

DOVEZI EXPERIMENTALE PRIVIND EFECTUL BENEFIC AL TRATAMENTULUI PRECOCE CU ETANERCEPT ÎN ARTRITA JUVENILĂ IDIOPATICĂ

Dr. Elena Simona Tucaliuc¹, Dr. Ionela Lăcrămioara Șerban¹,
Dr. Cristina Oprea¹, Dr. Loredana Hurjui¹, Dr. M.M. Hogaș¹, Dr. D. Tucaliuc¹,
Dr. D.N. Șerban¹, Dr. Stela Goția²

¹Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

³Clinica II Pediatrie, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii „Sf. Maria”, Iași

REZUMAT

Statusul inflamator sistemic este implicat în leziunile vasculare incipiente. Artrita indusă de adjuvant la șobolan este un model de artrită experimentală frecvent utilizat, datorită caracteristicilor comune cu artrita reumatoidă.

Obiectiv: Studiu experimental privind afectarea relaxării endotelio-dependente la șobolani cu AIA și efectul terapiei imunomodulatoare cu etanercept.

Material și metodă: Am utilizat șobolani Wistar masculi, cu greutatea variind între 250-300 g. Artrita a fost indusă printr-o singură injecție intradermică de 0,1 ml adjuvant complet Freund la nivelul suprafeței plantare a lăbuței drepte. Severitatea artritei a fost cuantificată prin metoda pletismometrică. Injecția subcutanată de etanercept s-a efectuat de două ori pe săptămână, începând cu ziua 22 postimunizare, timp de 21 de zile. Reactivitatea vasculară a fost determinată la nivelul arterei poplitee. După precontractarea cu fenilefrină, am determinat răspunsul vasodilatator la acetilcolină.

Rezultate: Vasodilatația indusă de acetilcolină la nivelul inelelor de arteră poplitee este semnificativ mai mică în loturile de șobolani cu AIA, comparativ cu loturile de control. Etanerceptul reduce disfuncția endotelială la șobolani cu AIA.

Concluzii: Statusul inflamator cauzează o disfuncție endotelială semnificativă la șobolani cu AIA. Terapia imunomodulatoare cu etanercept a îmbunătățit semnificativ disfuncția endotelială.

Cuvinte cheie: disfuncție endotelială, artrită indusă de adjuvant, etanercept, șobolan

Artrita indusă de adjuvant (AIA) este caracterizată prin inflamație și formarea unui panus agresiv care conduce la degradarea cartilajului și osului (1,2). AIA la șobolan este un model de boală inflamatorie articulară extrem de des folosit, care prezintă caracteristici comune cu artrita reumatoidă (3). La majoritatea modelelor pe animale de experiență cu inflamație articulară s-a observat hipoxie intraarticulară (4), similar cu artrita reumatoidă de la om. Hipoxia intra-articulară și acidoza lactică consecutivă în articulația inflamată se datorează unui flux sanguin insuficient, care poate fi determinat de o combinație de factori cum ar fi: incapacitatea proceselor angiogenetice de a

susține cerințele proceselor de creștere a panusului proliferativ și a țesutului sinovial și/sau mediul inflamator din articulația artritică predispune la disfuncție vasculară (5).

Studii recente au demonstrat că funcția endotelială este redusă la pacienții cu artrită juvenilă idiopatică asociată cu un status inflamator important. Cu toate că mecanismele care stau la baza disfuncției endoteliale în AJI nu sunt pe deplin elucidate, se poate spune că statusul inflamator sistemic poate fi implicat în afectarea precoce vasculară. În susținerea acestei ipoteze s-a dovedit că terapia cu anti-TNF α îmbunătățește disfuncția endotelială la acești pacienți. (6).

Adresa de corespondență:

Drd. Elena Simona Tucaliuc, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa”, Str. Universității Nr. 16, Iași
e-mail: etucaliuc@yahoo.com

Modelele pe animale de experiență sunt esențiale în înțelegerea mecanismelor fiziopatologice ale bolii la om.

OBIECTIVUL LUCRĂRII

Studiu experimental privind afectarea relaxării endotelio-dependență în modelele cu artrită indusă de adjuvant în artera aortă și poplitee și influența terapiei imunomodulatoare cu etanercept asupra disfuncției endoteliale.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru a elucida mecanismul disfuncției endoteliale produs de inflamația acută sistemică, am folosit șobolani Wistar, masculi, cărora li s-a indus artrită cu adjuvant (AIA).

Animale de experiență

Pentru toate experimentele au fost utilizați șobolani Wistar masculi adulți, cu greutate variind între 250-300 g. Animalele au fost preluate de la centru cu o săptămână înainte de începerea studiului, pentru a se acomoda cu noile condiții de mediu. Șobolanii au fost găzduiți în cuști individuale, la o temperatură de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclu nictemeral de 12 ore lumină/12 ore întuneric, cu hrană și apă la discreție. Toate animalele au fost menținute în condiții similare de mediu și alimentație.

