

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

miRNA JAKO DIAGNOSTICKÉ MARKERY V REVMATOLOGII PO TERAPII GLUKOKORTIKOIDY

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Katarína Tripská

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú náležite citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa 31.8.2018

Podpis:

Pod'akovanie

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce prof. PharmDr. Petrovi Pávkovi, Ph.D. za jeho cenné poznatky, rady a pripomienky, ktorými mi bol nápomocný pri tvorbe tejto práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Katarína Tripská

Školiteľ: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Názov diplomovej práce: **miRNA jako diagnostické markery v revmatologii po terapii glukokortikoidy**

MikroRNA (miRNA) sú triedou nekódujúcich RNA, ktoré hrajú dôležitú úlohu v modulácií expresie mnohých génov na post-transkripčnej úrovni. Ich dysregulácia prispieva k mnohým ochoreniam imunitného systému, vrátane reumatóidnej artritídy, systemového lupusu erythematosus a systémovej sklerodermie.

Táto práca predstavuje zhrnutie doterajších poznatkov o funkcií miRNA v patogenéze týchto chorôb a výsledky boli získané pomocou preskúmania odbornej literatúry v biomedicínskej databáze PubMed.

Najprespektívnejšie sa u reumatóidnej artritídy javia miR-16, miR-21, miR-146a, miR-150 a miR-223. U lupusu svoje uplatnenie ako biomarkery pravdepodobne nájdu miR-148, miR-126, miR-21, miR-155, miR-125a a miR-146. Systémová sklerodermia je zatiaľ najmenej preskúmaná choroba z týchto troch a u nej sa zatiaľ najviac vie o miR-29.

Keďže oblasť výskumu miRNA ako diagnostických biomarkerov je zatiaľ stále len na začiatku, je pravdepodobné, že postupom času pribudnú ďalšie miRNA, ktoré nám pomôžu viac objasniť patogenézy jednotlivých chorôb a zároveň sa stanú bežnou súčasťou diagnostiky a možno neskôr aj klinickej praxe.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Katarína Tripská

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: **miRNAs as diagnostic markers after treatment with glucocorticoids in rheumatology**

MicroRNAs are important class of non-coding RNAs that play important role in modulation of expression of multiple genes at a post-transcriptional level. Their deregulation contributes to many immune disorders including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis.

This thesis represents the most recent knowledge about functions of microRNAs in pathogenesis of these disorders and results were obtained by review of scientific literature published on PubMed database.

The most perspective microRNAs in rheumatoid arthritis seem to be miR-16, miR-21, miR-146a, miR-150 a miR-223. In lupus miR-148, miR-126, miR-21, miR-155, miR-125a a miR-146 will probably find their useage as biomarkers. Systemic sclerosis is less examined diseases and we know most about miR-29 in the disease.

Since the research of microRNA as diagnostic biomarkers is only at the beginning, it is most likely, that with the time there will be more and more of new microRNAs helping us clarify pathogenesis of each disorder. We can suppose that these microRNAs will become common method of diagnostic and maybe later will even find their place at everyday clinical practice.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
1. Zoznam skratiek.....	8
2. Úvod a cieľ práce.....	10
3. Metodika práce	12
4. Teoretická časť.....	13
3.1 Reumatoidná artritída	13
3.1.1 Definícia a základné príznaky.....	13
3.1.2 Etiológia a patogenéza	13
3.1.3 Klinický obraz.....	14
3.1.4 Diagnostika	15
3.1.5 Terapia	16
3.2 Systémový lupus erythematoses	18
3.2.1 Definícia a základné príznaky.....	18
3.2.2 Etiológia a patogenéza	18
3.2.3 Klinický obraz.....	19
3.1.4 Diagnostika	21
3.2.5 Terapia	22
3.3 Systémová sklerodermia.....	24
3.3.1 Definícia a základné príznaky.....	24
3.3.2 Etiológia a patogenéza	24
3.3.3 Klinický obraz.....	25
3.3.4 Diagnostika	26
3.3.5 Terapia	27
3.4 MikroRNA.....	27

3.4.1	Definícia mikroRNA.....	27
3.4.2	Regulácia expresie mikroRNA	29
3.4.2.1	Zmeny v sekvencií DNA/RNA a regulácia mikroRNA	29
3.4.2.2	Regulácia transkripcie génov pre mikroRNA.....	30
3.4.2.3	Regulácia spracovania mikroRNA v jadre	30
3.4.2.4	Regulácia maturácie a funkcie mikroRNA v cytoplazme	32
3.4.3	Metódy detekcie mikroRNA.....	33
3.4.3.1	Northern blot.....	33
3.4.3.2	In situ hybridizácia.....	34
3.4.3.3	Kvantitatívna real-time PCR.....	34
3.4.3.4	Vysokokapacitné analýzy	34
3.4.4	MikroRNA ako biomarkery.....	36
3.4.4.1	Reumatóidna artritída	36
3.4.4.2	Systémový lupus erythematosus	39
3.4.4.3	Systémová sklerodermia	42
3.4.5	MikroRNA a glukokortikoidy	44
5.	Diskusia	45
6.	Záver	47
7.	Zoznam tabuliek	48
8.	Zoznam obrázkov	49
9.	Použitá literatúra	50

1. Zoznam skratiek

- 3'-UTR – 3' neprekladaná oblasť
- ACPA – protilátky proti cyklickému citrulinovému peptidu
- ACR – Americká reumatologická spoločnosť
- ADAR – gén kódujúci dvojreťazcovú RNA-špecifickú adenosín deaminázu
- Ago – rodina Argonautových proteínov
- BMP – kostný morfogenetický proteín
- CDK-2 – cyklín dependentná kináza 2
- cDNA – komplementárna DNA
- CR1 – komplementový receptor typu 1
- CTGF – faktor rastu spojivového tkaniva
- CTLA4 – cytotoxický –lymfocyt asociovaný proteín 4
- DGCR8 – gén kódujúci podjednotku mikroprocesorového komplexu
- DMARD – chorobu modifikujúce anireumatické lieky
- DNMT1/3b – DNA methyltransferáza 1/3b
- ECM – extracelulárna matrix
- eIF4 - eukaryotický iniciačný faktor 4
- ER α/β – estrogénne receptory α/β
- EULAR – Európska liga proti reumatizmu
- GK - glukokortikoid
- HLA – ľudský leukocytárny antigén
- hnRNP A1 – heterogénny jadrový ribonukleoproteín A1
- IFN – interferón
- IgG/M/A – imunoglobulín G/M/A
- IL-1/6/7/12 – interleukín 1/6/7/12
- IRAK1 – IL-1 receptor asociovaná kináza 1
- LN – lupusová nefritída
- MCP-1 – monocytový chemoatraktant 1
- mRNA – messengerová RNA
- miRISC – miRNA-induced silencing complex
- miRNA – mikro RNA
- MMP-1 – matrixová metaloproteináza 1
- NF- κ B - nukleárny faktor kappa B

NSA – nesteroidné antireumatika
p53 – nádorový proteín
p68/72 – RNA helikázy
PABP1 - proteíny viažúce sa na poly(A) koniec
PACT – dvojreťazcový RNA viažúci proteín
PAGE – polyakrylamidová gélová elektroforéza
PBMC – mononukleárne bunky periférnej krvi
PDCD4 – programmed cell death protein
PTPN22 – proteín tyrozín fosfatáza, nереceptorový typ 22
RA – reumatóidna artritída
RASf – synoviálne fibroblasty u reumatóidnej artritídy
RASGRP-1 – RAS guanyl uvoľňujúci proteín
RF – reumatóidny faktor
RT-PCR – kvantitatívna polymerázova reťazová reakcia
SF – synoviálne fibroblasty
SHIP-1 – Src homology 2-containing inositol phosphatase 1
SLE – systémový lupus erythematosus
SLICC – klasifikačné kritéria pre systémový lupus erythematosus
SNP – jednonukleotidový polymorfizmus
SSc – systémová sklerodermia
STAT-3/4 – signálový presnášač a aktivátor transkripcie 3/4
TCR – T bunkový receptor
TF – transkripčný faktor
TGF β – transformujúci rastový faktor β
TLR – toll like receptor
TNF – faktor nádorovej nekrózy
TRAF1/6 – TNF receptor asociovaný faktor 1/6
TRBP - the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein
TUT-4 – terminálna U transferáza 4
VEGF – vaskulárny endotelový rastový faktor
XIAP – X-viažúci proteín inhibujúci apoptózu
XPO5 – xportin 5

2. Úvod a cieľ práce

MikroRNA je skupina krátkych, nekódujúcich RNA, ktorá bola objavená roku 1993 skupinou vedenou dr. Ambrosom a jeho tímom. Od toho roku sme sa o miRNA veľa dozvedeli, napríklad akú úlohu zohrávajú v post-transkripčnej či epigenetickej regulácii, akým mechanizmom sprostredkujú utíšenie transkripcie génov do proteínov či aké ďalšie proteíny sú pre správnu funkciu miRNA potreba. No veľa zostáva aj neodhaleného.

Mnoho štúdií sa venovalo tejto problematike a bolo zistené, že pri rôznych chorobách dochádza k zmene expresného profilu miRNA, čo viedlo k záveru, že miRNA môžu prispievať k patogenéze jednotlivých ochorení. Medzi tieto ochorenia patrí okrem iného aj reumatóidna artritída, systémový lupus erythematosus či systémová sklerodermia (9) – (33).

Táto práca sa teda bude venovať jednotlivým autoimunitným ochoreniam spomínaným vyššie, so zameraním na ich patogénezu (kde je to možné) a terapiu glukokortikoidmi (1) – (7). Ďalšia časť bude sústredená na mikroRNA – ich definíciu, úlohu, spôsoby regulácie a detekcie (8). Posledná časť sa bude zaoberať konkrétnymi mikroRNA u jednotlivých ochorení - akú úlohu zohrávajú v ich patogenéze, ako sa menia ich hladiny v priebehu choroby a či by sa v budúcnosti mohli používať ako biomarkery pri diagnostike, prípadne či by sa mohli uplatniť ako nové terapeutické ciele u týchto ochorení (9) – (33). Spomenieme tiež jednonukleotidové polymorfizmy a ako môžu vplývať na expresiu miRNA a následne procesy s tým súvisiace (19)(27). Posledná časť sa venuje problematike glukokortikoidov a miRNA, a to konkrétne ako ich podávanie môže meniť hladiny miRNA v konkrétnych bunkách a tiež ako by poznanie tohto mechanizmu mohlo ovplyvniť pacientov trpiacich týmito a inými ochoreniami v budúcnosti (34).

Reumatóidna artritída, systémový lupus erythematosus a systémová sklerodermia sú v celku dobre prebádané ochorenia, no stále o nich nevieme všetko. Nepoznáme úplne presné mechanizmy patogenézy a teda nie v každom prípade sa nám darí liečiť príčinu choroby. Taktiež súčasne používanie liečiva nemajú vždy očakávaný efekt a variabilita vo výsledku u jednotlivých chorôb a pacientov je často vysoká. Práve miRNA poskytujú o niečo širšie pochopenie vzniku konkrétnych chorôb a predstavujú nádejne biomarkery, ktoré by v budúcnosti mohli pomôcť s rýchlejšou a presnejšou diagnostikou, ktorá je u týchto ochorení často veľmi dôležitá. Taktiež je možné, že by sa

dali použiť na sledovanie progresu choroby a monitoring terapie. V neposlednom rade by sa miRNA mohli uplatniť ako nové terapeutické ciele u určitej časti pacientov.

Cieľom tejto práce je teda zhrnúť doterajšie poznatky o mikroRNA ako celku a o ich využití ako pravdepodobných diagnostických a prognostických biomarkerov u reumatoídnej artritídy, systemového lupusu erythematosus a systémovej sklerodermie.

3. Metodika práce

Pri spisovaní tejto diplomovej práce som používala predovšetkým voľne dostupnú biomedicínsku databázu PubMed.

Informácie som hľadala podľa kombinácie nasledujúcich kľúčových slov za použitia booleovských operátorov AND a OR: miRNA, diagnostic biomarker, rheumatoid arthritis, lupus erythematosus, systemic sclerosis, rheumatology a autoimmunity.

V prvom rade som hľadala prehľadové články vybraním slova REVIEW v kolónke „article types“ za posledných 10 rokov. Pre jednotlivé kombinácie som našla nasledujúci počet odkazov:

- 23 odkazov pre kombináciu: miRNA AND diagnostic biomarker AND rheumatoid arthritis,
- 15 odkazov pre kombináciu: miRNA AND diagnostic biomarker AND lupus erythematosus,
- 12 odkazov pre kombináciu: miRNA AND diagnostic biomarker AND systemic sclerosis,
- 20 odkazov pre kombináciu: miRNA AND diagnostic biomarker AND rheumatology,
- 25 odkazov pre kombináciu: miRNA AND diagnostic biomarker AND autoimmunity.

Po preštudovaní abstraktov som si vybrala najlepšie prehľadové články pre naštudovanie problematiky mojej diplomovej práce.

Detailné informácie som pomocou databáze PubMed vyhľadávala rovnakým spôsobom, no bez použitia slova REVIEW.

4. Teoretická časť

3.1 Reumatoidná artritída

3.1.1 Definícia a základné príznaky

Reumatoidná artritída (RA) je chronické, autoimunitné, zápalové ochorenie, ktoré zasahuje hlavne synoviálnu výstelku kĺbov, šliach a mazových väčkov. Prejavuje sa chronickou polyartritídou a následným vznikom kĺbných deštrukcií (1). Kĺby sú opuchnuté a bolestivé v pokoji aj pri pohybe. Ráno po prebudení sú kĺby stuhnuté a tento stav môže trvať aj niekoľko hodín. U časti pacientov tiež narastajú v okolí kĺbov alebo vo vnútorných orgánoch reumatoidné uzly. V ťažších prípadoch sa objavujú známky vaskulitídy. Postihnuté sú hlavne malé kĺby na rukách a nohách. U väčšiny pacientov sú prítomné mimokĺbne i systémové príznaky (2).

RA sa vyskytuje takmer na celom svete. Prevalencia sa pohybuje v intervale od 0,3 do 2,1% s priemerom okolo 0,8%. Približne trikrát častejšie sú postihnuté ženy. Ochorenie sa začína prejavovať v štvrtej až piatej dekáde života. Častejšie sa vyskytuje u príbuzných I. stupňa, hlavne medzi matkou a dcérou alebo medzi ženskými súrodencami. Heritabilita sa pohybuje medzi 40 – 60% (1).

3.1.2 Etiológia a patogenéza

Pôvod tohto ochorenia nie je známy. Je však známe, že na udržiavanie chronického zápalu sa podieľajú B lymfocyty, T lymfocyty, makrofágy, synoviálne fibroblasty a neutrofilné leukocyty. Svoj podiel zohráva aj aktivita imunitného systému na periférii, ktorá je hlavnou príčinou mimokĺbných manifestácií RA (1).

