do razvoja trajne in nepovratne izgube vida, če ustrezna terapija ni pravočasno uvedena. Najpogostejši vzrok za izgubo vida je zapore posteriorne ciliarne arterije in nastanek anteriorne ishemične optične nevropatije. Posledica zapore omenjene arterije je nenadna izguba vida in/ali izguba vidnega polja. Redkeje je izguba vida posledica zapore oftalmične arterije ali notranje karotidne arterije. Pri nekaterih bolnikih z GCA se že predhodno opazijo določeni znaki, ki opozarjajo na nevarnost kasnejše izgube vida. Takšni znaki vključujejo prehodne motnje vida, zameglitev slike ob spremembi telesnega položaja in dvojni vid. Zelo pomembno je, da smo na opozorilne znake pozorni in da pri pojavu le-teh takoj uvedemo imunosupresivno zdravljenje, s katerim lahko preprečimo izgubo vida. Pri bolnikih, ki že imajo okvarjen vid na enem očesu, moramo prav tako čim prej začeti s terapijo in skušati preprečiti izgubo vida še na drugem očesu. Najbolj nevarna je prikrita oblika GCA, pri kateri je izguba vida prvi klinični znak, ki se pojavi. Za takšno obliko bolezni zboli približno 4% posameznikov, ki običajno nimajo prisotnih niti drugih kliničnih znakov bolezni niti povišanih laboratorijskih vrednosti označevalcev vnetja (16, 17).

1.4 IMUNOPATOLOGIJA

V proces nastanka bolezni oziroma vnetja sta vključena tako imunski sistem kot tudi sestavni deli žilne stene. Žilna stena je sestavljena iz endotelijskih celic, gladko mišičnih celic, elastičnih membran, matriksa in fibroblastov. Prav tako je pomembna tudi mreža kapilar-vasa vasorum, ki žilo oskrbuje z zunanje strani (18). Med imunskimi celicami pa so predvsem pomembne žilne dendritične celice (DC), celice Th in makrofagi (9).

Imunopatološko dogajanje v žili lahko razdelimo na tri glavne dele (1, 14):

- Imunska aktivacija v adventiciji - pri tem sodelujejo žilne DC, ki prepoznajo tujek, se aktivirajo in izločajo različne citokine in kemokine. Antigene predstavijo limfocitom T, ki se klonsko razmnožijo in izločajo IFN- γ .
- Aktivacija celic T in makrofagov - vnetje napreduje v medijo, pride do nastanka granuloma in celic velikank, makrofagi izločajo vnetne citokine, matriks metaloproteinaze (MMP), reaktivne kisikove zvrsti (ROS), reaktivne dušikove zvrsti (RNS) in rastne dejavnike.
- Poprava celične stene z zaporo lumna - vnetje se razširi do intime, pride do razgradnje zunajceličnega matriksa, fragmentacije elastične membrane in hiperplazije intime.

1.4.1 Dendritične celice

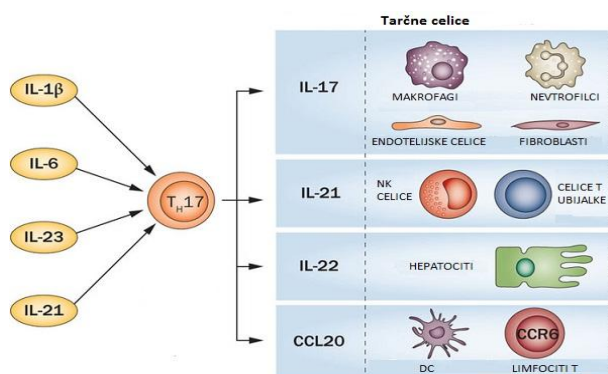
Žilne DC se, razporejene v obroču, nahajajo med medijo in adventicijo, v bližini vasa vasorum. V arterijah zdravih ljudi so DC nezrele in tolerogene. Naloga nezrelih DC je prepoznati in predelati različne antigene. Če prepoznajo antigen kot nevaren, se aktivirajo in potujejo v limfatične organe, kjer antigene predstavijo limfocitom T, ki jih nato odstranijo (7, 9). Med migracijo v limfatične organe se DC fenotipsko spremenijo, delno dozori in na svoji površini začnejo izražati kemokinski receptor 7 (CCR7) in kostimulatorne molekule (CD83). Med dozorevanjem izgubijo sposobnost fagocitoze in pridobijo sposobnost predstavitve antigenov limfocitom T (19). DC prepoznajo tujke s svojimi Tollu podobnimi receptorji (TLR). V arterijah bolnikov z GCA sta pomembna predvsem TLR4, ki prepozna bakterijske lipopolisaharide, in TLR5, ki prepozna bakterijske flageline (20). Ko DC s svojimi receptorji prepoznajo in vežejo tujke v arterijah bolnikov z GCA, pa le-te ne potujejo v limfatične organe ampak ostanejo v žilni steni vnetih arterij, dozori in se razmnožijo (7). Zrele in aktivirane DC v vneti arteriji izražajo

kostimulatorno molekulo CD83 in izločajo kemokinske ligande (CCL), kot so CCL18, CCL19 in CCL21. Prav tako na svoji površini izražajo tudi CCR7. Kemokina CCL19 in CCL21, ki ju izločajo DC, delujeta avtokrino preko vezave na receptor CCR7, ki se izraža na površini DC. Ta vezava prepreči potovanje DC iz vnete arterije in posledično DC ostanejo ujetе na mestu vnetja, kjer dozoriyo. Večina izmed njih izraža tudi kostimulatorno molekulo CD86, ki je potrebna za antigen specifično aktivacijo limfocitov T. To predstavlja ključni dogodek pri izgubi imunske tolerance v žili in pri vzpostavitvi antigen specifičnega imunskega odgovora (19). Aktivirane, zrele in diferencirane DC postanejo specializirane antigen predstavitvene celice in poleg kemokinov začnejo proizvajati tudi različne citokine, ki privabijo še druge imunske celice na mesto vnetja, predvsem makrofage in limfocite T. Oboji v žilo vstopijo preko vasa vasorum. Aktivirane DC proizvajajo velike količine IL-12 in IL-18, ki vzpodbudita diferenciacijo celic Th v Th1 celični odziv. Izločajo tudi IL-23, ki vzpodbudi diferenciacijo celic Th v Th17 celični odziv. Po aktivaciji, DC izločajo tudi druge vnetne citokine, kot so IL-2, IL-6 in IFN- γ , ki privabijo še ostale imunske celice na mesto vnetja v žilni steni (7).

1.4.2 Celice T pomagalkе

Celice Th vstopijo v vneto žilno steno skozi vasa vasorum, ko prepoznajo ustrezen antigen, ki jim ga predstavijo DC. Aktivirane celice Th se nato na mestu vnetja klonsko razmnožijo in začnejo izločati različne citokine (4). Prav tako vplivajo tudi na funkcijo makrofagov, žilnih gladko mišičnih celic (VSMC) in endotelijskih celic (21). Glavno vlogo imata dva podtipa celic Th, in sicer Th1 in Th17 (22). Za zgodnji oziroma akutni GCA je značilna prisotnost celic, značilnih za imunski odziv usmerjen v oba podtipa. Pri poznem obdobju bolezenskega procesa oziroma kroničnem arteritisu (3-9 mesecev po postavitvi diagnoze), ko je že vzpostavljeno zdravljenje, imunski odziv usmerjen v Th17 ni več prisoten, prevladuje le odziv usmerjen v Th1. Celice obeh podtipov proizvajajo svoje značilne citokine. Celice podtipa Th17 izločajo značilen citokin IL-17, medtem ko je za Th1 značilen IFN- γ . Po uvedbi zdravljenja z glukokortikosteroidi (GS) se količine IL-17 in ostalih citokinov, značilnih za imunski odziv usmerjen v Th17, znižajo. Količine IFN- γ , kljub uvedbi zdravljenja, ostanejo nespremenjene, imunski odgovor, usmerjen v Th1, pa ostane prisoten dlje časa (9).

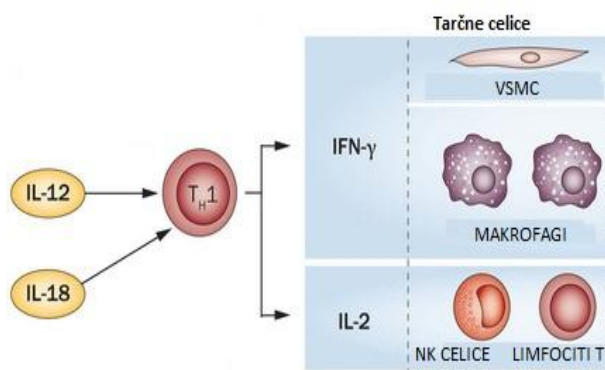
Za diferenciacijo celic Th v podtip Th17 so potrebni IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 in transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β). Celice podtipa Th17 nato izločajo različne vnetne citokine, vključno z IL-17, IL-21, IL-22, CCL20, IL-8 in IL-26 (18). IL-6 lahko izločajo endotelijske celice, VSMC, fibroblasti, limfociti in makrofagi. Predstavlja pomembno povezavo med poškodovano žilno steno in imunskimi celicami. Vpliva na diferenciacijo celic Th v podtip Th17, prav tako pa pospeši sintezo proteinov akutne faze v jetrih. Njegovo izločanje vzpodbujata IL-1 in TNF- α . IL-17 vzpodbudi makrofage, da proizvajajo vnetne citokine, prav tako pa vpliva tudi na endotelijske celice, VSMC in fibroblaste. Njegova naloga je privabljanje nevtrofilcev in makrofagov na mesto vnetja, proizvodnja in izločanje kemokinov, pospeši pa tudi izločanje IL-1, IL-6 in TNF- α (18, 23, 24). IL-8, poleg celic Th, izločajo še makrofagi, endotelijske celice in fibroblasti. IL-8 je kemokin in deluje kot kemotaktičen dejavnik za nevtrofilce in limfocite T. Pomembno vlogo igra tudi pri procesu angiogeneze (25). IL-21 vpliva na diferenciacijo citotoksičnih limfocitov T, IL-22 je mediator akutne faze vnetja, CCL20 pa olajša migracijo limfocitov T in DC na mesto vnetja (Slika 1). Citokini, značilni za podtip Th17 naj bi bili bolj odgovorni za akutne znake bolezni, ki jih po uvedbi zdravljenja z GS hitro zavremo (18).



Slika 1: Imunski odziv usmerjen v Th17 (prirejeno po (18))

Za diferenciacijo celic Th v podtip Th1 sta pomembna IL-12 in IL-18, ki ju izločajo žilne DC in makrofagi (18). IL-12 vzpodbudi tudi diferenciacijo citotoksičnih limfocitov T in izločanje IFN- γ iz limfocitov T (23). Celice podtipa Th1 v vneti arteriji izločajo predvsem IFN- γ in IL-2, v manjši meri pa tudi IL-27 in IL-32 (26). IFN- γ aktivira makrofage, pospeši diferenciacijo celic Th v podtip Th1, vpliva na remodelacijo stromalnih celic in pospeši migracijo ter razmnoževanje VSMC v žilni steni. Pomemben je tudi za tvorbo večjedrnih celic velikank, ki nastanejo z združevanjem visoko aktiviranih makrofagov, in za medsebojno povezavo med limfociti T in VSMC ter endotelijskimi celicami (18).

Povečana količina IFN- γ v vnetem tkivu je povezana s hiperplazijo intime, zaporo lumna žile in neoangiogenezo, zato naj bi bil, po navedbah nekaterih avtorjev, IFN- γ povezan tudi z ishemičnimi znaki oziroma zapleti, vključno z izgubo vida (27, 28). IFN- γ ima manjši vpliv na izražanje sistemskih znakov bolezni in ima večjo vlogo pri samem patološkem procesu v žilni steni (7). IL-2 deluje kot rastni faktor za z antigeni vzpodbujene limfocite T in je odgovoren za njihovo klonsko razmnoževanje (Slika 2) (23, 24).



Slika 2: Imunski odziv usmerjen v Th1 (prirejeno po (18))

1.4.3 Makrofagi

DC z izločanjem citokinov in kemokinov privabijo monocite, ki vstopijo skozi vasa vasorum na mesto vnetja v žilni steni (22). Pri tem sodeluje tudi mikrožilje v vneti arteriji, ki z izražanjem različnih adhezijskih molekul usmerja potovanje levkocitov na mesto vnetja (15). Glavni aktivator pretvorbe monocitov v makrofage je IFN- γ , ki ga izločajo celice podtipa limfocitov Th1 v adventiciji (22). Aktivirani makrofagi proizvajajo številne citokine, kemokine, rastne dejavnike, encime ter ROS in RNS (29). Obstajata najmanj dve podvrsti makrofagov, ki sta pomembni za GCA, M1 in M2. M1 so predvsem pomembni za pospešitev vnetne reakcije in izločajo velike količine vnetnih citokinov. M2 pa so pomembni za regeneracijo tkiva in izločajo IL-10, TGF- β in rastne dejavnike (26). Makrofagi, ki se nahajajo v adventiciji, po aktivaciji proizvajajo vnetne citokine, predvsem IL-1, IL-6, TNF- α in IL-32. Prav tako makrofagi v adventiciji sintetizirajo tudi TGF- β . Makrofagi v mediji proizvajajo MMP, predvsem MMP-2 in MMP-9, ki sta sposobna razgradnje elastina (22, 29). MMP lahko proizvajajo tudi druge celice, kot so večjedrne celice velikanke, VSMC in miofibroblasti. Izraženost MMP-9 v žilni steni je povezana s hiperplazijo intime, zaporo lumna žile in z neoangiogenezo (30). Makrofagi v mediji so tudi vir ROS in RNS, ki povzročijo lipidno peroksidacijo in s tem poškodbo proteinov in drugih sestavnih delov žilne stene. Produkta lipidne peroksidacije najdemo predvsem v

membranah VSMC. Tvorba ROS torej vodi v apoptozo VSMC in posledično v stanjšanje te plasti v mediji (31). Makrofagi v mediji izločajo tudi različne rastne dejavnike, kot so trombocitni rastni dejavnik (PDGF), fibroblasti rastni dejavnik (FGF) in žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF). PDGF in FGF sta potrebna za dediferenciacijo VSMC v miofibroblaste, za razmnoževanje miofibroblastov in njihovo potovanje proti intimi. VEGF lahko, poleg makrofagov, izločajo tudi večjedrne celice velikanke in VSMC, pomemben pa je za proces neoangiogeneze, v katerem se tvorijo nove kapilare za zagotovitev kisika in metabolitov, potrebnih za proces regeneracije tkiva oziroma žilne stene (9).

Makrofagi torej igrajo ključno vlogo pri nastanku hiperplazije intime in zapore lumna žile (22). Z izločanjem MMP, ki razgradijo notranjo elastično membrano, tako posredno omogočijo prosto potovanje miofibroblastov proti intimi. S proizvodnjem ROS in RNS vplivajo na stanjšanje plasti VSMC v mediji. Z izločanjem rastnih dejavnikov pa prispevajo k dediferenciaciji VSMC v miofibroblaste, ki nato migrirajo v intimo in se tam razmnožujejo. Pri migraciji in razmnoževanju miofibroblastov je pomemben tudi TGF- β , ki prav tako vpliva na nalaganje zunajceličnega matriksa (29-31).

1.4.4 Endotelijske celice

Endotelijske celice so pomembne pri patogenezi sistemskih vaskulitisov, saj na svoji površini izražajo in izločajo več različnih citokinov, kemokinov, adhezijskih molekul in drugih vnetnih molekul. Pri napredovanju vnetja so pomembne tudi specifične celične interakcije, predvsem med endotelijskimi in imunskimi celicami (makrofagi in limfociti), ki migrirajo na mesto vnetja (32). Migracija in pritrjevanje levkocitov se uravnava z izražanjem adhezijskih molekul na levkocitih, ki reagirajo z ustreznimi ligandi na endoteliju. Pri bolnikih z GCA imunske celice vstopijo v žilno steno skozi vasa vasorum. Za vstop v adventicijo pa je najprej potrebna migracija iz kapilarne mreže. Endotelijske celice so prve, ki vstopijo v interakcijo z imunskimi, ko le-te migrirajo v žilno steno (18). Limfociti T in makrofagi lahko v žilno steno vstopijo tudi skozi kapilare, ki se na novo tvorijo v procesu neoangiogeneze (9). Razvoj vnetnih infiltratov v tkivu je odvisen od interakcij med levkociti, endotelijskimi celicami in matriksom. Receptorji na levkocitih, ki sodelujejo v interakcijah z endotelijem pripadajo dvema družinama, selektinom in integrinom. Na endotelijskih celicah sta za interakcije odgovorni medcelična adhezijska molekula-1 (ICAM-1) in žilno celična adhezijska molekula-1 (VCAM-1). ICAM-1 se

izraža na endoteliju, levkocitih in fibroblastih. Njeno izražanje vzpodbudijo vnetni citokini, kot so IL-1, TNF- α in IFN- γ . VCAM-1 je izražena na endotelijskih celicah, na kar vplivajo vnetni citokini, in na vseh levkocitih, razen na nevtrofilcih (33).

1.5 REVMATIČNA POLIMIALGIJA

Pri preučevanju GCA in postavitvi diagnoze le-tega velikokrat naletimo na bolnike, s prisotnim podobnim bolezenskim procesom, revmatično polimialgijo (PMR) (16). Oba procesa sta namreč zelo tesno povezana in imata nekaj skupnih značilnosti. Oba prizadeneta predvsem starejše ljudi, klinični znaki so podobni, prav tako tudi vzorci reakcije akutne faze in povišane vrednosti nekaterih laboratorijskih označevalcev vnetja (CRP in hitrost sedimentacije eritrocitov (ESR)). Bolnikom, ki trpijo za eno ali drugo obliko bolezni, je skupno tudi to, da se dobro odzivajo na zdravljenje z GS (34). Po navedbah nekaterih avtorjev (4) naj bi šlo celo za različni manifestaciji istega bolezenskega procesa. PMR je dva do trikrat pogostejša kot GCA, nastopi pa pri 40-60% bolnikov s prisotnim GCA. PMR se lahko pojavi pred, vzporedno z ali po klinični manifestaciji GCA (4). Znaki PMR se pogosto pojavijo pri bolnikih z GCA, po zmanjšanju odmerka GS in predstavljajo poslabšanje stanja bolezni (35). Diagnoza PMR temelji na kombinaciji značilnih kliničnih znakov, povišanih laboratorijskih vrednosti označevalcev vnetja in spremljanju odziva na terapijo z GS (4). Tipični klinični znaki PMR so jutranja okorelost, bolečina mišic ramenskega obroča in vratu ter bolečine v medeničnem obroču (8). Pri nekaterih bolnikih z diagnozo PMR se razvije tudi sistemsko vnetje, pri drugih pa je bolezenski proces omejen na mišično-skeletni sistem (34). Bolniki z izolirano PMR naj bi imeli manj pogoste sistemske klinične znake (hujšanje, vročina), manjše spremembe v laboratorijskih označevalcih vnetja, hitrejši odgovor na zdravljenje in manj zapletov. Prav tako bolniki s PMR običajno ne razvijejo kliničnega vaskulitisa. Pri PMR so običajno DC le delno aktivirane, koncentracije različnih citokinov v serumu pa le rahlo povišane. Prav tako je lahko histološka slika biopsije temporalne arterije negativna. Do končne aktivacije DC in povišanja vrednosti citokinov pa lahko pride že v nekaj dneh (36-38).

1.6 DIAGNOSTIKA GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA

Diagnozo GCA postavimo na osnovi kombinacije kliničnih znakov, rezultatov laboratorijskih testov in biopsije temporalne arterije (16). Ameriško revmatološko združenje je leta 1990 podalo merila za pomoč pri diagnozi GCA. Za doseganje 91,2% specifičnosti in 93,5% občutljivosti, morajo biti pri bolniku prisotni vsaj 3 od 5 naštetih dejavnikov (39):

- starost 50 let ali več,
- nova lokalizacija glavobola,
- klinično spremenjena temporalna arterija (otrdela, zvižugana, na otip boleča),
- pospešena ESR nad 50 mm/h,
- značilna histološka slika biopsije temporalne arterije.

Pri bolnikih z GCA so pogosto zvišane vrednosti ESR in CRP. Ta dva laboratorijska označevalca vnetja nista diagnostično specifična za GCA, sta pa dovolj občutljiva in sta v pomoč pri postavitvi diagnoze in spremljanju bolnikov pri zdravljenju (36). Pri 90% bolnikov je ESR pospešena nad 50 mm/h (17). Pri tem pa moramo biti pozorni tudi na druge dejavnike, ki vplivajo na ESR, kot so starost, spol, anemija, morfologija rdečih krvnih celic, infekcije, travme, hiperholesterolemija in prisotnost malignih obolenj. Pri nekaterih bolnikih je lahko ESR normalna ali celo znižana navkljub prisotni aktivni bolezni GCA. Povečana ESR podpre sum na GCA, vendar normalen rezultat ne izključi bolezni. Koncentracija CRP se spremeni zelo hitro po začetku vnetja (4-6 ur), na koncentracijo pa ne vplivajo starost, spol in drugi hematološki dejavniki. Ima tudi višjo občutljivost in specifičnost za diagnozo GCA v primerjavi z ESR (16). Prav tako je pri bolnikih pogosto zvišana tudi koncentracija IL-6 v serumu. Pri aktivni bolezni so vrednosti IL-6 v serumu zelo povišane (koncentracija je večja od 6,1 pg/ml) in se po zdravljenju znižajo (17). Težava pri merjenju koncentracije IL-6 je, da so merjenja v laboratorijih pogosto nezanesljiva, prav tako pa njegova vloga še ni dovolj poznana in raziskana, da bi na podlagi spreminjanja koncentracije IL-6 v serumu lahko prilagodili zdravljenje bolnikov. Trenutno za postavitev diagnoze in odločitev o začetku zdravljenja še ni na voljo dovolj specifičnih označevalcev, ki bi jih lahko določali v serumu ali plazmi. Trenutno tudi še ni potrjenih dokazov, da bi lahko odločitve o zdravljenju temeljile le na laboratorijskih testih, v odsotnosti kliničnih znakov bolezni (14, 35). Poleg povišanih vrednosti ESR, CRP in

IL-6, so pri bolnikih pogosto prisotne tudi normocitna normokromna anemija, levkocitoza in trombocitoza. Prav tako so, poleg CRP, lahko zvišane vrednosti ostalih proteinov akutne faze vnetja (haptoglobin, SAA) (16, 17).