Sacrificarea a fost efectuată întotdeauna prin simplă decapitare, fără vreo intervenție farmacologică asupra animalului viu sau sacrificat. Toate procedurile experimentale folosite sunt în concordanță cu reglementările internaționale în vigoare privind utilizarea animalelor în cercetarea științifică (Directiva 609 din 24 noiembrie 1986, a Consiliului Comunității Europene).

Inducerea și evaluarea clinică a artritei

AIA a fost indusă după metoda propusă de Newbould, cu câteva modificări (7). Lăbuța dreaptă a fiecărui șobolan a fost injectată intradermic cu un volum de 0,1 ml de adjuvant complet Freund, ce conține 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*. Severitatea artritei este evaluată pe baza indicelui artritic în acord cu apariția eritemului și/sau a gradului de tumefiere al articulației (8). Pentru stabilirea acestui index artritic sunt evaluate toate cele 4 membre ale șobolanului, scorul final rezultând prin însumarea următoarelor puncte: 0 = aspect normal, 1 = grad scăzut de tumefiere și/sau eritem, 2 = eritem și tumefiere medie, 4 = eritem și tumefiere

marcată. De asemenea, se mai măsoară greutatea corporală și edemul (cu ajutorul unui pletismometru). Toate determinările au fost efectuate de două sau de trei ori pe săptămână. Injectarea subcutanată de etanercept 0,4 mg/kg/corp s-a efectuat de două ori pe săptămână, începând cu ziua 22 postimunizare, timp de 21 de zile.

Reactivitatea vasculară

După sacrificarea animalelor de experiență, s-a îndepărtat aorta și artera poplitee de la membrul cu inflamația cuantificată și s-au secționat fragmente vasculare de 1-2 mm lungime. Acestea s-au montat în miograful orizontal cu fire de tip Mulvany. Baia de organ a miografului conține 2,5 ml de soluție salină fiziologică (PSS) la 37°C , cu următoarea compoziție (mM): NaCl 119; NaHCO_3 15; KCl 4,6; NaH_2PO_4 1,2; MgCl_2 1,2; CaCl_2 1,5; glucoză 6. PSS este barbotată continuu cu un amestec gazos 95% O_2 și 5% CO_2 ; pH-ul este 7,4. Preparatele vasculare au fost echilibrate aproximativ 1 oră, după care se tensionează 1g.

Evidențierea capacității contractile a preparatelor vasculare s-a realizat mai întâi cu soluție de potasiu (60 mM) și apoi cu fenilefrină (10 μM). În cursul platoului din cadrul contracțiilor stabile s-au administrat acetilcolină în concentrații crescătoare. Timpul de incubare a preparatelor vasculare cu L-NAME a fost de aproximativ 20 de minute. Fiecare fragment vascular a fost supus la un singur tratament. Răspunsurile au fost exprimate ca % din precontractia indusă de fenilefrină.

Substanțele utilizate

Substanțele active folosite pentru inducerea artritei și pentru determinarea reactivității vasculare provin de la Sigma, US.

Analiza statistică

Datele sunt menținute ca medie \pm ESM; n indică numărul de fragmente vasculare examinate. Analiza statistică pentru valorile EC50 s-a realizat prin testul Student. Valori ale lui $p \leq 0,05$ sunt considerate semnificative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Endoteliul joacă un rol important în reglarea tonusului vascular; el eliberează factori vasoactivi cu rol vasodilatator și vasoconstrictor. Este bine cunoscut faptul că alterarea funcției endoteliale conduce la apariția și progresia aterosclerozei (9). Disfuncția endotelială reprezintă, pe de o parte,

reducerea biodisponibilității de oxid nitric (NO), un vasodilatator endotelio-dependent major, și pe de altă parte, a prostaciclina și factorului hiperpolarizant derivat din endotelium (EDHF) într-o multitudine de paturi vasculare (10,11).

Cu toate că EDHF, NO și prostaciclina operează diferit asupra efectorilor sau prin sisteme diferite de mesageri secunzi, există o interacțiune permanentă între acești factori vasodilatatori. S-a demonstrat că NO inhibă ciclooxigenaza (COX) și citocromul P450, ca și propria sa sinteză, prin mecanism de feedback negativ asupra NO sintezei (12, 13). Pe de altă parte, s-a demonstrat că EDHF este produs printr-un mecanism citocrom P450-dependent (14, 15). Astfel, NO poate regla sinteza de EDHF prin inhibarea acestei enzime. De asemenea, se discută mult și despre interacțiunile între acești factori vasodilatatori endotelio-dependenți legați de sistemul de mesageri secunzi sau prin activarea canalelor diferite de la nivel endotelial sau de la nivelul mușchiului neted vascular. Un exemplu în acest sens este faptul că hiperpolarizarea membranei celulei endoteliale de către un mediator poate determina eliberarea dependentă de calciu a altor factori relaxanți (16). În unele paturi vasculare, NO pare a fi mediatorul primar al relaxării endotelio-dependente, pe când EDHF și prostaciclina contribuie într-o măsură mai limitată (10, 17). Studii recente au arătat că NO și cGMP pot afecta relaxarea endotelio-dependență mediată de EDHF (18,19) sugerând că EDHF poate funcționa ca un sistem de „back-up” care se manifestă când sinteza de NO este redusă (20,21).