Základným patologickým znakom tohto ochorenia je rast zápalového tkaniva vo vnútri kĺbu, ktorá svojím deštruktívnym pôsobením vyvoláva poškodenie chrupavky a následnú aktiváciu osteoklastov, ktorej dôsledkom je odbúravanie kosti a vznik typických prejavov RA (1).

Existuje určitá vrodená náchylnosť k RA. Najdlhšie je známy vzťah k polymorfizmu HLA-DRB1. Ďalšou molekulou, ktorá má vplyv na vznik RA je PTPN22, gén, ktorý kóduje proteínovú tyrosínfosfatázu špecifickú pre lymfoidné bunky. Tá ma za následok neschopnosť tlmiť niektoré vlastnosti T a B lymfocytov. Medzi ďalšie molekuly, ktoré sú asociované s RA patrí gén kódujúci TRAF-1, C5 komplement, CTLA-4 a STAT-4 (1).

Pre RA sú charakteristické sú reumatoidne faktory (RF) a protilátky proti citrulínovým peptidom (ACPA) (1).

RF je protilátka (väčšinou IgM, ale existujú aj IgG, IgA a IgE) proti Fc fragmentom IgG. Pre RA je dôležitá predovšetkým tvorba RF v kĺbnom tkanive. Tam vznikajú imunokomplexy, ktoré vedú k aktivácii komplementovej kaskády. Produkty aktivácie komplementu môžu vyvolať chemotaxiu makrofágov, neutrofilov a lymfocytov do kĺbnej dutiny. Tiež dochádza k spojeniu jednotlivých IgG RF a k vzniku tzv. vzájomne spojených imunokomplexov, ktoré majú výrazné patologické vlastnosti v synoviálnom tkanive (1).

ACPA protilátky sú vysoko špecifické pre RA. Dnes sa najčastejšie detekujú ako protilátky proti cyklickému citrulinovanému proteínu (anti-CCP), ale existujú ich viac druhov. Prítomnosť a množstvo ACPA protilátok je asociované so závažnejším vývojom choroby (1).

Prítomnosť cytokínov v reumatoidnom kĺbe prispieva k patologickým zmenám. Hlavný dôvod je nerovnováha medzi prozápalovými cytokínmi (TNF α , IL-6 a IL-17, RANKL a IL-1) a ich inhibítormi. Neutralizáciou týchto cytokínov je možné znížiť nežiaduce účinky ich nadprodukcie a tak prospešne pôsobiť na potlačenie zápalu (1).

3.1.3 Klinický obraz

Klinické prejavy RA u jednotlivých pacientov sa líšia. Menej časté sú prípady s ľahkou synovitídou a rannou stuhlosťou. Vo väčšine prípadov sa RA manifestuje ako závažná artritída s rýchlou deštrukciou kĺbov a mimokĺbnými príznakmi (3).

Medzi typické príznaky RA patrí ranná stuhlosť a bolestivosť zasiahnutých kĺbov, najčastejšie metakarpofalangeálnych, proximálne interfalangeálnych a radiokarpálnych kĺbov. Zasiahnutie väčších kĺbov naznačuje vážnejší priebeh ochorenia. Chronický zápal týchto kĺbov často vedie k deštrukcii kĺbov, vzniku deformít, obmedzeniu pohyblivosti až ankylóze (4).

Špecifickým prejavom mimokĺbných príznakov sú reumatoidné uzly, ktoré sa vyskytujú u 20 – 30% jedincov postihnutých touto chorobou, hlavne však u tých, ktorí vykazujú pozitivitu na RF (5). Sú to nebolestivé podkožné uzlíky s rôznou veľkosťou, vyskytujúce sa hlavne v okolí postihnutých kĺbov ale aj rôzne inde na tele (2).

Časté býva postihnutie svalov, ktoré môžu byť hypotrofické až atrofické a tiež u nich klesá svalová sila. Objavuje sa tiež tenosynovitída, hlavne v oblasti rúk a zápästí. Ruptúra šliach môže viesť až k vývoju deformít. V okolí kĺbov sa tiež objavuje burzitída (1).

Vyskytujú sa aj očné problémy, hlavne suchá keratokonjunktivitída. Ostatné očné manifestácie sú veľmi zriedkavé (4).

Reumatoidná vaskulitída sa objavuje v dvoch formách – neurologickej (prejavuje sa ako senzorická neuropatia) a kožnej (objavuje sa purpura, vredy či nekróza tkaniva) (2).

Pľúca bývajú postihnuté hlavne pleuritídou, menej čase sú difúzna pľúcna fibróza, reumatoídne uzlíky, Caplanov syndrom či obliterujúca bronchiolitída (4).

Najčastejším kardiálnym príznakom je perikarditída, no objaviť sa môžu aj choroby spôsobené následkom vaskulitídy, amyloidózy, valvulitídy a fibrózy (1).

U pacientov s RA sa tiež častejšie vyskytujú hemtologické abnormality, Feltyho syndróm a difúzna osteoporóza. Objaviť sa môže aj sekundárna amyloidóza, rôzne infekčné ochorenia či nádory (1).

3.1.4 Diagnostika

Kritéria z roku 1987 (1) neboli vhodné pre diagnostiku začínajúcich foriem choroby (pri ich tvorbe boli hodnotení pacienti s dlhým trvaním choroby) a preto boli vypracované nové klasifikačné kritéria, ktoré slúžia hlavne na identifikáciu pacientov s nediferencovanou zápalovou artritídou, predovšetkým tých, u ktorých je ochorenie len krátko (1).

Tieto kritéria sú založené na klinickej identifikácii synovitídy aspoň v jednom kĺbe, ktorej prítomnosť nie je možné vysvetliť iným ochorením. V tom prípade sa aplikuje skórovací systém, ktorý hodnotí parametre ako: počet postihnutých kĺbov, ich veľkosť, prítomnosť RF alebo ACPA, trvanie choroby, či prítomnosť zvýšených hladín proteínov akútnej fázy. Ochorenie je klasifikované ako RA, ak dosiahne skóre najmenej 6 bodov z 10 (1).

Tab. 1: Nové ACR/EULAR klasifikačné kritéria pre diagnózu reumatoídnej artritídy

Kĺby (0-5 bodov)	
1 stredný – veľký kĺb	0
2 – 10 stredných – veľkých kĺbov	1
1 – 3 malé kĺby rúk/nôh alebo zápästia	2
4 – 10 malých kĺbov rúk/nôh alebo zápästia	3
> 10 (aspoň 1 z rúk/nôh alebo zápästia)	
Sérológia (0–3 bodov)	
RF a ACPA oba negatívne	0
aspoň jeden z RF a ACPA nízko pozitívne	2
aspoň jeden z RF a ACPA vysoko pozitívne	3

Trvanie symptómov (0-1 bod)	
< 6 týždňov	0
≥ 6 týždňov	1
Reaktanty akútnej fázy (0-1 bod)	
normálne CRP a FW	0
abnormálne CRP a/alebo FW	1

Prevzaté z: Pavelka K. et al. *Revmatologie* (2012)

3.1.5 Terapia

Liečba má byť komplexná, zahrňujúca poučenie pacienta o povahe choroby, režimových opatreniach, ktoré by mal pacient dodržiavať, ďalej o fyzikálnej liečbe, rehabilitácii či užívaných liečivách a prípadne o možnosti chirurgickej liečby (4).

Farmakologická liečba zahrňuje nasledujúce skupiny liečiv:

Nesteroidné antireumatika – využívaný je protizápalový, analgetický i antipyretický účinok týchto látok. NSA blokujú cyklooxygenázu, ktorá premieňa kyselinu arachidonovú na zápalové prostaglandíny (3). Pri liečbe týmito látkami ide o liečbu symptomatickú – nepotlačujú aktivitu choroby, proteíny akútnej fázy ani progresiu RA (6). Používajú sa najmä diclofenac, ibuprofen, naproxen a ďalšie. NSA majú aj veľa nežiadúcich účinkov medzi ktoré patrí gastrotoxicita (hlavne vznik žalúdočných či duodenálnych vredov), porucha zrážania krvi, bronchospazmy, kardiovaskulárne a renálne riziko. V súčasnosti sa doporučuje podávanie čo najnižších efektívnych dávok NSA po čo najkratšiu potrebnú dobu (4).

Chorobu modifikujúce lieky reumatoídnej artritídy DMARDs – terapia DMARDs by mala byť zahájená v momente stanovenia diagnózy RA. Ak sa očakávaný efekt nedostaví do troch mesiacov, liečba by mala byť zmenená. Je možné zamenenie liečiva za iné DMARD alebo kombinácia s jedným ďalším DMARD, poprípade s glukokortikoidmi. Terapia je dlhodobá a mala by byť pravidelne kontrolovaná. Pri dlhodobej remisii je možné znížiť dávky alebo predĺžiť dávkovacie intervaly. Prvým podávaným DMARD by mal byť methotrexát (s kyselinou listovou 1 x za týždeň). V prípade kontraindikácií (KI) alebo neznášanlivosti je možné použiť leflunomid či sulfasalazin, v špecifických prípadoch aj hydroxychlorochin a cyklofosfamid (1). Liečba DMARDs je spojená s mnohými nežiaducimi účinkami ako myelotoxicita a hepatotoxicita (7).

Biologické liečivá sú indikované v prípade, že zlyhala liečba pomocou DMARDs. V tom prípade sa pridáva do kombinácie jeden z antagonistov TNF ako napríklad

etanercept, adalimumab či infliximab alebo jedno z ďalších biologických liečiv, konkrétne abatacept, rituximab, tocilizumab, tofacitinib alebo baricitinib. Táto liečba je tiež spätá s nežiaducimi účinkami, z ktorých najzávažnejší je zvýšený výskyt infekcií, ktorý môže spôsobiť aktiváciu latentnej TBC. Preto je dôležité pred zahájením biologickej liečby absolvovať vyšetrenia na túto chorobu a v prípade pozitivity preliečiť pacienta isoniazidom (2).

Podľa najnovších doporučení EULAR sú glukokortikoidy (GK) indikované súčasne s nasadením DMARDs alebo pri ich zmene. Zdôrazňuje sa krátkodobosť podania (do 3 a veľmi výnimočne do 6 mesiacov) a nie je definovaná dávka, pretože niekoľko klinických štúdií ukázalo prospech krátkodobo podávaných stredných dávok GK (7,5 – 30 mg prednisonu denne). Okrem rýchleho ovplyvnenia aktivity RA a premostenia doby do nástupu účinku DMARDs, má krátkodobá liečba GK aj tzv. štruktúru modifikujúci efekt a prispieva k spomaleniu progresie. Vo všeobecnosti by mala byť liečba čo najkratšia, v prípadoch kde nejde vysadiť GK úplne by nemalo byť prekročených 5 mg, ktoré pomáhajú udržiavať klinickú remisiu a zároveň zachovávajú prevahu potencionálneho prospechu nad nežiadúcimi účinkami, ktorých je u GK mnoho. Napriek tomu, že neexistujú priame štúdie dokazujúce vplyv intraartikulárneho podania na štruktúrnu progresiu, mal by byť tento prístup základom intenzívnej liečebnej stratégie. Cieľená intraartikulárna aplikácia GK je v potlačení zápalovej aktivity kĺbov účinnejšia než intramuskulárne podanie, vzhľadom k prevažne lokálnemu pôsobeniu je s nižším rizikom nežiadúcich účinkov a navyše v kombinácii s intenzívne vedenou konvenčnou liečbou vykazuje lepší klinický efekt (7). Intraartikulárne sa používa triamcinolón hexacetonid alebo betametazón. Dlhodobé podávanie GK môže mať početné nežiaduce prejavy a preto je dôležité pravidelné vyšetrenie kostnej denzity a tiež dostatočná suplementácia vápnikom (1500 mg) a vitamínom D (400-800 IU) (1).

U pacientov s nestlmitel'nou bolesťou alebo s výrazným obmedzením pohybu je indikovaná chirurgická liečba. Ako dočasné riešenie sa používa synovektómia (podanie aktívneho izotopu ytria do kĺbu, ktoré vedie k nekróze synoviálnej výstelky), ktorá však nevedie k zásadnému spomaleniu deštruktívneho procesu v danom kĺbe. Celkové náhrady kĺbov sa robia predovšetkým na bedrových a kolenných kĺboch, zriedkavejšie na ramenných či lakt'ových. V oblasti karpálnych kostí je niekedy je nutné pristúpiť k artrodéze, ktorá fixuje kĺb vo výhodnej polohe a tým odstraňuje bolesť (1).

3.2 Systémový lupus erythematoses

3.2.1 Definícia a základné príznaky

Systémový lupus erythematoses (SLE) je autoimunitné zápalové ochorenie postihujúce takmer všetky dôležité orgány tela, ale hlavne kožu, kĺby, kardiovaskulárny systém, obličky, centrálny nervový systém a pľúca. Je pre neho charakteristická hyperaktivita B-lymfocytov, ktorá vedie k tvorbe autoprotílátiek, prevažne orgánovo nešpecifických, ktoré môžu poškodzovať bunky priamo alebo môžu vytvárať cirkulujúce imunokomplexy, ktoré následne spôsobujú zápal v rôznych častiach tela (1) (4).

K častým prejavom akútneho vzplanutia SLE patrí horúčka, únava či úbytok na váhe. Pre chorobu je typické striedanie remisí a relapsov. SLE môže vyústiť až do zlyhania postihnutého orgánu a pre závažnú formu choroby je typická významná mortalita (1).

Výskyt SLE sa významne líši v závislosti na etnickom pôvode obyvateľstva a geografickej polohe. Prevalencia sa pohybuje od 36,2 u bielej rasy cez 90,6 (Ázia) až po 206/100 000 žien u obyvateľstva afrického pôvodu v oblasti Karibského mora (1).

SLE je asi desať až dvadsaťkrát častejšie u žien než u mužov. Väčšina pacientov je postihnutá chorobou vo veku 15 až 40 rokov. Vo vyššej vekovej kategórii rozdiely v počte postihnutých žien a mužov klesajú (1).

3.2.2 Etiológia a patogenéza

SLE je z hľadiska patogenézy orgánovo nešpecifickým autoimunitným ochorením. Jednotný mechanizmus etiopatogenézy SLE nie je známy. Na jej vzniku sa podieľa veľké množstvo faktorov a iba malá časť z nich je v súčasnosti uspokojivo popísaná. To vedie k predpokladom, že nejde o chorobnú jednotku, ale o syndróm (1).

