

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



**Kostní remodelace u revmatických onemocnění: Ztráta kosti u pacientů s juvenilní
idiopatickou artritidou**

MUDr. Kristýna Brábníková Marešová

Autoreferát disertační práce

Praha, 2014

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 a Klinika revmatologie 1. LF UK, Na Slupi 4, 128
50 Praha 2

Školitel: Prof. MUDr. Jan Štěpán, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Janu Štěpánovi, DrSc., za vedení, pomoc při postgraduálním studiu a profesním růstu. Dále mé díky patří prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., za podporu mého doktorského studia, a MUDr. Kateřině Jarošové za pomoc s nábořem pacientů. Děkuji všem kolegům v Revmatologickém ústavu v Praze za pomoc a spolupráci při řešení projektů. Jejich řešení by se rovněž neobešlo bez finanční podpory následujících institucí: Výzkumné záměry MZČR 00023728 a grant GAUK 84208/2008.

Abstrakt

Úvod: Ve ztrátě kosti u juvenilní idiopatické artritidy (JIA) hraje významnou roli zánět. Prozánětlivé cytokiny i glukokortikoidy (GCs), mohou aktivovat osteoklastickou resorpci. Současně může být utlumena kostní novotvorba a to zejména prostřednictvím inhibitorů proteinů, které kontrolují diferenciaci osteoblastů. Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že u pacientů s vysoce aktivní JIA se významně uplatňuje utlumení kostní novotvorby inhibitory Wingless (Wnt) proteinů - Dickkopfem 1 (Dkk-1) a sklerostinem. Kromě denzitometrického měření kostní a svalové hmoty byly hodnoceny markery aktivity onemocnění, kostního metabolismu a remodelace u mladých dospělých pacientů s JIA před a během 2 let anti TNF α (tumor necrosis factor α) léčby, která snižuje aktivitu onemocnění.

Výsledky: U pacientů s JIA, kteří dosud nedostávali biologickou léčbu, byla oproti zdravým kontrolám významně nižší hustota kostního minerálu (BMD, g/cm²). Hodnoty BMD a složení těla u JIA významně závisely na trvání onemocnění JIA a na léčení GCs. Sérová koncentrace sklerostinu byla u JIA významně vyšší v porovnání s hodnotami u kontrolní skupiny zdravých osob. Hodnoty ostatních sledovaných markerů se mezi JIA a kontrolami nelišily. U pacientů byla zjištěna pozitivní korelace mezi Dkk-1 a C-reaktivním proteinem (hsCRP). Významná korelace byla zjištěna i mezi hodnotou skóre aktivity onemocnění 28 (DAS 28) a osteokalcinu a osteoprotegerinu, nikoli však hodnotou markeru stupně celotělové resorpce (C-terminálním telopeptidem kolagenu typu I, β CTX). Po 1 a 2 letech léčby anti TNF α se významně zvýšilo BMD v oblasti bederní páteře. Toto zvýšení bylo predikováno poklesem hodnoty DAS 28 po 1 roce anti TNF α léčby. Bazálně zvýšené hodnoty sklerostinu u JIA se již po 1 roce anti TNF α léčby významně snížily. Při léčbě byla nalezena významná korelace mezi sklerostinem a DAS 28 a počtem bolestivých kloubů. Sklerostin ale nekoreloval ani se sedimentací erytrocytů, ani s hsCRP. Kromě sklerostinu se za 2 roky léčby anti TNF α preparáty snížily rovněž hodnoty Dkk-1. Významná pozitivní korelace mezi hsCRP a Dkk-1, zjištěná již bazálně, byla prokázána rovněž po 2 letech léčby anti TNF α inhibitory.

Závěr: Výsledky práce potvrdily, že při zánětlivém onemocnění JIA u mladých dospělých osob jsou významně zvýšeny sérové koncentrace sklerostinu, který inhibuje novotvorbu kostní hmoty. V soulase s tím se hodnoty sklerostinu významně snižují při utlumení zánětu anti TNF α léčbou a zvyšuje se BMD. Buňky subchondrální kosti a chondrocyty kloubů postižených zánětem mohou být významným zdrojem sklerostinu. Výsledky také potvrzují pozitivní vliv svalové hmoty a negativní vliv GCs na novotvorbu kosti.

Klíčová slova: juvenilní idiopatická artritida, aktivita onemocnění, kostní remodelace, denzita kostní hmoty, anti TNF α terapie, glukokortikoidy

Abstract

Introduction: The inflammation plays the essential role in the bone loss in juvenile idiopathic arthritis (JIA). Proinflammatory cytokines and also glucocorticoids (GCs) may activate bone resorption by osteoclasts. Simultaneously, bone formation can be attenuated, especially by inhibitors of proteins, which control the osteoblast differentiation. The aim was to verify the hypothesis that in patients with highly active JIA, reduction of bone formation via Wingless (Wnt) proteins inhibitors - Dickkopf 1 (Dkk-1) and sclerostin could be found. Except the densitometry measurements of bone and lean mass, we assessed markers of disease activity, bone metabolism and remodeling in young adult patients with JIA before and during 2 years of anti TNF α (tumour necrosis factor α) treatment, which decreases disease activity.

Results: In patients with JIA before antiTNF α treatment, bone mineral density (BMD, g/cm²) was significantly reduced compared to controls. Values of BMD and body composition in JIA significantly depended on disease duration and GCs treatment. Serum concentration of sclerostin was significantly elevated in JIA compared to values in healthy controls. Values of the other monitored markers did not differ between JIA and controls. In patients with JIA, Dkk-1 correlated positively with C-reactive protein (hsCRP). Significant correlation was determined also between disease activity score 28 (DAS 28) and osteocalcin and osteoprotegerin, not with marker of total body resorption (C-terminal telopeptide, β CTX). During 1 and 2 years of anti TNF α treatment, BMD in lumbar spine increased. The elevation was predicated by the drop of DAS 28 after 1 year of anti TNF α treatment. The increased basal sclerostin in JIA decreased significantly after 1 year of anti TNF α therapy. Positive association between sclerostin and DAS 28 and number of tender joints was found during treatment. Sclerostin did not correlate or with erythrocyte sedimentation rate, or with hsCRP. Except the sclerostin, Dkk-1 decreased during 2 years of anti TNF α therapy. Significant positive correlation between hsCRP and Dkk-1 already detected in basal, was also confirmed after 2 years of TNF α blockers treatment.

Conclusion: Results confirm, that in inflammatory disease of JIA in young adult people, serum concentrations of sclerostin, which inhibits bone formation, are significantly increased. In agreement with this, sclerostin is significantly decreased in the control of inflammation during anti TNF α treatment, and BMD increased. Subchondral bone cells and chondrocytes of joints affected with inflammation may be important source of sclerostin. Results also confirm positive effect of lean mass and negative effect of GCs on bone formation.

Key words: juvenile idiopathic arthritis, disease activity, bone remodeling, bone mineral density, anti TNF α therapy, glucocorticoids

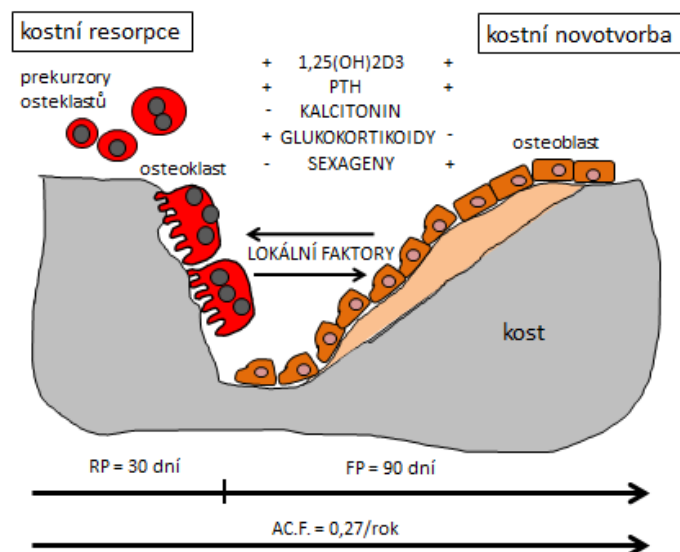
OBSAH	strana
1 ÚVOD	7
2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	9
3 METODIKA	10
3.1 Kostní remodelace u JIA	10
3.2 Rychlé účinky GCs na sérové markery kostní remodelace	12
4 VÝSLEDKY (KOMENTÁŘE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO DIZERTAČNÍ PRÁCE)	13
4.1 Souvislost mezi svalovou hmotou a obsahem kostního minerálu (BMC) u skupiny dospělých pacientů s JIA s vysokou aktivitou onemocnění	13
4.2 Kostní hmota, markery kostní remodelace a inhibitory osteoblastů před a během 24 měsíců léčby TNF α blokátory u vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA	17
4.3 Stav kostní hmoty u pacientů s JIA s nástupem v časném dětství po 1 roce léčby anti TNF α preparáty a přerušení léčby glukokortikoidy	20
4.4 Rychlé účinky GCs na sérové markery osteoklastů, osteoblastů a osteocytů	23
5 DISKUZE (K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM ZAŘAZENÝM DO DIZERTAČNÍ PRÁCE)	25
5.1 Souvislost mezi svalovou hmotou a BMC u aktivních pacientů s JIA	25
5.2 Elevace sklerostinu u vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA a jeho snížení během 24 měsíční léčby anti TNF α blokátory; sklerostin by mohl být kromě osteocytů tvořen i chondrocyty a buňkami subchondrální kosti	26
5.3 Zvýšení BMD u pacientů s JIA po 1 roce léčby anti TNF α a přerušení léčby GCs	27
5.4 Podání GCs rezultuje v rychlý pokles markerů aktivity osteoblastů a osteocytů (osteokalcin, P1NP, OPG, sklerostin) a nárůst markeru kostní resorpce (β CTX)	28
6 ZÁVĚR	29
7 POUŽITÁ LITERATURA	30
8 SEZNAM PUBLIKACÍ	33

1 ÚVOD

Juvenilní idiopatická artritida (JIA) je systémové chronické zánětlivé onemocnění onemocnění kloubů začínající do 16 let věku na autoimunitním podkladě. JIA je nejčastějším revmatickým onemocněním dětského věku. Podle kritérií International League of Associations for Rheumatology (ILAR) je JIA definována jako artritida jednoho nebo více kloubů neznámé etiologie trvající po dobu 6 týdnů či více a začínající před 16. rokem života (Petty et al. 2004).

Během celého života se kost vytváří (modeluje) a obnovuje (remodeluje). Modelace kosti zajišťuje růst kosti zejména během dětství a dospívání. Vrcholové kostní hmoty je dosaženo kolem 20. roku života. I během dalšího života však pokračuje modelace kosti, která zajišťuje adaptaci kosti na mechanickou zátěž. Vytvořená kost se během celého života remodeluje. Účelem cílené (targetted) remodelace je odstranit mikropoškození (microcracks), jejich hromaděním by se jinak zvyšovala fragilita kosti. Impulzem pro cílenou remodelaci je zpravidla apoptóza osteocytů. Stochastická (necílená) remodelace je řízena humorálně. Při remodelaci kosti se uplatňuje spřažení funkce pro-resorpčních mnohояaderných osteoklastů, jejichž původ je odvozován od monocytové linie, a kost tvořících jednojaderných osteoblastů, které se diferencují z mezenchymálních kmenových buněk stromatu kostní dřeně (Obr. 1.1, Manolagas a Jilka 1995). Kromě spřažení funkce osteoklastů a osteoblastů se při remodelaci kosti uplatňují osteocyty, které vznikají z osteoblastů uložených do kostní matrix během remodelace. Osteocyty fungují jako mechanostat, jsou schopny metabolicky reagovat na změny vznikající při deformaci kosti a regulují tak remodelaci a modelaci kosti (Manolagas a Jilka 1995). V řízení kostní remodelace se uplatňují systémové faktory (hormony) a faktory lokální (včetně prozánětlivých cytokinů), které působí parakrinně a jsou produkovány kostnímu buňkami či buňkami stromatu kostní dřeně (Obr. 1.1).

