

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Obor fyziologie a patofyziologie člověka

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Význam vybraných biomarkerů v hodnocení a patogenezi
osteoartrózy a revmatoidní artritidy**

Zpracoval: MUDr. Ladislav Šenolt

E-mail: seno@revma.cz

Školitel: Prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc.

Pracoviště: Revmatologický ústav

Na Slupi 4

12850 Praha 2

Tel. +420 234 075 111

Fax. +420 224 914 451

Praha 2006

OBSAH	Stránka
1. ÚVOD	4
1.1. Osteoartróza	4
1.2. Revmatoidní artritida	5
1.3. Potenciální biomarkery osteoartrózy	6
1.3.1. Markery kosti	6
1.3.2. Markery synovitidy	7
1.3.3. Nespecifické markery zánětu	8
1.3.4. Markery kloubní chrupavky	9
1.4. Potenciální biomarkery revmatoidní artritidy	11
1.4.1. Autoprotilátky asociované s revmatoidní artritidou	11
1.4.2. Zánětlivé parametry	13
1.4.3. Ukazatele kloubního metabolismu	14
1.4.4. Dědičné faktory	15
1.5. Vybrané biomarkery	16
1.5.1. Pentosidin – pozdní produkt pokročilé glykace (AGE)	16
1.5.2. Oligomerní protein chrupavkové matrix (COMP)	18
1.5.3. Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF- κ B (RANKL), receptor RANK a osteoprotegerin (OPG)	19
1.5.4. S100A4 protein	20
2. CÍL PRÁCE	22
3. METODIKA	23
3.1. Pacienti a kontrolní skupina	23
3.2. Synoviální tkáň	23
3.3. Laboratorní metody	23
3.4. Klinické a rentgenové vyšetření	26
3.5. Statistické zpracování	27
4. VÝSLEDKY	28
4.1. Pentosidin u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	28
4.1.1. Zvýšená hladina pentosidinu u pacientů s osteoartrózou	29
4.1.2. Vztah pentosidinu k ukazateli destrukce kloubní chrupavky oligomernímu proteinu chrupavkové matrix (COMP) u pacientů s osteoartrózou	30
4.1.3. Vztah pentosidinu ke klinickému a rentgenovému stádiu osteoartrózy	30

4.1.4.	Vztah pentosidinu k rentgenové progresi osteoartrózy	31
4.1.5.	Zvýšená hladina pentosidinu u pacientů s revmatoidní artritidou	32
4.1.6.	Vztah pentosidinu ke klinické aktivitě a rentgenovému stadiu u pacientů s revmatoidní artritidou	32
4.2.	Oligomerní protein chrupavkové matrix (COMP) u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	32
4.2.1.	COMP v séru a synoviální tekutině	32
4.2.2.	Vztah COMP k aktivitě a rentgenovému stadiu choroby	34
4.3.	Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF-κB a osteoprotegerin u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou	35
4.3.1.	Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF-κB (RANKL)	35
4.3.2.	Osteoprotegerin (OPG)	36
4.4.	Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy	37
4.4.1.	Exprese proteinu S100A4 synoviální tkání	37
4.4.2.	S100A4 zvyšuje expresi MMP mRNA synoviálními fibroblasty in vitro	37
4.4.3.	Tvorba MMP stimulovanými synoviálními fibroblasty	38
4.4.4.	Význam NF-κB signální dráhy v indukci tvorby MMP synoviálními fibroblasty stimulovanými S100A4	38
5.	DISKUSE	40
5.1.	Pentosidin u pacientů s osteoartrózou	40
5.2.	Pentosidin u pacientů s revmatoidní artritidou	41
5.3.	Oligomerní protein chrupavkové matrix u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	42
5.4.	Osteoprotegerin a ligand pro receptor aktivující NF-κB u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	44
5.5.	Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy	45
6.	ZÁVĚR	47
7.	LITERATURA	49
8.	SEZNAM PRACÍ AUTORA	63
9.	PODĚKOVÁNÍ	65

1. ÚVOD

1.1. OSTEOARTRÓZA

Osteoartróza (OA) patří mezi nejčastější kloubní onemocnění a postihuje téměř 15 % dospělé populace. Její výskyt vzrůstá s věkem a kolem 60 roku postihuje přibližně 60% jedinců (1). Postiženy jsou především váhonosné klouby, páteř a drobné klouby rukou. Ačkoli se jedná o heterogenní onemocnění s odlišnou příčinou vzniku, výsledkem je vždy selhání kloubního aparátu důsledkem narušeného metabolismu kloubní chrupavky. Snížení funkce postiženého kloubu se klinicky projevuje námahovou bolestí a krátkou ranní ztuhlostí. Výsledkem je často invalidizující postižení jedinců. Přestože je známo mnoho rizikových faktorů, základní příčina vzniku OA není dosud zcela objasněna (2,3). Významnou úlohu má stárnutí organismu, diskutuje se o genetické predispozici (4), nicméně velmi důležité je mechanické přetížení kloubu, následné narušení metabolismu hyalinní chrupavky a homeostázy kloubní výstelky.

