

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



Význam nových cytokinů v patogenezi revmatických onemocnění

MUDr. Mária Filková

Autoreferát disertační práce

Praha, 2011

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK, Na Slupi 4,
128 50 Praha 2

Školitel: Doc. MUDr. Ladislav Šenolt, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt

Úvod: Nerovnováha mezi aktivitou pro- a proti-zánětlivých cytokinů u revmatoidní artritidy (RA) přispívá ke vzniku imunitní dysregulace, chronického zánětu a následné kloubní destrukce. Adipokiny jsou bioaktivní proteiny, které se kromě jiného podílejí na regulaci zánětu. IL-35 je nový cytokin s dosud neznámou funkcí u lidí, který je podle výsledků u myších modelů důležitou součástí zánětlivých procesů. Cílem práce bylo zjistit hladiny a úlohu vybraných adipokinů a IL-35 v kloubním a systémovém kompartmentu a vztah k aktivitě nemoci u pacientů s RA a jiným revmatickým onemocněním.

Výsledky: Prokázali jsme zvýšené sérové hladiny adiponectinu u pacientů s erozivní osteoartrózou (OA) kloubů rukou, rozdílné koncentrace nových adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině pacientů s RA a OA. Dále jsme zjistili vliv biologické léčby TNF α inhibitory na expresní profil adipokinů v tukové tkáni pacientů s RA. Biologická léčba rituximabem vedoucí k depleci B lymfocytů způsobila pokles sérových hladin visfatinu u RA. Změna hladin visfatinu navíc předurčovala změnu aktivity nemoci v době, kdy by se měla podat další infuze biologického léku. Vyšší hladiny IL-35 v synoviální tekutině u pacientů s RA ve srovnání s OA korelovaly s parametry aktivity nemoci. IL-35 podjednotky p35 a EBI3 jsou zvýšené v RA synoviální tkáni. IL-35 je na genové i proteinové úrovni indukován prozánětlivým TNF α v RA synoviálních fibroblastech a periferních mononukleárních buňkách (PBMC). IL-35 vede v PBMC k uvolnění několika zánětlivých mediátorů

Závěr: Výsledky našich studií prokázaly význam adipokinů a IL-35 při regulaci zánětu u revmatických onemocnění a jejich vztah k aktivitě nemoci u pacientů s RA. Objasnění patogeneze RA a nalezení nových potenciálních terapeutických cílů by mohlo přispět k zlepšení klinického průběhu u pacientů rezistentních na dosavadní léčbu.

Abstract

Background: An imbalance between pro- and anti- inflammatory cytokine activities favors the induction of autoimmunity, chronic inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis (RA). Adipokines are bioactive proteins that are important regulators of inflammation. IL-35 is a new cytokine involved in the inflammatory processes in mouse models and is of unknown function in humans. The aim of the work was to study the levels and role of several adipokines and IL-35 in the joint and blood compartment and the association with the disease activity in patients with RA or other rheumatic diseases.

Results: We found increased levels of adiponectin in serum of patients with erosive osteoarthritis (OA) of the hand, differential regulation of new adipokines vaspin and omentin in synovial fluid of patients with RA compared with OA and the effect of therapy using TNF α inhibitor on the expression profile of adipokines in subcutaneous adipose tissue of RA patients. B cell depletion therapy in RA resulted in decrease of serum levels of visfatin that correlated with following change of disease activity. The levels of IL-35 in synovial fluid are significantly higher in RA than in OA and correlate with the disease activity and functional status. IL-35 subunits p35 and EBI3 are overexpressed in RA synovial tissue than that in OA. IL-35 is increased at transcriptional and protein levels after stimulation with proinflammatory cytokine TNF α in RA synovial fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). IL-35 induces release of some inflammatory mediators in PBMC.

Conclusion: Our results show the role of adipokines and IL-35 in inflammation in patients with rheumatic diseases and the association with disease activity in RA. Thus, the discovery of new therapeutic targets would be beneficial for patient resistant to current therapy.

OBSAH	Strana
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	8
3. METODIKA	
3.1. Stanovení adipokinů v séru a synoviální tekutině u pacientů s revmatickými nemocemi (přehled metodiky z publikovaných prací)	9
3.2. IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy	10
4. VÝSLEDKY	
4.1. Význam adipocytokinů u revmatických onemocnění	12
4.1.1. Adipokiny v séru u pacientů s erozivní osteoartrózou	12
4.1.2. Hladiny nových adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou	13
4.1.3. Vliv léčby TNF α inhibítorem na expresi adipocytokinů v tukové tkáni u pacientů s revmatoidní artritidou	14
4.1.4. Vliv léčby rituximabem na sérové hladiny visfatinu u pacientů s revmatoidní artritidou	16
4.2. Význam IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy	19
5. DISKUSE	
5.1. Význam adipokinů u pacientů s erozivní osteoartrózou a revmatoidní artritidou	24
5.2. Prozánětlivé vlastnosti IL-35 a jeho vztah k aktivitě nemoci u pacientů s revmatoidní artritidou	26
6. ZÁVĚR	27
7. POUŽITÁ LITERATURA	28
8. PODĚKOVÁNÍ	32
9. SEZNAM PUBLIKACÍ	33

1. ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) je systémové zánětlivé autoimunitní onemocnění, které se vyskytuje u 0.5-1% dospělé populace (Lawrence et al. 1998). Hlavním znakem RA je hyperplazie synoviální kloubní výstelky, lokální/systémový zánět a destrukce kloubní chrupavky a kosti. Je to onemocnění s nepředvídatelným vývojem, které může vést k ireverzibilnímu poškození a doživotnímu funkčnímu omezení (Guillemin et al. 2000).

Aktivace synoviální tkáně u RA je řízena komplikovanou sítí autokrinních a parakrinních faktorů, součástí které jsou prozánětlivé cytokiny, dráhy nezávislé na cytokinech (TLR, endogenní retrovirové elementy), chemokiny, růstové faktory, adhezní molekuly a matrixové metalloproteinázy (MMP) (Müller-Ladner et al. 2005, McInnes et al. 2007). To vede v konečném důsledku k degradaci kloubní chrupavky, následnému zúžení kloubní štěrbině a ke vzniku kostních erozí.

Protože se kostní eroze u většiny pacientů s RA tvoří do 2 let od začátku nemoci, včasné zahájení terapie významně redukuje poškození kloubu a zlepšuje klinický stav pacienta a následnou disabilitu (Fuchs et al. 1989, Van Dongen et al. 2007). To je podmíněno včasnou diagnózou onemocnění, kterou umožňují nová kritéria RA (Aletaha et al. 2010). Ta mohou být v současné době splněna například i při synovitidě jen jednoho kloubu (Aletaha et al. 2010). RA se stává onemocněním, kde díky extenzivnímu výzkumu molekulárních mechanismů patogeneze dochází k uplatnění nejmodernějších léčebných modalit. Současně dostupné biologické léky, které jsou zaměřeny cíleně proti cytokinům (TNF α , IL-1, IL-6) a buňkám imunitního systému (B a T lymfocyty), které jsou specifické pro patogenezi RA, významně přispívají k lepšímu průběhu onemocnění (Smolen et al. 2007). U části pacientů je stále léčebná odpověď nedostatečná a u velkého počtu není šance na dosažení remise. Pokrok ve výzkumu patogeneze RA významně přispěl k objevu dalších potenciálních terapeutických cílů, jejichž ovlivnění by mohlo být prospěšné i pro tuto skupinu pacientů (Senolt et al. 2009).

Osteoartróza (OA), která je charakterizována nerovnováhou mezi syntézou a degradací makromolekul kloubní chrupavky, postihuje páteř, periferní váhonosné klouby, ramenní klouby a drobné klouby rukou (Hamerman et al. 1989). Obecně se označuje jako nezápětlivé onemocnění, protože u většiny pacientů nacházíme normální hodnoty reaktantů akutní fáze, počet leukocytů v synoviální tekutině nedosahuje takového množství jako u zánětlivých

artropatií, otok kloubu a zarudnutí je obvykle menší, palpační citlivost a proteplení kloubu nemá tak velkou intenzitu (Punzi et al. 2005). Pouze erozivní forma OA drobných kloubů rukou (EOA) je definována jako „zánětlivá“, což dokazují nejenom klinické příznaky, ale i výsledky konvenčního rentgenového zobrazení, kostní scintigrafie, sonografie, magnetické rezonance, histopatologické změny a laboratorní nálezy (Zhang et al. 2009, Punzi et al. 2010).

Adipokiny jsou bioaktivní mediátory uvolňované tukovou, ale i jinou tkání. Na jejich tvorbě se podílí adipocyty a ostatní buňky tvořící stroma, včetně imunitních buněk (Fantuzzi 2005). Patří k nim leptin, adiponectin, resistin, visfatin, nově popsané adipokiny např. vaspin a omentin a dále skupina „klasických“ cytokinů jako jsou TNF α , IL-1 β , IL-6 a MCP-1. Kromě regulace energetického metabolismu se účastní fyziologických a patofyziologických procesů, včetně regulace imunitního systému a zánětlivé odpovědi. Poprvé byly v roce 2003 v synoviální tekutině u RA pacientů popsány vyšší hladiny adipokinů adiponectinu a resistinu (Schaffler et al. 2003). Od té doby se zájem o adipokiny zvyšuje a existují nezvratné důkazy, že adipokiny mají důležitou roli v patogenezi některých revmatických onemocnění, kterými jsou například RA a OA (Gómez et al. 2011).

IL-35, heterodimer složený z řetězců p35 (IL-12a) a EBI3 (IL-27b), je cytokin potřebný k maximální regulační aktivitě myších T regulačních buněk (Treg) a vykazuje imunopresivní vlastnosti v experimentálním modelu zánětlivého střevního onemocnění a kolagenem indukované artritidy (Collison et al. 2007, Niedbala et al. 2007). Obě podjednotky p35 i EBI3 jsou přítomny v místech zánětu lidského aterosklerotického plátu a jsou indukovány několika zánětlivými mediátory (Kempe et al. 2009, Wirtz et al. 2005). Zatímco je exprese p35 podobně regulována u myši jako u člověka, exprese EBI3 se významně liší a některé práce naopak poukazují na fakt, že podjednotka EBI3 není lidskými Treg tvořena vůbec (Bardel et al. 2008). Je proto možné, že i funkce samotného IL-35 se mezi oběma druhy může významně lišit.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Revmatoidní artritida je autoimunitní onemocnění provázené chronickou kloubní bolestí a vznikem kloubních deformit, které může vést k ireverzibilnímu poškození a funkčnímu omezení. Nerovnováha mezi aktivitou pro- a protizánětlivých cytokinů u RA přispívá ke vzniku autoimunitního onemocnění, k chronickému zánětu a následné destrukci kloubů. Hierarchie mezi jednotlivými buňkami imunitního systému, cytokiny a jejich vzájemné interakce nejsou dosud přesně objasněny.

