

**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
WYDZIAŁ LEKARSKI**

**Alicja Włoch**

**Miażdżyca tętnic szyjnych  
a stężenie endogennego inhibitora syntezy tlenu azotu we krwi chorych  
z reumatoidalnym zapaleniem stawów**

**P R A C A D O K T O R S K A**

**Promotor: dr hab. med. Andrzej Surdacki**

**Pracę wykonano  
w II Klinice Kardiologii Instytutu Kardiologii  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Jacek S. Dubiel**

*oraz*

**w Oddziale Reumatologii  
Małopolskiego Centrum Reumatologii, Immunologii i Rehabilitacji  
Szpitala Specjalistycznego im. Józefa Dietla w Krakowie  
Ordynator Oddziału: lek. med. Jolanta Bucka**

**Kraków 2007  
SPIS TREŚCI**

<b>WYJAŚNIENIE STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b>	<b>4</b>
<b>1. WPROWADZENIE</b>	<b>6</b>
1.1. RZS jako przewlekła choroba zapalna stawów	6
1.1.1. Etiologia i patogenezę RZS	6
1.1.2. Kryteria rozpoznania RZS	10
1.1.3. Wskaźniki aktywności i zaawansowania RZS	11
1.1.4. Objawy pozastawowe i powikłania RZS	13
1.1.5. Leczenie RZS	14
1.2. RZS a rozwój miażdżycy	16
1.2.1. Przyspieszony rozwój miażdżycy w RZS	16
1.2.2. RZS a tradycyjne czynniki ryzyka miażdżycy – nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, stężenie cholesterolu	16
1.2.3. Podwyższony poziom homocysteiny, dyslipidemia aterogenna i oporność metaboliczna na insulinę – konsekwencje wzmożonej aktywności zapalnej w RZS	17
1.2.4. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jako przyczyna przyspieszonego rozwoju miażdżycy w RZS	19
1.2.5. Zaburzenia hemostazy w RZS a rozwój miażdżycy	22
<b>2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY</b>	<b>23</b>
2.1. Znaczenie kliniczne liczebności krążących prekursorów komórek śródbłonna naczyniowego i stężenia we krwi endogennego inhibitora generacji tlenku azotu	23
2.2. Hipotezy badawcze	24
<b>3. METODYKA</b>	<b>25</b>
3.1. Grupa badana – chorzy z RZS	25
3.2. Grupa kontrolna zdrowych osób	25
3.3. Kryteria wyłączenia z badania – wspólne dla grupy badanej i grupy kontrolnej	26
3.4. Zakres badań	27
3.4.1. Oznaczenie liczebności EPC we krwi	27
3.4.2. Oznaczenie poziomu L-argininy i jej metylowanych pochodnych	27
3.4.3. Pozostałe analizy biochemiczne	28
3.4.4. Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych wspólnych	28
3.5. Analiza statystyczna	29
<b>4. WYNIKI</b>	<b>31</b>

4.1.	Porównania między grupą kontrolną (C) a pacjentami z RZS	31
4.1.1.	Dane demograficzne, kliniczne i parametry biochemiczne	31
4.1.2.	IMT, liczebność EPC oraz stężenie L-argininy, ADMA i SDMA	32
4.2.	Porównania między grupą kontrolną (C) a chorymi z RZS z uwzględnieniem obecności (RZS/A) bądź braku (RZS/B) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych	34
4.2.1.	Dane demograficzne, kliniczne i parametry biochemiczne	34
4.2.2.	IMT, liczebność EPC oraz stężenie L-argininy, ADMA i SDMA	36
4.3.	Analiza korelacyjna zmiennych powiązanych z IMT i liczebnością EPC	38
4.3.1.	Analiza jednoczynnikowa	38
4.3.2.	Analiza wieloczynnikowa	40
<b>5.</b>	<b>DYSKUSJA</b>	<b>42</b>
5.1.	Zagadnienia metodologiczne	42
5.2.	Podwyższenie poziomu ADMA w osoczu krwi chorych z RZS	43
5.3.	ADMA a aktywność szlaku syntezy NO i rozwój miażdżycy	45
5.4.	Związek podwyższonego stężenia ADMA z obniżeniem liczebności EPC we krwi chorych z RZS	46
5.5.	Związek podwyższenia ilorazu ADMA/L-arginina oraz obniżonej liczebności EPC z wykładnikami procesu miażdżycowego u chorych z RZS	48
5.6.	Konsekwencje kliniczne zaobserwowanych zależności	53
<b>6.</b>	<b>WNIOSKI</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>STRESZCZENIE</b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>PIŚMIENNICTWO</b>	<b>60</b>

## WYJAŚNIENIE STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<b>ADMA</b>	- <i>asymmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine</i> - asymetryczna N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -dwumetylo-L-arginina
<b>C</b>	- grupa kontrolna zdrowych osób
<b>CRP</b>	- <i>C-reactive protein</i> - białko C-reaktywne
<b>DAS<sub>28</sub></b>	- <i>disease activity score</i> - wskaźnik aktywności RZS
<b>DDAH</b>	- <i>N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase</i> - dwumetyloaminohydrolaza N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -dwumetylo-L-argininy
<b>DMARDs</b>	- <i>disease-modifying antirheumatic drugs</i> - leki modyfikujące przebieg choroby
<b>ELISA</b>	- <i>enzyme-linked immunoadsorbent assay</i> - metoda immunoenzymatyczna
<b>EPC</b>	- <i>endothelial progenitor cells</i> - prekursorzy komórek śródbłonka naczyniowego
<b>FITC</b>	- <i>fluorescein isothiocyanate</i> - izotiocyjanian fluoresceiny
<b>GM-CSF</b>	- <i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i> – czynnik stymulujący tworzenie kolonii komórkowych granulocytów i monocytów
<b>HLA</b>	- <i>human leukocyte antigens</i> - ludzkie antygeny leukocytarne
<b>KKr</b>	- klirens endogennej kreatyniny
<b>HDL</b>	- <i>high density lipoproteins</i> - lipoproteiny o dużej gęstości
<b>IMT</b>	- <i>intima-media complex thickness</i> - grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic
<b>KDR</b>	- <i>kinase insert domain receptor</i> - receptor typu 2 dla VEGF
<b>LDL</b>	- <i>low density lipoproteins</i> - lipoproteiny o małej gęstości
<b>MCP</b>	- <i>metacarpophalangeal joint</i> - staw śródrečno-paliczkowy
<b>MCP-1</b>	- <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> , chemokina uczestnicząca w adhezji monocytów do śródbłonka naczyniowego
<b>MHC</b>	- <i>major histocompatibility complex</i> - główny układ zgodności tkankowej
<b>MTP</b>	- <i>metatarsophalangeal joint</i> - staw śródstopno-palcowy
<b>NO</b>	- <i>nitric oxide</i> - tlenek azotu
<b>PE</b>	- <i>phycoerythrin</i> – fikoerytryna
<b>PIP</b>	- <i>proximal interphalangeal joint</i> - staw międzypaliczkowy bliższy
<b>PRMT</b>	- <i>protein arginine N-methyltransferases</i> - N-metylotransferazy katalizujące metylację reszt L-argininy wchodzących w skład białek

<b>RR</b>	- ciśnienie tętnicze krwi
<b>RZS</b>	- reumatoidalne zapalenie stawów
<b>RZS/A</b>	- chorzy z RZS z blaszkami miażdżycowymi w tętnicach szyjnych wspólnych
<b>RZS/B</b>	- chorzy z RZS bez blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych wspólnych
<b>SDMA</b>	- <i>symmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine</i> - symetryczna N <sup>G</sup> ,N <sup>G</sup> -dwumetylo-L-arginina
<b>SEM</b>	- <i>standard error of the mean</i> - błąd standardowy średniej
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	- <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> - czynnik martwicy nowotworu $\alpha$
<b>VEGF</b>	- <i>vascular endothelial growth factor</i> - śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń

## 1. WPROWADZENIE

### 1.1. RZS jako przewlekła choroba zapalna stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą i postępującą chorobą stawów, której częstość szacuje się na ok. 0.8–1 % populacji. RZS występuje 3-krotnie częściej u kobiet niż u mężczyzn, zaś u ok. 80 % pacjentów schorzenie rozpoczyna się między 35 a 50 r.ż. Proces zapalny obejmuje stawy, ale może też przebiegać w tzw. postaci układowej obejmującej narządy wewnętrzne. Zapalenie toczy się w błonie maziowej stawów doprowadzając do zniszczenia struktur stawowych. W postaci typowej choroba obejmuje symetrycznie stawy drobne rąk i stóp, ale nietypowo może rozpoczynać się od zajęcia dużych stawów np. kolanowych.

Ze względu na możliwość występowania ogólnoustrojowych zmian narządowych RZS zaliczane jest do układowych chorób tkanki łącznej. Proces toczy się wiele lat doprowadzając do deformacji stawów i niepełnosprawności, a także powikłań układowych. W wyniku obecności RZS spodziewany czas trwania życia skraca się średnio o 2–7 lat. Za zwiększoną umieralność odpowiedzialne są przede wszystkim choroby układu sercowo-naczyniowego (zwłaszcza przyspieszony rozwój miażdżycy), a także infekcje, powikłania choroby i krwawienia z przewodu pokarmowego. Do podwyższonej śmiertelności może przyczyniać się także farmakoterapia, co rozwinięto w podrozdziale 1.1.4 niniejszego opracowania.

#### 1.1.1. Etiologia i patogeneza RZS

RZS to choroba o nieznannej etiologii. Czynnikiem inicjującym proces zapalny jest niezidentyfikowany antygen u osób predysponowanych genetycznie. Do zachorowania usposabiają: płeć żeńska, starszy wiek, dodatni wywiad rodzinny i nałóg palenia tytoniu. Dowodem predyspozycji genetycznej jest skojarzenie występowania choroby z niektórymi allelami kodującymi antygeny leukocytarne (HLA, *human leukocyte antigens*) należące do głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*) klasy II. Stwierdzono, że allele związane z obecnością RZS kodują identyczne lub bardzo podobne sekwencje aminokwasów w tzw. trzecim hiperzmiennym obszarze łańcucha  $\beta$  cząsteczki HLA-DR niezależnie od tego, czy sekwencja ta występuje w obrębie cząsteczki HLA-DR1, HLA-DR4 czy HLA-Dw16. Jest to określane jako teoria wspólnego epitopu (*shared epitope*).

Układ MHC klasy II bierze udział w prezentacji antygenów przez makrofagi, czym uruchamia reakcję immunologiczną zależną od pomocniczych limfocytów T posiadających na powierzchni cząsteczkę CD4 (limfocyty T CD4+). W procesie aktywacji limfocytów T CD4+ istotną rolę odgrywa także połączenie limfocytarnej molekuly powierzchniowej CD28 z jej ligandem (B7) (tzw. kostymulacja limfocytów T); w przypadku braku w/wym. interakcji limfocyty stają się anergiczne i ulegają apoptozie. Zaktywowane w ten sposób pomocnicze limfocyty T CD4+ produkują interferon  $\gamma$ , interleukiny 2, 6, 17, czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*). Interferon  $\gamma$ , interleukina 17 oraz bezpośrednie interakcje komórkowe (częściowo zależne od CD69, tzw. antygeny wczesnego pobudzenia) stymulują monocyty, makrofagi i fibroblasty błony maziowej stawów do generacji interleukin 1 i 6 oraz TNF $\alpha$ . Poza tym interferon  $\gamma$  wzmacnia ekspresję cząsteczek należących do układu MHC klasy II w komórkach prezentujących antygen, a także ekspresję molekuł adhezyjnych przez śródbłonek. Interleukina 2 stymuluje proliferację limfocytów T, natomiast interleukina 6 jest cytokiną, której efekty biologiczne nie są ograniczone jedynie do regulacji procesów immunologicznych (jak proliferacja i aktywacja limfocytów T synergistycznie z interleukiną 1 i mitogenami oraz wpływ na dojrzewanie limfocytów B), ale także uruchamia ogólnoustrojową reakcję zapalną (w tym produkcję białek ostrej fazy, do których należy białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), a także stymuluje proliferację fibroblastów *synovium*. TNF $\alpha$  i interleukina 1 są odpowiedzialne za zwiększoną syntezę metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej przez makrofagi, monocyty, fibroblasty, komórki wyściółkowe maziówki stawowej, osteoklasty i chondrocyty; ponadto hamują produkcję inhibitorów metaloproteinaz przez fibroblasty. Limfocyty T drogą kontaktowych interakcji komórkowych stymulują także limfocyty B do generacji immunoglobulin o charakterze poliklonalnym, a także czynnika reumatoidalnego – przeciwciała reagującego z fragmentem Fc immunoglobuliny klasy G. Rola czynnika reumatoidalnego w patogenezie RZS nie jest jednoznacznie wyjaśniona; może on brać pewien udział w aktywacji układu dopełniacza przez kompleksy immunologiczne. W maziówce reumatoidalnej obok pomocniczych limfocytów T CD4+ (dominujących nad cytotoksycznymi limfocytami T CD8+) i makrofagów obecne są także limfocyty B (w tym niektóre dojrzewające do stadium plazmocytów) oraz komórki dendrytyczne pełniące rolę komórek prezentujących antygen. Ponadto dochodzi do wzmożonego różnicowania makrofagów w kierunku osteoklastów w wyniku ekspresji RANK (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*) pod wpływem TNF $\alpha$  i interleukiny 1 oraz jego interakcji z odpowiednim ligandem na komórkach zębów i limfocytach T.

Należy podkreślić zasadniczą rolę TNF $\alpha$  (produkowanego głównie przez monocyty i makrofagi, ale także limfocyty T, B i fibroblasty) w mechanizmie zapalenia, gdyż mediator ten działa na drodze zarówno autokrynej, jak i parakrynej wzmagając generację interleukin 1, 6 i 8 oraz GM-CSF, a także stymuluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych przez proliferujące fibroblasty maziówki stawowej. Obecność mediatorów, których źródłem są zaktywowane makrofagi, limfocyty i fibroblasty, nasila syntezę i ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna oraz generację przez nie chemokin, co przyciąga kolejne leukocyty z krwi obwodowej do ogniska zapalnego. Szczególną rolę odgrywa w tym procesie interakcja między CD40 (obecną na powierzchni monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych, a także komórek śródbłonna) a jej ligandem (CD154) pojawiającym się na zaktywowanych limfocytach T CD4<sup>+</sup> (oraz komórkach śródbłonna, monocytach, makrofagach i fibroblastach ekspozowanych na cytokiny prozapalne), gdyż interakcja CD40–CD154 na poziomie *endothelium* ułatwia przechodzenie leukocytów z krwi do ogniska zapalenia (Monaco i wsp., 2002; Wagner i wsp., 2004). Ekspresję cząsteczek adhezyjnych przez śródbłonek stymuluje także interleukina 1 i interferon  $\gamma$ . Poza tym interleukina 8 (głównie produkowana przez monocyty i makrofagi) stanowi czynnik chemotaktyczny dla limfocytów oraz ułatwia interakcje leukocyty–śródbłonek. Ligandem dla cząsteczek adhezyjnych są leukocytarne integryny, co utrwała stan zapalny w obrębie stawu. Ponadto wzrost ekspresji molekuł adhezyjnych pod wpływem mediatorów zapalenia ma miejsce również w zakresie proliferujących komórek wyściółkowych maziówki stawowej, co ułatwia przechodzenie komórek do płynu stawowego.

Maziówka stawów objętych zapaleniem wykazuje wzmożenie procesów tworzenia nowych naczyń, co jest wtórne do zapalenia, gdyż niektóre cytokiny (np. interleukina 8) i molekuly adhezyjne stymulują angiogenezę (Walsh, 1999; Middleton i wsp., 2004). Ponadto miejscowe obniżenie ciśnienia parcjalnego tlenu jest silnym czynnikiem zwiększającym generację śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (Ballara i wsp., 2001). Pewne znaczenie w procesie angiogenezy przypisuje się też wcześniej wspomnianej interakcji CD40–CD154, co ma stymulować produkcję VEGF (Monaco i wsp., 2004). Ostatnio pojawiły się doniesienia o roli VEGF w rekrutacji z krwi obwodowej pochodzących ze szpiku kostnego tzw. krążących prekursorów komórek śródbłonna naczyniowego (EPC, *endothelial progenitor cells*), które mogą uczestniczyć w procesie powstawania nowych naczyń w objętej zapaleniem maziówce stawowej (Ruger i wsp., 2004; Paleolog, 2005). Zagadnienia te zostały szerzej rozwinięte w dalszych częściach niniejszej rozprawy.



Wyżej przedstawione procesy zależne od specyficznej aktywacji limfocytów T CD4+ powodują, że obecny na początku schorzenia nieswoisty proces zapalny stawu rozszerza się i utrwała. W dalszym ciągu następuje aktywacja limfocytów B z produkcją poliklonalnych przeciwciał i czynnika reumatoidalnego. Następnie występujące w wyniku tych procesów uszkodzenie tkanek powoduje ekspozycję autoantygenów i dalszą – już także nieswoistą – aktywację limfocytów T. Pobudzone przez mediatory zapalenia komórki wyściółkowe maziówki stawowej oraz fibroblasty proliferują i uczestniczą (obok makrofagów, monocytów, osteoklastów i chondrocytów) w generacji enzymów proteolitycznych, a następnie zyskują autonomię od stymulacji przez układ immunologiczny i podtrzymują procesy destrukcji stawu.

Nie jest znany antygen, który uruchamia powyższą kaskadę zdarzeń. Wysuwane są hipotezy o roli niezidentyfikowanego zakażenia wirusowego (np. wirus Epsteina-Barra). Sugeruje się także, że pewne drobnoustroje bądź ich produkty mogą inicjować zapalenie przez ułatwianie ekspozycji determinant antygenowych białek w obrębie błony maziowej, co może uruchamiać odpowiedź immunologiczną. Alternatywną koncepcją jest krzyżowa reakcja immunologiczna na antygeny pochodzące z bakterii Gram-ujemnych i własne białka u osób predysponowanych genetycznie.

W związku ze stwierdzaną w ostatnich latach wysoką specyficznością przeciwciał przeciwko cytrulinowanym polipeptydom w diagnostyce RZS, uważa się, że mogą one odgrywać rolę w patogenezie choroby. Co więcej, przeciwciała te – o ile są obecne (u 50–70 % pacjentów) – wyprzedzają o wiele lat pojawienie się objawów RZS, zaś występują jedynie u 1–2 % zdrowej populacji. W maziówce reumatoidalnej stwierdza się cytrulinowane białka (m.in. włóknik) tak w przestrzeni pozakomórkowej, jak i w cytoplazmie komórek o morfologii makrofagów i fibroblastów (Masson-Bessiere i wsp., 2001). W związku z powyższym wysunięto koncepcję (Klareskog i wsp., 2006b), że u osób predysponowanych (obecność *shared epitope*) w pierwszym etapie dochodzi do wytworzenia w/wym. przeciwciał po ekspozycji na czynniki egzogenne (np. palenie tytoniu) sprzyjające enzymatycznej konwersji do cytruliny reszt argininy wchodzących w skład białek. Wiadomo, że cząsteczki układu MHC klasy II u osób z allelami predysponującymi do RZS (obecność *shared epitope*) mają taką konformację przestrzenną, iż przekształcenie reszt argininy do cytruliny ok. 100-krotnie zwiększa powinowactwo białka do w/wym. cząsteczek, co uruchamia proces prezentacji antygeny limfocytom T CD4+, a tym samym łańcuch zdarzeń wiodących do generacji przeciwciał przeciwko cytrulinowanym białkom (Hill i wsp., 2004). Jednakże do wystąpienia RZS niezbędne jest dołączenie się dodatkowego czynnika (może nim być np. uraz bądź infekcja powodujące miejscowy odczyn zapalny i wzmożone powstawanie cytrulinowanych

białek w obrębie stawu), który w obecności obecnych już wcześniej przeciwciał przeciwko cytrulinowanym polipeptydom wywołuje objawy choroby. Powyższa koncepcja, jakkolwiek bardzo interesująca, wymaga jednakże dalszych badań.

(na podstawie: Haynes & Fauci, 1998; Lipsky, 1998; Choy & Panayi, 2001; Löwenhoff & Głuszko, 2005; Klareskog i wsp., 2006a)

### 1.1.2. Kryteria rozpoznania RZS

Według Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (*American College of Rheumatology*; poprzednio *American Rheumatism Association*) rozpoznanie RZS ustala się w oparciu o spełnienie co najmniej 4 spośród 7 kryteriów diagnostycznych, przy czym kryteria 1–4 winne utrzymywać się przez nie krócej niż 6 tygodni, zaś kryteria 2–5 muszą być potwierdzone przez lekarza. Należy podkreślać, że w pewnych szczególnych przypadkach nawet spełnienie jedynie 2 lub 3 kryteriów nie pozwala na jednoznaczne wykluczenie RZS.

Listę kryteriów diagnostycznych tworzą następujące objawy:

1. Sztywność poranna w stawach i wokół stawów, utrzymująca się co najmniej 1 godzinę do wystąpienia znacznej poprawy;
2. Zapalenie 3 lub więcej stawów (jednoczasowy obrzęk lub wysięk stawowy; obecność tylko pogrubienia kości nie spełnia kryterium); uwzględnia się (po każdej ze stron ciała) stawy:
  - międzypaliczkowe bliższe (PIP, *proximal interphalangeal joint*)
  - śródrečno-paliczkowe (MCP, *metacarpophalangeal joint*)
  - nadgarstkowe
  - łokciowe
  - kolanowe
  - skokowe
  - śródstopno-palcowe (MTP, *metatarsophalangeal joint*).
3. Zapalenie stawów ręki (zapalenie co najmniej jednego ze stawów: nadgarstkowego, MCP, PIP).
4. Symetryczne zapalenie stawów (jednoczasowość i jednoimiennosc obustronnych zmian zapalnych). Obustronne zapalenie MCP, PIP i MTP spełnia kryterium bez konieczności zachowania absolutnej symetryczności.
5. Guzki reumatoidalne: guzki podskórne nad wyniosłościami kostnymi, powierzchniami wyprostnymi lub w okolicach stawów.

6. Obecność czynnika reumatoidalnego w surowicy (oceniana za pomocą metod, dla których odsetek wyników fałszywie dodatnich w grupie ludzi zdrowych nie przekracza 5 %).
7. Zmiany radiologiczne (nadżerki i osteoporoza okołostawowa na przednio-tylnych radiogramach ręki i nadgarstka). Obecność jedynie osteoporozy nie spełnia kryterium.