Dedičné vplyvy bezpochyby zohrávajú úlohu v rozvoji SLE. Táto skutočnosť je podporovaná viacerými štúdiami, ktoré popísali zvýšenú incidenciu HLA-DR2, HLA-DR3 a HLA-DQw1 u rôznych etnických skupín so SLE. Lupus sa vyskytuje častejšie i u jednovaječných a dvojvaječných dvojčiat a v rodinách. Ďalej bola zistená tiež asociácia s vrodeným deficitom rôznych komponentov komplementového systému a množstvom ďalších génov, poprípade ich absenciou. Panuje však všeobecný konsenzus, že SLE je polygénne podmienená choroba a že prínos hereditárnych faktorov je veľmi komplexný. Súhrn genetických faktorov a vplyv vonkajších faktorov (viry – retroviry, herpetické viry či EBV alebo tiež ultrafialové svetlo) prispieva k manifestácii choroby (1).

Diskutuje sa tiež vplyv poruchy apoptózy, ktorá pravdepodobne súvisí s poruchou fagocytózy a často prítomnou deficienciou komplementu (C3, C4 a C1q), ktorý sa podieľa na odstraňovaní apoptického materiálu. Takto sú niektoré pôvodne vnutrobunkové epitopy fosfolipidov a nukleozómov vystavené pôsobeniu IS, čo vedie k vzniku autoreaktívnych buniek. To následne spôsobuje nadmernú tvorbu imunokomplexov, ktoré komplementovo deficitný organizmus nezvláda a dochádza tak k ich usadzovaniu v tkanive a rozvoju orgánového postihnutia. Takto zasiahnutí jedinci nie sú schopní reagovať patričnými mechanizmami v situácií so zvýšenou bunkovou apoptózou, ako sú napríklad vírusové infekcie (1).

Pozornosť je venovaná vplyvu pohlavných hormónov, hlavne estrogénu a prolaktínu, ktorého zvýšenie je prítomné až u jednej tretiny pacientov s SLE a ktorý nepochádza len z hypofýzy ale aj z mononukleárných buniek v periférnej krvi (1).

Choroba je charakteristická hyperfunkciou B lymfocytov, ktoré produkujú veľké množstvo orgánovo nešpecifických protilátok. Na začiatku ochorenia pravdepodobne prevláda polyklonálna aktivácia B lymfocytov, neskôr sa prejavuje autoantigénom stimulovaná expanzia a aktivácia. Autoreaktívne klony T lymfocytov sú za normálneho stavu eliminované niekoľkými cestami, no u SLE však táto eliminácia zlyháva (1).

Ďalšou typickou charakteristikou choroby je prítomnosť cirkulujúcich imunokomplexov, ktoré sa ukladajú v tkanivách, hlavne v cievnej stene. Ich depozícia vyvoláva kaskádu dejov, ktoré ústia až do tkanivového poškodenia. Štúdie u pacientov s geneticky kódovanou poruchou komplementového systému vedie k názoru, že u SLE má hlavnú rolu porucha odstraňovania imunokomplexov z organizmu. To sa zrejme deje redukciami počtu CR1 receptorov na erytrocytoch, ktoré sa fyziologických podmienok transportujú opsonizované komplexy do pečene a sleziny k ďalšiemu spracovaniu fagocytmi (1).

U pacientov s SLE existujú dve základné kategórie abnormalít v rámci komplementového systému. Na jednej strane ide o hypokomplementémiu (genetická – deficit C1q a získana) a na strane druhej o protilátky (proti C1q a C3) namierené proti jednotlivým proteínom komplementového systému (1).

3.2.3 Klinický obraz

Klinické prejavy SLE môžu byť buď celkové alebo lokalizované, ktoré vychádzajú zo zasiahnutia jednotlivých orgánov (5). Príznaky bývajú veľmi mnohotvárne, takže si ochorenie vyslúžilo názov „magna simulatrix“. Chorobu často doprevádza

neznášateľnosť slnečného žiarenia, vypadávanie vlasov ale tiež celkové kŕče či bolestivé zdurené uzlín. Zo subjektívnych príznakov sa prejavuje zvýšená unavenosť, nadmerné potenie, artralgia a myalgia. Pacienti prichádzajú k doktorovi pre pretrvávajúce vysoké hodnoty sedimentácie erytrocytov či nevysvetliteľnú pretrvávajúcu anémiu, leukopéniu alebo trombocytopeniu. Najčastejšími prvými príznakmi SLE sú artralgie až artritídy, charakteristický motýľový exantém na tvári, slabosť a unavenosť, horúčka nad 38°C, niekedy tiež úbytok na váhe až anorexia (3).

Kĺby – problémy spojené s postihnutím kĺbov bývajú prítomné až u 95% pacientov. Zahrňujú hlavne artralgie až polyartritídy, ktoré imitujú reumatoídnu artritídu. Na rozdiel od RA nedochádza k erozívnejmu poškodeniu skeletu a uvádza sa tiež zasiahnutie distálnych interfalangeálnych kĺbov bez údajov o rannej stuhlosti a bez prechodu do kĺbných ankylóz (3).

Koža – kožné zmeny môžu byť *nešpecifické a špecifické* a objavujú sa u 80% všetkých pacientov. *Nešpecifické* príznaky vznikajú na podklade predchádzajúceho poškodenia ciev a typickými príkladmi sú chronické kožné ulcerácie, periférne gangrény, Raynaudov fenomén, teleangiektázie či alopecia. *Zo špecifických* príznakov sa na začiatku ochorenia často objavuje *akútne* typ kožného postihnutia – motýľový erytém, ktorý sa nachádza na tvári, prechádza cez koreň nosa ale vynecháva nazolabiálne ryhy. Môže byť splývavý až difúzny alebo škvrnitý. Objavuje sa kedykoľvek v priebehu ochorenia, hlavne však pri exacerbáciách. *Subakútne* lupus sa prejavuje v podobe papulozného exantému na tvári, šiji a hornej časti trupu a nemá tendencie k tvorbe jaziev a vzniku atrofii. *Chronický (diskoidný)* sa najčastejšie vyskytuje na osvetlených častiach kože a dochádza pri ňom k hypopigmentáciám, atrofii a tvorbe jaziev (3).

Typickým prejavom SLE je fotosenzitivita kože - vyrážka vyvolaná vystavením slnečnému žiareniu. Nachádza sa hlavne na osvetlených častiach tela. Spektrum kožných prejavov SLE je veľmi široké, avšak pre diagnostiku má význam len motýľový erytém, subakútne lupus a diskoidný exantém (2).

Srdce – srdcečné poškodenie sa vyskytuje zhruba u 30 – 50% pacientov. Lupusová karditída zahŕňa perikarditídu, myokarditídu, endokarditídu, Libmanovú-Sacksovú endokarditídu a vaskulitické poškodenie koronárnych ciev. Pri perikarditíde býva prítomný perikardiálny výpotok s autoprotilátkami a imunitnými komplexmi (3).

Pľúca – medzi najčastejšie ochorenia patrí peluritída, u ktorej je možné preukázať autoprotilátky a imunitné komplexy. Z chorôb pľúcneho parenchýmu sa vyskytujú akútne lupusová pneumotitída, aleveolárna hemoragia alebo chronická difúzna intersticiálna

pneumotitída. Objavuje sa tiež pľúcna hypertenzia, ktorá pravdepodobne vzniká na podklade okluzíí rôzneho pôvodu (3).

Neuropsychiatrický SLE – príznaky sa objavujú hlavne v posledných štádiách choroby. Patrí medzi ne prevažne postihnutie mozgu a miechy, ktoré pravdepodobne vznikajú ako následok vaskulopatie a následného vzniku trombov a mikroinfarktových ložísk. Tiež sa prepokladá priamy vplyv antifosfolipidových autoprotílátok. Má dve formy: *neurologickú* – prejavuje sa epiparoxyzmami, mozgovými príhodami, pohybovými poruchami, nemigrenóznou bolesťou hlavy, transverzálnou myelitídou a neuropatiou. Pre *psychiatrickú* formu je typický organický mozgový syndróm, psychózy, psychoneurózy a neurokognitívne dysfunkcie (3).

Obličky – ochorenia obličiek patria medzi najčastejšie príčiny smrti u pacientov trpiacich SLE. Glomerulonefritídy môžu byť až v 10% prvým príznakom choroby. Objavujú sa v 2. a 3. dekáde života a v podstate ide o imunokomplexové ochorenie s lokalizáciou v obličkách. K základným príznakom poškodenia obličiek patrí teda proteinuria, tzv. aktívny močový syndróm (nálež erytrocytov alebo granulárnych valcov) a hypertenzia. Ďalej sa objavujú známky zlyhávania funkcie obličiek so zvýšenými hodnotami urey a kreatinínu a s poklesom glomerulárnej filtrácie (3).

Hematologické prejavy – často je prítomná anémia, ktorá je následkom buď zníženej tvorby alebo imunopatologickej hemolýzy. Ďalej sa vyskytujú leukopénie, lymfopénie a trombocytopénie, ktoré sú spôsobené autoprotílátkami. Objavuje sa tiež autoprotílátka zvaná lupusové antikoagulans, ktorá je jednou z antifosfolipidových protílátok . Druhým typom sú protílátky proti kardiolipinom (3).

U pacientov s SLE sa tiež často objavujú gastrointestinálne problémy a choroba môže tiež zasahovať oči (1).

3.1.4 Diagnostika

Stanovenie SLE je založené na typickom klinickom obraze a charakteristických laboratórnych nálezoch, patognomický diagnostický test známy nie je (2).

Pre diagnostiku lupusu boli navrhnuté klasifikačné kritéria ACR (1982, revidované 1997), ktoré však nie sú vhodné pre skoré štádia a neúplné formy ochorenia a preto boli pracovnou skupinou SLICC navrhnuté kritéria nové – viz Tab. 2, ktoré hodnotia viac parametrov a umožňujú tak diagnostiku širšieho spektra prípadov a aj skorších štádií ochorenia (2).

Tab. 2: Klasifikačné kritéria pre systémový lupus erythematosus

Klinické kritéria	<ol style="list-style-type: none"> 1. akútny kožný lupus 2. chronický kožný lupus 3. orálne alebo nazálne ulcerácie 4. alopecia netvoriaca jazvy 5. artritída 6. serozitída 7. renálne poruchy 8. neurologické poruchy 9. hemolytická anémia
Imunologické kritéria	<ol style="list-style-type: none"> 1. ANA 2. anti-dsDNA 3. anti-Sm 4. antifosfolipidové protilátky 5. zníženie komplementu 6. pozitívny priamy Coombsov test (ak nie je prítomná hemolytická anémia)

Prevzaté z: M., Olejárová. *Revmatológia v obrazoch* (2016)

Pre diagnózu SLE je treba splniť aspoň 4 kritéria, pričom aspoň jedno musí byť klinické a jedno imunologické (2).

Samozrejmosťou je vyšetrenie na autoprotiľátky, komplement, reaktanty akútnej fázy; hematologické vyšetrenia a ďalšie biochemické a bioptické metódy na potvrdenie choroby (1).

3.2.5 Terapia

Nesteroidné antireumatika sa u SLE používajú k symptomatickej liečbe bolesti kĺbov a prejavov artritídy a serozitídy. NÚ zahŕňajú hlavne gastrotoxicitu či interakcie s GK a warfarínom (7).

Antimalarika, hlavne hydroxychlorochin a chlorochin, aktívne stabilizujú lyzozomálne membrány, potlačujú chemotaxiu a migráciu polymorfonukleárov a zasahujú tiež do niektorých funkcií T a B lymfocytov. Sú nezastupiteľné pri terapii kožných foriem, ale aj u muskuloskeletálneho postihnutia a u miernejších serozitíd a ich indikácie sa v rámci lupusu stále rozširujú. Hydroxychlorochin sa podáva v dávke 200 mg 2 x denne po dobu 6 – 8 týždňov, potom sa dávka znižuje na jednu tabletu denne. Medzi hlavné NÚ patrí

gastrotoxicita, keratopatia a retinopatia. Preto je nutné vyšetrenie očnej ostrosti pred zahájením liečby a po začatí v 6 – 12 mesačných intervaloch (7).

Medzi lieky špecifickej terapie patria na prvom mieste glukokortikoidy, ktoré cez všetky úskalia ich používania sú často nevyhnutné a život zachraňujúce. U pacientov s nízkou aktivitou choroby si vystačíme s dávkou 0,5 mg/kg/deň, pri vysokej aktivite potom 1 mg/kg/deň. Pri veľmi ťažkých stavoch sa tiež osvedčuje tzv. pulzný typ liečby s aplikáciou vysokých dávok (1000 mg) kortikoidov intravenózne v 3 – 5 pulzoch. Podávanie vysokých dávok GK by malo byť časovo obmedzené na 6 – 8 týždňov. Po dosiahnutí ústupu choroby je potrebné dávku postupne redukovať na najnižšiu možnú úroveň a pokúsiť sa o jej vysadenie. Je totižto treba myslieť na nežiadúce účinky GK, ktoré zahrňajú útlm činnosti nadobličiek pri dlhodobom podávaní, vývoj iatrogenného hyperkortizolizmu, osteoporózy, myopatie, poruchy glukózovej tolerancie či steroidného diabetu, glaukomu, vredovej choroby gastroduodena či pankreatitídy (7).

Azathioprin je používaný pri aktívnych formách lupusu s orgánovým postihnutím, udržaní remisie navodenej cyklofosfamidom alebo na zníženie dávok GK. Cyklofosfamid predstavuje v súčasnosti štandardnú terapiu aktívneho SLE s prítomnosťou lupusovej nefritídy III. a IV. typu, vaskulitídy, rezistentnej trombocytopenie či postihnutie CNS. Mykofenolát je liekom doporučovaným pre indukčnú i udržiavacu liečbu proliferatívnych a membranóznych foriem lupusovej nefritídy. Cyklosporín A sa najčastejšie užíva v liečbe nefrotických syndrómov u V. typu lupusovej nefritídy, či ako alternatíva cyklofosfamidu pri jeho netolerancii. U takrolimusu existujú údaje, že účinkuje na kožnú chorobu u chorých nereagujúcich na cyklofosfamid a cyklosporín. Methotrexát predstavuje alternatívu antimalarik u dominantného zasiahnutia kože, synovie, serózných blán a u foriem doprevádzaných pyretickou reakciou (7).

V rámci terapie SLE sa využívajú aj intravenózne imunoglobulíny, leflunomid, dapsón a dehydroepiandrosteron. Používajú sa výnimočne a u špecifických typov SLE (7).

Heparin, nízkomolekulárne heparíny, kumarínové deriváty a kyselina acetylsalicylová patria medzi základné prípravky používané v terapii antifosfolipidového syndrómu, ktorý sa častokrát v rámci SLE vyskytuje (7).

Z biologických liečiv sa využíva rituximab, ktorý je zatiaľ vyhradený refraktérnym formám lupusu s nefritídou, u ktorých zlyhala terapia cyklofosfamidom a/alebo mykofenolátom. Belimumab bol registrovaný ako prídavná liečba u dospelých pacientov s aktívnym SLE s pozitívnymi autoprotilátkami a vysokým stupňom aktivity choroby (7).