Zlati standard za postavitev diagnoze GCA še vedno predstavlja pozitivna histološka slika biopsije temporalne arterije, ki jo opravimo še pred začetkom zdravljenja (8). Kot pomoč pri diagnozi se uporablja tudi ultrazvok arterije (1). Za odvzem vzorca za biopsijo se priporoča najmanj 1,0 cm dolg odsek arterije, idealno pa odsek arterije v dolžino meri več kot 2,0 cm (40). V tkivu vnete arterije so prisotni limfociti, večinoma v mediji ali pa v vseh slojih žilne stene. Pogosto v vneti arteriji opazimo tudi makrofage, večjedrne celice velikanke, granulome in fragmentirane dele elastične membrane (1). Vnetje se v žilni steni ne pojavlja po celotni dolžini žile, temveč le v posameznih odsekih (t.i. preskakajočih lezijah). Histološko pozitivna biopsija temporalne arterije potrdi bolezen, negativni rezultat pa je ne izključuje. Pri približno 10-25% bolnikov pride do lažno negativne biopsije, predvsem zaradi preskakajočih mest vnetja (16). Poleg tega pa le 50% rutinskih biopsij pokaže tipične celice, značilne za GCA (4). Razlogi za lažno negativen rezultat so lahko tudi tehnika odvzema vzorca, prekratka dolžina odvzetega tkiva, rezultat pa je odvisen tudi od dolžine trajanja zdravljenja pred biopsijo (8). Odvzem se zato priporoča še pred začetkom zdravljenja oziroma znotraj 14 dni po začetku zdravljenja (16). Negativna biopsija temporalne arterije tudi ne izključuje možnosti vaskulitisa, prisotnega v drugih arterijah (subklavijska, aksiliarna) oziroma aortitisa (14). Pri prisotnih tipičnih znakih in negativni biopsiji se priporoča ponoven odvzem vzorca. Pomanjkljivost biopsije je tudi ta, da je proces invaziven in neprijeten za bolnika (7). Tipični znaki GCA so zato še vedno prepogosto spregledani, nujno potreben začetek zdravljenja pa je prepozen (16).

1.7 ZDRAVLJENJE GIGANTOCELIČNEGA ARTERITISA

Pri bolnikih s sumom na GCA je potrebna takojšnja vzpostavitev zdravljenja z GS, zaradi tveganja kasnejše oslepitve in možnosti lažno negativnega rezultata biopsije temporalne arterije (1). GS hitro odpravijo klinične znake bolezni in zmanjšajo tveganje za razvoj hujših zapletov (6). Po nekaj urah po začetku zdravljenja odpravimo klinične znake bolezni, kot so vročina, glavobol in vrtoglavica, po dveh do štirih tednih po začetku zdravljenja pa se zmanjša tudi vnetni odziv in vrednosti laboratorijskih označevalcev vnetja, kot so CRP, ESR in IL-6 (22). Ishemične zaplete preprečujemo z nizkim odmerkom acetilsalicilne kisline (1).

Zdravljenje najprej začnemo z višjim odmerkom GS, od 0,5 do 1,0 mg na kg telesne teže dnevno. Po približno štirih tednih praviloma zdravljenje privede do remisije kliničnih znakov in povrnitve laboratorijskih vrednosti označevalcev vnetja na normalne vrednosti. Tedaj lahko začnemo z zniževanjem odmerka, praviloma za 10% vsaka dva tedna do dosega najnižjega možnega odmerka. Pri bolnikih, pri katerih se že pojavljajo motnje vida in drugi opozorilni znaki na očeh, je potrebno zdravljenje z večjimi odmerki (6). Zdravljenje v povprečju traja dve leti, njegov potek pa spremljamo s kliničnimi pregledi bolnika in laboratorijskimi analizami označevalcev vnetja. Če pride pri bolnikih do znakov poslabšanja bolezni, moramo odmerek zdravil ponovno povečati. Pri bolnikih s poslabšanjem bolezni je velikokrat potrebno dalj časa trajajoče ali doživljenjsko zdravljenje z GS (16). Čeprav so GS zelo učinkoviti pri odpravljanju kliničnih znakov vnetja in preprečevanju izgube vida, so manj učinkoviti pri vzdrževanju bolnikov v remisiji - več kot 50% bolnikov namreč doživi poslabšanje ali zaplet bolezni med obdobjem zniževanja odmerka (5). Poslabšanje bolezni se lahko kaže laboratorijsko, klinično ali laboratorijsko in klinično (37). Na prisotnost poslabšanja bolezni pri bolnikih z GCA kažejo naslednji znaki: pojav povišane telesne temperature brez znanega vzroka, ki traja več kot en teden, ponoven pojav glavobola, čeljustnih klavdikacij, zadebelitev temporalne arterije in pojav ostalih kliničnih znakov, značilnih za GCA, izguba vida ali pojav kliničnih znakov na očeh, pojav možgansko-žilnih zapletov (napad ali kap), pojav kliničnih znakov značilnih za PMR, ponovno zvišane vrednosti laboratorijskih označevalcev vnetja (ESR, CRP, IL-6) (40). V raziskavi, ki so jo izvedli Petri in sod. (5), so bili najpogostejši zapleti, ki so se pri bolnikih z GCA, po postavitvi diagnoze in uvedbi zdravljenja, pojavili v roku

dveh let naslednji: pojav kliničnih znakov PMR kot najpogostejši zaplet, sledili so pojav motenj vida, obraznih bolečin, pojav angine pectoris in klavdikacij (5).

GS so v tem trenutku najučinkovitejša vrsta protivnetne terapije, ki je uporabna za zdravljenje velikega števila kroničnih vnetnih bolezni. GS namreč lahko aktivirajo številne protivnetne gene, zavrejo pa aktivacijo vnetnih genov, ki so se aktivirali med potekom vnetja. Uspešno zavrejo tvorbo in delovanje vnetnih citokinov, kot so IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15 in TNF, kemokinov, kot so CCL1, CCL5, CCL11, IL-8, in adhezijskih molekul, kot sta ICAM-1 ter VCAM-1. Prav tako lahko zmanjšajo delovanje in tvorbo različnih encimov in receptorjev, povečajo pa tvorbo in delovanje protivnetnih citokinov, kot je IL-10 (41, 42). GS pa ne zmanjšajo izražanja ali izločanja tvorbe IL-12 in IFN- γ , ki sta ključna citokina v kroničnem GCA (9). Zdravila torej uspešno zavrejo Th17 imunski odziv, manj uspešna pa so pri zaviranju Th1 imunskega odziva. GS namreč delujejo protivnetno predvsem na monocite in makrofage, zato se koncentracija citokinov, ki vplivajo na razvoj odziva Th17 zmanjša, IL-12, ki stimulira razvoj Th1 pa ostane zvišan, saj ga izločajo predvsem DC (43).

Slaba stran zdravljenja z GS je ta, da imajo številne hude stranske učinke, ki se pojavijo pri kar 86% bolnikih. Stranski učinki vključujejo osteoporozo in zlome kosti, arterijsko hipertenzijo, sladkorno bolezen, pojav aken, kongestivno srčno popuščanje, peptične razjede, katarakte, pospešeno aterosklerozo, podkožne krvavitve, okužbe, itd. (1). Zaradi hudih stranskih učinkov zdravil je zaželen čim krajši čas zdravljenja s čim nižjimi odmerki (6).

2. NAMEN DELA

GCA je vnetna sistemska avtoimunska bolezen, ki prizadene stene velikih in srednje velikih žil, predvsem kranialne veje arterij, ki izvirajo iz aortnega loka. Posledica vnetja je obsežna hiperplazija intime in zmanjšan pretok arterijske krvi, kar lahko vodi do nepovratne izgube vida, srčne ali možganske kapi in drugih resnih zapletov. Zlati standard za postavitev diagnoze je biopsija temporalne arterije, ki je invazivna za bolnike, pogosto pa je tudi lažno negativna. Zaradi možnosti nastanka nevarnih zapletov je nujno čim hitreje prepoznati bolezen, postaviti ustrezno diagnozo in začeti z zdravljenjem. Prav zaradi prevelike raznolikosti in splošnosti kliničnih znakov ter pomanjkljivosti analitskih metod je bolezen še vedno prevečkrat spregledana, zdravljenje pa prepozno uvedeno. Kljub zdravljenju pri bolnikih lahko pride do kasnejšega poslabšanja bolezni, katerega trenutno ne moremo vnaprej napovedati. Namen dela bo torej poskušati določiti nove, zgodnje označevalce v serumu in tkivu arterij, ki so povezani s patologijo GCA in nam bodo služili kot pomoč pri postavitvi diagnoze, pri spremljanju zdravljenja in za napoved poslabšanja bolezni.

2.1 HIPOTEZE

1. Serumske koncentracije analitov, vpletenih v imunopatologijo GCA, bodo različne v serumih zdravih krvodajalcev v primerjavi s serumi bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA.
2. Serumske koncentracije analitov, vpletenih v imunopatologijo GCA, bodo različne v serumih bolnikov z GCA, brez kasnejšega poslabšanja bolezni v primerjavi s serumi bolnikov, s kasnejšim poslabšanjem bolezni.
3. Serumske koncentracije analitov, vpletenih v imunopatologijo GCA, bodo pri bolnikih z GCA in kasnejšim poslabšanjem bolezni različne v času odvzema ob postavitvi diagnoze, ko še ni bilo prisotnega poslabšanja bolezni (t_0), in v času odvzema ob pojavu poslabšanja bolezni (t_1).
4. Izražanje genov za molekule, vpletene v imunopatologijo GCA, bo različno v tkivu bioptičnih vzorcev temporalnih arterij bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA in bolnikov, ki nimajo histološko potrjene diagnoze GCA, vendar je obstajal utemeljen sum na GCA.

2.2 CILJI

1. Določiti koncentracijo 17 različnih proteinov (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-22, IL-33, MMP-2, MMP-9, MMP-12, ICAM-1, VCAM-1, L-selektin in hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3-L1)), vpletenih v imunopatologijo GCA, v serumu bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA, brez in s kasnejšim poslabšanjem bolezni, v serumu bolnikov s histološko ovrženo diagnozo GCA in v serumu zdravih krvodajalcev s pomočjo metode hkratne analize več različnih analitov (Luminex xMAP).
2. Slediti koncentracijam teh analitov longitudinalno (0, 3, 6, 12 mesecev po postavitvi diagnoze) in s tem longitudinalno opredeliti njihove koncentracije pri bolnikih in jih povezati s potekom bolezni.
3. Izolirati RNA iz tkiva bioptičnega vzorca temporalne arterije bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA in bolnikov, ki nimajo histološko potrjene diagnoze GCA, vendar je obstajal sum na GCA.
4. Obratno prepisati vzorce RNA ter kvantitativno določiti izražanje genov za TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-9, MMP-12, tkivne inhibitorje metaloproteinaz (TIMP-1 in TIMP-2), ICAM-1, VCAM-1, superoksid dismutazi (SOD1 in SOD2), MARCO, feritin, apoA1 in označevalcev za granulocite, limfocite B ter makrofage, ki so vpleteni v imunopatologijo GCA in prisotni v arterijah bolnikov s histološko potrjeno in ovrženo diagnozo GCA, s tehniko kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (QPCR).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

- gostotni gradient Ficoll-paque™ plus, GE Healthcare, Švedska
- medij za rast celic (RPMI) Gibco®RPMI 1640 Medium, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, ZDA
- barvilo tripan modro, Trypan Blue Stain (0,4%), Invitrogen™, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, ZDA
- 2-merkaptotanol, $\text{OHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, elektroforezna čistost, Merck, Darmstadt, Nemčija
- 96% etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, raztopina 70% in 80% etanola, Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Nemčija

3.1.2 Analizni kompleti

1. Komplet za izolacijo RNA iz krvnih celic (RNeasy® Plus Micro kit), Qiagen, Hilden, Nemčija:
 - mini kolone za elucijo RNA (RNeasy MinElute® Spin Columns)
 - zbiralne epice (Collection Tubes) 1,5 ml in 2 ml
 - pufer RLT plus (lizirajoči pufer, ki vsebuje gvanidinijev tiocianat)
 - pufer RW1 (pufer za spiranje)
 - pufer RPE (pufer za spiranje)
 - voda brez vsebujočih ribonukleaz
2. Komplet za izolacijo RNA iz tkiva miRCURY™ RNA Isolation Kit-Tissue, Exiqon, Vedbaek, Danska:
 - raztopina za liziranje vzorca (Lysis solution)
 - proteinaza K
 - raztopina za spiranje
 - elucijski pufer
 - mini kolone za RNA
 - zbiralne epice
 - voda brez vsebujočih ribonukleaz

3. Komplet za reverzno transkripcijo RNA (Reverse Transcription System), Promega, Madison, Wisconsin, ZDA:

- AMV reverzna transkriptaza
- rekombinantni ribonukleazni inhibitor (RNasin® Ribonuclease Inhibitor)
- oligonukleotidni začetniki (oligo dT), 0,5 µg/µl
- mešanica deoksiribonukleotidtrifosfatov (dNTP), 10 mM
- pufer za reverzno transkripcijo, 10x koncentrirana raztopina (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton® X-100)
- magnezijev klorid (MgCl₂), 25 mM
- voda brez vsebujočih ribonukleaz

4. Komplet za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (QPCR) Kapa SYBR® FAST qPCR Kit Master mix (2X) ABI Prism™, Kapabiosystems, Boston, ZDA

5. Liofilizirani oligonukleotidni začetniki, Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, ZDA

6. Analizni komplet Luminex® Bead-Based Multiplex Kits, R&D Systems, Abingdon, VB:

- mešanica standardov, ki vsebuje liofilizirane rekombinantne človeške biološke kazalnike
- polistirenske mikrokroglice, na katere so vezana človeška primarna protitelesa
- sekundarna protitelesa označena z biotinom
- koncentrat streptavidina, konjugiran s fikoeritrinom
- pufer za redčenje RD2-1
- kalibrator RD6-52
- spiralni pufer
- mikroploščica s filtrom

3.1.3 Oprema

- centrifuga Universal 32R, Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- centrifuga Mikro 1120, Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Nemčija
- centrifuga 5430R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- mini centrifuga Hermle, Labnet International, Edison, NJ, ZDA
- mikroskop Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japonska
- avtomatski števec celic Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen™, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA
- homogenizator za tkiva TissueLyser LT, Qiagen, Hilden, Nemčija
- UV-VIS spektrofotometer NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, ZDA
- aparatura za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems®, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, ZDA
- vodna kopel Water Bath TW8, Julabo, Seelbach, Nemčija
- vibracijski mešalnik Vortex Genie 2, Scientific industries, New York, ZDA
- pipete Research plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- večkanalne pipete Research plus (100 µl, 300 µl), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- sterilni pipetni nastavki (10 µl, 100 µl, 300 µl, 1000 µl), Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- avtoklav A-11, Kambič, Laboratorijska oprema d.o.o., Semič, Slovenija
- aparatura za PCR v realnem času Step One Real-Time PCR System, Applied Biosystems®, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, ZDA
- mikrotitrna ploščica MicroAmp™, 48 well, Applied Biosystems®, Life Technologies, Waltham, Massachusetts, ZDA
- aparatura za hkratno analizo več različnih analitov v serumu Luminex xMAP® Technology, Luminex® Corporation, Austin, Texas, ZDA
- vakuumaska črpalka Vacusafe Comfort, Ibs-Integrated biosciences Inc., Pensilvanija, ZDA
- zbiralnik za tekočino po filtriranju Multiscreen™ HTS Vacuum Manifold, Millipore Corporation, Billerica, MA, ZDA
- stresalnik MS1 Minishaker, IKA®, Staufen, Nemčija

3.1.4 Biološki material in preiskovanci

V presečno študijo je bilo vključenih:

- 18 bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA, katerim se bolezen kasneje ni poslabšala,
- 22 bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA in kasnejšim poslabšanjem bolezni,
- 8 preiskovancev s histološko ovrženo diagnozo GCA in utemeljenim sumom na GCA,
- 8 zdravih krvodajalcev.

Pri skupini bolnikov brez poslabšanja bolezni je bil analiziran vzorec seruma odvzet ob času postavitve diagnoze. Pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni smo v raziskavo vključili dva vzorca seruma, pri čemer je bil prvi vzorec odvzet ob času postavitve diagnoze (ob izvedbi biopsije), ko poslabšanje bolezni še ni bilo prisotno (t_0), drugi pa časovno čim bližje pojavu poslabšanja bolezni (t_1). Poslabšanje bolezni je bilo opredeljeno kot povrnitev kliničnih znakov, značilnih za GCA in/ali povečane vrednosti laboratorijskih označevalcev vnetja (ESR, CRP). Skupaj smo tako analizirali 78 vzorcev serumov.

V longitudinalno študijo je bilo vključenih 18 bolnikov s potrjeno diagnozo GCA, od tega 9 bolnikov brez poslabšanja bolezni in 9 bolnikov s prisotnim poslabšanjem bolezni. Od istih bolnikov smo pridobili več različnih vzorcev serumov, odvzetih v različnih časovnih obdobjih: ob času postavitve diagnoze (t_0) in po 3 (t_1), 6 (t_2) ter 12 mesecih (t_3) od uvedbe terapije, kjer je bilo to le mogoče. Skupaj smo tako analizirali 81 različnih vzorcev serumov.

Podatke o bolnikih, kot so datum biopsije temporalne arterije oziroma postavitve diagnoze, datum poslabšanja bolezni in koncentracijo SAA in IL-6 v vzorcih serumov smo pridobili iz medicinske dokumentacije, vodene na KO za revmatologijo, UKC Ljubljana. Vzorci serumov so bili shranjeni v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, UKC Ljubljana, na -80°C . Starost serumskih vzorcev je bila od 0 do 3 let.

Pri določanju razlik v genski ekspresiji smo v analizo vključili mRNA iz tkiv bioptičnih vzorcev temporalnih arterij:

- 6 bolnikov s histološko ovrženo diagnozo GCA in utemeljenim sumom na GCA,
- 4 bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA brez poslabšanja bolezni,
- 2 bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA in poslabšanjem bolezni.

Skupaj smo primerjali izražanje 19 različnih genov na 12 različnih bioptičnih vzorcih tkiv temporalnih arterij. Tkiva temporalnih arterij so bila del tkiva odvzetega ob biopsiji, potrebnega za postavitev diagnoze in shranjena v tekočem dušiku, v Laboratoriju za imunologijo revmatizma, KO za revmatologijo, UKC Ljubljana. Za testiranje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili vzorce RNA iz belih krvnih celic, izoliranih iz periferne krvi, odvzete z antikoagulantom EDTA in na vzorcih RNA iz človeških endotelijskih celic koronarne arterije (HCAEC), stimuliranih s SAA 244, 1000 mM.

Raziskava je bila odobrena s strani Komisije za medicinsko etiko, od preiskovancev pa so bili pridobljeni prostovoljni pristanki.

3.2 METODE

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali več različnih metod, s katerimi smo prišli do zastavljenih ciljev. V vzorcih seruma smo koncentracijo analitov določali z metodo hkratne analize več različnih analitov (Luminex xMAP® Technology, Luminex® Corporation, Texas, ZDA), rezultate pa nato statistično obdelali in jih grafično prikazali s pomočjo računalniških programov Microsoft Excel in Graph Pad Prism 5.0. Normalnost porazdelitve podatkov smo preverili s Shapiro-Wilkovim testom in ugotovili, da podatki niso bili normalno porazdeljeni. Zato smo uporabili še neparametrični Kruskal-Wallisov test, s katerim smo preverili, ali se v medianah pri različnih skupinah preiskovancev pojavljajo statistično značilne razlike. Za primerjavo median različnih skupin med seboj smo uporabili še Dunnov test. Pri določevanju količine mRNA oziroma preučevanju razlik v izražanju genov v tkivu iz temporalnih arterij smo se poslužili kvantitativne določitve mRNA s PCR, s pomočjo aparature in računalniškega sistema StepOne (Applied Biosystems®, Life Technologies, ZDA). Prav tako smo za testiranje oligonukleotidnih začetnikov na vzorcih belih krvnih celic in HCAEC uporabljali aparaturo StepOne. Za izračun normaliziranega razmerja v izražanju genov smo uporabili računalniški program qGENE, podatke pa grafično prikazali s pomočjo programa Microsoft Excel.

3.2.1 Metoda hkratne analize več različnih analitov (Luminex xMAP)

Metodo smo uporabili za določitev različnih proteinov, povezanih z imunopatologijo GCA, v vzorcih serumov. Na polistirenskih mikrokroglicah so vezana specifična primarna protitelesa, ki prepoznajo določen tarčni analit. Mikrokroglice so različno obarvane, glede

na posamezni analit, ki se veže. Po nanosu vzorcev oziroma standardov, primarna protitelesa prepoznajo specifičen analit (antigen) iz vzorca in se nanj vežejo. Sledi dodatek sekundarnih protiteles z vezanim biotinom, ki se specifično vežejo na tarčni analit oziroma antigen, ki ga določamo v vzorcu. Nato dodamo streptavidin, konjugiran s fikoeritrinom. Streptavidin se veže z biotinom z močno nekovalentno vezavo. Na koncu sledi še optična detekcija, s pomočjo dveh laserjev: prvi prepozna barvo mikrokroglice in identificira ustrezen analit, drugi zazna jakost signala fikoeritrina, ki je premosorazmeren z vezano količino analita v vzorcu.

Postopek analize smo začeli tako, da smo na ploščico nanесли vzorce serumov, ki smo jih prej redčili v razmerju 1:2, kot je priporočeno s strani proizvajalca (R&D Systems, Abingdon, VB), kontrolo ozadja in standarde. Iz standardov z znano koncentracijo analitov smo pripravili serijo redčitev s faktorjem redčitve 3. S pomočjo računalniškega programa Luminex 100 Integrated system 2,3, smo vnesli podatke o redčitvah in določili ustrezno mesto nanosa standardov, vzorcev in kontrole ozadja na ploščici ter določili pogoje poteka reakcije (priporočene s strani proizvajalca-R&D Systems, Abingdon, VB). Računalniški program je na podlagi standardov izrisal standardno krivuljo in izračunal koncentracije tarčnih analitov v vzorcih serumov. Podatke smo nato še statistično obdelali in jih grafično prikazali.