Biologické léky, které jsou zaměřeny cíleně proti cytokinům a buňkám imunitního systému specifickým pro pochody spojené s patogenezi RA, přispívají k lepšímu průběhu revmatických zánětlivých onemocnění. U části pacientů je stále léčebná odpověď nedostatečná a u velkého počtu není šance na dosažení remise. Proto by nalezení nových potenciálních terapeutických cílů mohlo pomoci zlepšit klinický průběh i této skupině pacientů.

Adipokiny jsou bioaktivní proteiny, které jsou uvolňovány především tukovou tkání. Kromě regulace energetického metabolismu se podílí také na imunitní a zánětlivé odpovědi organismu, včetně revmatických onemocnění.

IL-35 je nedávno objevený cytokin z rodiny IL-12, který je podle výsledků získaných u myších modelů důležitou součástí procesů, ale jeho funkce u člověka je doposud neobjasněna.

Cílem méj disertační práce je alespoň částečně odpovědět na tyto otázky:

1. Jakým způsobem mohou již dříve popsané adipokiny přispívat k lokálnímu a celkovému zánětu u revmatoidní artritidy a jiných revmatických onemocněních?
2. Jakou roli u revmatoidní artritidy mají nové, doposud jen málo prostudované cytokiny?
3. Jaké jsou hladiny těchto cytokinů v kloubním a systémovém kompartmentu?
4. Mají tyto molekuly vztah k aktivitě nemoci a jejímu průběhu?

3. METODIKA

3.1. Stanovení adipokinů v séru a synoviální tekutině u pacientů s revmatickými nemocemi (přehled metodiky z publikovaných prací)

Pacienti

Sérové hladiny adipokinů adiponectinu a resistinu a byly stanovovány u 48 žen s EOA, 27 žen s neerozivní formou OA rukou a 20 zdravých kontrol. Visfatin v séru byl měřen u 29 pacientů s RA a 33 kontrol. Adipokiny vaspin a omentin byly analyzovány v synoviální tekutině 33 pacientů s RA a 33 s OA. V podkožní tukové tkáni 9 pacientů s RA byl zjišťován expresní profil adipokinů adiponectinu, resistinu, leptinu, visfatinu, vaspinu, omentinu a TNF α , IL-1 β a IL-6 relevantních pro patogenezi RA. Pacienti s RA a OA splňovali ACR kritéria pro diagnózu RA anebo kritéria pro OA kolenních kloubů, respektive OA drobných ručních kloubů, pacienti s EOA měli navíc známky erozí (Arnett et al. 1988, Altman et al. 1986, Altman et al. 1990). Aktivita RA byla stanovena pomocí skóre DAS28 (Disease activity score). Každý účastník před zařazením do výzkumu podepsal informovaný souhlas schválený etickou komisí.

Zobrazovací metody

U pacientů s EOA a s neerozivní OA rukou byl k dispozici rentgenový snímek kolenních a kyčelních kloubů, byla provedena sonografie kolenních kloubů a trojfázová kostní scintigrafie s aplikací injekčního bolusu Tc-99m metylén difosfonátu do kubitální žíly.

Měření vybraných biologických markerů

Hladiny adipokinů, faktoru aktivujícího B lymfocyty BAFF, cytokinů TNF α , IL-1 β a IL-6 a protilátek proti cyklickým citrulinovaným peptidům (ACPA) a revmatoidnímu faktoru IgM RF byly měřeny metodou ELISA podle doporučení výrobce. Profil periferních mononukleárních buněk (PBMC) byl analyzován metodou průtokové cytometrie za použití příslušných protilátek.

Statistická analýza

Pro porovnání hodnot mezi 2 skupinami byl použit Mann-Whitney U-test nebo t-test, pro porovnání sledovaných hodnot mezi 3 skupinami Kruskal-Wallisův test. Ke zjištění korelací byl použit Spearmanův nebo Pearsonův korelační koeficient. Aplikace příslušných

statistických testů závisela od normality rozložení jednotlivých skupin. Hodnoty p menší než 0.05 byly považovány za statisticky významné. Složitější statistická zpracování jsou blíže uvedena v jednotlivých publikacích.

3.2. IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy

Pacienti

Studie se zúčastnilo 46 pacientů s RA, 43 s OA kolenního kloubu, kteří splnili ACR kritéria pro diagnózu RA anebo kritéria pro OA kolenního kloubu a 34 zdravých kontrol. Aktivita RA byla stanovena pomocí skóre DAS28 a funkční stav byl zjišťován pomocí dotazníku HAQ (Health Assessment Questionnaire) u pacientů s RA a WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) u pacientů s OA. Každý účastník před zařazením do výzkumného projektu podepsal informovaný souhlas schválený etickou komisí Revmatologického ústavu v Praze.

Vzorky séra a synoviální tekutiny

Synoviální tekutina byla získána při punkci kolenního kloubu a sérum bylo odebráno do 5 dnů po provedené punkci. Vzorky byly zamrazeny a skladovány při teplotě -80°C . Před samotnou analýzou byly vzorky synoviální tekutiny inkubovány s hyaluronidázou (Hylase Dessau, Riemser Arzneimittel) při 37°C po dobu 30 minut a centrifugovány při 3500 otáček/min po dobu 10 minut.

Tkáňové kultury a in vitro experimenty

PBMC od zdravých dárců byly izolovány standardní gradientovou centrifugací za použití izolačního roztoku Ficoll a poté stimulovány TNF α (R&D Systems), IL-35:Fc humánním rekombinantním proteinem (ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences), kontrolním:Fc fúzovaným humánním rekombinantním proteinem (ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences) a polymyxin B sulfátem (Sigma-Aldrich) po dobu 6 a 24 hod za standardních podmínek. RA synoviální fibroblasty (RASf) byly získány ze vzorků synoviální tkáně od pacientů s RA, kteří podstoupili operaci pro kloubní náhradu. RASf byly stimulovány TNF α anebo IL-35:Fc rekombinantním proteinem po dobu 6 a 24h. Buňky byly lyzovány v lyzačním puftru pro izolaci RNA nebo proteinovou analýzu a kulturační médium bylo zachováno 24h po stimulaci. Vzorky byly až do použití skladovány při teplotě -80°C .

Real Time PCR

Po izolaci celkové RNA použitím MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) a reverzní transkripci (Applied Biosystems) následovala analýza genové exprese metodou PCR reakce v reálném čase (RT-PCR) a použitím TaqMan genových esejí (Applied Biosystems). Výsledky byly analyzovány metodou ddCt pro relativní kvantifikaci a exprese genu 18S byla použita jako endogenní kontrola.

ELISA

Komerčně dostupná ELISA (USCN Life Science) byla použita k měření koncentrace IL-35 v synoviální tekutině, séru a kultivačním médiu. Pro limitovaný detekční rozsah kitu (0.7-1600 pg/ml) byly vzorky s vysokou koncentrací mimo uvedený rozsah 50x naředěny a finální koncentrace byla spočítána pomocí dilučního faktoru. Cytokiny IL-1 β , IL-6 a MCP-1 byly měřeny v kultivačním médiu podle pokynů výrobce (RayBiotech). Absorbance byla měřena na vlnové délce 450nm.

Konstrukce expresních plasmidů

P35/IL-12a byl amplifikován z cDNA získané z RASF po inzerci Kozak sekvence pro ulehčení translace, EBI3 byl amplifikován z cDNA buněčné linie HEK293 s PCR mutagenézí s cílem začlenění Kozak sekvence s následným klonováním pomocí vektoru pcDNA3.1 (+) (Invitrogen). Správnost sekvence každého insertu byla ověřena sekvenováním. Expresní plasmidy byly transfekovány do RASF s použitím Amaxa Basic Nucleofector Kit pro primární savčí fibroblasty (Lonza).

Western blot (WB)

RASF po 24h stimulaci TNF α nebo 48h po transfekci expresními plasmidy byly lyzovány ve standardním lyzačním pufru pro proteinovou analýzu. Celý buněčný lyzát byl separován pomocí 15% SDS-PAGE a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Membrána byla inkubována přes noc s protilátkou proti IL-12a (Abcam) nebo EBI3 (Abcam) a 1 hod s protilátkou proti α -tubulinu (Sigma) v 5% mléku. Po následné inkubaci s příslušnou HRP značenou sekundární protilátkou (Jackson) byl signál detekován pomocí ECL roztoku (GE Healthcare).

Immunohistochemie

Vzorky synoviální tkáně byly získány od 5 pacientů s RA a 5 pacientů s OA. Po odstranění parafínu z tkáně a blokování nespecifických vazeb byla použita polyklonální protilátka proti

EBI3 (Lifespan Biosciences) nebo monoklonální protilátka proti IL-12a (Santa Cruz). Po nanesení 3, 3-diaminobenzidine chromogenu (Liquid DAB+Substrate, Dako Cytomation, Glostrup) byly řezy podbarveny hematoxylinem. Současně bylo provedeno kontrolní barvení. Řezy byly analyzovány semikvantitativně na škále intenzity barvení 0 - 3 (žádná – maximální intenzita barvení) v 7 zorných polích pro vrstvu intimy (lining) a intersticiium (sublining).

Statistická analýza

Mann Whitney U-test byl použit pro porovnání rozílů mezi 2 proměnnými a Kruskal-Wallisův test s následnou post-hoc korekcí pro mnohočetná porovnání (Dunn's post hoc test) byl použit k určení rozdílu mezi více než 2 proměnnými. Spearmanův korelační koeficient byl použit k výpočtu asociace mezi 2 veličinami. Hodnoty p menší než 0.05 byly považovány za statisticky významné.