Vlastní začátek choroby často předchází obtíže a je charakterizován nerovnováhou mezi syntézou a degradací makromolekul kloubní chrupavky. V časně fázi OA nabývá paradoxně kloubní chrupavka na objemu. To je způsobeno zvýšeným množstvím vody následkem poškození kolagenních struktur a urychlené novotvorby molekul proteoglykanů při reparační snaze chondrocytů zachovat integritu narušené chrupavky. S progresí OA již nejsou chondrocyty schopny nahrazovat degradované makromolekuly extracelulární matrix, dochází k postupnému úbytku proteoglykanů a hyalinní chrupavka ztrácí své základní biomechanické vlastnosti, stává se křehčí a méně odolná k mechanickému zatížení. Vznikají nerovnosti kloubního povrchu, fisury a následně dochází k postupné ztrátě kloubní chrupavky. Ovlivněn je i metabolismus subchondrální kosti, která se stává rigidnější a ztrácí vlastnosti podílející se na absorpci mechanického stresu. Vedle subchondrální kostní sklerózy je další kostní komplikací tvorba osteofytů. Jsou-li změny subchondrální kosti primární nebo vznikají-li až následně po poškození kloubní chrupavky je stále předmětem diskuse (5). V současné době je za klíčovou tkáň vzniku OA považována kloubní chrupavka. Buňky chrupavky, chondrocyty, produkují řadu proteolytických enzymů a zánětlivých cytokinů. Často dochází k zánětlivým reaktivním změnám kloubní výstelky, jejíž buňky se tvorbou prozánětlivých mediátorů také významně podílí na destrukci kloubu a patogenezi OA.

1.2. REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

Revmatoidní artritida (RA) je systémové chronické zánětlivé autoimunitní onemocnění, které postihuje přibližně 1% populace (1). Projevuje se destruktivním poškozením kloubů, vede k ireverzibilním deformitám a funkčnímu omezení. Onemocnění se často manifestuje i extraartikulárně, počínaje revmatoidními uzly a konče život ohrožující vaskulitidou.

Etiologie RA není stále jednoznačně známa. Obecně je přijímána autoimunitní podstata choroby. Na podkladě aktivace zánětlivých buněk dosud neznámým (auto)antigenem je navozena zánětlivá odpověď organismu. V posledních letech se vedou spory o tom, který typ buněk je primárně odpovědný za zánětlivou reakci a destrukci kloubu u RA. Významnou úlohu sehrávají aktivované makrofágy (6) a synoviální fibroblasty (7). Přítomnost T-lymfocytů v synoviální tkáni a jejich klíčové postavení v aktivaci dalších zánětlivých buněk podporuje význam také těchto buněk v iniciálním stádiu patogeneze RA (8). Produkce protilátek a vzájemně se doplňující interakce T- a B-lymfocytů poukazuje také na B-lymfocyty jako na významné buňky podílející se na destrukci kloubu během RA (9). Začátek systémového zánětlivého onemocnění je tak pravděpodobně navozen spíše souhrou více imunokompetentních buněk než pouze jedním typem buněk.

Synoviální membrána kloubu během RA podléhá hyperplazii, dochází k infiltraci tkáně zánětlivými buňkami, což vede k tvorbě agresivní vaskularizované granulační tkáně (panu). Panus je bohatý na aktivované fibroblasty, lymfocyty a makrofágy, může přerůst kloubní povrch, infiltrovat ostatní kloubní struktury a navozovat jejich postupnou destrukci (10). Synoviální tkáň je tak považována za klíčové místo patogeneze RA.

V patogenezi RA sehrává významnou roli produkce cytokinů zánětlivými buňkami, které zprostředkovávají buněčnou komunikaci, stimulují růst buněk, jejich metabolismus a genovou expresi (11). Zánětlivá synovie je bohatým zdrojem řady prozánětlivých cytokinů, chemokinů a degradačních enzymů. Mezi klíčové prozánětlivé cytokiny patří interleukin (IL)-1 a tumor nekrotizující faktor (TNF)- α , jejichž úloha byla extenzivně zkoumána na úrovni zvířecích modelů artritidy (12,13) a léčba zaměřená proti IL-1 a TNF- α našla již své uplatnění v terapii RA (13,14). Výsledný obraz RA na molekulární úrovni je navozen nerovnováhou mezi tvorbou prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a následnou nadprodukcí proteolytických enzymů, které vedou k destrukci kloubu.