U mladých dospělých zdravých osob jsou resorpce a novotvorba kosti v rovnováze. Objem kosti, resorbovaný osteoklasty, je nahrazován stejným objemem nové mineralizující organické matrix. S věkem však funkční kapacita osteoblastů klesá a proto i při normální osteoresorpci kostní hmoty ubývá (involuční osteoporóza). Kdykoli během života však může být úbytek kostní hmoty zrychlen, pokud je nadměrně zvýšena osteoresorpce (např. při nedostatku sexagenů, při zánětu, hypertyreóze, hyperparatyreóze), nebo pokud je nadměrně utlumena funkce osteoblastů (např. při hyperkortisolismu).



Obr. 1.1. Kostní remodelace v čase a její systémová a lokální regulace.

(Upraveno podle Štěpán J, Osteoporóza v praxi, 1997).

RP (resorpční fáze), FP (fáze novotvorby kosti), AC.F. (aktivační frekvence) – častost aktivace kostních remodelačních jednotek. Kostní remodelace je regulována na systémové úrovni prostřednictvím hormonů kalcifosfátového metabolismu (1,25 vitamín D3, parathormon – PTH, kalcitonin); kromě výše zobrazených hormonů (+ označuje pozitivní regulaci, - negativní regulaci) se uplatňuje i růstový hormon, inzulin a hormony štítné žlázy.

V současném poznání ztráty kosti u JIA hraje významnou roli zánětlivý proces. U revmatoidní artritidy (RA) je popisována dominantní úloha TNF rodiny, přičemž TNF α je základní faktor, který spojuje imunitní systém s kostní remodelací. TNF α , další IL, ale také glukokortikoidy (GCs) mohou aktivovat osteoklastogenezi. Útlum novotvorby kosti účinkem prozánětlivých cytokinů se může realizovat prostřednictvím inhibitorů kanonické metabolické cesty Wnt proteinů (Dkk-1, sklerostin), které kontrolují diferenciaci osteoblastů. Zvýšená exprese Dkk-1 je asociována i s léčbou GCs. Možné příčiny sníženého množství kostní hmoty u zánětlivých revmatických onemocnění stále nejsou dostatečně vysvětleny. Jako model chronického zánětlivého onemocnění byla v této práci zvolena JIA u mladých dospělých žen a mužů. Ve věku 20-40 let by se totiž neměl významněji uplatňovat ani rychlý růst s převahou novotvorby kosti v dospívání, ani závislost kostní remodelace na věku u starších osob.

Anti TNF α léčba u pacientů s RA snižuje aktivitu onemocnění (snížení hladiny TNF α) a může snižovat nejen zvýšenou osteoresorpci (RANKL), ale i koncentrace inhibitorů Wnt proteinů (Dkk-1, sklerostin). Při účinné anti TNF α léčbě lze také zvážit snížení podávaných dávek GCs a tím snížit ztráty kostní hmoty, resp. u dětí a dospívajících s JIA zvýšit denzitu kostní hmoty (BMD). Léčba GCs je pro revmatologické pacienty často nezbytná, minimálně v počátku léčby, než se uplatní účinek chorobu modifikujících léků (DMARDs).

2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Hypotéza dizertační práce se opírá o studie, které se zabývají výzkumem vztahu zánětu a kostní remodelace u zánětlivých revmatických onemocnění, zejména RA. Hypotéza je rozdělena na dvě části: na vztah zánětu a kostní remodelace a na vliv léčby (anti TNF α a GCs) na kostní remodelaci. Předpokládáme, že by kloubní zánět u nemocných s JIA mohl mít negativní vliv na kostní novotvorbu nezávisle na léčbě glukokortikoidy. Vztah zánětu a kostní novotvorby nebyl u pacientů s JIA zatím zkoumán. Dalším ověřením hypotézy by byla úprava úbytku kostní hmoty při léčení JIA anti TNF α preparáty. Rovněž jsme chtěli potvrdit či vyvrátit podíl zvýšené resorpce kosti na ztrátě kostní hmoty.

Specifické cíle práce:

Práce byla zaměřena na zkoumání příčin úbytku kostní hmoty u nemocných s JIA. Naším cílem bylo studovat, zda zánět, reprezentovaný ukazateli laboratorními (sedimentace erytrocytů – FW, a vysoce senzitivní C-reaktivní protein – hsCRP) a klinickými (počet oteklých a bolestivých kloubů) a komplexním ukazatelem skóre aktivity onemocnění 28 (DAS 28), navodí změny v markerech kostní resorpce, novotvorby a inhibitech osteoblastů.

A. Existují souvislosti mezi množstvím kostní, svalové a tukové hmoty a aktivitou zánětu u pacientů s JIA?

B. Je resorpce kosti (β CTX, sRANKL, OPG, poměr sRANKL/OPG) u pacientů s JIA oproti zdravým kontrolám odlišná? Koreluje s množstvím kostní hmoty a aktivitou zánětu?

C. Je novotvorba kosti (osteokalcin, P1NP) včetně koncentrací inhibitorů Wnt signální dráhy osteoblastů (Dkk-1, sklerostin) u pacientů s JIA oproti zdravým kontrolám odlišná? Koreluje s množstvím kostní hmoty a aktivitou zánětu?

D. Je léčba anti TNF α preparáty spojena se snížením markerů zánětu, změnou množství kostní hmoty a zejména se snížením resorpce či zvýšením novotvorby kosti?

E. Posoudit možný vliv GCs léčby na markery kostního metabolismu, remodelace a inhibitory osteoblastů za 24, 48 a 96 hodin po podání GCs u pro tuto léčbu naivních pacientů s různými diagnózami.

3 METODIKA

3.1 Kostní remodelace u JIA

Do studie byli zavzati všichni dospívající a dospělí pacienti s aktivní JIA, kteří v roce 2009 a 2010 splnili kritéria České reumatologické společnosti pro léčbu TNF α blokátory, a mohla u nich být v tomto období biologická léčba zahájena. Podmínkami toho byla vysoká aktivita onemocnění vyjádřená pomocí komplexního ukazatele DAS 28, které muselo být minimálně $\geq 3,9$, a nedostatečná odpověď na 1 DMARDs (preferenčně MTX, event. sulfasalazin - SAS či leflunomid). Léčba DMARDs musela být podávána v adekvátní dávce (dávka MTX alespoň 20-30mg/týdně) a musela trvat nejméně 3-6 měsíců (Pavelka a Vencovský 2010). Před započítáním studie tito pacienti nikdy nebyli léčeni anti TNF α preparáty.

Náhodná skupina zdravých kontrol byla získána ze stejných oblastí, ze kterých pocházeli pacienti. Ke každému pacientovi dle pohlaví a věku (ve většině případů do 2leté difference, naprosto ojediněle maximálně do 6leté difference) jsme přiřadili 3 vhodné kontrolní osoby, resp. pro 9 pacientek s JIA jsme mohli přiřadit pouze 2 kontroly. Takto bylo ze 100 zdravých osob vybráno 84 osob věkově i pohlavím shodných s pacienty s JIA.

U pacientů s JIA byla odebrána podrobná anamnéza a bylo provedeno klinické vyšetření, odběr krve a vyšetření BMD v den započítání léčby anti TNF α blokátory a poté za 12 a 24 měsíců. Obdobně byly vyšetřeny zdravé osoby.

Z důvodu zachování stejných podmínek při odběru krevních vzorků pacienti i zdravé osoby lačnili od 20:00 přes noc. Druhý den ráno v 8:00 jim byla odebrána žilní krev. Pro stanovení sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostinu byla krev ponechána přibližně 30 minut, aby se srazila, potom byla centrifugována 15 minut a získané krevní sérum bylo rozaliquotováno, zamraženo a uchováváno v -80st. Celsia. Alikvoty získané při zahájení léčby TNF α blokátory a za 12 a 24 měsíců byly nejprve sesbírány a v jedné době pak byly použity ke stanovení sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostinu. Ostatní markery kostního metabolismu byly měřeny v den odběru krve pacientů a zdravých kontrol.

Charakteristika souboru: do naší studie jsme zařadili 31 pacientů s JIA (12 mužů a 19 žen) ve věku $25,1 \pm 6,1$ roku s vysokou aktivitou choroby (hsCRP $18,36 \pm 16,95$, DAS 28 $6,36 \pm 0,64$) a 84 zdravých kontrol (Tab. 4.1, Tab. 4.5). V antropometrických měřeních nebyly mezi soubory nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. Co se týče charakteristiky souboru pacientů s JIA, tak onemocnění začalo průměrně ve věku $10,3 \pm 4,8$ let a trvalo průměrně po dobu $14,6 \pm 9,1$ let. Postižení krční páteře bylo nalezeno u 7 pacientů. Žádný pacient neměl vaskulitidu ani postižení plic. 6 pacientů mělo pozitivní antinukleární protilátky (ANA).

V našem souboru pacientů s JIA mělo 16 pacientů polyartikulární formu (RF pozitivní 4 a RF negativní 12 osob), 9 pacientů entezopatickou formu, 4 pacienti rozšířenou oligoartikulární a 2 pacienti psoriatickou formu. Funkční třída I byla nalezena u 18, II u 4, III u 5 a IV u 4 pacientů. U pacientek s JIA byla průměrná doba menarche $13,1 \pm 1,2$ let.

Všichni pacienti s JIA byli léčeni DMARDs: 23 MTX v průměrné dávce $16,8 \pm 3,4$ mg/týden, 4 leflunomidem, 2 SAS, 1 SAS + hydroxychlorochin sulfátem a 1 cyclosporinem A. Co se týče GCs, 12 pacientů (9 žen a 3 muži) bylo na této terapii (Prednison u 10 pacientů a Medrol u 2 pacientů). U těchto pacientů byla průměrná dávka GCs $6,7 \pm 4,3$ mg denně, medián dávky byl 5 mg denně a rozmezí 4-20mg/denně. 5 pacientů s JIA nikdy neužívalo GCs a 14 užívalo GCs v minulosti, nikoli v čase naší studie. Co se týče anti TNF α preparátů, 18 pacientů začalo užívat infliximab, 8 pacientů etanercept a 5 adalimumab. Mezi pacienty s JIA a zdravými kontrolami byl rozdíl v počtu již prodělaných zlomenin. U JIA bylo anamnesticky zaznamenáno 6 neobratlových nízkotraumatických zlomenin a 5 morfometrických zlomenin obratlů, u zdravých nebyly zlomeniny žádné (Tab. 4.1).

Pro stanovení aktivity onemocnění JIA bylo použito skóre DAS 28 a hsCRP. DAS 28 bylo získáno použitím DAS 28 kalkulátoru, který zahrnuje objektivní klinické komponenty (počet oteklých a bolestivých kloubů, vždy z celkového počtu 28), laboratorní komponenty (FW) a subjektivní komponenty (vizuální analogová škála, VAS, na stupnici 0-100 mm: 0 = nejlepší, 100 = nejhorší). Koncentrace hsCRP byla změřena použitím imunoturbidimetrického testu (AU 400 analyzátor, Beckman Coulter, Česká republika) v biochemické laboratoři RÚ. Opakovatelnost měření pro hsCRP byla 1,9 %.

Markery kostní remodelace a inhibitory osteoblastů: sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostin byly měřeny použitím kitů imunosorbentní eseye ve spojení s enzymem (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) podle instrukcí výrobce (sRANKL, OPG, Dkk-1: Biomedica Gruppe; sklerostin: Uscn Life Sciences Inc.) vždy stejnou osobou v Laboratoři kostního metabolismu RÚ. Všechny ELISA eseye, použité v naší studii, jsou kvantitativní sendvičové enzymové imunoeseje. Výsledky byly odečteny ELISA readerem Tecane Sunrise (Schoeller Instruments). Všechny vzorky byly vždy analyzovány v duplikátu. Vzorky sér pacientů byly neprve sesbírány a sRANKL, OPG, Dkk-1 a sklerostin byly za celé sledované období (0, 12 a 24 měsíců) analyzovány v jedné době, tedy na stejné ELISA destičce. sRANKL ELISA detekuje volný rozpustný RANKL, bez OPG vazby. Byl vypočítán poměr mezi sRANKL a OPG. Pro sRANKL byla opakovatelnost = “intra-assay” koeficient variability (iaCV) 8 a 9 %, reprodukovatelnost = “inter-assay” koeficient variability (ieCV) 6 a 3 % a detekční limit 0,02 pmol/l ($0 \text{ pmol/l} + 3 \text{ SD}$). Pro metodu OPG byl iaCV 10 a 4 %, ieCV 7 a 8 % a detekční limit

0, 14 pmol/l (0 pmol/l + 3 SD). Pro Dkk-1 byl iaCV 7 a 8 %, ieCV 9 a 12 % a detekční limit 0,38 pmol/l (0 pmol/l + 3 SD). Pro sklerostin byl iaCV < 10 %, ieCV < 12 % a detekční limit nižší než 0,106 ng/ml.

