

**STATIINIEN VAIKUTUS SILMÄNSISÄISIIN INFLAMMAATIOMARKKEREIHIN
PROLIFERATIIVISESSA DIABEETTISESSA RETINOPATIASSA**

LK Lassi Kurtelius
Syventävien opintojen tutkielma
Silmätautien klinikka
Oulun yliopisto
Helmikuu 2017
Ohjaaja dosentti Johanna Liinamaa
OULUN YLIOPISTO

TIIVISTELMÄ

Kurtelius, Lassi: Statiinien vaikutus silmänsisäisiin inflammaatiomarkkereihin proliferatiivisessa diabeettisessa retinopatiassa

Diabeettinen retinopatia (DR) on tärkein työikäisessä väestössä näkövammaisuutta ja sokeutta aiheuttava sairaus. Silmän sisäinen inflammaatio on keskeinen tekijä taudin patogeneesissä. Jo aikaisemmin on osoitettu, että proliferatiiviseen diabeettiseen retinopatiaan (PDR) liittyy interleukiini-6:n (IL-6) ja interleukiini-8:n (IL-8) paikallisesti lisääntynyt erityis. PDR:n patogeneesin kannalta keskeinen on myös verisuonen endoteelin kasvutekijä (VEGF). Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, miten statiinit vaikuttavat näiden inflammaatiomarkkereiden eritykseen PDR:aa sairastavilla potilailla.

Tutkimukseen kuului sekä PDR:aa sairastavilta potilailta kerätyistä lasiaisnäytteistä koostuva materiaali että potilasaineistoa täydentävä soluviljelyaineisto. Lasiaisnäytteitä oli yhteensä 39 ja näistä tutkittiin IL-6 ja IL-8 lisäksi yhdeksän muun sytokiinin ja kuuden adheesiomolekyylin pitoisuudet. Soluviljelyt toteutettiin useassa eri vaiheessa ja usealla eri koeasetelmalla. Keskeisimmät viljelyt olivat ARPE-19- ja RF-6A-soluilla tehdyt viljelyt, joissa säädeltäviä muuttujia olivat statiini- ja glukoosipitoisuudet ja vastemuuttujina IL-6, IL-8 ja VEGF.

Potilasaineistossa statiineja käyttävällä ryhmällä IL-6 ja IL-8 pitoisuudet lasiaisessa olivat vertailuryhmää korkeammat. Ryhmien välillä oli kuitenkin eroja diabeteksen kestossa ja paastokerissa, jotka osaltaan voivat selittää IL-pitoisuuksien eroja. Myös soluviljelymalleissa statiinille altistetut solut tuottivat korkeampia IL-8 pitoisuuksia, mikä tukee potilasaineiston löytöä.

Tutkimuksen perusteella statiinit voivat lisätä silmänsisäisiä inflammaatiomarkkereiden pitoisuuksia PDR:aa sairastavilla potilailla. Sekä potilasaineistosta että soluviljelymalleista saadut tulokset olivat tämän suhteen yhteneviä. Toistaiseksi tutkimusnäyttö ei ole kuitenkaan vahvaa ja vaaditaan lisätutkimuksia ennen kuin voidaan arvioida, mikä on statiinien kliininen merkitys inflammaation kannalta.

Avainsanat: Statiinit, retina, inflammaatio, diabetes, diabeettinen retinopatia, IL-6, IL-8, VEGF

SISÄLLYS

1.	Johdanto.....	1
2.	Tutkimuksen teoreettinen tausta.....	2
2.1	Diabeettinen retinopatia.....	2
2.2	Diabeettiseen retinopatiaan vaikuttavat molekulaariset mekanismit.....	3
2.2.1	Miten diabetes aiheuttaa inflammaatiota verkkokalvolla?	3
2.2.2	Verisuonen endoteelin kasvutekijä (VEGF).....	4
2.2.3	IL-8 ja IL-6.....	4
3.	Tutkimusaineisto ja tutkimusmenetelmät.....	5
3.1	Potilasaineisto	5
3.1.1	Näytteiden keräys	5
3.1.2	Molekyyliipitoisuuksien määrittäminen lasiaisnäytteistä.....	5
3.2	Soluviljelyaineisto	7
3.2.1	Viljelyiden toteutus	7
3.2.2	Näytteiden analysointi	8
3.3	Tilastollinen analyysi.....	8
4.	Tulokset.....	10
4.1	Potilasaineisto	10
4.2	Soluviljelyaineisto	13
4.2.1	IL-8 eritykseen vaikuttavat tekijät.....	13
4.2.2	VEGF eritykseen vaikuttavat tekijät.....	15
5.	Pohdinta.....	17
6.	Yhteenveto.....	19
7.	Lähteet	20

1. JOHDANTO

Diabeettinen retinopatia on tärkein sokeutta ja näkövammaisuutta työikäisessä väestössä aiheuttava sairaus länsimaissa (Tang & Kern 2011). Yli 60 % tyypin 2 diabeetikoista ja lähes kaikki tyypin 1 diabeetikot sairastuvat retinopatiaan 20 vuoden sisällä diabeteksen toteamisen jälkeen (Fong et al. 2004). Diabeettiseen retinopatiaan liittyy lukuisten eri tulehduksellisten ja tulehdusta vastaan vaikuttavien (eli inflammatoristen ja anti-inflammatoristen) soluvälittäjäaineiden, transkriptiotekijöiden ja muiden tulehdukseen eli inflammaatioon liittyvien molekyylien pitoisuuksien muutoksia. Käynnistytävä inflammatorinen vaste on samankaltainen kuin luontaisen immunitetin käynnistämä tulehdus (Tang & Kern 2011).

Kliinisten interventioiden kannalta yhdeksi tärkeimmistä välittäjäaineista on noussut VEGF, joka on keskeinen välittäjäainemolekyyli PDR:aan liittyvien verisuonimuutosten kehittymisen kannalta. Markkinoilla onkin jo useita silmänsisäisesti pistettäviä anti-VEGF-valmisteita (Bollinger & Antonetti 2016). IL-8 ja IL-6 ovat proinflammatorisia molekyyliä, joiden lasiaiskonsentraatiot ovat PDR:aa sairastavilla potilailla merkittävästi suurempia (Koskela et al. 2013). IL-8:n on osoitettu lisäävän angiogeneesiä VEGF:sta riippumattomalla mekanismilla (Ghasemi et al. 2011). IL-6 lisää valkosolujen adheesiota verkkokalvon verisuonistoon ja edesauttaa näin suonten tukkeutumista (Scheller et al. 2011).

Statiinit ovat keskeinen lääkeaineryhmä ateroskleroottisten sairauksien hoidossa ja siten ne ovat tavallisia lääkkeitä myös diabeetikoilla. Statiineilla tiedetään olevan systeemisiä anti-inflammatorisia vaikutuksia, mutta toisaalta niiden on epäilty tietyissä oloissa toimivan myös proinflammatorisesti (Ganda 2016). Statiineilla on todettu olevan angiogeneesiin kaksijakoinen vaikutus: atorvastatiini lisää angiogeneesiä matalilla annoksilla (0,005-0,01 $\mu\text{mol/l}$), mutta aiheuttaa suurilla annoksilla (0,5-1 $\mu\text{mol/l}$) endoteelisolujen apoptoosia ja siten estää angiogeneesiä (Colakoglu et al. 2010).