4. VÝSLEDKY

4.1. Význam adipokinů u revmatických onemocnění

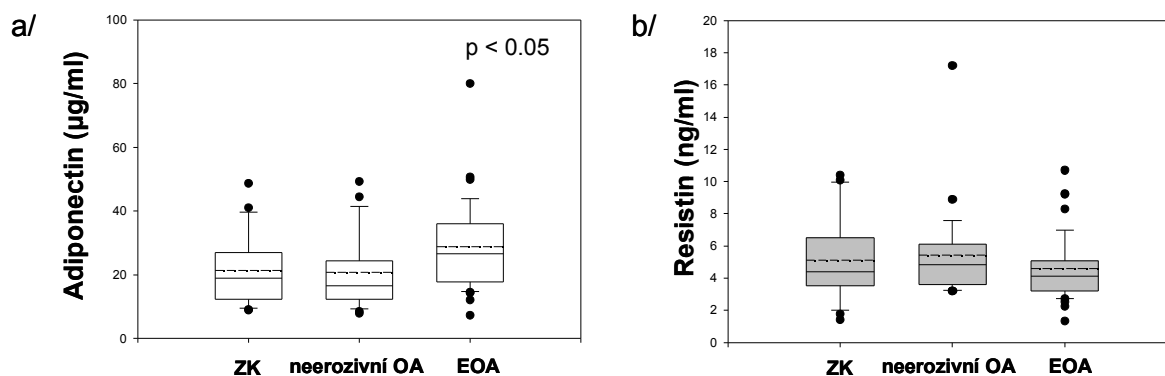
4.1.1. Adipokiny v séru u pacientů s erozivní osteoartrózou

Cílem studie bylo porovnat sérové hladiny adipokinů adiponectinu a resistinu u pacientů s EOA a neurozivní formou OA drobných ručních kloubů a zdravých kontrol (ZK) (Tab. 4.1.).

Charakteristika	EOA	neerozivní OA	ZK	p
n	48	27	20	-
Věk (roky)	64.2±8.0	62.2±10.2	61.0±5.1	>0.05
BMI (kg/m²)	26.2±3.6	26.9±4.4	25.6±3.9	>0.05
hsCRP (mg/l)	1.4±1.2	1.2±1.5	-	>0.05

Tab. 4.1. Charakteristika pacientek s OA kloubů rukou a zdravých kontrol zařazených do studie analyzující sérové koncentrace adipokinů adiponectinu a resistinu.

Výsledky získané v blood-pool fázi 3-fázové kloubní scintigrafie ukázaly 2x častější výskyt zánětu u pacientek s EOA než u pacientek s neurozivní OA, přestože se CRP u těchto skupin nelišilo. U pacientek s EOA jsme prokázali významně vyšší hladiny sérového adiponectinu ve srovnání s neurozivní OA nebo ZK, zatím co se hladiny resistinu v jednotlivých skupinách nelišily (Obr. 4.1.). Nepozorovali jsme korelaci hladin těchto adipokinů s CRP a přítomnost hydroysu nebo synovitidy kolenních kloubů neměla vliv na jejich koncentraci.



Obr. 4.1. Sérové hladiny adiponektinu (a) a resistinu (b) u zdravých kontrol a pacientů s neurozivní OA a EOA drobných kloubů rukou.

Publikace k tématu:

1. Filková M, Lisková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelková A, Pavelka K, Gay S, Müller-Ladner U, Senolt L. Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:295-6.
2. Filková M, Lišková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelka K, Šenolt L. Zvýšené hladiny sérového adiponektinu u pacientů s erozivní osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2008;16:100-3.

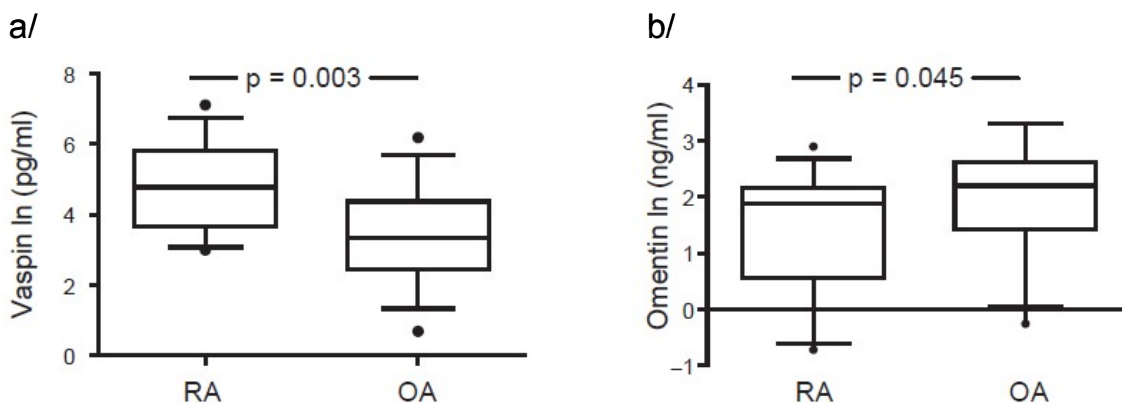
4.1.2. Hladiny nových adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou

V naší práci jsme v synoviální tekutině u pacientů s RA a OA zjišťovali koncentrace nově popsanych adipokinů vaspinu a omentinu (Tab. 4.2.).

Charakteristika	RA	OA	p
n	33	33	
Věk (roky)	58.9±9.9	65.0±9.9	0,021
Pohlaví (Ž/M)	25/8	22/11	<0.001
BMI (kg/m ²)	25.5±4.2	28.4±4.3	0.050
ACPA pozitivní (%)	57.6	-	-
RF pozitivní (%)	60.6	-	-
CRP (mg/l)	25.1±23.8	2.7±2.3	<0.001
DAS 28	5.2±1.3	-	-
Léčba (%)			
DMARD	33	-	-
Glukokortikoidy	25	-	-

Tab. 4.2. Charakteristika pacientů zařazených do studie analyzující koncentrace adipokinů vaspinu a omentinu v synoviální tekutině u RA a OA.

V synoviální tekutině u pacientů s RA byla koncentrace vaspinu významně vyšší zatím co hladiny omentinu byly naopak nižší ve srovnání s OA (Obr. 4.2.). Hladiny vaspinu měly tendenci korelovat s aktivitou nemoci měřenou podle DAS28 skóre ($r=0.320$, $p=0.070$), zatím co hladiny omentinu korelovaly z hladinou ACPA ($r=0.398$, $p=0.029$) a IgM RF ($r=0.592$, $p<0.001$) u pacientů s RA.



Obr. 4.2. Hladiny vaspinu (a) a omentinu (b) v synoviální tekutině u pacientů s RA a OA.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Polanska M, Filkova M, Oslejskova L, Pavelka K, Gay S, Haluzik M, Vencovsky J. VaspIn and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1410-1

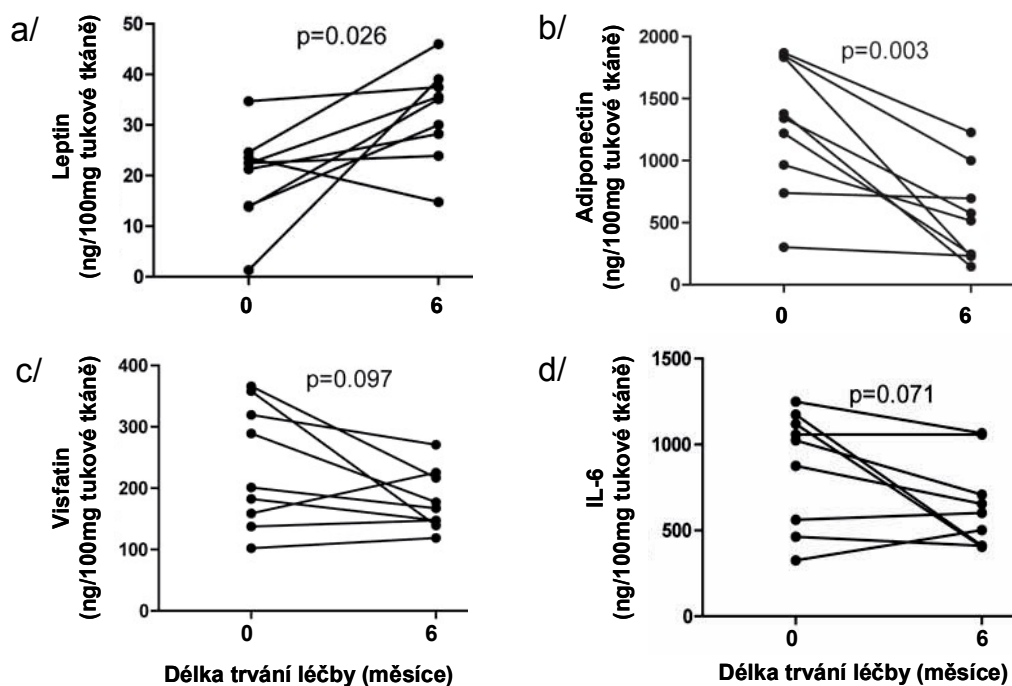
4.1.3. Vliv léčby TNF α inhibítorem na expresi adipokinů v tukové tkáni u pacientů s revmatoidní artritidou

V podkožní tukové tkáni pacientů s RA jsme studovali expresní profil adipokinů adiponektinu, resistinu, leptinu, visfatinu, vaspinu, omentinu a TNF α , IL-1 β a IL-6 před začátkem a po 6 měsících léčby TNF α inhibítorem etanerceptem (Tab. 4.3.). Etanercept je fúzovaný TNF receptor, který váže solubilní TNF α a blokuje jeho interakci s membránovým receptorem.

V tukové tkáni se po 6 měsíční léčbě etanerceptem množství leptinu signifikantně zvýšilo a množství adiponektinu významně snížilo, zatím co pokles koncentrací visfatinu a IL-6 po léčbě nedosáhl statistickou významnost. Hladiny ostatních adipokinů se po léčbě nezměnily (Obr. 4.3.). Hladiny leptinu v tukové tkáni před zahájením léčby negativně korelovaly s hladinou CRP před léčbou a zvýšená koncentrace leptinu v tukové tkáni po 6 měsíční terapii negativně korelovaly se změnou/rozdílem CRP.

Charakteristika	
n	9
Věk (roky)	47±12
Pohlaví (Ž/M)	8/1
BMI (kg/m ²)	24.5±2.6
ACPA pozitivní (n)	9
RF pozitivní (n)	8
CRP (mg/l)	19.15±22.13
FW (mm/h)	37.2 ± 28.1
DAS 28-FW	6.4±0.7
Léčba (n)	
DMARD	7
Glukokortikoidy	6
Biologická léčba (Etanercept)	9

Tab. 4.3. Charakteristika pacientů s RA zařazených do studie analyzující expresní profil adipokinů v tukové tkáni po léčbě TNF α inhibítorem etanerceptem.



