

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca PLANKL

**VPLIV ATORVASTATINA NA SINTEZO
CITOKINOV VNETNEGA IN SPECIFIČNEGA
IMUNSKEGA ODZIVA V KULTURAH HUMANIH
MONONUKLEARNIH CELIC IZ VENSKE KRVI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mojca PLANKL

**VPLIV ATORVASTATINA NA SINTEZO CITOKINOV VNETNEGA
IN SPECIFIČNEGA IMUNKEGA ODZIVA V KULTURAH
HUMANIH MONONUKLEARNIH CELIC IZ VENSKE KRVI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF ATORVASTATIN ON SYNTHESIS OF
INFLAMMATORY AND SPECIFIC IMMUNE RESPONSE
CYTOKINES IN CULTURES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD
MONONUCLEAR CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za diagnostiko alergij in citokinov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja, za somentorico pa višjo znan. sod. dr. Branko Wraber.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: višja znan. sod. dr. Branka WRABER
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Tomaž MARŠ, dr. med.
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Datum zagovora: 21.4.2009

Naloga je rezultat lastnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mojca Plankl

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 612:612.114:577.245(043.2)=163.6
KG atorvastatin/PBMC/vnetni odziv/specifični imunski odziv/interferon- γ /interlevkin-2/
interlevkin-4/interlevkin-6/tumorje-nekrotizirajoči faktor- α /ELISA
KK
AV PLANKL, Mojca
SA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (mentorica)/WRABER, Branka (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2009
IN VPLIV ATORVASTATINA NA SPROŠČANJE CITOKINOV VNETNEGA IN
SPECIFIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA V KULTURAH HUMANIH
MONONUKLEARNIH CELIC IZ VENSKE KRVI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 72 str., 14 pregl., 11 sl., 1 pril., 105 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Statini so zelo učinkovita zdravila, ki znižujejo raven holesterola v krvi. Z zaviranjem biosinteze holesterola zmanjšajo tudi nastanek izoprenoidnih derivatov, zaradi česar je njihovo delovanje pleiotropno. V okviru diplomske naloge smo se odločili proučiti vpliv atorvastatina na sproščanje citokinov vnetnega (IL-6 in TNF- α) in specifičnega imunskega odziva (IFN- γ , IL-2 in IL-4). Iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev smo izolirali mononuklearne celice (PBMC). Gojili smo jih v kulturah, k sproščanju citokinov pa smo jih spodbudili z dodatkom ustreznega aktivatorja – LPS za vnetne citokine, ionomicin in forbolni ester PMA za citokine specifičnega imunskega odziva. V kulture smo dodali tudi različne koncentracije atorvastatina. Citokine smo v supernatantih kultur merili z encimskoimunskim testom (ELISA). Glede na kontrolo so se koncentracije obeh vnetnih citokinov značilno znižale, pri čemer je bila odvisnost med učinkom atorvastatina in njegovo koncentracijo obratnosorazmerna. Podoben je bil odziv pri IFN- γ in IL-4. Koncentracija IL-2 pa se je ob prisotnosti atorvastatina zvišala. Predvsem pri citokinih specifičnega imunskega odziva so bili koeficienti variacije zelo visoki, kar je posledica individualnih odzivov pri sproščanju citokinov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 612:612.114:577.245(043.2)=163.6
- CX atorvastatin/PBMC/inflammatory response/specific immune response/interferon- γ /
interleukin-2/interleukin-4/interleukin-6/tumor necrosis factor- α /ELISA
- CC
- AU PLANKL, Mojca
- AA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/WRABER, Branka (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI EFFECT OF ATORVASTATIN ON SYNTHESIS OF INFLAMMATORY AND
SPECIFIC IMMUNE RESPONSE CYTOKINES IN CULTURES OF HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 72 p., 14 tab., 11 fig., 1 ann., 105 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Statins are highly efficient cholesterol-lowering drugs. By inhibiting the key step in cholesterol biosynthetic pathway, statins also prevent the synthesis of other important isoprenoid intermediates, which is the reason for their pleiotropic effects. We decided to investigate the effect of atorvastatin on synthesis of inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and specific immune response cytokines (IFN- γ , IL-2 and IL-4). From peripheral blood of healthy adult donors we isolated mononuclear cells (PBMC). We stimulated cultures of PBMC for cytokine production with an appropriate activator (either LPS or combination of ionomycin and phorbol ester PMA). PBMC were grown in the presence of three different concentrations of atorvastatin. Cytokine concentrations in culture supernatants were measured with ELISA. Levels of both inflammatory cytokines were significantly lower in the presence of atorvastatin, with negative dose-response relationship. Similar results were observed by measuring IFN- γ and IL-4, whereas IL-2 concentrations were higher regarding the control (PBMC grown in absence of atorvastatin). Very high values of coefficient of variance are due to variable cytokine responses of PBMC from different donors.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VNETJE	3
2.2 ATEROSKLEROZA	4
2.2.1 Vnetje in ateroskleroza	5
2.3 STATINI	5
2.3.1 Protivnetno delovanje statinov	7
2.3.1.1 Vpliv statinov v razmerah <i>in vitro</i>	8
2.3.1.2 Vpliv statinov v razmerah <i>in vivo</i>	9
2.4 CITOKINI	11
2.4.1 Citokini v naših poskusih	12
2.4.1.1 Tumorje-nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)	12
2.4.1.2 Interlevkin-6 (IL-6)	13
2.4.1.3 Interferon- γ (IFN- γ)	14
2.4.1.4 Interlevkin-2 (IL-2)	15
2.4.1.5 Interlevkin-4 (IL-4)	15
2.4.2 Merjenje citokinov	16
2.5 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	19
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 Levkocitni koncentrat in vzorci krvi	20
3.1.2 Mediji	20
3.1.3 Aktivatorji PBMC	21
3.1.3.1 Lipopolisaharid (LPS) (Sigma, ZDA)	21
3.1.3.2 Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma, ZDA)	21

3.1.3.3	Ionicin (IONO) (Sigma, ZDA)	22
3.1.4	Atorvastatin (Krka d.o.o., Slovenija)	22
3.2	METODE	23
3.2.1	Osamitev PBMC iz levkocitnega koncentrata in venske krvi zdravih darovalcev	23
3.2.1.1	Princip osamitve	23
3.2.1.2	Opis postopka osamitve PBMC levkocitnega koncentrata	24
3.2.1.3	Opis postopka osamitve PBMC zdravih darovalcev	24
3.2.2	Določevanje števila PBMC v suspenziji	25
3.2.3	Raztapljanje atorvastatina	26
3.2.4	Aktivacija in gojenje PBMC	26
3.2.4.1	Aktivacija PBMC z LPS	26
3.2.4.2	Aktivacija PBMC z IONO in PMA	27
3.2.4.3	Gojenje PBMC za izvedbo testa citotoksičnosti atorvastatina	27
3.2.5	Določevanje koncentracije citokinov z encimskoimunskim testom (ELISA)	28
3.2.6	Določevanje citotoksičnosti atorvastatina	30
3.2.6.1	Princip določevanja citotoksičnosti	30
3.2.6.2	Postopek določevanja citotoksičnosti	31
3.2.7	Obdelava podatkov	32
4	REZULTATI	33
4.1	VPLIV ATORVASTATINA NA PBMC LEVKOCITNEGA KONCENTRATA	33
4.2	CITOTOKSIČNOST ATORVASTATINA	35
4.3	VPLIV ATORVASTATINA NA PBMC ZDRAVIH DAROVALCEV	36
4.3.1	Vpliv atorvastatina na sintezo IL-6 in TNF-α	36
4.3.2	Vpliv atorvastatina na sintezo IFN-γ, IL-4 in IL-2	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	58
7	VIRI	60
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Razpon koncentracij v umeritveni krivulji in meje občutljivosti testov ELISA za citokine IFN- γ , IL-2, IL-4 in IL-6 (Pierce Biotechnology, ZDA) in TNF- α (Milenia Biotec, Nemčija).	29
Pregl. 2: Opis kontrol, vključenih v test citotoksičnosti atorvastatina.	31
Pregl. 3: Koncentracije IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-2 v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC levkocitnega koncentrata.	34
Pregl. 4: Indeksi modulacije sproščanja IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-2 v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC levkocitnega koncentrata.	34
Pregl. 5: Citotoksični vpliv atorvastatina na kulture PBMC levkocitnega koncentrata.	35
Pregl. 6: Meritve IL-6 (pg/ml) v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	37
Pregl. 7: Meritve TNF- α (pg/ml) v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	38
Pregl. 8: Primerjava srednjih vrednosti IL-6 in TNF- α v supernatantih spodbujenih kultur PBMC zdravih darovalcev, izpostavljenih atorvastatinu, s kontrolo (samo spodbujene PBMC).	40
Pregl. 9: Pearsonovi koeficienti korelacije (r) med koncentracijo IL-6 in TNF- α v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	42
Pregl. 10: Meritve IFN- γ (pg/ml) v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	43
Pregl. 11: Meritve IL-4 (pg/ml) v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	44
Pregl. 12: Meritve IL-2 (pg/ml) v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	45
Pregl. 13: Primerjava srednjih vrednosti IFN- γ , IL-4 in IL-2 v kulturah spodbujenih PBMC, izpostavljenih atorvastatinu, s kontrolo (samo spodbujene PBMC).	48

Pregl. 14: Spearmanovi koeficienti korelacije (*rho*) med koncentracijami citokinov antigensko specifičnega imunskega odziva v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev. 50

KAZALO SLIK

Sl. 1: Kemijske strukture statinov, ki so trenutno v uporabi.	6
Sl. 2: Porazdelitev krvnih celic v gostotnem gradientu po centrifugiranju.	23
Sl. 3: Razredčena kri, nanesena na fikol-pak pred centrifugiranjem.	23
Sl. 4: Mrežni sistem, vrisan na Neubauerjevi komori.	25
Sl. 5: Princip določevanja citotoksičnosti.	30
Sl. 6: Prikaz razpršenosti koncentracij IL-6 in TNF- α v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	39
Sl. 7: Koncentracije IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu.	41
Sl. 8: Prikaz razpršenosti koncentracij IFN- γ in IL-4 v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	46
Sl. 9: Prikaz razpršenosti koncentracij IL-2 v supernatantih spodbujenih in atorvastatinu izpostavljenih kultur PBMC zdravih darovalcev.	47
Sl. 10: Koncentracije IFN- γ in IL-4 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu.	49
Sl. 11: Koncentracije IL-2 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu.	50

KAZALO PRILOG

Pril. A: Vprašalnik za izključitev alergijskih, avtoimunskih in kroničnih vnetnih bolezni pri osebah, vključenih v raziskavo kot zdrava kontrola

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavljajoče celice
AT	atorvastatin
BSF-2	celice B spodbujajoči faktor-2
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> , antigenske determinante gručnega razločevanja na levkocitih
CRP	C-reaktivni protein
CSF	kolonije spodbujajoči faktor
DAG	diacilglicerol
EAE	<i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i> , živalski model multiple skleroze
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> , encimskoimunski test
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A
HS	humani serum
HSF	hepatocyte spodbujajoči faktor
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> , medcelična adhezijska molekula-1
IFN	interferon
IL	interlevkin
IL-2R	receptor za IL-2
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
IONO	ionomicin
IP ₃	inozitol trifosfat
KV	koeficient variacije
LDH	laktat-dehidrogenaza
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> , lipoprotein nizke gostote
LPS	lipopolisaharid
MAF	makrofage aktivirajoči faktor
MCP-1	monocitni kemoatraktantni protein-1
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , poglavitni kompleks tkivne skladnosti

M-CSF	makrofagne kolonije spodbujajoči faktor
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , minimalni osnovni medij
NK	<i>Natural Killer Cell</i> , naravna celica ubijalka
NO	dušikov oksid
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> , molekularni vzorec, povezan z mikrobi
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , mononuklearne celice periferne krvi
PKC	protein-kinaza C
PLC- γ	fosfolipaza C- γ
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> , osnovni medij
SD	standardni odklon
SE	standardna napaka
TCGF	<i>T-cell Growth Factor</i> , T-celični rastni faktor
TCR	T-celični receptor
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> , transformirajoči rastni faktor- β
Th	<i>T helper cell</i> , celica T pomagalka
TNF- α	tumorje-nekrotizirajoči faktor- α
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> , adhezijska molekula žilnih celic-1
\bar{x}	srednja vrednost

1 UVOD

Imunski sistem se je med evolucijo razvijal ob sobivanju živali in mikroorganizmov, od katerih so se nekateri prilagodili na parazitski način življenja v živalskem gostitelju. Imunski sistem gradijo specializirane celice in molekule, njihovo skupno in usklajeno delovanje ob vdoru tujka pa imenujemo imunski odziv. Način prepoznavanja tujkov je osnova za razlikovanje naravne in pridobljene (antigensko specifične) imunosti (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

Naravna ali prirojena imunost združuje mehanizme, ki preprečujejo vdor potencialno patogenih mikrobov v organizem. Epitelijske pregrade (koža in sluznice) s protimikrobnimi snovmi močno otežujejo vstop mikrobom. Če do tega vseeno pride, jih prepoznajo receptorji, ki se vežejo na t.i. molekularne vzorce, povezane z mikrobi (PAMP, okr. *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Različne skupine mikrobov (virusi, po Gramu pozitivne bakterije, po Gramu negativne bakterije, glive) imajo namreč na svoji površini različne molekularne vzorce. Ko receptorji prepoznajo te vzorce, se aktivirajo efektorski mehanizmi, ki se razlikujejo glede na prepoznani mikrob. Bakterije običajno aktivirajo proteine komplementnega sistema, ki pospešijo fagocitozo in znotrajcelično ubijanje bakterij. Pri naravni imunosti proti virusom pa sodelujejo predvsem naravne celice ubijalke (celice NK) in specifični citokini, interferoni. Komponente naravne imunosti so prisotne že pred izpostavljenostjo mikrobom, kar omogoča njihovo takojšnje prepoznavanje in aktivacijo obrambnih mehanizmov (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

V primeru, da prirojena imunost ne zadostuje za obrambo, se pri vretenčarjih aktivira antigensko specifična ali pridobljena imunost. Limfociti so celice z receptorji, ki specifično prepoznavajo točno določene antigene mikrobnega ali nemikrobnega izvora. Limfociti B prepoznavajo površinske antigene in se odzovejo z izločanjem protiteles, ki posredujejo humoralno imunost. Limfociti T prepoznavajo antigene fagocitiranih in znotrajceličnih mikrobov, ki jih na svoji površini predstavljajo antigen predstavljajoče celice (APC). Limfocite T na osnovi izražanja površinskih proteinov CD4 in CD8 razdelimo v dve skupini, ki se ločita tudi funkcionalno. Limfociti CD8 se po aktivaciji diferencirajo v citotoksične celice T, limfociti CD4 pa po aktivaciji (imenujemo jih celice T pomagalke)

sproščajo citokine, ki vplivajo na razmnoževanje in diferenciacijo limfocitov T in drugih celic (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007; Murphy in sod., 2008).

Za učinkovito delovanje imunskega sistema je potrebno ustrezno uravnavanje prirojene in pridobljene imunosti. Za usklajeno delovanje celic imunskega sistema so ključnega pomena citokini – topni proteini, ki jih izločajo aktivirane celice imunskega sistema. V primeru prirojene odpornosti citokine večinoma izdelujejo mononuklearni fagociti (monociti oziroma makrofagi), med antigensko specifičnim imunskim odzivom pa celice T pomagalk. Vendar meja med citokini prirojene in pridobljene imunosti ni popolna, saj se lahko posamezen citokin pojavlja pri obeh tipih imunosti. Pomembnejše naloge citokinov so spodbujanje lokalnega vnetja, vpliv na rast in diferenciacijo limfocitov ter aktivacija različnih efektorskih celic za odstranjevanje tujkov (Abbas in sod., 2007).

Imunske celice in topni mediatorji imunosti potujejo po telesu tudi s krvjo. Zato ni presenetljivo, da je endotelij krvnih žil včasih tarča efektorskih mehanizmov imunskega odziva. V nekaterih primerih pa se zgodi, da mehanizmi, ki sicer ščitijo organizem, pripomorejo k nastanku bolezni (Hansson in Berne, 2004). Ena takšnih je ateroskleroza, krvožilna bolezen, ki so jo dolgo povezovali zgolj z nalaganjem lipidov na stene arterij. Danes vemo, da ima veliko vlogo pri nastanku in poteku te bolezni tudi vnetje (Libby, 2002).

Bolezni srca in ožilja so že nekaj časa vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti, predvsem v razvitem svetu. Zato so si mnogi raziskovalci prizadevali odkriti spojine, ki bi učinkovito zniževale raven lipidov v krvi, predvsem holesterola, ki je poglavitni vzrok za razvoj ateroskleroze. V začetku 70. let prejšnjega stoletja sta japonska raziskovalca iz plesni vrste *Penicillium citrinium* izolirala njen sekundarni metabolit, mevastatin (Endo in sod., 1976). Dodatne raziskave so pokazale, da omenjena spojina inhibira ključni encim v biosintezi holesterola. V naslednjih letih je bilo odkritih ali umetno sintetiziranih več kot deset statinov, ki danes predstavljajo najpogosteje predpisano skupino zdravil (Jain in Ridker, 2005). Statini so se izkazali kot učinkovito zdravilo tudi pri nekaterih bolezenskih stanjih, ki niso močno povezana s povišano koncentracijo lipidov v krvi (Sacks in sod., 1996). Ta ugotovitev in dejstvo, da na potek ateroskleroze močno vpliva vnetje, sta sprožila razmišljanje o protivnetnem delovanju statinov (Jain in Ridker, 2005).

2 PREGLED OBJAV

2.1 VNETJE

Vnetje je kompleksna reakcija naravne imunosti na mestih okužbe. Lahko se razvije tudi povsem neodvisno od imunskega sistema, npr. ob fizični poškodbi tkiva. Eden prvih odzivov je povečano pritekanje krvi v prizadeto območje. Hkrati se poveča prepustnost kapilar v lokalnem žilju, kar omogoči izstopanje velikih serumskih molekul (protitelesa, proteini komplementnega sistema) iz krvi. Sproži se tudi pospešeno prehajanje imunskih celic iz krvnih žil v prizadeto območje (Vozelj, 2000).

Ko tkivni makrofagi prepoznajo mikrobo, začnejo izločati vnetna citokina tumorjenekrotizirajoči faktor- α (TNF- α) in interlevkin-1 β (IL-1 β) ter kemokine. Omenjena citokina delujeta na endotelijske celice v bližini okužbe, ki začnejo na svoji površini izražati adhezijske molekule, imenovane selektini. Na njih se z nizko afiniteto vežejo levkociti, ki potujejo s krvjo, kar privede do pojava kotaljenja levkocitov. Sproščeni kemokini aktivirajo integrinske molekule na levkocitih, ki se vežejo na ustrezne ligande na površini endotelijskih celic. Ker so te vezave močnejše, se levkociti prenehajo kotaliti vzdolž endotelija. Kemokini spodbudijo pritrjene levkocite, da začnejo prehajati skozi medcelične prostore na mesto okužbe. Rezultat tega procesa je, da se levkociti, najprej nevtrofilci in kasneje monociti (v tkivu se imenujejo makrofagi), hitro zberejo v okolici vira okužbe (Abbas in sod., 2007).

Nevtrofilci in makrofagi (s skupnim imenom fagociti) imajo na površini več vrst receptorjev, s katerimi prepoznavajo mikrobo. Eni izmed njih služijo aktivaciji fagocitoze. Med njimi so tudi t.i. odstranjevalni receptorji, ki poleg mikrobov vežejo tudi spremenjene oblike lipoproteinov nizke gostote (LDL). Drugi receptorji prav tako služijo aktivaciji fagocitov, vendar ne sodelujejo neposredno pri fagocitozi. Nekateri med njimi ob vezavi mikroba sprožijo sintezo in sproščanje citokinov, drugi pa so receptorji za citokine, ki nastanejo med reakcijo na mikrobo. Aktivirani nevtrofilci in makrofagi uničujejo fagocitirane mikrobo na več načinov. Zunajcelične mikrobo, ujete v fagocitnih vakuolah, najpogosteje ubijejo z oksidativnim izbruhom, ki nastane z redukcijo molekularnega

kisika. V citosolu aktiviranih makrofagov in nevtrofilcev pa deluje inducibilna sintaza dušikovega oksida (iNOS), ki katalizira nastanek NO. Slednji je pomemben pri uničevanju mikrobov, ki so vdrlji v citosol. Omenjeni mikrobicidni produkti ne razlikujejo med mikrobnimi in zdravimi telesnimi celicami. Zato je pomembno, da sta trajanje in jakost lokalnega vnetja skrbno nadzorovana (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

Makrofagi poleg omenjenih vnetnih citokinov sproščajo tudi citokin interleukin-12 (IL-12), ki spodbudi sproščanje interferona- γ (IFN- γ) iz celic NK in limfocitov T. Na ta način se lahko v vnetni proces vključi tudi pridobljena imunost. IFN- γ povratno deluje na makrofage in jih dodatno spodbudi k uničenju fagocitiranih mikrobov (Abbas in sod., 2007).

2.2 ATEROSKLEROZA

Ateroskleroza je kronična napredujoča bolezen arterij in predstavlja vodilni vzrok umrljivosti v razvitem svetu, tudi v Sloveniji (Kharbanda in MacAllister, 2005; Markec Nered in Prodan, 2007). Za to bolezen je značilno nalaganje lipidov in fibroznih elementov v obliki aterosklerotičnih leh predvsem v velikih in srednje velikih arterijah. Lehe lahko postanejo tako velike, da otežujejo tok krvi skozi arterijo, vendar je najpomembnejši klinični zaplet nastanek krvnih strdkov na poškodovanih lehah (Lusis, 2000).