Czynnik reumatoidalny (obecny we wczesnej fazie choroby u ponad 2/3 pacjentów) w codziennej praktyce lekarskiej oznacza się przy pomocy odczynu Waalera-Rosego. Za wartość graniczną miano uważa się 1 : 160. Dodatkowo miano czynnika reumatoidalnego może wystąpić w starszym wieku (do 10–20 % po 65-tym r.ż.), a także u 5 % ludzi zdrowych, zwłaszcza u krewnych chorych na RZS, co ma pewną wartość prognostyczną. Niekiedy przejściowo pojawia się po transfuzji lub szczepieniu. Ponadto czynnik reumatoidalny może towarzyszyć innym schorzeniom, jak toczeń rumieniowaty układowy, zespół Sjögrena, wirusowe zapalenie wątroby typu B, przewlekłe schorzenia wątroby, śródmiąższowe włóknienie płuc, podostre zapalenie wsierdza, gruźlica, kiła, sarkoidoza, mononukleozę zakaźną, niektóre choroby tropikalne, jak leiszmanioza, schistosomatoza, malaria, trąd.

W ostatnich latach wprowadzono do diagnostyki RZS oznaczenie przeciwciał przeciwko cytrulinowanym polipeptydom. Obecność w/wym. przeciwciał ma mniejszą czułość (50–65%) w porównaniu do oznaczenia czynnika reumatoidalnego, jednakże wyraźnie wyższą specyficzność (90–98%).

(na podstawie: na podstawie: Lipsky, 1998; Dell, 2004; Rindfleisch & Muller, 2005)

### **1.1.3. Wskaźniki aktywności i zaawansowania RZS**

Aktywność procesu zapalnego znajduje odzwierciedlenie w badaniach laboratoryjnych. Stwierdza się przyspieszone opadanie krwinek czerwonych, podwyższone stężenie białek ostrej fazy (w tym CRP, ceruloplazminy i fibrynogenu), zwiększenie liczby płytek krwi oraz często niedokrwistość normocytową z powodu nieefektywnej erytropoezy. Może wystąpić niewielka leukocytoza, czasem leukopenia (wyraźna w zespole Felty'ego). Eozynofilia może pojawiać się w układowej postaci schorzenia. Wysokie miano czynnika reumatoidalnego ma znaczenie prognostyczne; pojawia się zwykle w RZS o cięższym przebiegu i szybciej postępującym; częściej pojawiają się wówczas objawy pozastawowe. Płyn stawowy jest mętny, o zwiększonej zawartości białka i prawidłowym lub obniżonym stężeniu glukozy; ilość krwinek białych waha się zwykle w przedziale 5 000–25 000/ $\mu$ l; zwykle z przewagą (> 75 %) leukocytów wielojądrowych.

Dla oceny aktywności RZS opracowano wskaźnik aktywności choroby (DAS<sub>28</sub>, *Disease Activity Score*), który ocenia wyłącznie aktualne nasilenie choroby. Bierze się pod uwagę 28 stawów: stawy międzypaliczkowe bliższe, śródrečno-palcowe, stawy nadgarstka, łokciowe, barkowe i kolanowe po obu stronach. Pomiar uwzględnia bolesność uciskową i obrzęk każdego z w/wym. stawów. Pomiar 28 stawów jest szybką i łatwą do zastosowania metodą, która jest równoważna bardziej szczegółowym pomiarom stawów. Ponadto wyznaczenie DAS<sub>28</sub> wymaga pomiaru szybkości opadania krwinek czerwonych i oceny stanu ogólnego chorego (Prevo i wsp., 1995). Wartość DAS<sub>28</sub> przekraczająca 5.1 oznacza wysoką aktywność choroby, przedział 3.2–5.1 aktywność umiarkowaną, natomiast DAS<sub>28</sub> < 3.2 aktywność niską. Wskaźnik DAS<sub>28</sub> służy również do monitorowania leczenia. Wzrost wartości DAS<sub>28</sub> o  $\geq 1.2$  w stosunku do wartości wyjściowej oznacza wyraźną poprawę, wzrost o 0.6–1.2 określa się mianem poprawy umiarkowanej, w pozostałych przypadkach mamy do czynienia z brakiem poprawy.

Zdjęcia radiologiczne objętych procesem zapalnym stawów umożliwiają wgląd w zaawansowanie stopnia destrukcji stawu odzwierciedlające nasilenie choroby w przeszłości. W związku z tym w początkowym okresie RZS stwierdza się jedynie obrzęk tkanek miękkich okołostawowych i osteoporozę okołostawową. Ziarnina zapalna rozrastająca się w obrębie błony maziowej i w przestrzeniach międzybeleczkowych kości gąbczastej nasad powoduje destrukcję chrząstki i kości objawiającą się zwężeniem szpary stawowej, geodami zapalnymi, nadżerkami i podwichnięciami stawów. Zniszczenie struktur stawowych, włóknienie, kostnienie i przykurcze powodują trwałe deformacje stawów i stają się przyczyną inwalidztwa.

Klinicznie wyróżnia się trzy typy choroby: a. typ 1 tzw. samoograniczający się o łagodnym przebiegu; b. typ 2 z niewielką progresją choroby; c. typ 3 z szybką progresją charakteryzujący się wysokim mianem czynnika reumatoidalnego od początku choroby. Chorzy ci źle odpowiadają na leczenie tradycyjnymi lekami modyfikującymi przebieg choroby (DMARDs, *disease-modifying antirheumatic drugs*). Dochodzi do stałej progresji zmian, postępującej destrukcji stawów i szybkiego inwalidztwa.

(na podstawie: Prevo i wsp., 1995; Lipsky, 1998; Rindfleisch & Muller, 2005)

#### **1.1.4. Objawy pozastawowe i powikłania RZS**

Objawy pozastawowe pojawiają się częściej u chorych z wysokim mianem czynnika reumatoidalnego.

Guzki reumatoidalne stwierdza się u 25–30 % pacjentów; są to guzki podskórne obecne zwykle nad wyniosłościami kostnymi, powierzchniami wyprostnymi lub w okolicach okołostawowych. Mogą jednak także występować w narządach wewnętrznych praktycznie w każdej lokalizacji. Obszar centralny guzka zajmuje strefa martwicy, którą otaczają makrofagi, a na obwodzie tkanka ziarninowa.

Reumatoidalne zapalenie naczyń może objąć każdy obszar ustroju; w przypadku skóry objawia się wybroczynami i drobnymi zmianami martwiczymi na opuszkach palców rąk i łóżyskach paznokci. Następstwem zapalenia naczyń w obrębie obwodowego układu nerwowego jest najczęściej mieszana polineuropatia. Objawy neurologiczne w RZS mogą wynikać nie tylko z zapalenia naczyń, ale także bezpośrednio z uszkodzenia stawów kręgosłupa szyjnego z podwichnięciem stawu szczytowo-obrotowego lub z objawów uciskowych (zespół cieśni nadgarstka). Reumatoidalne zapalenie naczyń może być odpowiedzialne za niedokrwienie narządów wewnętrznych prowadzące do zawałów, w tym zawału serca. Objawem stosunkowo rzadko spotykanego zapalenia naczyń w obrębie nerek jest m.in. białkomocz, który należy różnicować z białkomoczem w przebiegu wtórnej amyloidozy.

Powikłania płucne obejmują zapalenie opłucnej, śródmiąższowe włóknienie płuc, zapalenie płuc, zapalenie tętnic a także obecność guzków reumatoidalnych. U chorych z pylicą płuc mnogie guzki reumatoidalne mogą prowadzić do masywnych zwłóknień, co określa się mianem zespołu Caplana. Zapalenie stawu pierścienno-nalewkowego może być przyczyną niedrożności górnych róg oddechowych.

Powikłania w zakresie serca to najczęściej przebiegające bezobjawowo wysiękowe zapalenia osierdzia (u ok. 1/3 chorych) (rzadko dochodzi do tamponady serca, nieco częściej do zaciskającego zapalenia osierdzia), mogą także, jakkolwiek bardzo rzadko, wystąpić bloki przedsionkowo-komorowe oraz zapalenie mięśnia serca. Zawał serca może wynikać z reumatoidalnego zapalenia naczyń, a także przyspieszonego rozwoju miażdżycy. To ostatnie zagadnienie zostało szerzej rozwinięte w podrozdziale 1.2 niniejszej rozprawy.

Objawy oczne (pojawiające się u < 1 % chorych) mogą przybierać postać zwykle łagodnego i przejściowego zapalenia nadtwardówki bądź zapalenia twardówki o cięższym przebiegu. U 15–20 % pacjentów z RZS może wystąpić zespół Sjögrena.

Zespół Felty'ego obejmuje splenomegalię i neutropenię (czasem także niedokrwistość i małopłytkowość) u chorych z długo trwającym RZS.

RZS o wieloletnim przebiegu, zwłaszcza o znacznej aktywności procesu zapalnego może spowodować wtórną amyloidozę.

Niektóre ze stanów uważanych za powikłanie RZS mogą wynikać przynajmniej częściowo z objawów ubocznych stosowanych leków. Ma to miejsce w przypadku skłonności do infekcji (leki immunosupresyjne i glukokortykoidy), zwiększonej częstości chłoniaków, białaczek i guzów litych (leki immunosupresyjne), osteoporozy (glukokortykoidy) oraz owrzodzeń i krwawień z przewodu pokarmowego (niesteroidowe leki przeciwzapalne i glukokortykoidy).

(na podstawie: Lipsky, 1998; Rindfleisch & Muller, 2005)

### 1.1.5. Leczenie RZS

Terapia RZS ma na celu walkę z bólem, zmniejszenie odczynu zapalnego w obrębie stawów i ochronę ich funkcji oraz kontrolę zajęcia innych układów ustroju. W tym celu stosuje się leki przeciwbólowe, przeciwzapalne (niesteroidowe leki przeciwzapalne i glukokortykoidy) oraz leki modyfikujące przebieg choroby (DMARDs, *disease-modifying antirheumatic drugs*). Niesteroidowe leki przeciwzapalne należy podawać w najmniejszej dawce zapewniającej kontrolę objawów, przy czym powinny one zostać wycofane po wystąpieniu remisji po DMARDs. Należy podkreślić, że niesteroidowe leki przeciwzapalne nie wpływają na postęp zmian stawowych, zaś glukokortykoidy (zarówno podawane doustnie, jak i w postaci iniekcji dostawowych – nie częściej niż 3-krotnie w ciągu roku) mają znaczenie jedynie w postępowaniu objawowym. Według obowiązujących wytycznych, DMARDs winne być wdrożone jak najwcześniej, nie później niż 3 miesiące po wystąpieniu objawów. Utrzymuje się miejsce glukokortykoidów w szczególnej sytuacji klinicznej, gdy niesteroidowe leki przeciwzapalne nie zapewniają adekwatnego złagodzenia objawów, zaś korzystny efekt DMARDs jeszcze nie zdążył się ujawnić.

Do DMARDs zaliczane są m.in. leki immunosupresyjne, wśród nich najczęściej obecnie stosowany metotreksat, antagonistą kwasu foliowego. Podaje się go w dawce 7.5–25 mg jeden raz w tygodniu. Alternatywą dla metotreksatu w monoterapii stanowi leflunomid, którego aktywny metabolit hamuje biosyntezę nukleotydów pirymidynowych. Do innych leków immunosupresyjnych stosowanych w leczeniu RZS należą: azatiopryna, cyklofosfamid (podawany głównie w przypadku reumatoidalnego zapalenia naczyń lub amyloidozy wikłających RZS), cyklosporyna. Stosowane obecnie już coraz rzadziej leki z grupy DMARDs to: sole złota, sulfasalazyna, D-penicylamina, leki przeciwmalaryczne (chlorochina, hydroksychlorochina). Znaczący postęp w terapii RZS nastąpił po wprowadzeniu leków biologicznych, antycytokinowych. Do tej grupy zalicza się antagonistów TNF $\alpha$  (infliximab,

etanercept, adalimumab), przeciwciało przeciwko biorącej udział w aktywacji limfocytów B CD20 (rituximab), jak również anakinra – antagonistą receptora dla interleukiny 1. W trakcie badań jest alefacept – białko blokujące aktywację limfocytów T.

(na podstawie: Lipsky, 1998; Dell, 2004; Rindfleisch & Muller, 2005)

## **1.2. RZS a rozwój miażdżycy**

### **1.2.1. Przyspieszony rozwój miażdżycy w RZS**

W RZS stwierdza się zwiększenie ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych wynikające głównie z przyspieszonego rozwoju miażdżycy. W porównaniu z osobami bez RZS zarówno podwyższona śmiertelność, jak i przedwczesny rozwój miażdżycy u tych chorych są jedynie częściowo tłumaczone przez tradycyjne czynniki ryzyka (Prior i wsp., 1984; Myllykangas-Lousujarvi i wsp., 1995; Wallberg-Jonsson i wsp., 1997; del Rincon i wsp., 2001; van Doornum i wsp., 2002; Solomon i wsp., 2003; Löwenhoff & Głuszko, 2005; Maradit-Kremers i wsp., 2005ab; Sodergren i wsp., 2007). Wolfe i wsp. (2003) obserwowali zwiększony odsetek występowania zawału i niewydolności serca u 9 093 pacjentów z RZS w porównaniu do 2 479 chorych z chorobą zwyrodnieniową stawów również po uwzględnieniu różnic w charakterystyce obu grup w analizie wieloczynnikowej. W RZS stwierdza się zwiększoną grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych (IMT, *intima-media complex thickness*), co stanowi wykładnik przyspieszonego rozwoju miażdżycy na etapie poprzedzającym rozwój blaszek miażdżycowych (Jonsson i wsp., 2001; Kumeda i wsp., 2002; Park i wsp., 2002a; del Rincon i wsp., 2003; Gerli i wsp., 2004; Desein i wsp., 2005; del Rincon i wsp., 2005; Daza i wsp., 2007). Podwyższenie IMT i obecność blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych w RZS okazały się powiązane nie tylko z klasycznymi czynnikami ryzyka, ale także ze wskaźnikami aktywności zapalnej, czasem trwania choroby oraz różnymi parametrami opisującymi jej zaawansowanie. W badaniach del Rincon i wsp. (2005) wpływ parametrów związanych z zaawansowaniem i aktywnością RZS zaznaczał się głównie w młodszych grupach wiekowych, podczas gdy u starszych chorych wielkość IMT i obecność blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych zależały przede wszystkim od tradycyjnych czynników ryzyka miażdżycy. W związku z rozpowszechnieniem RZS doniosłe znaczenie naukowe i kliniczne ma poznanie mechanizmów przyspieszonego rozwoju miażdżycy w tej chorobie.

### **1.2.2. RZS a tradycyjne czynniki ryzyka miażdżycy – nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, stężenie cholesterolu**

Istnieją doniesienia z piśmiennictwa sugerujące związek między RZS a nadciśnieniem tętniczym i nałogiem palenia tytoniu. U chorych z RZS stwierdzano mianowicie podwyższone wartości ciśnienia w porównaniu z grupą kontrolną osób bez RZS dobraną pod kątem wieku i płci (McEntegart i wsp., 2001), a także większą częstość nadciśnienia tętniczego. Jednakże inne publikacje nie potwierdziły w/wym. związku (Solomon i wsp., 2004; Maradit-Kremers i wsp., 2005a).



Ponadto niektóre badania wskazują, że palenie tytoniu predysponuje do rozwoju RZS (Silman i wsp., 1996; Symmons i wsp., 1997; Hutchinson i wsp., 2001). Powyższe zagadnienie nie jest jednak jednoznacznie rozstrzygnięte. Istnieją bowiem publikacje dowodzące raczej słabości powyższej interakcji (Hernandez Avila i wsp., 1990), a nawet sugerujące zależność odwrotną (Hazes i wsp., 1990). Ponadto pewne badania potwierdzają w/wym. związek jedynie dla seropozytywnej postaci RZS u mężczyzn (Heliovaara i wsp., 1993), zaś inne sugerują związek między paleniem tytoniu a poziomem czynnika reumatoidalnego i zaawansowaniem zmian radiologicznych u chorych z rozpoznanym RZS (Wolfe, 2000). Badania autorów ze Szwecji wskazują na zależność ryzyka zachorowania na seropozytywną postać RZS od interakcji między długoletnim paleniem tytoniu a czynnikiem genetycznym, co ma prowadzić do pojawienia się przeciwciał przeciwko cytrulinowanym polipeptydom na wiele lat przed pierwszymi objawami RZS (Padyukov i wsp., 2004; Klareskog i wsp., 2006ab).

Pomiar całkowitego stężenia cholesterolu nie jest zbyt użyteczny w określaniu ryzyka sercowo-naczyniowego w RZS (del Rincon i wsp., 2001), gdyż poziom cholesterolu wchodzącego w skład frakcji lipoprotein o małej gęstości (LDL, *low density lipoproteins*) nie tylko nie jest wówczas podwyższony, ale może obniżyć się podobnie jak w innych schorzeniach przebiegających z przewlekłym wzmożeniem procesów zapalnych (van Doornum i wsp., 2002; Gonzalez-Gay i wsp., 2005). Ponadto na całkowite stężenie cholesterolu wpływa obniżenie cholesterolu w obrębie frakcji lipoprotein o dużej gęstości (HDL, *high density lipoproteins*); mechanizmy prowadzące do dyslipidemii towarzyszącej RZS omówiono w następnym podrozdziale.

### **1.2.3. Podwyższony poziom homocysteiny, dyslipidemia aterogenna i oporność metaboliczna na insulinę – konsekwencje wzmożonej aktywności zapalnej w RZS**

U chorych z RZS stwierdzono także podwyższenie poziomu homocysteiny (Hernanz i wsp., 1999), osłabienie zdolności insuliny do obniżania poziomu glukozy we krwi (tzw. insulinooporność) (Svenson i wsp., 1988; Paolisso i wsp., 1991) oraz odchylenia od normy w zakresie lipoprotein surowicy, przede wszystkim obniżenie poziomu apolipoproteiny A1 oraz cholesterolu frakcji HDL (zwłaszcza HDL<sub>2</sub>), podwyższenie stężenia triglicerydów, obecność nieprawidłowych cząstek LDL (tzw. małych, gęstych LDL; *small dense LDL*) (wykazujących obniżoną zawartość cholesterolu w przeliczeniu na cząsteczkę apolipoproteiny B i własności aterogenne), a także zwiększenie poziomu lipoproteiny (a) (Park i wsp., 1999; Dessein i wsp., 2002). Ponadto zwiększone stężenie homocysteiny obserwuje się pod wpływem podawania

metotreksatu (Haagsma i wsp., 1999), leku hamującego reduktazę kwasu dihydrofoliowego, co powoduje niedobór N<sup>5</sup>-metylotetrahydrofolianu i upośledza aktywność enzymu katalizującego remetylację homocysteiny do metioniny (Fiskerstrand i wsp., 1997). Powyższemu efektowi ubocznemu metotreksatu można przeciwdziałać stosując jednocześnie suplementację kwasu foliowego (Morgan i wsp., 1998).

Pomijając wpływ metotreksatu na poziom homocysteiny, najprawdopodobniej tendencja do hiperhomocysteinemii, oporności na insulinę i dyslipidemii wynikają z obecności przewlekłego procesu zapalnego. Wykazano związek poziomu homocysteiny po obciążeniu metioniną z wskaźnikami aktywności RZS i obniżeniem poziomu fosforanu pirydoksalu, kofaktora  $\beta$ -syntazy cystationiny, kluczowego enzymu tzw. szlaku transsulfuracji w metabolizmie homocysteiny (Chiang i wsp., 2003). U osób bez RZS stwierdzono natomiast powiązanie polimorfizmu genetycznego w zakresie promotora genu dla interleukiny 6 z wrażliwością na insulinę (Cardellini i wsp., 2005), a także ujemną korelację między stężeniem CRP a poziomem fosforanu pirydoksalu we krwi (Friso i wsp., 2001).

W rozwoju dyslipidemii aterogennej istotną rolę odgrywa wpływ cytokin na tkankę tłuszczową oraz insulinooporność. TNF $\alpha$  i interleukina 6 nasilają lipolizę w adipocytach, co podwyższa stężenie wolnych kwasów tłuszczowych we krwi i zwiększa syntezę triglicerydów w wątrobie. Zarówno wolne kwasy tłuszczowe, jak i TNF $\alpha$  przyczyniają się osłabionej wrażliwości mięśni szkieletowych na insulinę i wtórnej hiperinsulinemii. Upośledzona aktywacja przez insulinę lipazy lipoproteinowej uczestniczących w katabolizmie lipoprotein bogatych w triglicerydy przyczynia się dodatkowo do ich akumulacji we krwi. Sprzyja to potencjalnie aterogennemu profilowi lipidów surowicy, m.in. przez nasilenie wymiany estrów cholesterolu na triglicerydy między cząstkami HDL a lipoproteinami bogatymi w triglicerydy (Khovidhunkit i wsp., 2000; Sattar i wsp., 2003; Gonzalez-Gay i wsp., 2005). Powoduje to powstawanie małych, gęstych cząstek LDL, zaś wzbogacone w ten sposób w triglicerydy cząstki HDL<sub>2</sub> ulegają przyspieszonemu przekształcaniu do HDL<sub>3</sub> wobec upośledzonego hamowania przez insulinę lipazy triglicerydowej wątroby (Garg, 1996).

Dowodem na słuszność przedstawionych hipotez na temat mechanizmów nadmiernej akumulacji homocysteiny, dyslipidemii aterogennej i insulinooporności w RZS jest spadek poziomu homocysteiny (Lazzerini i wsp., 2003), wzrost cholesterolu frakcji HDL (Munro i wsp., 1999; Park i wsp., 2002b) oraz poprawa tolerancji glukozy i złagodzenie insulinooporności (Hallgren & Berne, 1983; Svenson i wsp., 1988) po zastosowaniu leczenia hamującego aktywność zapalną w tej chorobie.