Pri prvi analizi vzorcev serumov smo določali koncentracijo 17 različnih analitov: TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-22, IL-33, MMP-2, MMP-9, MMP-12, ICAM-1, VCAM-1, L-selektin in CHI3-L1. V longitudinalni študiji smo v vzorcih serumov z isto metodo določali koncentracijo analitov, katerih koncentracija je bila pri prvi analizi nad mejo detekcije in pri katerih so se pokazale določene razlike v koncentracijah med skupinami. Tako smo spremljali vpliv zdravljenja z GS na koncentracijo 10 različnih analitov: TNF- α , IL-4, IL-8, IL-12, MMP-2, MMP-9, ICAM-1, VCAM-1, L-selektin in CHI3-L1.

3.2.2 Izolacija belih krvnih celic iz periferne krvi

Pred začetkom določanja količine mRNA v vzorcih tkiva iz temporalnih arterij, smo oligonukleotidne začetnike najprej testirali na vzorcih RNA iz belih krvnih celic. Prav tako smo preverili, ali se geni, katerih izražanje smo kasneje določali na vzorcih tkiv iz

temporalnih arterij bolnikov, dobro izražajo na belih krvnih celicah. Vzorci tkiv temporalnih arterij bolnikov so namreč zelo dragocen material, pridobljen na invaziven način, v majhnih količinah. Pred kvantitativno določitvijo mRNA s QPCR je bilo zato potrebno bele krvne celice izolirati iz vzorcev periferne krvi. Uporabili smo 3 ml vzorca periferne krvi, odvzete z antikoagulantom EDTA in jo redčili s 6 ml s fosfatom pufrane fiziološke raztopine (PBS, pH=7,2). Redčen vzorec krvi smo nanесли na 20 ml gostotnega gradienta (Ficoll-paque™ plus, GE Healthcare, Švedska). Vzorec smo najprej pustili na sobni temperaturi 30 min, temu je sledilo še centrifugiranje 30 min na 300g, pri 23°C. Eritrociti so se tako posedli na dno, plazma je ostala na vrhu, v sredini pa je nastal bel obroč belih krvnih celic. Bel obroč smo s pipeto previdno odstranili in celice prenesli v novo 50 ml epruveto. Sledilo je spiranje in dodatek PBS, tako da je skupni volumen znašal 30 ml. Temu je sledilo centrifugiranje 12 min na 350g, pri 23°C. Supernatant smo nato odlili, dodali 30 ml PBS in ponovno centrifugirali 12 min na 350g, pri 23°C. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 3 ml tekočega medija za rast celic (RPMI). Nato smo celice s pomočjo barvila tripan modro prešteli v aparatu za štetje celic (Countess™ Automated Cell Counter, Invitrogen™, ZDA). Vzorec celic smo redčili s tekočim medijem, tako da smo dobili želeno število celic ($1,0 \times 10^6$). Sledilo je centrifugiranje 12 min na 350g, pri 23°C in odlitje supernatanta. Iz izoliranih belih krvnih celic je nato sledila še izolacija RNA.

3.2.3 Izolacija RNA iz belih krvnih celic

RNA smo iz belih krvnih celic izolirali s pomočjo analiznega kompleta za izolacijo RNA (RNeasy® Plus Micro kit, Qiagen, Hilden, Nemčija). Pri tem smo sledili opisanemu postopku oziroma navodilom proizvajalca. Izoliranemu vzorcu RNA smo nato še izmerili absorbanco pri 260, 280 in 230 nm s spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ZDA). Tako smo preverili čistost RNA, saj pri 280 nm absorbirajo aminokisline oziroma proteini, pri 230 nm pa organska topila. Razmerje med absorbancami pri 260 nm, 280 nm in 230 nm je pri čistem vzorcu RNA 1:2:1. Če so te vrednosti nižje, to pomeni prisotnost nečistoč - DNA ali proteinov. S pomočjo izmerjene absorbance pri 260 nm, smo nato izračunali še koncentracijo RNA v vzorcu. Vzorec z absorbanco enako 1 vsebuje 40 µg/ml RNA.

3.2.4 Izolacija RNA iz vzorca tkiva temporalne arterije

RNA smo iz vzorca tkiva iz temporalnih arterij izolirali s pomočjo analiznega kompleta za izolacijo RNA iz tkiv (miRCURY™ RNA Isolation Kit-Tissue, Exiqon, Danska). Pri tem smo sledili postopku in navodilom, priporočenimi s strani proizvajalca. Predhodno je bilo potrebno vzorec tkiva še homogenizirati s homogenizatorjem za tkiva (TissueLyser LT, Qiagen, Nemčija). Izoliranemu vzorcu RNA smo nato z merjenjem absorbance pri 260, 280 in 230 nm s spektrofotometrom NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, ZDA) preverili čistost in izračunali koncentracijo.

3.2.5 Obratna transkripcija RNA

Obratna transkripcija, v kombinaciji s QPCR, je najobčutljivejša metoda za določevanje količine mRNA. Za razliko od DNA, ki je stabilna, je RNA zelo občutljiva, ko jo sprostimo iz celice. Poleg tega pa RNA ne more služiti kot matrica pri QPCR reakciji. Prvi korak je zato obratna transkripcija matrice RNA v cDNA, ki ji sledi pomnoževanje s QPCR reakcijo (44). Za omenjeni postopek smo uporabili komplet za obratno transkripcijo RNA (Reverse Transcription System, Promega, ZDA). Pripravili smo 14,4 µl reakcijske mešanice (Preglednica I) in dodali 15,6 µl vzorca, ki je vseboval 0,5 µg RNA in vodo brez ribonukleaz.

Preglednica I: Reakcijska mešanica za obratno transkripcijo RNA

Sestavine mešanice	Količina
1 x RT pufer (10,0 mM Tris-HCl, 50,0 mM KCl, 0,1% Triton X-100)	3,00 µl
dNTP (1,0 mM)	3,00 µl
MgCl ₂ (5,0 mM)	6,00 µl
oligo dT (0,5 µg/µl)	1,00 µl
RNAzni inhibitor (1,0 u/µl)	0,75 µl
AMV RT (15,0 u/µg)	0,60 µl
voda brez nukleaz	0,05 µl
skupni volumen mešanice	14,40 µl
vzorec RNA	15,60 µl
skupni volumen	30,00 µl

Ustreden volumen vzorca RNA, ki smo ga dodali reakcijski mešanici, smo predhodno izračunali s pomočjo merjenja absorbance pri 260 nm. Pri absorbanci enaki 1 je v vzorcu

40 µg/ml RNA. Če je bil ta volumen manjši od 15,6 µl, smo dodali ustrezen volumen vode brez ribonukleaz, da smo dobili želeno koncentracijo. Sledila je reakcija obratne transkripcije po naslednjem programu inkubacije: 30 min na 43°C, 30 min na 53°C in 5 min na 94°C. Na koncu smo vzorec cDNA redčili, v razmerju 1:4, do skupnega volumna 120 µl. Vzorce smo nato shranili na -20°C oziroma jih takoj uporabili za QPCR.

3.2.6 Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo

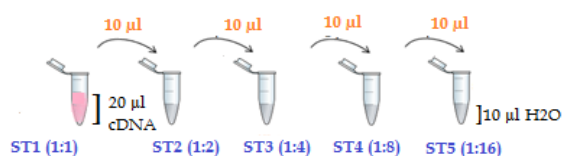
Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda, s katero pomnožujemo nukleinske kisline. S pomočjo te metode je možno pomnožiti veliko kopij določenega odseka DNA, v zelo kratkem času. Za uspešen potek reakcije so potrebni: vzorec DNA, ki služi kot matrica, encim termostabilna polimeraza, oligonukletidna začetnika, mešanica deoksinukleozid-trifosfatov, Mg ioni in reakcijski pufer. Pri metodi QPCR, v nasprotju s PCR, količino produkta spremljamo po vsakem ciklu in ne le na koncu reakcije. Tako lahko s spremljanjem reakcije in merjenjem fluorescence v eksponentni fazi določimo absolutno ali relativno začetno količino števila kopij v vzorcu (44, 45). Pri naši raziskavi smo za detekcijo uporabili fluorescenčno barvilo SYBER GREEN I. Barvilo se nespecifično veže oziroma vrine med dva para baz v dvoverižno DNA. Prost SYBR GREEN ima nezaznavno fluorescenco, vezan v dvoverižno DNA pa močno fluorescira. Jakost fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNA. Pred začetkom reakcije smo pripravili reakcijsko mešanico za QPCR (Preglednica II) s sestavinami kompleta za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (Kapa SYBR® FAST qPCR Kit Master mix (2X) ABI Prism™, ZDA).

Preglednica II: Reakcijska mešanica za QPCR reakcijo

Sestavine mešanice	Količina
KAPPA fast	6,00 µl
F primer (10,0 nM)	0,24 µl
R primer (10,0 nM)	0,24 µl
voda brez nukleaz	3,60 µl
skupni volumen	10,08 µl
vzorec cDNA	1,92 µl
skupni volumen	12,00 µl

10,08 μ l reakcijske mešanice smo nanesti na mikrotitrsko ploščico (MicroAmp™, 48 well, Applied Biosystems®, Life Technologies, Waltham, ZDA) in dodali 1,92 μ l vzorcev cDNA. Najprej smo na različnih vzorcih cDNA preverili ali se oligonukleotidni začetniki dobro pomnožujejo, ali imajo ustrezne talilne krivulje in ali se gen v vzorcu dobro izraža. Za testiranje oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili vzorce cDNA iz belih krvnih celic in HCAEC. Za mejo smo postavili zaznavo fluorescence do cikla 30. Poleg vzorcev smo na ploščico nanesti še kontrolo ozadja (namesto cDNA je vsebovala vodo brez nukleaz) in endogeno kontrolo (beta aktin). Pomnoževanje je potekalo s pomočjo aparature za QPCR StepOne (Applied Biosystems®, Life Technologies, ZDA). V računalniškem programu, povezanim z aparaturom, smo določili razporeditev posameznih vzorcev, mesto nanosa kontrole ozadja in endogene kontrole na ploščici in določili pogoje verižne reakcije. Najprej smo vzorce za 3 min segreli na 95°C za aktivacijo polimeraze, nato je sledilo 40 ciklov, ki vključujejo denaturacijo cDNA (3 s na 95°C), prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige (30 s na 60°C). Program je po pomnožitvi izrisal krivuljo, ki predstavlja jakost fluorescence v vsakem ciklu pomnoževanja. Na eksponentnem delu krivulje je program za vsak vzorec določil prazni cikel (C_t), v katerem je jakost fluorescence vzorca statistično značilno višja od jakosti fluorescence ozadja (prazna vrednost). Vrednosti C_t so obratno sorazmerne z začetnim številom kopij DNA (45). Poleg C_t je pomemben parameter QPCR tudi talilna krivulja barvila SYBER GREEN. Pomembno je, da ima talilna krivulja le en specifičen vrh, kar dokazuje, da smo pomnožili le en specifičen produkt.

Če se je gen dobro izrazil v vzorcu krvnih celic oziroma v vzorcih HCAEC in je bila talilna krivulja ustrezna, smo kasneje iz istih vzorcev pripravili standarde, ki smo jih serijsko redčili in izrisali še standardne krivulje, s pomočjo katerih smo določili učinkovitost pomnoževanja posamezne cDNA. Pripravili smo 4 različne redčitve standardov, v razmerjih: 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16 (Slika 3).



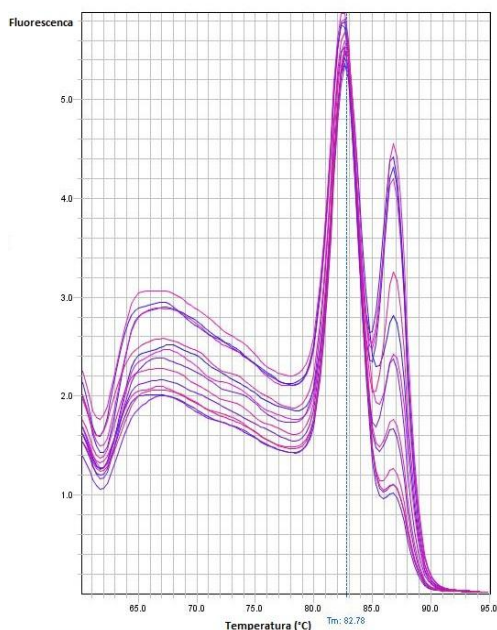
Slika 3: Prikaz priprave standardov za QPCR reakcijo

Poleg standardov in vzorcev cDNA smo na ploščico nanesti še kontrolo ozadja. Vse smo nanašali v duplikatih za posamezen gen, ki smo ga želeli pomnožiti. Računalniško smo zopet določili pogoje reakcije, razporeditev standardov in ustrezno redčitev, položaj vzorcev ter položaj kontrole ozadja na ploščici. Računalniški program pa je določil C_t za vsak vzorec oziroma standard. Za izris standardne krivulje, izračun koeficienta in učinkovitosti ter kvadrat Pearsonovega koeficienta (R^2) smo uporabili poseben program qGENE. Na osnovi pridobljenih podatkov (C_t) je program izrisal standardno krivuljo, ki prikazuje logaritem začetnega števila kopij cDNA v odvisnosti od C_t . Premica, oziroma naklon premice, nam služi za izračun učinkovitosti pomnoževanja (E) (Enačba 1). Poleg učinkovitosti smo izračunali še kvadrat Pearsonovega korelacijskega koeficienta, ki opisuje linearno povezanost dveh spremenljivk. Idealno je kvadrat Pearsonovega koeficienta med 0,98 in 1,0, učinkovitost pomnoževanja pa med 85% in 105%.

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{naklon standard .krivulje}}\right)} - 1$$

Enačba 1: Izračun učinkovitosti pomnoževanja

V naslednjem koraku smo najprej preverili, kako dobro se posamezni geni sploh izražajo na vzorcih iz tkiva temporalnih arterij. Po zgoraj opisanem postopku smo reakcijski mešanici za posamezen gen dodali ustrezen volumen vzorca cDNA, ki smo ga predhodno prepisali iz RNA, izolirane iz bioptičnih tkiv temporalnih arterij dveh bolnikov z GCA. Določili smo pogoje reakcije in postavitev vzorcev ter kontrole ozadja. Sledila je reakcija QPCR in računalniška določitev C_t . Če je bil C_t za posamezen gen manjši od 30 in so bile talilne krivulje ustrezne, je sledila nadaljnja analiza večjega števila vzorcev in primerjava razlik v izražanju genov med različnimi vzorci tkiv temporalnih arterij. Skupno smo v vzorcih tkiv temporalnih arterij testirali izražanje 49 različnih genov, od tega se jih 28 v tkivu temporalne arterije ni dovolj dobro izražalo (C_t večji od 30). Izražanje preostalih 21 genov pa smo nato primerjali na večjem številu različnih vzorcev tkiv temporalnih arterij bolnikov. Pri primerjavi različnih vzorcev smo ugotovili, da dva oligonukleotidna začetnika ne ustrezata pogojem (neustrezne talilne krivulje) (Slika 4). Skupaj smo zato primerjali izražanje 19 različnih genov.



Slika 4: Neustrezna talilna krivulja oligonukleotidnih začetnikov

V našem primeru smo kot referenčni gen uporabili gen za beta-aktin. Na mikrotitrsko ploščico smo tako nanesti kontrolo ozadja, vzorce cDNA iz tkiv temporalne arterije in referenčni gen. Vse smo nanašali v duplikatih. Poleg tega smo določili vzorec, glede na katerega smo kasneje primerjali izražanje genov v ostalih vzorcih. S pomočjo računalniškega programa smo določili položaj vzorcev, kontrole ozadja in referenčnega gena ter določili pogoje reakcije. Računalniški program pa je določil C_t za posamezne vzorce in gene. Rezultate smo nato vnesli v program qGENE, ki je, na podlagi izračunane učinkovitosti pomnoževanja posameznih genov in C_t , za različne vzorce določil izražanje tarčnega gena v vzorcih, normalizirano glede na izražanje referenčnega gena, po ustrezni enačbi (Enačba 2). Končni rezultat je bil tako graf, ki nam prikazuje povprečno izražanje tarčnega gena v vsakem vzorcu, ki je normalizirano glede na izražanje gena za beta aktin.

$$N = \frac{X_o}{R_o} = \frac{(1 + E_x)^{C_t(X)}}{(1 + E_R)^{C_t(R)}}$$

Enačba 2: Izračun normaliziranega razmerja med tarčnim in referenčnim genom, pri čemer je:

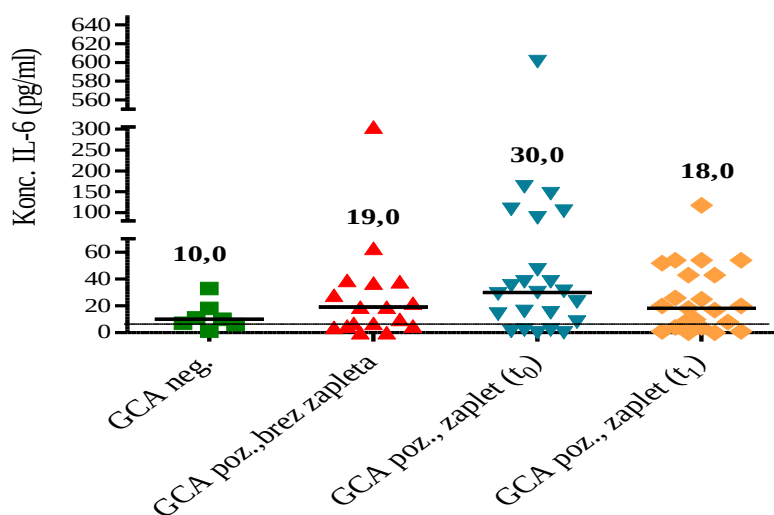
N = normalizirano razmerje, X_o = število začetnih kopij cDNA tarčnega gena, R_o = število začetnih kopij cDNA referenčnega gena, E_x = učinkovitost pomnoževanja tarčnega gena, E_R = učinkovitost pomnoževanja referenčnega gena, $C_t(X)$ = cikel, v katerem jakost fluorescence vzorca tarčnega gena preseže jakost fluorescence ozadja, $C_t(R)$ = cikel, v katerem jakost fluorescence vzorca referenčnega gena preseže jakost fluorescence ozadja.

4 REZULTATI

4.1 SERUMSKE VREDNOSTI ANALITOV

4.1.1 Citokini

Razlike v medianah serumskih koncentracij IL-6 med skupinami niso bile statistično značilne, opazimo pa, da so imeli bolniki s potrjeno diagnozo GCA, s ali brez kasnejšega poslabšanja bolezni, višje serumske koncentracije IL-6 kot preiskovanci s histološko ovrženo diagnozo GCA (GCA neg.). Koncentracije so bile pri bolnikih, ki niso doživeli poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta), nižje kot pri bolnikih, ki so kasneje doživeli poslabšanje bolezni, v vzorcu odvzetem ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanje bolezni še ni bilo prisotno (t_0). Koncentracija IL-6 je bila pri skupini bolnikov, s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze (t_0) najvišja, ob poslabšanju (t_1) pa se je koncentracija znižala (Slika 5).

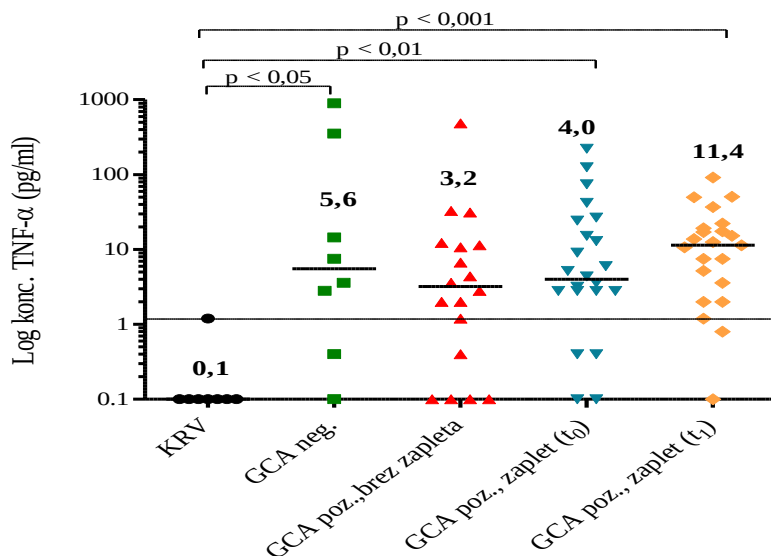


Slika 5: Koncentracije IL-6 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje prazno vrednost za IL-6 (95. percentil pri zdravi populaciji)-8,0 pg/ml. Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini.

Koncentracije TNF- α so bile pri zdravih krvodajalcih (KRV) večinoma pod mejo detekcije, medtem ko so bile pri skupinah bolnikov mediane višje. Statistično značilne razlike so se pojavile med skupino krvodajalcev in skupino bolnikov s kasnejšim poslabšanjem bolezni, tako ob času diagnoze (t_0) kot tudi ob času poslabšanja (t_1). Najvišja koncentracija TNF- α je bila v serumih bolnikov, ob času poslabšanja bolezni (t_1),

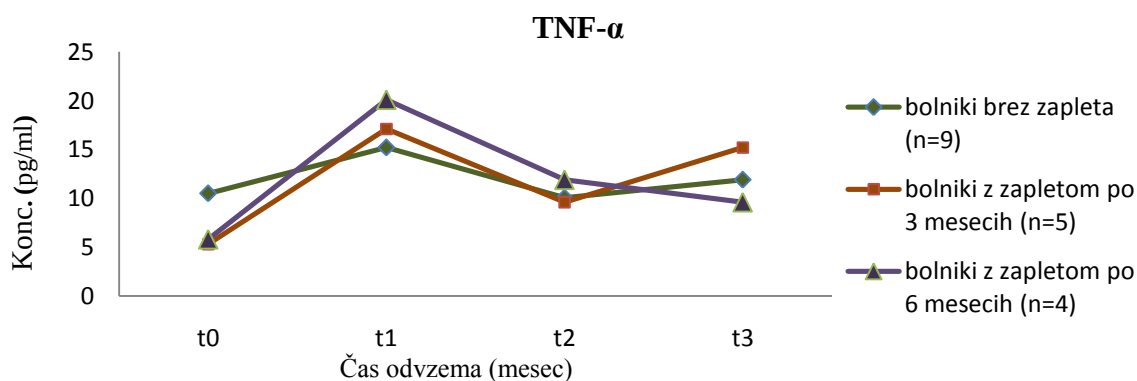
medtem ko je bila pri isti skupini ob času postavitve diagnoze, ko še ni bilo prisotnega poslabšanja bolezni (t_0), mediana nižja (Slika 6).