Z biochemických markerů kostního metabolismu byl měřen marker novotvorby kosti (P1NP), marker resorpce kosti (β CTX) a marker remodelace kosti (osteokalcin). Rovněž byly stanoveny následující ukazatele: vápník (Ca), fosfor (P), imunoreaktivní intaktní parathormon (iPTH) a 25hydroxyvitamin D (25OHD). Koncentrace osteokalcinu, P1NP, β CTX, iPTH a 25OHD byly stanoveny pomocí imunoanalýzy na bázi elektrochemiluminiscence (Cobas Analyzer, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Koncentrace Ca byla stanovena pomocí kolorimetrického barevného testu Calcium Arzenazo III na analyzátoru AU 400, Beckman Coulter. Výsledky Ca a P mezi skupinou pacientů s JIA a zdravých kontrol byly srovnatelné. Zvýšené hodnoty 25(OH)D u pacientů s JIA lze vysvětlit suplementací těchto pacientů vitamínem D, a vyšší hodnoty iPTH u zdravých osob kompenzačním mechanismem na nižší koncentrace 25(OH)D (Tab. 4.1).

3.2 Rychlé účinky GCs na sérové markery kostní remodelace

Do studie jsme prospektivně zařadili dospělé pacienty s různými revmatologickými nemocemi, pro které bylo nutno započít léčbu perorálními GCs. Tito pacienti nikdy předtím GCs neužívali a my jsme je prospektivně sledovali po dobu 4 dní (96 minut) od započetí léčby GCs. Před zařazením do výzkumu byli pacienti vyšetřeni klinicky včetně podrobné anamnézy. Ráno v den podání první dávky GCs a poté za 24, 48 a 96 hodin byly odebrány vzorky venózní krve pro stanovení sRANKL, OPG, Dkk-1, sklerostinu, P1NP, β CTX osteokalcinu.

4 VÝSLEDKY (komentáře k jednotlivým publikacím zařazeným do dizertační práce)

4.1 Souvislost mezi svalovou hmotou a obsahem kostního minerálu (BMC) u skupiny dospělých pacientů s JIA s vysokou aktivitou onemocnění

Cílem práce bylo zhodnotit parametry hustoty kostní hmoty a složení těla u dospělých pacientů s JIA a jejich vztah k aktivitě onemocnění a k léčbě GCs. Hodnoceny byly také vztahy mezi parametry kostní hmoty a složení těla. Pacienti měli vysokou aktivitu onemocnění (DAS 28 i hsCRP) a byly vyšetřeni před zahájením léčby anti TNF α preparáty (Tab. 4.1). Podrobnější popis pacientů s JIA je shodný s bazálními charakteristikami projektu 2 (Tab. 4.5 a odstavec 3.1).

	JIA pacienti (n=31)	Kontroly (n=84)	p
Počet osob	31	84	
Muži/ženy	12/19	36/48	0,692
Antropometrická měření			
Věk (roky)	25,1 \pm 6,1	23,8 \pm 4,5	0,405
Výška (cm)	170,5 \pm 9,8	173,3 \pm 9,3	0,145
Váha (kg)	68,0 \pm 12,5	69,2 \pm 12,5	0,884
BMI (kg/m²)	23,4 \pm 3,9	22,9 \pm 3,0	0,435
Klinická data ohledně kostní anamnézy			
Obratlové zlomeniny (počet)	5	0	<0,001
Neobratlové zlomeniny (počet)	6	0	<0,001
Rodinná anam. zl. kyčle (počet)	0	0	
Kouření (počet)	7	13	0,372
Abusus alkoholu (počet)	0	0	
Počet osob užív. GCs (počet)	12	0	<0,001
Menarché u žen (roky)	13,1 \pm 1,2	12,9 \pm 1,1	0,994
Hormonální kontracepce (počet)	11	23	0,462
25(OH)D v séru (nmol/l)	65,9 \pm 42,6	50,0 \pm 28,5	0,029
PTH (pmol/l)	4,8 1,3; 8,8	5,9 4,7; 7,6	0,004
Estradiol (pmol/l)	98,7 18,4; 541,1	103,2 56,4; 260,3	0,438
Aktivita onemocnění			
DAS 28	6,36 \pm 0,64	-	
hsCRP (mg/l)	18,36 \pm 16,95	1,40 \pm 1,63	<0,001

Tab. 4.1. Antropometrické a klinické charakteristiky pacientů s JIA a zdravých kontrol. Hodnoty jsou uvedeny v průměru \pm SD a/nebo medián a 75 % CI. Klinické charakteristiky s nulovou hodnotou nebyly zvažovány.

Prokázali jsme, že bazálně, tedy před započítím léčby anti TNF α , byly parametry denzity kostní hmoty (BMD) měřené s použitím dvouenergiové rentgenové absorpciometrie kostním denzitometrem GE Prodigy (DXA, GE, U.S.A., Software 12.10.113) a vyjádřené absolutně v g/cm² ve všech měřených oblastech (LS páteř, proximální kyčel, krček femuru, trochanter, distální radius a celé tělo) u pacientů s JIA statisticky signifikantně nižší než u zdravých kontrol. Co se týče hodnot BMD vyjádřených v T-skóre, tak kromě distálního radiu byly v ostatních oblastech také hodnoty T-skóre u pacientů s JIA nižší než u kontrolních osob. Jednoznačně jsme tedy prokázali, že u pacientů s JIA je snižené množství kostní hmoty ve všech námi měřených oblastech (Tab. 4.2).

	JIA pacienti (n=31)	Kontroly (n=84)	p
LS páteř BMD (g/cm²)	1,09 ± 0,15	1,23 ± 0,10	<0,001
LS páteř T-skóre (SD)	-0,54 ± 1,09	0,25 ± 0,85	0,003
Proximální kyčel BMD (g/cm²)	0,92 ± 0,16	1,14 ± 0,10	<0,001
Proximální kyčel T-skóre (SD)	-0,94 ± 1,13	0,67 ± 0,77	<0,001
Krček femuru BMD (g/cm²)	0,93 ± 0,17	1,13 ± 0,11	<0,001
Krček femuru T-skóre (SD)	-0,97 ± 1,21	0,54 ± 0,88	<0,001
Trochanter BMD (g/cm²)	0,69 ± 0,14	0,89 ± 0,10	<0,001
Trochanter T-skóre (SD)	-1,73 ± 1,35	-0,01 ± 0,97	<0,001
Distální radius BMD (g/cm²)	0,68 ± 0,08	0,73 ± 0,07	0,007
Distální radius T-skóre (SD)	-0,59 ± 1,06	-0,30 ± 0,77	0,168
Celé tělo BMD (g/cm²)	1,07 ± 0,19	1,21 ± 0,08	<0,001
Celé tělo T-skóre (SD)	-0,40 ± 0,92	0,64 ± 0,82	<0,001

Tab. 4.2. BMD g/cm² a v T-skóre v oblasti LS páteře, proximální kyčle, krčku femuru, trochanteru, distálního předloktí a celého těla u pacientů s JIA a zdravých kontrol.

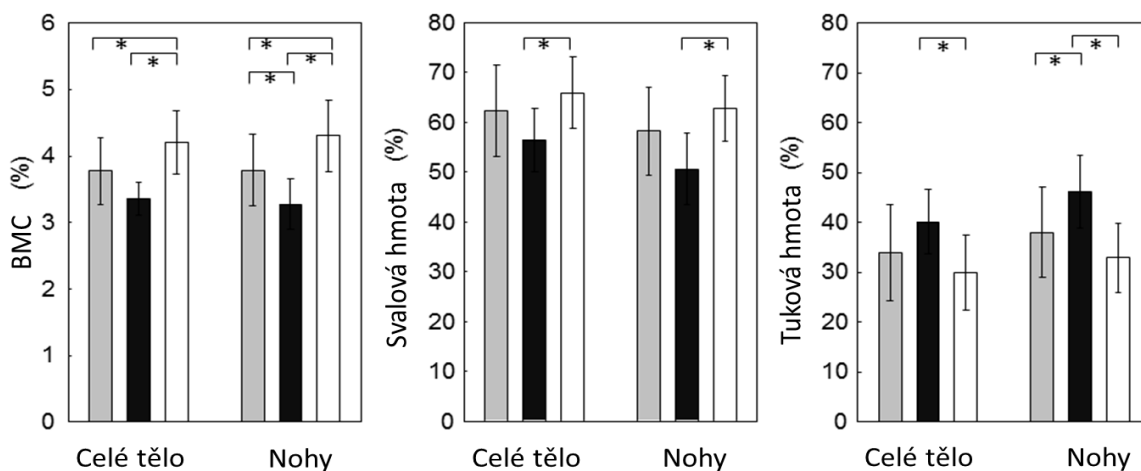
Navíc byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi parametry denzity kostní hmoty (BMD v g/cm² a T-skóre proximálního femuru, krčku femuru a trochanteru a BMD v g/cm² distálního radiu a T-skóre celého těla) a svalovou hmotou. Svalová hmota byla jediným determinujícím faktorem BMD proximálního femuru a krčku femuru.

Co se týče celkového množství tkáně (v gramech) jak celotělově, tak v oblasti trupu i končetin (paží a nohou), nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly mezi skupinou pacientů s JIA a zdravých kontrol. Nicméně ve všech měřených regionech byla svalová hmota a BMC (vyjádřené v %) statisticky významně nižší a tuková hmota v % statisticky významně vyšší u pacientů s JIA v porovnání se zdravými osobami (Tab. 4.3).

	JIA pacienti (n=31)	Kontroly (n=84)	p
Složení celého těla			
Hmotá tkáň (g)	63914 ± 11660	66813 ± 12338	0,273
Tuková hmota (%)	31,67 ± 10,63	24,93 ± 8,71	0,001
Svalová hmota (%)	64,64 ± 10,28	70,86 ± 8,52	0,002
BMC (%)	3,70 ± 0,48	4,20 ± 0,40	<0,001
Složení paží			
Hmotá tkáň (g)	7116 ± 1846	7446 ± 2017	0,578
Tuková hmota (%)	30,28 ± 12,23	21,79 ± 11,03	<0,001
Svalová hmota (%)	65,47 ± 11,69	73,28 ± 10,71	0,001
BMC (%)	4,25 ± 0,80	4,94 ± 0,69	<0,001
Složení nohou			
Hmotá tkáň (g)	22922 ± 4009	23974 ± 4134	0,238
Tuková hmota (%)	34,86 ± 12,03	26,62 ± 9,36	<0,001
Svalová hmota (%)	61,33 ± 11,54	68,89 ± 9,04	<0,001
BMC (%)	3,82 ± 0,62	4,49 ± 0,50	<0,001
Složení trupu			
Hmotá tkáň (g)	30207 ± 6538	31302 ± 6245	0,426
Tuková hmota (%)	31,20 ± 11,28	25,84 ± 9,15	0,013
Svalová hmota (%)	66,39 ± 11,10	71,31 ± 9,03	0,021
BMC (%)	2,41 ± 0,37	2,85 ± 0,32	<0,001
Chair rise test (5x) (sek)	10,29 ± 4,07	6,24 ± 1,47	<0,001
Rychlost chůze (m/sek)	1,22 ± 0,33	1,40 ± 0,27	0,002

Tab. 4.3. Složení celého těla, paží, nohou a trupu u pacientů s JIA a zdravých kontrol. Hodnoty jsou uvedeny v průměru ± SD.