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten statiinit vaikuttavat silmänsisäisiin VEGF-, IL-8- ja IL-6 pitoisuuksiin soluviljelymalleissa ja siten antaa viitteitä siitä, miten pitoisuudet muuttavat proliferatiivista diabeettista retinopatiaa sairastavilla potilailla.

2. TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Diabeettinen retinopatia

Diabeettisen retinopatian (DR) kehittyminen voidaan jakaa kahteen vaiheeseen: Varhaisessa vaiheessa verkkokalvon verisuoniin kertyy vaurioita, jotka asteittain huonontavat verkkokalvon verenkiertoa ja lopulta tukkeuttavat suonet (taustaretinopatia). Myöhemmässä vaiheessa elimistö pyrkii kompensoimaan kehittyvää hypoksiaa indusoimalla verisuonten kasvua retinan sisäpinnalle, jolloin puhutaan proliferatiivisesta diabeettisesta retinopatiasta (PDR). (Saari 2011)

DR on luonteeltaan etenevä sairaus. Ensimmäinen vaihe on taustaretinopatia, jossa verisuonimuutokset ilmenevät kapillaarisuonissa ja pienissä laskimoissa, jotka laajenevat ja joiden permeabiliteetti lisääntyy. Suoniin kehitty hiljalleen myös mikroaneurysmia ja kaiken tämän seurauksena vaurioituneet suonet vuotavat verkkokalvolle plasmata ja myöhemmin myös verta. Plasman mukana verkkokalvolle kertyy lipidejä, joiden muodostamia vaaleita läiskiä kutsutaan koviksi eksudaateiksi. (Saari 2011) Tämän vaiheen muutoksilla ei yleensä ole vielä vaikutusta potilaan näkökykyyn (Tang & Kern 2011), elleivät ne esiinny keskeisen fovean alueella (Saari 2011). Kuitenkin muutokset ennustavat runsastuessaan taudin kehittymistä vaikeampaan suuntaan (Tang & Kern 2011).

Retinopatian edetessä kehitty preproliferatiivinen retinopatia, jossa osa kapillaarisuonista tukkeutuu, jolloin ympäröivät kapillaarit ja niissä mahdollisesti olevat mikroaneurysmat kompensatorisesti laajenevat. Hiljalleen myös verkkokalvon valtimoissa alkaa esiintyä retinopaattisia muutoksia ja valtimon tukkeutuessa sen suonittamalle alueelle kehitty pieni mikroinfarkti. (Saari 2011) Makulan alueen iskemia onkin yksi tärkeimmistä mekanismeista, joilla diabeettinen retinopatia aiheuttaa näkövammaisuutta (Morello 2007).

PDR:ssa elimistö indusoi iskemian seurauksena verisuonten uudiskasvua verkkokalvolle. Ensimmäiset uudissuonet kasvavat verkkokalvon sisään, mutta myöhemmin uudissuonia alkaa syntyä myös verkkokalvon pinnalle. Pinnan verisuonet kehittävät ympärilleen fibroottista kudosta, joka jo itsessään huonontaa näköä. Uudissuonet ovat lisäksi varsin vuotoherkkiä ja vuotavat sekä verkkokalvon pinnalle että lasiaiseen. Vuodot muuttavat lasiaisen rakennetta ja lasiaisen kutistuminen sekä fibroottisen uudiskudoksen jo itsessään aiheuttama jännitys voivat aiheuttaa verkkokalvon irtauman, mikä pahimmillaan johtaa pysyvään sokeuteen (Saari 2011).

2.2 Diabeettiseen retinopatiaan vaikuttavat molekulaariset mekanismit

Ensimmäisen kerran inflammaation osuutta DR:aan epäiltiin jo 1964, kun salisylaatteja nivelreuman hoitoon käyttävillä potilailla DR:n ilmaantuvuus oli odotettua vähäisempi (Powell & Field 1964). Sitten DR:aan on havaittu liittyvän lukuisten inflammaatioon vaikuttavien adheesiomolekyylien ja soluvälittäjäaineiden muutoksia. McAuley ym. kävivät katsausartikkelissaan läpi vuonna 2014 saatavilla olleen tutkimusnäytön DR:ssa koholla olevista soluvälittäjäaineista. Kirjoittajat mallinsivat 12 eri molekyylin ristikkäisistä inhibointi- ja aktivointimekanismeista koostuvan verkoston, jossa VEGF:n, IL-6:n ja IL-8:n osuus on keskeinen (McAuley et al. 2014).

2.2.1 Miten diabetes aiheuttaa inflammaatiota verkkokalvolla?

Diabetes aiheuttaa inflammaatiota verkkokalvolla useilla eri mekanismeilla, joista alla esitetty keskeisimpiä.

Korkea glukoosipitoisuus on jo itsessään inflammaatiota aiheuttava tekijä. Verkkokalvon solujen viljely korkeissa glukoosipitoisuuksissa lisää proinflammatoristen indusoituvan typpioksidisyntaasin (iNOS), syklo-oksygenaasi-2:n (COX-2) ja leukotrieenien tuotantoa (Tang & Kern 2011) ja koe-eläinmallissa pitkäkestoinen ruokavaliolla aikaansaatu hyperglykemia *jopa ilman diabetesta* sai aikaan DR:aa muistuttavia muutoksia (Joussen et al. 2004).

Diabetes saa aikaan muutoksia myös verkkokalvon rasvametaboliassa. Erityisesti esille nousee omega-3-rasvahappojen vähentyminen (Tikhonenko et al. 2010), millä voi olla yhteys krooniseen inflammaatioreaktioon. Lipideillä on havaittu olevan sekä anti- että proinflammatorisia vaikutuksia: DR:n koe-eläinmalleissa omega-3-rasvahappojenannon on todettu pahentavan verkkokalvon kapillaarisuonten degeneraatiota, mutta toisaalta esimerkiksi dokosaheksaenihapon, joka kuuluu omega-3-rasvahappoihin, on todettu estävän kapillaarien degeneraatiota (Tang & Kern 2011).

Diabeteksen aiheuttama oksidatiivinen stressi puolestaan lisää ainakin kahden proinflammatorisen sytokiinin, interleukiini-1 β :n (IL-1 β) ja nukleeiinitekijä kappa-B:n (NF- κ B), tasoja (Kowluru & Odenbach 2004).

Glykosylaation kautta syntyvät lopputuotteet (AGE, advanced glycosylation end products) ovat puolestaan proteiineja tai lipidejä, jotka glykosyloituvat suuren sokerialtistuksen seurauksena. AGE:a aistivien reseptorien (RAGE) aktivoitumisen tiedetään verkkokalvolla johtavan proinflammatoriseen reaktioon (Li et al. 2011).