Slika 6: Koncentracije TNF- α v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za TNF- α (1,2 pg/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

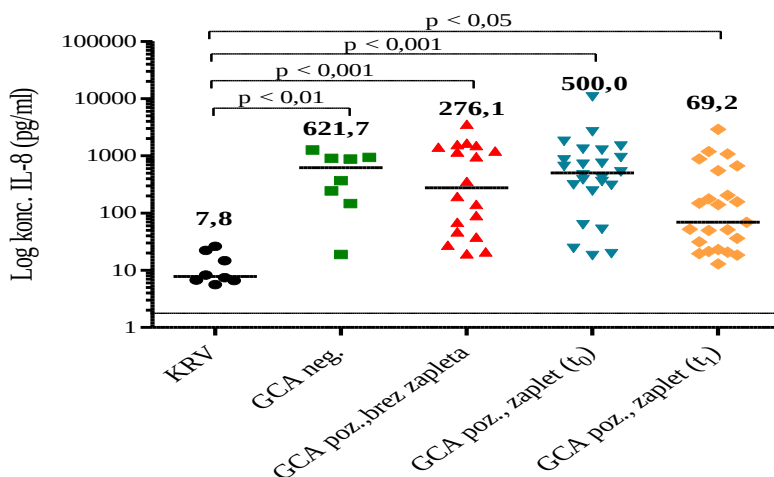
Mediane serumskih koncentracij TNF- α so se vsem bolnikom zvišale po 3 mesecih po postavitvi diagnoze in uvedbi zdravljenja (t_1) v primerjavi z medianami koncentracij ob postavitvi diagnoze (t_0). Po 6 mesecih (t_2) so se koncentracije vsem bolnikom ponovno znižale in se po 1 letu (t_3) zvišale, razen pri bolnikih, ki so po 6 mesecih doživeli zaplet, kjer so se po 1 letu serumske koncentracije znižale (Slika 7).



Slika 7: Koncentracije TNF- α v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

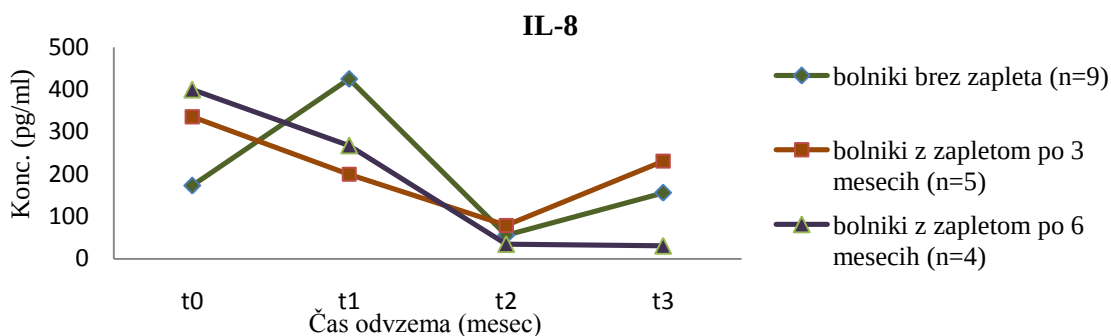
Mediane koncentracij IL-8 so bile pri vseh skupinah bolnikov statistično značilno višje kot mediana pri zdravih krvodajalcih (KRV). Mediana koncentracij je bila pri skupini bolnikov z GCA s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze, ko še ni bilo poslabšanja (t_0), višja kot pri skupini bolnikov brez poslabšanja (GCA poz., brez zapleta). Ob času poslabšanja bolezni, ko je bila terapija že uvedena (t_1), je bila pri teh bolnikih mediana nižja kot ob času postavitve diagnoze, ko še ni bilo poslabšanja (t_0) (Slika 8).



Slika 8: Koncentracije IL-8 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za IL-8 (1,8 pg/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

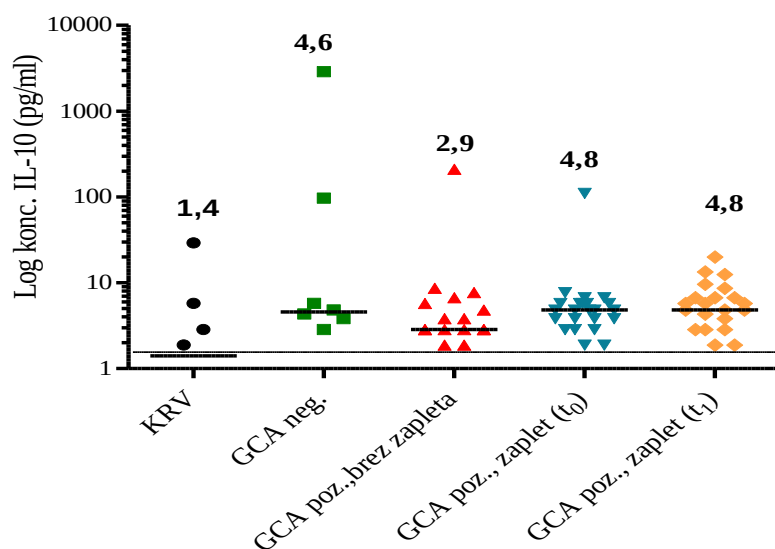
Bolnikom brez zapleta se je koncentracija IL-8 po 3 mesecih (t_1) zelo povišala v primerjavi s koncentracijo ob postavitvi diagnoze (t_0), po 6 mesecih padla (t_2) in se po 1 letu (t_3) spet zvišala. Pri bolnikih z zapletom je bila koncentracija najvišja ob času ob postavitvi diagnoze, po 3 in 6 mesecih se je znižala in se po 1 letu zopet zvišala (Slika 9).



Slika 9: Koncentracije IL-8 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

Serumske koncentracije IL-10 so bile pri večini preiskovancev zelo nizke. Najnižje koncentracije IL-10 smo določili v serumih zdravih krvodajalcev (KRV). Med posameznimi skupinami so se pojavile rahle razlike, ki pa niso bile statistično značilne. Opazimo pa, da je bila mediana koncentracij pri bolnikih z GCA, brez kasnejšega poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta) nižja kot pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni, tako ob času postavitve diagnoze (t_0) kot tudi ob času pojava poslabšanja bolezni (t_1) (Slika 10).



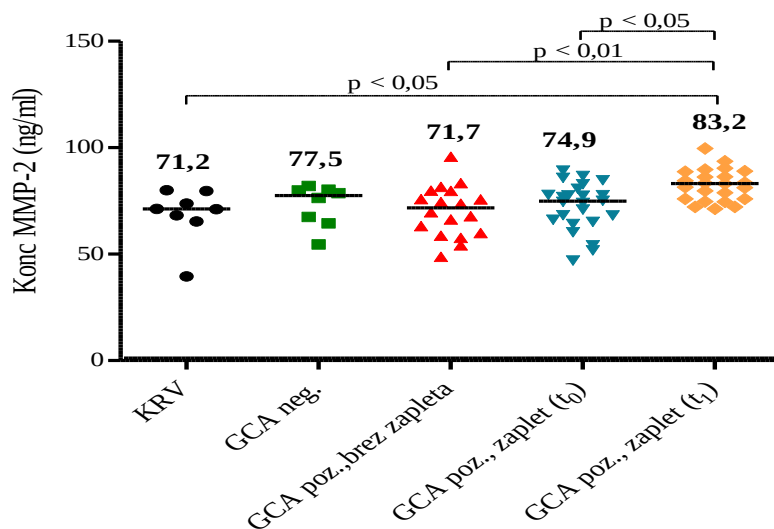
Slika 10: Koncentracije IL-10 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za IL-10 (1,6 pg/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini.

Pri ostalih analiziranih citokinih, kot so IL-2, IL-4, IL-12 in IFN- γ , so bile mediane serumskih koncentracij pri vseh skupinah pod mejo detekcije in le pri posameznikih so koncentracije presegle mejo detekcije, pri čemer so bile pri nekaterih od teh posameznikov koncentracije posameznih citokinov zelo visoke (npr. IL-12). Pri citokinih, kot so IL-17, IL-22 in IL-33, so bile koncentracije pri vseh skupinah na nivoju slepe in jih z izbrano metodo nismo uspeli zaznati.

4.1.5 Matriks metaloproteinaze

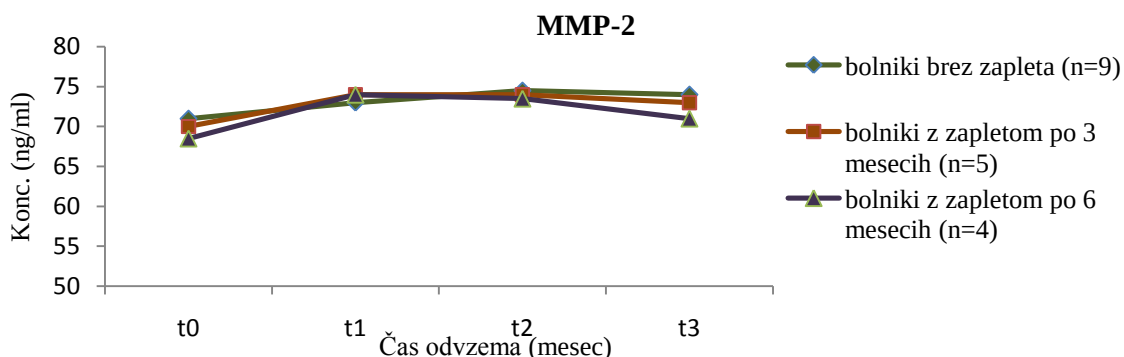
Mediane koncentracij MMP-2 niso bile statistično značilno različne med skupino krvodajalcev (KRV) in skupinami bolnikov, razen tistimi s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času poslabšanja (t_1), kjer je bila mediana višja. Pri skupini bolnikov s kasnejšim poslabšanjem bolezni, je bila mediana koncentracij statistično značilno višja ob času poslabšanja (t_1) kot ob času postavitve diagnoze, ko še ni bilo prisotnega poslabšanja bolezni (t_0) (Slika 11).



Slika 11: Koncentracije MMP-2 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za MMP-2 (0,11 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

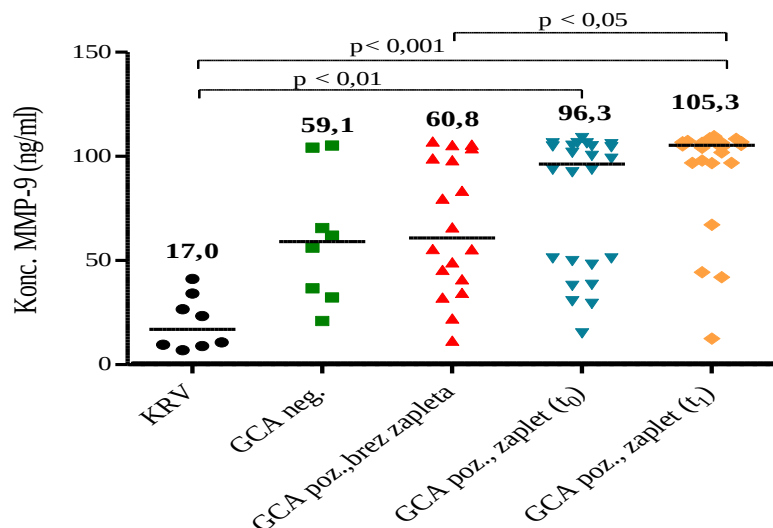
Longitudinalno so bile koncentracije MMP-2 pri vseh skupinah dokaj konstantne ob različnih časih odvzema vzorcev in se niso spreminjale niti glede na čas odvzema niti glede na čas pojava poslabšanja (Slika 12).



Slika 12: Koncentracije MMP-2 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

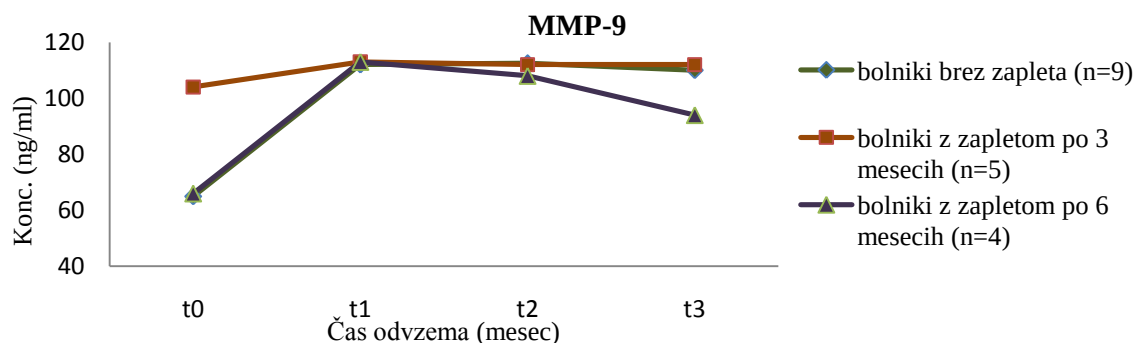
Mediana serumskih koncentracij MMP-9 je bila pri krvodajalcih (KRV) statistično značilno nižja kot pri bolnikih z GCA s kasnejšim poslabšanjem bolezni (t_0 in t_1). Višje vrednosti smo določili pri skupini bolnikov s kasnejšim poslabšanjem bolezni (t_0 in t_1) v primerjavi s skupino bolnikov, kjer se poslabšanje kasneje ne pojavi (GCA poz., brez zapleta). Razlika je bila statistično značilna ob času poslabšanja bolezni (t_1). Koncentracija MMP-9 je bila pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času poslabšanja (t_1) višja kot ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanje še ni bilo prisotno (t_0) (Slika 13).



Slika 13 : Koncentracije MMP-9 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za MMP-9 (0,01 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

Koncentracije MMP-9 so se pri vseh bolnikih zvišale po 3 mesecih (t_1) v primerjavi s časom ob postavitvi diagnoze (t_0). Po 6 (t_2) in 12 mesecih (t_3) je bila njihova koncentracija konstantna pri bolnikih brez zapleta in pri bolnikih z zapletom po 3 mesecih. Pri bolnikih z zapletom po 6 mesecih pa so se koncentracije po 6 in 12 mesecih znižale (Slika 14).

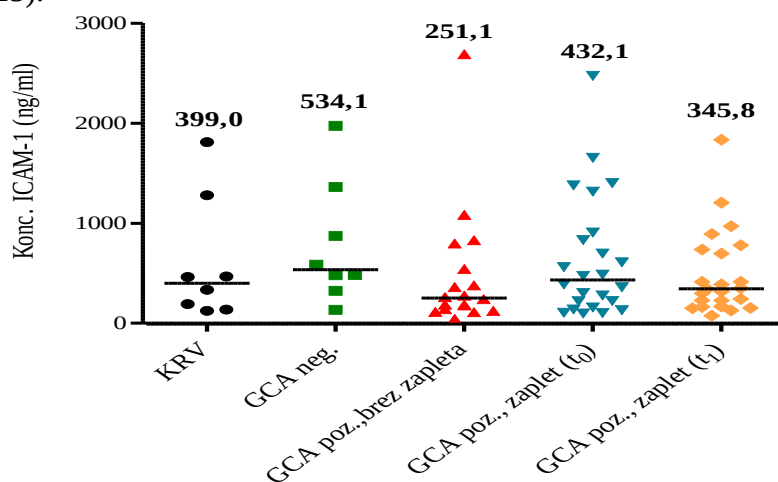


Slika 14: Koncentracije MMP-9 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

4.1.6 Adhezijske molekule

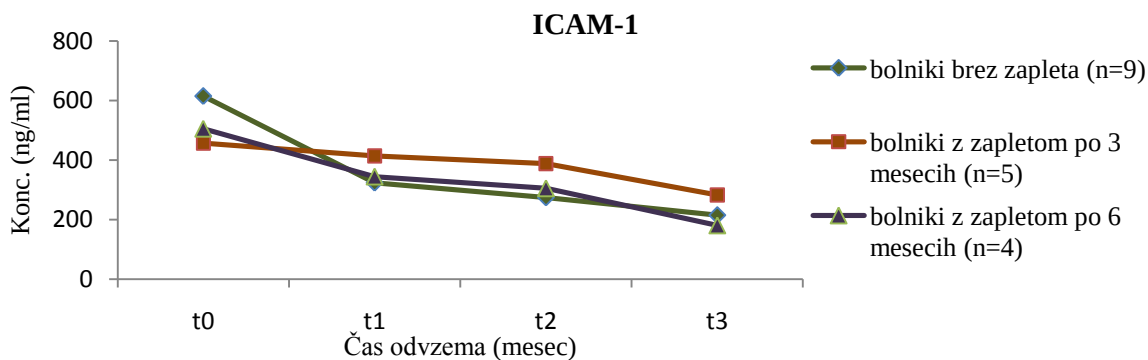
Serumske koncentracije ICAM-1 med skupinami niso bile statistično značilno različne. Pri skupini preiskovancev, kjer sum na GCA ni bil histološko potrjen (GCA neg.) so bile koncentracije najvišje. Mediane koncentracij ICAM-1 so bile pri bolnikih z GCA, pri katerih kasneje ni prišlo do poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta), nižje kot pri zdravih krvodajalcih (KRV). Vrednosti so bile nekoliko višje pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanje še ni bilo prisotno (t_0), v primerjavi z zdravimi krvodajalci (KRV) in so se ob času pojava poslabšanja (t_1) znižale (Slika 15).



Slika 15: Koncentracije ICAM-1 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za ICAM-1 (0,09 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini.

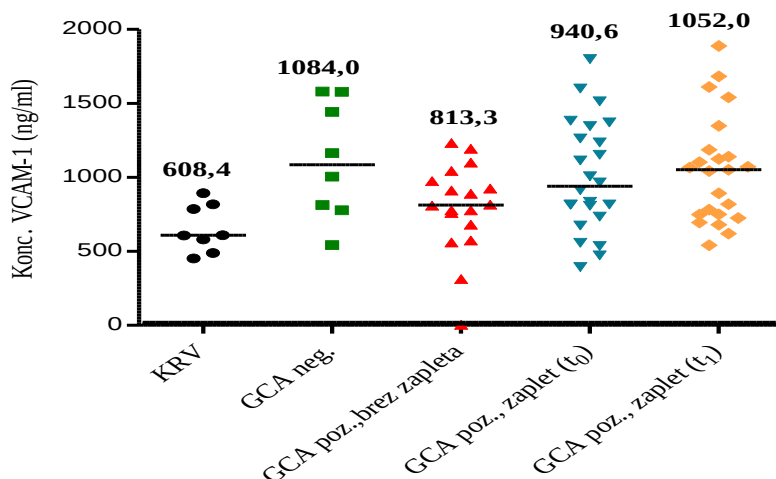
Longitudinalno spremljano so se serumske koncentracije ICAM-1 pri vseh skupinah bolnikov znižale po 3 (t_1), 6 (t_2) in 12 mesecih (t_3) po postavitvi diagnoze oziroma uvedbi zdravljenja v primerjavi s koncentracijami ob času postavitve diagnoze (t_0) (Slika 16).



Slika 16: Koncentracije ICAM-1 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

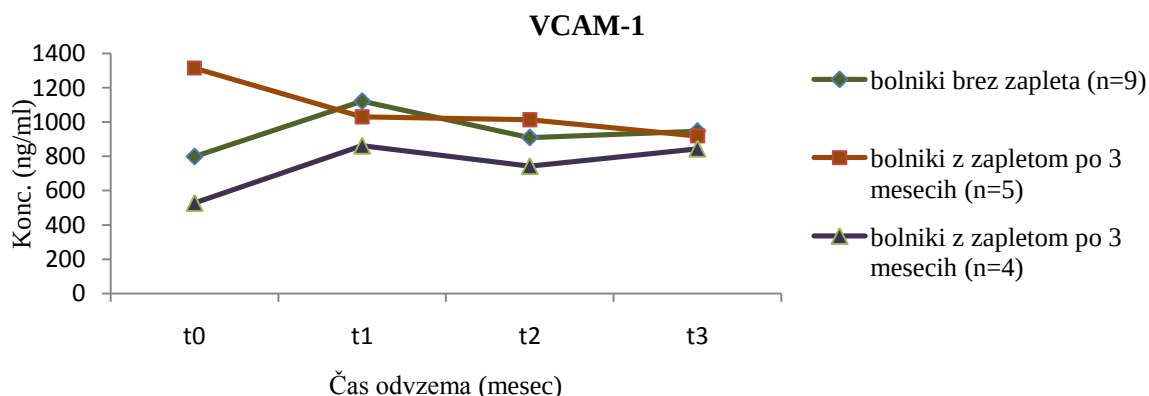
Vsi bolniki s histološko potrjeno (GCA poz.) in preiskovanci s histološko ovrženo diagnozo GCA (GCA neg.) so imeli višje mediane serumskih koncentracij VCAM-1 kot skupina zdravih krvodajalcev (KRV). Prav tako so imeli bolniki s kasnejšim poslabšanjem bolezni (t_0 in t_1), višje koncentracije VCAM-1 kot bolniki, ki kasneje niso doživeli poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta). Razlike med skupinami pa niso bile statistično značilne (Slika 17).



Slika 17: Koncentracije VCAM-1 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za VCAM-1 (0,24 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini.

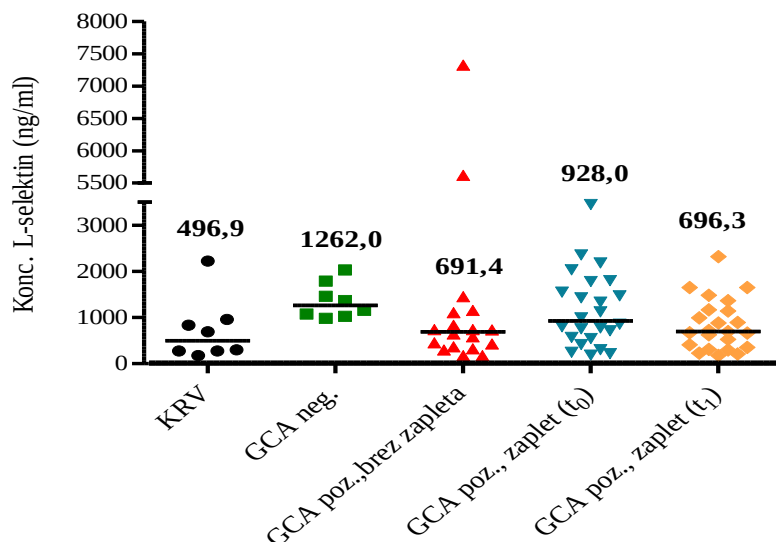
Koncentracije VCAM-1 so bile ob času diagnoze (t_0) najvišje pri bolnikih, ki so poslabšanje bolezni doživeli po 3 mesecih in so se nato znižale (t_1 , t_2 , t_3). Pri drugih dveh skupinah so se koncentracije po 3 mesecih zelo zvišale (t_1), po 6 mesecih znižale (t_2) in po 1 letu (t_3) spet zvišale (Slika 18).