Obr. 4.3. Vliv léčby TNF α inhibítorem na expresi vybraných adipokinů leptinu (a), adiponectinu (b), visfatinu (c) a IL-6 (d) v podkožní tukové tkáni u pacientů s RA.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Kuklová M, Cerezo LA, Hulejová H, Filková M, Bosanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovsky J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF α inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2011 May 27. [Epub ahead of print]

4.1.4. Vliv léčby rituximabem na sérové hladiny visfatinu u pacientů s revmatoidní artritidou

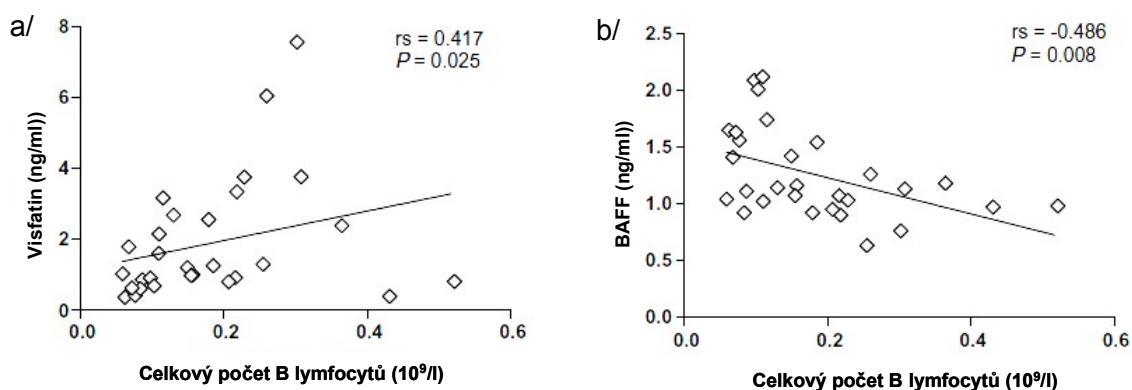
Cílem práce bylo porovnat sérové hladiny visfatinu u pacientů s RA a ZK, zjistit efekt léčby rituximabem na sérové hladiny visfatinu a jeho vztah k cirkulujícímu BAFF a k aktivitě nemoci u pacientů s RA (Tab. 4.4.). Sérové hladiny visfatinu, BAFF a celkový počet B lymfocytů byly zjišťovány před začátkem terapie a 16 a 24 týdnů po zahájení léčby.

BAFF (B cell activating factor of the TNF family) zvyšuje expresi visfatinu v B lymfocytech a jeho zvýšené hladiny byly popsány po léčbě rituximabem (Xu et al. 2002, Lavie et al. 2007). Rituximab je chimérická monoklonální protilátka proti znaku CD20 na povrchu B lymfocytů.

Charakteristika	RA	ZK
n	29	33
Věk (roky)	53.17 ± 12.9	48.3 ± 15.0
Trvání nemoci (roky)	13.96 ± 9.48	-
Pohlaví (Ž/M)	24/5	25/8
BMI (kg/m ²)	25.15 ± 4.18	25.32 ± 3.98
ACPA pozitivní (n)	22	-
RF pozitivní (n)	26	-
CRP (mg/l), medián [rozsah]	20.62 [0.47–136.30]	2.7±2.3
FW (mm/h), medián [rozsah]	50 [7.0–110.0]	
DAS 28, průměr±SD	6.67 ± 0.88	-
Léčba (n)		
DMARD	24	-
Glukokortikoidy	25	-
Předchozí léčba TNF α inhibitory	24	-

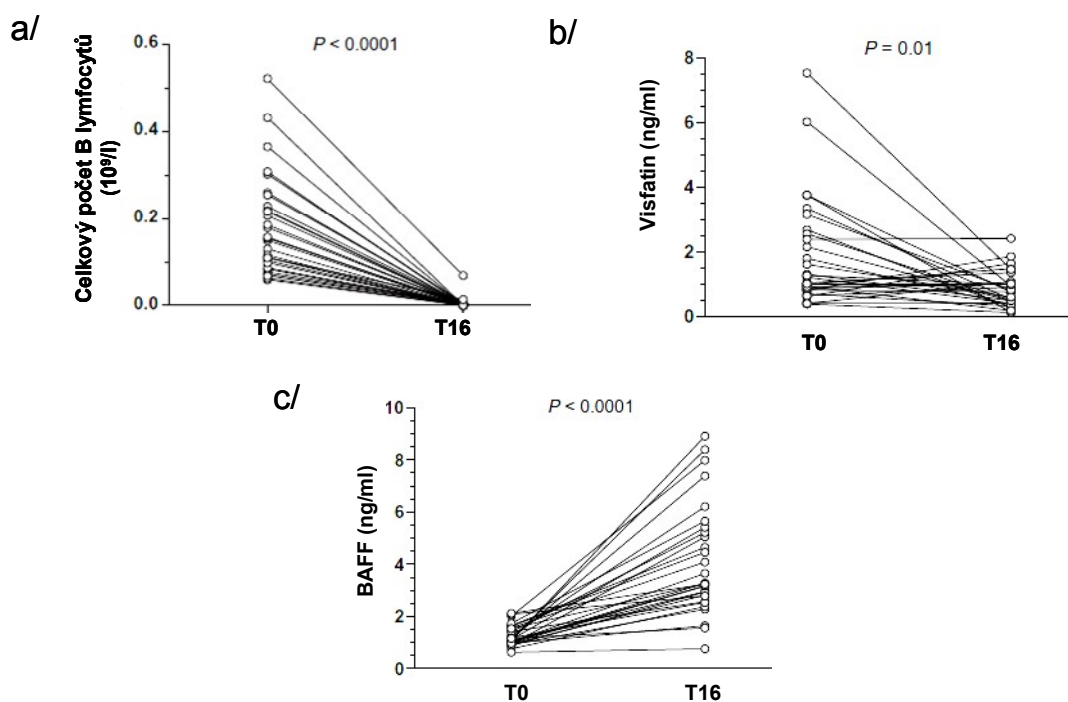
Tab. 4.4. Charakteristika pacientů s RA a zdravých kontrol zařazených do studie hodnotící vliv léčby rituximabem na sérové hodnoty visfatinu a jejich vztah k cirkulujícímu BAFF a k aktivitě RA.

Počet lymfocytů před začátkem léčby koreloval pozitivně s hladinami visfatinu a negativně s hladinami BAFF u pacientů s RA (Obr. 4.4.). Po 16 týdnech léčby tyto asociace nebyly již významné. Hladiny visfatinu ani BAFF nekorelovaly s aktivitou nemoci před ani po 16 týdnech léčby.



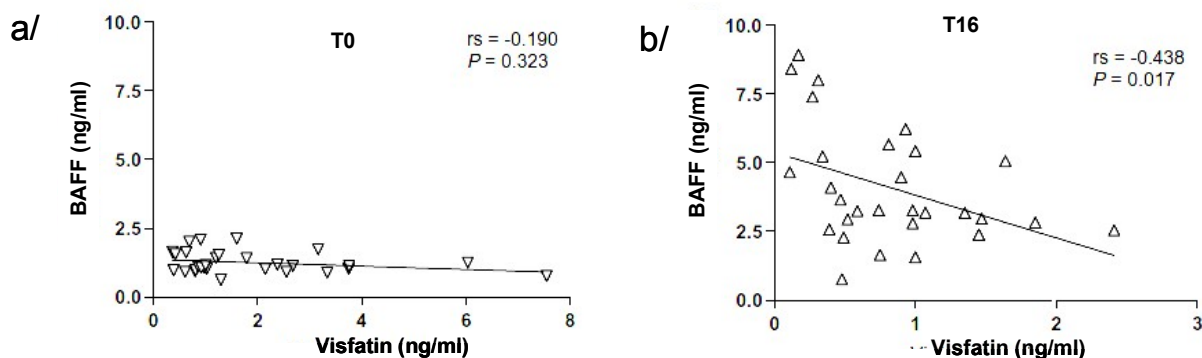
Obr. 4.4. Korelace visfatinu (a) a BAFF (b) s počtem lymfocytů u pacientů s RA před zahájením léčby rituximabem.

Terapie rituximabem přinesla zlepšení klinického stavu, což se projevilo poklesem DAS28 a významnou deplecí počtu B lymfocytů jak v 16., tak v 24. týdnu po zahájení léčby. Koncentrace visfatinu byla před začátkem léčby signifikantně vyšší u pacientů s RA než u zdravých kontrol a po 16 týdnech od začátku léčby byly tyto hladiny srovnatelné s kontrolami. Naproti tomu koncentrace BAFF v séru významně stoupla (Obr. 4.5.).



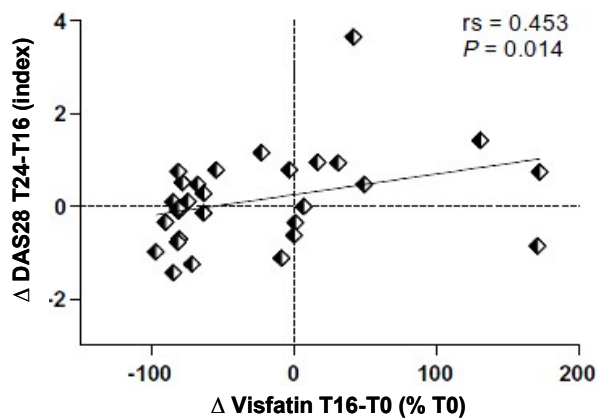
Obr. 4.5. Změny celkového počtu B lymfocytů (a), visfatinu (b) a BAFF (c) u pacientů s RA před a 16 týdnů po zahájení léčby rituximabem.

V 16. týdnu léčby hladiny visfatinu a BAFF vzájemně negativně korelovaly, ale před začátkem léčby tato korelace nebyla patrná (Obr. 4.6.).



Obr. 4.6. Korelace hladin visfatinu a BAFF u pacientů s RA před (a) a 16 týdnů (b) po zahájení léčby rituximabem.

I když není možné předpovědět jak bude individuální pacient reagovat na léčbu, zvýšení nebo minimální změna sérového visfatinu z období před léčbou rituximabem a 16 týdnů po jejím začátku představovalo predispozici pro zhoršení aktivity nemoci v období následujících 8 týdnů (Obr. 4.7.).



Obr. 4.7. Prediktivní hodnota změny sérových hladin visfatinu po 16 týdnech léčby pro změnu aktivity RA (DAS28 skóre) mezi 16. a 24. týdnem léčby.

Publikace k tématu:

1. Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine*. 2011;55:116-21.