Rozdíly ve složení těla a jeho částí mezi pacienty s JIA a kontrolami byly pro obě pohlaví obdobné: ve všech oblastech bylo sníženo BMC a ve všech oblastech kromě trupu byla tuková hmota zvýšena a svalová hmota snížena. U žen s JIA závisely frakce složení celého těla i nohou (BMC, svalová a tuková hmota v %) na tom, zda se léčily GCs (Obr. 4.1).



Obr. 4.1. Parametry složení celého těla a nohou u žen s JIA neléčených GCs (šedé sloupce), u žen s JIA léčených GCs (černé sloupce) a u žen kontrolní skupiny (bílé sloupce). *p < 0,05, One-way ANOVA.

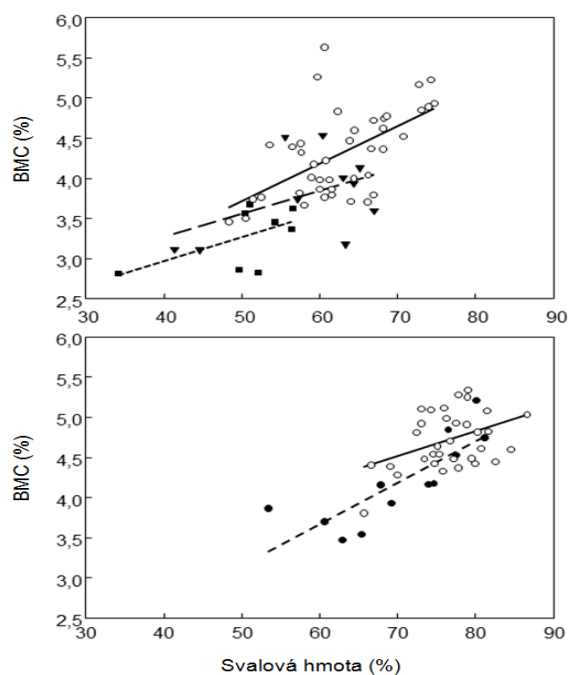
U JIA jsme prokázali signifikantní korelace mezi parametry složení nohou, testy funkce DK a délkou trvání onemocnění (Tab. 4.4). Nejzásadnější byl průkaz asociace mezi BMC a trváním onemocnění, užitím GCs a svalovou a tukovou hmotou. Mezi parametry složení těla a DAS 28 nebo hsCRP nebyly nalezeny žádné souvislosti.

	GCs	Délka trvání onemocnění (roky)	Tuková hmota (%)	Svalová hmota (%)	BMC (%)	DAS28
Chair rise test (s)	0,02	0,39*	0,40*	-0,40*	-0,23	0,13
GCs		0,21	0,43*	-0,43*	-0,43*	0,50**
Délka trvání on. (roky)			0,48**	-0,47**	-0,47**	-0,04
Tuková hmota (%)				-1,00**	-0,80**	0,24
Svalová hmota (%)					0,78**	-0,24
BMC (%)						-0,27

*p<0.05; **p<0.01

Tab. 4.4. Pearsonovy korelační koeficienty mezi složením nohou, testem funkce dolních končetin a trváním onemocnění u pacientů s JIA.

Díky zařazení žen s JIA, léčených GCs, jsme zjistili negativní korelace mezi užitím GCs a BMC nohou a mezi GCs a DAS 28 (obr. 4.2). Pozitivní korelace byla zjištěna mezi tukovou hmotou a užíváním GCs. Podle mnohočetné lineární regrese bylo BMC predikováno celotělovou svalovou hmotou jak u žen (p = 0,002), tak u mužů (p = 0,022), a svalovou hmotou nohou u mužů (p = 0,008). DAS 28, léčba GCs a trvání onemocnění významně nepřispívaly k predikci BMC u JIA.



Obr. 4.2. Korelace mezi svalovou hmotou a BMC v oblasti nohou u žen (horní panel) a mužů (dolní panel). Zdravé kontroly (prázdná kolečka, plná čára, ženy, $r = 0,58$, $p < 0,001$, muži, $r = 0,43$, $p = 0,017$), ženy s JIA neléčené GCs (plné trojúhelníky, čárkovaná čára, $r = 0,47$, $p = 0,17$), ženy s JIA léčené GCs (plné čtverce, drobně čárkovaná čára, $r = 0,43$, $p = 0,29$) a muži s JIA (plná kolečka, čárkovaná čára, $r = 0,81$, $p = 0,001$).

Výsledky této práce prokázaly signifikantní vliv léčby GCs a délky trvání onemocnění na parametry BMD a na složení těla u pacientů s JIA a podporují hypotézu dominantní role svalů v synchronizaci svalové a kostní hmoty.

Publikace k tématu:

1. Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. *The association between lean mass and bone mineral content in the high disease activity group of adult patients with juvenile idiopathic arthritis. BMC Musculoskelet Disord. 2014;15:51. doi: 10.1186/1471-2474-15-51.*

2. Brábníková Marešová K, Jarošová K, Štěpán J. *Asociace mezi svalovou hmotou a zlomeninami u pacientů s anamnézou juvenilní idiopatické artritidy. Česká revmatologie 2010;18(1):12-18.*

4.2 Kostní hmota, markery kostní remodelace a inhibitory osteoblastů před a během 24 měsíců léčby TNF α blokátory u vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA

Vstupně bylo onemocnění JIA u sledovaných pacientů vysoce aktivní, což dokumentuje DAS 28, včetně jeho složek (FW, VAS, počet oteklých a bolestivých kloubů), i hsCRP, přičemž aktivita onemocnění se během anti TNF α léčby významně snížila (Tab. 4.5) Charakteristika souboru je v tabulce 4.1.

Vstupně byl soubor pacientů s JIA shodný s projektem 1. Bazální hodnoty BMD v g/cm² v námi měřených úsecích skeletu byly signifikantně nižší u pacientů s JIA oproti zdravým kontrolám (Tab. 4.2 a 4.5). Navíc jsme zjistili negativní korelaci mezi BMD krčku femuru a užíváním GCs ($r = -0,40$, $p < 0,05$) a trváním onemocnění ($r = -0,48$, $p < 0,005$).

Co se týče bazálních sérových koncentrací markerů kostní remodelace a metabolismu, byly koncentrace sklerostinu významně vyšší u pacientů s JIA v porovnání se zdravými kontrolami (Tab. 4.5). Ostatní sledované markery se mezi skupinou JIA a zdravými kontrolami nelišily (Tab. 4.5). Nebyla nalezena žádná významná asociace mezi sklerostinem a ostatními markery a laboratorními proměnnými, kromě estradiolu ($p = 0,022$). Prokázali jsme ale významné souvislosti mezi aktivitou onemocnění a dalšími kostními markery: Dkk-1 pozitivně korelovalo s hsCRP ($r = 0,36$, $p < 0,05$) a navíc DAS 28 po adjustaci na pohlaví, GCs léčbu a délku trvání onemocnění signifikantně korelovalo s osteokalcinem ($p = 0,005$) a OPG ($p = 0,32$), nikoli s β CTX. Bazální hodnoty β CTX byly závislé pouze na pohlaví ($p < 0,001$).

	0 (n = 31)	12. měsíc (n = 31)	24. měsíc (n = 31)	Kontroly (n = 83)
hsCRP (mg/l)	12,09 ^b 6,28; 25,17	5,19 ^b 1,30; 12,89	4,28 ^b 0,89; 13,44	0,73 0,27; 1,78
FW (mm/hod)	25,50 ^b 20,00; 36,00	16,00 ^b 4,00; 24,00	12,00 ^{a,b} 4,00; 26,00	4,00 2,00; 8,00
DAS 28	6,26 5,87; 6,82	2,93 ^a 1,13; 3,69	2,51 ^a 1,25; 3,64	
Oteklé klouby (počet)	12,0 9,0; 15,5	0,0 ^a 0,0; 2,0	0,0 ^a 0,0; 2,0	
Bolestivé klouby (počet)	15,0 11,3; 17,8	1,0 ^a 0,0; 2,0	0,0 ^a 0,0; 2,0	
VAS (mm)	69,0 59,0; 75,0	18,0 ^a 5,0; 27,8	10,0 ^a 0; 20,0	
LS páteř BMD (g/cm²)	1,065 ^b 0,972; 1,221	1,089 ^{a,b} 1,044; 1,248	1,093 ^{a,b} 1,053; 1,161	1,209 1,175; 1,279
Prox. kyčel BMD (g/cm²)	0,909 ^b 0,776; 0,984	0,918 ^b 0,776; 1,015	0,886 ^b 0,790; 0,996	1,134 1,061; 1,202
Krček femuru BMD (g/cm²)	0,899 ^b 0,819; 1,017	0,903 ^b 0,806; 1,033	0,905 ^b 0,821; 1,019	1,118 1,042; 1,201
Distální rádius BMD (g/cm²)	0,690 0,614; 0,761	0,712 0,638; 0,769	0,707 0,632; 0,762	0,713 0,676; 0,768
Osteokalcin (µg/l)	17,75 12,40; 24,80	17,45 8,80; 26,90	15,20 11,95; 20,20	21,20 16,68; 26,90
P1NP (µg/l)	46,16 31,96; 59,41	46,41 32,01; 88,77	51,23 33,66; 72,01	50,96 37,10; 81,84
βCTX (µg/l)	0,35 0,18; 0,52	0,33 0,23; 0,49	0,33 ^b 0,20; 0,45	0,46 0,34; 0,70
sRANKL (pmol/l)	0,08 0,02; 0,25	0,05 0,00; 0,25	0,07 0,00; 0,21	0,06 0,00; 0,16
OPG (pmol/l)	3,84 2,53; 4,84	3,26 2,10; 3,64	3,02 2,03; 3,55	3,14 2,62; 3,85
RANKL/OPG poměr	0,03 0,01; 0,07	0,03 0,00; 0,10	0,01 0,00; 0,10	0,02 0,00; 0,05
Dkk-1 (pmol/l)	28,74 23,8; 36,84	24,08 14,54; 29,41	21,52 ^{a,b} 15,72; 31,25	28,74 23,80; 36,84
Sklerostin (µg/l)	7,42 ^b 3,57; 15,49	2,06 ^a 1,00; 3,48	1,22 ^a 0,30; 3,26	1,94 0,62; 5,71

Tab. 4.5. Aktivita onemocnění, BMD a laboratorní ukazatele u pacientů s JIA bazálně a během léčby anti TNF α preparáty a u zdravých kontrol.

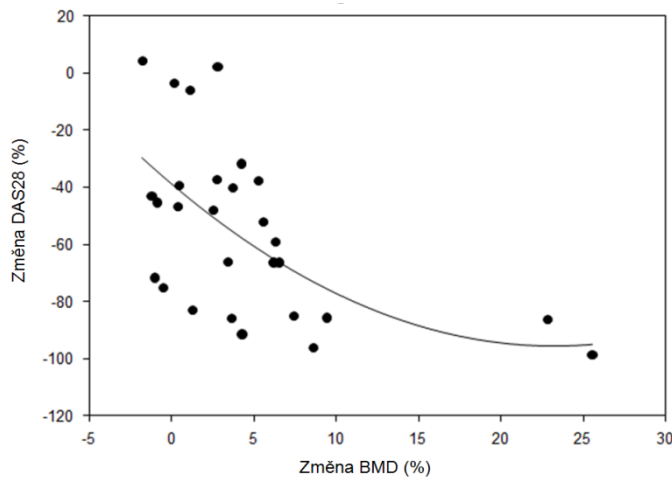
Medián a 75 % CI.

a: pravděpodobnost pomocí opakovaných měření jednocestné analýzy rozptylu uvnitř skupiny JIA pacientů, v porovnání s bazálními hodnotami, $p < 0,05$;

b: pravděpodobnost pomocí opakovaných měření jednocestné analýzy rozptylu v porovnání s kontrolními zdravými osobami $p < 0,05$.