#### 1.2.4. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jako przyczyna przyspieszonego rozwoju miażdżycy w RZS

. Dla rozwoju miażdżycy zasadnicze znaczenie ma zaburzenie równowagi między aterogennymi nieprawidłowymi cząstkami LDL a cząstkami HDL, którym przypisuje się działanie przeciwmiażdżycowe. Powyższe zaburzenie równowagi ściśle wiąże się z nasileniem stresu oksydacyjnego – w/wym. cząstki LDL są podatne na modyfikację przez utlenianie (de Graff i wsp., 1991), co sprzyja generacji anionu nadadtlenkowego i nadadtlenków lipidów unieczynniających tlenek azotu (NO, *nitric oxide*) (Gryglewski i wsp., 1986; Chin i wsp., 1992). Na podobnej drodze inaktywację NO stymuluje homocysteina (Weiss i wsp., 2003), w obecności której źródłem anionu nadadtlenkowego może stać się także śródbłonkowa synteza NO (Zhang i wsp., 2000). NO – produkowany w sposób ciągły przez śródbłonek naczyniowy – moduluje obwodowy i płucny opór naczyniowy (Vallance i wsp., 1989; Stamler i wsp., 1994) oraz przeciwdziała rozwojowi miażdżycy. Dysfunkcja śródbłonna to stan, gdy zdolność do generacji NO lub wywoływania przez niego efektów biologicznych jest upośledzona. W praktyce za miarę dysfunkcji śródbłonna uważa się obniżenie reakcji naczyniorozkurczowej pod wpływem bodźców stymulujących uwalnianie NO. Należy jednak pamiętać, że niedobór aktywności NO – stwierdzany już w obecności czynników ryzyka miażdżycy (Zeicher i wsp. 1993; Reddy i wsp., 1994; Quyyumi i wsp., 1995) – przekłada się na aterogenezę m.in. przez ekspresję na powierzchni *endothelium* cząsteczek adhezyjnych i generację chemokin pośredniczących w interakcjach między śródbłonkiem a monocytami, co ma miejsce już we wczesnej fazie rozwoju miażdżycy (Quehenberger, 2005). Związanie się chemokiny MCP-1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) z jej receptorem (CCR2) na powierzchni monocytów zwiększa powinowactwo monocytarnych integryn do cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłonna, co wzmacnia przyleganie monocytów do *endothelium*, a następnie stymuluje przechodzenie monocytów pod śródbłonek (Weber i wsp., 1996). Fundamentalną rolę w działaniu przeciwmiażdżycowym NO odgrywa hamowanie tworzenia MCP-1 i cząsteczek adhezyjnych (De Caterina i wsp., 1995; Tsao i wsp., 1995; Zeicher i wsp., 1995; Boeger i wsp., 2000a). Ponadto NO jest czynnikiem antyproliferacyjnym i przeciwdziałającym migracji dla komórek mięśniówki gładkiej ściany naczyń (Garg & Hassid, 1989; Sarkar i wsp., 1996).

TNF $\alpha$  stymuluje peroksydację lipoprotein LDL m.in. w wyniku generacji anionu nadadtlenkowego przez monocyty i komórki śródbłonna (Maziere i wsp., 1994), co może być szczególnie niekorzystne przy równoczesnym obniżeniu poziomu antyoksydantów, zaburzenia

opisywanego także w RZS (Honkanen i wsp., 1989). Z kolei lipoproteiny HDL zmniejszają stres oksydacyjny poprzez zapobieganie utlenianiu związków chemicznych wchodzących w skład cząstek LDL (za pośrednictwem enzymu paraoksonazy) oraz uczestniczą tzw. odwrotnym transporcie cholesterolu ze ściany naczyniowej do krwi (Barter i wsp., 2004).

Niezależnie od przedstawionych mechanizmów dyslipidemii i stresu oksydacyjnego jako możliwych ogniw pośrednich między przewlekłą aktywacją zapalną w RZS a dysfunkcją śródbłonna, cytokiny prozapalne mogą w sposób bezpośredni hamować generację NO. Wykazano to dla TNF $\alpha$  (Yoshizumi i wsp., 1993), a także CRP (Verma i wsp., 2002) powstającego w wątrobie pod wpływem interleukiny 6. Biorąc pod uwagę zdolność NO do przeciwdziałania ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni *endothelium* i generacji chemokin (De Caterina i wsp., 1995; Tsao i wsp., 1995; Zeiher i wsp., 1995; Boeger i wsp., 2000a), upośledzenie generacji NO może uczestniczyć w nasileniu interakcji leukocyty–śródbłonek pod wpływem TNF $\alpha$  (Thornhill i wsp., 1991) oraz CRP (Pasceri i wsp., 2000).

Dysfunkcję śródbłonna w RZS obserwowano u chorych bez klinicznych cech patologii układu sercowo-naczyniowego, przy czym nie była ona zależna od czasu trwania procesu chorobowego ani współistnienia klasycznych czynników ryzyka (Bergholm i wsp., 2002; Hansel i wsp., 2003). Co więcej, dysfunkcję śródbłonna stwierdzano również w podgrupie pacjentów z RZS o niskiej aktywności choroby i bez tradycyjnych czynników ryzyka (Vaudo i wsp., 2004). Nie jest rozstrzygnięty problem wpływu terapii DMARDs na czynność śródbłonna w RZS. Dysfunkcję śródbłonna stwierdzano bowiem u chorych z RZS dobrze kontrolowanym przez leczenie DMARDs (Hansel i wsp., 2003; Vaudo i wsp., 2004). Z drugiej strony jednak Bergholm i wsp. (2002) opisywali poprawę funkcji śródbłonna po zastosowaniu DMARDs u pacjentów z nowo-rozpoznanym RZS. Ponadto Huerlimann i wsp. (2002) obserwowali korzystny efekt antagonisty TNF $\alpha$  na śródbłonek u chorych z wysoką aktywnością RZS pomimo uprzedniej terapii metotreksatem i prednisolonem. Wykazano powiązanie między wskaźnikami aktywności zapalnej w RZS a poziomem krążących tzw. „rozpuszczalnych” form cząsteczek adhezyjnych, biochemicznych wykładników dysfunkcji śródbłonna (Bloom i wsp., 1999), oraz skorelowany spadek tych parametrów po zastosowaniu sulfasalazyny (Veale i wsp., 1998).

Dysfunkcja śródbłonna poprzedza rozwój miażdżycy (Al Suwaidi i wsp., 2000; Schaechinger i wsp., 2000), a także stanowi kolejny element w szeregu podobieństw między odchyleniami od normy stwierdzanymi w RZS a miażdżycą, uważaną obecnie również za przewlekły proces o charakterze zapalnym (Ross, 1999). Podobieństwa te obejmują m.in.: aktywację monocytów/makrofagów i limfocytów T, przesunięcie równowagi między

podtypami limfocytów pomocniczych T na korzyść podtypu 1, aktywację limfocytów B (przeciwciała przeciw zmodyfikowanym cząstkom LDL w miażdżycy oraz obecność czynnika reumatoidalnego w RZS), podwyższony poziom białek ostrej fazy i krążących cząsteczek adhezyjnych, a także nasilenie degradacji macierzy pozakomórkowej i wzmożone tworzenie nowych naczyń (Pasceri & Yeh, 1999; van Doornum i wsp., 2002). Głównym źródłem krążących cytokin w RZS jest błona maziowa objętych procesem zapalnych stawów. Podobny zestaw cytokin (m.in. TNF $\alpha$ , interleukiny 1 i 6) uczestniczy w rozwoju procesu miażdżycowego w ścianie naczynia, a zwłaszcza w destabilizacji blaszek miażdżycowych, co jest bezpośrednią przyczyną ostrych zespołów wieńcowych (Sattar i wsp., 2003). W RZS Gerli i wsp. (2004) wykazali związek przyspieszonego rozwoju miażdżycy (reprezentowanego przez IMT tętnicy szyjnej) oraz dysfunkcji śródbłónka (ocenianej jako odpowiedź rozkurczowa tętnicy ramiennej na zwiększony przepływ krwi podczas reaktywnej hiperemii) ze zwiększonym odsetkiem limfocytów T CD4 $^{+}$ /CD28 $^{-}$ , przy czym odsetek ten spadał po zastosowaniu antagonisty TNF $\alpha$ . Podwyższoną liczebność tej klasy limfocytów T stwierdzano także w niestabilnej dusznicy bolesnej przy niezmiennym ich odsetku w stabilnej formie choroby niedokrwiennej serca (Liuzzo i wsp., 1999). Limfocyty T CD4 $^{+}$ /CD28 $^{-}$  generują interferon  $\gamma$  hamujący syntezę kolagenu przez mioocyty naczyniowe i stymulujący makrofagi to produkcji metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (Libby, 1995; Libby, 2000). Stwierdzono wybiórczą akumulację limfocytów T CD4 $^{+}$ /CD28 $^{-}$  w niestabilnych blaszkach miażdżycowych (Liuzzo i wsp., 2000). Niedawne doniesienie pochodzące od cytowanej grupy autorów włoskich (Rizzello i wsp., 2006) wykazało zdolność antagonisty TNF $\alpha$  do hamowania proliferacji powyższego typu limfocytów w próbkach krwi pobranych od pacjentów z niestabilną dusznicą bolesną.

### **1.2.5. Zaburzenia hemostazy w RZS a rozwój miażdżycy**

Podobieństwa między RZS a miażdżycą dotyczą także zaburzeń w zakresie układu krzepnięcia i fibrynolizy. Podobnie jak wcześniej opisane odchylenia od normy, stanowią one konsekwencję aktywacji procesów zapalnych. Interleukina 6 zwiększa produkcję fibrynogenu w wątrobie, zaś TNF $\alpha$ , interleukiny 1 i 6 stymulują ekspresję czynnika tkankowego na powierzchni monocytów i komórek śródbłónka, podobnie jak wspomniana wcześniej interakcja CD40–CD154 (Mach i wsp., 1997; Grignani & Maiolo, 2000). Poza zwiększoną liczbą płytek i hiperfibrynogenią w RZS stwierdzono podwyższone poziomy czynnika von Willebranda, a także D dimeru i tkankowego aktywatora plazminogenu, odzwierciedlających

najprawdopodobniej wzmożoną aktywację tworzenia fibryny (McEntegart i wsp., 2001). Zwiększone stężenie fibrynogenu oraz parametry odzwierciedlające aktywność układów krzepnięcia i fibrynolizy okazały się czynnikami ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych w obserwacji prospektywnej u chorych z RZS (Wallberg-Jonsson i wsp., 2000), pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (Thompson i wsp., 1995; Juhan-Vague i wsp., 1996), a także w populacji zdrowych osób (Thogersen i wsp., 1998; Ma i wsp., 1999).

Wiadomo, że mechanizmy hemostazy pozostają pod stałą kontrolą śródbłonna naczyniowego. Wykazano zdolność NO do hamowania adhezji i agregacji pytek (Radomski i wsp., 1987; Busse i wsp., 1987; Gryglewski i wsp., 1989; Yao i wsp., 1995), redukcji ekspresji i aktywności czynnika tkankowego (Gerlach i wsp., 1998) i aktywności XIII czynnika krzepnięcia (Catani i wsp., 1998), a także do stymulacji fibrynolizy (Gryglewski i wsp., 1989; Korbut i wsp., 1994).

## **2. ZAŁOŻENIA i CELE PRACY**

### **2.1. Znaczenie kliniczne liczebności krążących prekursorów komórek śródbłonna naczyniowego i stężenia we krwi endogennego inhibitora syntezy tlenu azotu**

W ostatnich latach (Grisar i wsp., 2005; Herbrig i wsp., 2006) pojawiły się doniesienia o obniżeniu u chorych z RZS liczebności krążących prekursorów komórek śródbłonna naczyniowego (EPC, *endothelial progenitor cells*). EPC są to pochodzące ze szpiku kostnego komórki, które biorą udział w tworzeniu nowych naczyń w obrębie niedokrwionych tkanek

(Asahara i wsp., 1997; Landmesser i wsp., 2004; Iwakura i wsp., 2006) oraz w regeneracji śródbłonna naczyniowego (Walter i wsp., 2002; Iwakura i wsp., 2003; Laufs i wsp., 2004). Niedobór EPC we krwi stwierdzano wcześniej również u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca na podłożu miażdżycowym (Vasa i wsp., 2001b), a także u osób bez klinicznych cech miażdżycy, lecz z obecnością jej tradycyjnych czynników ryzyka i dysfunkcją śródbłonna (Hill i wsp., 2003). Wiadomo, że dysfunkcja śródbłonna jest stanem poprzedzającym rozwój dających objawy kliniczne blaszek miażdżycowych (Al Suwaidi i wsp., 2000; Schaechinger i wsp., 2000). Ponadto dwie niezależne grupy badaczy wykazały, że niski odsetek EPC we krwi okazał się silnym i niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie pacjentów z chorobą wieńcową poddanych diagnostyce inwazyjnej (Werner i wsp., 2005; Schmidt-Lucke i wsp., 2005). Zatem spadek liczebności EPC może stanowić kolejne ogniwo w łańcuchu podobieństw procesu miażdżycowego i zmian towarzyszących RZS.

W 2005 roku ukazało się doniesienie o odwrotnej zależności między liczebnością EPC a poziomem endogennego inhibitora syntezy tlenu azotu (NO), asymetrycznej  $N^G, N^G$ -dwumetylo-L-argininy (ADMA, *asymmetric  $N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginine*) we krwi u pacjentów z chorobą wieńcową (Thum i wsp., 2005). W publikacjach ostatnich 15 lat podwyższone stężenie ADMA stwierdzano u pacjentów z powodującą objawy kliniczne miażdżycą tętnic kończyn dolnych (Boeger i wsp., 1997) i tętnic wieńcowych (Lu i wsp., 2003), a także z czynnikami ryzyka miażdżycy, m.in. w niewydolności nerek (Vallance i wsp., 1992), hipercholesterolemii (Boeger i wsp., 1998), pierwotnym nadciśnieniu tętniczym (Surdacki i wsp., 1999), cukrzycy (Abbasi i wsp., 2001), hiperhomocysteinemii (Holven i wsp., 2003) oraz przy oporności metabolicznej na insulinę (Stuehlinger i wsp., 2002). Poziom ADMA korelował z IMT tętnic szyjnych u osób bez klinicznych cech miażdżycy (Miyazaki i wsp., 1999) oraz w przewlekłej niewydolności nerek (Zoccali i wsp., 2002; Nanayakkara i wsp., 2005). Ponadto poziom ADMA był niezależnym czynnikiem prognostycznym niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z terminalną niewydolnością nerek (Zoccali i wsp., 2001) oraz w chorobie niedokrwiennej serca (Valkonen i wsp., 2001; Schnabel i wsp., 2005; Meinitzer i wsp., 2007). Badania eksperymentalne dowiodły kluczowej roli lokalnej generacji NO w szpiku kostnym w procesie mobilizacji EPC ze szpiku kostnego do krwi (Aicher i wsp., 2003; Iwakura i wsp., 2003; Laufs i wsp., 2004; Landmesser i wsp., 2004).

## **2.2. Hipotezy badawcze**

**A.** *Została wysunięta koncepcja (Paleolog, 2005), że skoro w RZS dochodzi do akumulacji EPC w zmienionej zapalnie błonie maziowej stawów (Ruger i wsp., 2004), mogłoby to odpowiadać za obserwowany wówczas (Grisar i wsp., 2005; Herbrig i wsp., 2006) niedobór tych komórek we krwi z następowym upośledzeniem regeneracji warstwy śródbłonna naczyniowego, jego dysfunkcją i przyspieszonym rozwojem miażdżycy.*

Za akumulację EPC w *synovium* miałyby odpowiadać wzmożona lokalna generacja śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (Walsh, 1999; Ballara i wsp., 2001).

Hipoteza powyższa nie została dotychczas zweryfikowana – w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono publikacji wykazującej związek między liczebnością EPC a wykładnikami procesu miażdżycowego w RZS.

**B.** *W związku z faktem, że poziom ADMA we krwi u chorych z RZS nie był dotychczas badany, sformułowano ponadto hipotezę, że obniżenie liczebności EPC i zaawansowanie procesu miażdżycowego w RZS mogą być powiązane z nadmierną akumulacją ADMA.*

### **3. METODYKA**

#### **3.1. Grupa badana – chorzy z RZS**

Badaniami objęto 30 chorych z RZS bez klinicznych wykładników procesu miażdżycowego ani klasycznych czynników ryzyka miażdżycy. Chorzy pozostawali w kontroli Oddziału Reumatologii Małopolskiego Centrum Reumatologii, Immunologii i Rehabilitacji Szpitala Specjalistycznego im. Józefa Dietla w Krakowie (Ordynator: lek. med. Jolanta Bucka). Zastosowano następujące kryteria włączenia do badania:



- RZS wg zmodyfikowanych kryteriów Amerykańskiego Towarzystwa Reumatologicznego (Arnett i wsp., 1988);
- czas trwania choroby co najmniej 1 rok;
- wskaźnik aktywności choroby DAS<sub>28</sub> (Prevo i wsp., 1995) co najmniej 3.2;
- stosowanie nie zmienionego zestawu terapeutycznego z grupy DMARDs przez co najmniej 3 miesiące.

U wszystkich chorych stosowane były klasyczne niesteroidowe leki przeciwzapalne; u żadnego z pacjentów nie podawano w trakcie badania ani w przeszłości środki z grupy selektywnych antagonistów cyklooksygenazy typu 2 bądź antagonistów TNF $\alpha$ .

### **3.2. Grupa kontrolna zdrowych osób**

Grupę kontrolną stanowiło 20 osób bez klinicznych lub angiograficznych (o ile wykonywano diagnostykę inwazyjną celem wykluczenia choroby niedokrwiennej serca) wykładników miażdżycy ani klasycznych czynników ryzyka nie odbiegających w sposób znamieny od grupy badanej pod względem wieku, płci i wskaźnika masy ciała oraz nie zażywających żadnych leków.

### **3.3. Kryteria wyłączenia z badania – wspólne dla grupy badanej i grupy kontrolnej**

- wiek poniżej 20 lat bądź powyżej 60 lat;
- choroba niedokrwienne serca, chromanie przestankowe, choroby naczyń mózgowych, niewydolność serca;
- blaszki miażdżycowe powodujące istotne hemodynamicznie zwężenia w ultrasonografii tętnic szyjnych lub w badaniu koronarograficznym, o ile było wykonywane;
- cukrzyca bądź poziom glukozy na czczo w osoczu krwi żyłnej > 5.5 mmol/l;
- terapia lekami hipotensyjnymi, hipolipemicznymi lub przeciwcukrzycowymi (aktualna bądź w wywiadzie);

- stosowanie glukokortykoidów lub selektywnych antagonistów cyklooksigenazy typu 2;
- nałóg palenia tytoniu (aktualnie lub zaprzestanie palenia przed mniej niż 2 lata);
- ciśnienie tętnicze w warunkach spoczynkowych co najmniej 140/90 mmHg;
- całkowity cholesterol > 6.46 mmol/l bądź cholesterol frakcji LDL > 4.14 mmol/l;
- triglicerydy > 2.29 mmol/l;
- wskaźnik masy ciała > 30 kg/m<sup>2</sup>;
- klirens endogennej kreatyniny < 60 ml/min;
- dodatni wywiad w kierunku choroby niedokrwiennej serca u krewnych I-go stopnia przed 55 r.ż (mężczyźni) bądź przed 65 r.ż (kobiety);
- przebyte choroby infekcyjne w okresie ostatnich 2 miesięcy;
- choroby nowotworowe;
- wybrane pozastawowe objawy RZS, jak zapalenie opłucnej, zapalenie osierdza, zespół Felty'ego, objawy oczne, kłębkowe zapalenie nerek i inne postacie reumatoidalnego zapalenia naczyń (m.in. neuropatia obwodowa) – wykazano bowiem, że obecność w/wym. jest niezależnym czynnikiem obciążającym rokowanie w RZS, w tym ryzyko epizodów sercowo-naczyniowych (Gabriel i wsp., 2003; Turesson i wsp., 2007);
- zaburzenia endokrynologiczne;
- zaburzenia czynności wątroby;
- choroby neurologiczne lub psychiczne.

### **3.4. Zakres badań**

Protokół został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego; wszystkie osoby wyraziły zgodę na badania.

Osoby badane poproszono o pozostanie na czczo w dniu zaplanowanego pobrania krwi. Krew pobierano z żyły zgięcia łokciowego w godzinach porannych (8.00–10.00) w objętości ok. 12 ml. Porcję ok. 4 ml krwi pobierano do probówki zawierającej heparynę, a następnie probówkę przewożono bezpośrednio po pobraniu krwi do Zakładu Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego celem oznaczenia liczebności EPC przy pomocy cytometrii przepływowej. We wszystkich przypadkach próbki krwi zostały poddane analizie w Zakładzie Immunologii nie

później niż 60 minut po pobraniu. Pozostałą krew odwirowywano celem uzyskania próbek osocza i surowicy, które oddzielano i zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  (a w przypadku konieczności dłuższego przechowywania  $-70^{\circ}\text{C}$ ) do czasu analiz biochemicznych opisanych w podrozdziałach 3.4.2 i 3.4.3.

### 3.4.1. Oznaczenie liczebności EPC

Oznaczenie to wykonano za pomocą cytometrii przepływowej w Zakładzie Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik: Prof. dr hab. med. J. Pryjma) wg metodologii rozwiniętej na podstawie literatury (Vasa i wsp., 2001ab). Za EPC przyjęto komórki wykazujące jednoczesną ekspresję cząsteczek powierzchniowych CD34 oraz receptorów typu 2 dla VEGF (KDR, *kinase insert domain receptor*). Próbkę 100  $\mu\text{l}$  krwi inkubowano z mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko KDR (Sigma), a następnie z wtórnymi przeciwciałami króliczymi znakowanymi izotiocyanianem fluoresceiny (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) (Dako) oraz ze znakowanymi fikoerytryną (PE, *phycoerythrin*) mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko CD34 (Becton Dickinson). Kontrolne próbki krwi inkubowano z mieszaniną znakowanych mysich przeciwciał (IgG1-FITC oraz IgG2a-PE,  $\gamma 1/\gamma 2a$  Simultest, Becton Dickinson). Liczebność EPC wyrażono jako odsetek komórek w bramce dla limfocytów.