Eden glavnih dejavnikov tveganja za nastanek ateroskleroze je visoka koncentracija holesterola v plazmi, predvsem holesterola, vezanega na LDL (holesterol LDL). Zato je dolgo veljalo, da je v proces aterogeneze, ki vodi do nastanka aterosklerotičnih leh, v glavnem vključeno nalaganje lipidov na stene arterij (Ross, 1999). Po dognanjih raziskav zadnjih dvajsetih let pa aterosklerozo uvrščamo med vnetne bolezni, saj se v njenem poteku prepletajo mehanizmi prirojene in pridobljene imunosti, ki sodelujejo v vnetnih reakcijah (Ross, 1993; Libby, 1995; Hansson in Berne, 2004).

2.2.1 Vnetje in ateroskleroza

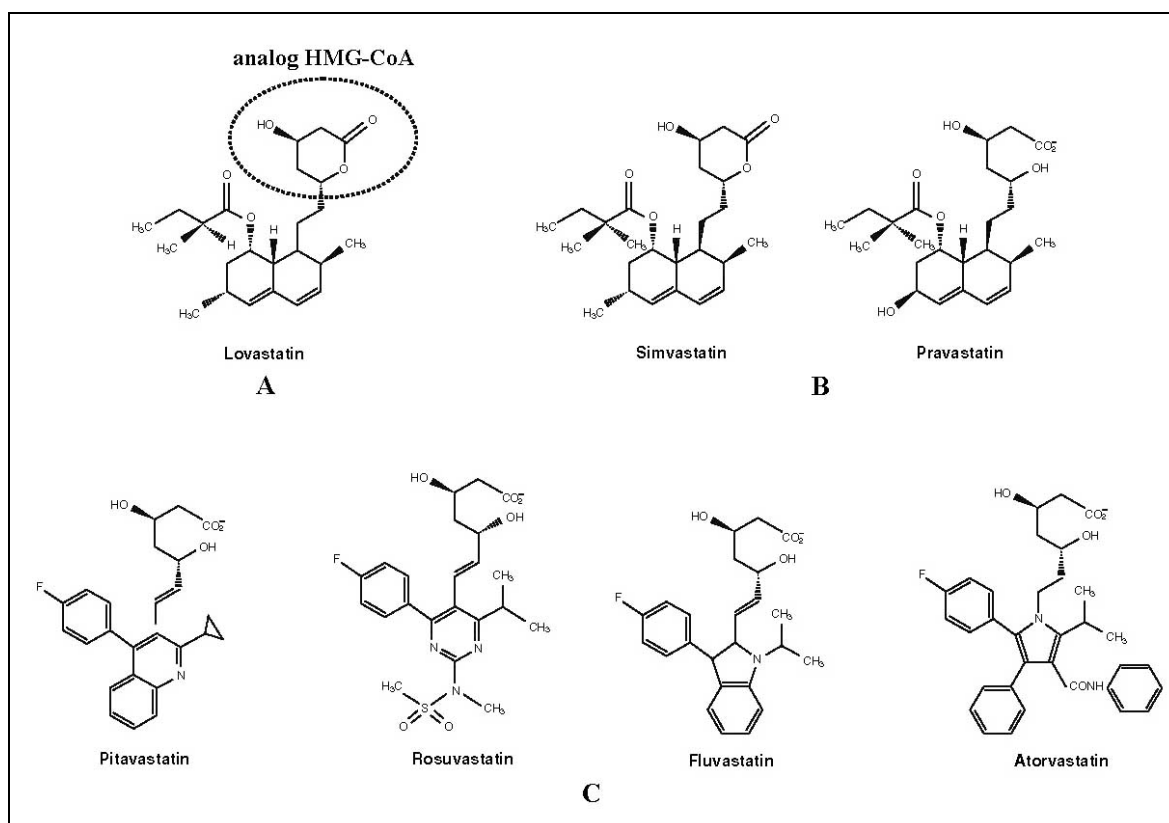
Raziskave na živalskih modelih, poskusi na celičnih kulturah in preiskave vzorcev človeških tkiv podpirajo mnenje, da začetek ateroskleroze predstavlja odziv prirojene imunosti na nalaganje in modifikacijo lipoproteinov v steni arterij (Hansson in Berne, 2004; Skåln in sod., 2002). Pri visoki koncentraciji LDL v plazmi je tudi kopičenje le-tega pod endotelijem hitrejše. Tam se LDL pogosto modificira, najpogosteje pride do oksidacije zaradi oksidativnih produktov endotelijskih celic. Oksidirani LDL spodbudi endotelijske celice, da začnejo na svoji površini izražati adhezijske molekule in izločati monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1). To omogoči vezavo monocitov na endotelijske celice in njihov prehod preko vmesnih stikov v subendotelijski prostor. Tam se monociti pod vplivom makrofagne kolonije spodbujajočega dejavnika (M-CSF), ki ga prav tako izločajo endotelijske celice, diferencirajo v makrofage. Kot že rečeno imajo tkivni makrofagi odstranjevalne receptorje, na katere se veže oksidirani LDL. Če se v makrofagih nakopiči preveč LDL, se spremenijo v t.i. penaste celice, ki sčasoma propadejo, njihova lipidna vsebina pa se nalaga v obliki nekrotičnega jedra aterosklerotične lehe. Ob nadaljevanju procesa se začnejo okoli lipidnega jedra razmnoževati tudi gladkomišične celice, s tem pa se leha še povečuje (Lusis, 2000; Hansson in Libby, 2006).

V okolici jedra lehe se nahajajo številni makrofagi in limfociti T. Večina teh celic je aktiviranih in izločajo vnetne citokine, npr. IL-1, TNF- α in IFN- γ . Med njimi je še posebej pomemben TNF- α , saj spodbuja nastanek prostih kisikovih radikalov. S tem se vzdržuje začaran krog vnetja, oksidacije LDL, nadaljevanje vnetja, vse dokler je v plazmi prisoten LDL (Ross, 1999; Ferro in sod., 2000; Hansson in Libby, 2006).

2.3 STATINI

Statini so skupina zdravil, ki učinkovito znižujejo raven holesterola v plazmi in se zato pogosto uporabljajo za zdravljenje hiperholesterolemije. Njihova učinkovitost temelji na kompetitivni inhibiciji encima 3-hidroksi-3-metilglutaril koencima A (HMG-CoA) reduktaze, ki katalizira omejujoči korak v biosintezi holesterola, pretvorbo HMG-CoA v

mevalonat. Del statinske molekule je strukturno analogen HMG-CoA (Sl. 1 A), poleg tega se statini na encim vežejo z več kot 1000-krat višjo afiniteto kot naravni substrat (Weitz-Schmidt, 2002; Pahan, 2006). Zmanjšana sinteza holesterola v jetrnih celicah sproži povečano sintezo LDL-receptorjev na površini teh celic in posledično povečan privzem holesterola iz krvi (Schachter, 2004). Trenutno je v farmacevtski obliki dostopnih sedem statinov, od katerih je lovastatin naraven, pravastatin in simvastatin sta njegovi modificirani obliki, atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin in pitavastatin pa so sintetični (McCarey in sod., 2005; Pahan, 2006). Kemijske strukture prvih treh statinov so si med seboj podobne, medtem ko se sintetični statini precej razlikujejo v zgradbi molekul (Sl. 1). Statini se med seboj razlikujejo tudi po učinkovitosti, ki narašča od naravnega proti sintetičnim statinom. Trenutno za najbolj učinkovitega velja atorvastatin (Veillard in Mach, 2002).



Slika 1: Kemijske strukture statinov, ki so trenutno v uporabi. Naravni lovastatin (A) in njegovi modificirani obliki (B) so si zelo podobni, sintetični statini (C) pa se v zgradbi precej razlikujejo (Schachter, 2004: 119).

Statini močno zmanjšajo tveganje za zaplete krvožilnih bolezni, vendar njihovih učinkov ne moremo v celoti razložiti z znižanjem ravni holesterola v plazmi. Rezultati kliničnih preizkušanj namreč kažejo, da imajo statini tudi mehanizme delovanja, ki niso povezani z lipidi. Kljub primerljivim koncentracijam holesterola imajo posamezniki iz skupine, zdravljeni s statinom, manj možnosti za nastanek bolezni srca in ožilja kot tisti iz placebo skupine (Jukema in sod., 1995; Sacks in sod., 1996; West of Scotland..., 1998; Schönbeck in Libby, 2004).

V nastanek in napredovanje ateroskleroze so vključeni štirje glavni tipi celic, in sicer endotelijske celice, gladkomišične celice, makrofagi in limfociti. Raziskovalci predvidevajo, da statini neposredno vplivajo na ključne mehanizme, preko katerih omenjene celice sodelujejo v poteku ateroskleroze. Glede na do sedaj opravljene raziskave statini vzdržujejo funkcionalnost endotelija in antioksidativne sposobnosti tkiv, zavirajo delitev gladkomišičnih celic in vnetje (Shovman in sod., 2002). Zaradi dejstva, da ima vnetje pomembno vlogo v poteku ateroskleroze, je velik poudarek na ugotavljanju protivnetnih mehanizmov delovanja statinov (Bessler in sod., 2005).

2.3.1 Protivnetno delovanje statinov

Ideja o vplivu statinov na vnetne procese izhaja iz dejstva, da so intermediati mevalonatne poti, ki jo statini inhibirajo, izoprenoidi. Slednji so pomembni v procesu aktivacije transkripcijskih dejavnikov, ki sprožijo izražanje genov z zapisi za vnetne mediatorje (Pahan, 2006). Eno prvih raziskav v tej smeri so izvedli Pahan in sod. (1997). Kulture podganjih makrofagov so predinkubirali z lovastatinom, potem pa so z lipopolisaharidom (LPS) v njih sprožili vnetni odziv. Makrofagi, izpostavljeni lovastatinu, so sintetizirali značilno manj NO, TNF- α in IL-1 β , v primerjavi z makrofagi, ki lovastatinu niso bili izpostavljeni (Pahan in sod., 1997). Ta ugotovitev je sprožila niz številnih raziskav tudi s kulturami humanih celic in kliničnih preizkušanj.

V supernatantih celičnih kultur, plazmi in serumu se kot pokazatelji vnetja lahko merijo vnetni citokini (TNF- α , IL-1 β , IL-6), kemokini (MCP-1), topne oblike adhezijskih molekul (npr. medcelične adhezijske molekule (ICAM-1) in adhezijske molekule žilnih celic

(VCAM-1)) in proteini akutne faze (C-reaktivni protein (CRP)) (Case in Ballantyne, 2002).

2.3.1.1 Vpliv statinov v razmerah *in vitro*

Vnetne citokine v večji meri sproščajo monociti in makrofagi. Zato se za gojenje v celičnih kulturah uporabljajo bodisi monociti ali pa mononuklearne celice iz periferne krvi (PBMC, okr. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), med katerimi so poleg monocitov tudi limfociti in celice NK. Vnetno reakcijo v celičnih kulturah sproži dodatek LPS, ki je močan spodbujevalec monocitov. Za ugotavljanje vpliva statinov na limfocite pa je potreben drug način spodbujanja. Običajno se v celično kulturo doda fitohemaglutinin ali kombinacija ionomicina (IONO) in forbol 12-miristat 13-acetata (PMA) (Larsen, 1990; Repnik, 2000; Simčič in sod., 2000; Abbas in sod., 2007).

Ferro in sod. (2000) so monocite izolirali iz krvi bolnikov s hiperholesterolemijo, ki so jih pred tem razdelili v dve skupini. V prvi skupini so se bolniki držali predpisane prehranske diete, v drugi pa so poleg tega dobivali dnevne odmerke simvastatina. Pred terapijo in po njej so iz venske krvi bolnikov obeh skupin izolirali monocite in jih gojili v kulturi v prisotnosti LPS. Koncentracije IL-1 β in TNF- α so bile značilno znižane v kulturah monocitov, izoliranih po terapiji s simvastatinom (Ferro in sod., 2000). Druga skupina raziskovalcev je izolirala monocite iz venske krvi zdravih prostovoljcev. Med spodbujanjem z LPS so bile kulture monocitov izpostavljene trem različnim koncentracijam simvastatina. V tem primeru so vpliv omenjenega statina na vnetni odziv ugotavljali z merjenjem koncentracije IL-6 v supernatantih kultur monocitov. Simvastatin je značilno znižal koncentracijo IL-6, pri čemer je bil učinek odvisen od koncentracije simvastatina – največji učinek je bil dosežen pri najvišji koncentraciji statina (Li in Chen, 2003).

Poleg tega, da se statini razlikujejo v učinkovitosti zniževanja ravni holesterola v plazmi, so različni tudi njihovi učinki na sproščanje citokinov. Kulture PBMC so se po spodbujanju in izpostavljenosti enemu od štirih statinov različno odzvale s sproščanjem citokinov IL-1 β , IL-2 in IFN- γ . Simvastatin in lovastatin sta zvišala koncentracijo IL-1 β in

znižala koncentraciji IL-2 in IFN- γ . Atorvastatin je znižal koncentracijo IFN- γ , pravastatin pa ni vplival na koncentracijo nobenega od omenjenih citokinov (Bessler in sod., 2005).

Ko je postalo jasno, da statini vplivajo na vnetne procese, so raziskovalci začeli proučevati njihove učinke tudi izven okvira ateroskleroze. Panichi in sod. (2006) ter Mantuano in sod. (2007) so se osredotočili na bolnike s kronično boleznijo ledvic, ki imajo povišane koncentracije citokinov IL-6 in IL-8 v plazmi. Monocite, izolirane iz venske krvi, so spodbudili z LPS, hkrati pa so jim dodali še naraščajoče koncentracije simvastatina. Po inkubaciji so bile koncentracije obeh citokinov v kulturah monocitov z dodanim simvastatinom značilno nižje od tistih, ki so bili samo spodbujeni. Tudi v tem primeru je bil učinek največji pri najvišji koncentraciji statina (Panichi in sod., 2006; Mantuano in sod., 2007).

Vsi poskusi pa vendarle ne podpirajo protivnetnega delovanja statinov. Kiener in sod. (2001) so kulture humanih monocitov najprej izpostavili delovanju statinov, potem pa so v njih z LPS sprožili vnetni odziv. Lipofilni statini (atorvastatin, lovastatin in simvastatin) so močno povečali sproščanje vnetnih citokinov IL-1 β , TNF- α in IL-8 ter kemokina MCP-1. Hidrofilni pravastatin pa ni imel značilnega učinka na sproščanje citokinov iz spodbujenih monocitov, kar je verjetno posledica počasnejšega vstopanja pravastatina v celice (Kiener in sod., 2001).

2.3.1.2 Vpliv statinov v razmerah *in vivo*

Raziskovalci predvidevajo, da so učinki statinov na vnetne in imunske odzive normalnih celic v pogojih *in vitro* drugačni kot v pogojih *in vivo* pri bolnikih s hiperholesterolemijo. Vzrok za to naj bi bila višja koncentracija holesterola, ki že sama po sebi spodbuja sintezo interlevkinov (Bessler in sod., 2005). Da bi izvedeli, kakšen je dejanski vpliv statinov na imunski sistem, je bilo veliko raziskav narejenih z omenjenimi bolniki.

Že nekaj časa je znano, da je koncentracija CRP v plazmi povezana s stopnjo napredovanja ateroskleroze. Poleg tega je dober pokazatelj tveganja za nastanek krvožilnih bolezni pri sicer zdravih ljudeh (Heinrich in sod., 1995; Ridker in sod., 1998). Merjenja tega vnetnega

označevalca tako pri skupinah bolnikov kot tudi zdravih ljudi, ki so uživali pravastatin, so pokazala značilno znižanje koncentracije CRP v plazmi v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni bila na terapiji s statinom (Ridker in sod., 1999; Albert M.A. in sod., 2001).

CRP se v jetrnih celicah sintetizira kot odziv na povišane koncentracije vnetnih citokinov (IL-1, TNF- α in IL-6) v plazmi (Vozelj, 2000). Ascer in sod. (2004) so ugotovili, da atorvastatin vpliva na koncentracije CRP in omenjenih vnetnih citokinov. Po osem tedenski terapiji z atorvastatinom so v serumih bolnikov s hiperholesterolemijo izmerili značilno nižje koncentracije CRP, IL-1, TNF- α in IL-6 kot pred terapijo. V kontrolni skupini bolnikov, ki se je držala samo predpisane prehranske diete, do znižanj koncentracij CRP in vnetnih citokinov ni prišlo, kar kaže na farmakološke učinke statinov, ki prispevajo k njihovi protivnetni aktivnosti (Ascer in sod., 2004). Do podobnih zaključkov so že nekaj let prej prišli Musial in sod. (2001), ki so v serumu bolnikov po trimesečni terapiji s simvastatinom izmerili značilno nižje koncentracije CRP, TNF- α in IL-6.

Protivnetno delovanje statinov se kaže tudi z njihovim vplivom na endotelij. Med vnetno reakcijo endotelijske celice sproščajo MCP-1. Znižanje koncentracije tega kemokina upočasni prehod monocitov iz krvi pod endotelij, v žarišče aterosklerotičnih leh. Očitno je to eden od mehanizmov, ki prispeva k učinkovitosti statinov pri zdravljenju ateroskleroze. Atorvastatin in simvastatin namreč učinkovito zmanjšujeta sproščanje MCP-1 iz endotelijskih celic (Rezaie-Majd in sod., 2002; Xu in sod., 2003).

Vnetno aktivnost endotelija lahko določimo tudi z merjenjem koncentracij CRP, vnetnih citokinov in adhezijskih molekul. V serumu bolnikov s hiperholesterolemijo so se po trimesečni terapiji z atorvastatinom značilno znižale ravni CRP, IL-6 in adhezijskih molekul (ICAM-1 in VCAM-1) (Nawawi in sod., 2003). V nasprotju s tem so Solheim in sod. (2001) ugotovili, da osem tedenska terapija s pravastatinom nima vpliva na raven CRP, IL-6 in adhezijskih molekul v serumu bolnikov s hiperholesterolemijo. V tem času pa se je značilno znižala koncentracija TNF- α . Eden od možnih vzrokov za te razlike je trajanje terapije, kar bi pomenilo, da je TNF- α zgodnji pokazatelj protivnetnega delovanja statinov. Za znižanje koncentracij IL-6, adhezijskih molekul in CRP bi bilo v tem primeru potrebno

več časa oziroma bolj izrazito zmanjšanje aterosklerotične aktivnosti (Solheim in sod., 2001).

Omenjene in številne druge raziskave kažejo, da statini vsekakor vplivajo na imunski sistem, predvsem na vnetje. Vendar je kakršnokoli posploševanje precej težavno, saj je malo študij *in vitro*, v katerih je bil uporabljen enak statin v enakih koncentracijah. Različni so tudi dnevni odmerki statinov bolnikom, vključenih v klinična preizkušanja (Kiener in sod., 2001).

2.4 CITOKINI

Citokini so polipeptidi, ki so ključni za komunikacijo med celicami imunskega sistema. V večini primerov je njihova sinteza posledica novega izražanja genov, ki ga sproži aktivacija celic (ob prisotnosti PAMP oziroma mikrobnih ali drugih antigenov). Večina citokinov deluje blizu mesta sproščanja bodisi na celice, ki so jih sprostile, ali pa na celice v bližini. Običajno deluje nek citokin na različne tipe celic in lahko tako sproža številne biološke učinke (pleiotropizem). Po drugi strani pa imajo lahko različni citokini enak funkcionalni učinek (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

Delovanje citokinov se začne z vezavo na ustrezne receptorje na površini tarčnih celic. Citokini dostikrat spodbudijo sintezo drugih citokinov, kar vodi v t.i. citokinsko kaskado, v kateri šele drugi ali tretji citokin posreduje biološki učinek prvega. Poleg tega na tarčno celico redko deluje en sam citokin, kar vodi do antagonističnih ali sinergističnih učinkov hkrati delujočih citokinov. Celični odziv na vezavo večine citokinov je spremenjeno izražanje genov, kar se odraža v pridobitvi novih funkcij ali razmnoževanju tarčne celice (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

Citokine lahko razdelimo v tri skupine glede na njihovo biološko delovanje. V prvo skupino sodijo citokini, ki delujejo v okviru prirojene imunosti in jih večinoma sproščajo mononuklearni fagociti v odgovor na bakterijske ali virusne produkte. V drugo skupino uvrščamo citokine, ki delujejo pri pridobljeni imunosti in jih izdelujejo limfociti T, ko

prepoznajo specifični antigen. V tretjo skupino pa spadajo citokini, ki spodbujajo hematopoezo, torej rast in diferenciacijo nezrelih levkocitov. Citokine prirojene in pridobljene imunosti načeloma izdelujejo različni tipi celic. Vendar meja med njimi ni popolna, saj se lahko določen citokin pojavi pri različnih odzivih (Abbas in sod., 2007).

2.4.1 Citokini v naših poskusih

Vpliv atorvastatina na imunski sistem smo ugotavljali z merjenjem citokinov IL-6, TNF- α , IL-2, IL-4 in IFN- γ . IL-6 in TNF- α sta citokina, značilna za vnetni odziv, IL-2 in IL-4 pa sta značilna citokina pridobljene imunosti. IFN- γ sicer nastaja med vnetnim in antigensko specifičnim imunskim odzivom, vendar smo ga merili le v pogojih, ki posnemajo antigensko specifični imunski odziv.