Disfuncția endotelială indusă de procesul inflamator modifică reactivitatea la factori vasoactivi. Acetilcolina determină relaxarea inelelor de aortă și arteră poplitee precontractate cu fenilefrină, atât la loturile de control, cât și la cele cu AIA. Relaxarea la acetilcolină $10^{-7}M$, $10^{-6}M$ și $10^{-5}M$ în preparatele de arteră poplitee în loturile cu AIA precontractate cu fenilefrină este de 13,1%, 34,4% și respectiv 56%, iar la loturile martor este de 55,7%, 85,7% și 99,6%. Relaxarea la acetilcolină a inelelor de arteră poplitee în loturile cu AIA este semnificativ mai mică comparativ cu loturile martor ($p \leq 0,05$) (figura 1), ceea ce poate conduce la ideea existenței disfuncției endoteliale la această categorie la șobolani.

Studii anterioare au arătat că, la nivelul arterei poplitee, un rol major în relaxarea endotelio-dependență îl are oxidul nitric. Am folosit inhibitor competitiv neselectiv de oxid nitric sintezei (L-NAME) și am observat că relaxarea la Ach indusă de NO este scăzută la loturile cu AIA în comparație cu loturile

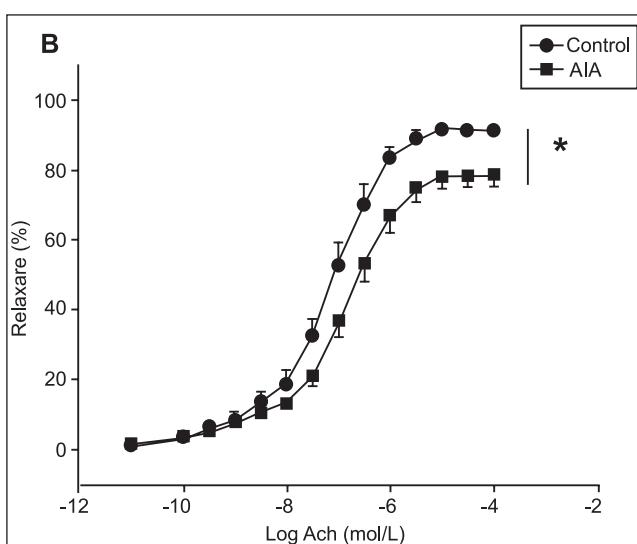
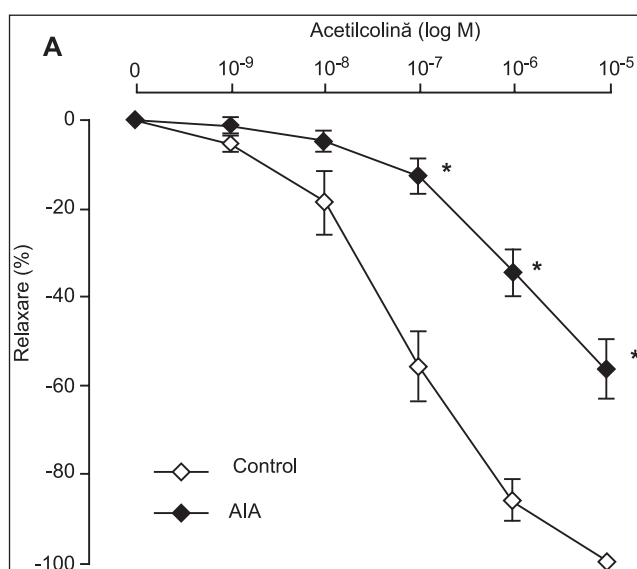


Figura 1. Curba doză-efect la acetilcolină pe fragmentele arteriale (A – arteră poplitee, B – aortă) cu endotelium intact, precontractate cu fenilefrină; relaxarea a fost exprimată ca procent din precontractația indusă de fenilefrină. Valorile sunt exprimate ca medie \pm ESM ($n = 6$ șobolani per grup). * = $P \leq 0,01$ versus control.

martor (figura 2). Relaxarea la Ach $10^{-7}M$, $10^{-6}M$ și $10^{-5}M$ în preparatele pretratate cu L-NAME la loturile de șobolani cu AIA este de 18%, 20% și respectiv 40%, iar la loturile martor pretratate cu L-NAME este de 20%, 30% și respectiv 55%. Observația conduce la concluzia că producția de NO este scăzută la loturile cu AIA în comparație cu loturile martor.