### 3.4.2. Oznaczenie poziomu L-argininy i jej metylowanych pochodnych

Pomiar stężenia substratu (L-arginina) i endogennego antagonisty (ADMA) syntezy tlenu azotu w osoczu wykonano metodą chromatografii cieczowej/spektrometrii masowej (Martens-Lobenhoffer & Bode-Boeger, 2006) w Instytucie Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu im. Otto-von-Guericke w Magdeburgu (Kierownik: Prof. dr hab. med. S.M. Bode-Boeger). Zmierzono także poziom izomeru ADMA, symetrycznej  $N^G, N^G$ -dwumetylo-L-argininy (SDMA, *symmetric  $N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginine*). Współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej w przypadku ADMA wynosiły odpowiednio 5.5 i 7.7 %, zaś dla L-argininy i SDMA poniżej 5.2 %.

### 3.4.3. Pozostałe analizy biochemiczne

Oznaczenia te obejmowały białko C-reaktywne metodą chemiluminescencyjną o dużej czułości (Immulite, DPC, USA) oraz homocysteinę metodą chemiluminescencyjną (Immulite, DPC, USA). Ponadto zmierzono stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji cholesterolu, triglicerydów i kreatyniny w surowicy, a także poziom glukozy w osoczu za pomocą standardowych metod. Na podstawie stężenia kreatyniny wyznaczono klirens endogennej kreatyniny (KKr) wg zmodyfikowanego wzoru opartego na badaniu MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) (Levey, 2002). Ponadto zmierzono poziom VEGF w osoczu metodą immunoenzymatyczną ELISA (*enzyme-linked immunoadsorbent assay*) (R & D Systems), przy czym współczynniki zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej wynosiły odpowiednio 6.7 i 8.8 %, zaś próg czułości metody 5 pg/ml.

W przypadku morfologii krwi i czynnika reumatoidalnego w dalszych analizach uwzględniono wartości w/wym. parametrów uzyskane w toku rutynowych oznaczeń przeprowadzonych u chorych z RZS nie wcześniej niż 2 tygodnie przed pobraniem krwi do uprzednio opisanych badań. Jako dodatni test na obecność czynnika reumatoidalnego przyjęto miano odczynu Waalera-Rosego co najmniej 1 : 160.

#### **3.4.4. Badanie ultrasonograficzne tętnic szyjnych wspólnych**

Badanie przeprowadzono w Pracowni Badań Nieinwazyjnych przy II Klinice Kardiologii Instytutu Kardiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego przy użyciu ultrasonografu Vivid 7 wyposażonego w głowicę liniową do badań naczyniowych. Osoba wykonująca badanie nie posiadała wiedzy na temat charakterystyki klinicznej pacjentów oraz wyników badań biochemicznych i liczebności EPC u pacjentów oraz w grupie kontrolnej. Pomiaru IMT dokonano w końcowym okresie rozkurczu; badaniem objęto odcinek o długości 1.5 cm przed rozwidleniem tętnicy szyjnej wspólnej poza obszarem ewentualnych blaszek miażdżycowych. IMT zdefiniowano jako odległość między dwoma wyraźnie zarysowanymi liniami odgraniczającymi błonę wewnętrzną od światła naczynia oraz błonę środkową od przydanki. U każdej osoby wykonującej badanie wykonano 12 pomiarów: w prawej i lewej tętnicy szyjnej wspólnej po 3 pomiary w zakresie ściany naczynia bliższej i dalszej w stosunku do głowicy (Schillaci i wsp., 2001; Gerli i wsp., 2004). Ponadto wyodrębniono osoby z obecnością blaszek miażdżycowych zdefiniowanych jako nieregularne uwypuklenia do światła naczynia (Schillaci i wsp., 2001; del Rincon i wsp., 2005).

### 3.5. Analiza statystyczna

Zmienne o charakterze jakościowym scharakteryzowano jako liczebności (n) i odsetki. Zmienne o charakterze ciągłym przedstawiono w postaci wartości średnich i odchyłeń standardowych z wyjątkiem poziomu CRP i VEGF, dla których zaprezentowano mediany i rozpiętość między 25-tym a 75-tym percentylem z powodu braku możliwości uzyskania jednorodności wariancji tych zmiennych w poszczególnych grupach osób badanych. Zgodność zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym badano przy pomocy testu Kolmogorowa-Smirnowa, zaś jednorodność wariancji testem Levene'a. Przy porównaniach liczebności EPC pomiędzy grupami zastosowano transformację logarytmiczną (logarytm dziesiętny) w celu uzyskania zgodności z rozkładem normalnym, zaś w przypadku ilorazu ADMA/L-arginina posłużono się w/wym. przekształceniem logarytmicznym w związku z koniecznością eliminacji niejednorodności wariancji.

Porównanie zmiennych o charakterze ciągłym między 2 grupami (grupą kontrolną a grupą chorych z RZS) wykonano za pomocą testu t Studenta dla zmiennych niepowiązanych, testu nieparametrycznego Mann'a-Whitney'a (dla stężenia CRP i VEGF), zaś testu  $\chi^2$  lub Fishera w przypadku zmiennych o charakterze jakościowym.

Następnie w obrębie chorych z RZS wyodrębniono 2 grupy chorych na podstawie obecności (RZS/A, n = 8) bądź braku (RZS/B, n = 22) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych wspólnych. W celu porównania tych 2 grup oraz grupy kontrolnej przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla zmiennych ciągłych z wyjątkiem CRP i VEGF, dla których posłużono się analizą wariancji Kruskala-Wallisa. W przypadku wykrycia istotności statystycznej ( $p < 0.05$ ) za pomocą analiz wariancji, analizę rozszerzono o badanie różnic między poszczególnymi parami grup za pomocą testu Tukey'a bądź – w przypadku CRP i VEGF – testu nieparametrycznego Mann'a-Whitney'a.

Jednoczynnikowa analiza korelacyjna polegała na obliczeniu współczynników korelacji liniowej Pearsona (r) między IMT tętnic szyjnych lub logarytmiczną pochodną liczebności EPC [ $\log(\text{EPC})$ ] a zmiennymi o charakterze ciągłym. W przypadku zmiennych jakościowych obliczono współczynniki korelacji Spearmana (rho). W celu identyfikacji zmiennych powiązanych w sposób niezależny z IMT bądź logarytmiczną pochodną liczebności EPC zastosowano analizę wieloczynnikową metodą liniowej regresji wielokrotnej z krokowym doбором zmiennych. Do analizy włączono jedynie zmienne, dla których miara istotności statystycznej (p) przy obliczaniu współczynników korelacji r bądź rho w analizie jednoczynnikowej nie przekraczała 0.15. Wyniki przedstawiono jako średnie standaryzowane

współczynniki regresji ( $\beta$ ) wraz z ich standardowymi błędami (SEM, *standard error of the mean*) oraz odpowiadające im wartości p dla zmiennych, które zostały włączone do końcowego modelu regresji. Modele regresji scharakteryzowano podając wartość kwadratu współczynnika korelacji wielokrotnej ( $R^2$ ) określający, jaka część zmienności zmiennej zależnej – IMT tętnic szyjnych lub [log (EPC)] – może być tłumaczona przez zmienne niezależne obecne w ostatecznym modelu regresji.

## **4. WYNIKI**

### **4.1. Porównania między grupą kontrolną (C) a pacjentami z RZS**

#### **4.1.1. Dane demograficzne, kliniczne i parametry biochemiczne**

Poza parametrami związanymi z RZS, nie stwierdzono różnic między grupą kontrolną a chorymi z RZS w przypadku danych demograficznych i klinicznych (tab. 1). U 8 chorych z RZS (26.7 %) stwierdzono obecność blaszek miażdżycowych powodujących nieistotne hemodynamicznie zwężenia, czego nie obserwowano oraz u żadnej osoby w grupie kontrolnej.

**Tab. 1. Chorzy z RZS i grupa kontrolna (C) – dane demograficzne i kliniczne**

	<b>RZS</b>	<b>C</b>
	<i>(n = 30)</i>	<i>(n = 20)</i>
Wiek, lata	47 ± 12	45 ± 10
Kobiety, n (%)	25 (83.3)	17 (85)
Wskaźnik masy ciała, kg/m <sup>2</sup>	25.2 ± 4.3	25.0 ± 2.1
Czas trwania choroby, lata	5.1 ± 4.4	-
DAS <sub>28</sub>	5.9 ± 1.2	-
Dodatni czynnik reumatoidalny, n (%)	21 (70)	-
Leczenie DMARDs, n (%)	30 (100)	-
Metotreksat	18 (60)	-
Inne DMARDs	5 (16.7)	-
Metotreksat + inne DMARDs	6 (20)	-
Kombinacje DMARDs (bez metotreksatu)	1 (3.3)	-
Średnie RR, mmHg	88 ± 5	89 ± 6
KKr, ml/min na 1.73 m <sup>2</sup> powierzchni ciała	104 ± 27	108 ± 13
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> /μl	7.1 ± 2.0	7.2 ± 1.7
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> /μl	362 ± 120***	219 ± 85

\*\*\* p < 0.001 vs. C.

U pacjentów z RZS stwierdzono podwyższenie liczby płytek krwi (tab. 1), większe stężenie CRP i VEGF, zaś obniżony poziom cholesterolu frakcji HDL i hemoglobiny (tab. 2).

**Tab. 2. Chorzy z RZS i grupa kontrolna (C) – parametry biochemiczne**

	<b>RZS</b>	<b>C</b>
	<i>(n=30)</i>	<i>(n=20)</i>
Hemoglobina, g/dl	11.9 ± 0.6***	13.7 ± 0.7
CRP, mg/l	12.0 (1.6–37.4)***	0.8 (0.6–1.0)
Homocysteina, μmol/l	9.3 ± 3.8	9.5 ± 1.6
Cholesterol frakcji LDL, mmol/l	2.9 ± 0.9	3.2 ± 0.4
Cholesterol frakcji HDL, mmol/l	1.0 ± 0.3***	1.3 ± 0.3
Triglicerydy, mmol/l	1.3 ± 0.7	1.1 ± 0.3
Glukoza, mmol/l	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.4
VEGF, pg/ml	47 (29–79)***	14 (8–20)

\*\*\* p < 0.001 vs. C.

#### 4.1.2. IMT, liczebność EPC oraz stężenie L-argininy, ADMA i SDMA

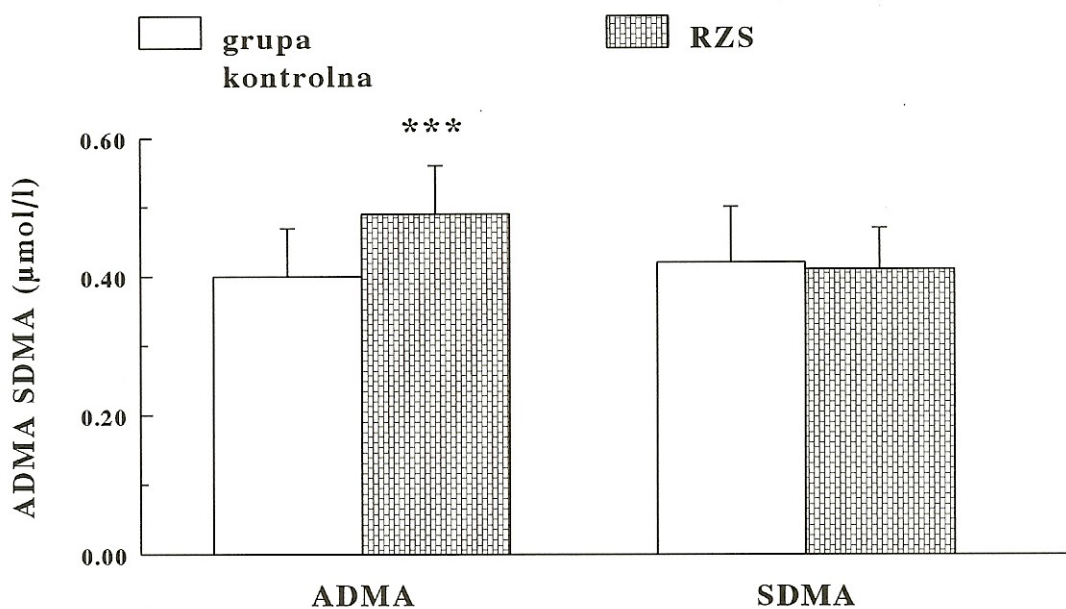
W stosunku do grupy kontrolnej pacjenci z RZS wykazywali znamienne podwyższone poziomy ADMA w osoczu krwi (tab. 3, ryc. 1), obniżoną liczebność EPC (tab. 3, ryc. 2) oraz zwiększenie średniej wartości IMT tętnic szyjnych wspólnych (tab. 3, ryc. 3). Stężenia SDMA i L-argininy nie różniły się w sposób istotny w obu grupach (tab. 3, ryc. 1)

**Tab. 3. Porównanie IMT tętnic szyjnych wspólnych, liczebności EPC oraz poziomu L-argininy, ADMA i SDMA w osoczu między grupą kontrolną a chorymi z RZS**

	C (n = 20)	RZS (n = 30)
IMT, mm	0.55 ± 0.10	0.65 ± 0.13**
EPC, odsetek limfocytów	0.063 ± 0.035	0.039 ± 0.025*
L-arginina, µmol/l	63 ± 16	69 ± 19
ADMA, µmol/l	0.40 ± 0.07	0.49 ± 0.07***
SDMA, µmol/l	0.41 ± 0.06	0.42 ± 0.08
ADMA/L-arginina	0.0068 ± 0.0019	0.0075 ± 0.0020

\* p < 0.05 vs.C; \*\* p < 0.01 vs. C; \*\*\* p < 0.001 vs. C.

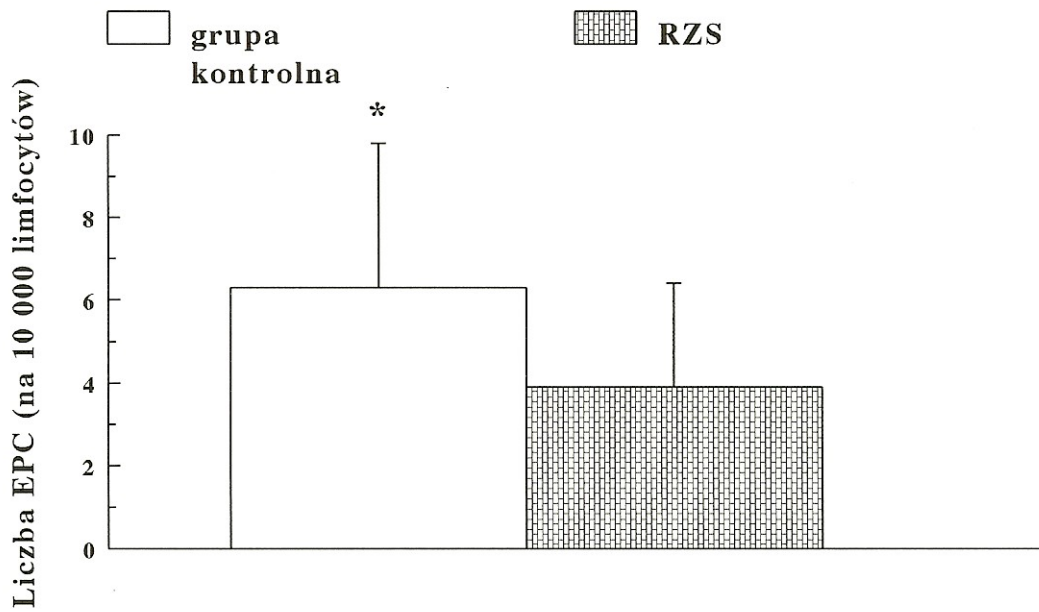
**Ryc.1. Poziomy ADMA i SDMA w osoczu krwi**



\*\*\* p < 0.001 w stosunku do grupy kontrolnej

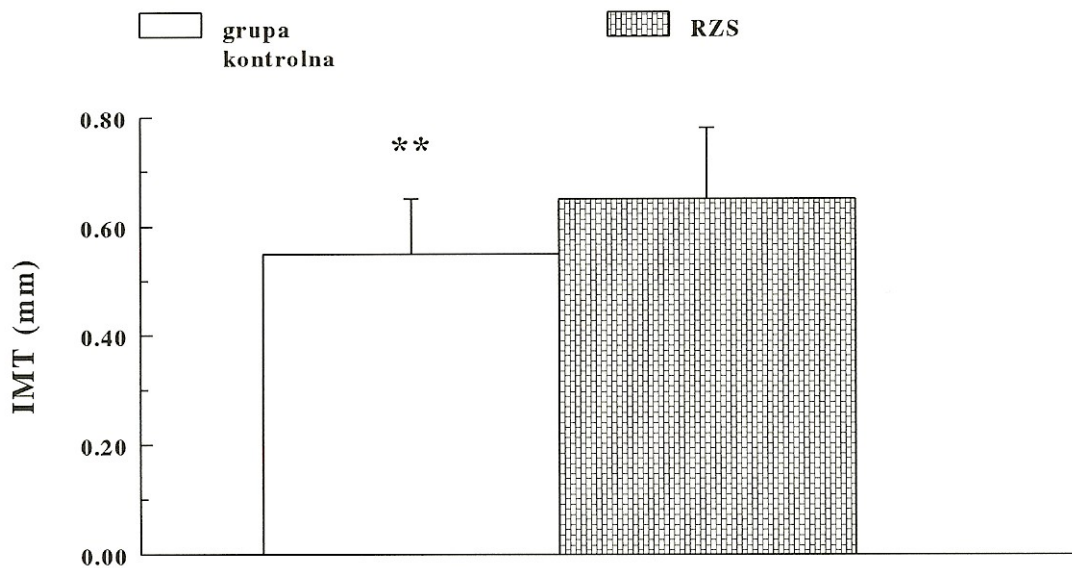


**Ryc.2. Liczebność EPC we krwi**



\*  $p < 0.05$  w stosunku do grupy kontrolnej

**Ryc.3. IMT tętnic szyjnych wspólnych**



\*\*  $p < 0.01$  w stosunku do grupy kontrolnej

## 4.2. Porównania między grupą kontrolną (C) a chorymi z RZS z uwzględnieniem obecności (RZS/A) bądź braku (RZS/B) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych

### 4.2.1. Dane demograficzne, kliniczne i parametry biochemiczne

Z uwagi na brak istotnych różnic między grupami określanymi jako RZS/A oraz RZS/B, porównanie różnic między 3 grupami (C, RZS/B oraz RZS/A) metodami opartymi na analizie wariancji przyniosło podobne wyniki do przedstawionego wcześniej porównania grupy kontrolnej (C) z chorymi na RZS rozpatrywanymi jako jedna grupa (tab. 4 i tab. 5). Obniżenie stężenia cholesterolu frakcji HDL i hemoglobiny oraz podwyższenie liczby płytek i poziomu CRP i VEGF obserwowano zarówno dla grup RZS/A, jak i RZS/B w porównaniu z grupą C (tab. 4 i tab. 5).

**Tab. 4. Grupa kontrolna (C) a chorzy z RZS z obecnością (RZS/A) lub bez (RZS/B) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych – dane demograficzne i kliniczne**

	C (n = 20)	RZS/B (n = 22)	RZS/A (n = 8)
Wiek, lata	45 ± 10	45 ± 11	52 ± 14
Kobiety, n (%)	17 (85)	18 (81.8)	7 (87.5)
Wskaźnik masy ciała, kg/m <sup>2</sup>	25.0 ± 2.1	25.0 ± 4.7	26.1 ± 3.2
Czas trwania choroby, lata	-	5.2 ± 4.5	4.8 ± 4.3
DAS <sub>28</sub>	-	6.0 ± 1.4	5.6 ± 0.5
Dodatni czynnik reumatoidalny, n (%)	-	14 (63.6)	7 (87.5)
Leczenie DMARDs, n (%)	-	22 (100)	8 (100)
Metotreksat	-	14 (63.6)	4 (50)
Inne DMARDs	-	5 (22.7)	0 (0)
Metotreksat + inne DMARD	-	2 (9.1)	4 (50)
Kombinacje DMARDs (bez metotreksatu)	-	1 (4.6)	0 (0)
Średnie RR, mmHg	89 ± 6	88 ± 5	87 ± 6
KKr, ml/min na 1.73 m <sup>2</sup> powierzchni ciała	108 ± 13	101 ± 22	116 ± 39
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> /μl	7.2 ± 1.7	7.1 ± 1.9	7.2 ± 2.5
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> /μl	219 ± 85	332 ± 95***	444 ± 129***

**Tab. 5. Grupa kontrolna (C) a chorzy z RZS z obecnością (RZS/A) lub bez (RZS/B) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych – parametry biochemiczne**

	<b>C</b>	<b>RZS/B</b>	<b>RZS/A</b>
	(n = 20)	(n = 22)	(n = 8)
Hemoglobina, g/dl	13.7 ± 0.7	11.9 ± 0.4***	12.0 ± 0.6***
CRP, mg/l	0.8 (0.6–1.0)	7.5 (1.7–45.1)***	23.5 (1.2–37.9)**
Homocysteina, µmol/l	9.5 ± 1.6	9.7 ± 4.0	8.2 ± 3.0
Cholesterol frakcji LDL, mmol/l	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.9	3.3 ± 0.5
Cholesterol frakcji HDL, mmol/l	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.3***	0.9 ± 0.3***
Triglicerydy, mmol/l	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.5
Glukoza, mmol/l	4.9 ± 0.4	4.7 ± 0.4	4.9 ± 0.5
VEGF, pg/ml	14 (8–20)	49 (29–82)***	47 (27–61)***

\*\* p < 0.01 vs. C; \*\*\* p < 0.001 vs. C.