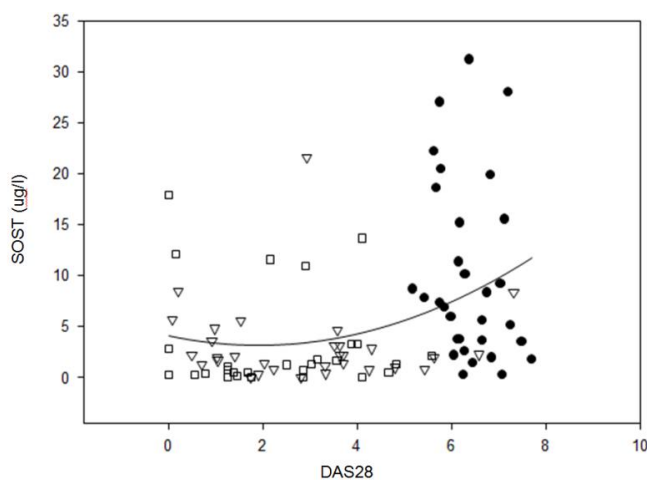
Prokázali jsme, že po 1 a po 2 letech léčby TNF α inhibitory signifikantně vzrostlo BMD v oblasti bederní páteře (o $2,9 \pm 4,7$ % a o $4,6 \pm 6,3$ %), v ostatních lokalitách nebyl nárůst BMD signifikantní (Tab. 4.5). Toto zvýšení BMD bederní páteře po 2 letech bylo statisticky významně predikováno poklesem hodnoty DAS 28 po 1 roce anti TNF α léčby ($p = 0,003$) a

tato korelace se nezměnila ani po adjustaci na pohlaví, věk, výšku, GCs léčbu ani délku trvání onemocnění (Obr. 4.3).



Obr. 4.3. Korelace mezi procentuální změnou DAS 28 po 1 roce a procentuální změnou BMD LS páteře po 2 letech anti TNF α léčby. Změna BMD po 24 měsících = $-1,582 - (0,112 * \text{změna DAS 28 po 12 měsících})$, $r = 0,53$, $p = 0,003$.

Bazálně zvýšený sklerostin u JIA proti zdravým kontrolám se již po 1 roce anti TNF α léčby významně snížil (Tab. 4.5). Navíc byla nalezena významná korelace mezi sklerostinem a počtem bolestivých kloubů po adjustaci na FW, pohlaví a GCs léčbu ($r = 0,40$, $p < 0,001$). Pozitivní korelace mezi DAS 28 a koncentrací sklerostinu před a během léčby anti TNF α blokátory (Tab. 4.6, Obr. 4.4) zůstala signifikantní i po adjustaci na léčbu GCs ($r = 0,37$, $p = 0,002$). Sklerostin nekoreloval ani s FW ani s hsCRP (Tab. 4.6). Kromě sklerostinu se za 2 roky léčby anti TNF α preparáty rovněž snížil Dkk-1 a statisticky signifikantní pozitivní korelace mezi hsCRP (po adjustaci na GCs léčbu) a Dkk-1, zjištěná již bazálně, byla prokázána rovněž po 2 letech léčby anti TNF α inhibitory ($r = 0,40$, $p < 0,001$).



Obr. 4.4. Korelace mezi hodnotou DAS 28 a sérovou koncentrací sklerostinu (=SOST) před a během anti TNF α léčby. $\text{DAS 28} = 3,332 + (0,104 * \text{sklerostin})$, $r = 0,32$, $p = 0,002$. Plná kolečka – bazální hodnoty; trojúhelníky – jeden rok anti TNF α léčby; čtverce – dva roky anti TNF α léčby.

	GCs	Trvání onemoc- nění	LS páteř BMD	Krček femuru BMD	Dkk-1	Skle- rostin	hsCRP	DAS 28	FW	Počet bolestivých kloubů
Pohlaví	0,226 ^c	0,311 ^b	0,074	0,350 ^b	0,281 ^b	-0,029	-0,124	0,280	0,085 ^b	0,211 ^c
GCs		0,130	0,274 ^b	0,391 ^a	0,291 ^b	0,229 ^c	0,229 ^c	0,416 ^a	0,330 ^b	0,323 ^b
Trvání onemocnění			0,176	-0,500 ^a	-0,021	0,010	0,100	0,192	0,100	0,104
LS páteř BMD				0,512 ^a	-0,106	-0,178	-0,055	-0,121	-0,075	-0,071
Krček femuru BMD					0,017	-0,154	-0,113	-0,270 ^c	-0,266 ^c	-0,116
Dkk-1						0,026	0,402 ^a	0,113	0,244	0,071
Sklerostin							-0,011	0,317 ^b	0,023	0,332 ^b
hsCRP								0,318 ^b	0,751 ^a	0,089
DAS 28									0,594 ^a	0,857 ^a
FW										0,255 ^c

Tab. 4.6. Pearsonovy korelační koeficienty pro proměnné měřené bazálně a během anti TNF α léčby. ^a: p<0,001; ^b: p<0,005; ^c: p<0,05

Publikace k tématu:

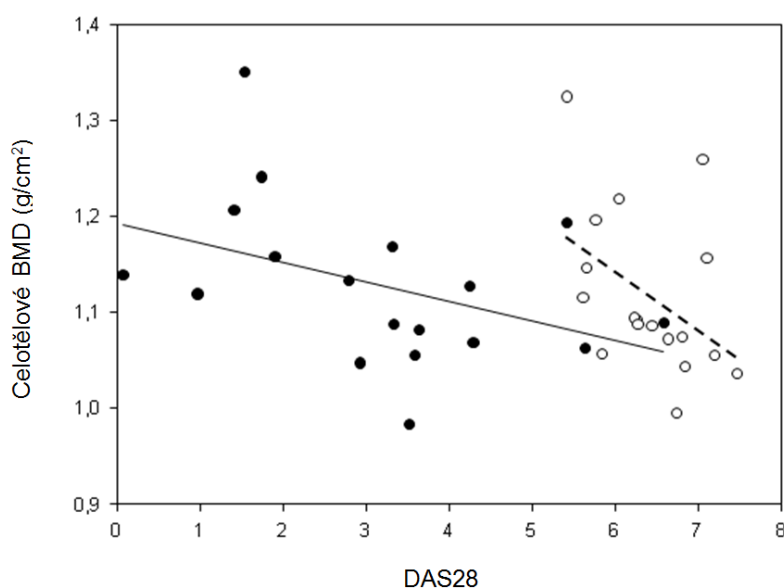
Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. Serum sclerostin in adult high-activity patients with juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Res Ther. 2014;16(5):460. [Epub ahead of print].

4.3 Stav kostní hmoty u pacientů s JIA s nástupem v časném dětství po 1 roce léčby anti TNF α preparáty a přerušení léčby glukokortikoidy

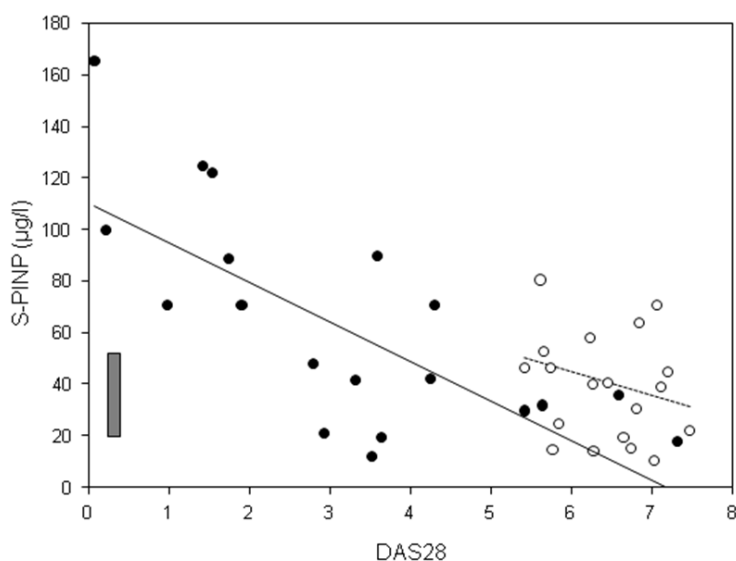
Prokázali jsme, že pacienti s JIA mají sníženou kostní hmotu, zvýšený sklerostin a že během anti TNF α léčby se kromě sklerostinu snižuje i Dkk-1 a naopak se zvyšuje BMD. Rovněž byly prokázány souvislosti mezi parametry aktivity onemocnění a inhibitory osteoblastů. Léčba pacientů s JIA zahrnuje kromě biologických preparátů, také DMARDs a GCs. Cílem této výzkumu bylo zhodnotit 12 měsíční léčbu anti TNF α preparáty na BMD a zejména na sérové markery kostního metabolismu u dospělých pacientů s JIA, kteří byli GCs naivní a kteří byli léčeni GCs a zhodnotit vliv přerušení této GCs léčby na kostní parametry. Práce vznikla na základě zhodnocení části souboru pacientů s JIA, kteří v době tohoto sběru absolvovali roční kontrolu na biologické léčbě anti TNF α (jako první zhodnocení našich dat a publikace).

Léčba anti TNF α blokátory vedla u pacientů s JIA k signifikantnímu snížení aktivity onemocnění jak ve formě DAS 28 (o 47 %), tak ve formě hsCRP (o 63 %), a k signifikantnímu zvýšení BMD LS páteře (o 1,8 %), celého těla (o 1,0 %) a ke zvýšení P1NP (o 71 %). Bazálně negativně korelovalo DAS 28 a celotělové BMD; po roce anti TNF α léčby již však tato korelace nedosahovala statistické významnosti (Obr. 4.5).

Významný je nálezný signifikantní negativní korelace mezi změnou DAS 28 a zvýšením P1NP po 1 roce anti TNF α léčby, nikoli bazálně (Obr. 4.6) a mezi snížením hsCRP a zvýšením P1NP ($r = -0,544$, $p < 0,016$). Snížení DAS 28 a hsCRP nebylo spojeno s žádnou statisticky významnou změnou v koncentraci β CTX nebo osteokalcinu.

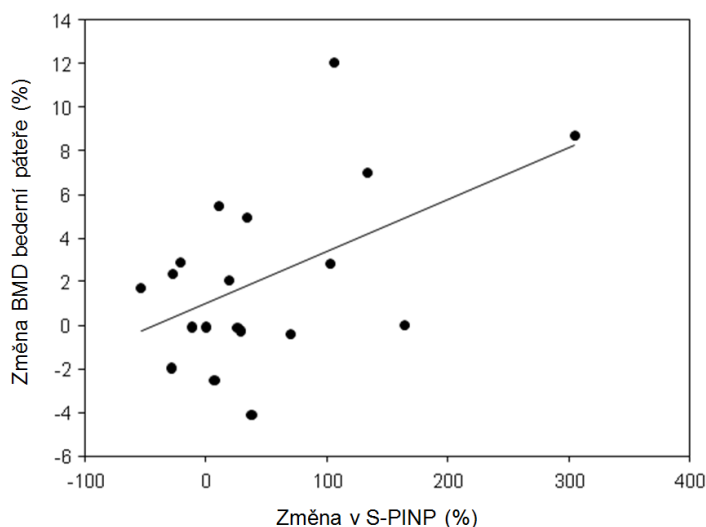


Obr. 4.5. Korelace mezi DAS 28 a BMD celého těla u pacientů s JIA bazálně (prázdná kolečka, čárkovaná linie, $r = -0,976$, $p < 0,001$) a po 1 roce anti TNF α léčby (plná kolečka, plná linie, $r = -0,414$, $p < 0,088$) u 18 pacientů s JIA.



Obr. 4.6. Korelace mezi koncentrací P1NP v séru a DAS 28 bazálně (prázdná kolečka, čárkovaná linie, $r = -0,243$, $p = 0,32$) a po 1 roce anti TNF α léčby (plná kolečka, plná linie, $r = -0,691$, $p = 0,001$) u 19 pacientů s JIA. Stínovaný obdélník ukazuje normální referenční mez pro P1NP.

Prokázali jsme rovněž, že po 1 roce léčby anti TNF α preparáty pozitivně koreluje změna v P1NP se změnou BMD bederní páteře (Obr. 4.7). Po 1 roce léčby TNF α blokátory nebyl rozdíl v P1NP mezi pacienty nikdy neléčenými GCs a mezi pacienty pokračujícími nadále s léčbou GCs. Nicméně jsme ale mohli pozorovat signifikantní zvýšení v P1NP u pacientů s JIA, kteří během anti TNF α léčby přerušili léčbu GCs (Tab. 4.7).