Pri vysoko aktívnej chorobe je možné na zahájenie liečby použiť plazmaferézu. Chirurgická splenektómia je alternatívou u závažných, na liečbu nereagujúcich cytopénií. V určitých prípadoch sa tiež využívajú experimentálne metódy ako extrakorporálna fotochemoterapia či imunoadsorpcia. V terminálnych štádiách sa uplatňuje dialýza alebo transplantácia obličiek (7).

Dlhodobé prežívanie pacientov so SLE je závislé na rozsahu a závažnosti postihnutia životne dôležitých orgánov. V posledných rokoch došlo k jeho významnému predĺženiu, za ktorý je zodpovedný pokrok v poznávaní imunopatologických mechanizmov spolu so zlepšením liečebných možností. Ďalšie zlepšenie je možné očakávať od novších molekúl určených pre ciele terapiu (4).

3.3 Systémová sklerodermia

3.3.1 Definícia a základné príznaky

Systémová sklerodermia (SSc) je systémové autoimunitné ochorenie spojivového tkaniva postihujúce najmä kožu, pohybový systém a vnútorné orgány. Vplyvom špecifických autoprotílátiek dochádza k fibrotickej sklerotizácii periférnych a viscerálnych ciev (3). Vyskytuje sa vzácne, s prevalenciou 120 – 250 na jeden milión obyvateľov, 4x častejšie postihuje ženy a najčastejšie začína v strednom alebo staršom veku (2).

3.3.2 Etiológia a patogenéza

Etiológia nie je známa, ale generalizovaný charakter a podobnosť zmien nasvedčuje tomu, že významnú úlohu zohrávajú genetické faktory, špecifické a nešpecifické autoprotílátky (proti DNA-topoizomerase I, proti metaloproteinázam a antiendoteliálne protílátky) a ďalej endotélie, fibroblasty, bunky hladkého svalstva, lymfocyty, monocyty, eozinofily a mastocyty. Interakcia medzi týmito bunkami a extracelulárnou matrix (ECM) je buď priama, alebo sprostredkovaná cytokínmi a ich receptormi. Výsledkom týchto interakcií je aktivácia fibroblastov, ktorá vedie k zvýšenej proliferácii a syntéze zložiek medzibunkovej hmoty (1).

Existuje však aj časť chorých, u ktorých je sklerodermia spôsobená niektorými toxickými látkami (kremík a jeho zlúčeniny, alifatické a aromatické uhľovodíky, biogénne amíny, toxické oleje,...) alebo liekmi (L-5-hydroxytryptofan, pentazocin, karbidopa, fenfluramin) (3).

3.3.3 Klinický obraz

Sklerodermia je heterogénne ochorenie, hlavne v počiatkových štádiach, priebehu a rozsahu postihnutia (1).

Cievne zmeny – radí sa tu Raynaudov fenomén, ktorý je charakteristický farbenými zmenami akrálnych oblastí od bielej až po fialovú. Objavuje sa na prstoch, ušiach, nose a jazyku. Vzniká aj štrukturálne zúženie ciev až úplný uzáver. Jeho vplyvom môže dôjsť až ku vzniku ulcerácií a niekedy aj gangrény. Raynaudov fenomén vo vnútorných orgánoch (pľúca, srdce, obličky) zhoršuje väzivové zmeny artérií. Postihnutie veľkých a stredných ciev je vzácne (1).

Kožné postihnutie – následkom zápalového procesu je tuhnutie a zhrubnutie kože. Najprv sa objavujú edematózne zmeny na prstoch horných končatín (vnímané ako artralgia a stuhlosť), predlaktiach a tvári. Neskôr nasleduje sklerodermatické zhrubnutie, kedy je pokožka tuhá, lesklá, napnutá a strácajú sa adnexa. Tvár nadobúda maskovitý vzhľad a objavujú sa radiálne ryhy okolo úst. Po niekoľkých rokoch prichádza atrofická fáza, kedy kože mäkne, je atrofická a dá sa na nej vytvoriť riasa (1).

Systémové prejavy – objavujú sa ako chudnutie, unavenosť a reaktívne depresie. Časté sú poruchy GIT, hlavne nedostatočnosť dolného pažerákového zvierača, ktorý spôsobuje regurgitáciu či pálenie žáhy. Môže sa objaviť aj erozívna ezofagitída či krvácanie. Postihnutie žalúdka väčšinou býva asymptomatické. Postihnutie tenkého čreva sa prejavuje nadúvaním, kŕčmi, diarrhoeou či malabsorpciou. Zasiachnutie pľúc je charakteristické dušnosťou a suchým kašľom a býva hlavnou príčinou smrti. U jedincov s pľúcnou fibrózou sa objavujú inspiračné fenomény a ak dôjde k rozvoji pľúcnej hypertenzie, môže sa objaviť aj cor pulmonale. Postihnutie myokardu sa prejavuje nevykonnosťou, palpitáciami a dušnosťou. Zasiachnutie obličiek sa vyznačuje príznakmi akcelerovanej hypertenzie niekedy vedúcej až k renálnej insuficiencii – tzv. sklerodermickej renálnej kríze. K neurologickým prejavom patrí syndróm karpálneho tunela a periférne neuropatie senzomotorického typu. Asi u štvrtiny pacientov sa objavuje sekundárny Sjorgenov syndróm s výrazným postihnutím slinných žliaz. Časté sú tiež poruchy erekcie, fertilita pacientok je mierne nižšia a častejšie sa vyskytujú spontánne potraty a predčasné pôrody (1).

Pri laboratórnych vyšetreniach je detekovaná anémia a trombocytopenia. Reaktanty akútnej fázy bývajú mierne zvýšené. Zisťujú sa aj reumatoídne faktory a kryoglobulíny,

cirkulujúce imunitné komplexy, antinukleárnej protilátky, anticentromerové protilátky či protilátky proti topoizomerase I. Všetky sú viac či menej špecifické pre SSc (1).

3.3.4 Diagnostika

Stanovenie diagnózy vyplýva z klinického obrazu – kožné postihnutie, Raynaudov fenomén, orgánové zmeny, preukázanie špecifických protilátok a ďalších vyšetrení (1).

Pre definitívne stanovenie diagnózy je možné použiť nové klasifikačné kritéria ACR/EULAR – viz. Tab. 3 (7).

Tab. 3: Klasifikačné kritéria pre systémovú sklerodermiu

Zhrubnutie kože na oboch rukách proximálne od metakarpofalangeálnych kĺbov		9
Zhrubnutie kože prstov (započítat' vyššie skóre)	difúzne edémy prstov	2
	sklerodaktylia prstov (distálne od metakarpofalangeálnych kĺbov a proximálne od interfalangeálnych kĺbov)	4
Lézie na konci prstov	Digitálne ulcerácie	2
	Jamkovité jazvičky	3
Teleangiektázia		2
Abnormálne kapilaroskopie nechtového valu		2
Pľúcna arteriálna hypertenzia alebo intersticiálne pľúcne postihnutie (max skóre je 2)	Pľúcna arteriálna hypertenzia	2
	Intersticiálne pľúcne postihnutie	2
Raynaudov fenomén		3
Autoprotilátky asociované so systémovou sklerodermiou	<ul style="list-style-type: none"> • anticentromerové • proti topoizomerase I • proti RNA-polymeráze 	3

Prevzaté z: Pavelka K. et al. *Farmakoterapie revmatických onemocnění* (2017)

Finálne skóre určuje súčet najvyšších hodnôt z každého príznaku. Skóre ≥ 9 značí definitívnu diagnózu sklerodermie. Kritéria nie je možné použiť u pacientov so zhrubnutím kože mimo prsty rúk alebo u chorých s inými chorobami podobnými sklerodermií, ktoré tieto klinické prejavy lepšie alebo plne vysvetľujú (7).

3.3.5 Terapia

Základom komplexnej liečby sú vždy režimové opatrenia zahrňujúce zákaz fajčenia, prácu a pobyt v prašnom prostredí a vylúčenie kontaktu s toxickými látkami a exogénnymi vplyvmi uvedenými v Tab. 4 (1).

Tab. 4: Exogénne vplyvy, lieky a chem. látky vyvolávajúce pseudoskleroderm. stavy

Oxid kremičitý	Anilín	Kokaín
Silikón	amfetamín	isoniazid
Vinylchlorid	mazindol	Vitamín K
Organické rozpúšťadla	bleomycin	RTG žiarenie
L-tryptofan	pentazocín	vibrácie

Prevzaté z: Pavelka K. et al. *Farmakoterapie revmatických onemocnění* (2017)

Doposiaľ boli vyskúšané rôzne preparáty, no so žiadnym presvedčivým účinkom. Ovplyvniť základný proces sa zatiaľ nedarí. Najčastejšie boli podávané glukokortikoidy a rôzne imunosupresíva (cyklofosfamid, methotrexát, mykofenolát). Novšou a nádejnejšou metódou je autológna transplantácia kmeňových buniek. Plazmaferéza a fotoforéza priaznivo pôsobia na kožnú zložku choroby. Tiež sa využíva indukcia orálnej tolerancie ku kolagénu typu I. Úspešnejšia ale väčšinou býva symptomatická liečba, napr. renálnej krízy pomocou ACE inhibítorov alebo Raynaudového fenoménu blokátormi kalciového kanálu. Z biologík sa využíva rituximab, ktorý pôsobí na zasiahnuté pľúca (1).

Určenie prognózy býva často veľmi obtiažne. Prognóza je daná hlavne závažnosťou a rýchlosťou zmien v pľúcach a obličkách. 85% pacientov prežíva 10 a viac rokov. K prognosticky nepriaznivým faktorom patrí: mužské pohlavie, kožne difúzna forma, vek nad 65 rokov, pokles renálnych funkcií, zasiahnutie viscerálnych orgánov, anémia a trombocytopenia (1).

3.4 MikroRNA

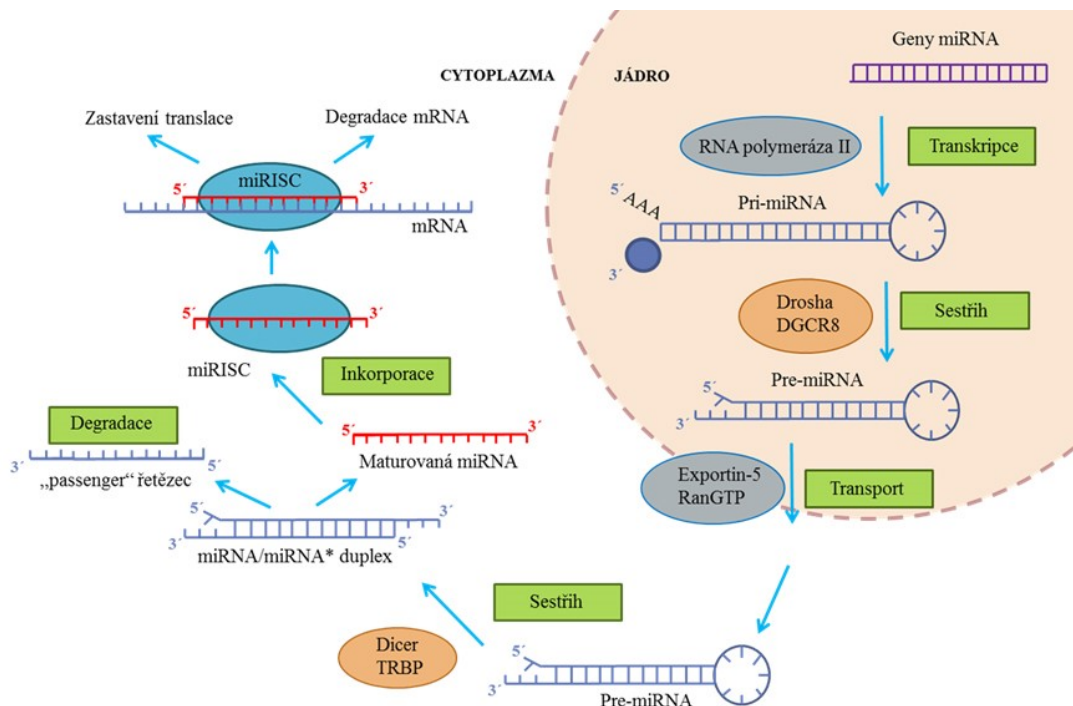
3.4.1 Definícia mikroRNA

MikroRNA, jeden z druhov nekódujúcich RNA, sú krátke 21 – 23 nukleotidov dlhé jednoretazcové RNA, ktoré vznikajú prepisom ich génov pomocou RNA polymerázy II do primárnych transkriptov (pri-miRNA) a tie sú ďalej zostrihované na 70 nukleotidov dlhé vlásenkové štruktúry pre-miRNA. Následne sú transportované do cytoplazmy

pomocou transportného proteínu Exportin 5 (XPO5). Tam su pre-miRNA spracované do podoby maturovaných miRNA (8).

Ich úlohou je post-transkripčná regulácia génovej expzie niektorých mRNA. Tá prebieha väzbou miRNA na 3' konci neprekladanej oblasti (3' UTR) mRNA. Takto „označené“ mRNA sú v organizme buď utlmené alebo úplne degradované. Týmto spôsobom miRNA kontrolujú fyziologické aj patologické procesy v organizme. (9)

Napriek tomu, že samy sú regulátory, podliehajú zložitému systému regulácií, ktorý prebieha ako na úrovni ich metabolizmu, tak aj pri realizácii ich vlastnej regulačnej funkcie. Poruchy v týchto reguláciách môžu viesť k patogeneze rôznych ochorení (8).



Obr. 1 Biogenézy mikroRNA. Prekurzor miRNA (pri-miRNA) je prepísaný z genomickej DNA RNA polymerázou II. Pomocou Drosha a DGCR8 komplexu je pri-miRNA zostrihnutá na vlásenkovú pre-miRNA, ktorá je v ďalšom kroku transportovaná do cytoplazmy pomocou komplexu Exportin 5. V cytoplazme vyhládaná komplexom Dicer, ktorý zostrihne pre-miRNA na krátke duplexy RNA:RNA. Jeden z reťazcov duplexu je degradovaný a druhý je naviazaný do komplexu RISC.

Prevzaté z: V. Vlahová et al. *MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství* (2014)

Aby mohla byť krátka RNA označená ako miRNA musí spĺňovať nasledujúce kritéria:

- musí byť jednoznačne detekovateľná pomocou northern blotu, RT-PCR alebo inej štandardnej metódy umožňujúcej detekciu RNA,
- musí sa vyskytovať v kmeňovej časti pre-miRNA,
- sekvencia krátkej RNA a jej prekursoru musí byť fylogeneticky konzervovaná (s výnimkou druhovo špecifických miRNA),
- inhibícia kľúčových ribonukleáz v biogenéze miRNA musí viesť k poklesu hladín krátkej RNA a k akumulácii jej prekursorovej štruktúry (8).