4.2. Význam IL-35 v patogenezi revmatoidní artritidy

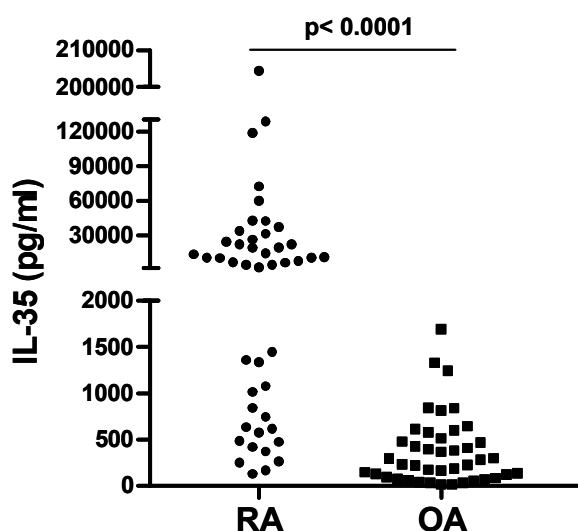
IL-35 a aktivita nemoci

Charakteristika pacientů a ZK, kteří se zúčastnili studie je uvedena v Tab. 4.5.

Charakteristika	RA	OA	ZK
n	46	43	34
Věk (roky)	59.5±14.25	63.29±11.05	44.56±14.76
Pohlaví (Ž/M)	32/14	22/21	19/15
ACPA pozitivní (%)	47.83	-	-
RF pozitivní (%)	30.43	-	-
CRP (mg/l)	27.56±31.04	6.05±13.99	1.44±1.13
Leukocyty v ST (buňky/mm ³)	7209±8044	297±748	-
DAS 28	4.67±1.62	-	-
HAQ	0.98±0.72	-	-
WOMAC (celkový)	NA	43.41±17.15	-
Léčba (%)			
DMARD	91.3	6.98	0
Glukokortikoidy	69.57	13.95	0
Biologická léčba	21.74	0	0
NSAID	56.52	55,81	0
SYSADOA	15.22	44.19	0

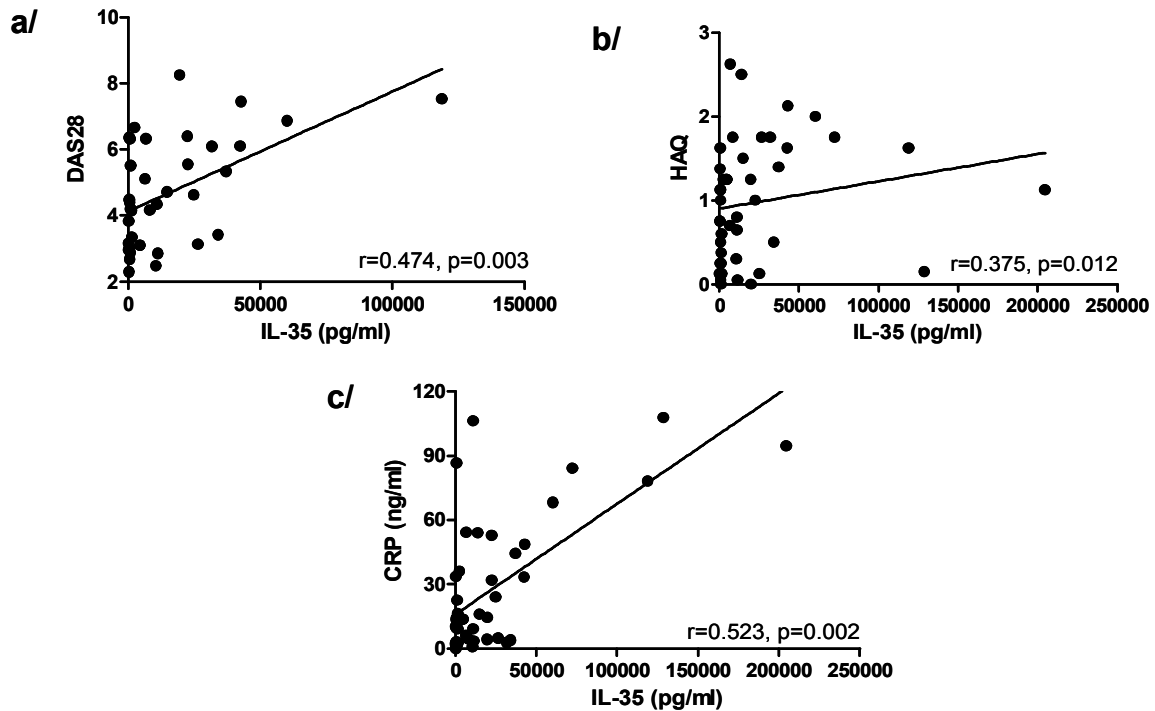
Tab. 4.5. Charakteristika pacientů s RA, OA a zdravých kontrol zařazených do studie analyzující koncentrace IL-35 v séru a synoviální tekutině.

Hladiny IL-35 v synoviální tekutině byly u pacientů s RA signifikantně vyšší v porovnání s pacienty s OA (medián 7483 vs. 257.6 pg/ml, $p < 0.0001$, Obr.4.8.).



Obr. 4.8. Hladiny IL-35 v synoviální tekutině pacientů s RA a OA.

Hladiny IL-35 v synoviální tekutině u pacientů s RA korelovaly významně s DAS28 skóre aktivity nemoci, funkčním stavem pacienta podle dotazníku HAQ a CRP (Obr. 4.9.)

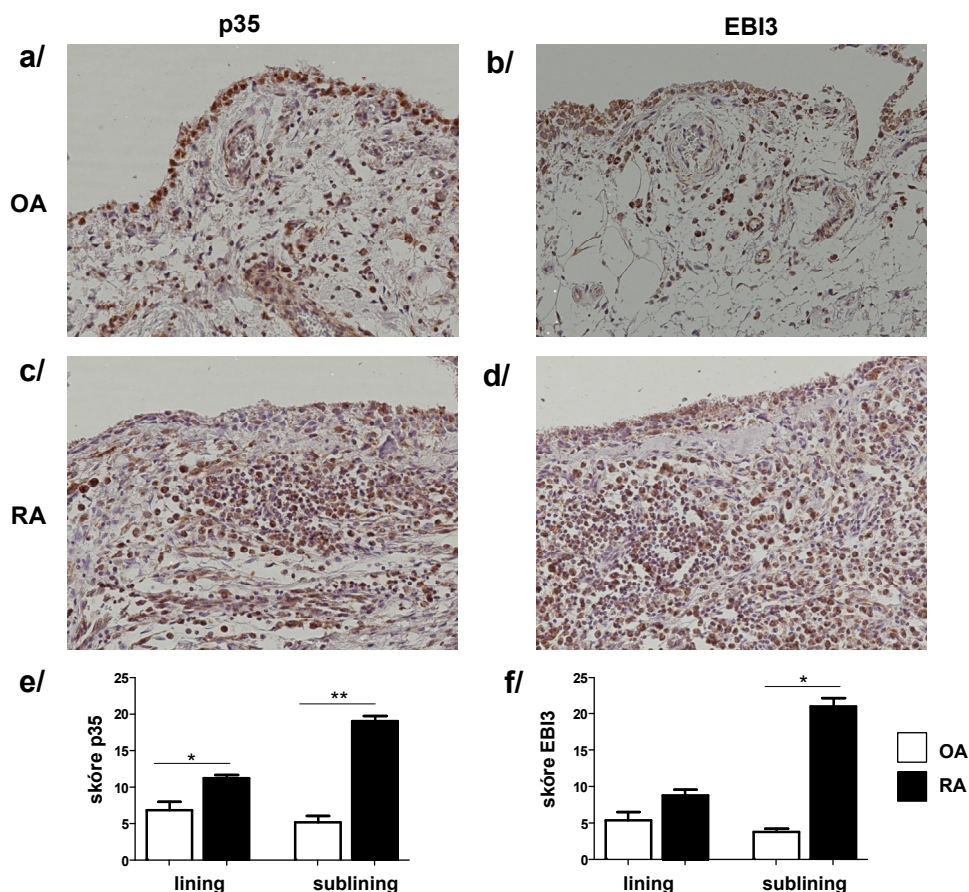


Obr. 4.9. Korelace hladin IL-35 v synoviální tekutině s DAS28 (a), HAQ (b) a CRP (c) u pacientů s RA.

U pacientů s OA hladiny IL-35 v synoviální tekutině korelovaly s funkčním stavem podle dotazníku WOMAC ($r=0.405$, $p=0.01$), ale ne se sérovým CRP nebo počtem leukocytů v synoviální tekutině, jak tomu bylo u RA.

EBI3 a p35 podjednotky IL-35 v RA synoviální tkáni

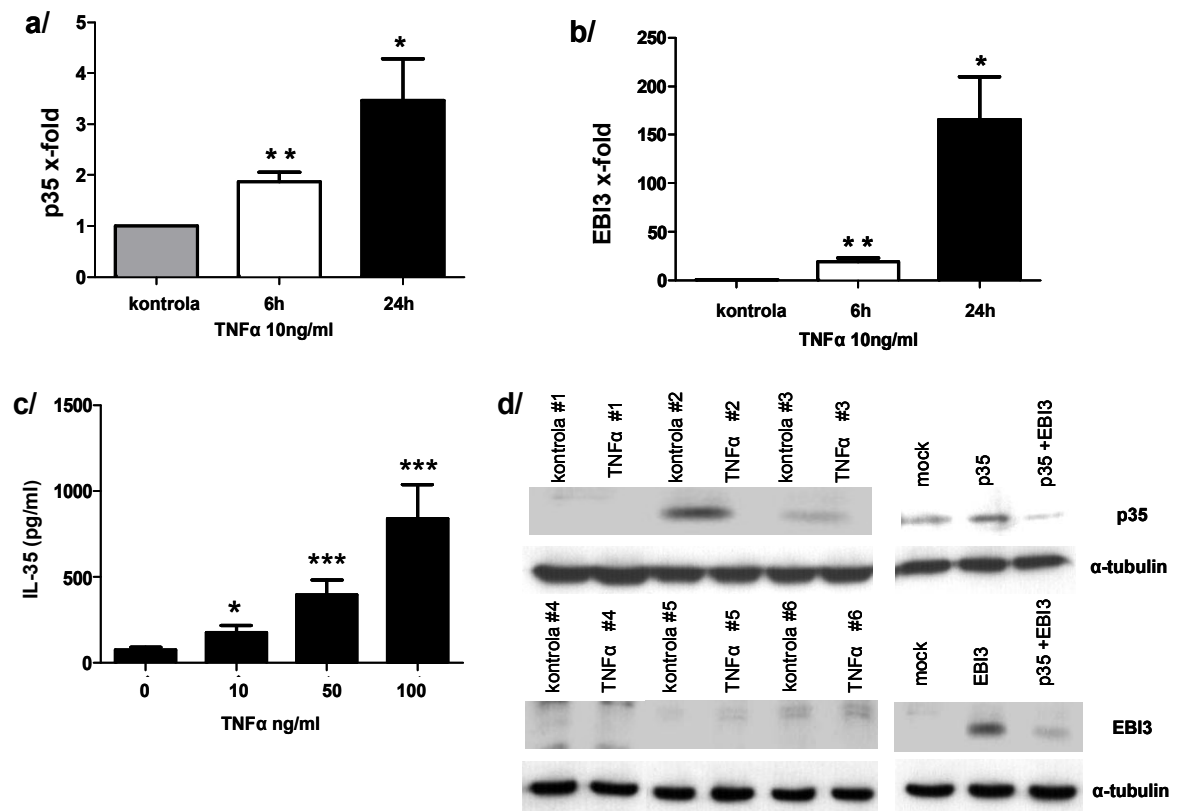
Imunohistochemické barvení s následnou semikvantitativní analýzou prokázalo vyšší intenzitu barvení obou podjednotek p35 a EBI3 v synoviální tkáni pacientů s RA v porovnání s OA a to jak v povrchové vrstvě, tak v intersticiu synoviální tkáně (Obr. 4.10.).