Slika 18: Koncentracije VCAM-1 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

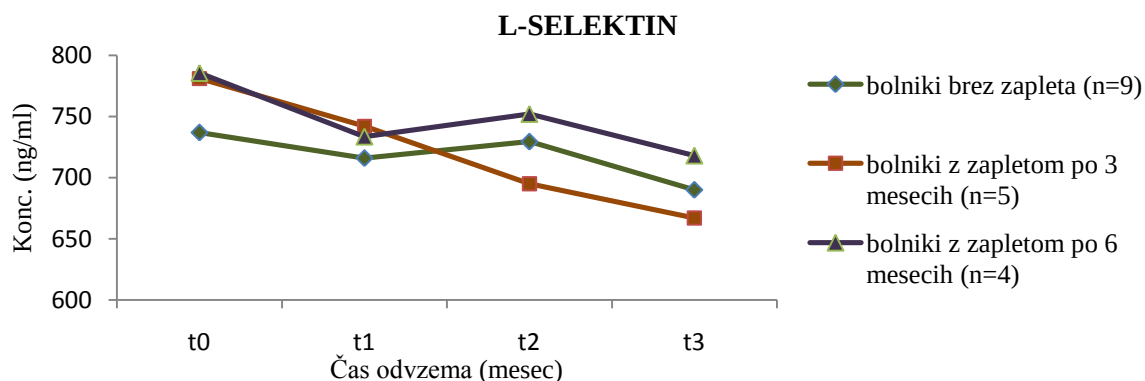
Tudi pri L-selektinu mediane koncentracij med skupinami niso bile statistično značilno različne. Izstopala sta le dva posameznika s potrjeno diagnozo GCA, ki sta imela zelo visoke serumske koncentracije L-selektina in pri katerih kasneje ni prišlo do poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta) (Slika 19).



Slika 19: Koncentracije L-selektina v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za L-selektin (0,11 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini.

Serumske koncentracije L-selektina so se, podobno kot pri VCAM-1, pri skupini bolnikov z zapletom po 3 mesecih znižale po 3 (t_1), 6 (t_2) in 12 mesecih (t_3) po postavitvi diagnoze (t_0). Pri ostalih dveh skupinah bolnikov so se koncentracije po 3 mesecih po postavitvi diagnoze znižale (t_1) v primerjavi s časom ob postavitvi diagnoze (t_0), po 6 mesecih (t_2) zvišale in po 1 letu (t_3) ponovno znižale (Slika 20).

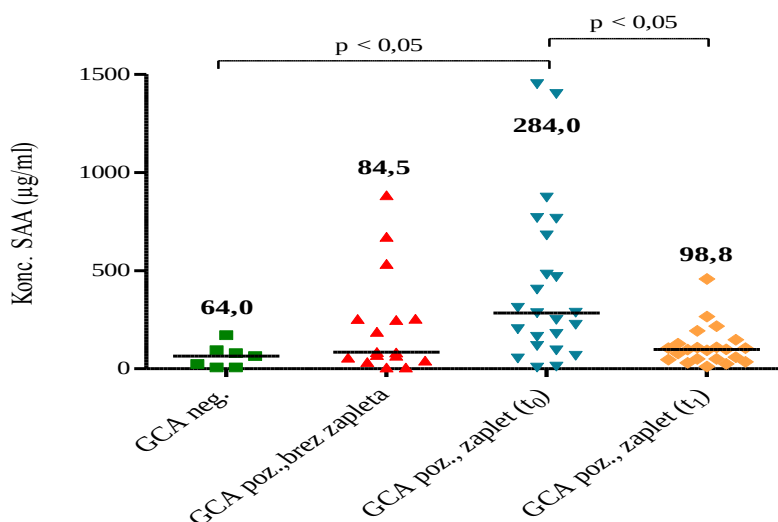


Slika 20: Koncentracije L-selektina v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

4.1.7 Serumski amiloid A

Če mediane testiranih skupin primerjamo s prazno vrednostjo (95. percentil pri zdravi populaciji) za SAA (6,4 µg/ml) opazimo, da so imele vse skupine bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA (GCA poz.) in preiskovanci s histološko ovrženo diagnozo GCA (GCA neg.) zelo povišane koncentracije SAA v primerjavi z zdravo populacijo. Mediana je bila pri bolnikih s histološko potrjeno diagnozo GCA (GCA poz.) višja kot pri bolnikih s sumom na GCA, ki pa ni bil histološko potrjen (GCA neg.). Mediana serumskih koncentracij je bila pri skupini bolnikov z GCA s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanja še ni bilo (t_0), statistično značilno višja od mediane pri isti skupini bolnikov ob času poslabšanja bolezni (t_1) in od mediane pri skupini bolnikov, kjer GCA ni bil histološko potrjen (GCA neg.) (Slika 21).



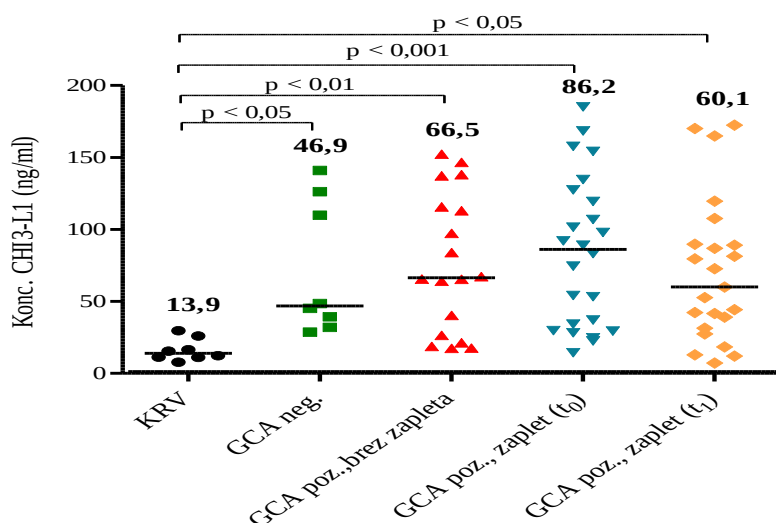
Slika 21: Koncentracija SAA v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje prazno vrednost za SAA (95. percentil pri zdravi populaciji) - 6,4 µg/ml. Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

4.1.8 Hitinazi 3 podoben protein 1

V primerjavi z mediano koncentracij CHI3-L1, določeno pri zdravih krvodajalcih (KRV), so imele vse skupine bolnikov s histološko potrjeno diagnozo GCA (GCA poz.) in skupina preiskovancev s histološko ovrženo diagnozo GCA (GCA neg.) statistično značilno višjo mediano. Pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni so bile serumske koncentracije ob času postavitve diagnoze, ko še niso doživeli poslabšanja (t_0), nekoliko višje kot ob času poslabšanja bolezni (t_1). Prav tako je bila mediana pri omenjeni skupini, ob času postavitve

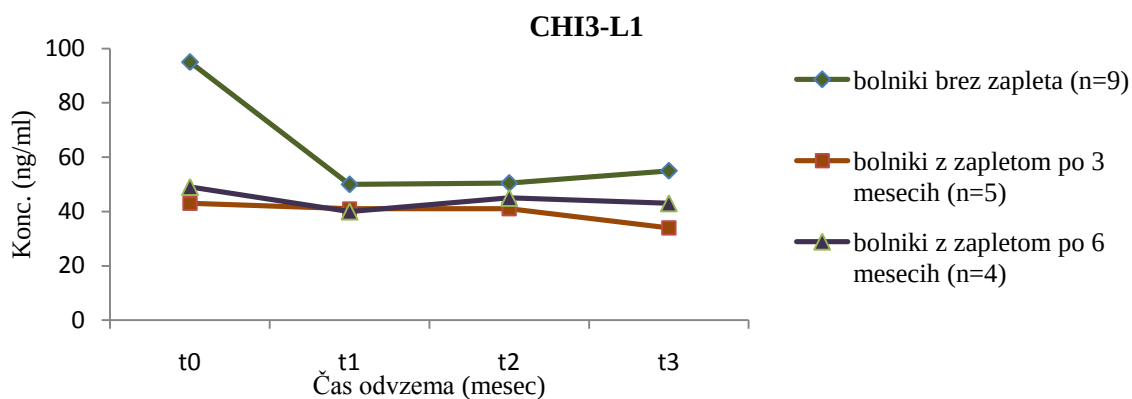
diagnoze (t_0) višja v primerjavi z mediano pri bolnikih brez kasnejšega poslabšanja bolezni (GCA poz., brez zapleta) (Slika 22).



Slika 22: Koncentracije CHI3-L1 v serumih posameznih preiskovancev

Vodoravna črta v spodnjem delu grafa prikazuje mejo detekcije za CHI3-L1 (0,01 ng/ml). Mediana koncentracij je podana z vodoravno črto in številko pri vsaki skupini. Statistično značilne razlike med skupinami so označene z vodoravno črto na vrhu grafa in črko p.

Bolnikom brez zapleta se je serumska koncentracija CHI3-L1 zelo znižala po 3 mesecih (t_1) od postavitve diagnoze (t_0), bila nato konstantna (t_2) in se po 1 letu (t_3) spet zvišala. Ostalima dvema skupinama se je koncentracija le malo spreminjala (Slika 23).



Slika 23: Koncentracije CHI3-L1 v serumih bolnikov z GCA

Prikazane so mediane serumskih koncentracij bolnikov brez zapleta, bolnikov z zapletom po 3 mesecih in bolnikov z zapletom po 6 mesecih, v različnih časovnih obdobjih (t_0 =čas ob postavitvi diagnoze, t_1 =3 mesece po postavitvi diagnoze, t_2 =6 mesecev po postavitvi diagnoze, t_3 =12 mesecev po postavitvi diagnoze).

4.2 RAZLIKE V IZRAŽANJU GENOV

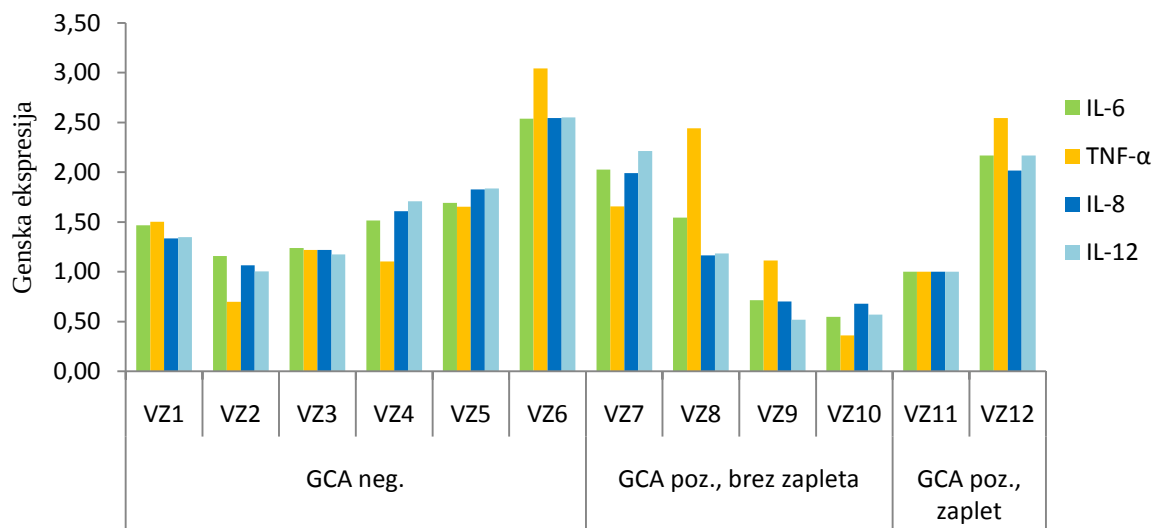
4.2.1 Citokini

Med skupinami bolnikov s histološko potrjeno in ovrženo diagnozo GCA ni bilo razlik v izražanju genov za citokine. Dva preiskovanca sta izstopala (VZ6, ki nima potrjene diagnoze GCA in VZ12, ki ima poslabšanje bolezni), saj sta imela večje izražanje genov za citokine v primerjavi z ostalimi preiskovanci. Pri VZ10, ki nima poslabšanja bolezni, je bilo izražanje genov za vse 4 citokine manjše v primerjavi z drugimi. Pri VZ9 je bilo izražanje genov za IL-6, IL-8 in IL-12 prav tako manjše v primerjavi z ostalimi. Zanimivo je, da je bilo izražanje genov za vse štiri vrste citokinov znotraj enega preiskovanca zelo podobno (Preglednica III, Slika 24).

Preglednica III: Gensko izražanje citokinov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebeljenim tiskom.

	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
IL-6	1,47	1,16	1,24	1,51	1,69	2,54	2,03	1,55	0,71	0,55	1,00	2,17
TNF-α	1,50	0,70	1,22	1,10	1,65	3,04	1,66	2,44	1,11	0,36	1,00	2,55
IL-8	1,33	1,06	1,22	1,61	1,83	2,54	1,99	1,17	0,70	0,68	1,00	2,02
IL-12	1,35	1,00	1,17	1,71	1,84	2,55	2,21	1,18	0,52	0,57	1,00	2,17



Slika 24: Gensko izražanje citokinov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

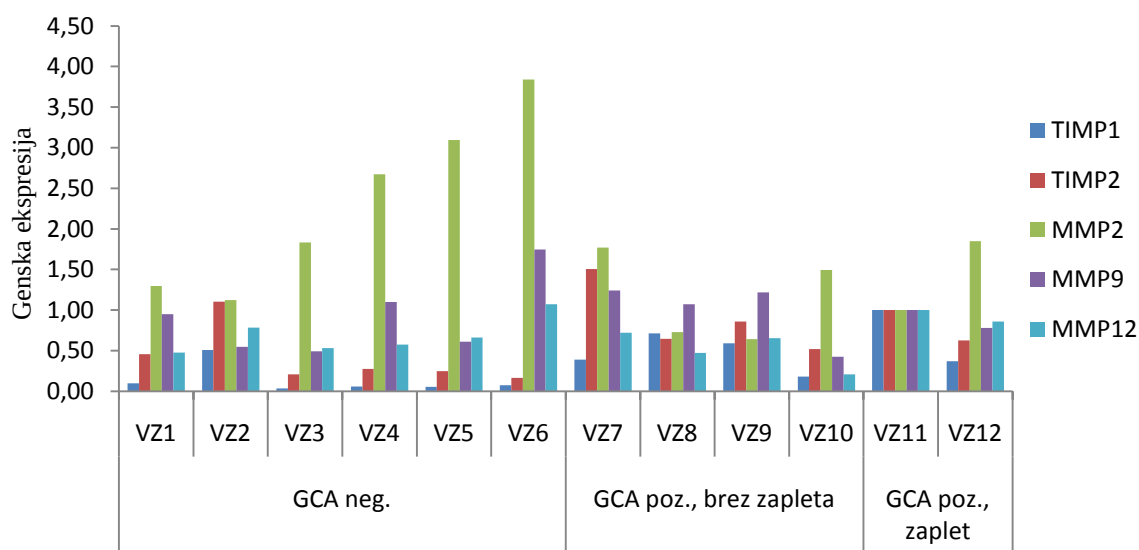
4.2.2 Matriks metaloprozeinaze in njihovi inhibitorji

Gen za MMP-2 je bil zelo izražen pri 4 od 6 bolnikov iz skupine, ki nimajo potrjene diagnoze GCA, medtem ko se je pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA manj izražal. Obratno je bilo gensko izražanje MMP-9 večje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA (pri 4 od 6 bolnikov), medtem ko je bilo preiskovancih z ovrženo diagnozo GCA manjše (pri 4 od 6 bolnikov). Pri MMP-12 ne opazimo razlik v izražanju med različnimi skupinami preiskovancev. Pri preiskovancih, ki nimajo potrjene diagnoze GCA, je bilo izražanje gena za TIMP-2 manjše kot pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA. Tudi izražanje gena za TIMP-1 je bilo večje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA. Močno sta izstopala vzorca 2 in 7, ki sta imela večje izražanje gena za TIMP-2 v primerjavi z ostalimi (Preglednica IV, Slika 25).

Preglednica IV: Gensko izražanje MMP in TIMP v biopsičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

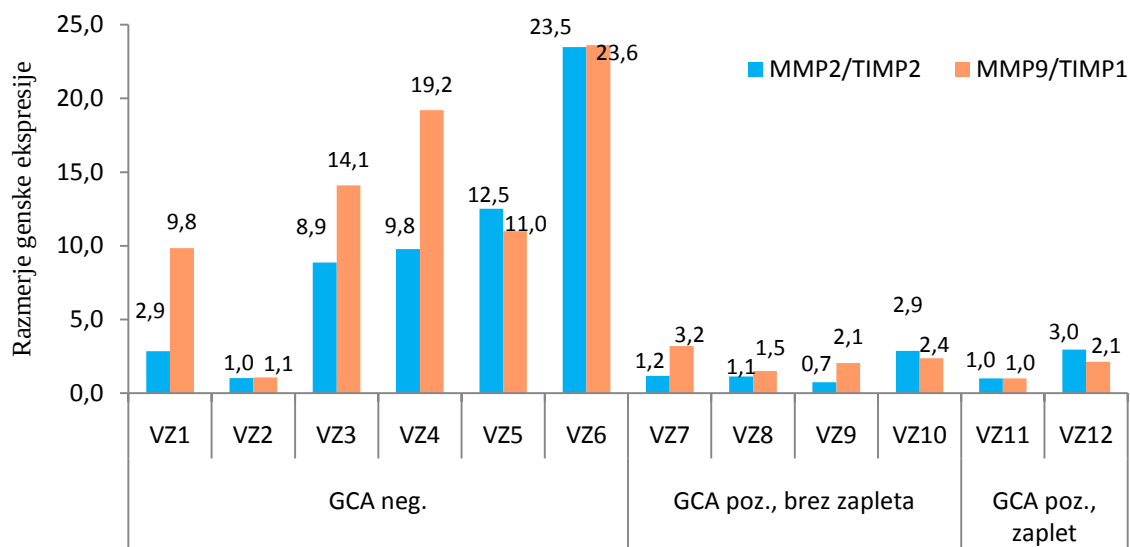
Vzorci, pri katerih je izražanje posameznega gena večje so označeni z rožnato barvo, vzorci, pri katerih je gensko izražanje manjše pa z modro barvo. Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebeljenim tiskom.

	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
MMP-2	1,30	1,12	1,83	2,67	3,10	3,84	1,77	0,73	0,64	1,49	1,00	1,85
MMP-9	0,95	0,55	0,49	1,10	0,61	1,74	1,24	1,07	1,22	0,43	1,00	0,78
MMP-12	0,48	0,78	0,53	0,57	0,66	1,07	0,72	0,47	0,65	0,21	1,00	0,86
TIMP-1	0,10	0,51	0,03	0,06	0,06	0,07	0,39	0,71	0,59	0,18	1,00	0,37
TIMP-2	0,46	1,10	0,21	0,27	0,25	0,16	1,51	0,65	0,86	0,52	1,00	0,63



Slika 25: Gensko izražanje MMP in TIMP v biopsičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Če pogledamo razmerje med izražanjem genov za MMP-2 in TIMP-2 ugotovimo, da je bilo razmerje večje pri preiskovancih, ki nimajo potrjene diagnoze GCA v primerjavi z bolniki s potrjeno diagnozo GCA. Izstopal je le vzorec 2, pri katerem je razmerje manjše. Do enakih razlik je prišlo tudi pri razmerju med MMP-9 in TIMP-1, kjer je prav tako izstopal vzorec 2 (Slika 26).



Slika 26: Razmerje izražanja genov za MMP in TIMP v biopsijskih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

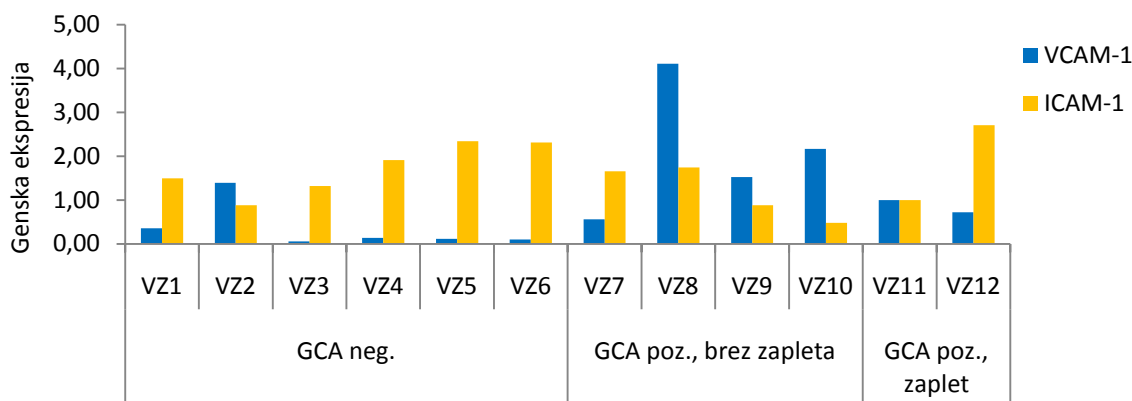
4.2.3 Adhezijske molekule

Pri izražanju gena za ICAM-1 ni bilo večjih razlik med skupinami. Izstopali so vzorci 5, 6 in 7 iz skupine, ki nima histološko potrjene diagnoze GCA ter VZ12 iz skupine s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ki so imeli večje izražanje gena za ICAM-1 v primerjavi z ostalimi. Pri VZ10 pa je bilo izražanje gena za ICAM-1 manjše kot pri ostalih. Gensko izražanje VCAM-1 je bilo večje pri skupini bolnikov s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi s preiskovanci z ovrženo diagnozo GCA. Izražanje je bilo največje pri skupini bolnikov z GCA brez kasnejšega poslabšanja bolezni. Izstopal je vzorec 8, pri katerem je bilo zelo povečano izražanje VCAM-1 v primerjavi z ostalimi preiskovanci (Preglednica V, Slika 27).