2.2.2 Verisuonen endoteelin kasvutekijä (VEGF)

VEGF on keskeinen tekijä DR:aan liittyvässä uudissuonien muodostumisessa ja siten siis PDR:n kehittymisessä. Sen keskeisimmät vaikutukset ovat uudissuonien kasvun indusoituminen ja veri-verkkokalvo-esteen heikentyminen (Simo et al. 2014). Silmänsisäiset anti-VEGF-pistokset ovat osoittautuneet tehokkaiksi PDR:n hoidoksi (Bolinger & Antonetti 2016), mikä vahvistaa tutkimusnäyttöä VEGF:n keskeisestä roolista PDR:n patogeneesissä. VEGF:n erittymistä PDR:ssa säätelevistä tekijöistä tärkeimmät ovat hypoksia, hyperglykemia, AGE-yhdisteet, useat muut kasvutekijät, kuten insuliini ja insuliinin kaltainen kasvutekijä-1 (IGF-1) (Simo et al. 2014) sekä proinflammatoriset sytokiinit (mm. IL-1, IL-6 ja IL-8) (McAuley et al. 2014).

2.2.3 IL-8 ja IL-6

IL-6 on keskeinen proinflammatorinen sytokiini, jonka pitoisuus on koholla useimmissa, ellei kaikissa inflammaatioreaktioissa. IL-6:n on *in vivo* -tutkimuksissa osoitettu lisäävän mm. solunsisäisen adheesiomolekyylin (ICAM-1) ilmaantumista (Scheller et al. 2011). Lisääntynyt ICAM-1 -eritys johtaa valkosolujen aktivoitumiseen ja kertymiseen verkkokalvon verisuoniston seinämiin aiheuttaen niiden vaurioitumisen ja tukkeutumisen (Tang & Kern 2011).

Myös IL-8 on proinflammatorinen sytokiini. Sitä erittyy retinan soluista mm. vasteena erilaisille vaurioille, kuten iskemialle, mekaaniselle stressille sekä silmäleikkausten yhteydessä (Ghasemi et al. 2011). Sen on osoitettu koe-eläinmalleissa lisäävän angiogeneesiä mekanismilla, joka ei vaikuta VEGF:n kautta (Bek et al. 2002). Muita vaikutuksia ovat mm. valkosolujen toiminnan, liikkumisen ja soluadheesion säätely. (Ghasemi et al. 2011)

3. TUTKIMUSAINEISTO JA TUTKIMUSMENETELMÄT

3.1 Potilasaineisto

Tutkimuksen aineisto koostui sekä potilailta kerätyistä lasiaisnäytteistä, että soluviljelyaineistosta. Alkuperäisessä aineistossa lasiaisnäytteitä oli 59 kappaletta. Tähän tutkimukseen aineistosta rajattiin pois ei-diabeettiset kontrollipotilaat sekä diabeetikot, joiden silmäleikkaus oli tehty kystisen makulaturvotuksen, makulan reiän tai diabetekseen liittymättömän syyn vuoksi. Samoin potilaat, jotka olivat saaneet bevasitsumabi-hoitoa (Avastin, VEGF-estäjä), rajattiin tutkimuksen ulkopuolelle. Lopulliseen tutkimukseen jäi 39 potilasta, joista 21 sairasti tyypin 1 diabetesta ja 18 tyypin 2 diabetesta. Operaatioiden syinä olivat verkkokalvon irtauma (tractional retinal detachment, n=11), proliferaatio (n=25) tai näiden yhdistelmä (n=3).

Kaikki leikkaukset tehtiin Oulun yliopistollisessa sairaalassa. Tutkimus toteutettiin Helsingin julistuksen eettisten ohjeiden mukaisesti (Declaration of Helsinki, World Medical Association 2013) ja Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin eettinen komitea on hyväksynyt tutkimussuunnitelman (diaarinumero 117/2). Kaikki osallistuneet potilaat saivat informaation tutkimuksesta ja heiltä pyydettiin suostumus tutkimukseen. Potilaat haastateltiin, heidän perussairautensa ja lääkityksensä kartoitettiin ja heille tehtiin silmien tutkimus päivää ennen leikkausta.

3.1.1 Näytteiden keräys

Laimentamattomat lasiaisnäytteet (200-500 µl) kerättiin klassisen kolmiporttisen lasiaisleikkauksen yhteydessä. Näytteet otettiin lasiaisleikkurilla tuberkuliiniruiskuihin ennen infuusioportin avaamista. Näytteet sentrifugoitiin mahdollisen jäännösveren poistamiseksi lasiaisesta, siirrettiin steriileihin putkiin ja pakastettiin -70 °C:ssa analysointiin asti.

3.1.2 Molekyylipitoisuuksien määrittäminen lasiaisnäytteistä

Näytteistä määritettiin kaikkiaan 17 eri aineen pitoisuudet kahdessa eri analyysissä. Määritettävät molekyylit olivat kuusi eri adheesiomolekyyliä (sE-Selectin (liukoinen endoteliaalinen

selektiini), sICAM-1 (liukoinen intersellulaarinen adheesiomolekyyli-1), sICAM-3, sPECAM (liukoinen endoteliaalinen verihiutaleadheesiomolekyyli-1), sP-Selectin (liukoinen verihiutaleselektiini), sVCAM-1 (liukoinen verisuonten adheesiomolekyyli-1)), 11 sytokiiniä (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), TNF α (tuumorinekroositekijä-alfa), TNF β , IFN γ (interferoni-gamma)).

Määrittämissä käytettiin virtaussytometriaan perustuvaa Multiplex-analyysiä: Human Adhesion 6 plex FlowCytomix Multiplex ja Human Th1/Th2 11 plex FlowCytomix Multiplex (Bender MedSystems®, Wien, Itävalta). Mittauksessa käytetään mikrohelmiä, jotka on päällystetty mitattavien aineiden kanssa reagoivilla vasta-aineilla. Mikrohelmet voidaan erottaa toisistaan kokoerojen ja yksilöllisten spektrien perusteella ja näin voidaan toteuttaa 20 eri aineen pitoisuuksien samanaikainen määrittäminen pienestä näytelmästä. Määrittäminen noudattaa samaa periaatetta kuin ELISA-menetelmä.

Mikrohelmet inkuboitettiin ensin joko standardiliuoksessa tai näytteessä. Tämän jälkeen käytettiin toista biotiini-konjugoitua vasta-aine -liuosta, joka satoi mikrohelmien vasta-aineisiin sitoutuneet mitattavat molekyylit. Lopuksi näytteisiin liitettiin Streptavidin-Phycoerythrin-konjugaatti, minkä seurauksena biotiini-konjugaatit saatiin fluoresoiviksi ja näin ollen mitattaviksi.