Inelele arteriale au fost preparate din artera poplitee de la șobolani din lotul de control, lotul cu AIA și lotul cu AIA tratați cu ETN administrat subcutanat în doză de 0,4 mg/kg/corp de două ori pe săptămână, începând cu ziua 22 postimunizare,

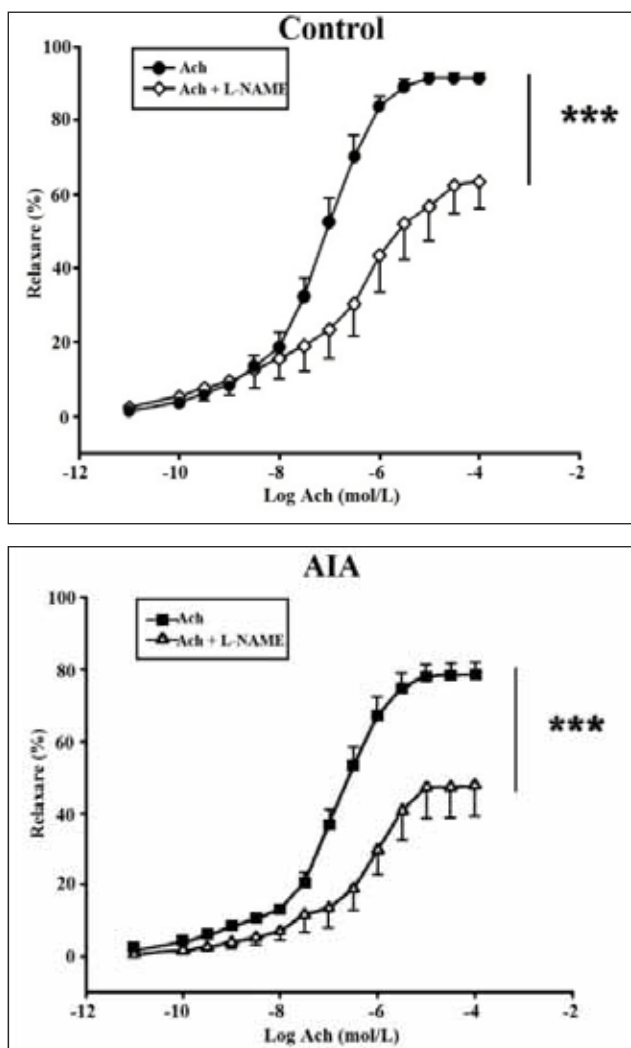


Figura 2. Efectul L-NAME asupra vasodilatației la Ach la șobolanii din lotul cu AIA și lotul de control. Valorile sunt exprimate ca medie \pm ESM ($n = 6$ șobolani per grup). * = $P \leq 0,01$ versus control

timp de 21 de zile. S-a înregistrat curba concentrație răspuns la Ach cu endoteliul intact.

Relaxarea la Ach 10^{-7} M, 10^{-6} M și 10^{-5} M la loturile de șobolani cu AIA tratați cu ETN este de 40%, 80% și respectiv 90% în comparație cu loturile cu AIA netratate cu ETN, unde este de 20%, 40% și respectiv 52%. S-a observat că tratarea cu ETN a

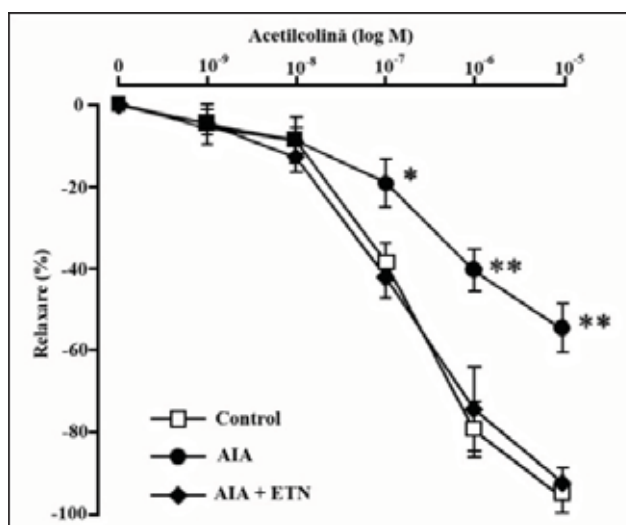


Figura 3. Efectul etanerceptului asupra disfuncției endoteliale la șobolanii cu AIA. Relaxarea a fost exprimată ca procent din precontractia indusă de FEN. Valorile sunt exprimate ca medie \pm ESM ($n=6$ șobolani per grup). * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$, versus control

loturilor de șobolani cu AIA reduce disfuncția endotelială (figura 3).

CONCLUZII

1. Artrita indusă de adjuvant la șobolani este un model de boală inflamatorie articulară având caracteristici comune cu artrita reumatoidă de la om;
2. Relaxarea la acetilcolină a inelelor de arteră poplitee în loturile de șobolani cu AIA este semnificativ mai mică comparativ cu loturile martor, ceea ce dovedește existența statusului inflamator cu o disfuncție endotelială semnificativă. Această disfuncție endotelială se datorează producției scăzute de oxid nitric la arterele poplitee afectate de procesul inflamator.
3. Administrarea injectabilă subcutanată de etanercept a îmbunătățit semnificativ disfuncția endotelială la șobolanii cu AIA după 21 de zile de tratament.