2.4.1.1 Tumorje-nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)

TNF- α je ključni mediator takojšnjega vnetnega odziva na vdor po Gramu negativnih bakterij in drugih patogenih mikrobov. V večini ga izdelujejo aktivirani mononuklearni fagociti, v manjši meri pa tudi aktivirani limfociti T in celice NK. V makrofagih se TNF- α sintetizira kot membranski homotrimerni protein, ki ga metaloproteinaza cepi v polipeptide z molekulsko maso 17 kD. Trije polipeptidi se združijo v biološko aktiven protein z molekulsko maso 51 kD. Najmočnejši dražljaj, ki sproži sintezo TNF- α v makrofagih, je LPS, sestavina celične stene po Gramu negativnih bakterij. Učinki TNF- α so odvisni od količine, ki se sprosti. Pri nizkih koncentracijah spodbudi endotelijske celice k izražanju površinskih adhezijskih molekul, na katere se vežejo levkociti iz krvnega obtoka (najprej nevtrofilci, kasneje monociti in limfociti). Pod njegovim vplivom začnejo endotelijske celice sproščati kemokine, ki povečajo afiniteto vezave levkocitov na endotelijske celice in omogočijo prehod levkocitov preko endotelija na mesto okužbe. Tam TNF- α spodbudi uničenje fagocitiranih mikrobov in sproščanje še enega vnetnega citokina, IL-1, ki ima podobne učinke kot TNF- α . Vse to pripomore k takojšnjemu lokalnemu vnetnemu odzivu na vdor mikrobov. Med resnejšimi infekcijami pa nastane toliko TNF- α , da le-ta vstopi v krvni obtok in deluje kot endokrini hormon. Tako lahko deluje kot endogeni pirogen in v hipotalamusnem termoregulacijskem območju inducira povišano telesno temperaturo.

Vpliva tudi na jetrne celice in v njih poveča sintezo proteinov akutne faze (CRP, fibrinogen, serumski amiloid A). Če koncentracije TNF- α v plazmi presežejo 10^{-7} M, se zmanjša kontraktilnost srčne mišice in tonus gladkih mišic v žilnih stenah, kar vodi v izrazit padec krvnega tlaka. Poleg tega endotelij izgubi normalne antikoagulacijske lastnosti in pride do nastanka tromboze. Od tod tudi ime citokina, saj je nekroza tumorjev, ki jo povzroča, rezultat tromboze tumorskih krvnih žil (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

2.4.1.2 Interlevkin-6 (IL-6)

IL-6 je homodimer z molekulsko maso med 21,5 in 30 kD. Različne molekulske mase so posledica posttranslacijskih modifikacij, kot sta glikozilacija in fosforilacija (Bauer in Herrmann, 1991). IL-6 je bil prvič opisan leta 1980 kot produkt fibroblastov, spodbujenih za sintezo IFN- β , in je bil zato prvotno poimenovan IFN- β 2 (Weissenbach in sod., 1980). Kasneje je bil opisan še nekajkrat pod različnimi imeni, npr. 26 kD-protein, celice B spodbujajoči faktor-2 (BSF-2) in hepatocyte spodbujajoči faktor (HSF). Nekaj let kasneje so Gaudie in sod. (1987) pokazali, da gre v vseh primerih za enak protein, ki je bil kasneje poimenovan IL-6 (Gaudie in sod., 1987; Poupart in sod., 1987). IL-6 izločajo različni tipi celic. V večji meri ga izdelujejo makrofagi, endotelijske celice in fibroblasti v odziv na mikrobo ali druge citokine, predvsem TNF- α in IL-1 β . V manjši meri ga sproščajo še aktivirani limfociti T (Abbas in sod., 2007). IL-6 sintetizirajo in sproščajo tudi skeletne mišice, in sicer neodvisno od imunskega sistema, med kontrakcijo (Hiscock in sod., 2004). IL-6 je citokin z izrazitim pleiotrofnim delovanjem. V okviru prirojene imunosti spodbuja nastanek proteinov akutne faze v jetrnih celicah ter s tem skupaj s TNF- α in IL-1 β prispeva k sistemskim učinkom vnetja. V kostnem mozgu skupaj s kolonije spodbujajočimi dejavniki (CSF, okr. *Colony Stimulating Factor*) spodbuja diferenciacijo nevtrofilcev iz mieloidne matične celice (Abbas in sod., 2007). V pridobljeni imunosti spodbuja razmnoževanje že aktiviranih limfocitov B. Receptorji za IL-6 so namreč prisotni na aktiviranih limfocitih B, ne pa tudi na počivajočih. S tem IL-6 okrepi izločanje protiteles proti specifičnim antigenom (Kishimoto, 1989). Poleg tega IL-6 v takojšnji vnetni odziv vključi celično posredovano odpornost. Skupaj s TGF- β namreč spodbudi diferenciacijo limfocitov CD4 v za zdaj še slabo poznane celice Th17. Celice Th17 so prve efektorske celice T, ki se diferencirajo v odziv na okužbo. Sproščajo citokin IL-17, ki na mestih

okužbe spodbudi celice k sproščanju IL-6 in kemokinov. S tem celice Th17 okrepijo vnetni odziv naravne odpornosti (Abbas in sod., 2007; Murphy in sod., 2008).

2.4.1.3 Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ , imenovan tudi IFN tipa II, je homodimerni protein, ki ima v glikozilirani obliki molekulska masa 50 kD. Izdelujejo ga aktivirane celice NK in aktivirani limfociti T (Abbas in sod., 2007). Celice NK sproščajo IFN- γ , če prepoznajo organizmu lastne celice, okužene z znotrajceličnimi mikrobi. Velike količine tega citokina se iz celic NK sprostijo tudi kot odziv na IL-12 in TNF- α , ki ju sproščajo aktivirani makrofagi. IFN- γ , ki se sprosti v okviru naravne odpornosti, ima pomembno vlogo pri nadzoru nekaterih okužb, preden ga začnejo izdelovati citotoksični limfociti T. Poleg tega vpliva tudi na diferenciacijo limfocitov CD4 v celice Th1, ki še dodatno sproščajo ta citokin (Murphy in sod., 2008). Delovanje IFN- γ je zelo pomembno pri celično posredovani imunosti proti znotrajceličnim mikrobom. Je eden najpomembnejših citokinov, ki aktivirajo makrofage (makrofage aktivirajoči faktorji, MAF). V njih spodbudi nastanek reaktivnih kisikovih intermediatov in NO, ki pospešijo uničenje fagocitiranih mikrobov. APC spodbudi k izražanju molekul poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC, okr. *Major Histocompatibility Complex*) razreda I in II ter kostimulatornih molekul. S tem pospeši stopnjo prepoznavanja antigenov, saj je prepoznavanje molekul MHC z vezanimi antigeni s strani limfocitov T potrebno za njihovo aktivacijo. S povečanim izražanjem MHC razreda I na površini tumorskih celic poveča njihovo občutljivost na citotoksično delovanje limfocitov T. IFN- γ okrepi delovanje TNF- α na endotelijske celice, saj v njih sproži izražanje adhezijskih molekul in sproščanje kemokinov. S tem pospeši pritrjevanje limfocitov na žilni endotelij in njihovo prehajanje na mesto okužbe. Končni rezultat delovanja IFN- γ je spodbujanje vnetnih reakcij, v katerih sodelujejo makrofagi (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

2.4.1.4 Interlevkin-2 (IL-2)

IL-2 je glikoprotein z molekulsko maso med 14 in 17 kD in je osrednji citokin pridobljene imunosti. Prvotno so ga opisali kot T-celični rastni faktor (TCGF, okr. *T-Cell Growth Factor*), vendar je danes znano, da deluje tudi na druge tipe celic, npr. celice NK, limfocite B in makrofage. Največ IL-2 se sprosti iz limfocitov CD4. Počivajoči limfociti imajo na svoji površini samo nizkoafinitetne receptorje za IL-2 (IL-2R), ki jim manjka ena podenota. Aktivacija limfocitov z antigeni in kostimulacijskimi molekulami sproži prehod iz mirujoče faze G₁ celičnega cikla v fazo S. Hkrati se prične sinteza IL-2 in manjkajoče podenote IL-2R, s katero receptor pridobi mnogo višjo afiniteto za IL-2. Vezava IL-2 na visokoafinitetni IL-2R sproži nadaljevanje celičnega cikla. Na ta način se hitro pomnožijo samo klone celic T, ki so prepoznali antigen. IL-2 omogoča preživetje aktiviranih limfocitov T, saj brez tega citokina propadejo. Poleg tega v njih poveča sintezo nekaterih drugih citokinov, npr. IFN- γ in IL-4. IL-2 spodbuja tudi rast in razvoj celic NK, vendar le, če je prisoten v dovolj visokih koncentracijah. Celice NK imajo namreč na svoji površini, tako kot počivajoče celice T, samo nizkoafinitetne IL-2R. Limfocite B spodbuja k rasti in izdelovanju protiteles. Pomembna aktivnost tega citokina je tudi spodbujanje nastanka in delovanja regulatornih celic T. Slednje sproščajo citokina IL-10 in transformirajoči rastni faktor- β (TGF- β , okr. *Transforming Growth Factor- β*), ki zavirata vnetne in imunske odzive (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007; Murphy in sod., 2008).

2.4.1.5 Interlevkin-4 (IL-4)

Aktivno obliko tega citokina predstavlja protein z molekulsko maso 18 kD. Glavni vir IL-4 so aktivirane celice T pomagalke, natančneje celice Th2, v manjši meri ta citokin izdelujejo tudi mastociti (Brown in sod., 1987; Abbas in sod., 2007). Njegovo delovanje je avtokrino, saj že diferencirane celice Th2 spodbuja k dodatni sintezi in sproščanju IL-4. V limfocitih B spodbudi izdelovanje protiteles razreda IgE. Slednja imajo pomembno vlogo pri obrambi organizma proti helmintom. Preko protiteles IgE se na helminte vežejo eozinofilci, ki jih aktivira drug citokin celic Th2, in sicer IL-5. Poleg tega so protitelesa IgE ključni mediatorji takojšnje preobčutljivosti, pri čemer je princip enak kot pri obrambi pred helminti. V primeru takojšnje preobčutljivosti se protitelesa IgE vežejo na sicer

neškodljive antigene in aktivirajo mastocite. Povečano sproščanje IL-4 ima tako pomembno vlogo pri nastanku alergij, antagonist IL-4 in IL-5 pa so v fazi kliničnega preizkušanja njihove uporabe pri omejevanju hudih alergijskih reakcij. IL-4 tudi zavira učinke IFN- γ , med katerimi je aktivacija makrofagov, in s tem inhibira celično posredovane imunske reakcije (Abbas in sod., 2007).

2.4.2 Merjenje citokinov

Citokini se v kliniki razmeroma redko uporabljajo kot rutinski označevalci, ker je njihovo delovanje preveč zapleteno, odzivi celic pa so preveč različni. Zelo pogosto pa jih merimo v kliničnih študijah, da bi spoznali mehanizme, ki sodelujejo pri nastanku, razvoju in zdravljenju imunske pogojenih bolezni (Wraber, 2007).

Najpogosteje merimo citokine, ki so se sprostili iz celic, saj citokini delujejo v zunajceličnem prostoru. Merimo jih bodisi v telesnih tekočinah (kri, urin, likvor, drugi punkti...), ko gre za citokine, ki so nastali v organizmu, ali v supernatantih celičnih kultur, v primeru citokinov, ki so se izločili *ex vivo* oziroma *in vitro*. Vendar jih je v telesnih tekočinah težko izmeriti, ker je njihovo delovanje v večini primerov lokalno, poleg tega so tudi kratkoživi. Zato sta se uveljavila dva komplementarna pristopa za merjenje citokinov na celični ravni, in sicer zaznavanje citokinskih mRNA in merjenje znotrajceličnih citokinov s pretočno citometrijo. Vsak od teh treh pristopov k merjenju citokinov zazna drugačno stopnjo na poti do aktivne molekule v zunajceličnem prostoru in zato primerjave rezultatov pogosto niso smiselne (Sullivan in sod., 2000; Wraber, 2007).

Za merjenje citokinov v telesnih tekočinah in v supernatantih celičnih kultur se uporabljajo imunski testi, predvsem encimskoimunski testi (ELISA, okr. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Wraber, 2007). Razvitih je več tehnik testa ELISA, za merjenje citokinov pa je najprimernejša nekompetitivna ali sendvič izvedba. Njen princip je vezava antigena (citokina) v preiskovanem vzorcu na specifična protitelesa, ki so pritrjena na dnu vdolbinic mikrotitrne ploščice. Po spiranju vdolbinic ostanejo v njih samo vezani citokini, na katere se vežejo detekcijska protitelesa, označena z encimom. S ponovnim spiranjem odstranimo nevezana protitelesa, nato pa dodamo substrat za vezan encim. Reakcija med

njima daje obarvan produkt, katerega absorbanco izmerimo s fotometrom. Jakost obarvanosti v posamezni vdolbinici je premosorazmerna s količino vezanega citokina. Za kvalitativno določitev moramo pripraviti umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami citokina, iz katere razberemo koncentracije citokina v preiskovanih vzorcih (Vozelj, 2000; Abbas in sod., 2007).

Raziskovalci za proučevanje citokinskih odzivov imunskih celic *in vitro* večinoma uporabljajo PBMC. Gre za heterogeno populacijo celic, ki vključuje monocite, limfocite T, limfocite B in celice NK (Sleasman in sod., 1997). Od polimorfonuklearnih celic se morfološko razlikujejo v tem, da imajo veliko, nezažeto jedro in so brez citoplazemskih granul z gosto vsebino, ki se dobro obarvajo (Vozelj, 2000). Druga možnost je priprava celičnih kultur iz polne krvi. Prednosti slednjih so, da za pripravo celičnih kultur potrebujemo manj krvi in manj časa, predvsem pa, da celice izdelujejo citokine v kompleksnem okolju, ki je podobno tistemu v organizmu. Po drugi strani je prednost kultur PBMC prav v tem, da se z osamitvijo celic iz krvi izognemo številnim mediatorjem, ki so prisotni v krvi. S tem lahko spremenjen citokinski odziv z večjo gotovostjo pripišemo spremenjenemu delovanju celic (De Groote in sod., 1992; Le Muer in sod., 1999).

V kulturah PBMC zdravih darovalcev so koncentracije spontano sproščenih citokinov nizke ali blizu nezaznavnosti, zato moramo celice ustrezno spodbuditi (Friberg in sod., 1994). Citokine v večji meri izdelujejo makrofagi in limfociti T, vendar za aktivacijo potrebujejo različne dražljaje. Makrofage k sproščanju vnetnih citokinov najbolj spodbudijo mikrobnimi produkti (npr. LPS). Običajno gre za ponavljajoča se zaporedja (PAMP), ki se vežejo na ustrezne receptorje na površini makrofagov. Aktivacija makrofagov med drugim vodi do sproščanja vnetnih citokinov (npr. TNF- α in IL-1) v supernatante celičnih kultur (Abbas in sod., 2007). Za aktivacijo limfocitov T sta potrebna dva signala. Prvi signal v razmerah *in vivo* je vezava kompleksa antigenski peptid-MHC na T-celični receptor (TCR) in koreceptor CD4 oziroma CD8. Drugi signal pa je vezava kostimulacijske molekule na APC in kostimulacijskega receptorja na limfocitu T. Če sta prisotna oba signala, se v limfocitih T sproži fosforilacija znotrajceličnih tirozinskih kinaz, ki med drugim aktivirajo encim fosfolipazo C- γ (PLC- γ). PLC- γ katalizira nastanek sekundarnih sporočevalcev inozitol trifosfata (IP₃) in diacilglicerola (DAG). Rezultat

njunega skupnega delovanja je aktivacija transkripcijskih dejavnikov in izražanje genov, ki vodi v delitev in diferenciacijo celic (Murphy in sod., 2008).

Za aktivacijo makrofagov in s tem sproščanje vnetnih citokinov v kulture PBMC najpogosteje dodamo ustrezno koncentracijo LPS. Za aktivacijo limfocitov T se uporablja več načinov spodbujanja, za vse pa je značilno, da posnemajo delovanje IP_3 in DAG. Tako se za spodbuditev sproščanja citokinov antigensko specifičnega imunskega odziva *in vitro* uporabljajo poliklonski aktivatorji v kombinaciji s snovmi, ki posnemajo kostimulacijski signal. Poliklonski aktivatorji so mitogeni lektini (konkanavalin A, fitohemaglutinin), protitelesa proti delom TCR (monoklonska protitelesa CD3) in kalcijevi ionofori (IONO). Kostimulacijski signal pa nadomeščajo forbolni estri (PMA) in protitelesa CD28. Med pogostejšimi načini aktivacije limfocitov T je kombinacija IONO in PMA v ustreznih koncentracijah (Wraber, 1998; Košnik in Wraber, 2000; Repnik, 2000; Gobec in sod., 2001).

2.5 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

V okviru diplomske naloge nas je zanimal vpliv najpogosteje uporabljenega statina, atorvastatina, na imunske procese v kulturah mononuklearnih celic iz venske krvi. V poskuse smo vključili ugotavljanje učinkov na vnetne in na antigensko specifične imunske odzive.

Zaradi omejenega števila celic, ki jih izoliramo iz venske krvi darovalcev, smo najprej natančneje definirali pogoje gojenja PBMC. Levkocitni koncentrat je del krvodajalčeve krvi, ki za transfuzijo ni primeren, vsebuje pa veliko levkocitov. Zato smo s PBMC levkocitnega koncentrat določili koncentracijsko območje atorvastatina, ki smo ga uporabljali v nadaljnjih poskusih.

V drugem delu poskusov smo kulture PBMC zdravih darovalcev izpostavili različnim koncentracijam atorvastatina. K izdelovanju citokinov smo jih spodbudili z dodatkom ustreznega aktivatorja. Za spodbuditev vnetnih procesov smo celice gojili v prisotnosti LPS. Po 18-urni inkubaciji smo v supernatantih kultur izmerili koncentracijo vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α . Za posnemanje antigensko specifičnega imunskega odziva smo celičnim kulturam dodali kombinacijo IONO in PMA. V tem primeru je inkubacija trajala 40 ur, po njej pa smo v supernatnatih kultur izmerili koncentracijo citokinov IL-2, IL-4 in IFN- γ . Vse citokine smo merili z encimskoimunskim testom (ELISA). Citokinske odzive spodbujenih PBMC, ki so bile izpostavljene atorvastatinu, smo primerjali z odzivi tistih, ki so bile samo spodbujene z ustreznim aktivatorjem.

Postavili smo hipotezo, da atorvastatin v kulturah PBMC zavira sintezo in sproščanje vnetnih citokinov in da vpliva tudi na sintezo in sproščanje citokinov antigensko specifičnega imunskega odziva.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Levkocitni koncentrat in vzorci krvi

PBMC smo osamili iz levkocitnega koncentrata, ki smo ga dobili iz Zavoda RS za transfuzijsko medicino. Krvodajalec je bil 45 let star moški s krvno skupino 0 in Rh+.

PBMC smo osamili tudi iz venske krvi zdravih odraslih darovalcev. Vseh darovalcev je bilo 15, od tega 8 žensk in 7 moških. Njihova starost je bila med 22 in 33 let, v povprečju 25 let. Pred odvzemom krvi so vsi izpolnili vprašalnik, na osnovi katerega smo izključili alergijske, avtoimunske in kronične vnetne bolezni (Pril. A). Poleg tega je bilo pomembno tudi, da darovalci tri tedne pred odvzemom krvi niso imeli akutne okužbe. Odvzem krvi je potekal med pol osmo in deveto uro zjutraj, darovalci pa so bili pred odvzemom tešči.

Kri vsakega darovalca smo odvzeli v tri epruvete za vakuumski odvzem z dodanim antikoagulantom EDTA, in sicer v vsako tri mililitre. Z osamitvijo PBMC smo začeli takoj po odvzemu krvi.

3.1.2 Mediji

Kot osnovni medij smo uporabljali RPMI 1640 brez L-glutamina (RPMI 1640 Lg-), ki vsebuje bikarbonatni puferski sistem, glukozo, aminokislino in vitamine (Sigma, ZDA). Z njim smo v postopku osamitve PBMC redčili vzorce krvi in spirali celice.

Za gojenje celic v kulturi in za pripravo ustreznih razredčin aktivatorjev smo uporabljali hranilni medij. Pripravili smo ga tako, da smo osnovnemu mediju RPMI 1640 Lg- dodali 1% L-glutamina, antibiotike (100 enot penicilina G in 100 µg streptomicina na mililiter hranilnega medija) in 5% humanega seruma (HS), ki smo ga pred tem inaktivirali s 30-minutno toplotno kopeljo pri 56°C (vsi Sigma, ZDA). Vsi reagenti so bili testirani na celičnih kulturah za vsebnost endotoksina in so imeli nizke vrednosti.

Za raztapljanje oziroma pripravo založne raztopine atorvastatina smo uporabljali minimalni osnovni medij (MEM, okr. *Minimum Essential Medium*, Invitrogen, ZDA).

3.1.3 Aktivatorji PBMC

3.1.3.1 Lipopolisaharid (LPS) (Sigma, ZDA)

LPS je komponenta celične stene večine po Gramu negativnih bakterij. Molekule LPS so zgrajene iz lipida A, osrednjega oligosaharida in polisaharidne verige, ki se precej razlikuje med različnimi vrstami bakterij in celo sevi iste vrste (Agarwal in sod., 1995). LPS je močan spodbujevalec naravne odpornosti. Lipidni del LPS predstavlja PAMP, ki se veže na receptorske komplekse monocitov in makrofagov. S tem sproži biosintezo vnetnih citokinov (npr. TNF- α in IL-1) in kostimulatornih molekul, ki so potrebne za aktivacijo pridobljene imunosti (Raetz in Whitfield, 2002).

Koncentracija LPS v kulturi PBMC je bila 10 ng/ml.