Preglednica V: Gensko izražanje ICAM-1 in VCAM-1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Vzorci, pri katerih je izražanje posameznega gena večje so označeni z rožnato barvo, vzorci, pri katerih je gensko izražanje manjše pa z modro barvo. Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebeljenim tiskom.

	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
ICAM-1	1,49	0,88	1,32	1,91	2,34	2,31	1,65	1,74	0,88	0,48	1,00	2,71
VCAM-1	0,35	1,39	0,06	0,13	0,11	0,10	0,56	4,11	1,52	2,17	1,00	0,72



Slika 27: Gensko izražanje ICAM-1 in VCAM-1 v bioptičnih vzorcih tkiv temporalnih arterij posameznih preiskovancev

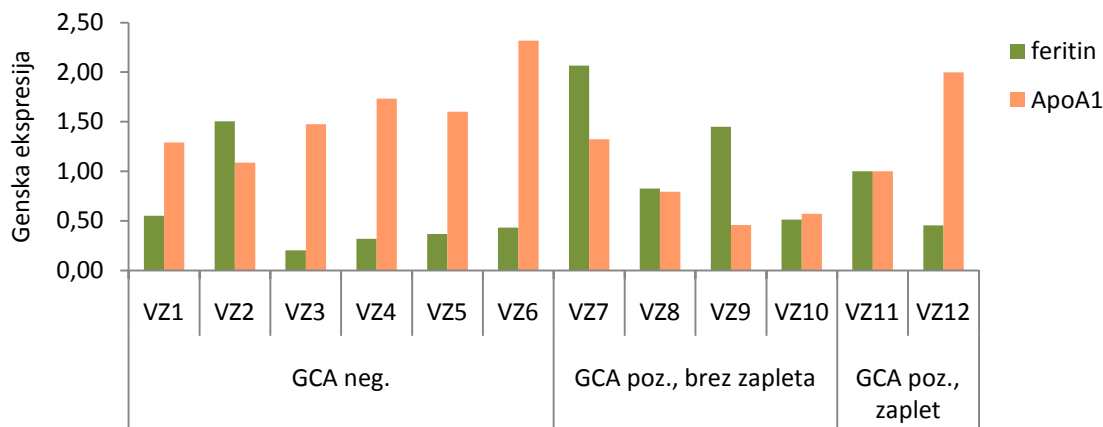
4.2.4 Proteini akutne faze

Gen za feritin se je bolj izražal pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z bolniki, ki nimajo potrjene diagnoze GCA. Izstopali so vzorci 2, 7 in 9, pri katerih je bilo večje izražanje gena za feritin v primerjavi z ostalimi. Gensko izražanje apoA1 je bilo večje pri preiskovancih, ki nimajo potrjene diagnoze GCA kot pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA. V izražanju gena za apoA1 sta izstopala vzorca 6 in 12, ki sta imela povečano izražanje tega gena v primerjavi z ostalimi (Preglednica VI, Slika 28).

Preglednica VI: Gensko izražanje feritina in apoA1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Vzorci, pri katerih je izražanje posameznega gena večje so označeni z rožnato barvo, vzorci, pri katerih je gensko izražanje manjše pa z modro barvo. Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebeljenim tiskom.

	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
Feritin	0,55	1,50	0,20	0,32	0,37	0,43	2,07	0,83	1,45	0,51	1,00	0,46
ApoA1	1,29	1,09	1,47	1,73	1,60	2,32	1,32	0,79	0,46	0,57	1,00	2,00



Slika 28: Gensko izražanje feritina in apoA1 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

4.2.5 Označevalci oksidativnega stresa

Pri izražanju genov za SOD1 in SOD2 so bile pri preiskovancih le majhne razlike. Izstopala sta VZ10, pri katerem je bilo zelo povečano izražanje gena za SOD2, in VZ1, pri katerem je bilo zelo povečano izražanje gena za SOD1 (Preglednica VII).

Preglednica VII: Gensko izražanje SOD1 in SOD2 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebelenim tiskom.

	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
SOD1	3,76	0,46	0,69	1,00	1,25	0,90	1,01	0,34	0,62	1,79	1,00	0,65
SOD2	0,24	1,37	0,32	0,78	0,53	0,46	0,37	0,91	0,71	11,56	1,00	0,30

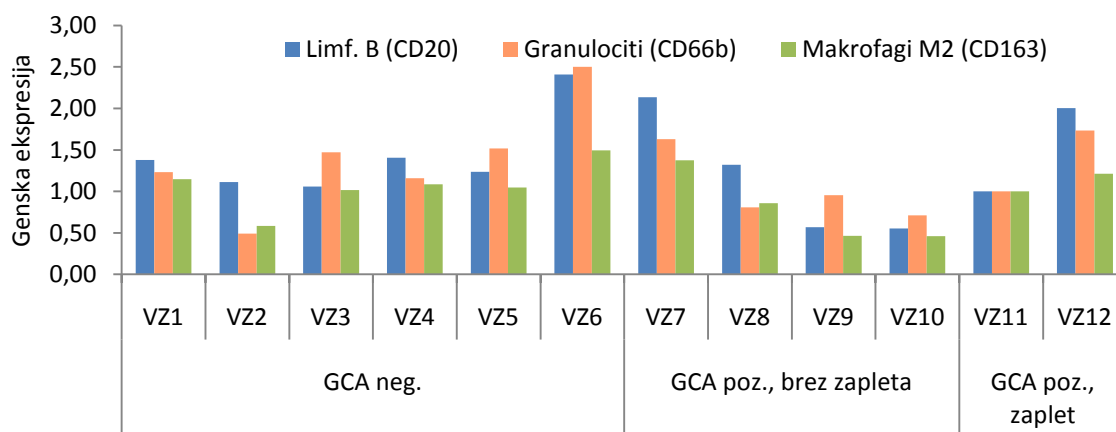
4.2.6 Označevalci celičnih tipov

Med bolniki s potrjeno diagnozo GCA in bolniki, ki nimajo potrjene diagnoze GCA nismo ugotovili pomembnejših razlik v genskem izražanju celičnih označevalcev limfocitov B, granulocitov in makrofagov M2. Izstopali so vzorci 6, 7 in 12, pri katerih je bilo večje izražanje genov za označevalce vseh treh celičnih tipov v primerjavi z ostalimi. Vzorca 9 in 10 sta imela manjše izražanje genov za označevalce limfocitov B in makrofagov M2, vzorca 2 in 10 pa sta imela manjše izražanje genov za označevalce granulocitov v primerjavi z ostalimi (Preglednica VIII, Slika 29).

Preglednica VIII: Gensko izražanje označevalcev različnih celičnih tipov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

Izstopajoče vrednosti posameznih vzorcev so označene z odebeljenim tiskom.

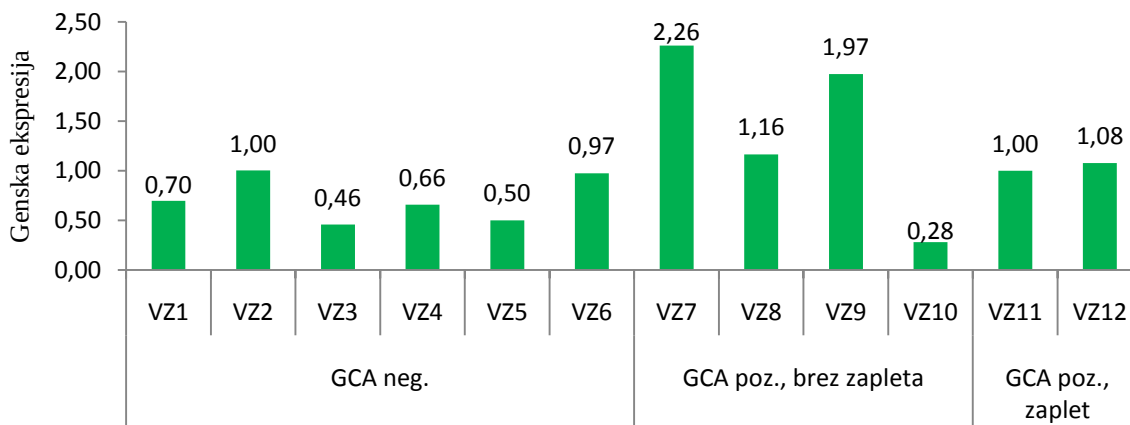
	GCA neg.						GCA poz., brez zapleta				GCA poz., zaplet	
	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	VZ5	VZ6	VZ7	VZ8	VZ9	VZ10	VZ11	VZ12
Limf. B	1,38	1,11	1,06	1,41	1,23	2,41	2,13	1,32	0,57	0,55	1,00	2,01
Granulociti	1,23	0,49	1,47	1,16	1,52	2,50	1,63	0,81	0,95	0,71	1,00	1,73
Makrofagi M2	1,15	0,59	1,02	1,09	1,05	1,50	1,37	0,86	0,46	0,46	1,00	1,21



Slika 29: Gensko izražanje označevalcev različnih celičnih tipov v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

4.2.7 Makrofagni receptor s kolagensko strukturo

Izražanje gena za MARCO je bilo večje pri preiskovancih s potrjeno diagnozo GCA (izjema VZ10) v primerjavi s preiskovanci, ki nimajo potrjene diagnoze GCA (izjema VZ2 in VZ6) (Slika 30).



Slika 30: Genska izražanje MARCO v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij posameznih preiskovancev

5 RAZPRAVA

5.1 CITOKINI

Med različnimi raziskavami, opravljenimi pri bolnikih z GCA, sta najbolj preučevana vnetna citokina IL-6 in TNF- α . Večina študij poroča, da je koncentracija IL-6 povišana v serumu ali plazmi bolnikov z GCA, pri katerih terapija z GS še ni uvedena, v primerjavi z zdravimi (43, 46-54). Tudi naši rezultati kažejo, da je koncentracija IL-6 v serumu bolnikov z GCA povišana v primerjavi z bolniki, ki nimajo histološko potrjene diagnoze GCA. Prav tako so serumske koncentracije IL-6 zelo visoke pri bolnikih z GCA v primerjavi s prazno vrednostjo za IL-6 pri zdravi populaciji. Vendar moramo paziti na to, da IL-6 ni diagnostično specifičen le za GCA in je njegova koncentracija lahko povečana tudi pri drugih vnetnih boleznih (npr. PMR, revmatoidni artritis). Ugotovili smo tudi, da so koncentracije IL-6 v serumih bolnikov z GCA, ki nimajo poslabšanja bolezni, nižje v primerjavi z bolniki, ki imajo poslabšanje bolezni, kar se sklada z nekaterimi objavljenimi raziskavami (51-53). Zanimivo je, da je koncentracija IL-6 pri bolnikih s poslabšanjem bolezni nižja v času odvzema ob pojavu poslabšanja v primerjavi s časom odvzema ob postavitvi diagnoze, ko poslabšanje še ni prisotno, kar je verjetno posledica uspešnega zdravljenja z GS, glede na to, da se je poslabšanje pri večini bolnikov pojavilo po 3 ali 6 mesecih od uvedbe terapije. Po navedbah več različnih avtorjev se po uvedbi terapije, koncentracija IL-6 pri večini bolnikov zniža v primerjavi z nezdravljenimi bolniki (43, 46-50, 52, 53). Roche in sod. (47) pa so dokazali tudi, da se bolnikom, ki dosežejo remisijo kliničnih znakov, po zmanjšanju odmerka oziroma ukinitvi terapije, koncentracija hitro poviša, kar bi lahko pomenilo, da GS vplivajo neposredno na izločanje oziroma na gensko transkripcijo IL-6, ne pa tudi na vzroke in mehanizme, zaradi katerih se IL-6 izloča (47). Nekateri so IL-6 predlagali kot označevalec za aktivnost bolezenskega procesa GCA in za spremljanje zdravljenja, saj korelira s kliničnimi znaki in je bolj diagnostično občutljiv za GCA kot CRP in ESR (47, 50, 51). Pri genskem izražanju IL-6 v bioptičnih vzorcih temporalnih arterij med bolniki, ki nimajo potrjene diagnoze GCA in bolniki s potrjeno diagnozo GCA nismo ugotovili razlik. Gen za IL-6 se pri vseh skupinah preiskovancev dobro izraža. Nasprotno so nekateri avtorji ugotovili povečano izražanje genov za IL-6 pri bolnikih z GCA v primerjavi z zdravimi (43, 46, 51, 54, 55). Hernandez-Rodriguez in sod. (56) so dokazali, da je povišano gensko izražanje v tkivu temporalnih arterij za IL-6 še

posebej vidno pri bolnikih z močnim sistemskim odgovorom na vnetje, kar nakazuje na vpletenost IL-6 v nastanek akutne faze vnetja. IL-6 je namreč eden glavnih citokinov, ki pospešijo sintezo proteinov akutne faze v jetrih. Ista skupina raziskovalcev je ugotovila tudi, da sta koncentracija IL-6 v serumu in izražanje IL-6 v temporalnih arterijah bolnikov z ishemičnimi zapleti manjša kot pri bolnikih, ki nimajo ishemičnih zapletov (54). Možen je torej vpliv IL-6 na endotelij in kasneje na angiogenezo. Tudi endotelijske celice so namreč sposobne proizvodnje IL-6. Večja angiogena aktivnost v arterijah bolnikov z GCA pa je, po navedbah nekaterih raziskovalcev, povezana z manj pogostimi ishemičnimi zapleti bolezni (33). Večja neovaskularizacija je opažena pri bolnikih z močno sistemsko reakcijo oziroma z večjimi koncentracijami IL-6 (33). Večina avtorjev je enotna, da se gen za IL-6 najbolj izraža v makrofagih in fibroblastih, prisotnih v vnetih arterijah (46, 56).

TNF- α je prav tako kot IL-6 mediator reakcije akutne faze. Podatki o njegovih nivojih pri bolnikih z GCA so nasprotujoči. Medtem ko ga nekateri raziskovalci v serumu ali plazmi sploh niso uspeli zaznati (47, 48), drugi niso ugotovili razlik med zdravimi in bolniki z GCA (49, 50, 57), tretji pa navajajo razlike med bolniki in zdravimi (52-54). V naši raziskavi serumskih koncentracij TNF- α pri zdravih krvodajalcih nismo uspeli zaznati, medtem ko so pri bolnikih z GCA koncentracije nad mejo detekcije. Mediana koncentracij pri zdravih krvodajalcih je statistično značilno nižja od mediane koncentracij pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni. Ob času poslabšanja imajo bolniki višje koncentracije TNF- α v primerjavi s časom ob diagnozi, ko še ni bilo poslabšanja bolezni, kar je v skladu z objavljenimi raziskavami (52, 53). Koncentracija TNF- α se po 3 mesecih po postavitvi diagnoze in uvedbi zdravljenja vsem bolnikom zviša, po 6 zniža in po 1 letu spet zviša. To bi lahko pripisali učinkom zdravljenja, saj GS učinkovito zavrejo provnetne citokine, kot so IL-6 in TNF- α . Odmerek GS se po 1 letu zmanjša in posledično se TNF- α lahko zviša, zato bi bilo smiselno mogoče pridobiti še podatek, kdaj in za koliko se je bolnikom znižal odmerek GS. Med bolniki s histološko potrjeno in ovrženo diagnozo GCA nismo uspeli dokazati razlik v izražanju genov za TNF- α . Nasprotno je večini avtorjev, ki so analizirali izražanje genov za TNF- α , uspelo dokazati statistično značilne razlike med zdravimi in bolniki z GCA (54-56, 58), pri čemer so makrofagi in večjedrne celice velikanke v vnetih arterijah glavni proizvajalci TNF- α , vendar naj ta ne bi imel ključnega pomena pri patogenezi GCA. Poskušali so namreč uvesti terapijo, pri kateri je tarča zdravil TNF- α ,

vendar niso ugotovili pomembnejših učinkov na potek bolezni, zato so sklepali, da so pri kroničnem vaskulitisu bolj pomembni učinki limfocitov T (49, 57).

IL-17 je značilen citokin za imunski odziv usmerjen v Th17. Pri procesu GCA je pomemben, saj vzpodbudi makrofage, da proizvajajo vnetne citokine, vpliva na endotelijske celice, VSMC in fibroblaste, privabi nevtrofilce in makrofage na mesto vnetja ter poveča proizvodnjo kemokinov (23, 24). V naši raziskavi serumskih koncentracij IL-17 pri bolnikih z GCA nismo zaznali. Prav tako ga v raziskavi, opravljeni s strani Deng in sod. (43), v plazmi bolnikov niso uspeli zaznati. Van der Gees (50) pa v svoji raziskavi ne ugotovi razlik v serumskih koncentracijah IL-17 med zdravimi in bolniki z GCA. Vzroki za nezmožnost določitve IL-17 in ostalih citokinov bi lahko bili naslednji: različen čas odvzema vzorca (cirkadiani ritem, fizična aktivnost, teščost), shranjevanje (na -80°C je večina citokinov stabilnih do treh let) ter večkratno odtajevanje in zamrzovanje vzorcev, ki dokazano vplivajo na stabilnost citokinov (59). Tudi gen za IL-17 se v arterijah bolnikov z GCA v naši raziskavi ni izražal, čeprav več avtorjev poroča o vpletenosti IL-17 v akutni oziroma zgodnji proces GCA (9, 18, 43) in o povečanem genskem izražanju pri bolnikih z GCA v primerjavi z zdravimi, ki se po uvedbi zdravljenja zmanjša (43, 53, 60).

Prav tako kot IL-17, tudi IFN- γ nismo uspeli zaznati v vzorcih serumov bolnikov z GCA in v serumih zdravih krvodajalcev. V dosedanjih raziskavah so IFN- γ le redki določevali v serumu in ga večinoma, podobno kot v naši raziskavi, niso uspeli določiti (48, 53). Nekateri pa so ugotovili, da imajo bolniki povišane koncentracije v serumu oziroma plazmi v primerjavi z zdravimi (50, 61). Vzroki za nezmožnost detekcije so lahko enaki kot pri IL-17, do razlik lahko prihaja tudi zaradi določevanja koncentracije v različnih bioloških vzorcih. V predhodni raziskavi so namreč ugotovili, da so koncentracije IFN- γ v plazmi višje kot v serumu (62). Pri preiskovancih, vključenih v našo raziskavo, se gen za IFN- γ v tkivu temporalnih arterij ni izrazil. V literaturi pa navajajo razlike v izražanju gena med zdravimi in bolniki z GCA (43, 53, 55, 58). Ugotovijo celo povečano izražanje v tkivu bolnikov s pogostejšimi zapleti (53). Vendar smo v naši raziskavi testirali le 2 bioptična vzorca temporalnih arterij bolnikov z GCA, kjer se IFN- γ ni dobro izrazil in smo zato lahko izpustili bioptične vzorce arterij, kjer bi se mogoče dobro izražal. Zanimivo bi bilo pridobiti vzorec ponovno čez 6 mesecev ali po 1 letu po uvedbi zdravljenja in ponovno

primerjati izražanje genov, saj se mogoče IFN- γ začne izločati šele kasneje, pri poznem oziroma kroničnem vaskulitisu.

Tudi koncentracije IL-12, ki je, prav tako kot IFN- γ , povezan z odzivom usmerjenim v Th1, so bile pri večini preiskovancev v naši raziskavi pod mejo detekcije in le pri posameznikih so bile koncentracije zelo visoke. O nivojih IL-12 se literatura razhaja. Nekateri so ugotovili, da so koncentracije povečane v plazmi pri bolnikih z aktivnim GCA v primerjavi z zdravimi (43). Drugi avtorji ne navajajo razlik v koncentracijah med zdravimi in bolniki z GCA (50). Visvanathan in sod. (53) so ugotovili povečano serumsko koncentracijo IL-12 pri bolnikih, ki doživijo zaplet v primerjavi z bolniki, ki ne doživijo zapleta. Prav tako je bila serumska koncentracija večja v času ob pojavu zapleta kot v času ob postavitvi diagnoze. Vendar so v omenjeni raziskavi določali serumsko koncentracijo podenote p40, medtem ko smo v naši raziskavi določali podenoto p70. Na mRNA nivoju nismo uspeli dokazati razlik med bolniki s potrjeno in ovrženo diagnozo GCA, medtem ko drugi avtorji navajajo razlike v izražanju genov za IL-12 v temporalnih arterijah bolnikov z GCA v primerjavi z zdravimi (43). Visvanathan in sod. (53) ugotovijo še, da imajo bolniki s pogostimi zapleti povečano izražanje IL-12.

O vlogi IL-8 v patogenezi GCA je bilo opravljenih le malo raziskav, ki si medsebojno nasprotujejo. Medtem ko nekateri (63) ugotovijo, da imajo zdravi preiskovanci v primerjavi z bolniki z GCA nižje koncentracije IL-8 v serumu, drugi (50) ne ugotovijo razlik v serumih med zdravimi in bolniki z GCA. V naši študiji so se pojavile statistično značilne razlike med zdravimi krvodajalci in bolniki z GCA. Bolniki brez zapleta so imeli rahlo nižje koncentracije kot bolniki z zapletom. Serumske koncentracije IL-8 so se pri bolnikih, po 6 mesecih po postavitvi diagnoze in uvedbi terapije z GS, zelo znižale, ne glede na klinični potek bolezni. Po 1 letu so se koncentracije IL-8 spet zvišale, kar nakazuje na to, da GS uspešno zavrejo izločanje oziroma tvorbo IL-8. Do enakih ugotovitev pridejo tudi Alvarez-Rodriguez in sod. (63), ki navajajo, da se po uvedbi zdravljenja z GS, koncentracije IL-8 v serumih bolnikov znižajo. Podobno so ugotovili tudi Nadkarni in sod. (64), ko so v plazmi določevali koncentracijo IL-8 pri bolnikih z GCA ob postavitvi diagnoze, po 48 urah, po 1, 4 in 24 tednih po uvedbi zdravljenja. Koncentracija IL-8 se je povečala po 48 urah, se znižala po 1 in 4 tednih in se po 24 tednih začela spet višati. Po daljšem časovnem obdobju (6, 12 mesecih po postavitvi diagnoze) bi

šlo mogoče za proces regeneracije oziroma angiogeneze, pri kateri naj bi imel vlogo tudi IL-8 in se zato njegove koncentracije začnejo spet višati. Lahko bi bilo povečanje koncentracije tudi posledica zmanjševanja odmerka GS. Tudi gen za IL-8 se je v arterijah naših preiskovancev dobro izražal, vendar pa ni bilo večjih razlik med bolniki s histološko potrjeno in histološko ovrženo diagnozo GCA. Zanimivo je, da je imelo vseh 5 bolnikov s povečanim izražanjem gena za IL-8, tudi večje izražanje gena za granulocyte. To nakazuje na učinkovito kemotaktično lastnost IL-8, ki privabi nevtrofilce na mesto vnetja (63).