Obr. 4.7. Korelace mezi procentuální změnou v sérové koncentraci P1NP a procentuální změnou v BMD LS páteře po 1 roce anti TNF α léčby u 19 pacientů s JIA ($r = -0,502$, $p = 0,029$).

	GCs naivní pacienti (n = 8)	Pacienti pokračující s GCs (n = 6)	Pacienti přerušující GCs (n = 5)
Změna v S-PINP (%)	27,3 9,6; 35,9	-16,3 -28,2; 10,4	105,6 * 54,2; 176,0
Změna v BMD (%)	-0,04 -0,21; 2,20	2,27 -0,09; 2,90	6,97 -0,94; 9,52
Změna v DAS 28 (%)	-53,3 ± 25,5	-32,5 ± 24,9	-57,2 ± 39,8

Tab. 4.7. Změna v PINP, BMD LS páteře a DAS 28 po 1 roce anti TNF α léčby u JIA neléčených, pokračujících a přerušujících léčbu GCs. *: $p = 0.036$ (one-way ANOVA). Data jsou uvedena jako medián \pm 25% percentil nebo průměr \pm SD.

Můžeme konstatovat, že po zahájení anti TNF α léčby může být nárůst ve formování nové kosti (růst P1NP a BMD) vysvětlen přerušením léčby GCs, protože pacienti s největším poklesem v aktivitě (DAS 28 a CRP) jsou pravděpodobně ti, u nichž lze přerušit léčbu GCs.

Publikace k tématu:

Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. Bone status in adults with early-onset juvenile idiopathic arthritis following 1-year anti-TNF α therapy and discontinuation of glucocorticoids. Rheumatol Int. 2013;33(8):2001-7.

4.4 Rychlé účinky GCs na sérové markery osteoklastů, osteoblastů a osteocytů

GCs jsou velmi často používány k léčbě revmatických onemocnění včetně JIA. Jejich negativní vliv na kostní novotvorbu byl prokázán v předchozí práci; inhibice kostní novotvorby nastává jejich vlivem v dlouhodobějším měřítku. Cílem této práce bylo zkoumat dosud méně probádané akutní (v řádech hodin) účinky GCs na markery kostního metabolismu, remodelace a inhibitory osteoblastů, resp. souvislosti mezi nimi.

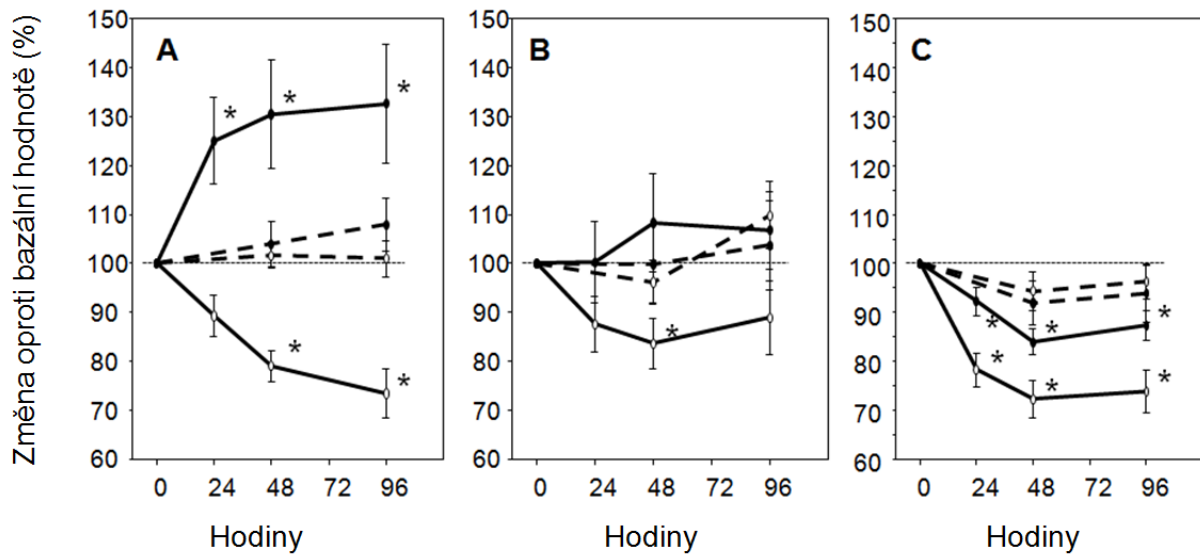
Do studie jsme prospektivně zařadili dospělé vstupně GCs naivní pacienty s různými revmatologickými nemocemi, pro které bylo nutno započít léčbu perorálními GCs. V souboru bylo 17 pacientů, z nichž 3 byly premenopauzální ženy (věkové rozmezí 19-36 let, BMI 18,1-24,8 kg/m²), 11 postmenopauzálních žen (věkové rozmezí 36-87 let, BMI 19,8-31,9 kg/m²) a 3 muži (věkové rozmezí 53-63 let, BMI 23,6-37,3 kg/m²). Pacienti byli léčeni průměrnou ekvivalentní dávkou prednisolonu 23,1 ± 12,7 mg/den (rozmezí 10-50mg/den). Kromě toho v době rekrutování do projektu 3 pacienti užívali MTX, 3 hydroxychlorochin sulfát, 1 cyklosporin A a 1 cyklofosfamid. Základní charakteristiky jsou v tabulce 4.8.

Věk (roky, průměr a rozpětí)	68 (19-87)
BMI (kg/m ²)	24,8 (21,9; 29,3)
BMD LS páteře (T-skóre)	-0,2 ± 1,3
BMD proximální kyčle (T-skóre)	-1,0 ± 0,9
BMD krčku femuru (T-skóre)	-1,3 ± 1,1
Dávka GCs (ekvivalent prednisolonu, mg/den)	20 (15,0; 32,5)
S-Ca (mmol/l)	2,28 (2,21; 2,38)
S-PO ₄ (mmol/l)	1,24 (1,13; 1,31)
S-bALP (μkat/l)	1,56 (1,41; 1,85)
S-P1NP (μg/l)	41,2 (24,6; 61,5)
S-Osteokalcin (μg/l)	13,0 (9,1; 14,7)
S-OPG (pmol/l)	4,07 (3,16; 5,83)
S-Sklerostin (μg/l)	24,7 (17,6; 29,5)
S-βCTX (μg/l)	0,48 (0,32; 0,65)
S-Dkk-1 (pmol/l)	118,2 (55,6; 179,2)
S-sRANKL (pmol/l)	0,050 (0,000; 0,125)
S-sRANKL/OPG (mol/mol)	0,005 (0,000; 0,033)
S-25hydroxyvitamín D (nmol/l)	24,5 (21,3; 41,0)
S-iPTH (pmol/l)	5,2 (3,5; 7,6)
TSH (mIU/l)	1,6 (1,4; 2,2)
hsCRP (mg/l)	60,4 (11,2; 104,0)

Tab. 4.8. Charakteristika populace. Průměr ± SD nebo medián (25%; 75%).

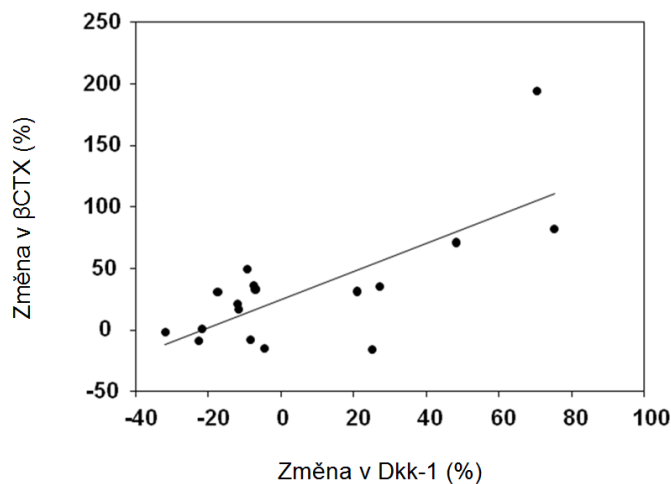
Prokázali jsme signifikantní redukci v sérových koncentracích osteokalcinu, P1NP, OPG, sklerostinu a hsCRP během 96 hodin po podání GCs (Obr. 4.8). Co se týče βCTX, zaznamenali jsme naopak významné procentuální zvýšení koncentrace (Obr. 4.8). Zvýšení Dkk-1, sRANKL ani poměru sRANKL/OPG nedosáhlo statistické významnosti. Byla zjištěna

pozitivní asociace mezi β CTX a Dkk-1 (Obr. 4.9), která může vysvětlovat zvýšení resorpce kosti (vzrůst β CTX).



Obr. 4.8. Změny sérových markerů u 17 pacientů nové léčených GCs (*p < 0,05, ANOVA). Čárkované linie označují kontroly.

- A. β CTX (plné kroužky) a P1NP (prázdné kroužky)
- B. Dkk-1 (plné kroužky) a sklerostin (prázdné kroužky)
- C. OPG (plné kroužky) a osteokalcin (prázdné kroužky)



Obr. 4.9. Korelace mezi koncentrací Dkk-1 a β CTX po 96 hodinách léčby GCs ($r = 0,73$, $p = 0,001$).

Výše zmíněné snížení sérové koncentrace sklerostinu spolu s poklesem hodnot sérových markerů kostní novotvorby (osteokalcin, P1NP, OPG) potvrzuje glukokortikoidy navozenou apoptózu osteoblastů i osteocytů.

Publikace k tématu:

Brabnikova Maresova K, Pavelka K, Stepan JJ. Acute effects of glucocorticoids on serum markers of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. Calcif Tissue Int. 2013;92(4):354-61.

5 DISKUZE (k jednotlivým publikacím zařazeným do dizertační práce)

5.1 Souvislost mezi svalovou hmotou a BMC u aktivních pacientů s JIA

Prokázali jsme rozdíly v parametrech BMD a složení těla mezi pacienty s JIA a zdravými. Byla nalezena statisticky významná souvislost mezi parametry BMD a svalovou hmotou. Významné korelace jsme rovněž pozorovali mezi BMC a délkou trvání onemocnění, léčbou GCs a svalovou hmotou. Svalová hmota byla jediným determinujícím faktorem BMD v oblasti proximálního femuru a krčku femuru a hlavním určujícím faktorem BMC v oblasti celého těla u žen a mužů a v oblasti nohou u mužů.

Zjištěné rozdíly mezi složením těla a nohou v podskupině žen s JIA léčených nebo neléčených GCs, svědčí pro negativní účinek GCs na svalovou hmotu a BMC a pozitivní vliv na tukovou hmotu. Tyto výsledky jsou v soulase s několika průřezovými a longitudinálními studiemi, které prokázaly významné negativní účinky GCs na svalovou hmotu u pacientů s různými diagnózami (Natsui et al. 2006, Mok et al. 2008). Pozitivní korelace mezi aktivitou onemocnění (DAS 28) a GCs by mohla být vysvětlena nutností GCs terapie u pacientů s těžkou a velmi aktivní formou onemocnění. Nicméně u 9 z 19 žen, které užívaly GCs, byl BMC predikován nikoli DAS 28, ale užíváním GCs. Důležitost svalové hmoty je podporována faktem negativní asociace mezi délkou onemocnění a svalovou a kostní hmotou a funkcí dolních končetin a naopak pozitivní asociace mezi délkou onemocnění a tukovou hmotou. Naše pozorování jsou v soulase s prací, kde pacienti s JIA měli sníženou svalovou CSA měřenou pomocí periferní QCT a kde toto snížení souviselo se svalovou silou, abnormalitami v kostní geometrii a s redukcí tloušťky kortikální kosti radiu (Roth et al. 2004) a tibie (Felin et al. 2007).