3.1.3.2 Forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Sigma, ZDA)

PMA spada v skupino forbolnih estrov, ki spodbujajo nastanek in rast tumorjev. PMA aktivira enega ključnih encimov v signalni poti aktivacije celic T – protein kinazo C (PKC). S tem posnema delovanje DAG v fizioloških razmerah (Slater in sod., 1994) in nadomesti koaktivacijski signal, ki ga *in vivo* posredujejo kostimulacijske molekule na APC (Hutchcroft in sod., 1996). Za proliferacijo celic T pa je poleg aktivacije PKC potreben še dvig koncentracije prostih kalcijevih ionov v citoplazmi celic T (Altman in sod., 1992).

Koncentracija PMA v kulturi PBMC je bila 3,33 ng/ml.

3.1.3.3 Ionomycin (IONO) (Sigma, ZDA)

Ionomycin je polieterski antibiotik, ki ima lastnosti ionofora. Preko lipidne membrane prenaša bivalentne katione, pri čemer ima najvišjo afiniteto za kalcijeve ione (Liu in Hermann, 1978). Ionomycin deluje celično nespecifično in poveča koncentracijo prostega kalcija v celici s prenosom kalcijevih ionov iz znotrajceličnih zalog in iz zunajceličnega prostora, kar je v pogojih *in vivo* učinek delovanja IP₃ (Clementi in sod., 1994). V citosolu limfocitov T delujejo kalcijevi ioni kot signal za aktivacijo številnih encimov, ki so potrebni za vezavo transkripcijskih dejavnikov na ustrezna mesta v zaporedju DNA in s tem za izražanje genov (Abbas in sod., 2007).

Koncentracija ionomicina v kulturi PBMC je bila 500 nM.

Za spodbujanje PBMC smo uporabili LPS oziroma kombinacijo IONO in PMA. Aktivatorje in njihove koncentracije smo izbrali na osnovi poskusov, narejenih v tem laboratoriju po primerjanju učinkovitosti različnih načinov aktivacije PBMC za izdelovanje citokinov (Wraber, 1994; Bilač, 1996; Kocjan, 1999; Repnik, 2000).

3.1.4 Atorvastatin (Krka d.o.o., Slovenija)

Atorvastatin je sintetična spojina, ki sodi v skupino statinov, zdravil za zniževanje ravni holesterola v krvi. Atorvastatin je kompetitivni inhibitor encima HMG-CoA reduktaze, ki katalizira ključno stopnjo v biosintezni poti holesterola, t.j. pretvorbo HMG-CoA v mevalonat (Schachter, 2004). Poleg omenjenega delovanja atorvastatin vpliva tudi na vnetne procese, na aktivnost limfocitov T in na znotrajcelične signalne poti (Pahan, 2006).

Koncentracije atorvastatina v kulturi PBMC levkocitnega koncentrata so bile 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM in 100 µM.

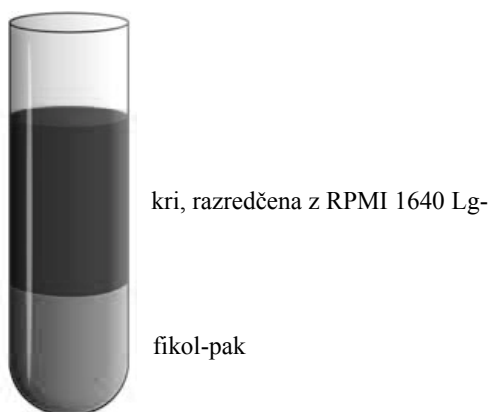
Koncentracije atorvastatina v kulturi PBMC zdravih darovalcev so bile 0,1 µM, 1 µM in 10 µM.

3.2 METODE

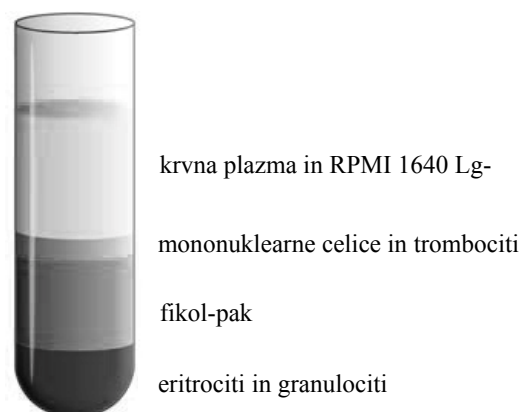
3.2.1 Osamitev PBMC iz levkocitnega koncentrata in venske krvi zdravih darovalcev

3.2.1.1 Princip osamitve

Osamitev je potekala na osnovi razlik v gostoti PBMC v primerjavi z drugimi krvnimi celicami. V ta namen smo uporabili ločevalni medij fikol-pak (Ficoll-Paque, Pharmacia, Švedska), ki je močno razvejan umetni polimer. Fikol-pak povzroči agregacijo eritrocitov, kar poveča stopnjo njihove sedimentacije med centrifugiranjem. Na dno epruvete potujejo tudi granulociti zaradi višje gostote. Gostota limfocitov, monocitov in trombocitov pa je prenizka, da bi lahko prodrli v fikol-pak, zato se zberejo v tanki beli plasti med krvno plazmo in fikol-pakom (Sl. 3). V naslednjem koraku prenesemo to plast celic v drugo epruveto in s spiranjem odstranimo trombocite, odvečen fikol-pak in krvno plazmo. Dobljena celična suspenzija vsebuje $95 \pm 5\%$ mononuklearnih levkocitov, delež viabilnih celic pa je $95 \pm 5\%$ (Bøyum, 1964; Directions for use Ficoll-Paque, 1989).



Slika 3: Razredčena kri, nanesena na fikol-pak pred centrifugiranjem (Isolation of mononuclear cells, 2007: 9).



Slika 2: Porazdelitev krvnih celic v gostotnem gradientu po centrifugiranju (Isolation of mononuclear cells, 2007: 9).

3.2.1.2 Opis postopka osamitve PBMC iz levkocitnega koncentrata

Celoten postopek osamitve PBMC iz levkocitnega koncentrata je potekal v sterilnih pogojih. Levkocitni koncentrat (približno 60 ml) smo iz vrečke prelili v 250 ml-plastično stekleničko, v katero smo pred tem dodali 0,5 ml heparina. V stekleničko smo do oznake 240 ml prilili RPMI 1640 Lg- in premešali. V osem 50 ml-centrifugirk smo odpipetirali 15 ml fikol-paka in nanj previdno nadplastili razredčen levkocitni koncentrat (Sl. 2). Centrifugirali smo 40 minut pri $404 \times g$, 18°C in z izklopljeno zavoro (Megafuge 1.0R, rotor 2705, Heraeus Instruments). Po centrifugiranju smo bel obroč celic nad fikol-pakom (Sl. 3) iz vsake centrifugirke odpipetirali v prazno centrifugirko. Z medijem RPMI 1640 Lg- smo dopolnili do oznake 45 ml, ročno premešali (z obračanjem centrifugirke) in centrifugirali 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Supernatant smo odlili, skupek celic na dnu pa smo premešali na mešalu vorteks. V vsako centrifugirko smo dodali 30 ml medija RPMI 1640 Lg-, ročno premešali in centrifugirali 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Supernatant smo odlili in celice na dnu premešali na mešalu vorteks. Nato smo v vsako od osmih centrifugirk odpipetirali 4 ml hranilnega medija in ročno premešali. Vsebine vseh centrifugirk smo združili v eni in suspenzija PBMC je bila pripravljena za štetje celic.

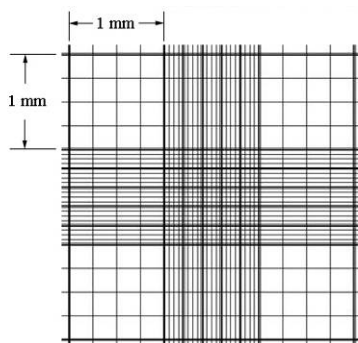
3.2.1.3 Opis postopka osamitve PBMC iz venske krvi zdravih darovalcev

Tudi postopek osamitve PBMC iz venske krvi zdravih darovalcev je potekal v sterilnih pogojih. Kri posameznega darovalca smo združili v 50 ml-centrifugirki in dodali enak volumen RPMI 1640 Lg-. V štiri sterilizirane, 10 ml-plastične epruvete smo odpipetirali 2,5 ml fikol-paka. Nanj smo previdno nadplastili razredčen vzorec krvi, enakomerno v vseh štirih epruvetah. Centrifugirali smo 40 minut pri $404 \times g$, 18°C in z izklopljeno zavoro. Po centrifugiranju smo odpipetirali bel obroč celic nad fikol-pakom v dve prazni epruveti (združili smo celice iz dveh epruvet) in v vsako dodali 7 ml medija RPMI 1640 Lg- ter ročno premešali. Centrifugirali smo 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Po centrifugiranju smo odlili supernatant, celice na dnu pa smo nekajkrat premešali na mešalu vorteks. V vsako epruveto smo dodali 10 ml medija RPMI 1640 Lg-, premešali in centrifugirali 7 minut pri $719 \times g$ in 20°C . Spet smo odlili supernatant in premešali celice na dnu. Nato

smo v vsako epruveto odpipetirali 2 ml hranilnega medija in ročno premešali. Vsebini obeh epruvet smo združili in suspenzija PBMC je bila pripravljena za štetje.

3.2.2 Določevanje števila PBMC v suspenziji

Mononuklearne celice smo šteli v Neubauerjevi komori. To je steklena ploščica, ki ima na sredini poglobljen predel z vrisano mrežo (Sl. 4). Mrežni sistem vsebuje štiri velike kvadrate, ki so razdeljeni na 16 manjših. Ploščina velikega kvadrata je 1 mm^2 , komora pa je globoka 0,1 mm. Volumen suspenzije nad enim velikim kvadratom torej znaša $0,1\text{ mm}^3$ (Žemva, 1968).



Slika 4: Mrežni sistem, vrisan na Neubauerjevi komori (Žemva, 1968: 176).

Za lažje štetje živih, nepoškodovanih celic smo pripravljeno celično suspenzijo najprej razredčili in obarvali s tripanskim modrilom. Za to kislo barvilo je značilno, da ne more prehajati skozi membrano z normalno prepustnostjo. Če pa je membrana poškodovana, barvilo vdre v celico, ki se v tem primeru obarva modro (Vozelj, 1996). V 4 ml-epruveto smo odpipetirali 450 μl tripanskega modrila (0,1% modrila v 0,154 M NaCl) in 50 μl celične suspenzije ter premešali na mešalu vorteks. Tako pripravljeno, desetkrat razredčeno suspenzijo celic smo nanесли na Neubauerjevo komoro. PBMC, ki smo jih opazovali s svetlobnim mikroskopom, so bile okrogle, z debelejšo membrano in so svetile zeleno.

PBMC smo prešteli v štirih velikih kvadratih in izračunali povprečje (N). Število celic v enem mililitru prvotne suspenzije izračunamo po formuli (1), ki upošteva vsa redčenja med pripravo suspenzije za štetje celic. Potem smo suspenzijo s hranilnim medijem uravnali do koncentracije 1×10^6 PBMC/ml in jo uporabili za pripravo celičnih kultur.

$$\text{število celic/ml} = N/10 \times 10^6 \quad \dots(1)$$

3.2.3 Raztapljanje atorvastatina

Atorvastatin (v obliki kalcijeve soli) smo raztapljali v MEM, ki smo ga zaradi boljšega raztapljanja atorvastatina najprej segreti na 37°C. V 20 ml segretega medija smo dodali 6,67 mg atorvastatina. S pomočjo magnetnega mešala smo mešali približno pol ure oziroma dokler se atorvastatin ni v celoti raztopil v mediju.

Svežo raztopino atorvastatina smo pripravili pred vsakim gojenjem PBMC. S serijskim redčenjem založne raztopine s koncentracijo 600 µM smo pripravili raztopine z ustreznimi koncentracijami, ki smo jih potrebovali za dodajanje kulturam PBMC.

3.2.4 Aktivacija in gojenje PBMC

Celice smo gojili na ploščah za celične kulture s 24 vdolbinicami (Costar, Cambridge). V vsako vdolbinico smo odpipetirali 1 ml celične suspenzije in 500 µl dodatkov. Koncentracija PBMC v kulturah je torej znašala $6,66 \times 10^5$ celic/ml. Za negativno kontrolo smo celični suspenziji dodali samo 500 µl hranilnega medija.

3.2.4.1 Aktivacija PBMC z LPS

Za pozitivno kontrolo smo celični suspenziji dodali 250 µl hranilnega medija in 250 µl LPS. Za ugotavljanje vpliva atorvastatina na sintezo vnetnih citokinov (IL-6 in TNF-α) smo celični suspenziji dodali 250 µl LPS in 250 µl atorvastatina v različnih koncentracijah. Koncentracija LPS v kulturah je bila 10 ng/ml, koncentracije atorvastatina pa so bile

0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM in 100 μM (PBMC levkocitnega koncentrata) oziroma 0,1 μM , 1 μM in 10 μM (PBMC zdravih darovalcev). Pripravljene kulture PBMC smo gojili 18 ur v inkubatorju s 5% CO_2 , 95% zračno vlažnostjo in temperaturo 37°C (CO_2 inkubator).

3.2.4.2 Aktivacija PBMC z IONO in PMA

Za pozitivno kontrolo smo suspenziji celic dodali 250 μl hranilnega medija, 125 μl IONO in 125 μl PMA. Za ugotavljanje vpliva atorvastatina na sintezo citokinov antigensko specifičnega imunskega odziva (IFN- γ , IL-2 in IL-4) smo celični suspenziji dodali 125 μl obeh aktivatorjev in 250 μl atorvastatina v različnih koncentracijah. Koncentracija IONO v kulturah PBMC je bila 500 nM, koncentracija PMA 3,33 ng/ml, koncentracije atorvastatina pa 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM in 100 μM (PBMC levkocitnega koncentrata) oziroma 0,1 μM , 1 μM in 10 μM (PBMC zdravih darovalcev). Tako pripravljene kulture PBMC smo gojili 40 ur v CO_2 inkubatorju.

3.2.4.3 Gojenje PBMC za izvedbo testa citotoksičnosti atorvastatina

Za visoko kontrolo testa citotoksičnosti atorvastatina smo pripravili kulturo PBMC, tako da smo celični suspenziji dodali samo 500 μl hranilnega medija. Celice smo gojili 18 ur v CO_2 inkubatorju. V kulturo smo 15 minut pred koncem inkubacije dodali 75 μl lizacijskega pufra.

Po končani inkubaciji vseh celičnih kultur smo vsebino vsake vdolbinice odpipetirali v 4 ml-epruveto in centrifugirali 3 minute pri $1619 \times g$ in 20°C. Supernatante smo prelili v 2 ml-firole in jih do določevanja citokinov in citotoksičnosti atorvastatina shranili na -20°C.

3.2.5 Določevanje koncentracije citokinov z encimskoimunskim testom (ELISA)

Koncentracijo citokinov IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-4 in IL-2 v supernatantih kultur PBMC smo določevali z nekompetitivno tehniko metode ELISA. Za določevanje TNF- α smo uporabili reagente podjetja Milenia Biotec (Nemčija), ki so namenjeni samo za *in vitro* diagnostično uporabo. Koncentracije ostalih citokinov smo določevali z reagenti podjetja Pierce Biotechnology (Thermo Scientific, ZDA), ki so namenjeni samo raziskovalnemu delu.

Določevanje koncentracij citokinov IL-6, IFN- γ , IL-4 in IL-2 je potekalo po enakem postopku. Na dnu plastične mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami so bila vezana specifična primarna protitelesa I za ustrezen citokin. V vdolbinice smo po vnaprej pripravljeni shemi nanесли standarde in vzorce supernatantov, in sicer v dveh ponovitvah. V vse vdolbinice smo dodali tudi primarna protitelesa II (detekcijska protitelesa) z vezanim biotinom, ki so bila specifična za drug epitop kot primarna protitelesa I. Sledila je dveurna inkubacija pri sobni temperaturi (20-25°C). Po njej smo ploščico trikrat temeljito sprali s pripravljenim pufrom za spiranje. V vse vdolbinice smo dodali streptavidin z vezanim encimom hrenovo peroksidazo. Ploščico smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo jo znova trikrat sprali in s tem odstranili streptavidin, ki se med inkubacijo ni vezal na biotin. Nato smo na ploščico nanесли encimski substrat. Reakcija je tekla 30 minut v temi pri sobni temperaturi, saj je substrat občutljiv za svetlobo. V tem času se je ob prisotnosti vezane peroksidaze substrat obarval modro. Reakcijo smo ustavili z dodatkom raztopine za ustavljanje reakcije, pri čemer se je modra barva spremenila v rumeno. S fotometrom (Anthos HTII, Anthos Labtech Instruments, Avstrija) smo izmerili absorbanco vsebine posameznih vdolbinic pri 450 nm in 550 nm. Od vrednosti absorbance pri 450 nm smo odšteli vrednost pri 550 nm in s tem zmanjšali vpliv same mikrotitrne ploščice na vrednosti meritev.

Postopek določevanja koncentracij TNF- α se je razlikoval od zgoraj opisanega. Tudi v tem primeru so bila na dnu mikrotitrne ploščice vezana primarna protitelesa I. V vdolbinice smo v dveh ponovitvah nanесли standarde in vzorce supernatantov. V vse vdolbinice smo dodali še poseben pufer in ploščico inkubirali dve uri pri sobni temperaturi (18-28°C) na

stresalniku (350-400 obratov na minuto). Potem smo ploščico štirikrat temeljito sprali in dodali primarna protitelesa II (detekcijska protitelesa), označena z encimom hrenovo peroksidazo. Sledila je dveurna inkubacija pri sobni temperaturi na stresalniku. Ploščico smo štirikrat sprali in dodali substrat, ki se je ob prisotnosti encima obarval modro. Reakcija je tekla 30 minut v temi na sobni temperaturi. Ustavili smo jo z raztopino za ustavljanje reakcije, pri čemer se je modra barva spremenila v rumeno. S fotometrom smo izmerili absorbanco pri 450 nm in 620 nm. Iz istega razloga kot pri merjenju koncentracije ostalih citokinov smo od vrednosti pri 450 nm odšteli vrednost pri 620 nm.

Koncentracije citokinov v vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje. V vsako ELISO smo vključili šest standardov (osem v primeru merjenja TNF- α), ki smo jih pripravili s serijskim redčenjem rekonstituiranega liofiliziranega standarda z znano koncentracijo rekombinantnega citokina (Pregl. 1). Standarde smo pripravili v hranilnem mediju. Prav tako smo z njim redčili vzorce, za katere smo pričakovali, da vsebujejo koncentracije citokinov, višje od najvišje koncentracije umeritvene krivulje.

Preglednica 1: Razpon koncentracij v umeritveni krivulji in meje občutljivosti testov ELISA za citokine IFN- γ , IL-2, IL-4 in IL-6 (Pierce Biotechnology, ZDA) in TNF- α (Milenia Biotec, Nemčija).

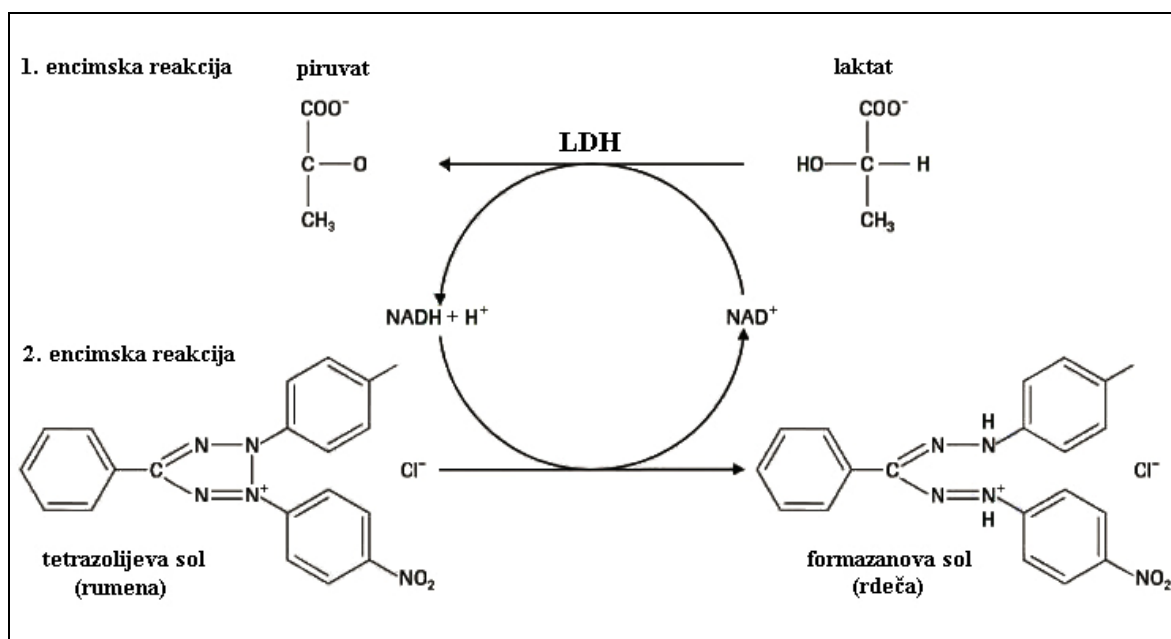
citokin	razpon umeritvene krivulje (pg/ml)	meja občutljivosti (pg/ml)
IFN- γ	0 – 1000	1
IL-2	0 – 1500	6
IL-4	0 – 400	2
IL-6	0 – 400	1
TNF- α	0 – 1000	6

Legenda: ELISA (encimskoimunski test); IFN- γ (interferon- γ); IL-2 (interlevkin-2); IL-4 (interlevkin-4); IL-6 (interlevkin-6); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α)

3.2.6 Določevanje citotoksičnosti atorvastatina

3.2.6.1 Princip določevanja citotoksičnosti

Citotoksični vpliv določene substance določamo z ugotavljanjem poškodb plazemske membrane. Povečana prepustnost membrane omogoča prehajanje celične vsebine v njeno okolje. Laktat-dehidrogenaza (LDH) je stabilen citoplazemski encim, ki je prisoten v vseh tipih celic. V primeru poškodb plazemske membrane celic se encim sprosti v supernatante celičnih kultur. Test za določanje citotoksičnosti temelji na ugotavljanju aktivnosti LDH v supernatantih celičnih kultur. Če je v preiskovanih vzorcih encim prisoten, bo reagiral s substratom v dodani reakcijski mešanici. Reakcija med njima daje rdeče obarvan produkt (Sl.5), katerega absorbanco izmerimo s fotometrom. Jakost obarvanosti je premosorazmerna količini LDH, ki je prisotna v vzorcu (Cytotoxicity..., 2006).