Če primerjamo posamezne bolnike, vidimo, da nekateri zelo izstopajo po serumskih koncentracijah posameznih analitov. Zanimivo je, da imajo vsi bolniki, ki imajo visoke serumske koncentracije TNF- α , IL-6 in IL-8, tudi visoke serumske koncentracije ostalih citokinov (IL-4, IL-10, IL-12, IL-33 in IL-22). Nekateri preiskovanci imajo torej zelo povišane koncentracije skoraj vseh citokinov, medtem ko pri drugih analitih po koncentracijah ne izstopajo. Če pri teh bolnikih pogledamo še izražanje genov za TNF- α , IL-6, IL-8 in IL-12 ugotovimo, da je to izražanje nižje v primerjavi z drugimi bolniki in po genskem izražanju ne izstopajo. Ugotovitev tako kaže na sistemsko izločanje citokinov in ne le na lokalno izločanje v vneti arteriji.

5.2 MATRIKS METALOPROTEINAZE IN NJIHOVI TKIVNI INHIBITORJI

MMP spadajo v družino endopeptidaz, ki so sposobne razgradnje sestavin zunajceličnega matriksa, kot so kolagen, elastin, gelatin, glikoproteini in proteoglikan. Izloča jih lahko več različnih vrst celic, med katere spadajo fibroblasti, endotelijske celice, makrofagi, nevtrofilci in limfociti. Na njihovo aktivnost vplivajo njihovi naravni inhibitorji TIMP. Povečana izraženost in aktivnost MMP je posledica porušanja ravnotežja med izraženostjo MMP in TIMP in lahko vodi v številne patološke procese in razgradnjo tkiva (65, 66). Serumi bolnikov z GCA imajo ob poslabšanju bolezni statistično značilno višje koncentracije MMP-2 kot ob času postavitve diagnoze, ko še ni bilo poslabšanja. Določevanje koncentracije MMP-2 v serumu bi bilo zato lahko uporabno za spremljanje poteka bolezni in poteka zdravljenja ter pri napovedi ukinitve oziroma zmanjšanja odmerka terapije. Gen za MMP-2 je v naši raziskavi zelo izražen pri 4 od 6 preiskovancev iz skupine, ki nimajo potrjene diagnoze GCA, medtem ko se pri bolnikih z GCA manj izraža. Imunohistokemično je MMP-2 pri zdravih ljudeh izražena predvsem v VSMC, pri

bolnikov z GCA pa v VSMC, levkocitnih infiltratih in miofibroblastih (30, 67). Avtorji ugotavljajo tudi, da MMP-2 pri zdravih ni aktivna, medtem ko je pri bolnikih njena aktivnost zelo povečana, kar nam pove, da je za njeno aktivacijo potreben dražljaj, kot je vnetje oziroma povečana količina vnetnih citokinov (30). Izražanje TIMP-2, ki zavira delovanje MMP-2, je bilo v naši študiji večje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA kot pri preiskovancih, ki histološko niso imeli potrjene diagnoze GCA. Tako ob izračunu razmerja med MMP-2 in TIMP-2 dobimo višje vrednosti pri bolnikih brez GCA, kar pomeni, da je proteolitična aktivnost MMP-2 pri bolnikih z ovrženo diagnozo GCA večja kot pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA. Rezultat je rahlo presenetljiv in ne potrjuje predhodnih študij (67, 68).

Koncentracije MMP-9 so bile v serumih krvodajalcev nižje kot v serumih bolnikov z diagnozo GCA. Do statistično značilnih razlik je prišlo v medianah med skupino bolnikov brez poslabšanja in skupino bolnikov s poslabšanjem bolezni, ob času poslabšanja, kar je v skladu z navedbami nekaterih drugih avtorjev (53, 69). Ugotovili smo, da bi MMP-9 lahko označevala proces aktivne bolezni GCA. Koncentracije v serumu pa nič ne povedo o aktivnosti encima, saj je ta lahko prisoten kot cimogen, v neaktivni obliki, ali pa ga zavirajo njegovi tkivni inhibitorji (67), zato bi bilo smiselno v serumu določati še aktivnost teh encimov. Gensko izražanje MMP-9 je večje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA kot pri preiskovancih z ovrženo diagnozo, kar je v skladu z večino raziskav opravljenih za MMP-9, kjer so ugotovili statistično značilne razlike v izražanju genov za MMP-9 v tkivu zdravih in bolnikov z GCA (67, 70, 71). Izražanje gena za TIMP-1, ki zavira MMP-9, je bilo povečano pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z bolniki z ovrženo diagnozo GCA, podobno kot v raziskavi, ki so jo opravili Segarra in sod. (67). Vendar pa je razmerje med MMP-9 in TIMP-1 v njihovi raziskavi še vedno večje pri bolnikih, medtem ko naši rezultati kažejo ravno obratno (67). Rezultat je v nasprotju s pričakovanji, saj smo pričakovali, da bo pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA razmerje v korist MMP-9 oziroma razgradnji zunanega matriksa. Glede na to, da je izražanje večje za gena TIMP-1 in TIMP-2 kot za gena MMP-9 in MMP-2, pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z bolniki z ovrženo diagnozo GCA, bi lahko sklepali, da vnetje še ni dokončno razvito in se MMP-9 in MMP-2 še nista začeli izločati.

Serumskih koncentracij MMP-12 pri preiskovancih nismo zaznali, medtem ko se je gen za MMP-12 dobro izražal v bioptičnih tkivih arterij vseh preiskovancev, ne glede na to, ali so imeli potrjeno ali ovrženo diagnozo GCA. Rezultat je v nasprotju z raziskavo, ki so jo opravili Rodriguez-Pla in sod. (70), kjer je bil gen za MMP-12 pri bolnikih z GCA bolj izražen kot pri zdravih. Prav tako je bilo izražanje genov za MMP-12 večje kot gensko izražanje MMP-2 in MMP-9 (70). Smiselno bi bilo mogoče določati še gensko izražanje VEGF, ki vpliva na neoangiogenezo in določiti povezanost med MMP in VEGF.

5.3 ADHEZIJSKE MOLEKULE

Med medianami koncentracij ICAM-1 in VCAM-1 v serumih zdravih krvodajalcev in bolnikov z GCA ni statistično značilnih razlik. Ugotovili pa smo, da je mediana koncentracij ICAM-1 pri zdravih krvodajalcih nekoliko višja od median koncentracij pri bolnikih z GCA, medtem ko imajo bolniki z GCA višjo koncentracijo VCAM-1 kot zdravi krvodajalci. Prav tako imajo bolniki s poslabšanjem bolezni višje koncentracije VCAM-1 kot bolniki, ki nimajo poslabšanja bolezni. V dosedanjih raziskavah so, v nasprotju z našo, dokazali statistično pomembne razlike v koncentracijah ICAM-1 med zdravimi in bolniki z GCA (53, 72, 73), medtem ko so za koncentracijo VCAM-1 rezultati različnih študij nasprotujoči. Coll-Vinent in sod. (72) ne poročajo o razlikah med zdravimi in bolniki z GCA, Remahl in sod. (73) pa ugotovijo, da imajo bolniki z GCA statistično značilno višje serumske koncentracije VCAM-1 v primerjavi z zdravimi kontrolami. Longitudinalno se v naši študiji, koncentracije ICAM-1 pri vseh skupinah bolnikov znižajo po 3, 6 in 12 mesecih po postavitvi diagnoze oziroma uvedbi zdravljenja v primerjavi s koncentracijami ob času postavitve diagnoze. Koncentracije VCAM-1 se znižajo po 3 in 6 mesecih, po enem letu pa se začnejo spet višati. Podobno znižanje koncentracij ICAM-1 dokažejo tudi Coll-Vinent in sod. (72). Tudi na mRNA nivoju ugotovimo podobno kot pri koncentracijah v serumu. Izražanje gena za VCAM-1 je namreč večje pri bolnikih s histološko potrjeno diagnozo GCA v primerjavi s tistimi z ovrženo diagnozo GCA. VCAM-1 se najbolj izraža pri skupini bolnikov brez poslabšanja bolezni. Cid in sod. leta 2000 (33) ugotovijo, da je ICAM-1 v arterijah zdravih ljudi izražena v endoteliju žile in v vasa vasorum, pri bolnikih pa je v večji meri izražena v na novo nastalem mikrožilju, v adventiciji in na stiku med medijo in intimo. Našli so jo tudi v infiltriranih levkocitih v intimi. Podobno ugotovijo tudi za VCAM-1, ki pri zdravih ljudeh v arterijah ni izražena, v vnetih arterijah pa je zelo izražena v na novo nastalem mikrožilju (33).

Pri L-selektinu so koncentracije v serumu zelo podobne pri vseh preiskovancih, mediane so nekoliko nižje pri zdravih krvodajalcih. Longitudinalno, po 1 letu opazimo znižanje koncentracij L-selektina v serumu preiskovancev. V temporalnih arterijah bolnikov z GCA, se gen za L-selektin ni izražal. V predhodni raziskavi prav tako ne poročajo o razlikah med zdravimi in bolniki z GCA, ter med zdravljenimi in nezdravljenimi (72). Cid in sod. (33) pa ugotovijo, da le nekaj levkocitov, infiltriranih v vneti arteriji, izraža L-selektin, kar nakazuje, da je L-selektin pomemben na začetku, za pritrditev levkocitov na endotelij in se kasneje umakne iz membrane. ICAM-1 in VCAM-1 pa naj bi bile bolj pomembne v kasnejšem razvoju vaskulitisa (33).

Po uvedbi zdravljenja se koncentracije vseh treh adhezijskih molekul znižajo, le pri VCAM-1 se po 1 letu koncentracija spet zviša, kar kaže na uspešno zaviranje adhezijskih molekul s strani GS. GS lahko neposredno zavrejo produkcijo adhezijskih molekul, tako da zavrejo njihovo transkripcijo. Lahko pa zavrejo izražanje adhezijskih molekul tudi posredno, tako da zavrejo proizvodnjo vnetnih citokinov, ki povečajo njihovo produkcijo (33). Vir ICAM-1 so tudi krožeči monociti, katere GS uspešno zavrejo (72). Na višanje serumskih koncentracij po 1 letu bi lahko vplival proces neoangiogeneze, saj so adhezijske molekule pri bolnikih najbolj izražene na endoteliju novonastalih žil. Po 1 letu je najbrž neovaskularizacija že prisotna in se izražanje adhezijskih molekul na novem žilju poveča in tudi v večji meri sprošča v krvni obtok. Nekateri raziskovalci so ugotovili povezavo med povečanim izražanjem adhezijskih molekul in sistemsko vnetno reakcijo, saj je pri nekaterih bolnikih večja proizvodnja vnetnih citokinov, posledično imajo močnejšo sistemsko vnetno reakcijo in močnejše izražanje adhezijskih molekul (33). V našem primeru imata 2 bolnika (VZ6 in VZ12), ki imata večje izražanje genov za TNF- α , IL-6 in IL-12, tudi večje izražanje gena za ICAM-1. Pri 1 bolniku opazimo v primerjavi z ostalimi, večje gensko izražanje TNF- α in VCAM-1 (VZ 8).

5.4 PROTEINI AKUTNE FAZE

SAA je pozitiven protein akutne faze in spada v družino krožečih apolipoproteinov. Sintetizirajo ga hepatociti, adipociti, makrofagi in fibroblastom podobni sinoviociti. SAA vzpodbudi sproščanje različnih citokinov, kot so IL-1, IL-6 in TNF- α , prav tako tudi vzpodbudi angiogenezo, tkivne dejavnike in izločanje MMP. Njegova koncentracija v serumu lahko naraste celo do tisočkrat le v dveh dnevih po nastanku vnetja (74). V naši

študiji je bila mediana koncentracij v serumu bolnikov s potrjeno diagnozo GCA nekoliko višja kot pri tistih, ki nimajo potrjene diagnoze. Zelo visoke koncentracije opazimo pri skupini bolnikov s poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze, katerih srednja vrednost se statistično značilno razlikuje od mediane bolnikov z ovrženo diagnozo GCA. Pri skupini bolnikov s poslabšanjem bolezni se ob času poslabšanja koncentracije SAA znižajo, mediana pa se statistično značilno razlikuje od mediane določene ob času postavitve diagnoze, ko poslabšanje še ni bilo prisotno. Če mediane primerjamo s prazno vrednostjo za SAA (6,4 µg/ml) opazimo, da imajo bolniki zelo povišane koncentracije v primerjavi z zdravo populacijo. Hachulla in sod. (75) dokažejo podobno, saj naj bi bil SAA, v kombinaciji s kliničnimi znaki, bolj občutljiv za označevanje aktivnosti GCA kot ESR in CRP. Yamane in sod. (76) pri populaciji bolnikov s PMR ugotovijo povezavo SAA s CRP in SAA pripišejo večjo diagnostično občutljivost za PMR v primerjavi s CRP. Pri bolnikih s poslabšanjem bolezni se, v naši raziskavi, po 3 oziroma 6 mesecih po uvedbi terapije, ko bolniki doživijo poslabšanje bolezni, koncentracije SAA znižajo. To bi lahko pripisali učinkoviti terapiji, saj GS zavrejo izločanje provnetnih citokinov (IL-6, TNF- α , IL-8), ki vplivajo tudi na sintezo proteinov akutne faze. Naši rezultati kažejo, da bi SAA potencialno lahko označeval prisotnost bolezenskega procesa oziroma nakazal pojav poslabšanja bolezni. Vendar pa SAA ni diagnostično specifičen za GCA in označuje le prisotnost procesa vnetja. SAA bi bilo mogoče smiselno primerjati še z ESR in CRP ter kliničnimi znaki. Vsekakor bi bil lahko potencialno uporaben kot pomoč pri postavitvi diagnoze in spremljanju bolnikov.

Feritin je prav tako pozitiven protein akutne faze. Sintetizirajo ga hepatociti, lahko pa tudi makrofagi. Izražanje feritina v največji meri regulira razpoložljiva količina železa, lahko pa tudi prisotnost oksidativnega stresa. Pomemben vpliv na regulacijo izražanja feritina imajo tudi citokini, še posebej ob prisotnosti vnetne reakcije. Feritin med imunsko reakcijo shranjuje železo in ščiti telo pred mikrobi, oksidativnim stresom in vnetjem. Prav tako naj bi bil vpleten tudi v proces angiogeneze. Nekateri provnetni citokini (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ) vzpodbudijo njegovo izražanje tako, da povečajo transkripcijo genov za feritin. Citokini tudi vplivajo na nastanek ROS in tako tudi posredno povečajo izražanje feritina (77). Gen za feritin se je pri naših preiskovancih v žilah dobro izražal v nasprotju z drugimi pozitivnimi proteini akutne faze, ki se niso izražali (α 1 kisli glikoprotein, α 2 makroglobulin, fibrinogen, α 1 antitripsin). Njegovo izražanje je bilo večje pri bolnikih s

potrjeno diagnozo GCA (4 od 6 bolnikov so imeli visoko izražanje), medtem ko se je pri bolnikih z ovrženo diagnozo GCA manj izražal (5 od 6 bolnikov je imelo nizko izražanje). Lahko sklepamo, da je pri bolnikih z GCA že povečan nivo ROS in RNS ter je za zaščito celic pred lipidno peroksidacijo in poškodbami zaradi oksidativnega stresa povečano gensko izražanje feritina. 2 vzorca od 5, ki sta imela povišano izražanje gena za feritin, sta imela povišano izražanje genov tudi za SOD1 in SOD2, ki prav tako ščitita tkivo pred oksidativnim stresom. 3 vzorci, od 5, ki so imeli povečano izražanje gena za feritin, so imeli povečano izražanje genov tudi za TNF- α , IL-6 in IL-8, ki naj bi pospešili izražanje feritina in imeli tudi vlogo pri angiogenezi. Nekateri avtorji so v svojih raziskavah določali avtoprotitelesa proti feritinu v serumu in ugotovili, da so bolj pogosto prisotna v serumih bolnikov z GCA v primerjavi z zdravimi. Prav tako so bila avtoprotitelesa v večji meri prisotna pri bolnikih s poslabšanjem bolezni v primerjavi z bolniki z remisijo kliničnih znakov (78). Smiselno bi bilo torej določiti še koncentracijo feritina v serumu ter prisotnost avtoprotiteles proti feritinu.

5.5 HITINAZI 3 PODOBEN PROTEIN 1

CHI3-L1 spada v družino encimov glikozil hidrolaz, vendar nima hidrolitične aktivnosti. Močno se veže na hitin in hitooligosaharide, lahko se tudi specifično veže na tip I kolagen in heparin. Izraža in izloča ga več vnetnih celic kot so nevtrofilci, monociti/makrofagi, celice velikanke, VSMC, endotelijske celice in maligne celice več različnih karcinomov. Povečano izražanje mRNA in proteina v tkivih najdemo v akutnih in kroničnih vnetjih, pri regeneraciji tkiva, fibrozi in nekaterih rakavih obolenjih. Koncentracije v serumu so povečane pri starejših, zdravih ljudeh v primerjavi z mlajšimi, predvsem zaradi povečanega subkliničnega vnetja ali neodkritih bolezni (79). V primerjavi z mediano koncentracij, določeno pri zdravih krvodajalcih, vključenih v našo raziskavo, imajo vse skupine bolnikov statistično značilno višjo mediano. Pri bolnikih s poslabšanjem bolezni so koncentracije nekoliko višje kot pri bolnikih brez poslabšanja. Če primerjamo skupino bolnikov s poslabšanjem bolezni, imajo ob času postavitve diagnoze višje koncentracije kot ob času pojava poslabšanja bolezni. Johansen in sod. (80) leta 1999 podobno ugotovijo, da ima polovica bolnikov z GCA zvišane koncentracije v serumu v primerjavi z zdravimi. Prav tako je imela polovica bolnikov s poslabšanjem bolezni višje koncentracije v primerjavi z bolniki brez poslabšanja (80). Longitudinalno koncentracija po 3 mesecih od postavitve diagnoze zelo pade in je nato konstantna, kar je v skladu z navedbami Johansen

in sod. (80), ki trdijo, da se koncentracije CHI3-L1 po zdravljenju znižajo in po 1 mesecu normalizirajo. Imunhistokemično je ista skupina dokazala prisotnost CHI3-L1 v velikankah in makrofagih v vnetih arterijah, predvsem na stiku med medijo in intimo, vzdolž notranje elastične membrane. Zanimivo, niso zaznali izražanja v makrofagih v intimi in adventiciji (80). Rodriguez-Pla in sod. (70) na mikromrežah ugotovijo povečano izražanje genov za CHI3-L1 pri bolnikih z GCA v primerjavi z zdravimi. Ker pri naši študiji gen za CHI3-L1 ni bil izražen v arterijah bolnikov z GCA, lahko trdimo, da pri teh bolnikih še ni razvito kronično vnetje oziroma še ni prišlo do procesa regeneracije tkiva, pri katerem igra CHI3-L1 pomembno vlogo. Glede na to, da so koncentracije CHI3-L1 povišane v serumih bolnikov, gen v arterijah pa se ne izraža, bi bili lahko vir CHI3-L1 tudi krožeči monociti oziroma druge vnetne celice v krvnem obtoku. Vsekakor bi bilo potrebno podrobneje preučiti vlogo CHI3-L1 pri procesu GCA, saj rezultati kažejo njegovo potencialno uporabnost pri pomoči pri postavitvi diagnoze in tudi za potencialno razlikovanje bolnikov brez poslabšanja bolezni in bolnikov s poslabšanjem bolezni. Prav tako bi bilo zanimivo CHI3-L1 primerjati še s kliničnimi znaki in ugotoviti, če obstaja povezanost z ESR in CRP.

5.6 MAKROFAGNI RECEPTOR S KOLAGENSKO STRUKTURO

MARCO je receptor, ki se specifično nahaja na površini makrofagov. Konstitutivno se izraža na makrofagih v vranici in limfatičnih organih, kjer ima neposredno vlogo pri odstranitvi patogenov (81). V raziskavi, ki so jo opravili Rodriguez-Pla in sod. (70) na mikromrežah, so ugotovili močno povečano izražanje gena za MARCO pri bolnikih z GCA v primerjavi z zdravimi posamezniki. Tudi v naši raziskavi se je gen za MARCO bolj izražal pri bolnikih z GCA (5 od 6 bolnikov je imelo povečano izražanje gena) v primerjavi s preiskovanci, ki nimajo potrjene diagnoze GCA (le pri enem od 6 je bilo izražanje povečano). To nakazuje prisotnost makrofagov v vnetih arterijah, ki so očitno v večji količini izraženi pri bolnikih z GCA v primerjavi s tistimi, ki nimajo potrjene diagnoze. Tudi vlogo MARCO v patogenezi GCA bi bilo potrebno podrobneje preučiti, saj bi bil lahko uporaben označevalec aktivnega procesa GCA.