Mittaukset tehtiin Becton Dickinson FACSCalibur-sytometrillä ja CellQuest-ohjelmalla (BD Biosciences, San Jose, CA) ja laskettiin FlowCytomix Pro 2.3 -ohjelmalla. Mittaukseen tarvittava nestetilavuus oli vain 25 μ l. Human Th1/Th2 11 -plex FlowCytomix Multiplex -analyysimenetelmän mittausalue on 27 pg/ml – 20 ng/ml (IL-8 14 pg/ml – 10 ng/ml). Valmistajan mukaan analyysin sisäinen variaatiokerroin on <10 % ja analyysien välinen <15 %. Human Adhesion 6 plex FlowCytomix Multiplexin mittausalueet ovat seuraavat: sE-Selectin: 4,0– 3000 ng/ml; sICAM-1: 5,0–4000 ng/ml; sICAM-3: 11–8000 ng/ml; sPEACM-1: 4,0–3000 ng/ml; sP-Selectin: 19–14 000 ng/ml; sVCAM 5,2–4000 ng/ml. Analyysin sisäiset ja analyysien väliset variaatiokertoimet ovat vastaavat kuin edellä.

3.2 Soluviljelyaineisto

3.2.1 Viljelyiden toteutus

Soluviljelyt toteutettiin useassa eri vaiheessa vuosina 2009-2014. Soluviljelyissä käytettiin kahta kaupallista solulinjaa: ARPE-19 ja RF/6A. ARPE-19 solut ovat ihmisen retinan pigmenttisoluja ja RF/6A reesusapinan suoni- ja verkkokalvon endoteelisoluja.

Soluviljelyissä käytettiin ARPE-19- ja RF/6A-soluja, joiden annettiin ennen altistusta kasvaa kolme vuorokautta kasvatusmediumissa ja tämän jälkeen olla 24 h starvaatiomediumissa. Kasvatusmediumina ARPE-19-soluille oli 1:1 DMEM:Ham's F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham, kaupallinen kasvatusmediumi) 500 ml asti, 50 ml (10 %) FCS (fetal cow serum), 5 ml P-S (Penicillin-Streptomycin), 2,5 ml Na-pyruvaatti ja 7,5 ml HEPES (N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo). RF/6A-soluille kasvatusmediumina oli Ham's F-12 (ad 500 ml), 50 ml (10 %) FCS, 5 ml P-S. Starvaatiomediumit olivat koostumukseltaan vastaavia, mutta ilman FCS:a. Altistusmediumina toimi starvaatiomedium.

Altistuksen kesto oli 48 h. Ensimmäisissä viljelyissä säädeltävinä muuttujina olivat glukoosi (0, 5 tai 20 mM tai vaihdellen 5 ja 20 mM), simvastatiini (0, 50, 100 tai 200 ng/ml), hypoksia (5 % O₂ tai huoneilma) sekä CRP (0 tai 100 µg/ml). Seerumin simvastatiinin keskimääräinen konsentraatio annostuksella 40 mg/vrk on n. 67-80 ng/ml (Bjorkhem-Bergman et al. 2011). Altistuksen jälkeen solut eroteltiin kasvatusmediumista suodattamalla, sentrifugoimalla ja pesemällä PBS:llä. Analyysivaiheessa näytteistä määritettiin IL-6- ja IL-8-pitoisuuksien lisäksi proteiinipitoisuudet, joiden avulla IL-pitoisuudet voitiin suhteuttaa solumäärään. Proteiinimääritystä varten solut hajotettiin 0,5 M NaOH-liuoksella.

Myöhemmät soluviljelyt olivat viljelysuunnitelmaltaan vastaavia, mutta altistuksissa muuttujina käytettiin enää simvastatiinia ja glukoosia. Vastemuuttujina oli VEGF-, ICAM1-, sE-Selectin-, IL-8- ja IL-6-pitoisuudet, mutta näistä vain VEGF:sta ja IL-8:sta saatiin mitattavia tuloksia. Keväällä ja syksyllä 2014 toteutetuissa viljelyissä vastemuuttujina olivat VEGF, IL-6 ja IL-8. Muuttujina olivat simvastatiini (0, 25, 50, 100 tai 500 ng/ml) ja glukoosi (0, 5, 10 tai 20 mM). Rinnakkaisia viljelyitä toteutettiin samoilla pitoisuuksilla kolmella eri kuopalla.

3.2.2 Näytteiden analysointi

IL-6 ja IL-8 määrittelykset toteutettiin käyttäen multiplex-analyysiä. Menetelmä on esitetty edellä lasiaisnäytteiden analyysin yhteydessä. Mittauskitteinä olivat BMS8213FF IL-6 ja BMS 8204FF IL-8 (Bender MedSystems®, Wien, Itävalta).

VEGF-pitoisuudet määritettiin käyttäen entsyymivälitteistä immunosorbenttimäärittystä (ELISA). Mittauslevy päällystettiin anti-VEGF-liuoksella (R&D Systems AF-293-NA) ja seuraavana päivänä tyhjät sitoutumispaikat päällystettiin 1 % BSA-PBS-EDTA-liuoksella. Tämän jälkeen levyille pipetoitiin näytteet ja standardisarjaa varten tehdyt VEGF-laimennokset (RD Systems rHVEGF 293-VE). Viimeisenä kiinnitettiin biotinyloitu anti-human VEGF-vasta-aine (RD Systems BAF-293), joka leimattiin vielä alkaalisella fosfaatilla (NeutrAvidin-Alkaline-Phosphatase Conjugate (Pierce 31002)). Vaiheiden välissä levyt pestiin kolme kertaa 1xPBS-EDTA-liuoksella ja vielä kuusi kertaa ennen mittauksia. Mittaus toteutettiin Lumiphos (Lumigen Ltd.) -reagenssia käyttäen. Mittauslaitteena oli Victor ja ohjelmana Luminescence Antti.

Proteiinimäärityksen pääperiaatteena oli kolorimetrinen menetelmä (Lowry-menetelmä), jossa proteiinit reagoivat alkaalisen kuparitartraatti-liuoksen ja Folin reagenssin kanssa muodostaen sinisen värin (Lowry et al. 1951).

3.3 Tilastollinen analyysi

Sekä potilasaineiston että soluviljelyaineistojen tilastollinen analyysi tehtiin käyttäen SPSS-ohjelmaa. Analysointiin käytettiin eri tilastollisia testejä, riippuen analysoitavien muuttujien jakaumasta ja laadusta. Käytetyt tilastolliset menetelmät esitetty kunkin taulukon yhteydessä sekä yhteenvedona taulukossa 1.

Taulukko 1. Potilasaineiston analysoinnissa käytetyt tilastolliset menetelmät.