Názvy sú pridelované konkrétnym experimentálne validovaným miRNA predtým, než je ich objav publikovaný. Predpona „mir“ je nasledovaná pomlčkou a číslom, ktoré väčšinou zodpovedá poradiu, v ktorom boli objavené. Označenie „mir“ bez veľkého písmena „R“ znamená pre-miRNA, zatiaľ čo „miR“ s veľkým písmenom „R“ symbolizuje maturovanú formu miRNA. MiRNA líšiac sa v jednom či dvoch nukleotidoch sú charakteristické pridaným malým písmenom za posledné číslo. Pre-miRNA, z ktorých vznikajú identické miRNA, ale ktorých gény sú lokalizované na iných miestach genómu sa na konci označujú ďalšou pomlčkou a číselnou príponou. Pre označenie živočíšneho druhu z ktorého daná miRNA pochádza sa použije trojpísmenová predpona nasledovaná pomlčkou. V prípade že dve maturované miRNA pochádzajú z protichodných reťazcov jednej pre-miRNA, tak sú na konci označené príponou -3p alebo -5p. Označenie hviezdičkou indikuje miRNA exprimovanú v nižších hladinách ako miRNA pochádzajúca z vlásenkovej pre-miRNA (8).

3.4.2 Regulácia expície mikroRNA

3.4.2.1 Zmeny v sekvenciách DNA/RNA a regulácia mikroRNA

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) v génoch kódujúcich miRNA môžu ovplyvňovať nielen biogenetickú dráhu a následne zvýšené alebo znížené hladiny miRNA (zmena v účinnosti väzby komplexu Dorsha/DGCR8 či v afinite k transportnému proteínu Exportin-5 alebo k ribonukleáze Dicer), ale tiež ich funkčnosť zmenou preferencie reťazcov pre miRISC komplex (polymorfizmus T/G v géne pre určité miRNA) (8).

Pri editácii pri-miRNA pomocou adenosin deamináz pôsobiacich na RNA (ADAR) dochádza k modifikácii adenosínu na inozín. Pretože inozín má podobné párovacie vlastnosti ako guanosín môže dôjsť k zmene v sekvenciách prekursorových štruktúr miRNA

a v konečnom dôsledku to môže vplývať na ich maturáciu (skrz pozmenenú citlivosť k ribonukleázam Drosha a Dicer), export z jadra a ich väzbu na cieľové mRNA (8).

3.4.2.2 Regulácia transkripcie génov pre mikroRNA

Prítomnosť CpG ostrovov, TATA box sekvencií, iniciačných elementov a niektorých histonových modifikácií naznačuje, že promotorové oblasti génov pre miRNA budú kontrolované transkripčnými faktormi (TF), enhancermi, tlmiacimi elementmi, metyláciou alebo chromaťínovými modifikáciami tak, ako je to aj u kódujúcich génov. Tie sú do pri-miRNA prepisované ako RNA polymerázou II, tak aj RNA polymerázou III (8).

Regulácia transkripcie pomocou TF:

- MYC a MYCN – stimulujú expresiu onkogenného klastru miR-17-92 a súčasne inhibujú expresiu niektorých nádor supresorových miRNA,
- nádorový supresor p53 stimuluje expresiu mnohých miRNA, ktoré sa významne podieľajú na zástave bunkového cyklu a apoptóze (8).

Epigenetická regulácia cestou metylácie promótorových oblasti miRNA génov je častým javom u malígnej transformácie. Zabezpečujú ju DNMT1 a DNMT3b DNA metyltransferázy, na ktorých prítomnosti závisí transkripcia niektorých miRNA (8).

3.4.2.3 Regulácia spracovania mikroRNA v jadre

Drosha a DGCR8, dve komponenty mikroprocesorového komplexu fungujú kooperatívne a navzájom sa regulujú. Ich hladina a aktivita je tiež regulovaná celkovým množstvom miRNA. DGCR8 má stabilizačný efekt na ribonukleázu Drosha, zatiaľ čo Drosha negatívnou spätnou väzbou redukuje hladiny DGCR8 v prípade, že aktivita mikroprocesorového komplexu je dostatočná (8).

Helikázy p68 a p72 sú komponenty mikroprocesorového komplexu, v ktorom stimulujú spracovanie až jednej tretiny pri-miRNA. V bunkách s inaktivovanými génmi pre tieto helikázy sú normálne hladiny pri-miRNA, ale hladiny pre-miRNA sú signifikantne znížené ako následok zníženej väzby nukleázy Drosha a pri-miRNA. Niektoré bunkové signalizácie využívajú prepojenie p68 a p72 s mikroprocesorom na zasiahnutie do spracovania pri-miRNA. Napríklad interakcia Drosha s nádorovým supresorom p53 je realizovaná práve cez p68 a takto stimuluje spracovanie nádorovo supresorových pri-miRNA ako odpoveď na poškodenie DNA v nádorových bunkách (8).

Rodina intracelulárnych proteínov Smad, ktoré sú hlavnými prenášačmi signálu v rámci TGF β a BMP (proteín spojený s kostnou prestavbou) signalizácie, reguluje génovu expresiu na úrovni transkripcie, ale tiež kontroluje spracovanie pri-miRNA v rámci mikroprocesorového komplexu. Proteíny Smad sú prítomne spolu s Drosha a p68 v komplexe s niektorými pri-miRNA a zvyšujú tak rýchlosť jeho štiepenia. To vedie k akumuláciám maturovaných miRNA, čo sa zase môže viesť k rôznym fyziologickým zmenám (8).

Estrogény sú známe regulátory transkripcie viažúce sa na špecifické jadrové receptory ER α a ER β . Bola popísaná interakcia medzi ER α a helikázami p68 a p72. Utlmenie signalizácie ER α viedlo k významným zmenám v profile miRNA. Údaje popisujúce inhibičný vplyv ER α na biogénu špecifickej skupiny miRNA poskytujú nový pohľad na molekulárne mechanizmy stojace za patogenézou estrogén-pozitívneho karcinómu pľúc (8).

Štiepenie pomocou Drosha môže byť regulované tiež pre jednotlivé miRNA. Heterogénny jadrový ribonukleoproteín A1 (hnRNP A1) sa špecificky viaže na vlásenkovú štruktúru pri-miR-18a a zosilňuje jej spracovanie. Strata hnRNP A1 vedie k významnému zníženiu hladín miR-18a, ale súčasne neovplyvní hladiny ďalších piatich miRNA, ktoré sú súčasťou rovnakého klastru. HnRNP A1 sa naviaže na vlásenku pri-miR-18a a zmení jej konformáciu tak, že viac sprístupní miesto pre štiepenie nukleázou Drosha (8).

RNA-väzbový proteín LIN28 je najlepšie preskúmaný regulátor biogenézy miRNA let-7. Spracovanie let-7 zlyháva v dôsledku väzby LIN28 na vlásenku pri-let-7, ktorá vedie k znemožneniu štiepenia prostredníctvom Drosha. Väzba LIN28 na pre-let-7 blokuje tiež štiepenie pomocou Dicer. LIN28 navyše indukuje polyurydyláciu na 3' konci pomocou terminálnej U transferázy (TUT4). To nielenže bráni štiepeniu ribonukleázou Dicer, ale vedie tiež priamo k jej degradácii. Utlmenie maturácie let-7 cestou LIN28 je zásadné pre schopnosť sebaobnovy embryonálnych kmeňových buniek a pre blokovanie ich diferenciácie. V priebehu diferenciácie hladiny LIN28 klesajú, zatiaľ čo expresia let-7 stúpa. Let-7 funguje ako nádorový supresor, pretože medzi jeho cieľmi je veľa onkogénov. Blokováním let-7 sa LIN28 chová ako onkogén. Aktivácia LIN28 bola pozorovaná u mnoho ľudských nádorov (8).

3.4.2.4 *Regulácia maturácie a funkcie mikroRNA v cytoplazme*

Multiproteínový komplex miRISC je efektorom regulačnej dráhy miRNA a obsahuje maturovanú jednoreťazcovú miRNA, ktorá vedie komplex ku komplementárnej mRNA. Spracovanie a skladanie miRISC v cytoplazme je regulované pomocou „zavádzajúceho komplexu miRISC“. Tento komplex je tvorený nukleázou Dicer, proteínmi TRBP a PACT viažucimi RNA, ktoré síce nie sú k štiepeniu nevyhnutné, ale zosilňujú. Dôležitou súčasťou je aj rodina Argonautových proteínov (AGO), ktoré sú zásadné pretože vykonávajú vlastnú funkciu komplexu miRISC na cieľovej mRNA. Táto rodina proteínov má štyroch členov AGO1-4. Všetky štyri proteíny majú podobnú afinitu k miRNA, AGO2-3 môžu tlmiť transláciu v prípade neúplnej komplementarity medzi miRNA a mRNA, no len AGO2 má navyše aj ribonukleázovú aktivitu. V prípade ak sú miRNA vysoko komplementárnej v rámci vlásenkovej štruktúry, zabezpečujú proteíny AGO2 prídavné štiepenie, ktoré uľahčuje rozdelenie reťazcov miRNA:miRNA* ešte pred vlastným štiepením pomocou Dicer. Tá následne odštiepi slučku vlásenky z pre-miRNA čím vytvorí priemerne 22 nukleotidov dlhú dvojreťazcovú miRNA. Tento krok je nevyhnutný v biogenéze miRNA. Ak by došlo k ultmeniu ribonukleázy Dicer, výrazne sa zníži alebo sa dokonca kompletne zablokuje produkcia zrelých miRNA. Dicer je regulovaná niekoľkými spôsobmi. Napríklad N-koncová helikázová doména, ktorá má schopnosť inhibovať štiepenie je taktiež väzbovým miestom pre TRBP, ktorý konformačnou zmenou spôsobuje jej aktiváciu. Dicer je tiež regulovaná negatívnou spätnou väzbou vlastného produktu let-7 (8).

MiRNA umožňujú komplexu miRISC rozpoznať a regulovať konkrétne mRNA. U väčšiny živočíšnych miRNA nedochádza ku presnej komplementarite po celej ich dĺžke. Kľúčové je presné párovanie na 2-8 nukleotide v tzv. „seed“ regióne. Stupeň komplementarity miRNA:mRNA je najdôležitejším faktorom vplyvujúcim na mechanizmus regulácie. Úplná komplementarita umožňuje AGO štiepiť a degradovať cieľovú mRNA, zatiaľ čo neúplná komplementarita to nedovoľuje a vedie k utlmeniu translácie danej mRNA. Netlmená mRNA naviaže iniciačné faktory translácie eIF4, proteíny viažúce sa na poly(A) koniec (PABP1), 40S a 60S podjednotky ribozómu a vytvorí cirkulárnu štruktúru vďaka ktorej je možná translácia. Keď sa komplex miRISC naviaže na mRNA môže zabraňovať iniciácii translácie buď kompetíciou s eIF4E alebo vyvizením 60S ribozómovej podjednotky. Prípadne môže indukovať deadenyláciu a tak znemožniť cirkularizáciu mRNA. V post-iniciačnej fáze môže spôsobiť predčasné

odlúčenie ribozomálnych podjednotiek alebo podporiť degradáciu mRNA adenyláciou a následným odstránením čiapočky (8).

Interakcie medzi miRNA a komplementárnymi sekvenciami na mRNA, nekódujúcich RNA alebo pseudogénoch sa zdajú byť ďalšou úrovňou regulácie génovej expresie. Kompetujúce endogénne RNA (ceRNA) regulujú hladinu konkrétneho transkriptu tak, že súťažia o väzbu miRNA, ktorá má schopnosť daný transkript regulovať. Všetky transkripty, ktoré majú väzbové miesto pre jednu miRNA, a teda príležitosť kompetovať o jej väzbu a navzájom tak regulovať svoju expresiu, vytvárajú komplexnú sieť ceRNA. Pre každú mRNA je tak možné identifikovať jej ceRNA sieť a predikovať jej správanie. Nový biologický význam tak získavajú pseudogény, ktoré nekódujú funkčné proteíny a boli preto považované za akési evolučné relikt (8).

3.4.3 Metódy detekcie mikroRNA

Experimentálna detekcia miRNA je kvôli ich krátkej dĺžke, vzájomnej sekvenčnej podobnosti, značnému dynamickému rozsahu a tkanivovej alebo vývojovej špecifickej expresii metodicky náročná (8).

3.4.3.1 Northern blot

Pri tejto metóde dochádza k separácií jednotlivých molekúl na základe ich veľkosti. Bežné postupy zahrňujú izoláciu miRNA, PAGE, prenos separovaných vzoriek na membránu a ich následnú vizualizáciu pomocou rádioaktívne značených DNA/RNA reťazcov komplementárnych k danej miRNA (8).

Medzi výhody northern blotu patrí to, že sa môže využívať na detekciu prekurzorových aj maturovaných foriem miRNA, čo je podstatné hlavne u štúdií zaoberajúcich sa ich biogenézou. Prednosťou sú tiež dobre zavedené protokoly a jej pomerne dobrá dostupnosť v molekulárne biologických laboratóriách (8).

Limitáciou sú nízka citlivosť a časová náročnosť (kompletná analýza často trvá aj niekoľko dní). Technika navyše neumožňuje dostatočný rozsah a v niektorých prípadoch môže byť problémom rádioaktívny spôsob detekcie (8).

V snahe vyriešiť problém s nízkou citlivosťou sa začali používať LNA modifikované oligonukleotidové sondy. To prináša značné výhody v prípade, ak je dostupné len malé množstvo vzorky, hladina skúmaných miRNA vo vzorke je nízka alebo ak hrozí nebezpečenstvo nešpecifickej hybridizácie s podobnými molekulami (8).

3.4.3.2 *In situ* hybridizácia

Táto metóda sa využíva hlavne k priestorovej a časovej distribúcií miRNA na bunkovej a subbunkovej úrovni. In situ hybridizácia (ISH) sa začala pre detekciu miRNA používať relatívne nedávno a to hlavne vďaka už vyššie zmieneným LNA modifikovaným sondám a tiež kvôli zavedeniu RNA oligonukleotidových sond konjugovaných s hapténom s naviazaným fluoresceínom a vysoko špecifickými podmienkami premývania s tetrametyl amónium chloridom. ISH tak môže presne lokalizovať jednotlivé miRNA priamo v tkanive, no nie je vhodná na vysokokapacitné profilovanie (8).

3.4.3.3 *Kvantitatívna real-time PCR*

Široko používaná metóda pri štúdiu génovej expresie, charakteristická vysokou citlivosťou ktorá sa s určitými modifikáciami dá aplikovať tiež na analýzu miRNA. Postup začína prevedením reverznej transkripcie (RT), ktorá prepisuje RNA do cDNA. Tá je ďalej amplifikovaná a následne aj kvantifikovaná jednou z metód kvantitatívnej real-time PCR (qPCR). Aplikácie tejto metódy na výskum miRNA však vyžaduje modifikáciu hlavne kvôli ich krátkej dĺžke a vysokej sekvenčnej homológii. V súčasnosti sú na detekciu miRNA pomocou qPCR využívané dva základné prístupy (8).