5.7 CELIČNI TIPI

Za GCA so značilne celice Th in makrofagi, manj pa limfociti B in granulociti. Ugotovili so že, da imajo glavno vlogo pri imunopatogenezi GCA celice Th ter, da sta pomembna dva podtipa makrofagov, M1 in M2. Vloga nevtrofilcev v patogenezi GCA pa še ni dobro poznana (82). V raziskavi so Foell in sod. (82) ugotovili, da tudi nevtrofilci prispevajo k procesu vnetja pri GCA, saj so le-ti prve imunske celice, ki prispejo na mesto vnetja. Nevtrofilci so bili prisotni v vnetih arterijah bolnikov z GCA, predvsem v adventiciji, znotraj in okoli vasa vasorum, ki predstavlja vhod za vnetne celice v vneto žilno steno. Nevtrofilci bi lahko sodelovali pri patogenezi GCA s tem, da aktivirajo endotelijske celice, izločajo provnetne posrednike in proizvajajo ROS (82). V drugi raziskavi so ugotovili večjo fagocitno aktivnost granulocitov pri bolnikih z GCA v primerjavi z zdravimi kontrolami in bolniki s PMR. Navajajo tudi, da bi lahko bilo povečano izražanje IL-8, ki ima kemotaktično aktivnost za privabljanje nevtrofilcev, povezano z večjim izražanjem genov za nevtrofilce v arterijah bolnikov z GCA (63). Nadkarni in sod. (64) prav tako poročajo o vpletenosti nevtrofilcev v patogenezo GCA. Spremljanje fenotipa nevtrofilcev bi namreč lahko napovedalo poslabšanje bolezni in potek samega zdravljenja - katerim bolnikom lahko znižamo odmerek ali ukinemo terapijo (64). Aktivirane makrofage lahko razdelimo v več podtipov. Podtip M1 aktivira IFN- γ , skupaj z drugimi vnetnimi citokini (npr. TNF- α). M1 so pomembni za odstranitev mikroorganizmov in izločajo velike količine provnetnih citokinov (IL-1, IL-6, TNF- α) ter ROS in RNS. Podtip M2 aktivirajo neposredno IL-4 in IL-13, posredno pa tudi IL-33 in IL-21. Prav tako jih lahko aktivirajo GS, TGF- β in IL-10. M2 so pomembni za fagocitozo apoptotičnih nevtrofilcev, zmanjšajo tvorbo provnetnih citokinov, pospešeno sintetizirajo dejavnike, pomembne pri regeneraciji tkiva in neoangiogenezi (VEGF, IL-6, TNF- α), izločajo velike količine IL-10 in pospešijo produkcijo MMP iz endotelija (83). V naših vzorcih se geni za označevalce limfocitov B, granulocitov in makrofagov M2 dobro izražajo. Med skupinami pa ni večjih razlik v izražanju teh genov. Zanimivo, pri 5 bolnikih, ki imajo večje izražanje genov za vse 3 celične vrste, opazimo tudi večje izražanje genov za citokine IL-6, TNF- α in IL-8. Zanimivo je tudi, da imajo 3 od 6 bolnikov z GCA manjše gensko izražanje vseh 3 celičnih tipov v primerjavi z bolniki, ki nimajo potrjene diagnoze GCA. Presenetljivo se dobro izraža tudi gen za limfocite B, kar v dosedanjih raziskavah niso potrdili (7, 9, 18). Vsekakor

bi bilo smiselno opraviti več raziskav glede nevtrofilcev in podrobneje preučiti njihovo vlogo pri patogenezi GCA.

5.8 PREDNOSTI IN OMEJITVE ŠTUDIJE

Zanimivo bi bilo pridobiti več kliničnih podatkov o posameznih bolnikih. Uporabni bi bili predvsem podatki o tem, kako močno sistemsko vnetno reakcijo so imeli bolniki, mogoče pridobiti podatke o koncentracijah proteinov akutne faze, natančneje opredeliti poslabšanje bolezni in ugotoviti ali je pri bolnikih s poslabšanjem bolezni prišlo tudi do ishemičnih zapletov, da bi to skušali povezati s povečanimi koncentracijami posameznih analitov v serumu in s povečanim genskim izražanjem v temporalnih arterijah. Izražanje nekaterih genov (za IL-6, TNF- α , IL-8, ICAM-1, VCAM-1, MMP) bi bilo mogoče smiselno ponovno določiti 6 mesecev ali leto kasneje po postavitvi diagnoze in primerjati izražanje, da bi preverili, če na njihovo izražanje vpliva proces neoangiogeneze. Prav tako bi bilo mogoče smiselno opredeliti prisotnost hiperplazije intime, neoangiogeneze in zaporo lumna žile pri posameznih bolnikih in pogledati povezavo med izražanjem genov in koncentracijo analitov v serumu. Zanimivo bi bilo tudi pridobiti rezine bioptičnih vzorcev tkiv temporalnih arterij bolnikov in histokemično pogledati katere imunske celice so prisotne v vneti arteriji in v katerih plasteh se nahajajo.

Naša raziskava je bila v osnovi dobro zasnovana, saj smo hkratno določevali koncentracijo večjega števila analitov v serumih velikega števila preiskovancev. Največja prednost je bila ta, da smo v raziskavo poleg zdravih krvodajalcev, vključili tudi preiskovance s sumom na GCA, ki histološko ni bil potrjen. Prav tako smo v raziskavo vključili bolnike brez kasnejšega poslabšanja in bolnike s kasnejšim poslabšanjem bolezni, katerih vzorce serumov smo pridobili v različnih časovnih obdobjih. Koncentracije posameznih analitov smo spremljali tudi longitudinalno. Kot pomanjkljivost bi bilo za izpostaviti, da izražanja posameznih genov v temporalnih arterijah ni bilo mogoče primerjati med zdravimi in bolniki z GCA, temveč med bolniki s histološko potrjenim GCA in preiskovanci s histološko ovrženo diagnozo GCA, ki so imeli klinične znake, značilne za GCA. Zato bi bilo zanimivo tudi izvedeti, za kakšno bolezensko stanje gre pri teh bolnikih. V kolikor gre za PMR ali za kakšen drug tip vaskulitisa to pojasni povečano gensko izražanje vnetnih citokinov, proteinov akutne faze, granulocitov in makrofagov. V literaturi prihaja, med že opravljenimi raziskavami, do več nasprotujočih si ugotovitev, kar je verjetno posledica

uporabe različnih metod, z različno analitično občutljivostjo in dejstva, da preiskovanci večinoma niso imeli natančno opredeljene diagnoze. Nekateri preiskovanci so imeli postavljeno diagnozo PMR, drugi GCA, tretji PMR in GCA. Pogosto so bile raziskave opravljene na majhnemu številu preiskovancev, prav tako pa pri vseh ni bilo jasno opredeljeno ali so bolnikom že uvedli terapijo ali ne in kolikšen odmerek GS so prejeli.

6 SKLEPI

Z določanjem koncentracij analitov, vpletenih v patologijo GCA, v serumih zdravih krvodajalcev in bolnikov z GCA ter določanjem razlik v genskem izražanju molekul, vpletenih v patologijo GCA, v vzorcih bioptičnih tkiv temporalnih arterij bolnikov s histološko potrjeno in preiskovancev s histološko ovrženo diagnozo GCA, smo prišli do naslednjih sklepov:

1. Koncentracije $\text{TNF-}\alpha$, IL-8, MMP-9, VCAM-1 in CHI3-L1 so statistično značilno višje pri bolnikih s potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z zdravimi krvodajalci. Koncentracije IL-6 in SAA so višje pri bolnikih s histološko potrjeno diagnozo GCA kot pri preiskovancih s histološko ovrženo diagnozo GCA.
2. Koncentracije MMP-2 in MMP-9 so statistično značilno višje pri bolnikih z GCA ob času poslabšanja bolezni (t_1) v primerjavi z bolniki z GCA, ki kasneje ne doživijo poslabšanja bolezni. Koncentracije IL-6, IL-8, MMP-9, ICAM-1, VCAM-1, L-selektina, CHI3-L1 in SAA so višje pri bolnikih s kasnejšim poslabšanjem bolezni, ob času postavitve diagnoze (t_0), kot pri bolnikih, ki kasneje ne doživijo poslabšanja bolezni.
3. Koncentracije MMP-2 so statistično značilno višje, koncentracije SAA pa statistično značilno nižje, pri bolnikih z GCA ob času poslabšanja bolezni (t_1) v primerjavi s časom ob postavitvi diagnoze, ko še ni bilo poslabšanja (t_0). Koncentracije $\text{TNF-}\alpha$ in VCAM-1 so višje, koncentracije IL-6, IL-8, ICAM-1 in CHI3-L1 pa nižje, pri bolnikih ob času poslabšanja bolezni (t_1) v primerjavi s časom ob postavitvi diagnoze (t_0).
4. Gensko izražanje MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, VCAM-1, feritina in MARCO je večje, izražanje MMP-2 in apoA1 pa manjše, pri bolnikih s histološko potrjeno diagnozo GCA v primerjavi z bolniki z ovrženo diagnozo GCA.

7 LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Littera Picta, Slovensko medicinsko društvo, Ljubljana, 2011: 1524-1527.
2. Hutchinson J: Diseases of arteritis. Arch Surg 1890; 1: 323.
3. Horton B, Magath T, Brown G: Arteritis of temporal vessels: previously undescribed form. Arch Int Med 1934; 53: 400-409.
4. Salvarani C, Cantini F, Hunder GG: Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. Lancet 2008; 372: 234-245.
5. Petri H, Nevitt A, Sarsour K, Napalkov P, Collinson N: Incidence of giant cell arteritis and characteristics of patients: data-driven analysis of comorbidities. Arthritis Care Res 2015; 67(3): 390-395.
6. Devauchelle-Pensec V, Jousse S, Destombe C, Saraux A: Epidemiology, imaging and treatment of giant cell arteritis. Joint Bone Spine 2008; 75: 267-272.
7. Boura P, Tselios K, Gkougkourelas I, Sarantopoulos A: Immunopathophysiology of large vessel involvement in giant cell arteritis-implications on disease phenotype and response to treatment. Dostop: 15.1.2015.
<http://www.intechopen.com/books/updates-in-the-diagnosis-and-treatment-of-vasculitis/immunopathophysiology-of-large-vessel-involvement-in-giant-cell-arteritis-implications-on-disease-ph>.
8. Rahman W, Rahman F: Giant cell (temporal) arteritis: an overview and update. Survey Ophthalmol 2005; 50: 415-427.
9. Weyand CM, Liao J, Goronzy JJ: The immunopathology of giant cell arteritis: diagnostic and therapeutic implications. J Neuro Ophthalmol 2012; 32: 259-265.
10. Kawasaki A, Purvin V: Giant cell arteritis: an updated review. Acta Ophthalmol 2009; 87: 13-32.
11. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ: Acute phase reaction and acute phase proteins. JZUS 2005; 11: 1045-1056
12. Lakota K, Frank M, Buzan O, Tomsic M, Rozman B, Sodin-Semrl S: Acute phase proteins in prototype rheumatic inflammatory diseases. Dostop: 25.3.2015.
<http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-regulation-and-functions-of-acute-phase-proteins/acute-phase-proteins-in-prototype-rheumatic-inflammatory-diseases>.

13. Janciauskiene S, Welte T, Mahadeva R: Acute phase proteins: Structure and function relationship. Dostop: 25.3.2015.
<http://www.intechopen.com/books/acute-phase-proteins-regulation-and-functions-of-acute-phase-proteins/acute-phase-proteins-structure-and-function-relationship>.
14. Weyand CM, Goronzy JJ: Giant cell arteritis, polymyalgia rheumatica and takayasu's arteritis, v: Klippel JH, Stone JH, Crofford LJ, White PH: Primer on the rheumatic diseases, 13. izdaja, Springer, New York, 2008: 398-408.
15. Weyand CM, Goronzy JJ: Mechanisms of disease: Medium- and large- vessel vasculitis. N Engl J Med 2003; 349: 160-169.
16. Ness T, Bley T, Schmidt W, Lamprecht P: The diagnosis and treatment of giant cell arteritis. Dtsch Arztebl Int 2013; 110(21): 376-386.
17. Fakin A, Kerin V, Hawlina M: Prizadetost vida pri temporalnem arteritisu. Zdrav Vestn 2012; 81: 140-150.
18. Weyand CM, Goronzy JJ: Immune mechanisms in medium- and large-vessel vasculitis. Nat Rev Rheumatol 2013; 9: 731-740.
19. Ma-Krupa W, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younger BR, Goronzy JJ, Weyand CM: Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. Am J Pathol 2002; 161: 1815-1823.
20. Deng J, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, Younger BR, Goronzy JJ, Weyand CM: TLR4 and TLR5 induce distinct types of vasculitis. Circ Res 2009; 104: 488-495.
21. Mohan S, Liao J, Kim J, Goronzy JJ, Weyand CM: Giant cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors. Arthritis Res Ther 2011; 13: 231-240.
22. Brochers A, Gershwin M: Giant cell arteritis: a review of classification, pathophysiology and treatment. Autoimmun Rev 2012; 11: 544-554.
23. Vozelj M: Temelji imunologije, 1. izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 239-256.
24. Roitt IM, Brostoff J, Male DK: Immunology, 6. izdaja, Mosby Elsevier, Edinburgh, 2002: 243-273.
25. Rollins BJ: Chemokines. Blood J 1997; 90: 909-928.
26. Hilhorst M, Shirai T, Berry G, Goronzy JJ, Weyand CM: T cell-macrophage interactions and granuloma formation in vasculitis. Front Immunol 2014; 5: 1-14.
27. Weyand CM, Tetzlaff N, Björnsson J, Brack A, Younger B: Disease patterns and tissue cytokine profiles in giant cell arteritis. Arthritis Rheum 1997; 40: 19-26.

28. Cid MC, Hernandez-Rodriguez J, Esteban MJ, Cebrian M, Song-Gho Y, Fond C, Urbano-Marquez A, Grau JM, Kleinman HK: Tissue and serum angiogenetic activity is associated with low prevalence of ischemic complications in patients with giant cell arteritis. *Circulation* 2002; 106: 1664-1671.
29. Goronzy JJ, Weyand CM: Cytokines in giant cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002; 169, SII: 91-94.
30. Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil J, Rossello-Urgell J, Huguet-Redecilla P, Stone J, Vilardell-Tarres M: Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling. *Circulation* 2005; 112: 264-269.
31. Weyand CM, Ma-Krupa W, Goronzy JJ: Immunopathways in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Autoimm Rev* 2003; 3: 46-53.
32. Kasama T, Takahashi R, Wakabayashi K, Miwa Y: Clinical relevance of cytokines, chemokines and adhesion molecules in systemic vasculitis. Dostop: 25.4.2015. <http://www.intechopen.com/books/advances-in-the-etiology-pathogenesis-and-pathology-of-vasculitis/clinical-relevance-of-cytokines-chemokines-and-adhesion-molecules-in-systemic-vasculitis>.
33. Cid MC, Cebrian M, Font C, Coll-Vinent B, Hernandez-Rodriguez J, Esparza J, Urbano-Marquez A, Grau JM: Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 184-194.
34. Martinez-Taboada V, Alvarez L, Ruiz-Soto M, Marin-Vidalled M, Lopez-Hoyos M: Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: Role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment. *Cytokine* 2008; 44: 207-220.
35. Weyand CM, Goronzy JJ: Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *N Engl J Med* 2014; 371: 50-57.
36. Gonzalez-Gay M: Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: two different but often overlapping conditions. *Arthritis Rheum* 2004; 33: 289-293.
37. Ghosh P, Borg F, Dasgupta B: Current understanding and management of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6: 913-928.
38. Younge B, Weyand CM, Goronzy JJ: Occurrence of giant cell arteritis...suddenly. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2007; 105: 141-145.
39. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al: The American Collage of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1122-1128.

40. Dasgupta B, Borg FA, Hassan N, Alexander L, Barraclough K, Bourke B, Fulcher J, Hollywood J, Hutchings A, James P, Kyle V, Nott J, Power M, Ash S: BSR nad BHPR guidelines for the management of giant cell arteritis. *Rheumatology*, 2010; 49: 1594-1597.
41. Barnes P: Glucocorticosteroids: Current and future directions. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 29-43.
42. Kotnik P: Vpliv protivnetnega zdravljenja z glukokortikosteroidi na število in težo okužb dihal pri otrocih z astmo. *Med razgl* 1999; 38: 167-192.
43. Deng J, Younge B, Olshen R, Goronzy JJ, Weyand CM: Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010; 121: 906-915.
44. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I: Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108-148.
45. Bustin SA, Nolan T: Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15: 155-166.
46. Emilie D, Liozon E, Crevon MC, Portier A, Liozon F, Galanaud P: Production of IL-6 by granulomas of giant cell arteritis. *Hum Immunol* 1994; 39: 17-24.
47. Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM: Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1286-1294.
48. Roblot P, Morel F, Lelievre E, Gascan H, Wijdenes J, Lecron JC: Serum cytokine and cytokine receptor levels in patients with giant cell arteritis during corticosteroid therapy. *J Rheumatol* 1996; 23: 408-410.
49. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Bonnotte B: Is TNF- α really involved in giant cell arteritis pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: e1-e2.
50. Van der Geest KSM, Abdulahad WH, Rutgers A, Horst G, Bijzet J, Arends S, Roffel MP, Boots AMH, Brouwer E: Serum markers associated with disease activity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2015; 262: 1-6.
51. Weyand CM, Fulbright JW, Hunder GG, Evans JM, Goronzy JJ: Treatment of giant cell arteritis; interleukin-6 as a biologic marker of disease activity. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1041-1048.
52. Garcia-Martinez A, Hernandez-Rodriguez J, Espigol-Frigole G, Prieto-Gonzalez S, Butjosa M, Segarra M, Lozano E, Cid MC: Clinical relevance of persistently elevated

- circulating cytokines (TNF- α and IL-6) in the long-term follow-up of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Care Res* 2010; 62: 835-841.
53. Visvanathan S, Rahman MU, Hoffman GS, Xu S, Garcia-Martinez A, Segarra M, Lozano E, Espigol-Frigole G, Hernandez-Rodriguez J, Cid MC: Tissue and serum markers of inflammation during the follow-up of patients with giant cell arteritis - a prospective longitudinal study. *Rheumatology* 2011; 50: 2061-2070.
54. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, Grau JM, Urbano-Marquez A, Colomer D, Kleinman HK, Cid MC: Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant cell arteritis. *Circulation* 2003; 107: 2428-2434.
55. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Principe S, Raiata F, Cavazza A, Guggino G, Accardo-Palumbo A, Boiardi L, Ferrante A, Principato A, Giardina A, De-Leo G, Salvarani C, Triolo G: Expression of interleukin-32 in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2097-2104.
56. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, Queralt C, Grau JM, Urbano-Marquez A, Palacin A, Colomer D, Cid MC: Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant cell arteritis. *Rheumatology* 2003; 1-8.
57. Seror R, Baron G, Hachulla E, et al: Adalimumab for steroid sparing in patients with giant-cell arteritis: results of a multicentre randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 2014-2081.
58. Weyand CM, Hicok KC, Goronzy JJ: Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1994; 121: 484-491.
59. De Jager W, Bourcier K, Rijkers GT, Prakken BJ, Seyfert-Margolis V: Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *Bio Med Central* 2009; 10: 52-63.
60. Espígol-Frigolé G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, García-Martínez A, Prieto-González S, Hernández-Rodríguez J, Grau JM, Rahman MU, Cid MC: Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1481-1487.

61. Blain H, Abdelmouttaleb I, Belmin J, Blain A, Floquet J, Goueant J, Jeandel C: Arterial wall production of cytokines in giant cell arteritis: results of a pilot study using human temporal artery cultures. *J Gerontol* 2002; 57: 241-245.
62. Aziz N, Nishanian p, Mitsuyasu R, Detels R, Fahey JL: Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(1): 89-95.
63. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Calvo-Alen J, Aurrecoechea E, Villa I, Mrtinez-Taboada VM: Phagocyte dysfunction in polymyalgia rheumatica and other age-related, chronic, inflammatory conditions. *JLB* 2013; 94: 1071-1078.
64. Nadkarni S, Dalli J, Hollywood J, Mason JC, Dasgupta B, Peretti M: Investigational analysis reveals a potential role for neutrophils in giant cell arteritis disease progression. *Circ Res* 2014; 114: 242-248.
65. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 562-573.
66. Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
67. Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, Hernandez-Rodriguez J, Lozano E, Grau JM, Cid MC: Gelatinase expression and proteolytic activity in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1429-1435.
68. Tomita T, Imakawa K: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in giant cell arteritis: an immunocytochemical study. *Pathology* 1998; 30: 40-50.
69. Sorbi D, French DL, Nuovo GJ, Kew RR, Arbeit LA, Gruber BL: Elevated levels of 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase 9) in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (10): 1747-1753.
70. Rodriguez-Pla A, Martinez-Murillo F, Savino PJ, Eagle RC, Seo P, Soloski MJ: MMP-12, a novel matrix metalloproteinase associated with giant cell arteritis. *Rheumatology* 2009; 48: 1460-1461.
71. Nikkari ST, Hoyhtya M, Isola J: Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol* 1996; 149: 1427-1433.
72. Coll-Vinent B, Vilardell C, Font C, Oristrell J, Hernandez-Rodriguez J, Urbano-Marquez A, Grau JM, Cid MC: Circulating soluble adhesion molecules in patients

- with giant cell arteritis. Correlation between soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) concentrations and disease activity. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 189-192.
73. Remahl N, Bratt J, Möllby H, Nordborg E, Waldenlind E: Compariosn of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin levels in patients with episodic cluster headache and giant cell arteritis. *Cephalalgia* 2008; 28: 157-163.
74. Singh NK, Varshney AN, Meena RP: Serum amyloid A as a sensitive marker of disease activity in rheumatic diseases. *IJRCI* 2014; 2(S1): SR1.
75. Hachulla E1, Saile R, Parra HJ, Hatron PY, Gosset D, Fruchart JC, Devulder B: Serum amyloid A concentrations in giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a useful test in the management of the disease. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9(2): 157-163.
76. Yamane T, Yamauchi H, Abe N, Torio N, Shimada R, Senba T, Imaizumi Y, Nomura T: Serum amyloid A as a useful index of disease activity in polymyalgia rheumatica. *Ryumachi* 2003; 43(3): 544-548.
77. Koorts AM, Viljoen M: Acute phase proteins: ferritin and ferritin isoforms. Dostop: 16.4.2015.
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/21451.pdf>.
78. Baerlacken NT, Linnemann A, Gross WL, Moosig F, Vazquez-Rodriguez TR, Gonzalez-Gay MA, Martin J, Kotter I, Henes JC, Melchers I, Vaith P, Schmidt RE, Witte T: Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 943-947.
79. Johansen JS: Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006; 53: 172-209.
80. Johansen JS, Baslund B, Garbarsch C, Hansen M, Stoltenberg M, Lorenzen I, Price PA: YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2624-2630.
81. Pikkarainen T, Brännström A, Tryggvason K: Expression of macrophage MARCO receptor induces formation of dendritic plasma membrane processes. *J Biol Chem* 1999; 274: 10975-10982.
82. Foell D, Hernandez-Rodriguez J, Sanchez M, Vogl T, Cid MC, Roth J: Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. *J Pathol* 2004; 204: 311-316.
83. Gordon S, Martinez FO: Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010; 32: 593-604.