Tilastollinen menetelmä	Käyttö
Kahden riippumattoman otoksen t-testi	Kaksi toisistaan riippumatonta ryhmää Jakauma noudattaa normaalijakaumaa Jatkuva muuttuja
Khiin neliö -testi	Kaksi toisistaan riippumatonta ryhmää Dikotominen muuttuja
Mann-Whitney U-testi	Kaksi toisistaan riippumatonta ryhmää Jakauma ei noudata normaalijakaumaa Jatkuva muuttuja

4. TULOKSET

4.1 Potilasaineisto

Potilasaineisto analysoitiin lääkkeiden käytön mukaan, huomioiden sekä ACE-estäjien että statiinien käyttö. ACE-estäjien käytön mukaan jaettuna potilasryhmien välillä ei ollut eroja sytokiini- tai adheesiomolekyyli- tasoissa, joten myöhemmin keskitytään vertailemaan eroja statiineja käyttävän ryhmän (statiini+) ja ryhmän, joka ei käyttänyt statiineja (statiini-), välillä. Potilasryhmien väliset kliiniset ominaispiirteet on esitetty taulukossa 2. Potilasryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa iän, sukupuolen, glykosyloituneen hemoglobiinin, systolisen tai diastolisen verenpaineen tai painoindeksin suhteen. Statiini+ -ryhmän diabeteksen kesto oli jonkin verran pitempi kuin vertailuryhmällä (27,3 vs. 18,1 vuotta, $p=0,028$) ja heidän paastosokerinsa oli korkeampi (11,1 vs. 8,7 mmol/l, $p=0,026$). Taulukossa 3 on vertailtu ryhmien lipidi- ja kreatiniinitasoja. Kokonaiskolesteroli oli statiini+ -ryhmällä matalampi, mutta muiden arvojen välillä ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa.

Lasiakonsentraatiot määriteltiin kuudesta adheesiomolekyylistä (sE-Selectin, sICAM-1, sICAM-3, sPECAM-1, sP-Selectin ja sVCAM-1), joista tilastollisesti merkitsevät erot löytyivät sE-Selectin-pitoisuuksista (mediaanit: statiini+ 7,3 vs. statiini- 5,3, $p=0,002$) ja sICAM-1-pitoisuuksista (mediaanit: statiini+ 50,8 vs. statiini- 28,8, $p=0,033$). Tulokset on esitetty taulukossa 4.

Lasiainnäytteistä määritettiin 11 eri sytokiiniä: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), TNF- α , TNF- β ja INF- γ . Tilastollisesti merkitseviä eroja löytyi IL-8-pitoisuuksista (mediaanit: statiini+ 59,8 vs. statiini- 33,4, $p=0,048$) ja IL-6 pitoisuuksista (mediaanit: statiini+ 75,0 vs. statiini- 34,1, $p=0,038$). Muiden adheesiomolekyylien ja sytokiinien kohdalla p-arvo oli yli tilastollisesti merkittävänä pidetyn arvon 0,05. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 2. Vertailtavien ryhmien kliiniset ominaisuudet

	Statiinien käyttö +		Statiinien käyttö –		p-arvo
	Keskiarvo (SD)	n	Keskiarvo (SD)	n	
Ikä (vuosia)	57,4 (16,1)	24	54,7 (13,3)	15	0,605 ^a
Sukupuoli (M/N)	12/12		5/10		0,307 ^b
Diabeteksen kesto (vuosia)	27,3 (12,5)	24	18,1 (10,8)	14	0,028 ^a
Glykosyloitunut hemoglobiini (%)	7,9 (1,4)	22	8,8 (1,5)	13	0,087 ^a
Plasman paastosokeri (mmol/l)	mediaani: 10,5 (3,9)	22	mediaani: 7,2 (4,2)	13	0,026 ^c
Systolinen verenvainepaine (mmHg)	157 (32)	19	155 (25)	12	0,847 ^a
Diastolinen verenvainepaine (mmHg)	84 (15)	19	82 (9)	12	0,647 ^a
Painoindeksi (kg/m ²)	29,1 (6,0)	24	25,6 (3,9)	13	0,076 ^a

SD = Keskihajonta

^a Kahden riippumattoman otoksen t-testi

^b Khiin neliö -testi

^c Mann-Whitney U-testi

Taulukko 3. Lipidi- ja kreatiniinitasot statiineja käyttävillä potilailla ja vertailuryhmällä.

	Statiinien käyttö +	Statiinien käyttö –	p-arvo
	n=23	n=14	
	Keskiarvo (SD)	Keskiarvo (SD)	
Kokonaiskolesteroli (mmol/l)	4,0 (0,7)	4,7 (1,1)	0,012 ^a
HDL-kolesteroli (mmol/l)	1,1 (0,3)	1,3 (0,3)	0,180 ^a
LDL-kolesteroli (mmol/l)	2,3 (0,6)	2,7 (0,8)	0,093 ^a
Triglyseridit (mmol/l)	mediaani: 1,4 (1,0)	mediaani: 1,7 (0,9)	0,406 ^b
Plasman kreatiniini (µmol/l)	97 (54)	77 (23)	0,189 ^a

SD = Keskihajonta

^a Kahden riippumattoman otoksen t-testi

^b Mann-Whitney U-testi

Taulukko 4. Adheesiomolekyylien lasiaiskonsentraatiot statiineja käyttävillä potilailla ja vertailuryhmällä.

	Statiinien käyttö + n=23 Mediaani (SD)	Statiinien käyttö – n=14 Mediaani (SD)	p-arvo (Mann-Whit- ney)
sE-selectin (pg/ml)	7,3 (6,6)	5,3 (5,4)	0,002
sICAM-1 (pg/ml)	50,8 (36,2)	28,8 (35,9)	0,033
sICAM-3 (pg/ml)	0,0 (1,1)	0,0 (0,0)	0,445
sPECAM-1 (pg/ml)	8,1 (4,4)	5,95 (2,8)	0,116
sP-Selectin (pg/ml)	31,5 (20,9)	27,3 (15,7)	0,592
sVCAM-1 (pg/ml)	9,0 (12,6)	7,7 (4,8)	0,112

SD = Keskihajonta

Taulukko 5. Sytokiinien lasiaiskonsentraatiot statiineja käyttävillä potilailla ja vertailuryhmällä.

	Statiinien käyttö + n=23 Mediaani (SD)	Statiinien käyttö – n=14 Mediaani (SD)	p-arvo (Mann-Whit- ney)
IL-1 β (pg/ml)	0,0 (0,59)	0,0 (1,2)	0,112
IL-2 (pg/ml)	0,0 (14,5)	0,0 (22,6)	0,935
IL-4 (pg/ml)	0,7 (8,3)	5,6 (7,1)	0,532
IL-5 (pg/ml)	1,5 (2,6)	1,3 (2,3)	0,862
IL-6 (pg/ml)	75,0 (1194,1)	34,1 (57,9)	0,038
IL-8 (pg/ml)	59,8 (497,4)	33,4 (41,6)	0,048
IL-10 (pg/ml)	3,5 (2,9)	2,7 (1,6)	0,415
IL-12 (p70) (pg/ml)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,000
TNF- α (pg/ml)	0,2 (1,0)	0,0 (1,4)	0,446
TNF- β (pg/ml)	0,0 (0,6)	0,0 (0,8)	0,622
INF- γ (pg/ml)	14,7 (56,0)	8,3 (39,0)	0,085