#### 4.2.2. IMT, liczebność EPC oraz stężenie L-argininy, ADMA i SDMA

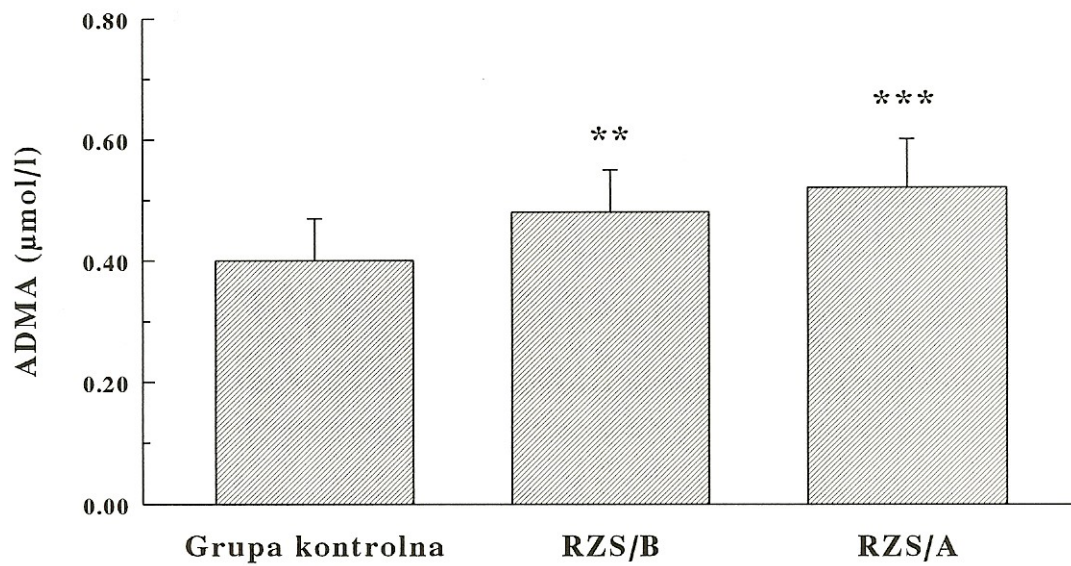
Porównanie grupy kontrolnej (C) oraz grup RZS/A i RZS/B za pomocą analizy wariancji wykazało znamienność statystyczną w przypadku IMT tętnic szyjnych wspólnych (p < 0.01), liczebności EPC we krwi (p < 0.05), stężenia ADMA w osoczu (p < 0.001) i ilorazu stężeń ADMA/L-arginina (p < 0.05). W stosunku do grupy kontrolnej poziom ADMA w osoczu był podwyższony u chorych z RZS niezależnie od obecności blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych (tab. 6, ryc. 4). Stężenia SDMA i L-argininy nie wykazywały istotnych znamiennych różnic między powyższymi 3 grupami. (tab. 6). W grupie RZS/A średnia wartość IMT tętnic szyjnych wspólnych (tab. 6) i iloraz stężeń ADMA/L-arginina (tab. 6, ryc. 5) okazały się podwyższone, zaś liczebność EPC była obniżona (tab. 6, ryc. 6) – tak względem grupy RZS/B, jak i grupy kontrolnej. Nie stwierdzono znamiennych różnic między grupą kontrolną a grupą RZS/B dla IMT tętnic szyjnych wspólnych (tab. 6), ilorazu ADMA/L-arginina (tab. 6, ryc. 5) oraz liczebności EPC (tab. 6, ryc. 6).

**Tab. 6. Porównanie IMT tętnic szyjnych wspólnych, liczebności EPC oraz poziomu L-argininy, ADMA i SDMA w osoczu między grupą kontrolną (C) oraz chorymi z RZS z uwzględnieniem obecności (RZS/A) bądź braku (RZS/B) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych**

	<b>C</b>	<b>RZS/B</b>	<b>RZS/A</b>
	(n = 20)	(n = 22)	(n = 8)
IMT, mm	0.55 ± 0.10	0.61 ± 0.12	0.74 ± 0.11**†
EPC, odsetek limfocytów	0.063 ± 0.035	0.045 ± 0.032	0.020 ± 0.013*†
L-arginina, µmol/l	63 ± 16	73 ± 18	61 ± 19
ADMA, µmol/l	0.40 ± 0.07	0.48 ± 0.07**	0.52 ± 0.08***
SDMA, µmol/l	0.41 ± 0.06	0.43 ± 0.08	0.38 ± 0.09
ADMA/L-arginine	0.0068 ± 0.0019	0.0069 ± 0.0013	0.0092 ± 0.0028*†

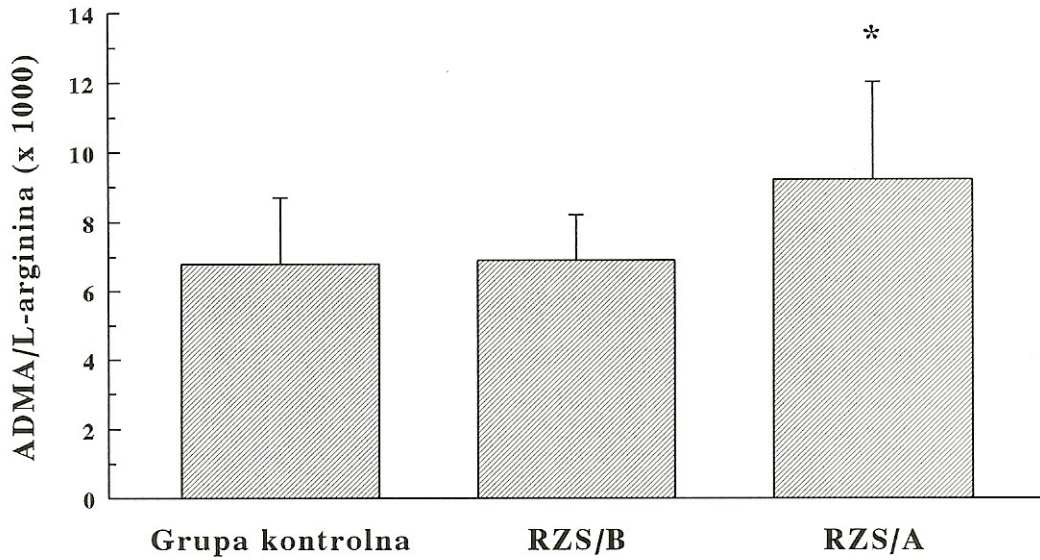
\* p < 0.05 vs. C; \*\* p < 0.01 vs. C; \*\*\* p < 0.001 vs. C; † p < 0.05 vs. RZS/B.

**Ryc.4. Poziom ADMA a obecność (A) lub brak (B) miażdżycy t.szyjnych w RZS**



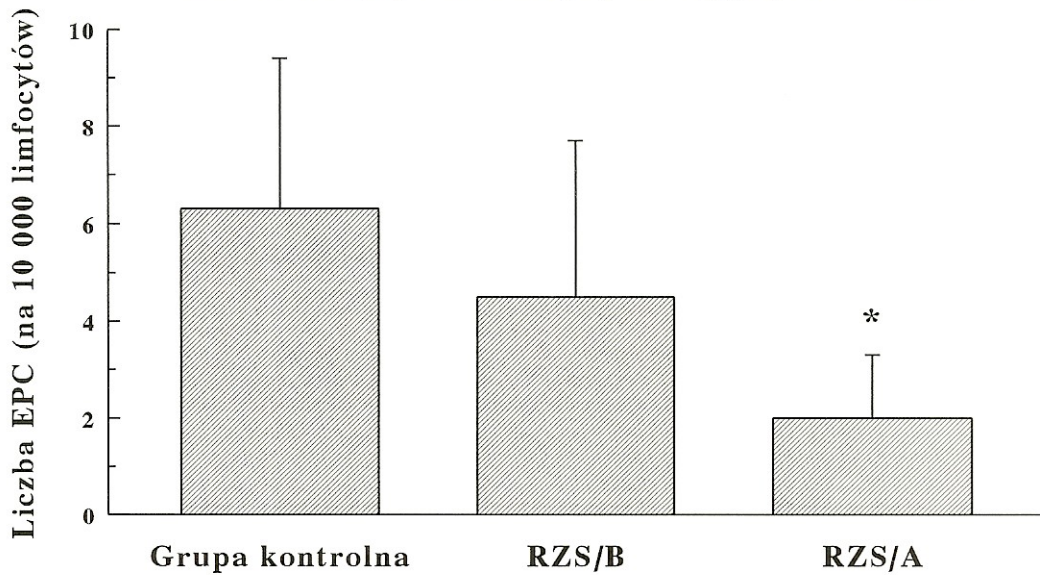
\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  w stosunku do grupy kontrolnej

**Ryc.5. Iloraz ADMA/L-arg a obecność (A) lub brak (B) miażdżycy t.szyjnych w RZS**



\*  $p < 0.05$  w stosunku do RZS/B i grupy kontrolnej

**Ryc.6. Liczebność EPC a obecność (A) lub brak (B) miażdżycy t.szyjnych w RZS**



\*  $p < 0.05$  w stosunku do RZS/B i grupy kontrolnej

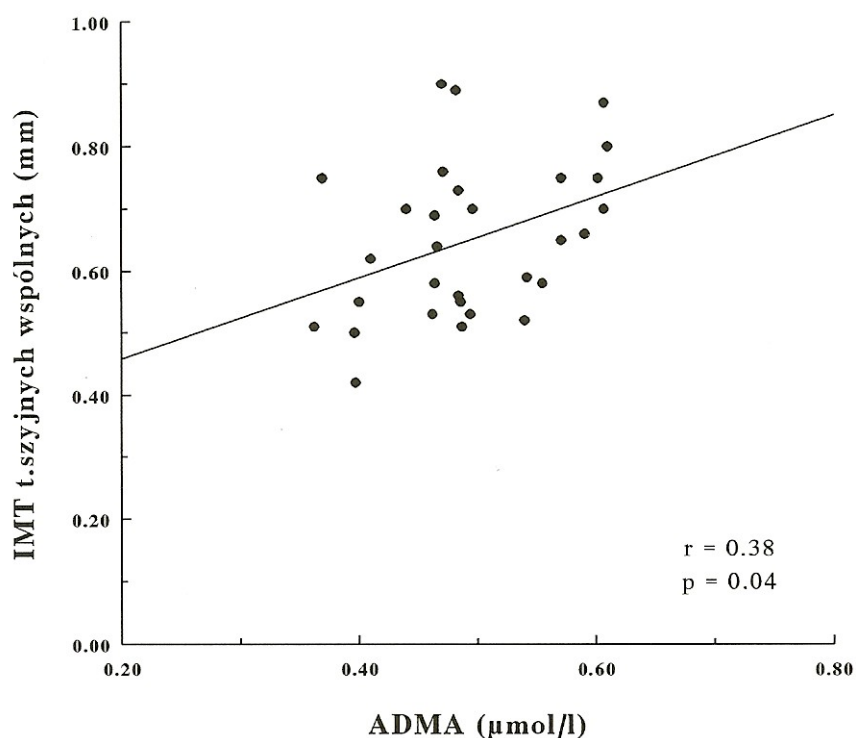
### 4.3. Analiza korelacyjna zmiennych powiązanych z IMT i liczebnością EPC

#### 4.3.1. Analiza jednoczynnikowa

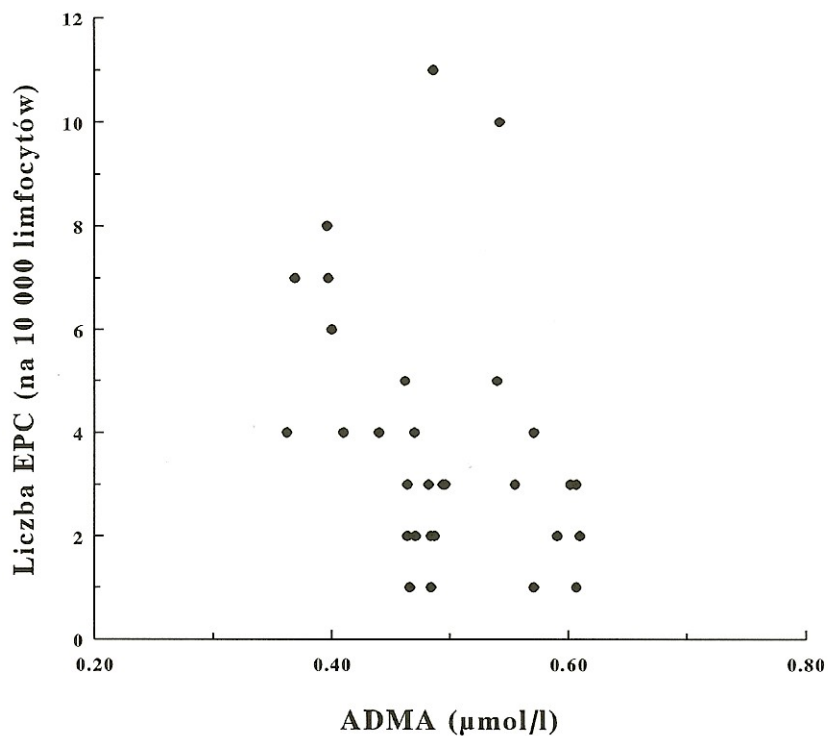
U chorych z RZS wartość IMT tętnic szyjnych wspólnych korelowała z ilorzem ADMA/L-arginina ( $r = 0.48$ ;  $p = 0.007$ ), wiekiem ( $r = 0.43$ ;  $p = 0.02$ ), stężeniem ADMA w osoczu ( $r = 0.38$ ;  $p = 0.04$ ) (ryc. 7) oraz liczebnością EPC ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.04$ ). Ponadto stwierdzono ujemną korelację liczebności EPC i poziomu ADMA ( $r = -0.41$ ;  $p = 0.02$ ) (ryc. 8a i 8b).

W grupie kontrolnej stwierdzono nieznamiennie trendy do zależności IMT tętnic szyjnych wspólnych od wieku ( $r = 0.39$ ;  $p = 0.09$ ) i poziomu ADMA ( $r = 0.36$ ;  $p = 0.12$ ). Nie obserwowano istotnej korelacji między IMT tętnic szyjnych a liczebnością EPC ( $p > 0.5$ ), a także pomiędzy w/wym. parametrami a innymi zmiennymi ( $p > 0.2$ ).

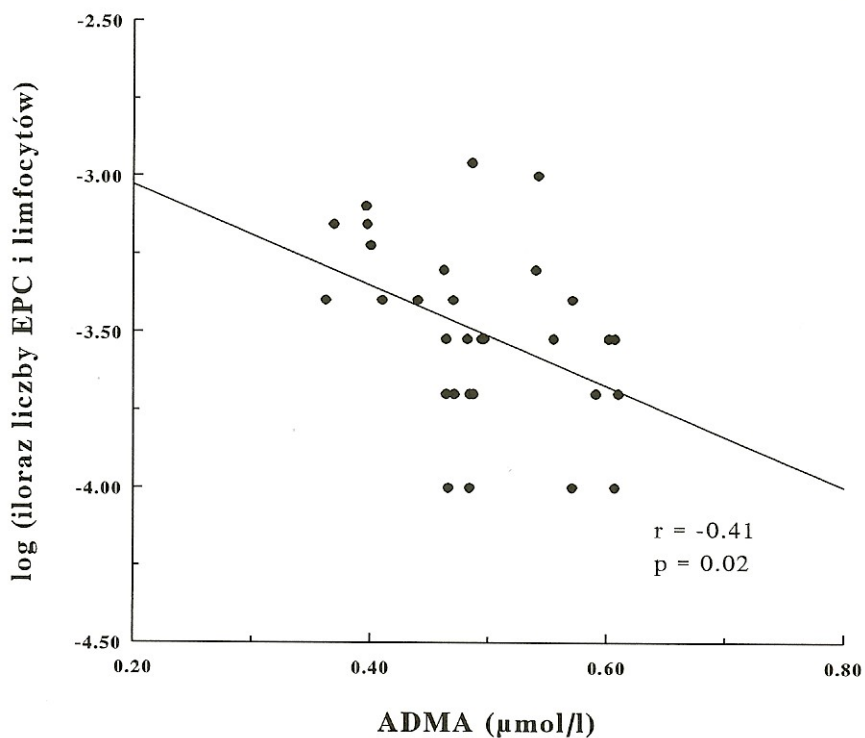
Ryc.7. IMT a poziom ADMA w RZS



**Ryc.8a. Liczba EPC a poziom ADMA w RZS**



**Ryc.8b. Liczba EPC a poziom ADMA w RZS po zlogarytmowaniu ilorazu EPC/limfocyty**



### 4.3.2. Analiza wieloczynnikowa

Za pomocą liniowej regresji wielokrotnej z krokowym doбором zmiennych zidentyfikowano iloraz ADMA/L-arginina ( $\beta = 0.41 \pm 0.15$ ;  $p = 0.01$ ) oraz liczebność EPC (po transformacji logarytmicznej) ( $\beta = -0.32 \pm 0.15$ ;  $p = 0.04$ ) jako parametry powiązane w sposób niezależny z IMT tętnic szyjnych wspólnych (tab. 7).

**Tab. 7. Parametry powiązane w sposób niezależny z IMT – wyniki liniowej regresji wielokrotnej z krokowym doбором zmiennych ( $R^2 = 0.42$ ,  $p = 0.002$ ,  $n = 30$ )**

	$\beta \pm \text{SEM}$	<b>p</b>
ADMA/L-arginina	$0.41 \pm 0.15$	0.01
Liczebność EPC [log (EPC)]	$-0.32 \pm 0.15$	0.04

Przedstawiono średnie standaryzowane współczynniki regresji ( $\beta$ ), wartości błędów standardowych tych średnich (SEM) oraz istotność statystyczną ( $p$ ) dla poszczególnych zmiennych obecnych w końcowym modelu regresji.

Przy pomocy analogicznej metody zidentyfikowano poziom ADMA w osoczu ( $\beta = -0.41 \pm 0.17$ ;  $p = 0.02$ ) jako jedyny parametr obecny w końcowym modelu regresji opisującej liczebność EPC (po transformacji logarytmicznej) ( $R^2 = 0.17$ ,  $p = 0.02$ ,  $n = 30$  dla ostatecznego modelu regresji).



## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Zagadnienia metodologiczne

Należy zaznaczyć, że w literaturze obecny jest pogląd, iż najbardziej miarodajną metodą oceny liczebności EPC we krwi jest hodowla komórek (George i wsp., 2006). Autorzy nie są jednak zgodni na temat wyboru najwłaściwszej metodologii *in vitro*. Rehman i wsp. (2003) poddali szczegółowej analizie jedną z tych metod polegającej na ocenie zdolności hodowanych komórek do adhezji do fibronektyny, obecności lektyny (*Ulex europaeus agglutinin I*) na ich powierzchni oraz zdolności w/wym. komórek do pochłaniania acetylowanej pochodnej LDL. Badacze ci wykazali, że komórki identyfikowane dotychczas (Vasa i wsp., 2001ab) jako EPC za pomocą powyższej metody są w zdecydowanej większości komórkami posiadające na powierzchni markery typowe dla monocytów/makrofagów i zaproponowali dla nich określenie „krążące komórki angiogenne” (*circulating angiogenic cells*) z uwagi na ich zdolność do wydzielania cytokin istotnych w procesie angiogenezy. Wydaje się, że najmniej kontrowersji wiąże się z analizą EPC poprzez pomiar liczebności kolonii komórek śródbłonna *in vitro* (*colony-forming units*). Jednakże ostatnio pojawił się pogląd, iż ocenę tej liczebności należy przeprowadzać nie po 7–9 dniach hodowli (jak postępowano wcześniej) (Hill i wsp., 2003), ale po 14–28 dniach (*late outgrowth endothelial progenitors*) (Gueven i wsp., 2006). George i wsp.

(2006) dokonali porównania liczby EPC definiowanych za pomocą różnych kryteriów opartych na cytometrii przepływowej z liczbą EPC zdefiniowaną na podstawie liczebności kolonii komórkowych. Okazało się, że wyniki uzyskane w ten sposób nie były zgodne, natomiast jedynie liczba EPC określonych jako komórki wykazujące ekspresję cząsteczek powierzchniowych CD34 i KDR (kryterium stosowane w niniejszych badaniach) korelowała z poziomem we krwi VEGF, mediatora biorącego udział w mobilizacji EPC ze szpiku kostnego do krwi. Skłoniło do cytowanych badaczy do sformułowania wniosku, że różne metody koncentrują się na odmiennych aspektach EPC. Mianowicie wyniki oparte na cytometrii przepływowej mają dostarczać informacji o liczebności populacji komórek, wśród których obecne są rzeczywiste EPC, podczas gdy na zdolność do tworzenia kolonii komórkowych *in vitro* wpływają – poza liczebnością EPC – także ich właściwości biologiczne, zwłaszcza zdolność do proliferacji.

Poza powyższymi wynikami Geoga i wsp. (2006) istnieje szereg innych przesłanek wskazujących na miarodajność wyników uzyskanych metodą cytometrii przepływowej. Po pierwsze, w badaniach prospektywnych (Werner i wsp., 2005), w których udowodniono wartość prognostyczną liczebności EPC w chorobie wieńcowej, posługiwano się kryterium definiującym EPC identycznym jak w niniejszych badaniach, czyli za EPC przyjmowano komórki wykazujące jednoczesną obecność cząsteczek powierzchniowych CD34 oraz KDR. W publikacji tej dokonano także oceny liczebności EPC przy użyciu hodowli komórkowej (poprzez uprzednio wspomniany pomiar liczby kolonii komórek śródbłonna – *colony-forming units*) w podgrupie 203 spośród 507 chorych, co przyniosło porównywalne wyniki. Co więcej, w cytowanej publikacji wnioski okazały się podobne również, gdy zdefiniowano EPC metodą cytometrii przepływowej na podstawie obecności cząsteczki powierzchniowej CD133 typowej dla komórek o mniejszej dojrzałości. Ponadto Vasa i wsp. (2001b), Thum i wsp. (2005) oraz Grisar i wsp. (2005) wykazali obniżenie liczebności EPC w porównaniu do grupy kontrolnej w chorobie niedokrwiennej serca oraz w RZS niezależnie od tego, czy posługiwali się cytometrią przepływową, czy metodami *in vitro*. Wreszcie obie te metody potwierdziły swą wartość w przypadku badania wpływu wysiłku fizycznego (Adams i wsp., 2004) oraz leczenia statynami (Vasa i wsp., 2001a) na liczebność EPC. Vasa i wsp. wykazali także, że istotna statystycznie zależność między EPC a czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego (2001b) oraz znamienny efekt terapii statynami (2001a) miały miejsce, gdy w metodzie cytometrycznej użyto kryterium podobnego jak w obecnych badaniach, podczas gdy powyższe efekty nie osiągnęły znamienności przy zdefiniowaniu EPC jako komórki CD133+ bądź CD34+/CD133+. Istotny przyczynek do wciąż frapującego badaczy problemu metodologii oceny liczebności EPC

stanowi niedawno opublikowana praca Fadiniego i wsp. (2006), którzy badali relację między IMT tętnic szyjnych u 137 osób bez klinicznych cech miażdżycy a różnymi populacjami komórek w cytometrii przepływowej. Okazało się, że jedynie liczebność komórek z cząsteczkami powierzchniowymi CD34 i KDR (CD34+/KDR+) wykazywała znamiennej ujemną korelację z wielkością IMT, podczas gdy istotności takiej korelacji nie stwierdzono dla komórek CD34+, CD133+, CD34+/CD133+, CD133+/KDR+ ani CD34+/CD133+/KDR+.