Slika 5: Princip določevanja citotoksičnosti: LDH oksidira laktat, ki je prisoten v reakcijski mešanici, v piruvat. Sproščeni protoni se preko $\text{NADH} + \text{H}^+$ prenesejo na rumeno obarvano tetrazolijevo sol, ki je prav tako prisotna v reakcijski mešanici. Končni produkt reakcije je rdeče obarvana formazanova sol (Cytotoxicity..., 2006: 16).

3.2.6.2 Postopek določevanja citotoksičnosti

Uporabili smo reagente proizvajalca Roche Diagnostic (Nemčija), ki so namenjeni samo za uporabo *in vitro*. V čisto mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami smo v dveh ponovitvah odpipetirali 100 µl supernatantov celičnih kultur. Testirali smo supernatante tistih kultur PBMC, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji atorvastatina (100 µM). V vse vdolbinice smo dodali 100 µl reakcijske mešanice in inkubirali 30 min pri sobni temperaturi, v temi. V tem času je potekla reakcija med encimom in njegovim substratom v reakcijski mešanici. Po končani inkubaciji smo v vdolbinice dodali 50 µl raztopine za ustavitev reakcije. Absorbanco smo izmerili pri valovni dolžini 450 nm.

Za kvantitativno določitev citotoksičnosti atorvastatina smo v test vključili tudi kontrole, ki so podrobneje predstavljene v preglednici 2.

Preglednica 2: Opis kontrol, vključenih v test citotoksičnosti atorvastatina.

kontrola	vsebina vdolbinice	namen kontrole
ozadje	100 µl hranilnega medija	LDH-ktivnost hranilnega medija
visoka kontrola	50 µl supernatanta kulture PBMC* 50 µl hranilnega medija	največje možno sproščanje LDH
kontrola atorvastatina I	50 µl atorvastatina 50 µl hranilnega medija	LDH-aktivnost atorvastatina
kontrola atorvastatina II	50 µl atorvastatina 50 µl standardne raztopine LDH	potencialni vpliv atorvastatina na LDH

* V kulturo PBMC smo 15 minut pred koncem inkubacije dodali 75 µl lizacijskega pufra

Legenda: LDH (laktat-dehidrogenaza); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)

Od izmerjenih absorbanc kontrol in vzorcev smo odšteli vrednost absorbance ozadja. Nato smo iz dobljenih vrednosti (A) po formuli (2) izračunali stopnjo citotoksičnosti atorvastatina v posameznih vzorcih.

$$\text{citotoksičnost (\%)} = \frac{A(\text{vzorec})}{A(\text{visoka kontrola})} \times 100 \quad \dots(2)$$

3.2.7 Obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov in oblikovanje preglednic smo uporabljali računalniški program Microsoft Excel, MS Office 2007.

Izračunali smo srednje vrednosti (\bar{x}), standardne odklone (SD) in standardne napake (SE). Razpršenost posameznih podatkov smo ocenjevali na osnovi koeficienta variacije (KV), ki meri, kolikšen odstotek srednje vrednosti predstavlja standardni odklon. Izračunali smo ga po formuli (3).

$$KV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots(3)$$

Podatke, ki so bili normalno porazdeljeni, smo analizirali s Studentovim *t*-testom. V primeru značilnega odstopanja od normalne porazdelitve pa smo podatke analizirali z neparametričnim testom Wilcoxon za parne povezane spremenljivke. Stopnjo korelacije smo v primeru normalne porazdelitve podatkov izračunali s Pearsonovim koeficientom korelacije. V primeru, ko podatki niso bili porazdeljeni normalno, smo uporabili Spearmanov koeficient korelacije. Mejo statistično značilnih razlik smo postavili pri vrednosti $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV ATORVASTATINA NA PBMC LEVKOCITNEGA KONCENTRATA

Zaradi velikega števila PBMC, osamljenih iz levkocitnega koncentrata, smo v prvem delu poskusov uporabili širši model proučevanja vpliva atorvastatina na sproščanje citokinov. Uporabili smo širše koncentracijsko območje atorvastatina (0,01 μ M do 100 μ M).

V preglednici 3 so prikazane koncentracije citokinov, izmerjene v supernatantih spodbujenih kultur PBMC po inkubaciji z atorvastatinom v petih različnih koncentracijah. IL-6 in TNF- α smo izmerili v supernatantih kultur, spodbujenih z LPS, inkubacija je trajala 18 ur. Za merjenje IFN- γ in IL-2 smo celice spodbujali z IONO&PMA, inkubacija je v tem primeru trajala 40 ur.

Citokine smo izmerili v kulturah PBMC levkocitnega koncentrata samo enega krvodajalca. Po formuli (4) smo izračunali indekse zaviranja oziroma spodbujanja (indeksi modulacije) sproščanja citokinov v kulturah PBMC, izpostavljenih atorvastatinu. Pri tem za značilno nižje oziroma višje veljajo indeksi, nižji od 0,8 oziroma višji od 1,2 (Simčič in sod., 2000). Indeksi so prikazani v preglednici 4.

$$\text{indeks modulacije} = \frac{\text{koncentracija (AKT + AT)}}{\text{koncentracija (AKT)}} \quad \dots(4)$$

Opomba: koncentracija (AKT + AT) - koncentracija citokina v supernatatih spodbujenih kultur z dodanim atorvastatinom v ustrezni koncentraciji
koncentracija (AKT) - koncentracija citokina v supernatantih spodbujenih kultur PBMC brez dodanega atorvastatina

Preglednica 3: Koncentracije IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-2 v supernatantih kultur PBMC levkocitnega koncentrata. Za merjenje IL-6 in TNF- α smo PBMC spodbujali z LPS (18 ur), za merjenje IFN- γ in IL-2 pa z IONO&PMA (40 ur).

Koncentracija atorvastatina	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
	LPS (18 ur)		IONO&PMA (40 ur)	
/	8217	3538	50779	7630
AT (0,01 μ M)	7924	3727	46298	6457
AT (0,1 μ M)	8398	3699	53606	7587
AT (1 μ M)	7012	3341	55263	7488
AT (10 μ M)	7396	2991	41648	7076
AT (100 μ M)	4192	1310	11809	2935

Legenda: AT (atorvastatin, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ali 100 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-2 (interlevkin-2); IL-6 (interlevkin-6); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α)

Preglednica 4: Indeksi modulacije sproščanja IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-2 v supernatantih kultur PBMC levkocitnega koncentrata. Za merjenje IL-6 in TNF- α smo PBMC spodbujali z LPS (18 ur), za merjenje IFN- γ in IL-2 pa z IONO&PMA (40 ur).

Koncentracija atorvastatina	IL-6	TNF- α	IFN- γ	IL-2
	LPS (18 ur)		IONO&PMA (40 ur)	
/	1,00	1,00	1,00	1,00
AT (0,01 μ M)	0,96	1,05	0,91	0,85
AT (0,1 μ M)	1,02	1,05	1,06	0,99
AT (1 μ M)	0,85	0,94	1,09	0,98
AT (10 μ M)	0,90	0,85	0,82	0,93
AT (100 μ M)	0,51	0,37	0,23	0,38

Legenda: AT (atorvastatin, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M ali 100 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-2 (interlevkin-2); IL-6 (interlevkin-6); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α)

4.2 CITOTOKSIČNOST ATORVASTATINA

V tem sklopu poskusov nas je zanimalo, če atorvastatin na PBMC deluje citotoksično. V ta namen smo naredili test prisotnosti LDH v supernatantih kultur PBMC. Vključili smo supernatante tistih kultur, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji atorvastatina (100 μ M). Preglednica 5 prikazuje vpliv atorvastatina na preživetje PBMC, izpostavljenih samo atorvastatinu oziroma še dodatno spodbujenih z LPS (18 ur). Citotoksičnost smo ocenjevali glede na visoko kontrolo, ki jo je predstavljal vzorec z liziranimi celicami. Iz dobljenih vrednosti lahko sklepamo, da atorvastatin nima citotoksičnih vplivov na kulture PBMC.

Preglednica 5: Citotoksični vpliv atorvastatina na kulture PBMC levkocitnega koncentrata. PBMC smo inkubirali z atorvastatinom in jih spodbujali z LPS 18 ur.

vzorec	AT (18 ur)	AT + LPS (18 ur)
citotoksičnost (%)	-0,003	0,023

Legenda: AT (atorvastatin 100 μ M v kulturi); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)

4.3 VPLIV ATORVASTATINA NA PBMC ZDRAVIH DAROVALCEV

V tem sklopu poskusov smo ugotavljali vpliv atorvastatina na citokinske odzive kultur PBMC, izoliranih iz venske krvi 15 zdravih darovalcev. PBMC vsakega darovalca smo izpostavili atorvastatinu v treh različnih koncentracijah in jih spodbudili z ustreznim aktivatorjem. Za proučevanje vnetnega odziva smo jih spodbudili z LPS in jih inkubirali 18 ur. Specifični imunski odziv pa smo posnemali z aktivacijo z IONO&PMA, v tem primeru je inkubacija trajala 40 ur. Po končani inkubaciji smo v supernatantih kultur, spodbujenih z LPS, izmerili koncentracijo IL-6 in TNF- α . V supernatantih kultur, spodbujenih z IONO&PMA, pa smo izmerili koncentracijo IFN- γ , IL-4 in IL-2.

4.3.1 Vpliv atorvastatina na sintezo IL-6 in TNF- α

V preglednicah 6 in 7 so prikazane meritve IL-6 in TNF- α pri posameznih darovalcih krvi. Prikazane so tudi izračunane srednje vrednosti, standardni odkloni in koeficienti variacije. Porazdelitev vrednosti ne odstopa statistično značilno od normalne porazdelitve. Slika 6 prikazuje kvartilne diagrame izmerjenih vrednosti citokinov pri posameznih pogojih gojenja PBMC. Spodnji rob pravokotnika označuje prvi kvartil, zgornji rob tretji kvartil, črta v pravokotniku pa mediano. Spodnji konec intervalne črte označuje najnižjo izmerjeno koncentracijo, zgornji konec intervalne črte pa najvišjo izmerjeno koncentracijo. Iz kvartilnih diagramov lahko razberemo, da so koncentracije IL-6 razpršene precej enakomerno, koncentracije TNF- α pa malo manj.

Preglednica 6: Meritve IL-6 (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. Celice smo spodbudili z LPS in jih inkubirali 18 ur brez ali v prisotnosti atorvastatina.

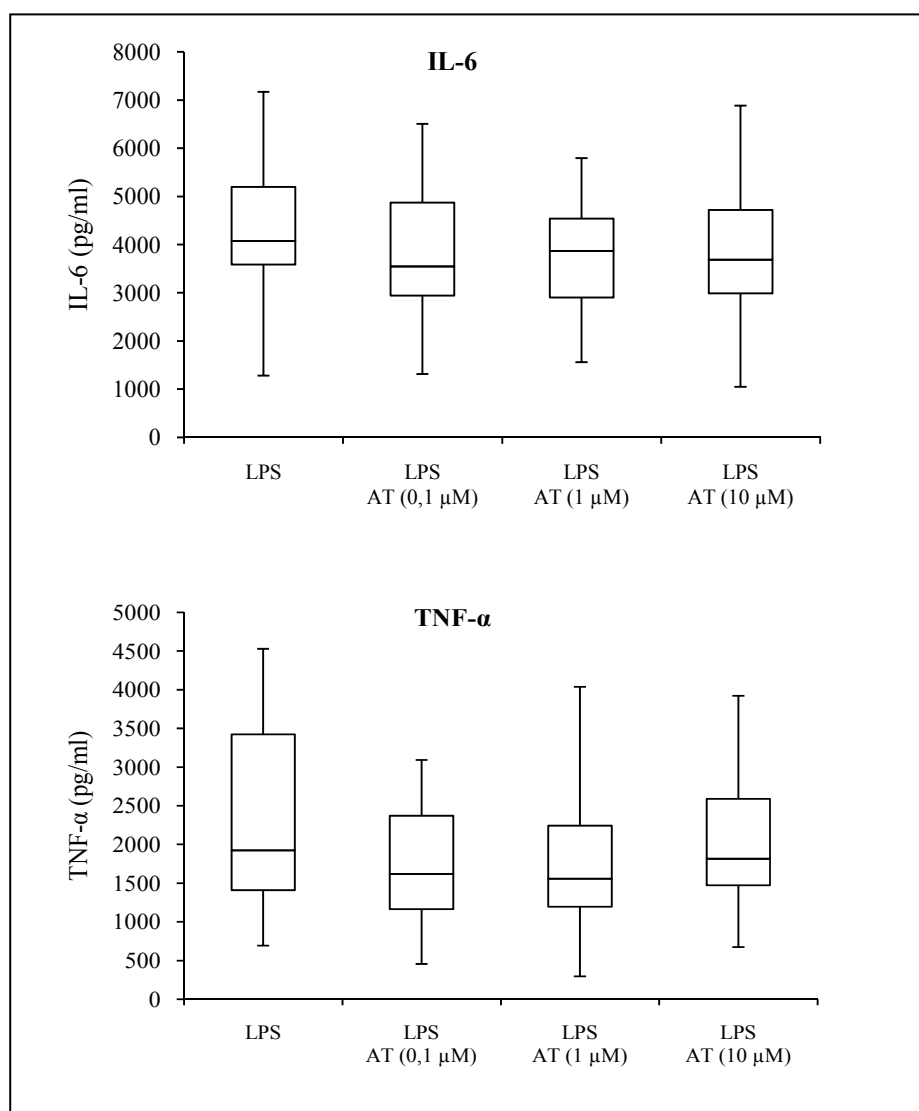
Zaporedna številka darovalca krvi	LPS	LPS AT (0,1 μ M)	LPS AT (1 μ M)	LPS AT (10 μ M)
1	5444	4240	4540	3609
2	3779	3313	3314	3312
3	4076	2681	3873	4532
4	7164	6504	5796	6880
5	3071	2941	2903	2904
6	3588	3545	4204	4056
7	3953	3376	3011	3682
8	5404	5172	3848	4712
9	2478	2391	2188	2408
10	4928	5260	4216	5720
11	5196	4572	4744	3014
12	1279	1312	1557	1050
13	3662	3180	2858	2985
14	5164	4872	5740	4904
15	5160	4072	4440	4012
\bar{x} (pg/ml)	4290	3829	3815	3852
SD (pg/ml)	1432	1319	1199	1407
KV (%)	33,4	34,5	31,4	36,5

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IL-6 (interlevkin-6); KV (koeficient variacije); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); \bar{x} (srednja vrednost)

Preglednica 7: Meritve TNF- α (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. Celice smo spodbudili z LPS in jih inkubirali 18 ur brez ali v prisotnosti atorvastatina.

Zaporedna številka darovalca krvi	LPS	LPS AT (0,1 μ M)	LPS AT (1 μ M)	LPS AT (10 μ M)
1	1410	863	1077	987
2	1347	1164	1194	1593
3	1924	1443	1424	1558
4	4469	2332	2242	3458
5	1227	1078	913	1197
6	1739	1256	1556	1814
7	1425	1645	1294	1709
8	3422	2370	2646	2122
9	1600	1182	1255	1901
10	3793	2450	3094	3158
11	1936	1619	1649	1471
12	692	455	296	675
13	2578	1746	1944	2588
14	4530	3092	4040	3922
15	2458	2402	1850	2268
\bar{x} (pg/ml)	2303	1673	1765	2028
SD (pg/ml)	1212	722	938	917
KV (%)	52,6	43,2	53,2	45,2

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); KV (koeficient variacije); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α); \bar{x} (srednja vrednost)



Slika 6: Prikaz razpršenosti koncentracij IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. PBMC smo spodbujali z LPS in jih inkubirali 18 ur brez in v prisotnosti atorvastatina.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IL-6 (interlevkin-6); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α)

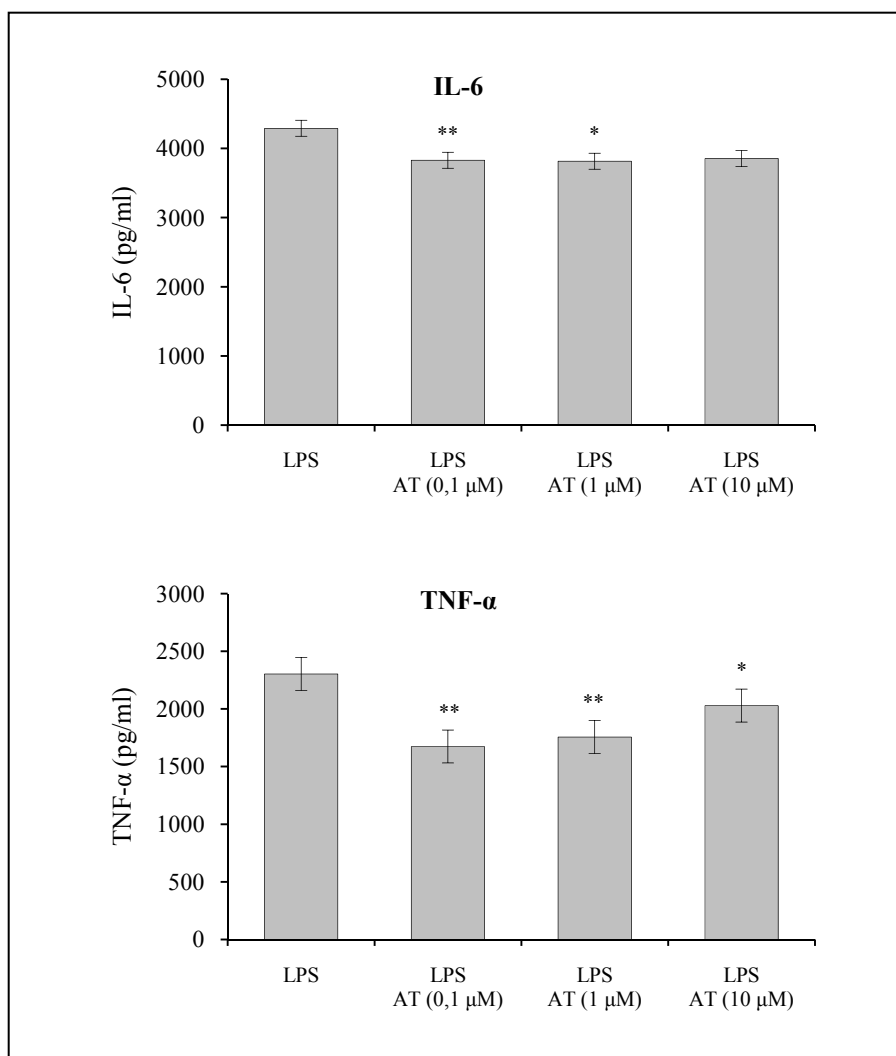
Srednje vrednosti koncentracij citokinov, ki so se sprostili iz kultur spodbujenih PBMC, izpostavljenih atorvastatinu v različnih koncentracijah, smo primerjali s kontrolo, ki so jo predstavljale srednje vrednosti koncentracij citokinov, sproščenih iz kultur samo spodbujenih celic. Atorvastatin je znižal sproščanje obeh vnetnih citokinov. Srednje vrednosti TNF- α so bile značilno nižje pri vseh koncentracijah atorvastatina v kulturi. Prav tako so bile znižane vrednosti IL-6, vendar statistično značilno le pri koncentracijah atorvastatina 0,1 in 1 μ M v kulturi (Pregl. 8, Sl. 7). Izračunali smo Pearsonov koeficient korelacije med koncentracijo IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC, izpostavljenih različnim koncentracijam atorvastatina. Iz preglednice 9 je razvidno, da so koeficienti korelacije (r) med omenjenima citokinoma statistično značilni.

Preglednica 8: Primerjava srednjih vrednosti IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev, izpostavljenih atorvastatinu, s kontrolo (samo spodbujene PBMC). PBMC smo spodbujali z LPS in inkubirali 18 ur.

		LPS	LPS AT (0,1 μ M)	LPS AT (1 μ M)	LPS AT (10 μ M)
IL-6 (pg/ml)	$\bar{x} \pm SD$	4290 \pm 1432	3829 \pm 1319	3815 \pm 1199	3852 \pm 1407
	p		0,002 ↓↓	0,012 ↓	0,054 NZ
TNF- α (pg/ml)	$\bar{x} \pm SD$	2303 \pm 1212	1673 \pm 722	1756 \pm 938	2028 \pm 917
	p		0,002 ↓↓	0,001 ↓↓	0,041 ↓

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IL-6 (interlevkin-6); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); p (verjetnost, da je razlika med srednjima vrednostima posledica naključja); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α); \bar{x} (srednja vrednost)

Opombe: ↓↓ - značilno nižja koncentracija pri $p < 0,01$
 ↓ - značilno nižja koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$
 NZ - neznačilno različna koncentracija pri stopnji tveganja 5% oziroma 1%



Slika 7: Koncentracije IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu. PBMC smo spodbujali z LPS in inkubirali 18 ur. Z višino stolpcev so prikazane srednje vrednosti, na njih so označene standardne napake.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IL-6 (interlevkin-6); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); TNF- α (tumorje-nekrotizirajoči faktor- α)

Opombe: ** - značilno različna koncentracija pri $p < 0,01$

* - značilno različna koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$

Preglednica 9: Pearsonovi koeficienti korelacije (r) med koncentracijo IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev brez in v prisotnosti atorvastatina. PBMC smo spodbujali z LPS in inkubirali 18 ur.