SD = Keskihajonta

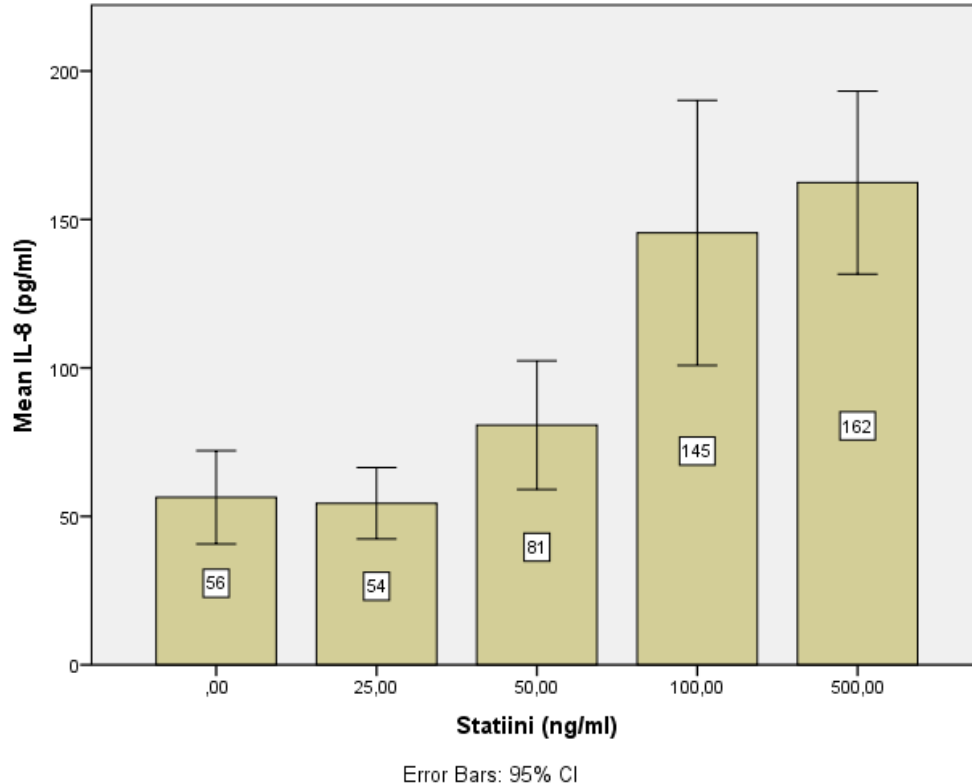
4.2 Soluviljelyaineisto

Kaikista soluviljelyissä käytetyistä vastemuuttujista ei saatu mitattavia pitoisuuksia, joten alla käsitellään vain IL-8:n ja VEGF:n eritykseen vaikuttavia tekijöitä. IL-6-, ICAM-1- ja sE-Selectin-pitoisuudet eivät olleet muutamia yksittäisiä näytteitä lukuun ottamatta mitattavissa, eikä tuloksia voida siis tässä esittää.

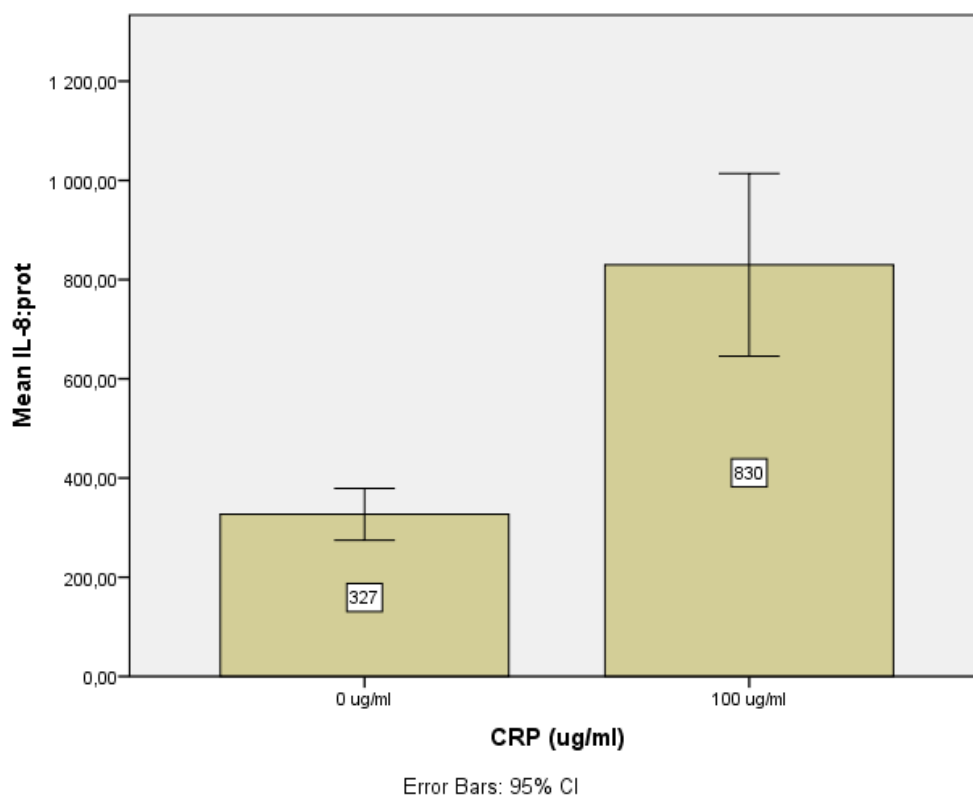
4.2.1 IL-8 eritykseen vaikuttavat tekijät

Statiinialtistus lisäsi IL-8:n eritystä (kuvaaja 1). CRP-altistuksessa molempien solulinjojen IL-8-eritys lisääntyi ja tämä näkyi selkeämmin RF/6A-soluissa (kuvaaja 2). Hypoksialla oli IL-8-eritystä lisäävä vaikutus, mikä tuli esille selkeämmin RF/6A-soluissa (kuvaaja 3), mutta pitoisuuksien keskihajonta oli kuitenkin suuri, joten tulos ei tilastollisesti merkittävä.

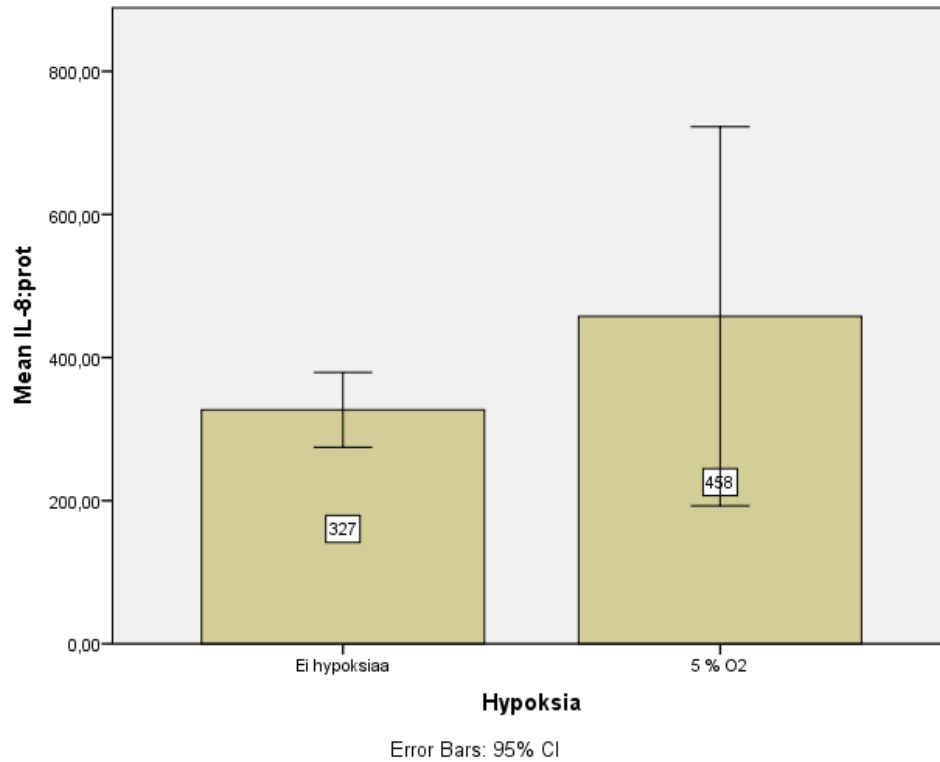
Kuvaaja 1. Statiinin vaikutus IL-8-eritykseen.