Experimental evidence on the beneficial effect of early treatment with etanercept in juvenile idiopathic arthritis

Elena Simona Tucaliuc¹, Ionela Lăcrămioara Șerban¹, Cristina Oprita¹, Loredana Hurjui¹, M. M. Hogaș¹, D. Tucaliuc¹, D. N. Șerban¹, Stela Gotia²

¹*Faculty of Medicine, Gr. T. Popa” University of Medicine and Pharmacy, Iasi*
²*2nd Clinic of Pediatrics, “St. Mary” Emergency Clinical Hospital for Children, Iasi*

ABSTRACT

Systemic inflammatory status is involved in early vascular lesions. Adjuvant-induced arthritis in rats is a commonly used experimental model of arthritis due to common features with rheumatoid arthritis in humans.

Aim: The aim of this study was to determine endothelio-dependent relaxation impairment generated by use of immunomodulatory therapy, etanercept.

Material and method: We used male, adult Wistar rats weighing 250-300 g. Arthritis was induced by a single intradermal injection of 0,1 ml complet Freund adjuvant into the plantar surface of the right hind-foot. Arthritis severity was quantified by pletismometry method. Etanercept therapy was performed twice a week, starting on day 22 post-adjuvant injection for 21 days. Vascular reactivity was performed on popliteal artery. After precontraction with phenylephrine, we determined the vasodilatory response to acetylcholine.

Results: Acetylcholine-induced vasodilation in popliteal artery rings was significantly impaired in adjuvant-induced arthritis rats, compared to control rats. Etanercept reduces endothelial dysfunction in adjuvant-induced arthritis rats.

Conclusions: Inflammatory status causes significant endothelial dysfunction in adjuvant-induced arthritis rats. Immunomodulatory therapy with etanercept significantly improves endothelial dysfunction.

Key words: endothelial dysfunction, adjuvant-induced arthritis, etanercept, rat

Adjuvant-induced arthritis (AIA) is characterized by inflammation and aggressive pannus formation leading to bone and cartilage destruction (1,2). Adjuvant-induced arthritis in rats is a commonly used experimental model of arthritis due to common features with rheumatoid arthritis in humans. (3). In most animal experimental models of joint inflammation was observed intra-articular hypoxia (4), similar to rheumatoid arthritis. Intra-articular hypoxia and consecutive lactic acidosis in inflamed joint is due to insufficient blood flow, which may be caused by a combination of factors such as: inability of angiogenetic processes to support the growth process requirements of proliferative pannus and synovial tissue and/or inflammatory environment of arthritic joint predisposes to vascular dysfunction (5).

Recent studies have demonstrated that endothelial function is reduced in patients with juvenile idiopathic arthritis associated with an important inflammatory status. Although the mechanisms underlying endothelial dysfunction in AJI are not fully elucidated, it appears that systemic inflammatory status may be involved in early vascular damage. In support of this hypothesis has

been shown that anti-TNF therapy improves endothelial dysfunction in these patients. (6).

Experimental animal models are essential in understanding the pathophysiological mechanisms of human disease.

OBJECTIVE

Experimental study on impaired endothelio-dependent relaxation in adjuvant induced arthritis models on aorta and popliteal artery and effect of immunomodulatory therapy with etanercept on endothelial dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

To elucidate the endothelial dysfunction mechanism produced by acute systemic inflammation we used males Wistar rats, with adjuvant-induced arthritis (AIA).

Experimental animals

For all experiments were used adult male Wistar rats, weighing 250-300 g. Rats were housed in

individual cages at a temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$, nocturnal cycle 12-hour light/12 hours darkness, with food and water ad libitum. All animals were maintained under similar conditions of environment and food.

Sacrificing was always done by simple decapitation, without any pharmacological intervention. All experimental procedures used are consistent with existing international regulations on the use of animals in scientific research (Directive 609 of November 24, 1986, European Community Council).

Induction and clinical evaluation of arthritis

AIA was induced by the method proposed by Newbould, with some modifications (7). Right paw of each rat was intradermally injected with a volume of 0.1 ml adjuvant complete Freund containing 10 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis*. The severity of arthritis is evaluated on the basis of arthritic index consistent with the appearance of erythema and/or the degree of swelling of the joint (8). To establish the arthritic index were evaluated all four members of the rat, resulting final score by adding the following points: 0 = normal appearance, 1 = low degree of swelling and/or erythema, 2 = erythema and swelling average, 4 = erythema and swelling marked. There are also measures body weight and edema (by pletismometry). All determinations were performed by two or three times a week. Subcutaneous injection of etanercept 0.4 mg / kg / body was performed twice a week starting on day 22 after immunization, for 21 days.