Prvý z nich je založený na princípe umelého predĺženia templátu miRNA v rámci kroku RT pomocou vlasenkového primeru, čo vedie k predĺženiu maturovanej miRNA na dĺžku, ktorá umožňuje následnú amplifikáciu za použitia jedného špecifického a jedného univerzálneho primeru a špecifickej sondy založenej na TaqMan detekčnom systéme (8).

Druhá najčastejšie používaná metóda je založená na polyadenylácií miRNA, ktorá predchádza RT. Polyadenylovaná RNA je v ďalšom kroku prepísaná do cDNA a tá je následne kvantifikovaná s využitím miRNA špecifických a LNA modifikovaných primerov. Detekcia prebieha pomocou nešpecifického interkalačného farbiva SYBR green (8).

3.4.3.4 *Vysokokapacitné analýzy*

Napriek tomu že qPCR je vysoko citlivá a presná, posun v oblasti výskumu miRNA vyžadoval vývoj nových vysokokapacitných metód pre rýchlu paralelnú detekciu všetkých miRNA, ktoré sú prítomné v skúmanej vzorke (8).

Technológia miRNA microarray je založená na hybridizácií nukleových kyselín medzi cieľovými molekulami a sondami. MiRNA sondy majú amino-modifikovaný 5' koniec a sú pomocou kovalentnej väzby imobilizované na podložné sklo. MiRNA sú značené fluorescenčnou farbou a následne hybridizované s upevnenými sondami, ktoré sú umiestnené na definovaných pozíciách. Následnou analýzou tak môže byť vyhodnotená ich prítomnosť, prípadne relatívne množstvo. To však môže vyžadovať veľké množstvo RNA a tiež je možná skřížená reaktivita spôsobená vysokým stupňom sekvenčnej homológie, ktorá vyžaduje validáciu jednou z nezávislých metód (8).

Ak nie je k dispozícii väčšie množstvo RNA potom je možné využiť jednu z metód qPCR. Najčastejšie sa používa metóda s detekčným systémom TaqMen vo formáte mikrofluidných kariet alebo miRNA qPCR array s detekčným systémom SYBR green, ktorých princípy boli popísané vyššie (8).

Ďalšou metódou je bead based array. Sondy špecifické pre miRNA sú pripojené k mikroguličkám, ktoré sú kvôli neskoršej identifikácii značené jedinečnou zmesou dvoch fluorescenčných farieb. Adaptorové sekvencie sú ligované na koncoch miRNA. Potom je pomocou RT a primerov so špecifitou k adaptorom vytvorená cDNA knižnica. Následne je opäť za použitia primerov komplementárnych k adaptorom a biotinylovaných primerov vykonaná PCR, pri ktorej dochádza k namnoženiu a označeniu cDNA, ktorá môže s vysokou afinitou reagovať so streptavidin-fykoerytrin komplexom. Vznikajúci produkt je hybridizovaný so zmesou fluorescenčných guľôčok tvoriacich cDNA knižnicu a táto zmes je potom detekovaná pomocou prietokovej cytometrie. Fluorescenčná guľôčka značí špecifickú sondu pre miRNA a intenzita fluorescenčného signálu zodpovedá množstvu danej miRNA (8).

Vyššie spomínané metódy umožňujú detekciu už známych miRNA. MiRAGE využíva metódu založenú na namnožení nielen známych, ale aj potenciálne nových miRNA, no tento postup je veľmi náročný, sú potrebné stovky mikrogramov RNA a neposkytuje informácie o kvantite miRNA vo vzorke. Adaptorové sekvencie použité v RT sú ligované na koncoch miRNA a PCR amplifikácia je vykonaná s biotinylovanými primermi. V nasledujúcom kroku sú adaptory s naviazaným biotínom odštiepené od ostatných PCR produktov. Vzniknutá zmes je pustená cez kolónu s mikroguličkami potiahnutými streptavidínom, ktorý naviaže adaptory s biotínom a tak nám vznikne produkt obsahujúci len krátke RNA. Tie sú klonované a v poslednom kroku sekvenované (8).

3.4.4 MikroRNA ako biomarkery

3.4.4.1 Reumatoídna artritída

Nedávne štúdie odhalili rozdielne hladiny miRNA u pacientov s RA verzus u zdravých kontrol (HC), z čoho vyplýva, že abnormality v profile miRNA môžu prispievať k vývoju choroby na molekulárnej úrovni (10)(11).

Bola pozorovaná expresia miRNA u pacientov trpiacich RA buď v synoviálnom tkanive vo všeobecnosti alebo v jednotlivých bunkách osobitne. V Tab. 5 je možné vidieť celkový prehľad jednotlivých miRNA, ktoré sú u pacientov s RA vyjadrené inak ako u ľudí, ktorí touto chorobou netrpia (12).

Tab. 5 Diferenciálna expresia mikroRNA u reumatoídnej artritídy

Vzorka	miRNA expresia	
	<i>Up-reguované miRNA</i>	<i>Down-regulované miRNA</i>
<i>PBMCs</i>	miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-132, miR-16, miR-26a, miR-150	miR-21, miR-125b
<i>Sérum-plazma</i>	miR-125a-5p, miR-16, miR-21, miR-24, miR-26a, miR-125b, miR-126-3p, miR-223, miR-451	miR-125a-3p, miR-16, miR-126-3p, miR-132, miR-146a, miR-155, miR-451
<i>Synoviálne tkanivo</i>	miR-146b, miR-155, miR-150, miR-146a, miR-223	miR-188-5p, miR-22, miR-23b, miR-30a, miR-10a, miR-140
<i>Synoviálna tekutina</i>	miR-146a, miR-155, miR-223, miR-16	miR-132, miR-140
<i>Synoviálne fibroblasty</i>	miR-203, miR-155, miR-21, miR-17-92 klaster, miR-133a, miR-142, miR-146a, miR-221, miR-222, miR-223, miR-323-3p, miR-346	miR-188-5p, miR-124a, miR-34a, miR-10a, miR-18a, miR-22, miR-152, miR-363, miR-375
<i>CD 4⁺ T lymfocyty</i>	miR-146a, miR-223	miR-363, miR-498, miR-21
<i>Makrofágy</i>	miR-223	miR-99a, miR-100, miR-125b, miR-199-3p, miR-199-5p, miR-152, miR-214

Prevzaté z: M. J. Mousavi et al. *Implications of the noncoding RNAs in rheumatoid arthritis pathogenesis* (2018)

MiR-16 sa dokáže naviazať na 3'UTR TNF- α , ktorý je jedným z hlavných pro-zápalových mediátorov RA a tak môže regulovať TNF- α signalizáciu, ktorá je dôležitá pre patogenézu RA. Zvýšené hladiny miR-16 korelujú s aktivitou choroby (13).

Transkripčný faktor STAT3, ktorý je dôležitý pre diferenciáciu Th17 buniek je cieľom miR-21. Zvyšovaním hladín tohto faktoru môže miR-21 spôsobovať nevyrovnanosť pomeru Th17/Treg lymfocytov u pacientov s RA (13).

MiR-26a má potencial byť diagnostickým biomarkrom s vysokou špecificitou. Jej hladina je signifikantne zvýšená počas diferenciácie IL-17 priťahujúceho CD4⁺ bunky, ktoré hrajú dôležitú úlohu v procese patogenézy u RA (14), (15).

X-viažúci proteín inhibujúci apoptózu (XIAP) bol identifikovaný ako priamy cieľ miR-34a* a jeho znížené hladiny korelujú so zníženou expresiou miR-34a* v synoviálnych fibroblastoch (SF) u RA. To vedie k presvedčeniu, že znížené hladiny miR-34a prispievajú k poškodeniu apoptózy SF, ktorých predĺžená funkčnosť je dôležitá pre patogenézu RA (16).

Hladiny miR-124a sú značne znížené v RASF. Transfekcia s pre-miR-124a inhibovala proliferáciu RASF a zastavila bunkový cyklus v G₁ fáze. Tiež došlo k zmenám hladín jej cieľov, ktorými sú cyklin-dependentná kináza-2 (CDK-2), monocyt chemoatraktant proteín-1 (MCP-1), vaskulárny endotelový faktor (VEGF) a angiogénin. To vedie k predpokladu, že znížená expresia miR-124a môže prispievať k rozvoju RA za pomoci zvýšenej proliferácie RASF, chemotaxii leukocytov a angiogenéze (17).

MiR-146a je jednou z najštudovanejších miRNA u RA (13). Bolo demonštrované, že miRNA môže inhibovať Th1 sprostredkované odpovede a je tiež dôležitá pri potlačovaní aktivity Treg lymfocytov (18). Avšak napriek súčasným poznatkom stále nie je úplne jasné, akou mierou sa miRNA podieľa na patogenéze choroby, keďže existujú niekoľké štúdie s protichodnými výsledkami (13). Taktiež boli prevedené štúdie zaoberajúce sa SNP u tejto miRNA a bolo preukázané, že nie je žiadna asociácia medzi miR-146a rs2910164 a RA (19), (20).

MiR-150 je signifikantne zvýšená počas diferenciácie IL-17 produkujúcich buniek, ktoré sú často prítomné u pacientov s RA. Tieto zvýšené hladiny sú spájané so závažnou kĺbnou deštrukciou a vysokou aktivitou choroby (15).

MiR-155 má pleiotropnú funkciu a pravdepodobne reguluje rôzne signálne dráhy súvisiace s RA. Zvýšené hladiny v synoviálnych CD14⁺ bunkách a makrofágoch sú spájané s nižším výskytom Src homology 2-containing inositol phosphatase-1 (SHIP-1), silného inhibítora zápalu. To naznačuje, že táto pro-zápalová cesta môže zohrávať dôležitú negatívnu úlohu v patogenéze RA (21). Toll-like receptorové (TLR) ligandy a cytokíny ako IL-10 môžu modulovať expresiu miR-155. Zároveň je miRNA silným regulátorom cytokínov (22). Tiež existuje hypotéza, že miR-155 je potrebná pre homeostázu a funkciu Treg buniek a IL-17 produkujúcich buniek (15) a že môže prispievať k zvýšenej rezistencii na apoptózu monocytov u pacientov s RA (23).

Pro-zápalová miR-203 je schopná stimulovať tvorbu matrixovej meteloproteinázy-1 (MMP-1) a NF- κ B dependentnej produkcie IL-6 a tak prispievať k RASF fenotypu RA a zápalom kĺbov (24).

Bolo pozorované, že miR-223 môže regulovať diferenciáciu osteoklastov, ktoré sú kritické pre kĺby u RA. Táto teória bola čiastočne potvrdená *in vitro* štúdiami, kde zvýšená expresia miR-223 viedla k potlačeniu produkcie osteoklastov a tiež aj expresie kathepsinu K (25). MiRNA-223 bola tiež navrhnutá ako biomarker aktivity choroby a možný prediktor výsledku choroby u pacientov so skorou RA (26).

Niekoľko štúdií tiež potvrdilo, že SNP miR-499 rs374644 zohráva dôležitú úlohu u pacientov s RA (19), (20), (27).

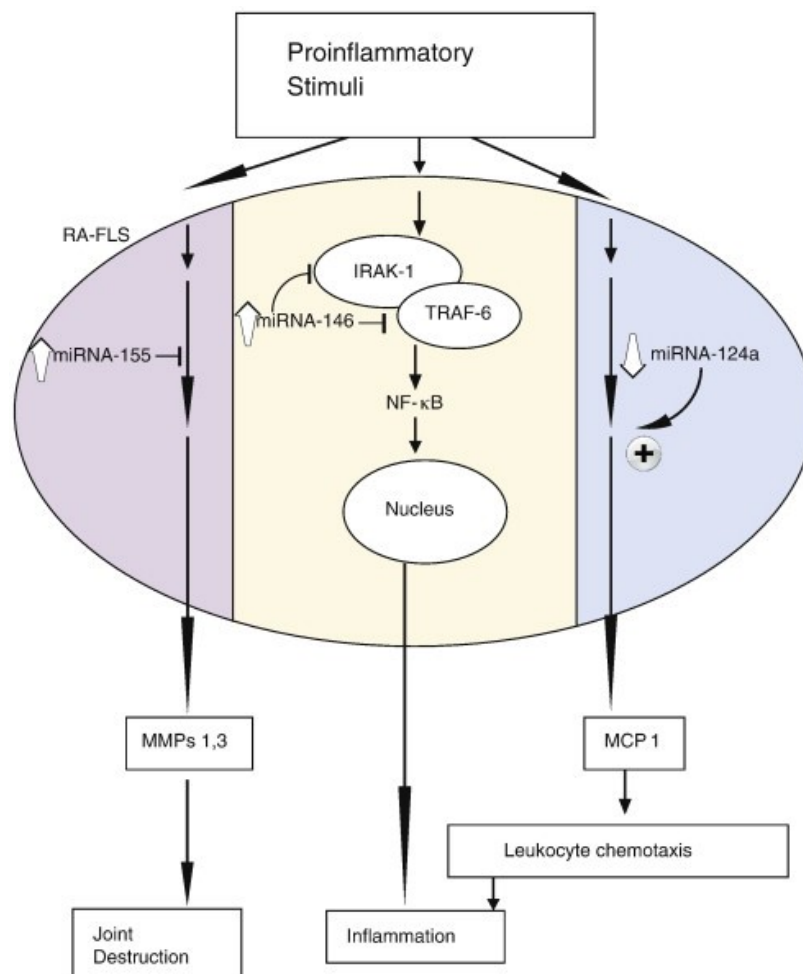
V Tab. 6 sú stručne popísané úlohy ďalších miRNA, ktorých hladiny sú zmenené u pacientov s RA (28).

Tab. 6 Úloha mikroRNA v patogenéze reumatóidnej artritídy

miRNAs	Imunologická a zápalová odpoveď		Synovialná hyperplázia		Kĺbna deštrukcia	
	Regulácia T lymfocytov	Zápalová odpoveď	Apoptóza	Bunkové delenie	Tvorba osteoklastov	Matrixové metaloproteinázy
<i>let-7a</i>	+					
<i>miR-146b</i>	+					
<i>miR-132</i>	+					
<i>miR-21</i>	+					
<i>miR-323-3p</i>	+	+				
<i>miR-15a</i>			+			
<i>miR-19a/b</i>		-				-

Prevzaté z: Chen X-M et al. *Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Novel Perspectives Based on Review of the Literature* (2015)

Obr. 2 znázorňuje ako niektoré miRNA pôsobia v procese patogenézy reumatoidnej artritídy.