Obr. 4.10. Imunohistochemické barvení p35 (a, c) a EBI3 (b, d) podjednotek IL-35 v OA (a, b) a RA (c, d) synoviální tkáni. Semikvantitativní hodnocení prokázalo vyšší expresi p35 (e) a EBI3 (f) jak v synoviální intimě (lining) tak v oblasti intersticia (sublining). Původní zvětšení x20. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

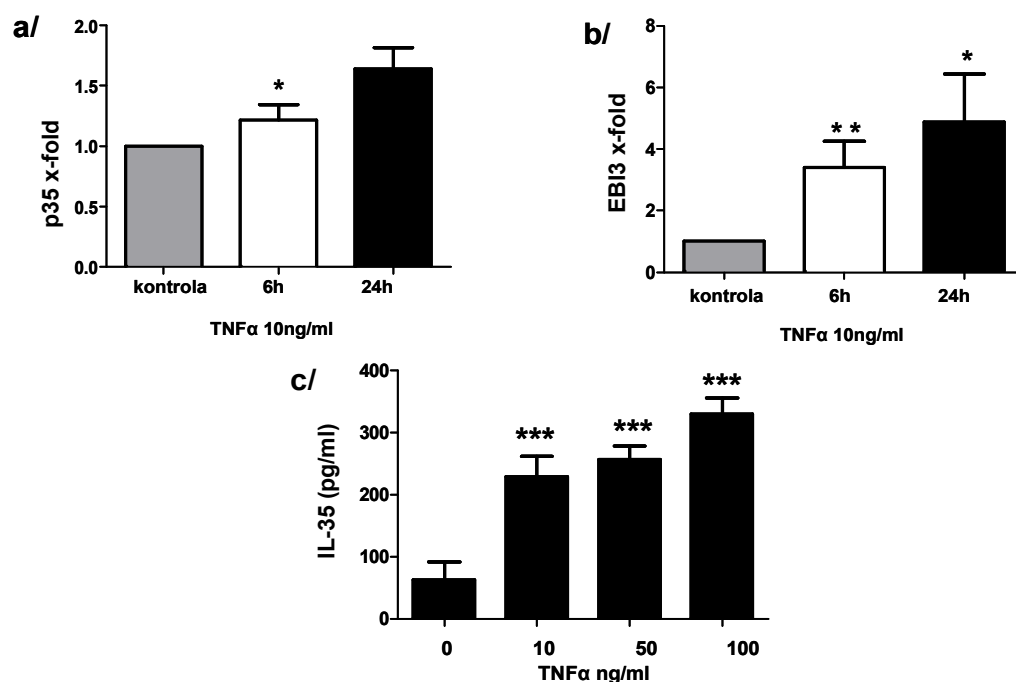
Expresa p35/EBI3 a IL-35 v RASF a PBMC

Expresa p35 a EBI3 na úrovni mRNA v RASF byly signifikantně zvýšeny po stimulaci $TNF\alpha$ a byly následovány uvolněním IL-35 do kultivačního média v závislosti na dávce $TNF\alpha$ (Obr. 4.11.). Proteinová analýza WB prokázala v buněčném lyzátu mírně zvýšenou expresi p35 v souladu s výsledky na transkripční úrovni. Specifický signál byl ověřen porovnáním s proužkem získaným po transfekci p35 expresním plasmidem. Signál pro EBI3 se nepodařilo prokázat pro jeho nízkou expresi v porovnání s expresí dosaženou po transfekci plasmidem, která ani po stimulaci $TNF\alpha$ nedosahuje expresní úroveň získanou po transfekci (Obr. 4.11.).



Obr. 4.11. Indukce p35 (a) a EB13 (b) na transkripční úrovni, uvolnění IL-35 do kultivačního média (c) a exprese p35 a EB13 v buněčném lyzátu (d) po stimulaci prozánětlivým cytokinem TNFα v RASF. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

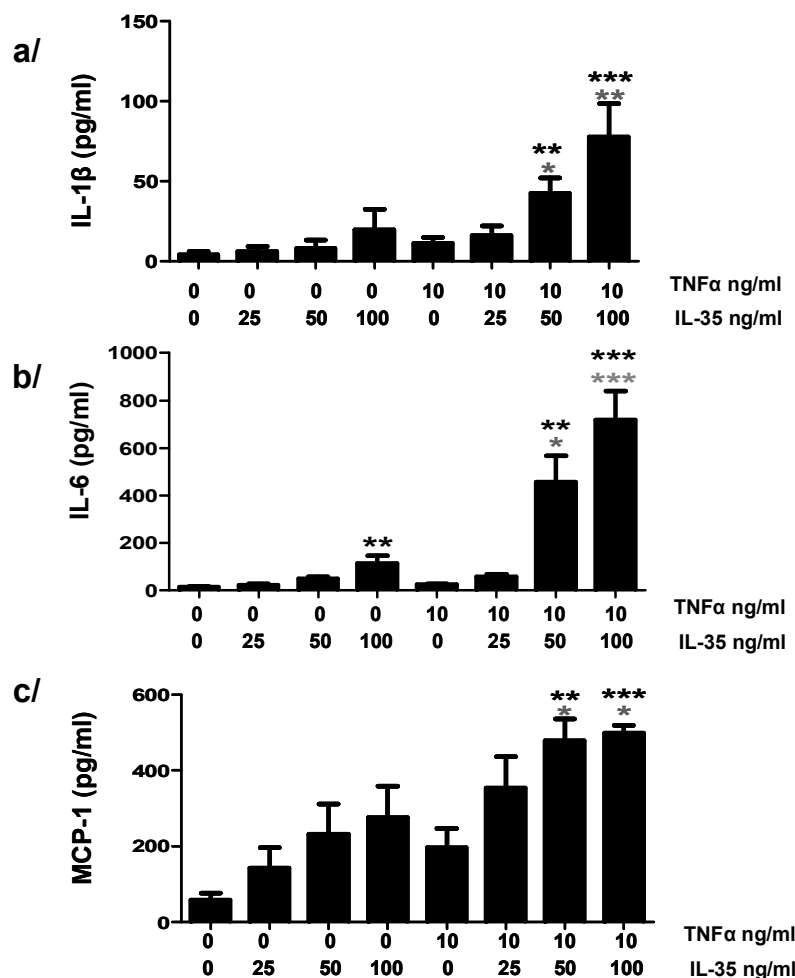
Rovněž u PBMC vedla stimulace TNFα k indukci exprese p35 a EB13 na transkripční úrovni. Uvolnění IL-35 do kultivačního média potvrdilo výsledky na transkripční úrovni (Obr. 4.12.).



Obr. 4.12. Expresa p35 (a) a EB13 (b) na transkripční úrovni a uvolnění IL-35 do kultivačního média po stimulaci TNFα (c) u PBMC. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IL-35 indukuje expresi prozánětlivých cytokinů/chemokinů

PBMC byly stimulovány rekombinantním IL-35, TNF α a nebo jejich kombinací po dobu 6 a 24h. IL-35 zvyšuje v závislosti na dávce expresi IL-1 β a IL-6 a chemoatraktantu MCP-1 jak úrovní mRNA po 6 a 24h, tak i na proteinové úrovni po 24h (Obr. 4.13.). Tato stimulace neměla vliv na uvolnění TNF α .



Obr. 4.13. IL-35 indukuje v PBMC tvorbu cytokinů IL-1 β (a) a IL-6 (b) a chemoatraktantu MCP-1 (c).

* znamenají porovnání s nestimulovanou kontrolou, * znamenají porovnání s TNF α stimulovanou kontrolou v případě kombinované stimulace. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Stimulace RASF IL-35 neměla žádný vliv na expresi následujících molekul, které jsou esenciální v patogenezi RA: IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1, COX2, MMP-1 a MMP-3. Nelze ale vyloučit, že některé z genů, které nebyly předmětem našeho studia, byly touto stimulací ovlivněny.

Nespecifický efekt rekombinantního IL-35 v důsledku kontaminace LPS nebo přítomností Fc fragmentu byl vyloučen, protože stimulace PBMC kontrolním Fc IgG fragmentem a IL-35 s

polymyxinem B nevedla ke změně exprese IL-1 β , IL-6, TNF α , MCP-1 v porovnání s příslušnou nestimulovanou, resp. IL-35 stimulovanou kontrolou.

5. DISKUSE

5.1. Význam adipokinů u pacientů s erozivní osteoartrózou a revmatoidní artritidou

V posledních letech vzrůstá zájem o výzkum známých adipokinů a objevování nových molekul, včetně jejich potenciálního vztahu k zánětu. Rostoucí množství studií prokázalo jejich důležitou roli v průběhu revmatických onemocnění (Gómez et al. 2011). Několik prací potvrdilo zvýšené koncentrace adipokinů adiponectinu, resistinu, visfatinu nebo leptinu v synoviální tekutině u RA pacientů (Schaffler et al. 2003, Bokarewa et al. 2005, Šenolt et al. 2006, Brentano et al. 2007, Bokarewa et al. 2003).