Kuvaaja 2. CRP:n vaikutus IL-8-eritykseen RF/6A-soluilla. IL-8-määrä suhteutettu näytteen proteiinitasoon.



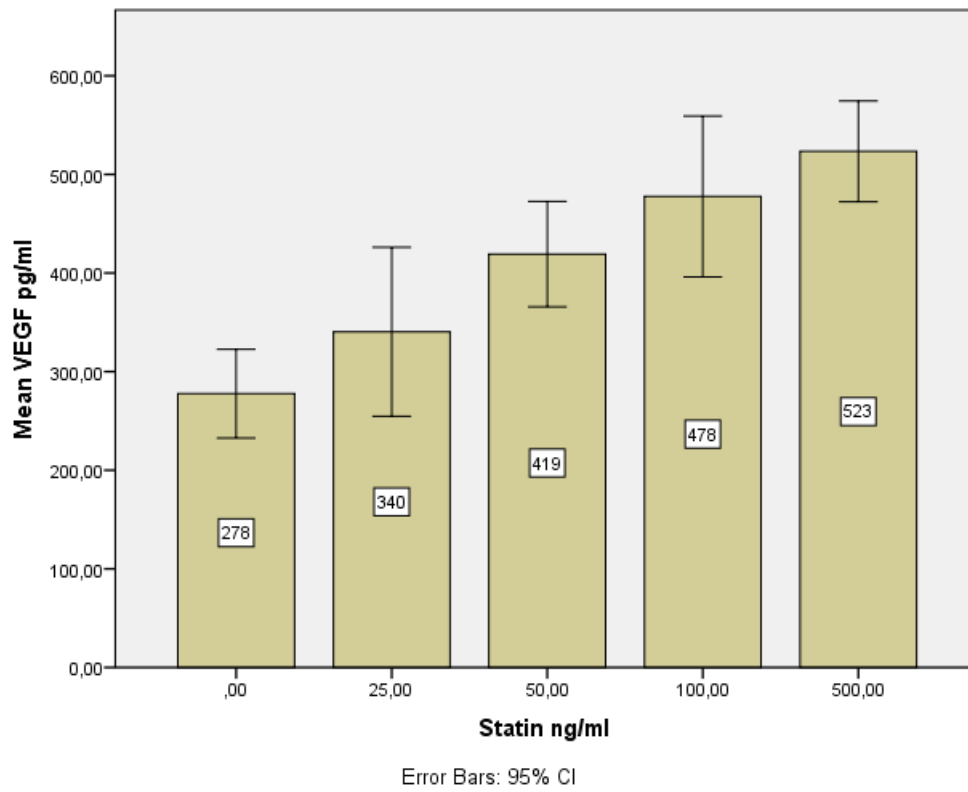
Kuvaaja 3. Hypoksian vaikutus IL-8-eritykseen RF/6A-soluilla. IL-8-määrä suhteutettu näytteen proteiinitasoon.



4.2.2 VEGF eritykseen vaikuttavat tekijät

Soluviljelyssä statiinien havaittiin lisäävän VEGF-eritystä suhteessa statiinikonsentraatioon (kuvaaja 4). Glukoosipitoisuuksilla ei ollut selkeää vaikutusta VEGF-eritykseen (ei esitetty kuvaajassa).

Kuvaaja 4. Statiinien vaikutus VEGF-eritykseen.



5. POHDINTA

Diabeettiseen retinopatiaan tiedetään liittyvän useiden inflammaatiomarkkereiden kohonneita pitoisuuksia ja inflammaation arvellaan olevan keskeinen tekijä diabeettisen retinopatian kehitymisessä (Bolinger & Antonetti 2016, Joussen et al. 2004, McAuley et al. 2014, Tang & Kern 2011). Artikkelissaan vuodelta 2013 Koskela et al osoittivat, että PDR:aan liittyvät vuodot verkkokalvon verisuonistosta eivät selitä lasiaisen korkeita IL-6 ja IL-8 tasoja PDR-potilailla, vaan näiden sytokiiniinien kohonnutta pitoisuutta selittää parhaiten niiden erittyminen verkkokalvon soluista tai muista silmän kudoksista (Koskela et al. 2013). IL-6-pitoisuudet korreloivat IL-8-pitoisuuksien kanssa ja nämä yhdessä liittyvät endoteelisolujen virheelliseen toimintaan ja inflammaatiokaskadiin, johon liittyy leukosyyttien kerääntymistä verkkokalvon suonistoon sekä eri adheesiomolekyylien ja kasvutekijöiden lisääntynyt ilmentyminen (Yoshida et al. 1998, Yoshimura et al. 2009, Yuuki et al. 2001).

Tämän tutkimuksen potilasaineistossa havaittiin, että statiinien käyttöön liittyy kohonneet IL-6- ja IL-8-pitoisuudet. Ryhmien välillä oli kuitenkin jonkin verran eroja diabeteksen kestossa ja paastoglukoosissa. Glykosyloituneen hemoglobiinin välillä ei ollut ryhmien välillä eroa, minkä vuoksi voidaan olettaa, että oleellista eroa diabeteksen hoitotasapainossa ryhmien välillä ei ole huolimatta paastosokerin eroavaisuuksista. Eroa diabeteksen kestossa ei kuitenkaan voida aivan täysin sivuuttaa, kun huomioidaan, että aika diagnoosista on merkittävä tilastollinen tekijä PDR:n ilmaantumisessa ja etenemisessä. Yllä mainituista epävarmuustekijöistä huolimatta so-luviljelmalleista saadut tulokset tukevat potilasaineistosta saatuja tuloksia.

VEGF:n merkitys diabeettisen retinopatian synnyssä on myös hyvin osoitettu ja sen vasta-aine, bevasitsumabi, on osoittautunut tehokkaaksi hoidoksi PDR-potilailla (Bolinger & Antonetti 2016). Colakoglu et al (2010) havaitsivat atorvastatiinin lisäävän angiogeneesiä terapeuttisilla annoksilla (0,5 mg/kg/päivä) suurten annosten (2,5 mg/kg/päivä) aiheuttaessa endoteelisolujen apoptoosia ja siten vähentävän angiogeneesiä. Tässä tutkimuksessa kaksivaiheista vaikutusta ei tullut tässä tutkimuksessa esille, vaan VEGF:n erityis lisääntyi suhteessa statiinikonsentraatioon myös korkeimmilla annoksilla.