Obr. 2 MikroRNA v regulácii synoviálnych fibroblastov u reumatoidnej artritídy (RASF). Expresia miR-155 je zvýšená v RASF a to vedie k potlačeniu expresie matrixovej metaloproteinázy 1 a 3 (MMP-1 a 3), z čoho vyplýva, že miR-155 môže modulovať deštruktívne vlastnosti RASF. MiR-146 je taktiež zvýšená u RA, kde inhibuje expresiu TRAF6 a IRAK1, kľúčových regulátorov NF-κB signalizácie a tak pravdepodobne pôsobí potlačenie zápalovej reakcie u RA. Hladiny miR-124a sú v RASF znížené. Keďže miR-124a normálne potláča expresiu monocytového chemoatraktantu 1, pokles jej hladiny bude prispievať k zápalu a poškodeniu tkaniva u RA.

Prevzaté z: V. Furer et al. *The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases* (2010)

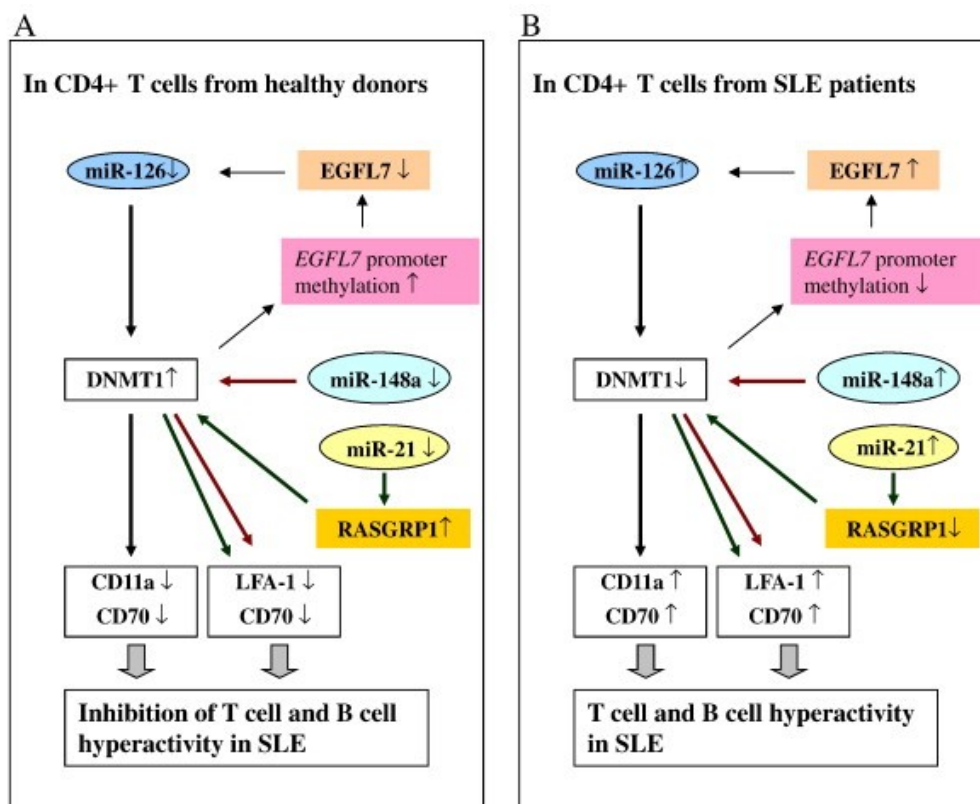
3.4.4.2 Systémový lupus erythematosus

Keďže miRNA môžu regulovať každý aspekt bunkovej aktivity, od diferenciácie cez proliferáciu až po apoptózu, zmeny v ich expresii prispievajú aj k patogenéze SLE (29).

T lymfocyty pacientov s lupusom poukazujú na redukciu v DNA methylácií. Táto epigenetická deregulácia koreluje s aktivitou choroby a môže viesť až k aktivácií T a B buniek (29).

Boli identifikované tri rôzne miRNA, ktoré sú zacielené na DNA methyláciu u SLE (Obr. 3).

MiR-148a a miR-126 sa priamo viažu na 3'-UTR DNA methyltransferázy 1 (DNMT1) a inhibujú jej expresiu. MiR-21 nepriamo down-reguluje DNMT1 pôsobením na RAS guanyl-releasing protein 1 (RASGRP1). Hladiny týchto miRNA sú značne zvýšené v CD4⁺ bunkách SLE pacientov, čo vedie k poklesu DNMT1 a následne k hypomethylácií CD4⁺ buniek (29), (30).



Obr. 3 MikroRNA zapojené v epigenetickej regulácii u systémového lupusu erythematosus (SLE). MiR-126 a miR-148 sú priame inhibítory DNA methyltransferázy (DNMT1). MiR-126 sa nachádza na EGFL7 géne, ktorý bol tiež up-regulovaný v CD4⁺ bunkách pacientov so SLE a zvýšené hladiny miR-126/EGFL7 boli asociované s redukciou methylácie na EGFL7 promótoře. MiR-21 nepriamo znižuje hladiny DNMT1 znižovaním expresie génu RASGRP1, ktorý za normálnych podmienok pomocou Ras-MAPK dráhy spôsobuje zvyšovanie DNMT1. Inhibícia expresie a miR-21 a miR-148 v CD4⁺ bunkách pacientov so SLE by mohla zvýšiť expresiu DNMT1 a stlmiť DNA hypomethyláciu, čo by mohlo viesť k potlačeniu hyperaktivity T a B buniek u SLE.

Prevzaté z: Cheng-gui Miao et al. *The emerging role of microRNAs in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus* (2013)

Je tiež známe, že miRNA môžu regulovať imunitnú odpoveď aj cez iné signalizačné dráhy nezávislé na DNA metylácií. Zvýšené hladiny miR-126 vedú k up-regulácií génov kódujúcich proteíny ako CD11a a CD70 a to vedie k autoreaktivite T a B lymfocytov. MiR-21 tiež ovplyvňuje TCR signalizáciu a pravdepodobne je schopná aj kontroly aktivácie T buniek reguláciou programmed cell death proteínu 4 (PDCD4). MiR-142 je negatívny regulátor aktivácie T buniek CD4⁺. Vyššie hladiny miR-181a vedú k zvýšeniu citlivosti T lymfocytov na antigény a tiež k urýchleniu diferenciácie progenitorových B lymfocytov v kostnej dreni (29).

MiR-155 reguluje imunitné odpovede hneď niekoľkými spôsobmi. Jej ciele zahŕňajú mRNA IFN, SHIP1 a veľa ďalších (29).

MiRNA tiež prispievajú k patogenéze lupusu pomocou regulácie hladín cytokínov. Nevyrovnané hladiny miR-31 sú zodpovedné za defekty v syntéze IL-2 u SLE pacientov. MiR-125a sa priamo viaže na RANTES, ktorý zohráva úlohu vo vývoji SLE. MiR-146a zase negatívne reguluje IFN signalizačnú dráhu typu I a tiež negatívne reguluje imunitnú odpoveď pôsobením na TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) a IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1). MiRNA prispieva k ich down-regulácií a k následnému ukončeniu zápalovej odpovede (29).

V Tab. 7 sú vyznačené všetky ďalšie miRNA, ktorých expresia sa líši u SLE oproti HC.

Tab. 7 Diferenciálna expresia mikroRNA u systemového lupusu erythematosus

vzorka	miRNA expresia	
	<i>Up-reguované miRNA</i>	<i>Down-regulované miRNA</i>
<i>PBMCs</i>	miR-516a-3p, miR-525-5p, miR-629, miR-21, miR-61, miR-78, miR-142-3p, miR-189, miR-198, miR-298, miR-299-3p, miR-342, miR-410	miR-126, miR-17-5p, miR-112, miR-141, miR-184, miR-196a, miR-383, miR-409-3p, miR-146a, miR-155
<i>Sérum-plazma</i>	miR-148-3p, miR-130b-3p	
<i>T lymfocyty</i>		miR-26a
<i>moč</i>	miR-146a	

Prevzaté z: Ji-Qing Chen et al. *The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases* (2016)

MiR-146a u SLE je v T lymfocytoch vyjadrená nižšie ako obyčajne a to môže viesť k zmenám v IFN signalizačnej dráhe typu I (29). Naproti tomu, hladina miR-146a je zvýšená v moči a to hlavne u pacientov s lupusovou nefritídou (LN). Naviac, SNP

v promotorovej oblasti miR-146a sú asociované s nástupom a progresom SLE (20). Tiež bolo preukázané, že liečba steroidmi nemá vplyv na už zmenenú expresiu danej miRNA (31). Silná asociácia medzi hladinou miR-146a a aktivitou choroby indikuje, že miRNA môže slúžiť ako nový biomarker choroby (29).

Hladina miR-125 v močovom supernatante by tiež mohla byť považovaná za relevantný a presný biomarker u pacientov s LN (29).

MiR-126 je signifikantne zvýšená v PBMC u pacientov so SLE a opačný jav je pozorovaný u RA, čo naznačuje, že táto miRNA by mohla slúžiť ako lupusu špecifický biomarker (32). MiR-21 je vysoko zvýšená u SLE a jej hladiny sa líšia u pacientov s aktívnym a neaktívnym lupusom. Avšak miR-21 je zvýšená aj u RA a teda túto miRNA nemožno považovať za špecifickú pre SLE. Hladina miR-148a je zvýšená v T lymfocytoch u SLE a zároveň pozitívne koreluje s aktivitou choroby. To všetko napovedá, že miR-126, miR-21 a miR-148a môžu mať potenciálne využitie ako biomarkry SLE a možno aj ako nové terapeutické ciele terapie lupusu (29).

3.4.4.3 Systémová sklerodermia

Zvýšená expresia profibrotických miRNA a/alebo znížená expresia antifibrotických miRNA je pravdepodobne dôležitým faktorom vo vývoji fibrózy u SSc. Mikroarray a RT-PCR ukázali, že zhruba 40 rôznych miRNA má súvislosť s fibrózou v rôznych orgánoch. Väčšina z týchto miRNA je regulovaná pomocou TGF, ktorý je považovaný za dôležitého účastníka v procese fibrózy u systémovej sklerodermie (33).

MiR-133, miR-141, miR-200a/b, miR-21 a miR-590 priamo indukujú alebo inhibujú fibrózu pôsobením na TGF- β /Smad kanonickú signálnu dráhu. Analýza miR-132, miR-133 a miR-17-92 klastru ukázala, že ich cieľom je faktor rastu spojivového tkaniva (CTGF). MiR-29a/b/c, miR-377 (klaster s miR-382) a miR-449a/b sa zapojené v prestavbe extracelulárnej matrix. Let-7, miR-132, miR-155, miR-192 a miR-382 sa nepriamo podieľajú na fibrogenéze vplyvom na epiteliálno-mezenchymálny prechod a miR-132, miR-15b, miR-16, miR-150, miR-27a, miR-27b, miR-335 a miR-34a indukujú proliferáciu myofibroblastov a resistenciu k apoptóze (33).

MiR-29 vykazuje antifibrotický efekt u niekoľkých rôznych fibrotických chorôb, vrátane SSc. Táto miRNA potláča expresiu kolagénu I, kolagénu III a kolagénu IV. Je dokázané, že silná down-regulácia expresie miR-29 môže viesť k zvýšenej tvorbe kolagénu a následnej fibrotickej odpovedi vo forme srdečnej, pľúcnej a pečenej

fibrózy. Tyrozín-kinázový inhibítor imatinib mesylát bol schopný obnoviť hladiny miR-29 u bleomycínom vyvolanej fibrózy u myší (33).

V Tab. 8 sú popísané ďalšie mikroRNA, ich cieľové gény a proteíny a tiež výsledné efekty, ktoré vyvolávajú v organizme. Inhibícia funkcie profibrotických miRNA a posilňovanie aktivity antifibrotických miRNA pomocou génovej terapie sa môžu uplatniť ako nové terapeutické možnosti v liečbe sklerodermie (33).

Tab. 8 MikroRNA spojované s fibrózou u systémovej sklerodermie

miRNA	Efekt	Cieľový gén a proteín
<i>miR-29</i>	Antifibrotický	COL1A1, COL1A2, COL3A1, FBN1, ELN1, ECM syntéza
<i>miR-21</i>	Profibrotický	Smad7
<i>miR-150</i>	Antifibrotický	Integrin-β3
<i>miR-196a</i>	Antifibrotický	COL1A1, COL1A2
<i>miR-92a</i>	Profibrotický	MMP-1

Prevzaté z: H. Zhu et al. *MicroRNAs: their involvement in fibrosis pathogenesis and use as diagnostic biomarkers in scleroderma* (2013)

MiRNA môžu byť získavané z rôznych zdrojov, najčastejšie však z krvných komponent, biologických tekutín či vzoriek tkanív. Sú vysoko stabilné a zdajú sa byť rezistentné na zmeny v zaobchádzaní so vzorkou, čo zvyšuje ich šance ako potencionálnych biomarkrov. Tab. 9 popisuje zmeny v expresii jednotlivých miRNA a efekt, ktorý daná zmena vyvoláva (33).

Tab. 9 MikroRNA ako biomarkery u systémovej sklerodermie

miRNA	Zmena expresie	Efekt
<i>miR-29a</i>	Znížená	Vyšší systolický tlak v pravej komore
<i>miR-150</i>	Znížená	Vážnejšia klinická manifestácia
<i>miR-196a</i>	Znížená	Vyšší pomer dssc:lssc, vyššie Rodnanovo skóre, vyššia výskyt jaziev
<i>miR-92a</i>	Zvýšená	Nižšia frekvencia teleangiektázy
<i>miR-142-3p</i>	Zvýšená	Diagnostický marker pre odlišenie SSc od SSD, skorá detekcia rozvíjajúcej sa SSc, krátka podjazyková uzdička

Prevzaté z: H. Zhu et al. *MicroRNAs: their involvement in fibrosis pathogenesis and use as diagnostic biomarkers in scleroderma* (2013)

3.4.5 MikroRNA a glukokortikoidy

Aktivácia glukokortikoidných receptorov (GR) glukokortikoidmi môže indukovať alebo naopak potláčať špecifické miRNA v rôznych cieľových génoch. Bolo prevedených mnoho štúdií zaoberajúcich sa touto témou, no podstatná väčšina z nich skúmala nádorové bunky od pacientov s leukémiou. Existuje však hypotéza, že podobným mechanizmom by mohlo dochádzať k ovplyvňovaniu profilu miRNA u pacientov s autoimunitnými ochoreniami liečenými glukokortikoidmi. Identifikácia mikroRNA, ktoré majú rozdielnú expresiu u chorých pacientov oproti HC ako následok GK liečby a ich následné ovplyvnenie, predstavuje inovatívny prístup, ktorý by v budúcnosti mohol byť zavedený do klinickej praxe (34).