## 5.2. Podwyższenie poziomu ADMA w osoczu krwi chorych z RZS

Poszukując mechanizmów podwyższenia poziomu ADMA, należy wziąć pod uwagę zaburzenia zarówno powstawania, jak i degradacji ADMA. ADMA jest syntetyzowana w wyniku metylacji reszt L-argininy wchodzącej w skład łańcuchów polipeptydowych (Vallance & Leiper, 2004). Za powyższą reakcję chemiczną syntezy ADMA odpowiedzialna jest grupa enzymów określanych jako PRMT (*protein arginine N-methyltransferases*) typu I (Gary & Clarke, 1998). Natomiast uwolnienie wolnej ADMA następuje podczas degradacji białek, procesu zachodzącego w sposób ciągły w ustroju (Cantoni, 1975). Rozkład ADMA katalizowany jest przez specyficzny enzym, dwumetyloaminohydrolazę  $N^G, N^G$ -dwumetylo-L-argininy (DDAH, *N<sup>G</sup>, N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine dimethylaminohydrolase*) (Ogawa i wsp., 1989). Przyczyna podwyższonego stężenia ADMA w osoczu krwi może znajdować się na każdym z w/wym. etapów metabolizmu tego związku.

Zwiększenie ekspresji PRMT typu I obserwowano pod wpływem zmodyfikowanych przez utlenianie cząstek LDL za pośrednictwem wzmożonego stresu oksydacyjnego (Boeger i wsp., 2000b), który opisano także w RZS (Kaur & Halliwell, 1994; Remans i wsp., 2005). Stres oksydacyjny (Stuehlinger i wsp., 2001), zmodyfikowane cząstki LDL (Ito i wsp., 1999) oraz TNF $\alpha$  (Ito i wsp., 1999) hamują ponadto aktywność DDAH. Natomiast ekspresja DDAH spada w warunkach niedotlenienia (Millatt i wsp., 2003), zaś w RZS dochodzi do obniżenia ciśnienia parcjalnego tlenu w obrębie objętej procesem zapalnym błony maziowej stawów (Middleton i wsp., 2004). Ponadto komórki śródbłonna naczyń zaopatrujących błonę maziową wykazują sprzężone nasilenie procesów apoptozy i proliferacji (Middleton i wsp., 2004). Podczas apoptozy dochodzi do rozkładu białek, zaś – jak zaznaczono powyżej – uwalnianie ADMA następuje przy degradacji łańcuchów polipeptydowych. Należy podkreślić, że komórki śródbłonna *in vitro* generują ok. 2-krotnie więcej ADMA niż SDMA (Boeger i wsp., 2000a). W niniejszej rozprawie stwierdzono podwyższenie stężenia ADMA w RZS przy niezmiennym

poziomie SDMA, co czyni prawdopodobnymi w/wym. mechanizmy. Przedstawione hipotezy zgodne są bowiem ze znanymi faktami, że PRMT typu I uczestniczą w sposób wybiórczy w tworzeniu ADMA (Gary & Clarke, 1998), zaś DDAH katalizuje rozkład ADMA, pozostając bez wpływu na metabolizm SDMA (Ogawa i wsp., 1989). Ponadto związek metabolizmu ADMA z szybkością procesów katabolicznych został potwierdzony przez badania Marliss i wsp. (2006), którzy wykazali dodatnią zależność między stężeniem ADMA w osoczu krwi a szybkością ogólnoustrojowego metabolizmu białek. Jednakże autorzy ci stwierdzili podobną zależność tak dla ADMA, jak i SDMA, podczas gdy selektywna akumulacja ADMA w obecnej rozprawie sugeruje raczej wybiórcze zaburzenie metabolizmu ADMA.

Warto zaznaczyć, że dobór badanych grup pozwolił wykluczyć osoby z obecnością klinicznych cech miażdżycy, a także czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, jak nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, cukrzyca, hiperhomocysteinemia i niewydolność nerek. Dla wszystkich powyższych stanów opisywano uprzednio podwyższenie poziomu ADMA we krwi (Vallance i wsp., 1992; Boeger i wsp., 1997; Boeger i wsp., 1998; Surdacki i wsp., 1999; Abbasi i wsp., 2001; Holven i wsp., 2003; Lu i wsp., 2003). Ponadto pacjenci z RZS i grupa kontrolna nie różnili się w sposób istotny pod względem wieku i klirensu endogennej kreatyniny, kolejnych parametrów oddziałujących na stężenie krążącej ADMA (Kielstein i wsp., 2003; Marescau i wsp., 1997).

Nie da się wykluczyć, że leczenie metotreksatem aż 80 % pacjentów z RZS mogło wpłynąć na metabolizm ADMA. Metotreksat hamuje reduktazę kwasu dihydrofoliowego, czego następstwem jest niedobór N<sup>5</sup>-metylotetrahydrofolianu, co upośledza remetylację homocysteiny do metioniny (Fiskerstrand i wsp., 1997). Niedobór metioniny obniża stężenie S-adenozylometioniny, która jest donorem grupy metylowej w procesach metylacji, a zatem także w syntezie ADMA. Gdyby jednak przedstawiony mechanizm w sposób istotny wpływał na poziom ADMA w osoczu, można by się raczej spodziewać obniżenia stężenia ADMA w RZS, podczas gdy w rzeczywistości poziom ADMA okazał się podwyższony u tych chorych.

Wydaje się zatem, że nadmierna akumulacja ADMA we krwi chorych z RZS wynika nie z zaburzeń towarzyszących, ale z samej obecności tego stanu chorobowego, co zaobserwowano po raz pierwszy w toku niniejszych badań.

### **5.3. ADMA a aktywność szlaku syntezy NO i rozwój miażdżycy**

Przed sformułowaniem jakichkolwiek hipotez na temat patofizjologicznych konsekwencji nadmiernej akumulacji ADMA, kluczowy charakter ma kwestia, czy stężenia ADMA obserwowane w warunkach klinicznych nie są zbyt niskie, by w sposób istotny wpłynąć na aktywność w/wym. enzymu. Wartość stałej Michaelisa-Mentena śródbłonkowej syntazy NO dla L-argininy wynosi bowiem jedynie 2.9  $\mu\text{mol/l}$  (Pollock i wsp., 1991), czyli ok. 20-krotnie mniej niż stężenie L-argininy w osoczu. Wiadomo jednak, że pomimo tego egzogenna L-arginina wywołuje efekty biologiczne przypisywane zwiększonej generacji NO, co określa się mianem paradoksalnej odpowiedzi na L-argininę (*L-arginine paradox*) (Boeger & Bode-Boeger, 2001). Ponadto istnieją przesłanki, że ADMA w sposób ciągły moduluje aktywność szlaku syntezy NO.

Po pierwsze, w hodowlach komórek śródbłonka wewnątrzkomórkowe stężenie ADMA ok. 10-krotnie przewyższało poziom tego związku mierzony w płynie pozakomórkowym (Boeger i wsp., 2000a). U królika iloraz stężeń ADMA/L-arginina w osoczu wynosił ok. 1 : 70 (Bode-Boeger i wsp., 1996), podczas w komórkach śródbłonka naczyniowego jedynie ok. 1 : 7 (Azuma i wsp., 1995) Natomiast po dodaniu ADMA w określonym stężeniu do medium otaczającego hodowane komórki *endothelium*, śródkomórkowy poziom ADMA był wielokrotnie wyższy (Cardounel i wsp., 2007). Po drugie, doświadczenia *in vitro* dowodzą zdolności ADMA do wywoływania efektów biologicznych przy stężeniach ADMA porównywalnych do obserwowanych w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych (Vallance i wsp., 1992; Faraci i wsp., 1995; Goonasekera i wsp., 1997). Po trzecie, zwiększenie ekspresji (Dayoub i wsp., 2003) bądź hamowanie (MacAllister i wsp., 1996) aktywności DDAH, enzymu rozkładającego ADMA powoduje odpowiednio wzmożenie albo osłabienie generacji NO. Po czwarte, w warunkach klinicznych poziom ADMA (bądź iloraz stężeń ADMA/L-arginina) korelował ze stopniem zaawansowania miażdżycy, nasileniem dysfunkcji śródbłonka oraz obniżeniem biochemicznych wskaźników generacji NO (Boeger i wsp., 1997; Boeger i wsp., 1998; Fard i wsp., 2000; Lu i wsp., 2003; Piatti i wsp., 2003; Stuehlinger i wsp., 2003; Wang i wsp., 2006; Surdacki i wsp., 2007). Natomiast związek stężenia ADMA z IMT tętnic szyjnych stwierdzono zarówno w grupie zdrowych ochotników (Miyazaki i wsp., 1999), jak i u chorych z łagodną i umiarkowaną niewydolnością nerek (Nanayakkara i wsp., 2005) oraz u pacjentów przewlekle dializowanych, a zatem z wyraźnie podwyższonym poziomem ADMA (Zoccali i wsp., 2002). Wskazuje to na zdolność ADMA do modulacji procesu rozwoju miażdżycy w szerokim zakresie stężeń tego mediatora, a zatem obejmującym także podwyższenie poziomu ADMA w relatywnie niewielkim stopniu, jak obserwowane w obecnej rozprawie. Po piąte, stężenie ADMA w osoczu okazało się niezależnym parametrem

prognostycznym u chorych z chorobą niedokrwienną serca (Valkonen i wsp., 2001; Schnabel i wsp., 2005; Meinitzer i wsp., 2007) oraz terminalną niewydolnością nerek (Zoccali i wsp., 2001).

Przedstawione argumenty wskazują na istotną możliwość związku przyczynowego między nadmierną akumulacją ADMA a rozwojem miażdżycy.

#### **5.4. Związek podwyższonego stężenia ADMA z obniżeniem liczebności EPC we krwi chorych z RZS**

W roku 2003 grupa autorów niemieckich opublikowała pracę dowodzącą roli miejscowej generacji NO w mobilizacji EPC ze szpiku kostnego do krwi (Aicher i wsp., 2003). W myśl tej koncepcji pod wpływem VEGF dochodzi do aktywacji kinazy białkowej B (tzw. Akt) w śródbłonku naczyń włosowatych szpiku kostnego, co uruchamia sekwencję zdarzeń wiodących do wzmożenia uwalniania NO, który poprzez wzrost aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej typu 9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase-9*) stymuluje mobilizację EPC do krwi. Kluczową rolę w przedstawionym łańcuchu procesów odgrywa NO. Zostało to potwierdzone w różnych modelach eksperymentalnych obejmujących zwiększony wyrzut EPC ze szpiku kostnego do krwi w odpowiedzi na wysiłek fizyczny (Laufs i wsp., 2004), niedokrwienie mięśnia serca (Landmesser i wsp., 2004), a także stosowanie VEGF (Aicher i wsp., 2003), estrogenów (Iwakura i wsp., 2003) lub statyn (Landmesser i wsp., 2004). Można zatem założyć, że obserwowana w niniejszej rozprawie zależność między podwyższonym poziomem ADMA a stopniem obniżenia liczebności krążących EPC mogła wynikać ze zdolności ADMA do redukcji aktywności syntazy NO w szpiku, a konsekwencji z upośledzonej mobilizacji EPC do krwi.

Na powyższy mechanizm wskazuje także opublikowana w roku 2005 praca, w której Thum i wsp. stwierdzili niezależną ujemną korelację stężenia ADMA i liczebności EPC u chorych ze stabilną dusznicą bolesną poddanych diagnostyce inwazyjnej tętnic wieńcowych. Warto podkreślić, że w cytowanej pracy do oceny liczby EPC posłużono się dwoma niezależnymi metodami, czyli nie tylko cytometrią przepływową, ale także pomiarem liczebności kolonii komórkowych w warunkach hodowli *in vitro*, przy czym otrzymano podobne wyniki niezależnie od zastosowanej metody.

Stwierdzenie w obecnej rozprawie niezależnej ujemnej korelacji liczebności EPC z poziomem ADMA w osoczu stanowi uzupełnienie badań ostatnich 2 lat, które wykazały, że

niedobór tych komórek we krwi ma miejsce także u pacjentów z RZS, kolejnym stanem chorobowym związanym ze zwiększonym ryzykiem rozwoju miażdżycy. Za przyczynę niedoboru EPC we krwi uważa się wówczas zwiększoną akumulację tych komórek w zmienionej zapalnie błonie maziowej stawów (Ruger i wsp., 2004). Czynnikiem odpowiedzialnym za migrację EPC z krwi do *synovium* ma być gradient stężeń VEGF, uwalnianego w warunkach lokalnego spadku ciśnienia parcjalnego tlenu w maziówce reumatoidalnej. Przechodzenie VEGF do krwi powoduje zwiększenie jego poziomu w osoczu, stwierdzone w obecnej rozprawie oraz przez innych autorów u chorych z RZS o wysokiej aktywności (Ballara i wsp., 2004). Ponieważ VEGF stymuluje także mobilizację EPC do krwi ze szpiku kostnego, obniżenie liczebności EPC we krwi pomimo zwiększonego stężenia krążącego VEGF sugeruje przewagę migracji EPC do *synovium* nad ich mobilizacją ze szpiku. Ponadto nie da się wykluczyć, że proces mobilizacji EPC może być hamowany przez inne czynniki. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że może być za to odpowiedzialna nadmierna akumulacja ADMA we krwi chorych z RZS. Rozwijając rozważania przedstawione w poprzednim podrozdziale Dyskusji, można zatem sformułować wniosek, że upośledzenie mobilizacji EPC w szpiku kostnym stanowi kolejny mechanizm aterogennej nadmiernej akumulacji ADMA.

#### **5.5. Związek podwyższenia ilorazu ADMA/L-arginina oraz obniżonej liczebności EPC z wykładnikami procesu miażdżycowego u chorych z RZS**

Pacjenci z RZS i obecnością blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych wspólnych wykazywali zarówno podwyższenie ilorazu stężeń ADMA/L-arginina, jak i obniżenie liczebności krążących EPC. Ponadto w analizie wieloczynnikowej oba w/wym. parametry były powiązane z IMT w sposób niezależny, co przemawia za znaczeniem akumulacji ADMA i obniżonej liczebności EPC dla procesu rozwoju miażdżycy w RZS.

Powstaje pytanie, na jakiej drodze redukcja liczebności EPC może stymulować rozwój miażdżycy. W pierwszym rzędzie należy przytoczyć badania doświadczalne, które dowiodły udziału EPC w procesie regeneracji śródbłonna po jego eksperymentalnym uszkodzeniu (Walter i wsp., 2002; Iwakura i wsp., 2003; Laufs i wsp., 2004). Ponadto badania autopsyjne mężczyzn, u których wcześniej wykonano przeszczep serca od osób płci żeńskiej, wykazały obecność chromosomu Y z znaczącym odsetkiem komórek przeszczepu, w tym także w obrębie śródbłonna naczyniowego (Quaini i wsp., 2002; Minami i wsp., 2005). Dowodzi to, że pochodzące ze szpiku kostnego komórki rzeczywiście uczestniczą w ciągłej odnowie serca,

przy czym za regenerację śródbłonka naczyń wieńcowych odpowiada specyficzny rodzaj tych komórek, określanych jako EPC. Zatem można postawić hipotezę, że spadek liczebności EPC upośledza proces odnowy śródbłonka, co może sprzyjać jego dysfunkcji. Dysfunkcja śródbłonka pojawia się na wczesnym etapie rozwoju miażdżycy. Dysfunkcja śródbłonka naczyń wieńcowych stanowiła niekorzystny czynnik prognostyczny u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca bez krytycznych zwężeń w tętnicach wieńcowych (Al Suwaidi i wsp., 2000; Schaechinger i wsp., 2000). Co więcej, obecność tej dysfunkcji w określonym obszarze tętnicy wieńcowej poprzedzała pojawienie się w tym miejscu blaszki miażdżycowej (Schaechinger i wsp., 2000). Wydaje się zatem, że ogniwem łączącym zmniejszenie liczebności EPC z rozwojem miażdżycy jest upośledzenie czynności *endothelium*. Za przedstawionym mechanizmem przemawia również zaobserwowany przez Hilla i wsp. (2003) silniejszy związek stopnia zaawansowania dysfunkcji śródbłonka z obniżeniem liczebności EPC niż ze wskaźnikiem ryzyka wg skali Framingham u osób bez klinicznych cech miażdżycy, jednakże wykazujących obecność jej klasycznych czynników ryzyka. Ponadto późniejsze publikacje dowiodły redukcji liczebności EPC także u pacjentów z tzw. nietradycyjnymi czynnikami ryzyka również kojarzonymi się z dysfunkcją śródbłonka, jak hiperhomocysteinemia (Zhu i wsp., 2006) czy niewydolność nerek (Choi i wsp., 2004; de Groot i wsp., 2004). Można zatem sądzić, że liczebność EPC stanowi wypadkową wpływu nie tylko klasycznych, jak i nietradycyjnych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy. Co więcej, związek obniżonej liczebności EPC z wykładnikiem wczesnej aterogenezy (IMT tętnic szyjnych) u osób bez klinicznych cech miażdżycy (Fadini i wsp., 2006) potwierdza zaproponowaną wcześniej koncepcję, że niedobór EPC może przyspieszać rozwój miażdżycy poprzez upośledzenie odnowy śródbłonka naczyniowego z jego następową dysfunkcją. Na znaczenie liczebności EPC dla czynności śródbłonka wskazuje też niedawna publikacja Wassmanna i wsp. (2006), którzy w modelu eksperymentalnym dysfunkcji śródbłonka i przyspieszonej miażdżycy (myszy apoE<sup>-/-</sup>) wykazali poprawę funkcji *endothelium* utrzymującą się 7, 14 i 45 dni po serii 3 transfuzji dożylnych EPC izolowanych od zwierząt kontrolnych.

RZS jest kolejnym stanem chorobowym związanym z podwyższonym ryzykiem rozwoju miażdżycy, w którym opisano niedobór EPC we krwi (Grisar i wsp., 2005; Herbrig i wsp., 2006). Obecne badania stanowią dowód na rzecz słuszności hipotezy o powiązaniu liczebności EPC ze stopniem rozwoju miażdżycy w grupie chorych z RZS.

Fakt, że wielkość IMT powiązana była w sposób niezależny zarówno z podwyższeniem ilorazu ADMA/L-arginina, jak i obniżoną liczebnością EPC, pozwala przypuszczać, iż nadmierna akumulacja ADMA mogła stymulować rozwój miażdżycy także w sposób



niezależny od liczebności EPC. Hipotetyczny mechanizm takiego efektu mógłby wynikać z udowodnionych mechanizmów aterogenego działania ADMA. ADMA zmniejsza biodostępność L-argininy, naturalnego substratu śródbłonkowej syntazy NO. Spadek biodostępności L-argininy nie tylko powoduje obniżenie uwalniania NO, mediatora przeciwdziałającego rozwojowi miażdżycy, ale także sprzyja generacji anionu ponadtlenkowego przez w/wym. enzym (Klatt i wsp., 1993). Działając na tej zasadzie, ADMA w stężeniu 10  $\mu\text{mol/l}$  nasilała tworzenie anionu ponadtlenkowego w komórkach śródbłonka naczyniowego, co prowadziło do aktywacji zależnego od stresu oksydacyjnego (Marui i wsp., 1993) szlaku transkrypcyjnego kontrolowanego przez czynnik jądrowy  $\kappa\text{B}$  (*nuclear factor  $\kappa\text{B}$* ) z następową wzmożoną generacją białka o działaniu chemotaktycznym (chemokiny) odpowiadającej za wczesny etap interakcji między monocytami a śródbłonkiem (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) (Boeger i wsp., 2000a). Do powyższego efektu ADMA mógł przyczyniać się także bezpośrednio niedobór NO, gdyż wiadomo, iż NO hamuje aktywność czynnika jądrowego  $\kappa\text{B}$  m.in. przez indukcję i stabilizację jego inhibitora (Peng i wsp., 1995; De Caterina i wsp., 1995). Ponadto obserwowano 2–3-krotne wzmożenie zdolności monocytów i limfocytów T do adhezji do *endothelium* po inkubacji w/wym. komórek z komórkami śródbłonkowymi uprzednio pozostającymi w obecności ADMA i L-argininy przy ilorazie stężeń tych związków odpowiadających wartościom mierzonym w warunkach fizjologicznych i u chorych z hipercholesterolemią (Chan i wsp., 2000). Zjawisko przylegania monocytów do *endothelium* ma zaś zasadnicze znaczenie dla wczesnych etapów rozwoju miażdżycy, procesu o charakterze zapalnym (Ross, 1999; Quehenberger, 2005). Kolejne prace przyniosły odkrycie nowych szlaków aterogenego działania ADMA. ADMA w stężeniu 5  $\mu\text{mol/l}$  powodowała (w wyniku redukcji generacji NO) wcześniejsze pojawienie się cech starzenia w hodowli pasażowanych komórek śródbłonka, a także przyśpieszenie ściśle związanego z procesem starzenia komórkowego skracania się końcowych odcinków chromosomów (tzw. telomerów), hamując aktywność kompleksu enzymatycznego określanego mianem telomerazy (Scalera i wsp., 2004). Starzenie się komórek oznacza utratę ich zdolności do podziałów oraz wzmożoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych, zaś endogenne NO przeciwdziała temu procesowi, zapobiegając apoptozie komórek *endothelium* i stymulując ich proliferację (Cooke, 2003), a także zwiększając aktywność telomerazy (Vasa i wsp., 2000). Zatem podwyższenie poziomu ADMA sprzyja zaburzeniu równowagi między apoptozą a odnową warstwy śródbłonka naczyniowego (Jang i wsp., 2000; Cooke, 2006).