	LPS	LPS AT (0,1 μ M)	LPS AT (1 μ M)	LPS AT (10 μ M)
r	0,73**	0,75**	0,68**	0,75**
p	0,002	0,001	0,006	0,001

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); LPS (lipopolisaharid 10 ng/ml kulture); p (verjetnost, da je korelacija posledica naključja); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); r (Pearsonov koeficient korelacije)

Opomba: ** - značilna korelacija pri $p < 0,01$

4.3.2 Vpliv atorvastatina na sintezo IFN- γ , IL-4 in IL-2

V preglednicah 10, 11 in 12 so prikazane meritve IFN- γ , IL-4 in IL-2 pri posameznih darovalcih krvi. Prikazane so tudi vrednosti opisnih statistik (srednja vrednost, standardni odklon in koeficient variacije). Visoke vrednosti standardnih odklonov in koeficientov variacije (57-63% za IFN- γ , 39-63% za IL-4 oziroma 65-74% za IL-2) so posledica velike razpršenosti koncentracij citokinov. V primeru IL-4 in IL-2 je porazdelitev vrednosti značilno odstopala od normalne porazdelitve. Zato smo namesto Studentovega t -testa za primerjavo srednjih vrednosti uporabili Wilcoxonov test, pri katerem ni nujno, da je porazdelitev vrednosti normalna. Slika 8 prikazuje kvartilne diagrame izmerjenih vrednosti IFN- γ in IL-4, slika 9 pa kvartilni diagram za IL-2. Spodnji rob pravokotnika označuje prvi kvartil, zgornji rob tretji kvartil, črta v pravokotniku pa mediano. Spodnji konec intervalne črte označuje najnižjo izmerjeno koncentracijo, zgornji konec intervalne črte pa najvišjo izmerjeno koncentracijo. Iz kvartilnih diagramov lahko razberemo, da so koncentracije IFN- γ razpršene precej neenakomerno, še bolj pa koncentracije IL-4 in IL-2.

Preglednica 10: Meritve IFN- γ (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. Celice smo spodbudili z IONO&PMA in jih inkubirali 40 ur brez ali v prisotnosti atorvastatina.

Zaporedna številka darovalca krvi	IONO&PMA	IONO&PMA AT (0,1 μ M)	IONO&PMA AT (1 μ M)	IONO&PMA AT (10 μ M)
1	3380	1921	3380	3920
2	6977	4295	5920	6701
3	1041	433	694	1280
4	2900	2269	2860	2206
5	3140	2744	3040	3560
6	9479	8885	11300	10833
7	846	749	1540	846
8	8859	5055	4700	5371
9	3400	971	2191	1604
10	7426	5498	6380	5308
11	3940	3314	4220	4295
12	8688	6353	6828	6195
13	3380	2997	3240	1826
14	9008	7018	8110	7176
15	6220	7334	6806	7461
\bar{x} (pg/ml)	5246	3989	4747	4572
SD (pg/ml)	2985	2617	2816	2814
KV (%)	56,9	65,6	59,3	61,5

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); KV (koeficient variacije); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); \bar{x} (srednja vrednost)

Preglednica 11: Meritve IL-4 (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih prostovoljcev. Celice smo spodbudili z IONO&PMA in jih inkubirali 40 ur brez ali v prisotnosti atorvastatina.

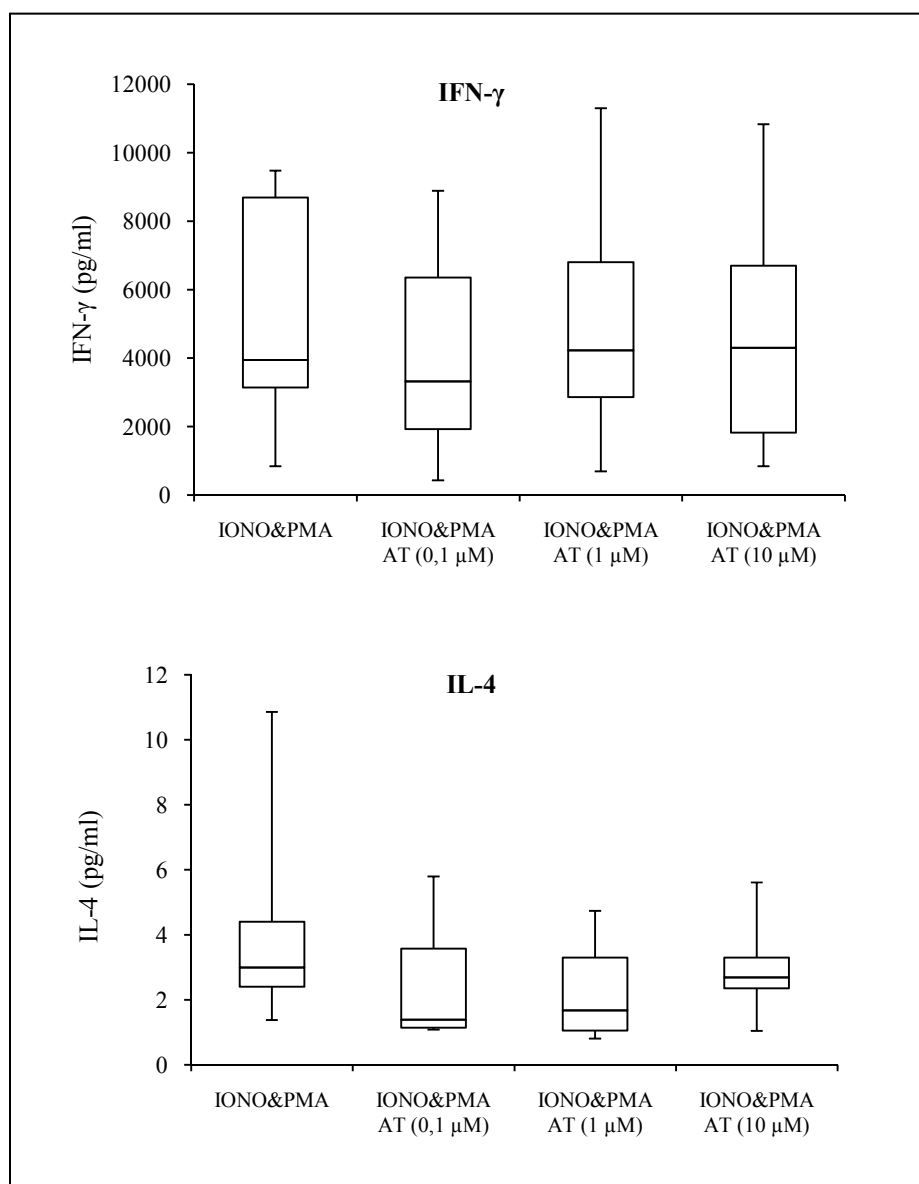
Zaporedna številka darovalca krvi	IONO&PMA	IONO&PMA AT (0,1 μ M)	IONO&PMA AT (1 μ M)	IONO&PMA AT (10 μ M)
1	1,38	1,64	1,67	1,62
2	4,40	1,09	0,94	2,12
3	2,08	1,35	1,78	2,35
4	2,99	1,23	1,16	2,41
5	2,45	1,39	1,21	2,75
6	2,97	1,12	1,05	2,46
7	2,40	3,81	1,36	2,70
8	3,29	1,27	1,01	2,69
9	2,39	3,57	3,32	3,30
10	5,87	5,80	2,96	2,48
11	3,97	1,08	3,30	5,61
12	10,86	2,78	2,93	3,87
13	4,97	1,14	0,80	2,76
14	2,82	3,60	4,46	1,04
15	3,36	3,39	4,73	4,23
\bar{x} (pg/ml)	3,75	2,28	2,18	2,83
SD (pg/ml)	2,29	1,45	1,33	1,10
KV (%)	61,0	63,4	60,8	38,9

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IL-4 (interlevkin-4); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); KV (koeficient variacije); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); \bar{x} (srednja vrednost)

Preglednica 12: Meritve IL-2 (pg/ml) v supernatantih kultur PBMC zdravih prostovoljcev. Celice smo spodbudili z IONO&PMA in jih inkubirali 40 ur brez ali v prisotnosti atorvastatina.

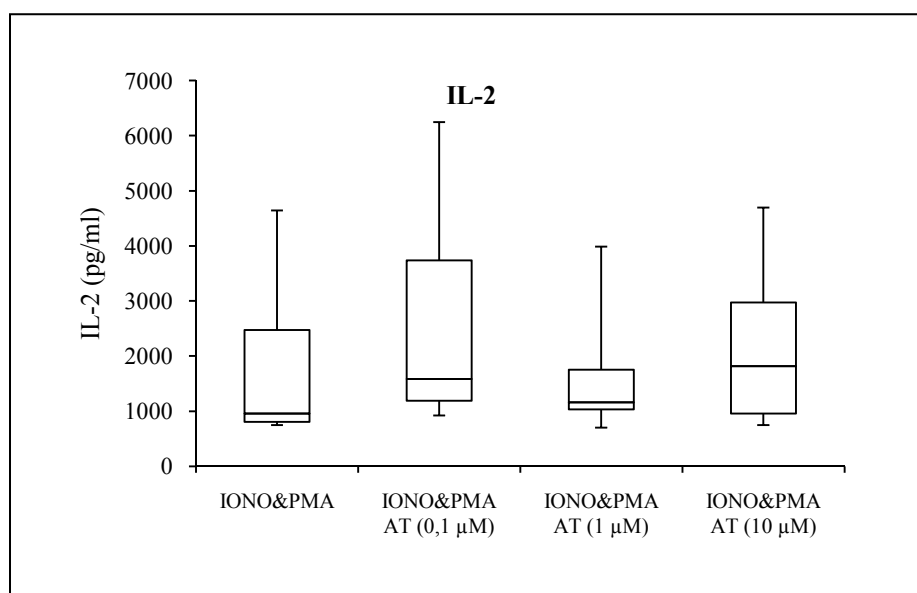
Zaporedna številka darovalca krvi	IONO&PMA	IONO&PMA AT (0,1 μM)	IONO&PMA AT (1 μM)	IONO&PMA AT (10 μM)
1	793	1363	1311	1235
2	2058	1920	1433	4106
3	838	924	1067	747
4	945	938	1158	2024
5	808	1349	1113	747
6	2576	3752	2714	4697
7	747	1187	701	884
8	960	1656	1036	1067
9	1021	1056	701	960
10	2472	3737	1753	2593
11	1006	1583	1189	2969
12	4645	6245	3990	4507
13	945	1965	1052	1036
14	3403	4461	3421	2938
15	808	1451	777	1818
\bar{x} (pg/ml)	1602	2239	1561	2155
SD (pg/ml)	1184	1572	1006	1406
KV (%)	73,9	70,2	64,5	65,3

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μM, 1 μM ali 10 μM v kulturi); IL-2 (interlevkin-2); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); KV (koeficient variacije); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); \bar{x} (srednja vrednost)



Slika 8: Prikaz razpršenosti koncentracij IFN- γ in IL-4 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in jih inkubirali 40 ur brez in v prisotnosti atorvastatina.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-4 (interlevkin-4); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)



Slika 9: Prikaz razpršenosti koncentracij IL-2 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in jih inkubirali 40 ur brez in v prisotnosti atorvastatina.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 µM, 1 µM ali 10 µM v kulturi); IL-2 (interlevkin-2); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)

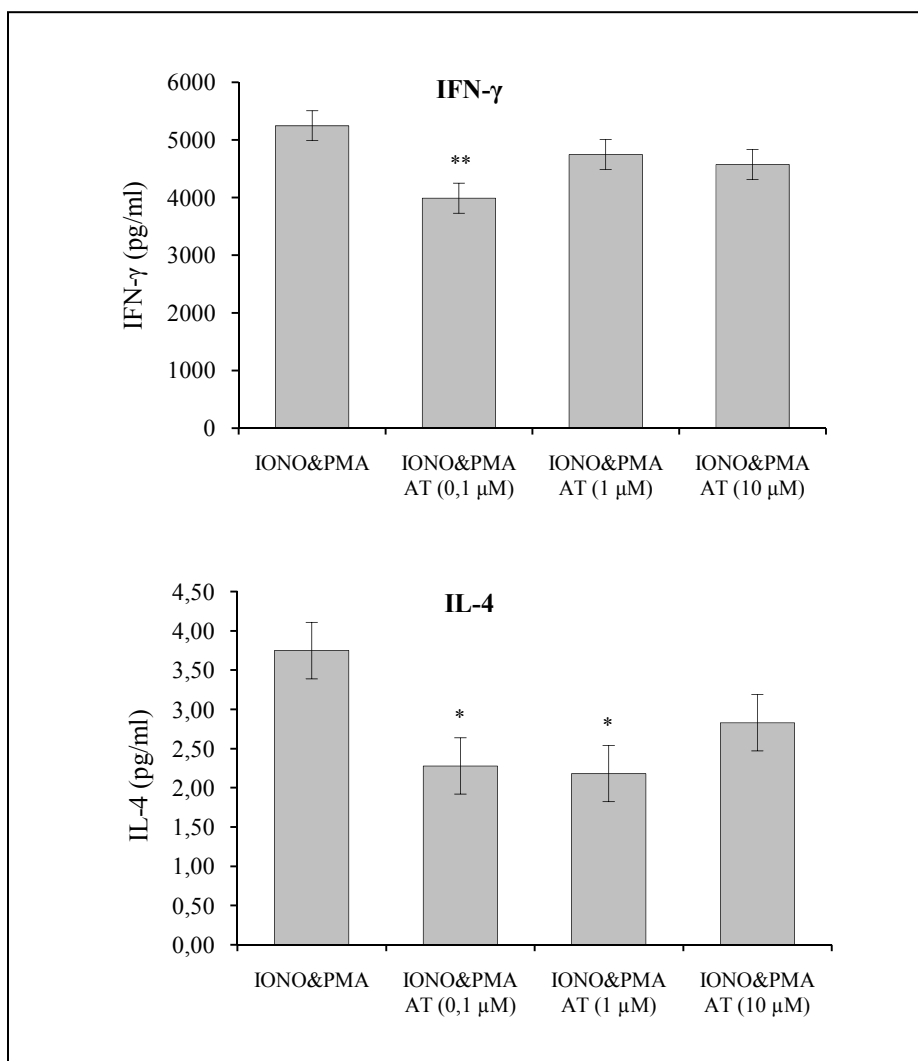
Srednje vrednosti koncentracij IFN- γ , IL-4 in IL-2 v supernatantih kultur spodbujenih PBMC, izpostavljenih atorvastatinu v različnih koncentracijah, smo primerjali s kontrolo (samo spodbujene celice). Srednje vrednosti IFN- γ in IL-4 so bile v prisotnosti atorvastatina v kulturah PBMC nižje od kontrole, pri čemer je bila odvisnost od koncentracije atorvastatina podobna kot pri obeh vnetnih citokinih. Značilno nižje vrednosti citokinov so bile dosežene pri nižjih koncentracijah atorvastatina (Pregl. 13, Sl. 10). V nasprotju z ostalimi citokini, se je koncentracija IL-2 po inkubaciji PBMC z atorvastatinom povečala, in sicer pri najvišji in najnižji koncentraciji atorvastatina. Izračunali smo Spearmanov koeficient korelacije (ρ) med koncentracijami IFN- γ in IL-4, IFN- γ in IL-2 oziroma IL-4 in IL-2 v supernatantih kultur PBMC, izpostavljenih različnim koncentracijam atorvastatina. Koeficienti korelacije so statistično značilni med IFN- γ in IL-2, neznačilni pa med IFN- γ in IL-4 ter IL-4 in IL-2, razen v primeru primerjave IL-4 in IL-2 v supernatantih samo spodbujenih kultur PBMC, kjer je koeficient korelacije statistično značilen (Pregl. 14).

Preglednica 13: Primerjava srednjih vrednosti IFN- γ , IL-4 in IL-2 v kulturah spodbujenih PBMC, izpostavljenih atorvastatinu, s kontrolo (samo spodbujene PBMC). PBMC smo spodbudili z IONO&PMA in inkubirali 40 ur.

		IONO&PMA	IONO&PMA AT (0,1 μM)	IONO&PMA AT (1 μM)	IONO&PMA AT (10 μM)
IFN-γ (pg/ml)	$\bar{x} \pm SD$	5246 \pm 2985	3989 \pm 2617	4747 \pm 2816	4572 \pm 2814
	<i>p</i>		0,002 ↓↓	0,178 NZ	0,095 NZ
IL-4 (pg/ml)	$\bar{x} \pm SD$	3,75 \pm 2,29	2,28 \pm 1,45	2,18 \pm 1,33	2,83 \pm 1,10
	<i>p</i>		0,041 ↓	0,023 ↓	0,191 NZ
IL-2 (pg/ml)	$\bar{x} \pm SD$	1602 \pm 1184	2239 \pm 1572	1561 \pm 1006	2155 \pm 1406
	<i>p</i>		0,002 ↑↑	0,910 NZ	0,044 ↑

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-2 (interlevkin-2); IL-4 (interlevkin-4); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); *p* (verjetnost, da je razlika med povprečjema posledica naključja); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); SD (standardni odklon); \bar{x} (srednja vrednost)

Opombe: ↓↓ - značilno nižja koncentracija pri $p < 0,01$
 ↑↑ - značilno višja koncentracija pri $p < 0,01$
 ↓ - značilno nižja koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$
 ↑ - značilno višja koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$
 NZ - neznačilno različna koncentracija pri stopnji tveganja 5% oziroma 1%

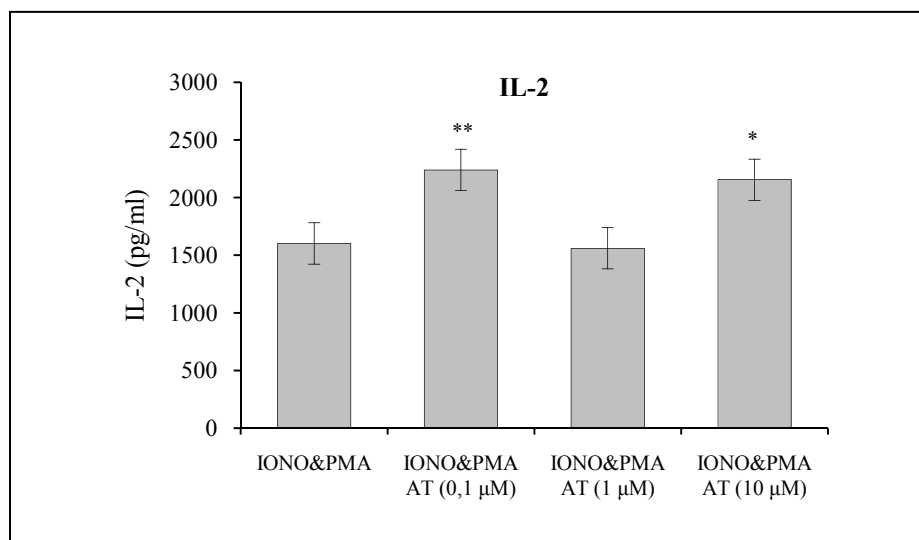


Slika 10: Koncentracije IFN- γ in IL-4 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in inkubirali 40 ur. Z višino stolpcev so prikazane srednje vrednosti, na njih so označene standardne napake.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 μ M, 1 μ M ali 10 μ M v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-4 (interlevkin-4); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)

Opombe: ** - značilno različna koncentracija pri $p < 0,01$

* - značilno različna koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$



Slika 11: Koncentracije IL-2 v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev po spodbujanju in izpostavljenosti atorvastatinu. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in inkubirali 40 ur. Z višino stolpcev so prikazane srednje vrednosti, na njih so označene standardne napake.

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 µM, 1 µM ali 10 µM v kulturi); IL-2 (interlevkin-2); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi)

Opombe: ** - značilno različna koncentracija pri $p < 0,01$

* - značilno različna koncentracija pri $0,01 \leq p < 0,05$

Preglednica 14: Spearmanovi koeficienti korelacije (ρ) med koncentracijami citokinov antigeno specifičnega imunskega odziva v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev brez in v prisotnosti atorvastatina. PBMC smo spodbujali z IONO&PMA in inkubirali 40 ur.

	IONO&PMA	IONO&PMA AT (0,1 µM)	IONO&PMA AT (1 µM)	IONO&PMA AT (10 µM)
ρ (IFN-γ in IL-4)	0,46	-0,05	0,16	-0,08
p	0,086	0,869	0,576	0,771
ρ (IFN-γ in IL-2)	0,79**	0,82**	0,69**	0,78**
p	0,0004	0,0002	0,005	0,001
ρ (IL-4 in IL-2)	0,52*	-0,01	0,03	-0,06
p	0,046	0,97	0,919	0,820

Legenda: AT (atorvastatin 0,1 µM, 1 µM ali 10 µM v kulturi); IFN- γ (interferon- γ); IL-2 (interlevkin-2); IL-4 (interlevkin-4); IONO&PMA (ionomicin 500 nM v kulturi in forbol 12-miristat 13-acetat 3,33 ng/ml kulture); p (verjetnost, da je korelacija posledica naključja); PBMC (mononuklearne celice iz venske krvi); ρ (Spearmanov koeficient korelacije)

Opomba: ** - značilna korelacija pri $p < 0,01$

* - značilna korelacija pri $0,01 \leq p < 0,05$

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Že nekaj časa je znano, da imajo statini, poleg tega da znižujejo raven holesterola v krvi, tudi protivnetno delovanje. Natančni mehanizmi za zdaj še niso znani, raziskovalci pa jih poskušajo razjasniti z različnimi pristopi. Pomembno vlogo v poteku vnetja imajo vnetni citokini (IL-1 β , TNF- α in IL-6). Zato je v raziskave pogosto vključeno proučevanje vpliva statinov na sintezo in sproščanje citokinov. V okviru diplomske naloge smo se odločili proučiti vpliv atorvastatina na sproščanje citokinov vnetnega odziva (IL-6 in TNF- α), v poskuse pa smo vključili tudi citokine pridobljene (antigensko specifične) imunosti (IFN- γ , IL-4 in IL-2).