Uvedené výsledky podporují hypotézu zásadní role cytokinů (myostatin, leukemický inhibiční faktor, IL-6, IL-7, IGF-I, FGF 2, a další) v synchronizaci metabolismu svalu a kosti (Gilsanz et al. 2006, Vernikos a Schneider 2010, Pedersen a Febbraio 2012). Zejména signální dráha myostatin/aktivin může hrát zásadní roli v koordinaci mezi kostní a svalovou hmotou (Fajardo et al. 2010). Zánětlivý proces prostřednictvím zvýšené produkce cytokinů může tlumit diferenciaci myocytů a indukovat apoptózu myocytů a degradaci proteinů (Lindehammar a Lindvall 2004). Tedy i u JIA může být zánět prostřednictvím sarkopenie zodpovědný za úbytek kostní hmoty. Na rozvoji sarkopenie se mohou podílet i GCs (prostřednictvím zvýšené produkce myostatínu) a snížená fyzická aktivita u JIA (Lindehammar a Lindvall 2004). GCs nejenom snižují svalový anabolismus (prostřednictvím

snížení transportu aminokyselin do svalů), ale zvyšují i katabolismus (Hanaoka et al. 2012). Navíc GCs hrají klíčovou roli v indukci degradace proteinů u akutních zánětlivých stavů prostřednictvím autofagické a ubikvitin-proteazomové dráhy (Schakman et al. 2012).

Výše zmíněné diskutované výsledky svědčí pro významný vliv jak onemocnění JIA jako takového, tak léčby GCs na parametry BMD a složení těla a podporují hypotézu dominantní role svalů v synchronizaci svalové a kostní hmoty.

5.2 Elevace sklerostinu u vysoce aktivních pacientů s dlouhotrvající JIA a jeho snížení během 24 měsíční léčby anti TNF α blokátory; sklerostin by mohl být kromě osteocytů tvořen i chondrocyty a buňkami subchondrální kosti

Bazální hodnoty BMD bederní páteře, proximální femuru, krčku femuru a distálního rádia byly u pacientů s JIA nižší než u zdravých kontrol. Po 2 letech anti TNF α léčby se zvýšilo BMD v oblasti bederní páteře a tento nárůst koreloval se snížením DAS 28. Co se týče souvislostí ukazatelů zánětu, sklerostin bazálně pozitivně koreloval s DAS 28, nikoli s hsCRP, ani FW. Navíc DAS 28 bylo bazálně asociováno s osteokalcinem, nikoli β CTX, což naznačuje inhibici kostní novotvorby u pacientů s aktivním zánětem. Toto naše zjištění podporuje i práce, kde u myšího modelu RA je etanercept schopen prostřednictvím inhibice Dkk-1 aktivovat osteoblastogenezi a novotvorbu kosti (Tanida et al. 2013).

Koncentrace sklerostinu závisí na genetických aspektech, pohlaví, funkci ledvin, adipozitě a přítomnosti diabetu a v neposlední řadě na věku (Modder et al. 2011, Amrein et al. 2012, Kuipers et al. 2014), jehož vliv lze v naší věkově homogenní skupině pominout. Je překvapivé, že jsme u pacientů s JIA nenalezli významné korelace mezi bazálně zvýšeným sklerostinem a denzitou kostního minerálu, jak bylo prokázáno v myším modelu artritidy (Chen et al. 2013, Marenzana et al. 2013). Ovšem i pro postmenopauzální ženy jsou pro souvislost mezi sklerostinem a BMD krčku femuru (Robling et al. 2008, Amrein et al. 2012, Polyzos et al. 2012, Garnero et al. 2013) a rizikem zlomenin (Arasu et al. 2012, Ardawi et al. 2012, Garnero et al. 2013) rozporuplná data. Při mechanickém zatížení skeletu klesá exprese sklerostinu (Robling et al. 2008, Moester et al. 2010). Sklerostin je ale produkován nejen osteocyty (Winkler et al. 2003), ale i buňkami jiných linií: chondrocyty a cementocyty (Moester et al. 2010, Chan et al. 2011), ale také v játrech, ledvinách a buňkami cévní stěny (Brunkow et al. 2001, Rhee et al. 2014). Naše práce u mladých dospělých pacientů s JIA a vysoce aktivním onemocněním prokázala pozitivní asociaci mezi sklerostinem a aktivitou onemocnění prezentovanou DAS 28 (nikoli hsCRP). U našich pacientů jsme však neprokázali

závislost mezi sklerostinem a parametry BMD, což bychom teoreticky očekávali, poněvadž sklerostin (spolu s Dkk-1) je významným inhibítozem osteoblastů a tedy tvorby nové kostní hmoty (Li et al. 2005, Diarra et al. 2007, Monroe et al. 2012). Zdrojem sérového sklerostinu u našich pacientů s JIA by mohly být nejen chondrocyty, ale i buňky subchondrální kosti. To je v soulase s nálezem ochranných účinků monoklonální protilátky proti sklerostinu na kost a chrupavku před zánětlivou destrukcí (Chen et al. 2013). Myšlenku možné tvorby sklerostinu buňkami subchondrální kosti a chondrocyty můžeme podpořit naším nálezem signifikantní asociace mezi sklerostinem a počtem bolestivých a oteklých kloubů, zatímco mezi sklerostinem a hsCRP, FW nebo Dkk-1 nebyla nalezena významná korelace.

Hodnoty Dkk-1 nebyly u pacientů s JIA bazálně zvýšené oproti zdravým kontrolám. Prokázali jsme však pozitivní korelaci mezi hodnotami Dkk1 a aktivitou onemocnění prezentovanou hsCRP. Tento vztah mezi Dkk-1 a hsCRP můžeme potvrdit nálezem významného poklesu obou markerů po 2 letech anti TNF α léčby u našich pacientů s JIA, obdobně jako u RA po terapii infliximabem (Wang et al. 2011). Jiné korelace mezi Dkk-1 a ostatními monitorovanými proměnnými nebyly nalezeny.

V naší práci jsme nenalezli signifikantní odlišnosti v koncentracích sRANKL, OPG a poměru sRANKL/OPG mezi JIA a zdravými osobami. Ani během léčby anti TNF α preparáty jsme nepozorovali žádné změny v koncentracích sRANKL, OPG a poměru sRANKL/OPG u pacientů s JIA oproti bazálním hodnotám. Ostatně i dosud známá data ohledně těchto markerů u JIA a RA a jejich změny během léčby anti TNF α inhibitory jsou rozporná.

Toto je první práce, která prokázala statisticky významnou korelaci mezi sklerostinem a počtem bolestivých a oteklých kloubů (nikoli s BMD) u JIA. Výše zmíněná data podporují hypotézu, že jsou to právě chondrocyty a buňky subchondrální kosti, které by mohly přispívat k tvorbě cirkulujícího sklerostinu. Signifikantní pokles sklerostinu po 1 roce anti TNF α léčby predikoval pokles DAS 28 pozorovaný s 1 ročním zpožděním po snížení sklerostinu.

5.3 Zvýšení BMD u pacientů s JIA po 1 roce léčby anti TNF α a přerušení léčby GCs

Za 1 rok léčby TNF α inhibitory u pacientů s JIA se signifikantně snížilo DAS 28 i hsCRP a zvýšilo BMD bederní páteře, celého těla a markerů kostní novotvorby P1NP. Nebyly nalezeny žádné signifikantní změny ani markeru kostní resorpce β CTX, ani osteokalcinu. Pozorovali jsme negativní korelaci mezi změnami DAS 28, hsCRP a P1NP. Navíc změna v koncentraci P1NP pozitivně korelovala se změnou BMD bederní páteře. Signifikantní zvýšení v koncentraci P1NP jsme zaznamenali pouze u pacientů, kteří během anti TNF α

terapie přerušili léčbu GCs. Můžeme vyvozovat, že díky anti TNF α léčbě může být zvýšení novotvorby kostní hmoty (vzrůst BMD i osteoformačního P1NP) vysvětleno přerušáním léčby GCs a to proto, že pacienti s největším snížením DAS 28 a hsCRP, tedy ti, co dosáhnou remise onemocnění, jsou nejpravděpodobněji ti, u kterých lze léčbu GCs ukončit.

5.4 Podání GCs rezultuje v rychlý pokles markerů aktivity osteoblastů a osteocytů (osteokalcin, P1NP, OPG, sklerostin) a nárůst markeru kostní resorpce (β CTX)

U 17 GCs naivních pacientů s různými diagnózami, pro které byla indikována systémová GCs terapie a kteří byli prospektivně sledováni 96 hodin, jsme prokázali během tohoto období signifikantní pokles v sérových koncentracích osteokalcinu, P1NP, OPG a sklerostinu a naopak významný nárůst β CTX a nesignifikantní zvýšení Dkk-1. Pokles osteokalcinu a P1NP je v soulase s předchozími studii u zdravých osob i pacientů léčených GCs (Sasaki et al. 2001, Dovoio et al. 2004). Navíc genová exprese osteokalcinu i P1NP je přímo downregulována GCs (Webster a Cidlowski 1999). Co se týče OPG, v liniích lidských osteoblastických buněk byl popsán inhibiční vliv dexametasonu na OPG, což podporuje naše pozorování poklesu OPG u pacientů po podání GCs in vivo.

Bezprostředně po podání GCs je snížení markerů kostní tvorby doprovázeno signifikantním poklesem sklerostinu. Gen pro sklerostin, který je antagonistou kostních morfogenetických proteinů nutných pro osteoblastogenezi a inhibítorem Wnt/ β cateninové signální kaskády osteoblastů, exprimují osteocyty (van Bezooijen et al. 2004). Sklerostin je negativním regulátorem diferenciaci osteoblastů, inhibuje proliferaci osteoblastů, stimuluje apoptózu osteoblastů a tlumí mineralizaci osteoblastických buněk (Li et al. 2005). Nedostatek sklerostinu u lidí má za následek vznik poruch s nadměrnou kostní hmotou jako Van Buchemova choroba (Balemans et al. 2001) a sklerosteóza (Brunkow et al. 2001). Podání antisklerostinových protilátek zvyšuje novotvorbu kosti u myši léčených GCs (Marenzana et al. 2011). Kromě vlivu sklerostinu na zvýšení apoptózy osteoblastů (Sutherland et al. 2004) bylo také zjištěno, že nadměrná exprese sklerostinu je u transgenních myši spojena se snížením kostní hmoty. V naší práci je signifikantní snížení sklerostinu asociováno nikoli se zvýšením, ale snížením markerů kostní novotvorby reflektující GCs indukovanou apoptózu osteocytů. To je v soulase se snížením sklerostinu u pacientů s endogenním hyperkortizolismem, kdy se při remisi koncentrace sklerostinu zvýší (van Lierop et al. 2012).

Za 24-48 hodin po podání GCs se zvýšily hodnoty markeru kostní resorpce β CTX. Odpovídá to výsledkům v jiných studiích (Dovoio et al. 2004, Szappanos et al. 2010).

Prokázali jsme také pozitivní korelaci mezi β CTX a dalším inhibítozem Wnt proteinů a kostní novotvorby, Dkk-1 po 96 hodinách od podání GCs. Prostřednictvím snížení formování a funkce osteoblastů může zvýšení Dkk-1 vést ke zvýšení na osteoblastech závislé osteoklastogeneze upregulováním RANKL a downregulováním OPG (Glass a Karsenty 2006). Exprese Dkk-1 v lidských osteoblastech a osteocytech je stimulována i GCs a může vést k na osteoblastech závislé osteoklastogenezi (Fujita a Janz 2007), apoptóze osteoblastů a snížení kostní hmoty (Ohnaka et al. 2004, Wang et al. 2008). Dkk-1 je sice vysoce exprimován osteocyty, avšak je tvořen i v několika jiných typech buněk, a jeho sérové koncentrace odrážejí zejména expresi Dkk-1 v kostním mikroprostředí.

Přestože jsme po podání GCs pozorovali trend ke zvýšení Dkk-1, můžeme vyvozovat, že signifikantní snížení v koncentracích sklerostinu, OPG a osteokalcinu pozorované v této práci může naznačovat rychlou GCs indukovanou apoptózu osteocytů.