Akumulacja ADMA może także stymulować rozwój miażdżycy w sposób niezależny wprawdzie od liczebności EPC, lecz powiązany z ich aktywnością biologiczną, określaną poza

liczebnością także przez zdolność EPC do migracji, proliferacji i różnicowania. Udowodniono mianowicie, że osłabienie aktywności EPC inkubowanych w obecności zmodyfikowanych przez utlenianie cząstek LDL (Imanishi i wsp., 2003; Ma i wsp., 2006) bądź CRP (Verma i wsp., 2004) związane było z obniżeniem generacji NO, zaś zdolność L-argininy i rosiglitazonu do hamowania w/wym. niekorzystnych efektów wynikała z przywrócenia aktywności szlaku syntezy NO. Dowodzi to, że NO nie tylko kontroluje mobilizację EPC ze szpiku kostnego do krwi, ale także reguluje ich właściwości. Na znaczenie generacji NO w obrębie EPC wskazują także dane Thuma i wsp. (2005), którzy opisali hamowanie proliferacji i różnicowania EPC w obecności ADMA w stężeniu 5  $\mu\text{mol/l}$ , przy czym dla jednego z mierzonych parametrów (rozmiaru kolonii komórkowych) znamienny efekt występował już przy stężeniu ADMA 1  $\mu\text{mol/l}$ . Ponadto Azuma i wsp. (1995) zaobserwowali, że w zregenerowanych komórkach śródbłonna tętnicy szyjnej królika po eksperymentalnym uszkodzeniu jej śródbłonna iloraz stężeń ADMA/L-arginina wynosił 1.5 : 1, podczas gdy w komórkach kontrolnych nie przekraczał 1 : 7. Przyjmując uprzednio przedstawioną koncepcję roli EPC w regeneracji śródbłonna (Walter i wsp., 2002; Iwakura i wsp., 2003; Laufs i wsp., 2004), stanowi to kolejny argument na rzecz zdolności ADMA do modulacji odnowy *endothelium*, a tym samym do oddziaływania na szybkość rozwoju miażdżycy poprzez wpływ na właściwości biologiczne krążących EPC. Z drugiej strony jednak Hoetzer i wsp. (2005) nie stwierdzili zahamowania migracji bądź różnicowania EPC po zablokowaniu syntezy NO.

Należy podkreślić, że istotnym ograniczeniem powyższych hipotez jest wnioskowanie na podstawie stwierdzenia jedynie znamiennej statystycznie korelacji. Obecność korelacji nie dowodzi bowiem związku przyczynowego. Pozorność związku przyczynowego pomimo obecności korelacji ma miejsce wówczas, gdy oba skorelowane zjawiska są wtórne do innego zjawiska nie uwzględnionego w analizie korelacyjnej. U pacjentów z RZS czynnikiem takim mogłaby być aktywacja procesu zapalnego, którego wykładnikiem jest poziom CRP. CRP nie tylko jest wskaźnikiem aktywności zapalnej, ale także począwszy od stężenia 5 mg/l wywołuje bezpośredni efekt prozapalny na poziomie *endothelium* w warunkach *in vitro* (Pasceri i wsp., 2000), zaś już w stężeniu 15 mg/l upośledza różnicowanie EPC oraz nasila ich apoptozę (Verma i wsp., 2004). U badanych chorych z RZS rozpiętość między 25-tym a 75-tym percentylem poziomu CRP wynosiła 1.6–37.4 mg/l przy wartości mediany 12.0 mg/l, co nie pozwala wykluczyć przedstawionych mechanizmów. Gdyby jednak zależność między liczebnością EPC a wykładnikami rozwoju miażdżycy była wtórna do poziomu CRP, można by się spodziewać, że zostałyby to wykryte w analizie wieloczynnikowej. Nie stwierdzono jednak takiej zależności, co potwierdza doniesienia o braku korelacji między stężeniem CRP a

liczebnością EPC u chorych z RZS (Grisar i wsp., 2005; Herbrig i wsp., 2006) oraz u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca (Schmidt-Lucke i wsp., 2005). Zależność liczebności EPC od CRP jest najprawdopodobniej zagadnieniem złożonym, gdyż opisano nie ujemną, ale dodatnią korelację tych parametrów u chorych z niestabilną dusznicą bolesną (George i wsp., 2004). Może dowodzić to, że odmienne mechanizmy dominują w przypadku ewentualnej modulacji przez CRP procesu mobilizacji EPC ze szpiku kostnego, zaś inne odgrywały rolę przy bezpośrednim efekcie CRP na właściwości biologiczne EPC w przedstawionych powyżej badaniach *in vitro*.

Kolejnym mechanizmem mogącym nie tylko odpowiadać za korelację między IMT a EPC, ale także tłumaczyć powiązanie obu tych parametrów z akumulacją ADMA, jest koncepcja wysunięta przez Hilla i wsp. (2003). Zaproponowali oni, że obniżenie liczebności EPC w stopniu proporcjonalnym do dysfunkcji śródbłonna może wynikać z nasilonego zużycia krążących EPC w procesach odnowy *endothelium*. Z kolei przyśpieszenie procesów odnowy śródbłonna miałyby być skutkiem wzmożonego działania czynników uszkadzających śródbłonek, a tym samym odpowiedzialnych za jego dysfunkcję, a w dłuższej perspektywie również rozwój miażdżycy. Rozwijając dalej powyższą hipotezę, podwyższenie poziomu ADMA byłoby skutkiem zwiększonego obrotu komórek śródbłonna naczyniowego, gdyż – jak wspomniano wcześniej – ADMA jest uwalniana przy degradacji białek zawierających metylowane reszty L-argininy (Cantoni, 1975). Zakładając prawdziwość powyższych rozważań, nasilenie procesów apoptozy śródbłonna miałyby być procesem odpowiedzialnym za przyśpieszenie aterogenezy, podwyższenie poziomu ADMA oraz nasilone zużycie EPC w związku z koniecznością przyśpieszonej odnowy *endothelium*. Może to teoretycznie tłumaczyć wzajemne powiązania między wskaźnikami zaawansowania procesu miażdżycowego, poziomem ADMA oraz liczebnością EPC we krwi nawet przy braku związku przyczynowego między rozwojem miażdżycy a liczebnością EPC oraz poziomem ADMA.

Przeciwko przedstawionemu rozumowaniu przemawiają jednak badania eksperymentalne i kliniczne. Gdyby bowiem obniżona liczebność EPC była pozbawiona znaczenia patofizjologicznego i klinicznego, mając jedynie charakter wtórny do dysfunkcji śródbłonna, można by się spodziewać braku jakichkolwiek korzystnych efektów po transfuzji EPC. Jednakże, jak wspomniano wcześniej, Wassmann i wsp. (2006) wykazali utrzymującą się do 45 dni poprawę czynności śródbłonna po serii 3 transfuzji EPC u myszy apoE<sup>-/-</sup>. Natomiast grupa autorów niemieckich przedstawiła ostatnio korzystne wyniki dowieńcowego podania izolowanych ze szpiku kostnego autologicznych komórek progenitorowych (zawierających także EPC) w 3–7 dobie zawału mięśnia serca leczonego skuteczną pierwotną angioplastyką

wieńcową (Erbs i wsp., 2006; Schaechinger i wsp., 2006abc). Wyniki te obejmowały zarówno oceniany po 4 miesiącach wzrost rezerwy przepływu wieńcowego w zakresie tętnicy dozawałowej (Erbs i wsp., 2006; Schaechinger i wsp., 2006a), jak i poprawę rokowania w obserwacji 12-miesięcznej (Schaechinger i wsp., 2006bc).

## **5.6. Konsekwencje kliniczne zaobserwowanych zależności**

Związek EPC z IMT tętnic szyjnych, wskaźnikiem wczesnego etapu rozwoju miażdżycy, dowodzi roli obniżenia liczebności tych komórek z procesem aterogenezy u pacjentów z RZS. Wobec powyższego można się spodziewać wzrostu liczby EPC pod wpływem leków zmniejszających ryzyko sercowo-naczyniowe w RZS. Istnieją doniesienia, że spośród DMARDs skuteczny w tym aspekcie może być metotreksat (Choi i wsp., 2002) oraz antagoniści TNF $\alpha$  (Jacobsson i wsp., 2004). W RZS z umiarkowaną bądź wysoką aktywnością choroby ( $DAS_{28} \geq 3.2$ ) Grisar i wsp. (2005) zaobserwowali podobną do grupy kontrolnej liczebność EPC jedynie u chorych leczonych antagonistami TNF $\alpha$ , podczas gdy u pacjentów otrzymujących inne DMARDs (w tym metotreksat) liczebność ta była obniżona. Co więcej, Ablin i wsp. (2006) stwierdzili wzrost liczebności EPC skorelowany ze spadkiem wskaźnika  $DAS_{28}$  14 dni po włączeniu do terapii antagonisty TNF $\alpha$ . Przytoczone wyniki zgodne są z wcześniejszymi wynikami Huerlimanna i wsp. (2002), którzy wykazali poprawę czynności śródbłonna 12 tygodni po zastosowaniu antagonisty TNF $\alpha$  u chorych z RZS i wysoką aktywnością choroby pomimo uprzedniej terapii metotreksatem i prednisolonem. Korzystny wpływ antagonistów TNF $\alpha$  na funkcję śródbłonna i liczebność EPC ma konsekwencje kliniczne dla chorych z RZS, gdyż badania Jacobssona i wsp. (2005) wskazują na zdolność tych leków do redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego.

Szczególną rolę przypisuje się w ostatnich latach tzw. plejotropowym efektom statyn. Wciąż pojawiają się publikacje na temat mechanizmów tłumaczących udowodnione efekty statyn w prewencji pierwotnej i wtórnej choroby niedokrwiennej serca. Vasa i wsp. (2001a) wykazali ok. 3-krotny wzrost liczebności EPC 3–4 tygodnie po wdrożeniu leczenia statynami u pacjentów z udokumentowaną angiograficznie chorobą wieńcową. Wydaje się, że korzystne efekty statyn wykraczają poza tradycyjny obszar zainteresowania kardiologii. W

wieloośrodkowym randomizowanym badaniu TARA (*Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis*) zaobserwowano poprawę klinicznych i biochemicznych wykładników aktywności choroby w pacjentów z RZS 6 miesięcy po włączeniu 40 mg atorwastatyny w stosunku do grupy otrzymującej placebo (McCarey i wsp., 2004). Natomiast Hermann i wsp. (2005) stwierdzili poprawę funkcji śródbłonna u chorych z RZS po zastosowaniu innego leku z grupy statyn, simwastatyny w dawce 40 mg dziennie przez 4 tygodnie. Można postawić hipotezę, iż o ile leki z tej grupy korygują czynność śródbłonna w RZS, mogą one także podwyższać liczebność EPC analogicznie do przytoczonych badań u pacjentów z chorobą wieńcową (Vasa i wsp., 2001a).

Nie jest natomiast rozstrzygnięta kwestia ewentualnego wpływu statyn na stężenie ADMA we krwi. Dotychczasowe publikacje wskazują raczej na brak takiego efektu. Zachodzi jednak możliwość, że mogą istnieć różnice między poszczególnymi lekami z tej grupy w omawianym aspekcie. Mianowicie wykazano spadek poziomu ADMA po zastosowaniu rosuwastatyny (Lu i wsp., 2004) przy braku efektów simwastatyny, prawastatyny i atorwastatyny (Eid i wsp., 2003; Paiva i wsp., 2003; Pereira i wsp., 2003; Shinohara i wsp., 2005). Zatem dalsze badania są niezbędne w celu poznania tego zagadnienia o potencjalnym znaczeniu klinicznym obejmującym także chorych z RZS.

## 6. WNIOSKI

1. U chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów o umiarkowanej lub wysokiej aktywności choroby bez klinicznych wykładników patologii układu sercowo-naczyniowego ani tradycyjnych czynników ryzyka poziom asymetrycznej N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dwumetylo-L-argininy (endogennego inhibitora syntezy tlenku azotu) w osoczu krwi jest podwyższony przy niezmiennym stężeniu L-argininy (substratu w procesie generacji tlenku azotu).

2. Nadmierna akumulacja asymetrycznej N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dwumetylo-L-argininy we krwi chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów koreluje ze stopniem obniżenia liczebności pochodzących ze szpiku kostnego krążących prekursorów komórek śródbłonna naczyniowego, którym przypisuje się udział w ciągłej odnowie *endothelium*.

3. W reumatoidalnym zapaleniu stawów obniżenie liczebności krążących prekursorów komórek śródbłonna oraz zaburzenie równowagi między endogennym inhibitorem a substratem w reakcji syntezy tlenku azotu stanowią parametry powiązane w sposób niezależny z grubością kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnic szyjnych wspólnych, wskaźnikiem zaawansowania wczesnej fazy rozwoju miażdżycy. Ponadto powyższe zaburzenia obecne są w sposób wybiórczy u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazujących obecność blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych.

4. Zaburzenie równowagi między endogennym inhibitorem a substratem w reakcji syntezy tlenku azotu może przyczyniać się do przyspieszonego rozwoju miażdżycy u chorych z

reumatoidalnym zapaleniem stawów, częściowo w wyniku upośledzenia mobilizacji prekursorów komórek śródbłonna ze szpiku kostnego – procesu zależnego od tlenu azotu.

## 7. STRESZCZENIE

U chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) rozwój miażdżycy jest przyspieszony, co powoduje zwiększone ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych. Powyższe zjawiska, podobnie jak dysfunkcja śródbłonna naczyniowego w RZS (wczesny etap rozwoju miażdżycy) są jedynie częściowo tłumaczone przez tradycyjne czynniki ryzyka. Przyjmuje się, że pochodzące ze szpiku kostnego prekursory komórek śródbłonna (EPC, *endothelial progenitor cells*) uczestniczą w ciągłej odnowie *endothelium*.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że zaawansowanie procesu miażdżycowego w RZS i liczebność EPC we krwi mogą być powiązane z podwyższonym stężeniem we krwi asymetrycznej N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dwumetylo-L-argininy (ADMA, *asymmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine*) – endogennego inhibitora syntezy tlenu azotu (NO, *nitric oxide*).

Badaniami objęto 30 chorych (25 kobiet, 5 mężczyzn; średni wiek 47 ± 12 lat; średni czas trwania choroby 5.1 ± 4.4 lat) z RZS o wysokiej bądź umiarkowanej aktywności schorzenia. Wszyscy pacjenci otrzymywali nie zmieniony zestaw leków modyfikujących przebieg choroby przez co najmniej 3 miesiące. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych osób porównywalnych z pacjentami z RZS pod względem wieku, płci i wskaźnika masy ciała. Kryteria wyłączenia z badań (wspólne dla obu grup) obejmowały m.in. kliniczne wykładniki patologii układu sercowo-naczyniowego, palenie tytoniu, ciśnienie tętnicze krwi ≥ 140/90 mmHg, hiperlipidemię, cukrzycę lub podwyższenie glikemii na czczo, hiperhomocysteinemię, wskaźnik masy ciała > 30 kg/m<sup>2</sup>, klirens kreatyniny endogennej < 60 ml/min, przedwczesne występowanie choroby niedokrwiennej serca u krewnych I-go stopnia.

Liczebność EPC we krwi zmierzono przy użyciu cytometrii przepływowej. Za EPC przyjęto komórki wykazujące ekspresję cząsteczek powierzchniowych CD34 oraz receptorów typu 2 dla śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń. Liczbę EPC wyrażono jako odsetek

komórek w bramce dla limfocytów. Pomiar stężenia substratu (L-arginina) i endogennego antagonisty syntezy tlenku azotu (ADMA) oraz jego izomeru (SDMA, *symmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine*) w osoczu krwi wykonano metodą chromatografii cieczowej/ spektrometrii masowej. Średnią grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej (IMT, *intima-media complex thickness*) zmierzono ultrasonograficznie na odcinku o długości 1.5 cm przed rozwidleniem tętnic szyjnych wspólnych. Mierzone parametry porównano między grupą kontrolną a 2 grupami chorych z RZS wyodrębnionymi na podstawie obecności (RZS/A, n = 8) bądź braku (RZS/B, n = 22) blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych wspólnych.

W stosunku do grupy kontrolnej pacjenci z RZS wykazywali znamienne podwyższony poziom ADMA w osoczu krwi ( $0.49 \pm 0.07$  vs.  $0.40 \pm 0.07$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0.001$ ), obniżoną liczebność EPC ( $0.039 \pm 0.025$  vs.  $0.063 \pm 0.035$  %;  $p < 0.05$ ) oraz zwiększoną wartość IMT tętnic szyjnych ( $0.65 \pm 0.13$  vs.  $0.55 \pm 0.10$  mm;  $p < 0.01$ ). Stężenia SDMA ( $0.42 \pm 0.08$  vs.  $0.41 \pm 0.06$   $\mu\text{mol/l}$ ) i L-argininy ( $69 \pm 19$  vs.  $63 \pm 16$   $\mu\text{mol/l}$ ) nie różniły się w sposób istotny w obu grupach. W grupie RZS/A iloraz stężeń ADMA/L-arginina okazał się znamienne podwyższony w stosunku do grupy RZS/B ( $0.0092 \pm 0.0028$  vs.  $0.0069 \pm 0.0013$ ;  $p < 0.05$ ) oraz grupy kontrolnej ( $0.0092 \pm 0.0028$  vs.  $0.0068 \pm 0.0019$ ;  $p < 0.05$ ). Natomiast liczebność EPC była znamienne obniżona w grupie RZS/A względem RZS/B ( $0.020 \pm 0.013$  vs.  $0.045 \pm 0.032$  %;  $p < 0.05$ ) i grupy kontrolnej ( $0.020 \pm 0.013$  vs.  $0.063 \pm 0.035$  %;  $p < 0.05$ ).

U chorych z RZS wartość IMT tętnic szyjnych korelowała z ilorazem ADMA/L-arginina ( $r = 0.48$ ;  $p = 0.007$ ), wiekiem ( $r = 0.43$ ;  $p = 0.02$ ), stężeniem ADMA w osoczu ( $r = 0.38$ ;  $p = 0.04$ ) oraz liczebnością EPC ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.04$ ). Ponadto stwierdzono ujemną korelację liczebności EPC i poziomu ADMA ( $r = -0.41$ ;  $p = 0.02$ ). Przy pomocy liniowej regresji wielokrotnej z krokowym doбором zmiennych zidentyfikowano iloraz ADMA/L-arginina ( $\beta = 0.41 \pm 0.15$ ;  $p = 0.01$ ) oraz liczebność EPC ( $\beta = -0.32 \pm 0.15$ ;  $p = 0.04$ ) jako parametry powiązane w sposób niezależny z wielkością IMT tętnic szyjnych u pacjentów z RZS ( $R^2 = 0.42$ ,  $p = 0.002$ ). Poziom ADMA w osoczu ( $\beta = -0.41 \pm 0.17$ ;  $p = 0.02$ ) był jedynym parametrem obecnym w końcowym modelu regresji opisującym liczebność EPC u chorych z RZS ( $R^2 = 0.17$ ,  $p = 0.02$ ).

Uzyskane wyniki sugerują, że:

1. Stężenie ADMA (endogennego inhibitora syntezy NO) w osoczu krwi jest podwyższone u chorych z RZS bez klinicznych wykładników patologii układu sercowo-naczyniowego ani tradycyjnych czynników ryzyka.
2. Nadmierna akumulacja ADMA we krwi chorych z RZS koreluje ze stopniem obniżenia liczebności EPC we krwi.



3. Obniżenie liczebności EPC oraz zaburzenie równowagi między ADMA a L-argininą w RZS stanowią parametry powiązane w sposób niezależny z IMT tętnic szyjnych, wskaźnikiem zaawansowania wczesnej fazy rozwoju miażdżycy. Powyższe zaburzenia obecne są w sposób wybiórczy u pacjentów z RZS i obecnością blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych.
4. Zaburzenie równowagi między substratem (L-arginina) a endogennym inhibitorem (ADMA) w procesie generacji NO może przyczyniać się do przyspieszonego rozwoju miażdżycy u chorych z RZS, częściowo w wyniku upośledzenia mobilizacji EPC ze szpiku kostnego – procesu zależnego od NO.

## 8. SUMMARY

Patients with rheumatoid arthritis (RA) exhibit accelerated atherogenesis with consequent excessive cardiovascular mortality risk. This phenomena and endothelial dysfunction, an antecedent of plaque development, are only partially explained by traditional atherosclerotic risk factors. Bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPC) are assumed to participate in continuous endothelial renewal.

Our aim was to validate the hypothesis that indices of early atherosclerosis and blood EPC count may be linked to abnormal plasma levels of an endogenous inhibitor of nitric oxide (NO) synthesis, asymmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine (ADMA).

We studied 30 RA patients (25 women, 5 men; mean age 47 ± 12 years; mean disease duration 5.1 ± 4.4 years) with moderate-to-high disease activity. All patients were receiving an unchanged therapeutic regimen based on disease-modifying antirheumatic drugs for ≥ 3 months. Twenty healthy subjects matched for age, sex and body mass index served as controls. Exclusion criteria (common for both groups) included clinical evidence of cardiovascular disease, smoking habit, blood pressure ≥ 140/90 mmHg, hyperlipidaemia, diabetes mellitus or impaired fasting glucose, hyperhomocysteinaemia, body mass index > 30 kg/m<sup>2</sup>, endogenous creatinine clearance < 60 ml/min, a family history of premature coronary artery disease in first-degree relatives.

EPC in blood – defined as cells expressing both CD34 and vascular endothelial growth factor type 2 receptor – were enumerated by flow cytometry. EPC count was calculated as a percentage of cells in the lymphocyte gate. Plasma levels of the substrate (L-arginine), endogenous inhibitor of NO synthesis (ADMA) and its stereoisomer (SDMA, symmetric N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethyl-L-arginine) were measured by liquid chromatography/mass spectrometry. Mean intima-media thickness (IMT) of the common carotid arteries was estimated by B-mode ultrasonography within a 1.5-cm segment immediately caudal to the carotid bulb. Intergroup

comparisons were performed between healthy controls and RA patients divided on the basis of presence (RA/A, n = 8) or absence (RA/B, n = 22) of carotid plaques.