Protivnetni učinki atorvastatina in drugih statinov so jasno izraženi predvsem v razmerah *in vivo* (Ridker in sod., 1999; Wiklund in sod., 2002; Ascer in sod., 2004). Pri tem lahko zmanjšanje vnetnega odziva, ki ga povzročijo statini, pripišemo njihovem osnovnemu mehanizmu delovanja, torej inhibiciji sinteze holesterola v jetrnih celicah. Slednje začnejo privzemati holesterol LDL iz krvi, katerega koncentracija se zato zniža. Manj holesterola LDL v krvi pomeni manjše prehajanje le-tega v stene krvnih žil, kjer se oksidira in spodbudi endotelijske celice k izdelavi in sproščanju kemoatraktantnih spojin za levkocite. Na ta način se v steni žil zbere manj imunskih celic, ki po aktivaciji sproščajo citokine. V tem primeru je torej vpliv statinov na vnetne reakcije posreden. Pri gojenju PBMC *in vitro* pa v mediju ni prisotnega holesterola, ki bi vplival na aktivacijo celic in sproščanje citokinov. Zato lahko tako pričakujemo in proučujemo neposreden vpliv statinov na celice imunskega sistema (Lusis, 2000; Bessler in sod., 2005).

V prvem delu poskusov smo želeli določiti natančnejše pogoje gojenja, ki smo jih kasneje uporabili za gojenje PBMC zdravih darovalcev. V levkocitnem koncentratu je zelo veliko levkocitov, med katerimi so tudi mononuklearne celice. Zato smo lahko kulture PBMC iz levkocitnega koncentrata gojili na več načinov kot je bilo to mogoče s PBMC zdravih darovalcev. Iz odvzete krvi lahko izoliramo precej manj celic, zaradi česar smo želeli predhodno izbrati pogoje njihovega gojenja.

Z merjenjem koncentracije IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-2 v supernatantih kultur PBMC levkocitnega koncentrata smo določili koncentracijsko območje atorvastatina, ki smo ga kasneje uporabili za proučevanje vpliva atorvastatina na PBMC zdravih darovalcev. Pri najvišji koncentraciji atorvastatina (100 μ M) so bile koncentracije vseh citokinov v supernatantih kultur zelo znižane. Predvidevali smo, da je tako visoka koncentracija atorvastatina za PBMC že toksična. Vendar s testom LDH nismo zaznali citotoksičnosti atorvastatina (Pregl. 5). Do drugačnih ugotovitev sta prišla Coward in Chow (2006), ki sta s poskusi na limfocitih T ugotovila, da atorvastatin do koncentracije 10 μ M nima vpliva na preživetje celic. Pri višjih koncentracijah pa se učinek povečuje z višanjem koncentracije atorvastatina in pri koncentraciji 100 μ M doseže citotoksičnost približno 30%, pri 500 μ M pa že skoraj 100%. Avtorja sta citotoksičnost atorvastatina preverjala s privzemom propidijevega jodida v celice in merjenjem fluorescence (Coward in Chow, 2006). Odstopanja med našimi rezultati in rezultati omenjenih avtorjev so lahko posledica razlik v občutljivosti obeh metod. Primerjave različnih načinov določanja viabilnosti celic namreč kažejo na manjšo občutljivost merjenja aktivnosti LDH (Coco-Martin in sod., 1992; da Costa in sod., 1999; Fotakis in Timbrell, 2006). Še bolj verjetno pa je, da je nizka aktivnost LDH v naših vzorcih posledica njihovega zamrzovanja, saj je stabilnost LDH pri nizkih temperaturah zelo zmanjšana. Iz tega razloga smo kljub rezultatom LDH-testa v nadaljnjih poskusih s PBMC zdravih darovalcev uporabili ožje koncentracijsko območje atorvastatina (0,1 – 10 μ M). Pri tem smo upoštevali tudi dejstvo, da ob rednem odmerjanju atorvastatina, njegova koncentracija v organizmu doseže 0,2 μ M ali več v določenih predelih (Cilla in sod., 1996).

Glede trajanja inkubacij smo se odločili za preverjene načine, in sicer 18-urna inkubacija z LPS in 40-urna inkubacija z IONO in PMA (Košnik in Wraber, 2000; Repnik, 2000; Simčič in sod., 2000).

Iz meritev koncentracije vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC zdravih darovalcev je razvidno, da je prisotnost atorvastatina značilno zmanjšala njuno sproščanje (Pregl. 8). Primerjava obeh citokinov pokaže, da so koncentracije TNF- α glede na kontrolo bolj znižane kot koncentracije IL-6. Vendar pa so koeficienti korelacije med vrednostmi IL-6 in TNF- α v supernatantih kultur PBMC visoki (Pregl.9). Opažanje lahko

razložimo s časovnim potekom izdelovanja citokinov v fizioloških razmerah. Ko makrofagi prepoznajo mikrobo, začnejo takoj izdelovati in sproščati TNF- α . Vezava slednjega z ustreznimi receptorji na makrofagih, endotelijskih celicah in nekaterih drugih tipih celic sproži prepisovanje genov z zapisom za IL-6 (Abbas in sod., 2007). To pomeni, da zmanjšano sproščanje TNF- α zaradi delovanja atorvastatina vodi tudi do zmanjšane sproščanja IL-6 iz makrofagov.

Zmanjšano sproščanje vnetnih citokinov iz PBMC po izpostavljenosti atorvastatinu je v skladu z našimi pričakovanji. Pričakovali smo tudi, da bo učinek največji pri visokih koncentracijah atorvastatina. V nasprotju s tem je bila odvisnost med koncentracijo atorvastatina in njegovim učinkom obratnosorazmerna. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Kiener in sod. (2001), s tem da je med našimi in njihovimi rezultati pomembna razlika. V njihovem primeru je atorvastatin glede na kontrolo povečal sproščanje citokinov (TNF- α , IL-1 β in IL-8) iz monocitov, v naših poskusih pa so bile vrednosti nižje od kontrole. Avtorji članka predvidevajo, da statini z inhibicijo prenilacije proteinov pospešijo sintezo določenih citokinov. Tarčni proteini sicer še niso določeni, med kandidati pa so proteini iz družine majhnih proteinov G (Kiener in sod, 2001). V našem primeru ne moremo sklepati na mehanizem delovanja atorvastatina, ki je privedel do inhibicije sproščanja IL-6 in TNF- α , vendar je bila tako kot pri omenjenih avtorjih tudi v naših poskusih najnižja koncentracija atorvastatina najučinkovitejša. Večji učinek atorvastatina pri nizkih koncentracijah (0,1 μ M) je klinično pomemben, saj koncentracije atorvastatina v organizmu ob rednem zdravljenju dosegajo približno takšne vrednosti (0,2 μ M) (Cilla in sod, 1996).

Do podobnega odziva PBMC na prisotnost atorvastatina kot pri obeh vnetnih citokinih je prišlo tudi pri IFN- γ in IL-4 (Pregl. 13). Merili smo ju v supernatantih kultur PBMC, spodbujenih z IONO in PMA, s čimer smo k izdelovanju citokinov spodbudili limfocite T. IONO in PMA aktivirata tudi celice NK, ki so pomemben vir IFN- γ (Mori in sod., 1998). IFN- γ , sproščen iz celic NK, dodatno spodbudi sproščanje tega citokina iz limfocitov T. Zmanjšano sproščanje IFN- γ (statistično značilno sicer samo pri najnižji koncentraciji) je pomembno predvsem zaradi odzivov celic, ki jih ta citokin povzroči. APC namreč

spodbudi k izražanju molekul MHC razreda II na njihovi površini. Molekule MHC razreda II so nujne za predstavljanje antigenov in aktivacijo limfocitov T preko TCR. Aktiviran TCR sproži delitev limfocitov T in njihovo diferenciacijo. Najbolje proučeni sta populaciji limfocitov Th1 in Th2. Celice Th1 sproščajo citokine, ki pospešujejo celično imunost in z njo povezano vnetje (IFN- γ in TNF- α). Celice Th2 pa sproščajo protivnetne citokine, ki to vnetje omejujejo (IL-4 in IL-10). Pri tem procesu sodelujejo regulatorne celice, ki prav tako sproščajo TGF- β in tudi IL-10. Zmanjšano izražanje MHC II, ki ga povzroči delovanje statinov, tako vodi v zmanjšano diferenciacijo limfocitov T (Abbas in sod., 2007; Bessler in sod., 2005; Gurevich in sod., 2005). S tem bi lahko razložili nižje koncentracije IFN- γ in IL-4 v supernatantih kultur PBMC, izpostavljenih atorvastatinu.

V nasprotju z vsemi omenjenimi citokini so se koncentracije IL-2 značilno zvišale pri najnižji in najvišji koncentraciji atorvastatina v kulturah PBMC (Pregl. 13). IL-2 je rastni dejavnik za aktivirane limfocite T. Čeprav so bile vrednosti tako IFN- γ kot tudi IL-4 znižane ob prisotnosti atorvastatina v kulturah PBMC, se je razmerje IFN- γ /IL-4 povečalo glede na kontrolo. Zanimivi so tudi koeficienti korelacije med citokini pridobljene imunosti (Pregl. 14). Med IFN- γ in IL-4 korelacije ni, iz česar lahko sklepamo, da so bili darovalci krvi polarizirani bodisi v Th1 ali Th2 odziv. V primeru samo spodbujenih celic (brez dodanega atorvastatina) je koeficient korelacije statistično značilen tako med IFN- γ in IL-2 kot tudi med IL-4 in IL-2. To se sklada z dejstvom, da je IL-2 rastni dejavnik za vse limfocite T. V supernatnatih kultur z dodanim atorvastatinom pa je ostala visoka korelacija samo med IFN- γ in IL-2, medtem ko se je znižala med IL-4 in IL-2. Vendar bi težko sklepali, da je prišlo do diferenciacije v smeri celic Th1. Coward in Chow (2006) sta ugotavljala vpliv atorvastatina na diferenciacijo limfocitov CD4, vendar prav tako ni bilo značilnih razlik v razmerju med celicami Th1 in Th2 glede na kontrolo brez atorvastatina. Zanimivo bi bilo natančneje proučiti vpliv atorvastatina na regulatorne celice T. Hu in sod. (2007) so namreč v svoji raziskavi ugotovili, da pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom atorvastatin obnovi številčnost in funkcionalnost regulatornih celic T. Slednje so zelo pomembne pri vzdrževanju ravnotežja v imunskem sistemu (Hu in sod., 2007).

Interpretacija rezultatov merjenja citokinov v našem primeru je precej težavna. Citokinski odzivi se namreč zelo razlikujejo med posamezniki, o čemer poročajo tudi drugi avtorji (Wraber, 1994; Danis in sod., 1995; Ferry in sod., 1997; Repnik, 2000; Kiener in sod., 2001; Livk, 2007). Velik del k tej variabilnosti prispevajo genetski polimorfizmi, katerih posledica je lahko povečano ali zmanjšano izdelovanje in sproščanje citokinov (Danis in sod., 1995; Terry in sod., 2000), manjša ali višja gostota citokinskih receptorjev na površini celic (Arcaroli in sod., 2005). Pomembno je predvsem razmerje med celicami Th1 in Th2. Porušeno ravnovesje pogosto poveča tveganje za nastanek nekaterih bolezni. Pomik ravnovesja proti celicam Th2 poveča verjetnost razvoja bronhialne astme, Crohnova bolezen pa je povezana s pomikom proti celicam Th1 (Bottini in sod., 2005).

Od odkritja pleiotropnega delovanja statinov je bilo narejenih veliko raziskav o njihovem vplivu na imunski sistem. Iz več razlogov pa je težko primerjati rezultate, predvsem tiste, ki so bili dobljeni s poskusi *in vitro*, z rezultati kliničnih študij. V prvem primeru imunske celice osamimo iz krvi in s tem odstranimo vse mediatorje, ki bi lahko vplivali bodisi na sproščanje citokinov ali na delovanje samega statina. Koncentracije v celičnih kulturah pogosto tudi precej presegajo tiste, ki jih lahko dosežemo s terapijami. Tako na primer s terapijo z 80 mg atorvastatina na dan po treh tednih dosežemo v plazmi koncentracijo atorvastatina približno 0,2 μM , kar je blizu najnižje koncentracije atorvastatina, ki smo jo uporabili v naših poskusih. Veliko obetajočih rezultatov izhaja tudi iz poskusov z živalskimi modeli. Tako na primer različni statini spodbujajo diferenciacijo mišjih limfocitov CD4 v celice Th2, atorvastatin pa v podganjih celicah zmanjšuje izražanje mRNA vnetnih markerjev (VCAM-1, TNF- α , IL-1 β) tudi do 80% glede na kontrolo. Vendar je nujno poudariti, da so uporabljene doze statinov pogosto zelo velike, tudi 100 mg/kg telesne teže dnevno. Trenutno največja terapevtska doza pa je 80 mg/dan (Bustos in sod., 1998; Sparrow in sod., 2001; Hakamada-Taguchi in sod., 2003; Riad in sod., 2007).

Vpliv statinov na imunski sistem v razmerah *in vivo* je preplet neposrednih in posrednih posledic njihovega osnovnega mehanizma delovanja. Zmanjšana sinteza holesterola pomeni manjše nalaganje LDL-holesterola v žilnih stenah. S tem je že v osnovi zmanjšana stopnja lokalnega vnetja. Inhibicija mevalonatne poti vodi tudi do zmanjšane sinteze

izoprenoidov in njihovih derivatov. Slednji so pomembni v posttranslacijskih modifikacijah (prenilacijah) proteinov, ki sodelujejo v številnih celičnih procesih (prenos signala, delitev in diferenciacija celic, organizacija citoskeleta). Statini niso celično specifični, zato inhibirajo mevalonatno pot tudi v drugih celicah, kar lahko privede do nastanka stranskih učinkov. Najboljši primer za to je cerivastatin. Gre za t.i. mikrostatin, ki zelo učinkovito znižuje raven holesterola že v mikrogramskih odmerkih. Vendar je bil cerivastatin zaradi stranskih učinkov umaknjen iz tržišča. Povzročal je namreč rabdomiolizo, razpad mišičnih celic, ki vodi do odpovedi ledvic (Furberg in Pitt, 2001; Lau in sod., 2001). V primerjavi s cerivastatinom je verjetnost nastanka rabdomiolize pri uporabi ostalih statinov zelo nizka (Graham in sod., 2004).

Imunomodulatorni in imunosupresorni učinki delovanja statinov dajejo možnost njihove uporabe tudi izven okvirov bolezni srca in ožilja. Obetavna je predvsem njihova uporaba pri presaditvah organov in zdravljenju avtoimunskih bolezni. Kot že rečeno, statini inhibirajo izražanje molekul MHC razreda II, za katere je bilo pokazano, da so bolj izražene pri nekaterih avtoimunskih boleznih, na primer multipli sklerozi, revmatoidnem artritisu, miokarditisu in sistemskem lupusu eritematozusu (Greenwood in sod., 2006). Do sedaj je bila večina raziskav opravljenih na živalskih modelih, zaradi česar je težko napovedati rezultate kliničnih študij. Zanimiv je predvsem primer eksperimentalnega avtoimunskega encefalomyelitisa (EAE, okr. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, živalski model multiple skleroze). Z uporabo statinov se je v osrednjem živčnem sistemu podgan z EAE znižalo sproščanje vnetnih markerjev (iNOS, TNF- α , IFN- γ), povečalo se je sproščanje protivnetnih citokinov (IL-4, IL-10 in TGF- β), izboljšali pa so se tudi klinični znaki bolezni (Stanislaus in sod., 1999; Youssef in sod., 2002; Aktas in sod., 2003). Pozitivni učinki statinov se kažejo tudi v rezultatih kliničnih študij, vendar bo potrebno za zanesljivejše trditve opraviti še dodatne raziskave. Kljub temu pa statini predstavljajo možno alternativo v zdravljenju avtoimunskih bolezni.

5.2 SKLEPI

Za določanje citotoksičnosti atorvastatina s testom LDH niso primerni vzorci, shranjeni pri -20°C . Iz podatkov iz literature je namreč razvidno, da je omenjeni encim pri tako nizkih temperaturah nestabilen. Rezultati bi bili zato zanesljivejši, če bi test izvedli takoj po končani inkubaciji kultur PBMC.

Primerjava srednjih vrednosti koncentracije vnetnih citokinov (IL-6 in TNF- α) v supernatantih kultur PBMC, izpostavljenih atorvastatinu, s kontrolo brez atorvastatina, kaže na značilno zmanjšano sproščanje obeh citokinov ob prisotnosti atorvastatina. Poleg tega so koncentracije obeh citokinov v posameznih vzorcih v visoki korelaciji. Atorvastatin je zmanjšal tudi sproščanje IFN- γ in IL-4 iz PBMC.

Pri omenjenih citokinih (IL-6, TNF- α , IFN- γ in IL-4) je odvisnost med koncentracijo atorvastatina in odzivom PBMC obratnosorazmerna, kar pomeni, da je največji učinek dosežen pri najnižji koncentraciji atorvastatina.

PBMC so se na prisotnost atorvastatina odzvale s povečanim sproščanjem IL-2, in sicer pri najnižji in najvišji koncentraciji atorvastatina, pri čemer je bil učinek tudi v tem primeru največji pri najnižji koncentraciji atorvastatina. Koncentracije IL-2 v supernatantih kultur PBMC posameznih darovalcev so v visoki korelaciji z IFN- γ , ne pa tudi z IL-4.

Koncentracije citokinov so se precej razlikovale med supernatanti kultur PBMC posameznih darovalcev krvi. Še posebej razpršene so bile vrednosti pri citokinih, ki smo jih merili v kulturah, spodbujanih z IONO&PMA (IFN- γ , IL-4 in IL-2), kar kaže na to, da so odzivi pridobljene imunosti bolj podvrženi individualnim razlikam kot odzivi na LPS.

6 POVZETEK

Imunski sistem včasih namesto obrambe deluje v nasprotni smeri in tako sodeluje pri nastanku različnih bolezenskih stanj. Ob povečani koncentraciji holesterola LDL v krvi vnetni procesi pripomorejo k nastanku aterosklerotičnih leh. Ateroskleroza in njene klinične posledice predstavljajo eno največjih zdravstvenih težav. Statini so skupina zdravil, ki uspešno znižujejo raven holesterola v krvi. V jetrnih celicah inhibirajo HMG-CoA reduktazo, ključni encim v biosintezni poti holesterola. S tem zmanjšajo tudi sintezo izoprenoidov in njihovih derivatov, kar je razlog za pleiotropno delovanje statinov, saj po raziskavah zadnjih let statini vplivajo tudi na druge tipe celic. Pomemben je predvsem vpliv statinov na celice imunskega sistema, saj je v aterosklerotičnih lelah veliko makrofagov in limfocitov T. Imunske celice med seboj komunicirajo s citokini, topnimi polipeptidi, ki se sintetizirajo in sproščajo po aktivaciji teh celic. Običajno je za aktivacijo celic potreben vdor patogenih mikrobov v organizem, v primeru ateroskleroze pa je za aktivacijo makrofagov dovolj povišana raven holesterola LDL. Aktivirani makrofagi lahko s sproščanjem citokinov v odziv vključijo tudi druge celice, npr. limfocite T. Zniževanje ravni holesterola in vpliv na imunski sistem je torej kombinacija, zaradi katere so statini tako učinkoviti. V diplomski nalogi smo želeli proučiti vpliv atorvastatina na sproščanje citokinov vnetnih (IL-6 in TNF- α) in antigensko specifičnih imunskih odzivov (IFN- γ , IL-4 in IL2). Iz venske krvi zdravih darovalcev smo izolirali mononuklearne celice (PBMC) in pripravili celične kulture, ki smo jih izpostavili trem različnim koncentracijam atorvastatina. Ker je spontano sproščanje citokinov v kulturah PBMC blizu meje nezaznavnosti, smo celice spodbudili z ustreznim aktivatorjem. Z LPS in 18-urno inkubacijo smo celice spodbudili k sproščanju vnetnih citokinov. S kombinacijo IONO&PMA in 40-urno inkubacijo pa smo posnemali antigensko specifični imunski odziv. Koncentracijo citokinov v supernatantih celičnih kultur smo merili z encimskoimunskim testom (ELISA). Kot kontrolo smo uporabili meritve citokinov v supernatantih kultur, ki smo jih samo spodbudili z ustreznim aktivatorjem. Ugotovili smo, da atorvastatin vpliva na sproščanje vseh citokinov, ki smo jih zajeli v naših poskusih. Po pričakovanjih so se značilno znižale koncentracije obeh vnetnih citokinov, pri čemer je bila odvisnost med koncentracijo atorvastatina in njegovim učinkom obratnosorazmerna. Sproščanje TNF- α je bilo zmanjšano v večji meri kot sproščanje IL-6, vendar je bila

korelacija med koncentracijo TNF- α in IL-6 pri posameznih darovalcih statistično značilna. Podobno so se PBMC odzvale s sproščanjem IFN- γ in IL-4, vendar ne tako izrazito kot pri obeh vnetnih citokinih. V nasprotju s temi citokini se je koncentracija IL-2 v povprečju zvišala pri najnižji in najvišji koncentraciji atorvastatina. Meritve IL-2 v supernatantih kultur PBMC darovalcev z dodanim atorvastatinom so v korelaciji z meritvami IFN- γ , ne pa z IL-4. Iz visokih koeficientov variacije lahko sklepamo, da je sproščanje citokinov precej individualen odziv. Zelo razpršene so bile vrednosti pri IFN- γ , še bolj pa pri IL-4 in IL-2. Iz rezultatov lahko sklepamo, da k učinkovitemu delovanju atorvastatina, ki ga opazamo pri klinični uporabi, prispeva tudi zaviranje vnetnega in specifičnega imunskega odziva. To spoznanje ima velik pomen, saj odpira možnosti uporabe atorvastatina in drugih statinov tudi pri zdravljenju avtoimunskih bolezni, pri katerih se imunski sistem aktivira proti telesu lastnim celicam. Vsekakor pa bo potrebnih še veliko raziskav, saj statini delujejo celično nespecifično, kar lahko privede do nastanka neželjenih stranskih učinkov.