Adiponectin má obecně v patogenezi metabolického syndromu a jeho komplikací roli protizánětlivého cytokinu (Haluzík 2005). Adiponectin v synoviálních fibroblastech a chondrocytech indukuje tvorbu zánětlivých cytokinů, chemokinů a matrix degradačních enzymů a podporuje tak zánětlivé prostředí v kloubu a jeho destrukci (Neumann et al. 2011). Sérové hladiny adiponectinu korelují se závažností kloubní destrukce u pacientů s RA (Giles et al. 2009, Giles et al. 2011). Adiponectin v synoviální tekutině koreluje s degradačními produkty proteoglykanů a s mírou postižení u pacientů s OA kolenního kloubu (Honsawek et al. 2010, Hao et al. 2010). Intraartikulární podání rekombinantního resistinu u myšího modelu vede k zánětu synoviální tkáně, který svým obrazem připomíná RA a jeho vysoká exprese je popsána v RA synoviální tkáni (Bokarewa et al. 2005, Šenolt et al. 2006). Resistin vede v PBMC k tvorbě zánětlivých cytokinů, chemoatraktantů, cyklooxygenázy a matrix degradačních enzymů (Bokarewa et al. 2005, Nagaev et al. 2006, Lee et al. 2009).

Hladiny adipokinů u pacientů s OA byly doposud stanovovány pouze u nemocných s OA kolenních kloubů (Presle et al. 2006). Některé práce studovaly biochemické markery u pacientů s EOA, kde vyšší hodnoty CRP byly považovány za ukazatel aktivity nemoci hodnocené podle klinického a scintigrafického nálezu (Punzi et al. 2010).

V naší studii jsme nezjistili u pacientů s EOA a neerozivní OA rozdíl v koncentracích sérového CRP, i když kostní scintigrafie prokázala 2x častější zánět drobných kloubů rukou u pacientů s EOA. Na základě toho se domníváme, že zánětlivý charakter EOA je podmíněný lokálně a nevede k systémové zánětlivé odezvě v podobně zvýšeného CRP. U pacientů s EOA jsme současně zjistili významně vyšší hladiny sérového adiponectinu než u pacientů s neerozivní formou OA, ale hladiny sérového resistinu se nelišily. Lze proto předpokládat, že

adiponectin se účastní v patogenezi erozivní formy artritického procesu. Jeho protektivní nebo destruktivní úloha u EOA zůstává otázkou, i když nejnovější data poukazují na jeho prozánětlivé a destruktivní účinky.

Vaspin a omentin jsou adipokiny objevené v souvislosti se senzitivitou k inzulinu. Některé práce poukazují na jejich možnou souvislost se zánětlivými procesy (Hida et al. 2005, Auguet et al. 2011, Schäffler et al. 2005, Yamawaki et al. 2011).

Naše výsledky ukazují vyšší koncentraci vaspinu a nižší koncentraci omentinu v synoviální tekutině u pacientů s RA než s OA a tím i rozdílný mechanismus regulace těchto adipokinů v místech zánětu. Jakým způsobem se tyto cytokiny podílí na zánětu a kloubní destrukci zůstává předmětem dalšího výzkumu.

I když je obezita závažným rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy, diabetu 2. typu, OA, některých typů rakoviny atd., je obezita u RA paradoxně spojena s méně agresivním průběhem a představuje tak spíše protektivní faktor dalšího vývoje nemoci (Escalante et al. 2005, Westhoff et al. 2007). Poměrně velké množství prací popisuje hladiny cirkulujících adipokinů u pacientů léčených TNF α inhibitory, ale doposud žádná se nezabývala expresí adipokinů v tukové tkáni, která je jejich významným zdrojem (Neumann et al. 2011).

Na rozdíl od limitovaného vlivu TNF α inhibitorů na systémové hladiny adipokinů v předchozích studiích, naše data ukazují, že léčba TNF α inhibitorem etanerceptem významně ovlivňuje expresi leptinu a adiponectinu v podkožní tukové tkáni u pacientů s RA. Předpokládáme, že zejména zvýšení leptinu v tukové tkáni je důsledkem zlepšení systémového zánětu po léčbě, což je v souladu s protektivním účinkem vysokých systémových hladin leptinu na rentgenové kloubní postižení u pacientů s RA (Rho et al. 2009).

Visfatin se kromě energetického metabolismu, kde plní funkci nikotinamid fosforibosyl transferázy, podílí jako PBEF (pre-B colony enhancing factor) na diferenciaci B lymfocytů (Rongvaux et al. 2002, Samal et al. 1994). Visfatin je protein s významnými imunomodulačními vlastnostmi. Prozánětlivé faktory stimulují jeho tvorbu v synoviálních fibroblastech a on sám působí jako zánětlivý mediátor (Brentano et al. 2007). Inhibice visfatinu u myšího modelu artritidy snížila lokální expresi a systémové hladiny zánětlivých cytokinů, eliminovala destrukci chrupavky a tvorbu kostních erozí (Busso et al. 2008, Evans et al. 2011). Zvýšené hladiny visfatinu v cirkulaci a v synoviální tekutině u pacientů s RA

navíc významně korelovaly s aktivitou nemoci (Otero et al. 2006, Brentano et al. 2007). Jiná studie však neprokázala vztah sérového visfatinu k aktivitě RA ani k jeho změnu po léčbě TNF α inhibitory (Gonzalez-Gay et al. 2010).

V souladu s předchozími publikacemi jsme potvrdili vyšší sérové koncentrace visfatinu v séru RA pacientů než u zdravých jedinců, které ale nekorelovaly s aktivitou nemoci, což by mohlo být podmíněné předchozí léčbou TNF α inhibitory u většiny pacientů v naší studii. Hladiny sérového visfatinu významně korelovaly s počtem B lymfocytů a poklesly po terapii rituximabem, která vedla ke snížení počtu B lymfocytů a ke zlepšení klinické aktivity.

BAFF, který je rovněž faktorem regulujícím dozrávání a přežívání B lymfocytů, zvyšuje expresi visfatinu v B lymfocytech (Lavie et al. 2007). Protože se hladiny BAFF v naší skupině RA pacientů po terapii rituximabem významně zvýšily a po 16 týdnech léčby negativně korelovaly s hladinami visfatinu, domníváme se, že uvedený pokles visfatinu po léčbě rituximabem je specificky podmíněn sníženým počtem B lymfocytů. Navíc změna sérového visfatinu před začátkem a 16 týdnů po zahájení léčby korelovala se změnou aktivity RA v následujících 8 týdnech, kdy bývá obvykle podávána další dávka rituximabu. Lze tedy uvažovat, že visfatin by mohl mít prediktivní hodnotu pro další průběh RA.

5.2. Prozánětlivé vlastnosti IL-35 a jeho vztah k aktivitě nemoci u pacientů s revmatoidní artritidou

Rodina IL-12 je složena ze 4 heterodimerních cytokinů IL-12 (p35/IL-12a a p40/IL-12b), IL-23 (p19 a p40), IL-27 (p28 a EBI3/IL-27b) a IL-35 (p35 a EBI3) (Collison et al. 2008). Hladiny IL-12 byly zvýšeny v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA a mají vztah k počtu oteklých kloubů a k CRP (Kim et al. 2000). Hladiny IL-23 byly v séru a synoviální tekutině téměř neměřitelné a mezi RA a OA pacienty nebyly žádné rozdíly (Brentano et al. 2009). IL-27 je vyšší v plasmě RA pacientů ale jeho asociace s aktivitou RA není známá (Wong et al. 2010). Sérové hladiny IL-27 korelovaly se závažností nemoci u pacientů s psoriatickou artritidou a systémovou sklerodermií (Shibata et al. 2010, Yoshizaki et al. 2011).

Zjistili jsme, že IL-35 je signifikantně vyšší v synoviální tekutině u RA než OA a koreluje s aktivitou a funkčním stavem u RA pacientů. Na základě korelace IL-35 s počtem leukocytů v synoviální tekutině u RA se můžeme domnívat, že právě leukocyty mohou být hlavním zdrojem IL-35 v místě zánětu.

Buňky, které tvoří IL-12, jsou v RA synoviální tkáni lokalizované v především v povrchové intimě v souladu s predominantní expresí IL-12 v makrofázích (Morita et al. 1998). Protein

p19 je přítomen v intimě RA synovie, v místech invaze do chrupavky a v cévním endotelu. Exprese p40 nevykazuje stejnou lokalizaci a ani RASF, které exprimují p19, současně netvoří p40 (Brentano et al. 2009). Zatímco je p35 protein exprimován ubikvitně, EBI3 je vysoce inducibilní a je exprimován selektivně (Trinchieri et al. 2003, Bardel et al. 2008). Koexprese p35 a EBI3 byla popsána v placentárních trofoblastech a hladkých svalových buňkách v zánětlivém prostředí aterosklerotickém plátu (Devergne et al. 1997, Kempe et al. 2005). Zjistili jsme, že obě podjednotky IL-35 - p35 a EBI3 jsou více exprimovány v RA oproti OA synovii a to jak v intimě, tak v intersticiu. Exprese obou podjednotek je přítomna i v buňkách připomínajících fibroblasty. Protože RASF neprodukují p40 (Brentano et al. 2009), je EBI3 jediným možným (a doposud známým) partnerem pro p35.

Jak p35 tak i EBI3 jsou indukovány po stimulaci mediátory zánětu (Pflanz et al. 2002, Kempe et al. 2009, Wirtz et al. 2005). Naše experimenty in vitro ukazují, že exprese p35 a EBI3 je po stimulaci TNF α zvýšena v RASF a PMBC. Zvýšená exprese p35 a EBI3 v RA synoviální tkáni může být proto vysvětlena chronickým zánětlivým prostředím, což koresponduje s výsledky předchozích publikací a s naším pozorováním in vitro. Zatímco IL-12 a IL-23 fungují jako zánětlivé molekuly, studie na IL-27 u myších modelů jsou protichůdné (Niedbala et al. 2008, Cao et al. 2008). IL-35 byl u myších modelů prezentován jako protein s protizánětlivými vlastnostmi (Collison et al. 2007, Collison et al. 2010, Niedbala et al. 2007). IL-35 měl i vlastnosti zánětlivého cytokinu, kdy u myšího modelu nezabránil rozvoji lymfatické artritidy, ale naopak zesílil zánětlivou odpověď (Kuo et al. 2011). V našich experimentech IL-35 stimuluje PBMC k tvorbě několika zánětlivých molekul, které jsou esenciální pro průběh RA.