6 ZÁVĚR

Naše výsledky prokázaly významnou souvislost mezi inhibítozem osteoblastů – sklerostinem – a parametry zánětu; navíc získaná data naznačují, že sklerostin mohou tvořit buňky subchondrální kosti a chondrocyty. Pokles sérové koncentrace sklerostinu během anti TNF α léčby předcházela poklesu komplexního ukazatele zánětu DAS 28. Nadto léčba TNF α blokátory je asociována se zvýšenou novotvorbou kostní hmoty a to zejména u pacientů, kteří ukončili léčbu GCs. Dále jsme dokumentovali důležitost svalové hmoty na formování kostní hmoty a negativní vliv GCs na kostní hmotu. Dle našich pozorování by GCs mohly být zodpovědné za rychlou apoptózu osteocytů; prokázali jsme jejich rychlý a signifikantní vliv na markery kostní remodelace.

U pacientů s vysokou aktivitou onemocnění JIA jsme potvrdili naši hypotézu snížené kostní novotvorby ve vztahu k zánětu a snížení inhibitorů kostní novotvorby vlivem anti TNF α léčby. Nebyla ale prokázána zvýšená resorpce kosti a během anti TNF α terapie ani změny v markerech resorpce.

Výsledky této práce ukazují, že sklerostin by mohl být vhodným doplněním laboratorního spektra u pacientů se zánětlivým onemocněním kloubů. Naproti tomu sérové markery remodelace kosti, které vypovídají o celotělové úrovni kostního metabolismu, nemusejí mít postačující výpověď pro hodnocení lokálního postižení kosti, např. subchondrální kosti u artritidy.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Amrein, K., S. Amrein, C. Drexler, H. P. Dimai, H. Dobnig, K. Pfeifer, A. Tomaschitz, T. R. Pieber and A. Fahrleitner-Pammer. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:148-154.
- Arasu, A., P. M. Cawthon, L. Y. Lui, T. P. Do, P. S. Arora, J. A. Cauley, K. E. Ensrud, S. R. Cummings and G. Study of Osteoporotic Fractures Research. Serum sclerostin and risk of hip fracture in older Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2027-2032.
- Ardawi, M. S., A. A. Rouzi, S. A. Al-Sibiani, N. S. Al-Senani, M. H. Qari and S. A. Mousa. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women: the Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *J Bone Miner Res* 2012;27:2592-2602.
- Balemans, W., M. Ebeling, N. Patel, E. Van Hul, P. Olson, M. Dioszegi, C. Lacza, W. Wuyts, J. Van Den Ende, P. Willems, A. F. Paes-Alves, S. Hill, M. Bueno, F. J. Ramos, P. Tacconi, F. G. Dikkers, C. Stratakis, K. Lindpaintner, B. Vickery, D. Foerzler and W. Van Hul. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001;10:537-543.
- Brunkow, M. E., J. C. Gardner, J. Van Ness, B. W. Paeper, B. R. Kovacevich, S. Proll, J. E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Y. Fu, R. S. Alisch, L. Gillett, T. Colbert, P. Tacconi, D. Galas, H. Hamersma, P. Beighton and J. Mulligan. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001;68:577-589.
- Diarra, D., M. Stolina, K. Polzer, J. Zwerina, M. S. Ominsky, D. Dwyer, A. Korb, J. Smolen, M. Hoffmann, C. Scheinecker, D. van der Heide, R. Landewe, D. Lacey, W. G. Richards and G. Schett. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13:156-163.
- Dovio, A., L. Perazzolo, G. Osella, M. Ventura, A. Termine, E. Milano, A. Bertolotto and A. Angeli. Immediate fall of bone formation and transient increase of bone resorption in the course of high-dose, short-term glucocorticoid therapy in young patients with multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4923-4928.
- Fajardo, R. J., R. K. Manoharan, R. S. Pearsall, M. V. Davies, T. Marvell, T. E. Monnell, J. A. Ucran, A. E. Pearsall, D. Khanzode, R. Kumar, K. W. Underwood, B. Roberts, J. Seehra and M. L. Bouxsein. Treatment with a soluble receptor for activin improves bone mass and structure in the axial and appendicular skeleton of female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Bone* 2010;46:64-71.
- Felin, E. M., S. Prahalad, E. W. Askew and L. J. Moyer-Mileur. Musculoskeletal abnormalities of the tibia in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:984-994.
- Fujita, K. and S. Janz. Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2-induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer* 2007;6:71.
- Garnero, P., E. Sornay-Rendu, F. Munoz, O. Borel and R. D. Chapurlat. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporos Int* 2013;24:489-494.
- Gilsanz, V., T. A. Wren, M. Sanchez, F. Dorey, S. Judex and C. Rubin. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res* 2006;21:1464-1474.
- Glass, D. A., 2nd and G. Karsenty. Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1068:117-130.
- Hanaoka, B. Y., C. A. Peterson, C. Horbinski and L. J. Crofford. Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:448-457.
- Chan, B. Y., E. S. Fuller, A. K. Russell, S. M. Smith, M. M. Smith, M. T. Jackson, M. A. Cake, R. A. Read, J. F. Bateman, P. N. Sambrook and C. B. Little. Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19:874-885.

- Chen, X. X., W. Baum, D. Dwyer, M. Stock, K. Schwabe, H. Z. Ke, M. Stolina, G. Schett and A. Bozec. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1732-1736.
- Kuipers, A. L., Y. Zhang, S. Yu, C. M. Kammerer, C. S. Nestlerode, Y. Chu, C. H. Bunker, A. L. Patrick, V. W. Wheeler, I. Miljkovic and J. M. Zmuda. Relative influence of heritability, environment and genetics on serum sclerostin. *Osteoporos Int* 2014;25:905-912.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris and D. Wu. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280:19883-19887.
- Lindehammar, H. and B. Lindvall. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:1546-1554.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305-311.
- Marenzana, M., K. Greenslade, A. Eddleston, R. Okoye, D. Marshall, A. Moore and M. K. Robinson. Sclerostin antibody treatment enhances bone strength but does not prevent growth retardation in young mice treated with dexamethasone. *Arthritis Rheum* 2011;63:2385-2395.
- Marenzana, M., A. Vugler, A. Moore and M. Robinson. Effect of sclerostin-neutralising antibody on periarticular and systemic bone in a murine model of rheumatoid arthritis: a microCT study. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R125.
- Modder, U. I., K. A. Hoey, S. Amin, L. K. McCready, S. J. Achenbach, B. L. Riggs, L. J. Melton, 3rd and S. Khosla. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res* 2011;26:373-379.
- Moester, M. J., S. E. Papapoulos, C. W. Lowik and R. L. van Bezooijen. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010;87:99-107.
- Mok, C. C., C. H. To and K. M. Ma. Changes in body composition after glucocorticoid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:1018-1022.
- Monroe, D. G., M. E. McGee-Lawrence, M. J. Oursler and J. J. Westendorf. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012;492:1-18.
- Natsui, K., K. Tanaka, M. Suda, A. Yasoda, Y. Sakuma, A. Ozasa, S. Ozaki and K. Nakao. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int* 2006;17:105-108.
- Ohnaka, K., H. Taniguchi, H. Kawate, H. Nawata and R. Takayanagi. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:259-264.
- Pavelka K, Vencovsky J: Recommendations of the Czech Society for Rheumatology for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ces Revmatol* 2010;18:182-191.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:457-465.
- Petty, R. E., T. R. Southwood, P. Manners, J. Baum, D. N. Glass, J. Goldenberg, X. He, J. Maldonado-Cocco, J. Orozco-Alcala, A. M. Prieur, M. E. Suarez-Almazor, P. Woo and R. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390-392.
- Polyzos, S. A., A. D. Anastasilakis, C. Bratengeier, W. Woloszczuk, A. Papatheodorou and E. Terpos. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporos Int* 2012;23:1171-1176.

- Rhee, Y., W. J. Kim, K. J. Han, S. K. Lim and S. H. Kim. Effect of liver dysfunction on circulating sclerostin. *J Bone Miner Metab* 2014;32:545-549.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldridge, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris and C. H. Turner. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008;283:5866-5875.
- Roth, J., C. Palm, I. Scheunemann, M. B. Ranke, R. Schweizer and G. E. Dannecker. Musculoskeletal abnormalities of the forearm in patients with juvenile idiopathic arthritis relate mainly to bone geometry. *Arthritis Rheum* 2004;50:1277-1285.
- Sasaki, N., E. Kusano, Y. Ando, K. Yano, E. Tsuda and Y. Asano. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:479-482.
- Schakman, O., M. Dehoux, S. Bouchuari, S. Delaere, P. Lause, N. Decroly, S. E. Shoelson and J. P. Thissen. Role of IGF-I and the TNFalpha/NF-kappaB pathway in the induction of muscle atrogens by acute inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E729-739.
- Stepan J, 1997, Osteoporóza v praxi, TRITON, Praha, 155s., ISBN: 80-85875-50-0.
- Sutherland, M. K., J. C. Geoghegan, C. Yu, E. Turcott, J. E. Skonier, D. G. Winkler and J. A. Latham. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004;35:828-835.
- Szappanos, A., J. Toke, D. Lippai, A. Patocs, P. Igaz, N. Szucs, L. Futo, E. Glaz, K. Racz and M. Toth. Bone turnover in patients with endogenous Cushing's syndrome before and after successful treatment. *Osteoporos Int* 2010;21:637-645.
- Tanida, A., Y. Kishimoto, T. Okano and H. Hagino. Etanercept Promotes Bone Formation via Suppression of Dickkopf-1 Expression in Rats with Collagen-Induced Arthritis. *Yonago Acta Med* 2013;56:13-19.
- van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, P. ten Dijke and C. W. Lowik. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004;199:805-814.
- van Lierop, A. H., A. W. van der Eerden, N. A. Hamdy, A. R. Hermus, M. den Heijer and S. E. Papapoulos. Circulating sclerostin levels are decreased in patients with endogenous hypercortisolism and increase after treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1953-1957.
- Vernikos, J. and V. S. Schneider. Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology* 2010;56:157-166.
- Wang, F. S., J. Y. Ko, D. W. Yeh, H. C. Ke and H. L. Wu. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* 2008;149:1793-1801.
- Wang, S. Y., Y. Y. Liu, H. Ye, J. P. Guo, R. Li, X. Liu and Z. G. Li. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:821-827.
- Webster, J. C. and J. A. Cidlowski. Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:396-402.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, J. C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J. E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B. R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M. E. Brunkow and J. A. Latham. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003;22:6267-6276.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace k tématu disertační práce:

S IF:

Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. The association between lean mass and bone mineral content in the high disease activity group of adult patients with juvenile idiopathic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:51. doi: 10.1186/1471-2474-15-51.

Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. Serum sclerostin in adult high-activity patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):460. [Epub ahead of print].

Brabnikova Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, Stepan JJ. Bone status in adults with early-onset juvenile idiopathic arthritis following 1-year anti-TNF α therapy and discontinuation of glucocorticoids. *Rheumatol Int.* 2013;33(8):2001-7.

Brabnikova Maresova K, Pavelka K, Stepan JJ. Acute effects of glucocorticoids on serum markers of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. *Calcif Tissue Int.* 2013;92(4):354-61.

Recenzované:

Brábníková Marešová K, Jarošová K, Štěpán J. Asociace mezi svalovou hmotou a zlomeninami u pacientů s anamnézou juvenilní idiopatické artritidy. *Česká revmatologie* 2010; 18(1): 12-18.

Další publikace:

S IF:

Maresova KB, Franek T, Vondracek T, Stepan JJ. A comparison of the acute effects of calcium and strontium ranelate on the serum marker of bone resorption. *Clin Chem Lab Med.* 2011;50(2):333-5.

Recenzované:

Brabnikova Maresova, K. Secondary osteoporosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Osteoporosis*, 2011. Přehledný článek byl publikován v mezinárodním

elektronickém časopise Journal of Osteoporosis, Volume 2011 (2011), Article ID 569417, 7 pages, doi:10.4061/2011/569417.

Brábníková Marešová K. Kostní hmota u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou. Osteologický bulletin 2010; 15(1): 18-25.

Skácelová S, Marešová K. Sekundární osteoporóza u revmatických chorob. Postgraduální medicína 2009, 11 (1):84-89.

Skácelová S, Vaculík J, Šimková G, Marešová K, Dungal P, Pavelka K, Štěpán J. Absolutní riziko osteoporotické zlomeniny kyčle u nemocných s frakturou kyčle. Ortopedie 2008; 3: 115-119.