7 VIRI

Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. 2007. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition, Philadelphia, Elsevier Saunders: 572 str.

Agarwal S., Piesco N.P., Johns L.P., Riccelli A.E. 1995. Differential expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *Journal of Dental Research*, 74, 4: 1057-1065

Aktas O., Waiczies S., Smorodchenko A., Dörr J., Seeger B., Prozorovski T., Sallach S., Endres M., Brocke S., Nitsch R., Zipp F. 2003. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *The Journal of Experimental Medicine*, 197, 6: 725-733

Albert M.A., Danielson E., Rifai N., Ridker P.M., PRINCE Investigators. 2001. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: The pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): A randomized trial and cohort study. *JAMA: The Journal of American Medical Association*, 286, 1: 64-70

Altman A., Mally M.I., Isakov N. 1992. Phorbol ester synergizes with Ca²⁺ ionophore in activation of protein kinase C (PKC) α and PKC β isoenzymes in human T cells and in induction of related cellular functions. *Immunology*, 76, 3: 465-471

Arcaroli J., Fessler M.B., Abraham E. 2005. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock*, 24, 4: 300-312

Ascer E., Bertolami M.C., Venturinelli M.L., Buccheri V., Souza J., Nicolau J.C., Ramires J.A.F., Serrano C.V. Jr. 2004. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*, 177, 1: 161-166

- Bauer J., Herrmann F. 1991. Interleukin-6 in clinical medicine. *Annals of Hematology*, 62, 6: 203-210
- Bessler H., Salman H., Bergman M., Straussberg R., Djaldetti M. 2005. In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. *Clinical Immunology*, 117, 1: 73-77
- Bilač M. 1996. Interleukin 2 in njegov specifični receptor v primarnih kulturah mononuklearnih celic. Diplomsko naloga. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 56 str.
- Bottini N., Gloria-Bottini F., Amante A., Saccucci P., Bottini E. 2005. Genetic polymorphism and Th1/Th2 orientation. *International Archives of Allergy and Immunology*, 138, 4: 328-333
- Brown M.A., Pierce J.H., Watson C.J., Falco J., Ihle J.N., Paul W.E. 1987. B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell*, 50, 5: 809-818
- Bustos C., Hernández-Presa M.A., Ortego M., Tuñón J., Ortega L., Pérez F., Diaz C., Hernández G., Egido J. 1998. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in rabbit model of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 32, 7: 2057-2064
- Bøyum A. 1964. Separation of white blood cells. *Nature*, 204: 793-794
- Case C.C., Ballantyne C.M. 2002. Statins and inflammatory markers. *Current Atherosclerosis Reports*, 4, 1: 42-47
- Cilla D.D. Jr., Withfield L.R., Gibson D.M., Sedman A.J., Posvar E.L. 1996. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 60, 6: 687-695

Clementi E., Martino G., Grimaldi L.M., Brambilla E., Meldolesi J. 1994. Intracellular Ca^{2+} stores of T lymphocytes: changes induced by *in vitro* and *in vivo* activation. *European Journal of Immunology*, 24, 6: 1365-1371

Coco-Martin J.M., Oberink J.W., van der Velden-de Groot T.A., Beuvery E.C. 1992. Viability measurements of hybridoma cells in suspension cultures. *Cytotechnology*, 8, 1: 57-64

Coward W., Chow, S.C. 2006 Effect of atorvastatin on T_H1 and T_H2 cytokine secreting cells during T cell activation and differentiation. *Atherosclerosis*, 186, 2: 302-309

Cytotoxicity detection kit PLUS (LDH), 2006. Roche Diagnostic, Mannheim, Nemčija

da Costa A.O., de Assis M.C., Marques Ede A., Plotkowski M.C. 1999. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell*, 23, 1: 65-72

Danis V.A., Millington M., Hyland V.J., Grennan D. 1995. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clinical and Experimental Immunology*, 99, 2: 303-310

De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y., Fassotte M.F., Beguin Y., Noizat-Pirenne F., Pirenne J., Gathy R., Lopez M., Dehart I. 1992. Direct stimulation of cytokines (IL- 1β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine*, 4, 3: 239-248

Dimc Josič M. 2004. Primerjava biosinteze IFN- α in IL-4 v kulturah mononuklearnih celic, izoliranih iz venske krvi po standardnem in modificiranem postopku. Diplomski naloga. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, 51 str.

Directions for use Ficoll-Paque, 1989. Pharmacia LKB, Uppsala, Švedska.

Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. The Journal of Antibiotics, 29, 12: 1346-1348

Ferro D., Parrotto S., Basili S., Alessandri C., Violi F. 2000. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. Journal of the American College of Cardiology, 36, 2: 427-431

Ferry B., Antrobus P., Huzicka I., Farrell A., Lane A., Chapel H. 1997. Intracellular cytokine expression in whole blood preparations from normals and patients with atopic dermatitis. Clinical and Experimental Immunology, 110, 3: 410-417

Fotakis G., Timbrell J.A. 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters, 160, 2: 171-177

Friberg D., Bryant J., Shannon W., Whiteside T.L. 1994. *In vitro* cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of immunocompetence or the state of activation. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1, 3: 261-268

Furberg C.D., Pitt B. 2001. Withdrawal of cerivastatin from the world market. Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine, 2, 5: 205-207

Gauldie J., Richards C., Harnish D., Lansdorp P., Baumann H. 1987. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 20: 7251-7255

- Gobec S., Urleb U., Simčič S., Wraber B. 2001. Synthesis and modulation of cytokine production by two new adamantane substituted acyclic desmuramylpeptide analogs. *Pharmazie*, 56, 7: 523-526
- Graham D.J., Staffa J.A., Shatin D., Andrade S.E., Schech S.D., La Grenade L., Gurwitz J.H., Chan K.A., Goodman M.J., Platt R. 2004. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 292, 21: 2585-2590
- Greenwood J., Steinman L., Zamvil S.S. 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 5: 358-370
- Gurevich V.S., Shovman O., Slutzky L., Meroni P.L., Shoenfeld Y. 2005. Statins and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 4, 3: 123-129
- Hakamada-Taguchi R., Uehara Y., Kuribayashi K., Numabe A., Saito K., Negoro H., Fujita T., Toyooka T., Kato T. 2003. Inhibition of hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase reduces Th1 development and promotes Th2 development. *Circulation*, 107, 10: 948-956
- Hansson G.K., Libby P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*, 6, 7: 508-519
- Hansson G.K., Berne G.P. 2004. Atherosclerosis and the immune system. *Acta Paediatrica. Supplement*, 93, 446: 63-69
- Heinrich J., Schulte H., Schönfeld R., Köhler E., Assmann G. 1995. Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain. *Thrombosis and Haemostasis*, 73, 3: 374-379

Hiscock N., Chan M.H., Bisucci T., Darby I.A., Febbraio M.A. 2004. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *The FASEB journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18, 9: 992-994

Hu Z., Li D., Hu Y., Yang K. 2007. Changes of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and the effects of atorvastatin. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 27, 5: 524-527

Hutchcroft J.E., Tsai B., Bierer B.E. 1996. Differential phosphorylation of the T lymphocyte costimulatory receptor CD28. Activation-dependent changes and regulation by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 23: 13362-13370

Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications, 2007. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska

Jain M.K., Ridker P.M. 2005. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4, 12: 977-987

Jukema J.W., Bruschke A.V.G, van Boven A.J., Reiber J.H.C., Bal E.T., Zwinderman A.H., Jansen H., Boerma G.J.M., van Rappard F.M., Lie K.I. 1995. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels: The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation*, 91, 10: 2528-2540

Kharbanda R., MacAllister R.J. 2005. The atherosclerosis time-line and the role of the endothelium. *Current Medicinal Chemistry – Immunology, Endocrine and Metabolic Agents*, 5, 1: 47-52

- Kiener P.A., Davis P.M., Murray J.L., Youssef S., Rankin B.M., Kowala M. 2001. Stimulation of inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *International Immunopharmacology*, 1, 1: 105-118
- Kishimoto T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood*, 74, 1: 1-10
- Kocjan T. 1999. Spremembe v razmerju citokinov Th1 in Th2 pri bolnikih z avtoimunsko hipertirozo. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 50 str.
- Košnik M., Wraber B. 2000. Shift from Th2 to Th1 response in immunotherapy with venoms. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440, 5: r70-r71
- Larsen C.S. 1990. Activation of human T lymphocytes by phorbol-12,13-dibutyrate and ionomycin. *Scandinavian Journal of Immunology*, 31, 3: 353-360
- Lau T.K., Leachman D.R., Lufschanowski R. 2001. Severe rhabdomyolysis associated with the cerivastatin-gemfibrozil combination therapy. *Texas Heart Institute Journal*, 28, 2: 142-145
- Le Muer Y., Lorgeot V., Aldigier J.C., Wijdenes J., Leroux-Robert C., Praloran V., 1999. Whole blood production of monocytic cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , sIL-6R, IL-1Ra) in hemodialysed patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 14, 10: 2420-2426
- Li J.J., Chen X.J. 2003. Simvastatin inhibits interleukin-6 release in human monocytes stimulated by C-reactive protein and lipopolysaccharide. *Coronary Artery Disease*, 14, 4: 329-334
- Libby P. 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91, 11: 2844-2850
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, 6917: 868-874

Liu C., Hermann T.E. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *The Journal of Biological Chemistry*, 253, 17: 5892-5894

Livk J. 2007. Razmerje med efektorskimi in regulatornimi odzivi limfocitov T v kulturah mononuklearnih celic zdravih ljudi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, 78 str.

Lusis A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature*, 407, 9: 233-241

Mantuano E., Santi S., Filippi C., Manca-Rizza G., Paoletti S., Consani C., Giovannini L., Tramonti G., Carpi A., Panichi V. 2007. Simvastatin and fluvastatin reduce interleukin-6 and interleukin-8 lipopolysaccharide (LPS) stimulated production by isolated human monocytes from chronic kidney disease patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, 6: 360-365

Markelc Nered M., Prodan V. 2007. Trendi zdravstvenih kazalnikov SZO za Slovenijo. Inštitut za varovanje zdravja. Enota za zdravstveno statistiko.

McCarey D.W., Sattar N., McInnes I.B. 2005. Do the pleiotropic effects of statins in the vasculature predict a role in inflammatory diseases? *Arthritis Research & Therapy*, 7, 2: 55-61

Mori S., Jewett A., Cavalcanti M., Murakami-Mori K., Nakamura S., Bonavida B. 1998. Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin. *International Journal of Oncology*, 12, 5: 1165-1170.

Murphy K., Travers P., Walport M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. 7th edition, New York, Garland Science: 887 str.

- Musial J., Undas A., Gajewski P., Jankowski M., Sydor W., Szczeklik A. 2001. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *International Journal of Cardiology*, 77, 2-3: 247-253
- Nawawi H., Osman N.S., Yusoff K., Khalid B.A. 2003. Reduction in serum levels of adhesion molecules, interleukin-6 and C-reactive protein following short-term low-dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. *Hormone and Metabolic Research*, 35, 8: 479-485
- Pahan K. 2006. Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 10: 1165-1178
- Pahan K., Sheikh F.G., Namboodiri A.M.S., Singh I. 1997. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 11: 2671-2679
- Panichi V., Paoletti S., Mantuano E., Manca-Rizza G., Filippi C., Santi S., Taccola D., Donadio C., Tramonti G., Innocenti M., Casto G., Consani C., Sbragia G., Franzoni F., Galetta F., Panicucci E., Barsotti G. 2006. *In vivo* and *in vitro* effects of simvastatin on inflammatory markers in pre-dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21, 2: 337-344
- Poupart P., Vandenaabeele P., Cayphas S., Van Snick J., Haegeman G., Kruys V., Fiers W., Content J. 1987. B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN- β 2, HPGF). *The EMBO Journal*, 6, 5: 1219-1224
- Raetz C.R.H., Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 635-700

Riad A., Du J., Stiehl S., Westermann D., Mohr Z., Sobirey M., Doehner W., Adams V., Pauschinger M., Schultheiss H.P., Tschöpe C. 2007. Low-dose treatment with atorvastatin leads to anti-oxidative and anti-inflammatory effects in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*, 569, 3: 204-211

Repnik U. 2000. Razmerje citokinov Th1 in Th2 v primarnih kulturah humanih mononuklearnih celic. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, 80 str.

Rezaie-Majd A., Maca T., Bucek R.A., Valent P., Müller M.R., Husslein P., Kashanipour A., Minar E., Baghestanian M. 2002. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22, 7: 1194-1199

Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P., Hannekens C.H. 1998. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, 97, 5: 425-428

Ridker P.M., Rifai N., Pfeffer M.A., Sacks F., Braunwald E. 1999. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation*, 100, 3: 230-235

Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 6423: 801-809

Ross R. 1999. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, 340, 2: 115-126

Sacks F.M., Pfeffer M.A., Moye L.A., Rouleau J.L., Rutherford J.D., Cole T.G., Brown L., Arnold J.M.O., Wun C.C., Davis B.R., Braunwald E. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patient with average cholesterol levels. *The New England Journal of Medicine*, 335, 14: 1001-1009

- Schachter M. 2004. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 19, 1: 117-125
- Schönbeck U., Libby P. 2004. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: Statins as antiinflammatory agents? *Circulation*, 109, 21: II18-26
- Shovman O., Levy Y., Gilburd B., Shoenfeld Y. 2002. Antiinflammatory and immunomodulatory properties of statins. *Immunologic Research*, 25, 3: 271-285
- Simčič S., Wraber B., Sollner M., Urleb U., Gobec S. 2000. Modulation of tumor necrosis factor production with desmuramyldipeptide analogues. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 440, 7: r64-r66
- Skålén K., Gustafsson M., Rydberg E.K., Hultén L.M., Wiklund O., Innerarity T.L., Borén J. 2002. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417, 6890: 750-754
- Slater S.J., Kelly M.B., Taddeo F.J., Rubin E., Stubbs C.D. 1994. Evidence for discrete diacylglycerol and phorbol ester activator sites on protein kinase C. Differences in effects of 1-alkanol inhibition, activation by phosphatidylethanolamine and calcium chelation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 25: 17160-17165
- Sleasman J.W., Leon B.H., Aleixo L.F., Rojas M., Goodenow M.M. 1997. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 4, 6: 653-658
- Solheim S., Seljeflot I., Arnesen H., Eritsland J., Eikvar L. 2001. Reduced levels of TNF- α in hypercholesterolemic individuals after treatment with pravastatin for 8 weeks. *Atherosclerosis*, 157, 2: 411-415

Sparrow C.P., Burton C.A., Hernandez M., Mundt S., Hassing H., Patel S., Rosa R., Hermanowski-Vosatka A., Wang P., Zhang D., Peterson L., Detmers P.A., Chao Y., Wright S.D. 2001. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21,1: 115-121

Stanislaus R., Pahan K., Singh A.K., Singh I. 1999. Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin. *Neuroscience Letters*, 269, 2: 71-74

Sullivan K.E., Cutilli J., Piliero L.M., Ghavimi-Alagha D., Starr S.E., Campbell D.E., Douglas S.D. 2000. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 6: 920-924

Terry C.F., Loukaci V., Green F.R. 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 24: 18138-18144

Veillard N.R., Mach F. 2002. Statins: the new aspirin? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 11: 1771-1786

Vozelj M. 1996. *Imunologija. Enciklopedijski priročnik*. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 371 str.

Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 552 str.

Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M., Schulman L., Soreq H., Nir U., Wallach D., Perricaudet M., Tiollais P., Revel M. 1980. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: *In vitro* translation and *Escherichia coli* cloning studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 77, 12: 7152-7156

Weitz-Schmidt G. 2002. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 10: 482-487

West of Scotland Coronary Prevention Study Group. 1998. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*, 97, 15: 1440-1445

Wiklund O., Mattsson-Hultén L., Hurt-Camejo E., Oscarsson J. 2002. Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *Journal of Internal Medicine*, 251, 4: 338-347

Wraber B. 1994. Modulation of cytokine synthesis in human mononuclear cell cultures of different origin. *Zdravniški vestnik*, 63: 57-61

Wraber B. 1998. Citokini v kliniki - koristna informacija ali podatek odveč. *Medicinski razgledi*, 37: 39-46

Wraber B. 2007. Citokini v kliniki - novi pogledi. V: Merjenje imunosti od molekule do bolnika, enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine. Kranj, Kemomed: 46-52

Xu Z.M., Zhao S.P., Li Q.Z, Nie S., Zhou H.N. 2003. Atorvastatin reduces plasma MCP-1 in patients with acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta*, 338, 1-2: 17-24

Youssef S., Stüve O., Patarroyo J.C., Ruiz P.J., Radosevich J.L., Hur E.M., Bravo M., Mitchell D.J., Sobel R.A., Steinman L., Zamvil S.S. 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*, 420, 6911: 78-84

Žemva M. 1968. Laboratorijska hematologija. Ljubljana, DZS

ZAHVALA

Iskrena hvala somentorici, višji znan. sod. dr. Branki Wraber, ki me je od samega začetka vodila po poti do cilja. Hvala za veliko koristnih nasvetov tako pri praktičnem delu kot tudi pri pisanju in za strokoven pregled diplomske naloge.

Bojani Žiberna se zahvaljujem za prijetno uvajanje v laboratorijsko delo, za spodbudo in dobro voljo.

doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja se zahvaljujem za hiter, a vseeno natančen pregled diplomske naloge.

Hvala vsem na Inštitutu za patološko fiziologijo, ki so mi pomagali. Doc. dr. Tomažu Maršu, za koristne informacije o atorvastatinu in natančen pregled diplomske naloge. Katarini Pegan za pomoč pri izvedbi testa citotoksičnosti in Zvonki Frelj za raztapljanje atorvastatina, ko sem ga potrebovala.

Doc. dr. Andreju Blejcu se zahvaljujem pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Hvala prijateljem, sošolcem in znancem, ki so darovali kri in seveda Katji Sluga, ki je poskrbela, da so odvzemi krvi potekali brez posebnosti.

Jernej, hvala, ker si mi poskušal pomagati najti ravnovesje med delom in zabavo, čeprav si se bolj nagibal k slednji. Leta, ki sem jih preživela s teboj, Ksenijo, Ksenijo in Primožem, pa bodo ostala v najlepšem spominu.

Premalo lepih besed je za vas, ki ste mi ves čas stali ob strani, me podpirali in me imeli radi - ati, mami in Boris.

Jurij, presenetil si me s svojo vztrajnostjo in potrpežljivostjo, brez tebe bi najbrž trajalo še malo dlje. Hvala za vse čudovite trenutke, ki jih preživljam s teboj.

PRILOGE

Priloga A

VPRAŠALNIK ZA IZKLJUČITEV ALERGIJSKIH, AVTOIMUNSKIH IN KRONIČNIH VNETNIH BOLEZNI PRI OSEBAH, VKLJUČENIH V RAZISKAVO KOT ZDRAVA KONTROLA

Familiarna anamneza:

Vprašanja o alergijskih in avtoimunskih boleznih pri ožjih sorodnikih: starši, stari starši, tete, strici, brati in sestre, otroci.

Osebna anamneza:

Vprašanja o alergijskih in avtoimunskih boleznih v otroštvu, odraslem obdobju

Alergijske bolezni:

- Astma
- Alergijski rinitis
- Konjunktivitis
- Faringitis, laringitis
- Atopijski dermatitis
- Kontaktni dermatitis
- Urtikarija, angioedem
- Anafilaksija
- Oralni alergijski sindrom (alergijsko vnetje v ustni sluznici)
- Gastrointestinalna alergija (diareja, napenjanje, krči) za kazein, jajca, jabolka, breskve, lešnike, arašide, sojo, morske sadeže
- Alergija za pike insektov

Avtoimunske in kronične vnetne bolezni:

- Diabetes tip 1
- Hashimoto tiroiditis
- Addisonova bolezen

- Revmatoidni artritis
- SLE in druge bolezni vezivnega tkiva

- Akutni alergijski tubulointersticijski nefritis
- Tubulointersticijski nefritis, povzročen z imunskimi kompleksi
- MCGN tip II

- Kronični atrofični gastritis
- Celiakija
- Ulcerozni kolitis, Mb. Crohn
- Hepatitis B
- Primarna biliarna ciroza

- Alergijski alveolitis
- Pljučna fibroza

- Pemfigus
- Alergijski vaskulitis
- Eritema nodosum
- Poliarteritis nodosa
- Dermatitis herpetiformis

- Episkleritis
- Uveitis

- Hematološke avtoimune bolezni

- Nevrološke bolezni: multipla skleroza, Miastenia gravis, Guillan Barrejev sindrom