6. ZÁVĚR

Naše studie prokázaly význam adipokinů při regulaci zánětu u revmatických onemocnění a jejich možnou prediktivní hodnotu pro další průběh RA. Další výsledky poukazují spíše na zánětlivé vlastnosti IL-35, podobně jako je tomu u ostatních členů IL-12 rodiny a jeho vztah k aktivitě nemoci u pacientů s RA. Objasnění patogeneze RA a nalezení nových potenciálních terapeutických cílů by mohlo přispět ke zlepšení klinického stavu u pacientů rezistentních na dosavadní léčbu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 1990;33:1601-10.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986;29:1039-49.
- Auguet T, Quintero Y, Riesco D, Morancho B, Terra X, Crescenti A, Broch M, Aguilar C, Olona M, Porras JA, Hernandez M, Sabench F, del Castillo D, Richart C. New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. *BMC Med Genet.* 2011;12:60.
- Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008;181:6898-905.
- Bokarewa M, Bokarew D, Hultgren O, Tarkowski A. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:952-6.
- Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 2005;174:5789-95.
- Brentano F, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:143-50.
- Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Pre-B cell colonyenhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. *Arthritis Rheum* 2007;56:2829-39.
- Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, Leo O, So A, De Smedt T. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.
- Cao Y, Doodles PD, Glant TT, Finnegan A. IL-27 induces a Th1 immune response and susceptibility to experimental arthritis. *J Immunol.* 2008;180:922-30.
- Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, Rehg JE, Jones ML, Ni HT, Artis D, Turk MJ, Vignali DA. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11:1093-101.
- Collison LW, Vignali DA. Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev.* 2008;226:248-62.
- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450:566-9.
- Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12041-6.

Escalante A, Haas RW, del Rincon I. Paradoxical effect of body mass index on survival in rheumatoid arthritis: role of comorbidity and systemic inflammation. *Arch Intern Med* 2005;165:1624–9.

Evans L, Williams AS, Hayes AJ, Jones SA, Nowell M. Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:1866-77.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:911-9; quiz 920.

Fuchs HA, Kaye JJ, Callahan LF, Nance EP, Pincus T. Evidence of significant radiographic damage in rheumatoid arthritis within the first 2 years of disease. *J Rheumatol*. 1989;16:585-91.

Giles JT, Allison M, Bingham CO 3rd, Scott WM Jr, Bathon JM. Adiponectin is a mediator of the inverse association of adiposity with radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:1248–56.

Giles JT, van der Heijde DM, Bathon JM. Association of circulating adiponectin levels with progression of radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1562-8.

Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat Rev Rheumatol*. 2011 [Epub ahead of print]

Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Filloo JA, de Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J. Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:56-62.

Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, De Wit D, Flamand V, Willems F, Goldman M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*. 2006;107:1078-84.

Gosset M, Berenbaum F, Salvat C, Sautet A, Pigenet A, Tahiri K, Jacques C. Crucial role of visfatin/pre-B cell colonyenhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1399–1409.

Guillemin F. Functional disability and quality-of-life assessment in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39 Suppl 1:17-23.

Haluzik M. Adiponectin and its potential in the treatment of obesity, diabetes and insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6:988-93.

Hamerman D. The biology of osteoarthritis. *N Engl J Med* 1989;320:1322-30.

Hao D, Li M, Wu Z, Duan Y, Li D, Qiu G. Synovial fluid level of adiponectin correlated with levels of aggrecan degradation markers in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2010. E-pub ahead of print.

Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, Futami J, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Akagi S, Makino H, Kanwar YS. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:10610-5.

Honsawek S, Chayanupatkul, M. Correlation of plasma and synovial fluid adiponectin with knee osteoarthritis severity. *Arch. Med. Res*. 2010;41:593–8.

Kempe S, Heinz P, Kokai E, Devergne O, Marx N, Wirth T. Epstein-barr virus-induced gene-3 is expressed in human atheroma plaques. *Am J Pathol*. 2009;175:440-7.

- Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5308–19.
- Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 2000;119:175-81.
- Kuo J, Nardelli DT, Warner TF, Callister SM, Schell RF. Interleukin-35 Enhances Lyme Arthritis in Borrelia-Vaccinated and -Infected Mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18:1125-32.
- Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. *Ann Rheum Dis* 2007;66:700-3.
- Lawrence RC, Helmick GG, Arnett DF et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778-788.
- Lee JH, Ort T, Ma K, Picha K, Carton J, Marsters PA, Lohmander LS, Baribaud F, Song XY, Blake S. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:613–20.
- McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:429-42.
- Morita Y, Yamamura M, Nishida K, Harada S, Okamoto H, Inoue H, Ohmoto Y, Modlin RL, Makino H. Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1998;41:306-14.
- Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005;1:102-10.
- Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PLoS ONE*. 2006;1:e31.
- Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum*. 2011;63:1159-69.
- Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:1474-9.
- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:3021-9.
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*. 2002;16:779-90.
- Presle N, Pottie P, Dumond H, Guillaume C, Lopicque F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14:690-5.
- Punzi L, Frigato M, Frallonardo P, Ramonda R. Inflammatory osteoarthritis of the hand. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:301-12.
- Punzi L, Oliviero F, Plebani M. New biochemical insights into the pathogenesis of osteoarthritis and the role of laboratory investigations in clinical assessment. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005;42:279–309.

- Rho YH, Solus J, Sokka T, Oeser A, Chung CP, Gebretsadik T, Shintani A, Pincus T, Stein CM. Adipocytokines are associated with radiographic joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1906-14.
- Rongvaux A, Shea RJ, Mulks MH, Gigot D, Urbain J, Leo O, Andris F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol.* 2002;32:3225-34.
- Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:1431-37.
- Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Schölmerich J, Müller-Ladner U, Gay S. Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA.* 2003;290:1709-10.
- Schäffler A, Neumeier M, Herfarth H, Fürst A, Schölmerich J, Büchler C. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1732:96-102.
- Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2006;35:247-52.
- Senolt L, Vencovský J, Pavelka K, Ospelt C, Gay S. Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2009;9:102-7.
- Shibata S, Tada Y, Kanda N, Nashiro K, Kamata M, Karakawa M, Miyagaki T, Kai H, Saeki H, Shirakata Y, Watanabe S, Tamaki K, Sato S. Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130:1034-9.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370:1861-74.
- Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:133-146.
- Van Dongen H, van Aken J, Lard LR, Visser K, Roday HK, Hulsmans HM, Speyer I, Westedt ML, Peeters AJ, Allaart CF, Toes RE, Breedveld FC, Huizinga TW. Efficacy of methotrexate treatment in patients with probable rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2007;56:1424-32.
- Westhoff G, Rau R, Zink A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. *Arthritis Rheum* 2007;56:3575-82.
- Wong CK, Chen da P, Tam LS, Li EK, Yin YB, Lam CW. Effects of inflammatory cytokine IL-27 on the activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R129.
- Yamawaki H, Kuramoto J, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;408:339-43.
- Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, Komura K, Ogawa A, Muroi E, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:194-200.
- Zhang W, Doherty M, Leeb BF, Alekseeva L, Arden NK, Bijlsma JW, Dincer F, Dziedzic K, Hauselmann HJ, Kaklamanis P, Kloppenburg M, Lohmander LS, Maheu E, Martin-Mola E, Pavelka K, Punzi L, Reiter S, Smolen J, Verbruggen G, Watt I, Zimmermann-Gorska I; ESCISIT. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of hand osteoarthritis: report of a task force of ESCISIT. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:8-17.

8. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Doc. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, PhD., za příkladné vedení, pomoc při postgraduálním studiu a profesním růstu. Chci se poděkovat Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli Revmatologického ústavu v Praze, za podporu a umožnění zahraničního studijního pobytu v Center of Experimental Rheumatology v Curychu. Mé poděkování patří i Prof. Dr. Steffenu Gayovi, Prof. Dr. Renate Gay a Dr. Astrid Jüngel, PhD. v Center of Experimental Rheumatology v Curychu za rozšíření mého obzoru na poli epigenetiky, podporu a laskavý přístup. Děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze, především Ing. Haně Hulejové, Mgr. Lucii Andrés Cerezo a Mgr. Markétě Kuklové, v Center of Experimental Rheumatology v Curychu a na všech partnerských pracovištích za pomoc a spolupráci při řešení projektů.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace k tématu dizertační práce

S IF:

1. Senolt L, Kuklová M, Cerezo LA, Hulejová H, Filková M, Bosanská L, Pecha O, Pavelka K, Haluzík M, Vencovsky J. Adipokine profile is modulated in subcutaneous adipose tissue by TNF α inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 May 27. [Epub ahead of print] *IF 9.082*
2. Senolt L, Kryštůfková O, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Cerezo LA, Běláček J, Haluzík M, Forejtová S, Gay S, Pavelka K, Vencovský J. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. *Cytokine*. 2011;55(1):116-21. *IF 3.537*
3. Senolt L, Polanska M, Filkova M, Oslejskova L, Pavelka K, Gay S, Haluzik M, Vencovsky J. Vaspin and omentin: new adipokines differentially regulated at the site of inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(7):1410-1. *IF 9.082*
4. Filková M, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009;133(2):157-70. *IF 3.863*
5. Filková M, Lisková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelková A, Pavelka K, Gay S, Müller-Ladner U, Senolt L. Increased serum adiponectin levels in female patients with erosive compared with non-erosive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):295-6. *IF 9.082*

Recenzované:

1. Filková M, Lišková M, Hulejová H, Haluzík M, Gatterová J, Pavelka K, Šenolt L. Zvýšené hladiny sérového adiponectinu u pacientů s erozivní osteoartrózou. *Čes. Revmatol*. 2008; 16(3):100-3.

Další publikace:*S IF:*

1. Fojtíková M, Tomasová Studýnková J, Filková M, Lacinová Z, Gatterová J, Pavelka K, Vencovský J, Senolt L. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(6):849-54. *IF* 2.358
2. Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K. Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(12):1615-9. *IF* 3.888

Recenzované:

1. Tomčík M, Hulejová H, Filková M, Braun M, Bečvář R, Haluzík M, Šenolt L. Vztah adiponectinu ke změnám v kůži u pacientů se systémovou sklerodermií. *Čes. Revmatol.* 2008; 16(4):148-152.
2. Filková M, Šenolt L, Braun M, Hulejová H, Pavelková A, Šléglová O, Kupka K, Gatterová J, Pavelka K. Sérová hladina kyseliny hyaluronové- prediktivní biomarker rentgenové progresse osteoartrózy kloubů rukou. *Čes. Revmatol.* 2009;17(4):184-90.