Vascular reactivity

After the killing of experimental animals, aorta and popliteal artery was removed from the member with quantified inflammation and vascular fragments were cut 1-2 mm long. They were mounted on horizontal myograph with wire Mulvany type. Myograph bath organ contains 2.5 ml of physiological saline solution (PSS) at 37°C with the following composition (mM): NaCl 119, NaHCO_3 15, KCl 4.6, NaH_2PO_4 1.2, MgCl_2 1.2, CaCl_2 1, 5, glucose 6. PSS is continuously bubbled with a gas mixture 95% O_2 and 5% CO_2 , the pH is 7.4. Vascular preparations were balanced approximately 1 hour then were tension 1 g.

Highlighting the contractile capacity of vascular preparations was performed first with potassium solution (60 mM) and then phenylephrine (10 μM). During the plateau of stable contractions were administered increasing concentrations of acetylcholine. Vascular preparations during incubation

with L-NAME, was about 20 minutes. Each fragment was subjected to a vascular one treatment. Responses were expressed as % of phenylephrine-induced pre-contraction.

Substances used

Active substances used to induce arthritis and to determine vascular reactivity were from Sigma, U.S.

Statistical analysis

The data is maintained as mean \pm ESM; n indicates the number of vascular fragments examined. Statistical analysis for EC50 was done by Student test. Values of $p \leq 0.05$ are considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Endothelium plays an important role in regulating vascular tone; he releases vasoactive factors with vasodilating and vasoconstrictor role. It is well known that alterations in endothelial function lead to progression of atherosclerosis (9). Endothelial dysfunction is represented by the reduced bio-availability of nitric oxide (NO), a major endothelium-dependent vasodilator and prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in many vascular beds (10, 11).

Although EDHF, NO and prostacyclin operates differently on effectors or different systems of second messengers there is a constant interaction between these vasodilators factors. NO has been shown to inhibit cyclooxygenase (COX) and cytochrome P450 as its own synthesis by negative feedback mechanism of NO synthase (12,13). On the other hand, has been shown that EDHF is produced by cytochrome P450-dependent mechanism (14,15). Thus, NO can regulate the synthesis of EDHF by inhibiting this enzyme. It is also much talk about the interactions between these vasodilators endothelium-dependent factors related by the second messaging system or by activating different channels at their endothelial or vascular smooth muscle level. An example is that endothelial cell membrane hyperpolarisation by a mediator can cause calcium-dependent release of other relaxing factors (16). In some vascular beds, NO seems to be the primary mediator of endothelium-dependent relaxation, while EDHF and prostacyclin contributing in a more limited (10,17). Recent studies have shown that NO and cGMP may affect endothelium-dependent relaxation mediated by EDHF (18,19), suggesting that EDHF may function as a

system of “back-up” that occurs when NO synthesis is reduced (20, 21).

Endothelial dysfunction induced by inflammatory process alter reactivity in the vasoactive factors. Acetylcholine causes aorta and popliteal artery rings relaxation precontracted with phenylephrine to both control and AIA groups. Relaxation to acetylcholine 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M in the popliteal artery rings contracted with phenylephrine in AIA lot is 13.1%, 34.4% and 56%, and in the control group is 55, 7%, 85.7% and 99.6%. Relaxation to acetylcholine of popliteal artery rings in AIA group is significantly lower than control groups ($p \leq 0.05$) (figure 1), which may lead to the idea of endothelial dysfunction existence in rats from this category.