Stále sa skúma, ako presne sa správajú miRNA v regulácii GR a prevláda názor, že 3'-UTR glukokortikoidného receptora obsahuje niekoľko „seed“ oblastí, ktoré sú rozpoznávané rôznymi miRNA (34).

Davis *et al* (35) pozorovali zmeny v expresii miRNA u aktivovaných CD4⁺ T lymfocytov od zdravých ľudí, ktoré boli vystavené *in vitro* 1 μmol/l methylprednisolonu. Bolo preukázané, že methylprednisolon zvýšil expresiu miR-98 a znížil hladiny jej predpovedaných cieľov ako IL-13 a ďalších troch TNF receptorov (35).

Napriek tomu, že ďalšie štúdie potvrdili, že mikroRNA zohrávajú určitú úlohu pri variabilnej odpovedi pacientov na terapiu GK aj u ďalších chorôb, získané výsledky sú vysoko premenlivé a zatiaľ nebola definitívne vysvetlená žiadna dráha, ktorou GK ovplyvňujú miRNA (34).

5. Diskusia

Hoci už od prvého objavu miRNA uplynulo 25 rokov, stále o nich nevieme úplne všetko. Veľa štúdií pozorovalo zmenené hladiny miRNA v rôznych tkanivách, jednotlivých bunkách či telesných tekutinách u jednotlivých ochorení, no nie vždy bolo objasnené akým mechanizmom k týmto zmenám dochádza. Je však jasné, že miRNA zohrávajú dôležitú úlohu pri patogeneze autoimunitných ochorení.

Reumatoídna artritída je jedna z najlepšie preskúmaných chorôb, čo sa týka mi miRNA. Je mnoho štúdií (10) – (28), ktoré sa zaoberajú úlohou miRNA u tohto ochorenia. Medzi dôležité činitele patogenezy u RA patria miR-16, miR-21, miR-34a*, miR-124a, miR-150, miR-155, miR-203 a SNP na miR-499. Každá z týchto miRNA sa určitým mechanizmom podieľa na vývoji choroby. Ďalšou podstatnou miRNA sa javí byť miR-223, ktorá bola navrhnutá ako marker aktivity choroby a možný prediktor výsledku choroby u pacientov so skorou reumatoídnu artritídou (26). MiR-146a je jedna z najviac preskúmaných ale zároveň aj kontroverznejších mikroRNA. Zatiaľ čo niektoré štúdie hlásili jej zvýšené hladiny v PBMC, iné tvrdili opak (13). Za tieto rozdiely môže byť zodpovedných mnoho faktorov ako napríklad rozdiely v etnických skupinách u jednotlivých štúdií, vysoká variabilita choroby a mnohé ďalšie.

U SLE sa na patogeneze rôznymi mechanizmami podieľajú: miR-148a, miR-126, miR-21, miR-142, miR-181, miR-155, miR-31, miR-125a, miR-146 (29) – (32). Použiteľné ako biomarkery sa zdajú byť miR-148a a miR-146 (29). MiR-126 je možným špecifickým biomarkerom pre SLE (32), zatiaľ čo miR-21 môže byť využívaná na rozoznanie aktívnej a neaktívnej formy SLE (29). MiR-125a sa zdá byť vhodným kandidátom na biomarker u pacientov s lupusovou nefritídou (29).

U systémovej sklerodermie boli popísané zmeny v hladinách u miR-133, miR-141, miR-200a/b, miR-21, miR-590, miR-132, miR-17-92, miR-29a/b/c, miR-377, miR-449, let-7, miR-132, miR-155, miR-192, miR-382, miR-156, miR-16, miR-150, miR-27, miR-335 a miR-34 ovplyvňujúce rôzne funkcie od indukcie či inhibície fibrozy, cez prestavbu ECM až po vznik resistencie na apoptózu. SSc je však najmenej popísana z troch chorôb a najviac vieme o miR-29, no jej funkcia ako biomarkru zatiaľ nebola potvrdená (33).

Objavila sa aj štúdia, ktorá popisuje zmenu expresie miRNA pri podávaní glukokortikoidov, no keďže bola vykonávaná na lymfocytoch zdravých ľudí, zatiaľ nie je úplne jasné, aký vplyv to bude predstavovať pre vyššie spomínané autoimunitné choroby.

Zo všetkých zhromaždených poznatkov teda vyplýva, že miRNA naozaj zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v patogenéze mnohých chorôb a že by mohli byť veľmi hodnotnými diagnostickými a prognostickými biomarkrami a tiež aj novými terapeutickým cieľmi. No keďže výskum miRNA ako diagnostických biomarkerov je stále na začiatku, je ešte potreba veľké množstvo štúdií na väčšom počte pacientov z rôznych etnických skupín. V takom prípade bude možné, že s pribúdajúcim časom sa objavia ďalšie miRNA, ktoré nám pomôžu viac objasniť patogenézy chorôb a ktoré sa stanú bežnou súčasťou diagnostiky a klinickej praxe.

6. Záver

Na základe posúdenia odborných publikácií o možnosti používania miRNA ako biomarkrov u RA, SLE a SSc je možné konštatovať, že existuje pár nádejných kandidátov, ktoré by sa v blízkej budúcnosti mohli začať používať ako diagnostické biomarkry. Medzi nich patrí mir-223 u reumatóidnej artritídy a mir-148a, mir-126, mir-21, mir-125a a mir-146a u systemového lupusu erythematosus. Ďalšie miRNA sa tiež môžu stať biomarkrami a novými terapeutickými cieľmi, no je ešte potreba veľa času a veľké množstvo štúdií, aby boli zavedené do bežnej klinickej praxe.

7. Zoznam tabuliek

Tab. 1: Nové ACR/EULAR klasifikačné kritéria pre diagnózu reumatóidnej artritídy	15
Tab. 2: Klasifikačné kritéria pre systémový lupus erythematosus	22
Tab. 3: Klasifikačné kritéria pre systémovú sklerodermiu	26
Tab. 4: Exogénne vplyvy, lieky a chem. látky vyvolávajúce pseudoskleroderm. stavy ...	27
Tab. 5 Diferenciálna expresia mikroRNA u reumatóidnej artritídy	36
Tab. 6 Úloha mikroRNA v patogenéze reumatóidnej artritídy	38
Tab. 7 Diferenciálna expresia mikroRNA u systémového lupusu erythematosus	41
Tab. 8 MikroRNA spojované s fibrózou u systémovej sklerodermie.....	43
Tab. 9 MikroRNA ako biomarkery u systémovej sklerodermie.....	43

8. Zoznam obrázkov

Obr. 1 Biogenézy mikroRNA	28
Obr. 2 MikroRNA v regulácii synoviálnych fibroblastov u reumatóidnej artritídy	39
Obr. 3 MikroRNA zapojené v epigenetickej regulácii u systemového lupusu erythematosus	40

9. Použitá literatura

1. **Pavelka K., Vencovský J., Horák P., Šenolt L., Mann H., Štěpán J.** *Revmatologie*. Praha : Maxdorf, 2012. ISBN 978-7345-295-7.
2. **M., Olejárová.** *Revmatologie v obrazech*. Praha : Mladá fronta, 2016. ISBN 80-247-0459-5.
3. **K., Pavelka.** *Revmatologie*. Praha : Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-688-5.
4. **Š., Alušík.** *Revmatologie*. Praha : Triton, 2002. ISBN 80-7254-279-6.
5. **Rovenský J., Pavelka K.** *Klinická reumatologie*. Martin : Osveta, 2000. s. 1047. ISBN 80-8063-022-4.
6. **K., Pavelka.** *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha : Grada Publishing a.s., 2005.
7. **Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L., Horák P., Olejárová M., Tomčík M., Závada J., Štěpán J.** *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha : Maxdorf, 2017. ISBN 978-80-7345-537-8.
8. **Slabý O., Svoboda M. et al.** *MikroRNA v onkologii*. Praha : Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-587-1.
9. **Kaleb M. Pauley, Seunghee Cha, Edward K.L. Chan.** MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*. 2009, *Zv.* 32, 3 - 4, s. 189 - 194. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.02.012>.
10. **Duroux-Richard I., Presumey J., Courties G., Gay S., Gordeladze J., Jorgensen C., Kyburz D., Apparailly F.** MicroRNAs as new player in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2011, *Zv.* 78, 1, s. 17 - 22.
11. **Victoria Furer, Jeffrey D. Greenberg, Mukundan Attur, Steven B. Abramson, Michael H. Pillinger.** The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clinical Immunology*. 2010, *Zv.* 136, 1, s. 1 - 15. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.02.005>.
12. **M. J. Mousavi, A. Jamshidi, A. Chopra, S. Aslani, M. Akhlaghi, M. Mahmoudi.** Implications of the noncoding RNAs in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 2018, s. 1 - 13. <https://doi.org/10.1002/jcp.26911>.
13. **Alexey V. Churov, Eugenia K. Oleinik, Mikael Knip.** MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmunity Reviews*. 2015, *Zv.* 14, 11, s. 1029 - 1037.
14. **Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, et al.** Comprehensive microRNA Analysis Identifies miR-24 and miR-125a-5p as Plasma Biomarkers for

Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2013, *Zv.* 8, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069118>.

15. **T. Niimoto, T. Nakasa, M. Ishikawa, A. Okuhara, B. Izumi, M. Deie, O. Suzuki, N. Adachi and M. Ochi.** MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2010, *Zv.* 11, 209. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-209>.

16. **Niederer F, Trenkmann M, Ospelt C, Karouzakis E, Neidhart M, Stanczyk J, et al.** Down-regulation of microRNA-34a* in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis & Rheumatism*. 2012, 64, s. 1771 - 1779. doi:10.1002/art.34334.

17. **Nakamachi, Y. , Kawano, S. , Takenokuchi, M. , Nishimura, K. , Sakai, Y. , Chin, T. , Saura, R. , Kurosaka, M. and Kumagai, S.** MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2009, 60, s. 1294 - 1304. doi:10.1002/art.24475.

18. **Li-Fan Lu, M. P. Boldin, A. Chaudhry, L. Lin, K. D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, A. Y. Rudensky.** Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*. 2010, *Zv.* 142, 6, s. 914 - 929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.012>.

19. **Ke Li, Hongtao Tie, Ning Hu, Hong Chen, Xinru Yin, Chao Peng, Jingyuan Wan, Wei Huang.** Association of two polymorphisms rs2910164 in miRNA-146a and rs3746444 in miRNA-499 with rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Human Immunology*. July 2014, *Zv.* 75, 7, s. 602 - 608.

20. **Lingyu Fu, Lei Jin, Lei Yan, Jingpu Shi, Hailong Wang, Bo Zhou, Xiaomei Wu.** Comprehensive review of genetic association studies and meta-analysis on miRNA polymorphisms and rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus susceptibility. *Human Immunology*. January 2016, *Zv.* 77, 1, s. 1 - 6.

21. **Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al.** MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011, *Zv.* 108, 27, s. 11193 - 11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019536108>.

22. **McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, et al.** IL-10 inhibits miR-155 induction by Toll-like receptors. *Journal of biological chemistry*. 2010, 285, s. 20492 - 20498.

23. **Megha Rajasekhar, Anton M. Olsson, Kathryn J.A. Steel, Mirella Georgouli, Ushan Ranasinghe, Christine Brender Read, Klaus S. Frederiksen, Leonie S. Taams.** MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes

- from patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2017, Zv. 79, s. 53 - 62.
24. **Stanczyk, J. , Ospelt, C. , Karouzakis, E. , Filer, A. , Raza, K. , Kolling, C. , Gay, R. , Buckley, C. D., Tak, P. P., Gay, S. and Kyburz, D.** Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis & Rheumatism*. 2011, Zv. 63, s. 373-381. doi:10.1002/art.30115.
25. **Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, et al.** Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Modern Rheumatology*. 2013, Zv. 23, s. 674 - 685. <https://doi.org/10.3109/s10165-012-0710-1>.
26. **Filková M, Aradi B, Šenolt L, et al.** Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2014, Zv. 73, 10, s. 1898 - 1904.
27. **Song GG, Bae SC, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Lee YH.** The association between susceptibility to inflammatory arthritis and miR-146a, miR-499 and IRAK1 polymorphisms. A meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2015, Zv. 74, 7, s. 637 - 645.
28. **Chen X-M, Huang Q-C, Yang S-L, et al.** Role of Micro RNAs in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Novel Perspectives Based on Review of the Literature. [ed.] Yehuda S. *Medicine*. 2015, Zv. 94, 31.
29. **Stypińska B., Paradowska-Gorycka A.** Cytokines and MicroRNAs as Candidate Biomarkers for Systemic Lupus Erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, Zv. 16, s. 24194-24218. <https://doi.org/10.3390/ijms161024194>.
30. **Cheng-gui Miao, Ying-ying Yang, Xu He, Cheng Huang, Yan Huang, Lei Zhang, Xiong-Wen Lv, Yong Jin, Jun Li.** The emerging role of microRNAs in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cellular Signalling*. 2013, Zv. 25, 9, s. 1828-1836. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.05.006>.
31. **Luo X, Yang W, Ye D-Q, et al.** A Functional Variant in MicroRNA-146a Promoter Modulates Its Expression and Confers Disease Risk for Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS Genetics*. 2011, Zv. 7, 6. doi:10.1371/journal.pgen.1002128.
32. **Honglei Wang, Wujian Peng, Xin Ouyang, Wuxian Li, Yong Dai.** Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Translational Research*. 2012, Zv. 160, 3, s. 198 - 206.
33. **H. Zhu, H. Luo and X. Zuo.** MicroRNAs: their involvement in fibrosis pathogenesis and use as diagnostic biomarkers in scleroderma. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013, Zv. 45. doi:10.1038/emm.2013.71.

34. **De Iudicibus S, Lucafò M, Martelossi S, Pierobon C, Ventura A, Decorti G.** MicroRNAs as tools to predict glucocorticoid response in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2013, *Zv.* 19, 44, s. 7947 - 7954.
35. **Davis TE, Kis-Toth K, Szanto A and Tsokos GC.** Glucocorticoids suppress T cell function by up-regulating microRNA-98. *Arthritis Rheum.* 2013, *Zv.* 65, s. 1882 - 1890. doi: 10.1002/art.37966.
36. **Ji-Qing Chen, Gábor Papp, Péter Szodoray, Margit Zeher.** The role of microRNAs in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2016, *Zv.* 15, 12, s. 1171-1180.
37. **Y. Nakamachi, S. Kawano, M. Takenokuchi, K. Nishimura, Y. Sakai, T. Chin, R. Saura, M. Kurosaka, S. Kumagai.** MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2009, *Zv.* 60, s. 1294 - 1304.
38. **V. Vlahová, K. Šmerková, M. Vaculovičová and R. Kizek.** MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství. *J. Met. Nano.* 2014, *Zv.* 1, 1, s. 18 - 22.