Potilasaineistossa havaittiin korkeampia sE-Selectin- ja sICAM-1-pitoisuuksia statiineja käyttävällä ryhmällä. Molemmat molekyylit ovat adheesiomolekyylejä, jotka lisäävät leukosyyttien

kiinnittymistä endoteelin pintaan verisuonistossa. Interventiotutkimuksissa statiinien on todettu alentavan E-Selectin- ja ICAM-1-tuotantoa (Jilma et al. 2003). Onkin oletettavissa, että havaittu ero adheesiomolekyyliipitoisuuksissa johtuu todennäköisimmin statiini+ -ryhmällä jo ennen statiinihoitoa olleista korkeammista pitoisuuksista, jotka eivät statiinihoidollakaan täysin ole hävinneet. Adheesiomolekyylien tiedetään olevan merkittävä tekijä ateroskleroottisten sairauksien synnyssä (Jarvisalo et al. 2006) ja on oletettavaa, että statiineja käyttävällä ryhmällä näitä sairauksia on vertailuryhmää enemmän.

IL-8:n, IL-6:n ja VEGF:n erityksen lisääntyminen statiinialtistuksen myötä tukee havaintoa, etteivät statiinit vähennä PDR:aan liittyvää inflammaatiota, kuten ne vähentävät systeemistä inflammaatiota, vaan saattavat jopa jouduttaa tautiprosessia inflammaation lisääntymisen kautta.

Tutkimuksen heikkouksina on potilasaineiston pieni koko sekä pienet ryhmien väliset erot veren paastosokerin ja diabeteksen keston osalta. Tutkimuksen vahvuutena voidaan pitää sitä, että soluviljelymalleista *in vitro* saadut tulokset olivat samansuuntaisia kuin potilasaineistossa *in vivo* ja näin ollen tutkimuksessa käytetyt soluviljelymallit olivat tulehdusreaktion mallintamiseen päteviä. Potilasaineistosta saatu näyttö tukee oletusta, että samat tutkimustulokset olisivat löydettävissä myös laajemmasta aineistosta, ja aikaisemmin on saatukin samansuuntaisia tuloksia statiineiden ja VEGF:n osalta (Liinamaa & Savolainen 2008).

6. YHTEENVETO

Statiinialtistus lisää IL-8:n ja VEGF:n tuotantoa verkkokalvon soluissa ja hypoksia ja inflamaatio ovat siihen myötävaikuttavia tekijöitä. Statiinien vaikutus on tässä tutkimuksessa mallinnettu soluviljelymalleilla *in vitro* ja myös tutkimuksen potilasaineisto tukee löytöä *in vivo*. Potilasaineiston perusteella todettiin statiinien nostavan myös IL-6:n, sE-Selectinin ja sICAM-1:n lasiaiskonsentraatioita.

7. LÄHTEET

- Bek EL, McMillen MA, Scott P, Angus LDG & Shaftan GW (2002) The effect of diabetes on endothelin, interleukin-8 and vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in rats. *Clin Sci* 103(Suppl 48): 424S-429S.
- Bjorkhem-Bergman L, Lindh JD & Bergman P (2011) What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects?. *Br J Clin Pharmacol* 72(1): 164-165.
- Bolinger MT & Antonetti DA (2016) Moving Past Anti-VEGF: Novel Therapies for Treating Diabetic Retinopathy. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9).
- Colakoglu T, Nursal TZ, Ezer A, Kayaselcuk F, Parlakgumus A, Belli S, Karakayali H & Haberal M (2010) Effects of different doses of statins on liver regeneration through angiogenesis and possible relation between these effects and acute phase responses. *Transplant Proc* 42(9): 3823-3827.
- Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, 3rd, Klein R & American Diabetes A (2004) Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care* 27(Suppl 1): S84-7.
- Ganda OP (2016) Statin-induced diabetes: incidence, mechanisms, and implications. *F1000Research* (5).
- Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S & Hassan ZM (2011) Roles of IL-8 in ocular inflammations: a review. *Ocular Immunology & Inflammation* 19(6): 401-412.
- Jarvisalo MJ, Juonala M & Raitakari OT (2006) Assessment of inflammatory markers and endothelial function. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 9(5): 547-552.
- Jilma B, Joukhadar C, Derhaschnig U, Rassoul F, Richter V, Wolzt M, Dorner GT, Petternel V & Wagner OF (2003) Levels of adhesion molecules do not decrease after 3 months of statin therapy in moderate hypercholesterolaemia. *Clin Sci* 104(2): 189-193.
- Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS & Adamis AP (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB Journal* 18(12): 1450-1452.
- Koskela UE, Kuusisto SM, Nissinen AE, Savolainen MJ & Liinamaa MJ (2013) High vitreous concentration of IL-6 and IL-8, but not of adhesion molecules in relation to plasma concentrations in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 49(2): 108-114.
- Kowluru RA & Odenbach S (2004) Role of interleukin-1beta in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(11): 4161-4166.
- Li G, Tang J, Du Y, Lee CA & Kern TS (2011) Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Molecular Vision* 17: 3156-3165.

- Liinamaa MJ & Savolainen MJ (2008) High vitreous concentration of vascular endothelial growth factor in diabetic patients with proliferative retinopathy using statins. *Ann Med* 40(3): 209-214.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- McAuley AK, Sanfilippo PG, Hewitt AW, Liang H, Lamoureux E, Wang JJ & Connell PP (2014) Vitreous biomarkers in diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes & its Complications* 28(3): 419-425.
- Morello CM (2007) Etiology and natural history of diabetic retinopathy: an overview. *American Journal of Health-System Pharmacy* 64(17 Suppl 12): S3-7.
- Powell ED & Field RA (1964) Diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis. *Lancet* 2(7349): 17-18.
- Saari KM (2011) *Silmätautioppi*. Helsinki, Kandidaattikustannus.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D & Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813(5): 878-888.
- Simo R, Sundstrom JM & Antonetti DA (2014) Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 37(4): 893-899.
- Tang J & Kern TS (2011) Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in Retinal & Eye Research* 30(5): 343-358.
- Tikhonenko M, Lydic TA, Wang Y, Chen W, Opreanu M, Sochacki A, McSorley KM, Renis RL, Kern T, Jump DB, Reid GE & Busik JV (2010) Remodeling of retinal Fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elov12 and Elov14. *Diabetes* 59(1): 219-227.
- Yoshida A, Yoshida S, Khalil AK, Ishibashi T & Inomata H (1998) Role of NF-kappaB-mediated interleukin-8 expression in intraocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(7): 1097-1106.
- Yoshimura T, Sonoda K, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, Ueno A, Hata Y, Yoshida H & Ishibashi T (2009) Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 4(12): e8158.
- Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I & Kishi S (2001) Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *Journal of Diabetes & its Complications* 15(5): 257-259.