With the reference to the control group, RA patients exhibited significantly elevated plasma ADMA levels ( $0.49 \pm 0.07$  vs.  $0.40 \pm 0.07$   $\mu\text{mol/l}$  for RA and controls, respectively;  $p < 0.001$ ), a depressed EPC count ( $0.039 \pm 0.025$  vs.  $0.063 \pm 0.035$  %;  $p < 0.05$ ) and increased carotid IMT ( $0.65 \pm 0.13$  vs.  $0.55 \pm 0.10$  mm;  $p < 0.01$ ). There were no significant intergroup differences in concentrations of SDMA ( $0.42 \pm 0.08$  vs.  $0.41 \pm 0.06$   $\mu\text{mol/l}$  for RA and controls, respectively) and L-arginine ( $69 \pm 19$  vs.  $63 \pm 16$   $\mu\text{mol/l}$ ). RA/A subjects exhibited elevated ADMA/L-arginine ratio as compared to either RA/B patients ( $0.0092 \pm 0.0028$  vs.  $0.0069 \pm 0.0013$ ;  $p < 0.05$ ) or healthy controls ( $0.0092 \pm 0.0028$  vs.  $0.0068 \pm 0.0019$ ;  $p < 0.05$ ). EPC number was decreased in RA/A subjects with respect to RA/B patients ( $0.020 \pm 0.013$  vs.  $0.045 \pm 0.032$  %;  $p < 0.05$ ) and the control group ( $0.020 \pm 0.013$  vs.  $0.063 \pm 0.035$  %;  $p < 0.05$ ).

In RA carotid IMT correlated with ADMA/L-arginine ratio ( $r = 0.48$ ;  $p = 0.007$ ), age ( $r = 0.43$ ;  $p = 0.02$ ), plasma ADMA level ( $r = 0.38$ ;  $p = 0.04$ ) and EPC count ( $r = -0.38$ ;  $p = 0.04$ ). Additionally, ADMA concentrations were inversely related to EPC number ( $r = -0.41$ ;  $p = 0.02$ ). Forward stepwise multiple linear regression identified ADMA/L-arginine ratio ( $\beta = 0.41 \pm 0.15$ ;  $p = 0.01$ ) and EPC count ( $\beta = -0.32 \pm 0.15$ ;  $p = 0.04$ ) as independent determinants of carotid IMT in RA patients ( $R^2 = 0.42$ ,  $p = 0.002$ ). Plasma ADMA level ( $\beta = -0.41 \pm 0.17$ ;  $p = 0.02$ ) was the only variable which entered the final regression equation describing EPC number ( $R^2 = 0.17$ ,  $p = 0.02$ ).

These results suggest that:

1. Plasma levels of ADMA, an endogenous NO synthesis inhibitor, are elevated in RA patients without cardiovascular disease or traditional risk factors.
2. The degree of EPC depletion in blood of RA patients is parallel to the magnitude of excessive ADMA accumulation.
3. In RA blood EPC depletion and elevated plasma ADMA/L-arginine ratio are independently related to carotid IMT, an index of early atherosclerosis. These abnormalities are also associated with the presence of carotid plaques in RA patients.
4. The imbalance between the substrate (L-arginine) and endogenous inhibitor of NO synthesis (ADMA) may contribute to accelerated atherogenesis in RA, which can partially be due to impaired mobilization of EPC from the bone marrow, a NO-dependent process.

## 9. PIŚMIENICTWO

Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001; 88:1201-3.

Ablin JN, Boguslavski V, Aloush V, Elkayam O, Paran D, Caspi D, George J. Effect of anti-TNFalpha treatment on circulating endothelial progenitor cells (EPCs) in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2006; 79:2364-9.

Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:684-90.

Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9:1370-6.

Al Suwaidi J, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101:948-54.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-7.

Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E, Obayashi S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1995; 115:1001-4.

Ballara S, Taylor PC, Reusch P, Marme D, Feldmann M, Maini RN, Paleolog EM. Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive change in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2055-64.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95:764-72.

Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1637-41.

Bloom BJ, Miller LC, Tucker LB, Schaller JG, Blier PR. Soluble adhesion molecules in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26:2044-8.

Bode-Boeger SM, Boeger RH, Kienke S, Junker W, Froelich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219:598-603.

Boeger RH, Bode-Boeger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41:79-99.

Boeger RH, Bode-Boeger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Froelich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95:2068-74.

Boeger RH, Bode-Boeger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842-7.

Boeger RH, Bode-Boeger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol* 2000a; 36:2287-95.

Boeger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boeger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000b; 87:99-105.

Busse R, Luckhoff A, Bassenge E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1987; 336:566-71.

Cantoni GL. Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem* 1975; 44:435-51.

Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, Marini MA, Procopio C, Hribal ML, Andreozzi F, Frontoni S, Giacomelli M, Paganelli M, Pontiroli AE, Lauro R, Folli F, Sesti G. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care* 2005; 28:2007-12.

Cardounel AJ, Cui H, Samouilov A, Johnson W, Kearns P, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. *J Biol Chem* 2007; 282:879-87.

Catani MV, Bernassola F, Rossi A, Melino G. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249:275-8.

Chan JR, Boger RH, Bode-Boger SM, Tangphao O, Tsao PS, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1040-6.

Chiang EP, Bagley PJ, Selhub J, Nadeau M, Roubenoff R. Abnormal vitamin B(6) status is associated with severity of symptoms in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 2003; 114:283-7.

Chin JH, Azhar S, Hoffman BB. Inactivation of endothelial-derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J Clin Invest* 1992; 89:10-8.

Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet* 2002; 359:1173-7.

Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1246-52.

Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344:907-16

Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* 2003; 4:53-60.

Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62 (Suppl. 1):115-21.

Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, Jacobi J, Stuehlinger MC, Wang BY, Tsao PS, Kimoto M, Vallance P, Patterson AJ, Cooke JP. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation* 2003; 108:3042-7.

Daza L, Aguirre M, Jimenez M, Herrera R, Bollain JJ. Common carotid intima-media thickness and von Willebrand factor serum levels in rheumatoid arthritis female patients without cardiovascular risk factors. *Clin Rheumatol* 2007; 26:533-7.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-8.

Dell JR. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350:2591-601.

Dessein PH, Joffe BI, Stanwix A, Botha AS, Moomal Z. The acute phase response does not fully predict the presence of insulin resistance and dyslipidemia in inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29:462-6.

Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, Stevens BA, Tobias M, Reddi K, Stanwix AE. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32:435-42.

van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2002; 46:862-73.

Eid HM, Eritsland J, Larsen J, Arnesen H, Seljeflot I. Increased levels of asymmetric dimethylarginine in populations at risk for atherosclerotic disease. Effects of pravastatin. *Atherosclerosis* 2003; 166:279-84.

Erbs S, Linke A, Assmus B, Hoffmann C, Schächinger V, Schuler G, Zeiher AM, Hambrecht R. Restoration of coronary microvascular function in the infarct-related artery by bone marrow-derived progenitor cells after acute MI: results from the double-blind, placebo-controlled REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; 27 (Suppl. 1):151 (abstrakt).

Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006; 37:2277-82.

Faraci FM, Brian Jr JE, Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1995; 269:H1522-7.

Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2039-44.

Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Folate depletion induced by methotrexate affects methionine synthase activity and its susceptibility to inactivation by nitrous oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:1305-11.

Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. *Circulation* 2001; 103:2788-91.

Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003; 48:54-8.

Garg A. Insulin resistance in the pathogenesis of dyslipidemia. *Diabetes Care* 1996; 19:387-400.

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-7.

Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61:65-131.

George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 2004; 25:1003-8.

George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 2006; 12:331-5.

Gerlach M, Keh D, Bezold G, Spielmann S, Kurer I, Peter RU, Falke KJ, Gerlach H. Nitric oxide inhibits tissue factor synthesis, expression and activity in human monocytes by prior formation of peroxynitrite. *Intensive Care Med* 1998; 24:1199-208.

Gerli R, Schillaci G, Giordano A, Bocci EB, Bistoni O, Vaudo G, Marchesi S, Pirro M, Ragni F, Shoenfeld Y, Mannarino E. CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation* 2004; 109:2744-8.

Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35:8-17.

Goonasekera CDA, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ. Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 1997;15:901-9.

de Graff J, Hak-Lemmers HL, Hectors MPC, Demacker PNM, Hendriks JCM, Stalenhoef AFH. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfractions in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:298-306.

Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica* 2000; 85:967-72.

Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, Weigel G, Schwarzinger I, Wolozczuk W, Steiner G, Smolen JS. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2005; 111:204-11.

de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H, Fliser D. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 2004; 66:641-6.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320:454-5.

Gryglewski RJ, Korbust R, Trąbka-Janik E, Zembowicz A, Trybulec M. Interaction between NO donors and iloprost in human vascular smooth muscle, platelets, and leukocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 (Suppl. 11):S124-8.

Gueven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1579-87.

Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van de Putte LB. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58:79-84.

Hallgren R, Berne C. Glucose intolerance in patients with chronic inflammatory diseases is normalized by glucocorticoids. *Acta Med Scand* 1983; 213:351-5.

Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003; 170:177-80.

Haynes BF, Fauci AS. Wprowadzenie do układu immunologicznego. W: *Interna Harrisona* (red.: Fauci i wsp.). Czelej sp. z o.o., Lublin, 1998:2999-3029.

Hazes JM, Dijkmans BA, Vandenbroucke JP, de Vries RR, Cats A. Lifestyle and the risk of rheumatoid arthritis: cigarette smoking and alcohol consumption. *Ann Rheum Dis* 1990; 49:980-2.

Heliovaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993; 20:1830-5.

Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:157-63.

Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, Spieker LE, Frey D, Hermann M, Riesen W, Neidhart M, Michel BA, Hellermann JP, Gay RE, Luescher TF, Gay S, Noll G, Ruschitzka F. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45:461-4.

Hernandez Avila M, Liang MH, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Roberts WN, Hennekens CH, Speizer FE Reproductive factors, smoking, and the risk for rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 1990; 1:285-91.

Hernanz A, Plaza A, Martin-Mola E, De Miguel E. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis women. *Clin Biochem* 1999; 32:65-70.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348:593-600.

Hill J, Cairns E, Bell DA. The joy of citrulline: new insights into the diagnosis, pathogenesis, and treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31:1471-3.

Hoetzer GL, Irmiger HM, Keith RS, Westbrook KM, DeSouza CA. Endothelial nitric oxide synthase inhibition does not alter endothelial progenitor cell colony forming capacity or migratory activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46:387-9.

Holven KB, Haugstad TS, Holm T, Aukrust P, Ose L, Nenseter MS. Folic acid treatment reduces elevated plasma levels of asymmetric dimethylarginine in hyperhomocysteinaemic subjects. *Br J Nutr* 2003; 89:359-63.

Honkanen V, Kontinen YT, Mussalo-Rauhamaa H. Vitamins A and E, retinol binding protein and zinc in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7:465-9.

Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Bechir M, Spieker LE, Neidhart M, Michel BA, Gay RE, Luescher TF, Gay S, Ruschitzka F. Anti-tumor necrosis



factor- $\alpha$  treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002; 106:2184-7.

Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:223-7.

Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:665-70.

Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092-5.

Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 2003; 108:3115-21.

Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 2006; 113:1605-14.

Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32:1213-8.

Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP. Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2000; 102:1414-9.

Juhan-Vague I, Pyke SDM, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG, for the ECAT Study Group. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation* 1996; 94:2057-2063.

Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350:9-12.

Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis* 2000; 181 (Suppl. 3):S462-72.

Kielstein JT, Bode-Boeger SM, Froelich JC, Ritz E, Haller H, Fliser D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. *Circulation* 2003; 107:1891-5.

Klareskog L, Padyukov L, Roennelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2006a; 18:650-5.

Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Ronnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapaa-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L.. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006b; 54:38-46.

Klatt P, Schmidt K, Uray G, Mayer B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N<sup>o</sup>-hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J Biol Chem* 1993; 268:14781-7.

Korbut R, Warner TD, Gryglewski RJ, Vane JR. The effect of nitric oxide synthase inhibition on the plasma fibrinolytic system in septic shock in rats. *Br J Pharmacol* 1994; 112:289-91.

Kumeda Y, Inaba M, Goto H, Nagata M, Henmi Y, Furumitsu Y, Ishimura E, Inui K, Yutani Y, Miki T, Shoji T, Nishizawa Y. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1489-97.

Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, Spiekermann S, Hilfiker-Kleiner D, Templin C, Kotlarz D, Mueller M, Fuchs M, Hornig B, Haller H, Drexler H. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2004; 110:1933-9.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109:220-6.

Lazzerini PE, Capecchi PL, Bisogno S, Galeazzi M, Marcolongo R, Pasini FL. Reduction in plasma homocysteine level in patients with rheumatoid arthritis given pulsed glucocorticoid treatment. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:694-5.

Levey AS. A simplified equation to predict GFR from serum creatinine. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl. 1):S76-110.

Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-50.

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000; 247:349-58.

Lipsky PE. Reumatoidalne zapalenie stawów. W: *Interna Harrisona* (red.: Fauci i wsp.). Czelej sp. z o.o., Lublin, 1998:3185-97.

Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ, Weyand CM. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 1999; 100:2135-9.

Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101:2883-8.

Löwenhoff T, Głuszko P. Miażdżyca naczyń w reumatoidalnym zapaleniu stawów. *Przegl Lek* 2005; 62:1506-9.

Lu TM, Ding YA, Charng MJ, Lin SJ. Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2003; 26:458-64.

Lu TM, Ding YA, Leu HB, Yin WH, Sheu WH, Chu KM. Effect of rosuvastatin on plasma levels of asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004; 94:157-61.

Ma J, Hennekens CH, Ridker PM, Stampfer MJ. A prospective study of fibrinogen and risk of myocardial infarction in the Physicians' Health Study. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1347-52.

Ma FX, Zhou B, Chen Z, Ren Q, Lu SH, Sawamura T, Han ZC. Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cells by regulation of endothelial nitric oxide synthase. *J Lipid Res* 2006; 47:1227-37.

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1533-40.

Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997; 96:396-9.

Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, Gabriel SE. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 2005a; 52:402-11.

Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005b; 52:722-32.

Marescau B, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Becaus I, Billiouw JM, Lornoy W, De Deyn PP. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism* 1997; 46:1024-31.

Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006; 49:351-9.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boeger SM. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006; 52:488-93.

Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92:1866-74.

Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166:4177-84.

Maziere C, Auclair M, Maziere JC. Tumor necrosis factor enhances low density lipoprotein oxidative modification by monocytes and endothelial cells. *FEBS Lett* 1994; 338:43-6.

McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 363:2015-21.

McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40:640-4.

Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, Marz W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem* 2007; 53:273-83.

Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Aguilar L, Amalric F, Girard JP. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:60-72.

Millatt LJ, Whitley GS, Li D, Leiper JM, Siragy HM, Carey RM, Johns RA. Evidence for dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase I in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 108:1493-8.

Minami E, Laflamme MA, Saffitz JE, Murry CE. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005; 112:2951-8.

Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1141-6.

Monaco C, Andreakos E, Young S, Feldmann M, Paleolog E. T cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J Leukoc Biol* 2002; 71:659-68.

Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3:35-42.

Morgan SL, Baggott JE, Lee JY, Alarcon GS. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* 1998; 25:441-6.

Munro R, Morrison E, McDonald AG, Hunter JA, Madhok R, Capell HA. Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:374-7.

Myllykangas-Lousujarvi R, Aho K, Kautianen H, Isomaki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22:1065-7.

Nanayakkara PW, Teerlink T, Stehouwer CD, Allajar D, Spijkerman A, Schalkwijk C, ter Wee PM, van Guldener C. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) concentration is independently associated with carotid intima-media thickness and plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) concentration in patients with mild-to-moderate renal failure. *Kidney Int* 2005; 68:2230-6.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, N<sup>G</sup>,N<sup>G</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem* 1989; 264:10205-9.

Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3085-92.

Paiva H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Laaksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:219-22.

Paleolog E. It's all in the blood: circulating endothelial progenitor cells link synovial vascularity with cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 2005; 7:270-2.

Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Lee CH, Song CH, Lee J. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26:1701-4.

Park YB, Ahn CW, Choi HK, Lee SH, In BH, Lee HC, Nam CM, Lee SK. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. *Arthritis Rheum* 2002a; 46:1714-9.

Park YB, Choi HK, Kim MY, Lee WK, Song J, Kim DK, Lee SK. Effects of antirheumatic therapy on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Am J Med* 2002b; 113:188-93.

Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100:2124-6.

Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102:2165-8.

Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 1995; 270:14214-9.

Pereira EC, Bertolami MC, Faludi AA, Salem M, Bersch D, Abdalla DS. Effects of simvastatin and L-arginine on vasodilation, nitric oxide metabolites and endogenous NOS inhibitors in hypercholesterolemic subjects. *Free Radic Res* 2003; 37:529-36.

Piatti P, Fragasso G, Monti LD, Setola E, Lucotti P, Fermo I, Paroni R, Galluccio E, Pozza G, Chierchia S, Margonato A. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels

and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation* 2003; 107:429-36.

Pollock JS, Foerstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:10480-4.

Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38:44-8.

Prior P, Symmons DP, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Causes of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1984; 23:92-9.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346:5-15.

Quehenberger O. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005; 46:1582-90.

Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon RO III. Nitric oxide activity in the human coronary circulation: impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1995; 95:1747-1755.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-8.

Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JMcb. Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:833-843.

Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107:1164-9.

Remans PH, van Oosterhout M, Smeets TJ, Sanders M, Frederiks WM, Reedquist KA, Tak PP, Breedveld FC, van Laar JM. Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2003-9.

del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2737-45.

del Rincon I, Battafarano DF, Arroyo RA, Murphy FT, Fischbach M, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1833-40.

del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary DH, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3413-23.

Rindfleisch JA, Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician* 2005; 72:1037-47.

Rizzello V, Liuzzo G, Brugaletta S, Rebuzzi A, Biasucci LM, Crea F. Modulation of CD4(+)CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor-alpha blockade in patients with unstable angina. *Circulation* 2006; 113:2272-7.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:115-26.

Ruger B, Giurea A, Wanivenhaus AH, Zehetgruber H, Hollemann D, Yanagida G, Groger M, Petzelbauer P, Smolen JS, Hoecker P, Fischer MB. Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2157-66.

Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78:225-30.

Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003; 108:2957-63.

Scalera F, Borlak J, Beckmann B, Martens-Lobenhoffer J, Thum T, Taeger M, Bode-Boeger SM. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1816-22.

Schaechinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101:1899-906.

Schaechinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 2006a; 95:13-22.

Schaechinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006b; 355:1210-21.

Schaechinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006c; 27:2775-83.

Schillaci G, Vaudo G, Marchesi S, Lupattelli G, Reboldi G, Verdecchia P, Pasqualini L, Mannarino E. Optimizing assessment of carotid and femoral intima-media thickness in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14:1025-31.

Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111:2981-7.

Schnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Jachmann N, Post F, Peetz D, Bickel C, Cambien F, Tiret L, Muenzel T. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005; 97:e53-9.

Shinohara K, Shoji T, Kimoto E, Yokoyama H, Fujiwara S, Hatsuda S, Maeno T, Shoji T, Fukumoto S, Emoto M, Koyama H, Nishizawa Y. Effect of atorvastatin on regional arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12:205-10.

Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 1996; 39:732-5.

Sodergren A, Stegmayr B, Lundberg V, Ohman ML, Wallberg-Jonsson S. Increased incidence of and impaired prognosis after acute myocardial infarction among patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:263-6.

Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003; 107:1303-7.

Solomon DH, Curhan GC, Rimm EB, Cannuscio CC, Karlson EW. Cardiovascular risk factors in women with and without rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3444-9.

Stamler JS, Loh E, Roddy M-A, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89:2035-40.

Stuehlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104:2569-75.

Stuehlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287:1420-6.

Stuehlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2003; 108:933-8.

Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide



metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33:652-8.

Surdacki A, Stochmal E, Szurkowska M, Bode-Boeger SM, Martens-Lobenhoffer J, Stochmal A, Klecha A, Kawecka-Jaszcz K, Dubiel JS, Huszno B, Szybński Z. Nontraditional atherosclerotic risk factors and extent of coronary atherosclerosis in patients with combined impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2007; 56:77-86.

Svenson KL, Pollare T, Lithell H, Hallgren R. Impaired glucose handling in active rheumatoid arthritis: relationship to peripheral insulin resistance. *Metabolism* 1988; 37:125-30.

Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, Silman AJ. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1955-61.

Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; 98:2241-7.

Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW, for the European Concerted Actions on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Group. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995; 332:635-41.

Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* 1991; 146:592-8.

Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Ertl G, Bauersachs J. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1693-701.

Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL. Severe extra-articular disease manifestations are associated with an increased risk of first ever cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:70-5.

Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-8.

Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2:997-1000.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572-5.

Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1023-30.

Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 2000; 87:540-2.

Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001a; 103:2885-90.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001b; 89:e1-7.

Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, Pirro M, Shoenfeld Y, Schillaci G, Mannarino E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:31-5.

Veale DJ, Maple C, Kirk G, McLaren M, Belch JJ. Soluble cell adhesion molecules--P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998; 27:296-9.

Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002; 106:913-9.

Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmítko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109:2058-67.

Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. CD154/CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:715-20.

Wallberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 1997; 24:445-51.

Wallberg-Jonsson S, Cederfelt M, Rantapaa Dahlqvist S. Hemostatic factors and cardiovascular disease in active rheumatoid arthritis: an 8 year followup study. *J Rheumatol* 2000; 27:71-5.

Walsh DA. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology* 1999; 38:103-12

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105:3017-24.

Wang TD, Chen WJ, Cheng WC, Lin JW, Chen MF, Lee YT. Relation of improvement in endothelium-dependent flow-mediated vasodilation after rosiglitazone to changes in asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, and C-reactive protein in nondiabetic patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2006; 98:1057-62.

Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res* 2006; 99:e74-83.

Weber C, Alon R, Moser B, Springer TA. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol* 1996; 134:1063-1073.

Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state--impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1455-61.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353:999-1007.

Wolfe F. The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27:630-7.

Wolfe F, Freundlich B, Straus WL. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30:36-40.

Yao SK, Akhtar S, Scott-Burden T, Ober JC, Golino P, Buja LM, Casscells W, Willerson JT. Endogenous and exogenous nitric oxide protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. *Circulation* 1995; 92:1005-10.

Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993; 73:205-9.

Zeiber AM, Drexler H, Saurbrier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effect of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92:652-662.

Zeiber AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse B. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76:980-986.

Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol* 2000; 279:F671-8.

Zhu J, Wang X, Chen J, Sun J, Zhang F. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells from patients with hyperhomocysteinemia. *Arch Med Res* 2006; 37:484-9.

Zoccali C, Bode-Boeger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Froelich J, Boeger R. Plasma concentration of asymmetrical

dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. Lancet. 2001; 358:2113-7.

Zoccali C, Benedetto FA, Maas R, Mallamaci F, Tripepi G, Malatino LS, Böger R; CREED Investigators. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13:490-6.

*(zacytowano 219 pozycji piśmiennictwa)*