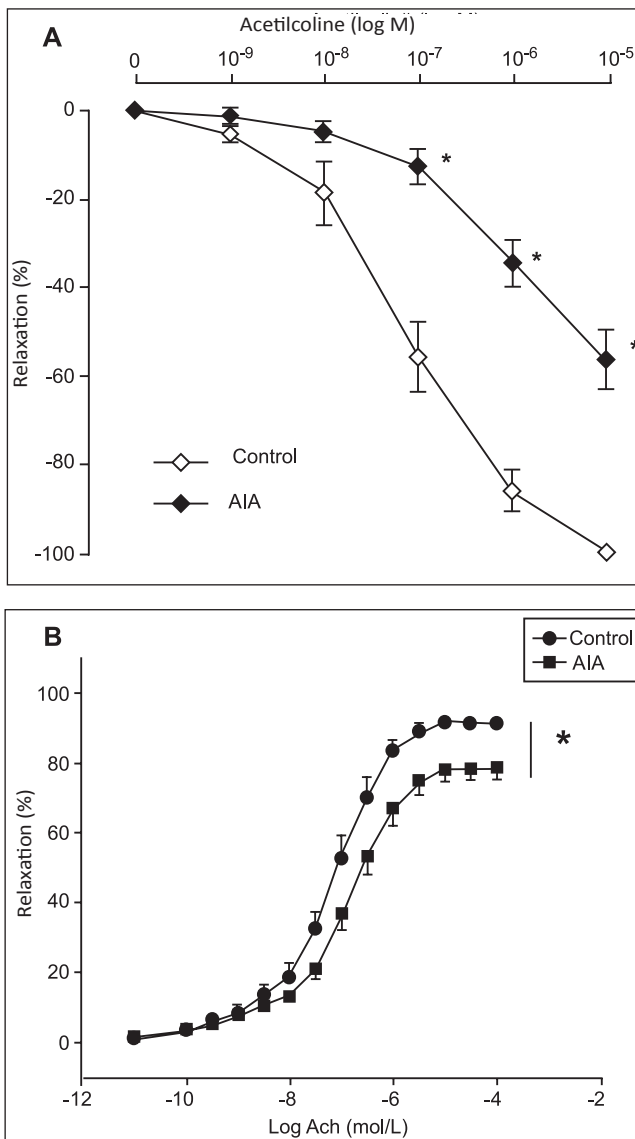


Figure 1. Dose-response curve to acetylcholine on arterial fragments (A – popliteal artery, B – aorta) with intact endothelium, contracted with phenylephrine; relaxation was expressed as a percentage of phenylephrine-induced precontraction. Values are expressed as mean \pm ESM ($n = 6$ rats per group). * $P \leq 0.01$ versus control.

Previous studies have shown that in popliteal artery a major role in endothelium-dependent relaxation is played by nitric oxide. We used a non-selective competitive inhibitor of nitric oxide synthase (L-NAME) and noticed that the Ach-induced relaxation of NO is low in AIA group compared with control groups (figure 2). Relaxation to Ach 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M in artery rings pretreated with L-NAME in AIA rats is 18%, 20% and 40% and in control group pretreated with L-NAME is 20%, 30% and 55%. Observation leads to the conclusion that NO production is low in AIA rats compared with control group.

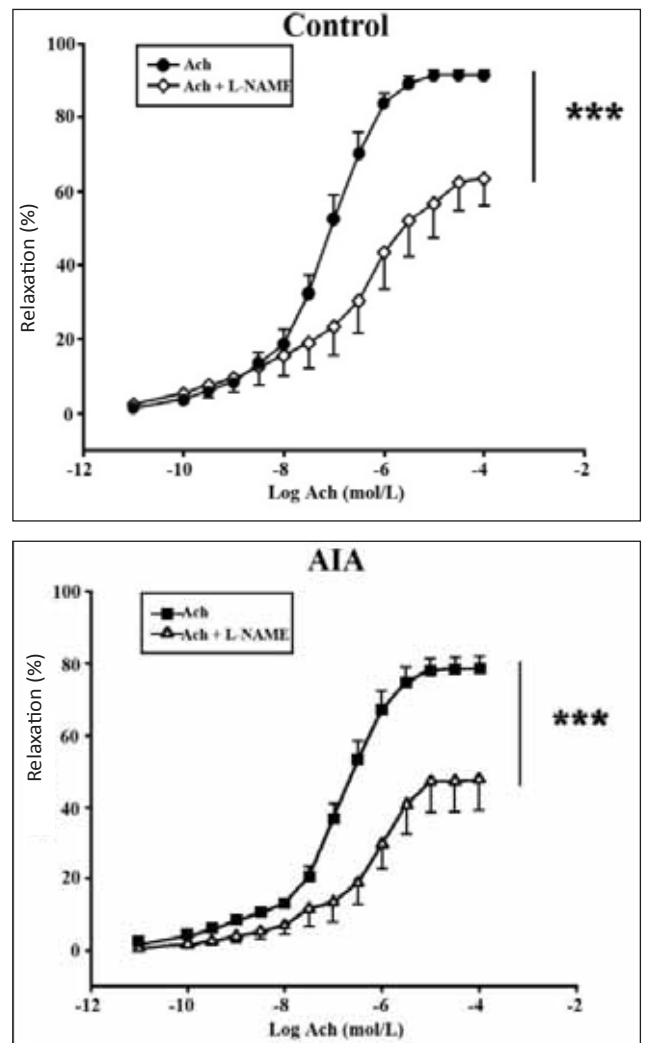


Figure 2. L-NAME effect on vasodilatation to Ach in AIA rats and control groups. Values are expressed as mean \pm ESM ($n = 6$ rats per group). * $P \leq 0.01$ versus control.

Arterial rings were prepared from popliteal artery of rats from control group, with AIA group and ETN administered subcutaneously at a dose of 0.4 mg / kg / body twice a week on day 22 post-adjuvant injection, for 21 days. treated group. Concentration-response curve to Ach with intact endothelium was recorded.

Relaxation to Ach 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M in AIA rats treated with ETN is 40%, 80% and 90%

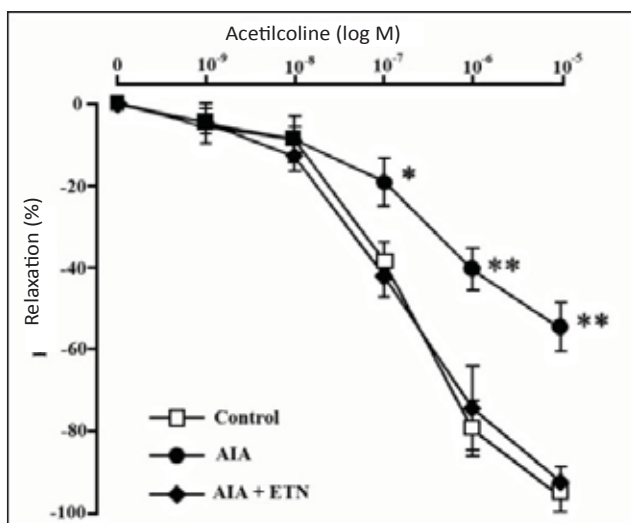


Figure 3. Etanercept effect of on endothelial dysfunction in AIA rats. Relaxation was expressed as a percentage of FEN-induced precontraction. Values are expressed as mean \pm ESM ($n = 6$ rats per group). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$, versus control.

compared with untreated AIA rats which is 20%, 40% and 52%. We observed that treatment with ETN of AIA rats decreases endothelial dysfunction (figure 3).

CONCLUSION

1. Adjuvant-induced arthritis in rats is a model of inflammatory joint disease with common features with rheumatoid arthritis in humans.
2. Relaxation to acetylcholine of popliteal artery rings in AIA rats group with is significantly lower than control groups which proves the existence of inflammatory status with a significant endothelial dysfunction. This endothelial dysfunction is due to lower production of nitric oxide in the popliteal arteries affected by the inflammatory process.
3. Subcutaneous injections of etanercept significantly improved endothelial dysfunction in AIA rats after 21 days of treatment.

REFERENCES

1. Carpenter M.A., Everett L.D. & Hall M.A. – High-resolution magnetic resonance imaging of arthritic pathology in the rat knee. *Skeletal Radiol* 1994; 23: 429-437
2. Griffiths R.J. – Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions* 1992; 35:88-95
3. Klareskog L. – What can we learn about arthritis from animal models? *Springer Semin Immunopathol* 1989; 11:315-33
4. Najafipour H. & Ferrell W.R. – Sympathetic innervation and α -adrenoceptor profile of blood vessels in the posterior region of the rabbit knee joint. *Br J Pharmacol.* 1993; 108:79–84
5. McDougall J.J., Elenko R.D. & Bray R.C. – Cholinergic vasoregulation in normal and adjuvant monoarthritic rat knee joints. *J Auton Nerv Syst.* 1998; 72:55-60
6. Vlahos A.P., Theocharis P., Bechlioulis A., Naka K.K., Vakalis K., Papamichael N.D., Alfantaki S., Gartzonika K., Mavridis A., Michalis L.K., Siamopoulou A. – Changes in Vascular Function and Structure in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Care Res.*, 2011 Sep 8. doi: 10.1002/acr.20613.
7. Newbould B.B. – Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterium adjuvant. *Br J Pharmacol.* 1963; 21:127-136
8. Verdrengh M., Holmadahl R., Tarkwski A. – Administration of antibodies to hyaluronan receptor (CD44) delays the start and ameliorates the severity of collagen II arthritis. *Scand J Immunol.*, 1995; 42:353-8
9. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. – Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; 109:27-33
10. Cohen R.A. & Vanhoutte P.M. – Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337 \pm 3349
11. Moncada S. & Higgs A. – The L-arginine-nitric oxide pathway. *New. Eng. J. Med.* 1993; 329: 2002 \pm 2012
12. Khatsenko O.G., Gross S.S., Rifkind A.B. & Vane J.R. – Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450- dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90:11147 \pm 11151
13. Ziyaat A., Zhang B-L. & Benzoni D. – Interactions between nitric oxide and prostanoids in isolated perfused kidneys of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119:388-392
14. Campbell W.B., Gebremedhin D., Pratt P.F. & Harder D.R. – Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* 1996; 78:415 \pm 423
15. Chen G. & Cheung D.W. – Modulation of endothelium- dependent hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in rat mesenteric artery by cytochrome P450 enzyme activity. *Circ. Res.* 1996; 79:827 \pm 833
16. Luckhoff A. & Busse R. – Calcium into endothelial cells and formation of EDRF is controlled by the membrane potential. *Pflügers Arch.* 1990; 416:305 \pm 311
17. Garland C.J., Plane F., Kemp B.K. & Cocks T.M. – Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; 16:23 \pm 30
18. Bauersachs J., Popp R., Hecker M., Sauer E., Fleming I. & Busse R. – Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 1996; 94: 3341 \pm 3347
19. McCulloch A.I., Bottrill F.E., Randall M.D. & Hiley R.C. – Characterization and modulation of EDHF-mediated relaxations in the rat isolated superior mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120:1431 \pm 1438
20. Drummond G.R. & Cocks T.M. – Evidence for mediation by endothelium-derived hyperpolarizing factor of relaxation to bradykinin in the bovine isolated coronary artery independently of voltage-operated Ca^{2+} channels. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117:1035 \pm 1040
21. Kemp B.K., Smolich J.J., Ritchie B.C. & Cocks T.M. – Endothelium-dependent relaxations in sheep pulmonary arteries and veins: resistance to block by NG-nitro-L-arginine in pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116:2457 \pm 2467