1.3. POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY OSTEOARTRÓZY

Diagnóza osteoartrózy se opírá o kombinaci klinického a rentgenového nálezu, přičemž rentgenový snímek často vypovídá o poměrně pokročilém stádiu choroby. Mezi mírou obtíží a rentgenovým nálezem existuje často významná diskrepance. Při sledování efektu léčby na progresi choroby je nutno opakovat rentgenové vyšetření s odstupem 1-3 let. Dříve totiž nelze získat validní výsledky hodnotící progresi choroby, tj. zúžení kloubní štěrbiny. Biologické markery by měly představovat alternativu, která by tento interval dokázala zkrátit na 1-3 měsíce (15).

Molekulární markery představují do budoucna naději pro hodnocení OA a rozvíjející se výzkum v oblasti molekulárních markerů by měl přispět k jejich využití pro:

1. diagnostiku OA
2. detekci jedinců s časným začátkem choroby
3. predikci dalšího vývoje choroby
4. hodnocení efektu tzv. chorobu modifikující léčby
5. pochopení patogeneze OA na podkladě specifického molekulárně-buněčného procesu.

Molekulární markery OA by měly reflektovat metabolismus kloubní tkáně, tj. hyalinní chrupavky, kosti nebo synoviální membrány (tab.1.) (16). Analyzovat je lze v tělních tekutinách. Většina markerů, dříve než vstoupí do cévního řečiště, může být enzymaticky degradována v synoviální tekutině nebo může vstoupit do lymfatického systému. Koncentrace markerů v séru a moči odráží metabolismus všech kloubů v těle a může být ovlivněna jak synovitiidou, která zvyšuje jejich clearance z kloubní tekutiny (17), tak funkcí jater či ledvin, věkem, hmotností, pohlavím, rasou nebo fyzickou aktivitou. Specifický molekulární marker OA by měl mít vyšší koncentraci v synoviální tekutině a měl by odrážet metabolické změny postiženého kloubu.

Markery kosti

Subchondrální kost během artrotického procesu podléhá remodelačním změnám ve smyslu urychlené kostní novotvorby, pozorována jsou drobná mikropoškození kosti, dochází k cévní novotvorbě, aktivaci osteoblastů a produkci prozánětlivých mediátorů (18). Metabolický obrat kosti je tak reflektován markery syntézy i resorpce kosti.

Tabulka 1. Rozdělení molekulárních markerů osteoartrózy podle místa jejich tvorby

	Degradace	Syntéza
Kost	CTX-I, NTX-I PYD a DPD BSP	PICP, PINP Osteokalcin Kostní ALP
Kloubní chrupavka	CTX-II COMP PYD Keratansulfátové epitopy (např.5D4)	PIICP, PIIANP a PIIBNP Chondroitinsulfátové epitopy (např.846) YKL-40
Synoviální membrána	Glc-Gal-PYD CTX-I a NTX-I PYD	PIIINP Hyaluronan YKL-40 COMP MMPs (1,2,3,9), TIMPs (1,3)
Systémový zánět		CRP Interleukiny

CTX a NTX, C- and N-terminal crosslinking telopeptide of collagen (C- a N-terminální příčně vazebné telopeptidy kolagenu); PCP a PNP, C- and N-propeptide of collagen (C- a N-propeptid kolagenu); PYD a DPD, pyridinolin i deoxypyridinolin; Glc-Gal-PYD, glukosyl-galaktosyl pyridinolin; BSP, bone sialoprotein (kostní sialoprotein); ALP, alkalická fosfatáza; COMP, cartilage oligomeric matrix protein (oligomerní protein chrupavkové matrix); YKL-40, glykoprotein 39; MMP, metaloproteinázy; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases (tkáňový inhibitor metaloproteináz); CRP, C-reaktivní protein.

Markery syntézy kosti jsou reprezentovány sérovým osteokalcinem, kostní alkalickou fosfatázou (ALP) a propeptidy kolagenu typu I (PINP a PICP). Není známo příliš mnoho o jejich významu při hodnocení OA, nicméně byla např. popsána asociace vyšší hladiny osteokalcinu s progresí kloubního postižení u pacientů s OA kolenních kloubů ve smyslu zúžení kloubní štěrbiny (19).

Močový deoxypyridinolin, terminální příčně vazebný telopeptid kolagenu typu I (CTX-I a NTX-I) a kostní sialoprotein (BSP) představují resorpční markery kosti. Neexistuje dosud jednotný názor na význam jejich uplatnění při hodnocení OA, nicméně podle rozsáhlé Chingfordské studie jsou koncentrace CTX-I a NTX-I srovnatelné u postmenopauzálních pacientek s progredující OA kolenních kloubů s koncentracemi u pacientek s osteoporózou (20). Vyšší sérové hladiny CTX-I byly prokázány též u pacientů s erozivní formou OA rukou (21). Lze tak usuzovat na asociaci progresu a závažnosti OA se zvýšeným remodelačním obratem kosti. Hladiny močového pyridinolinu a deoxypyridinolinu se v porovnání s kontrolami u OA jedinců příliš neliší. V oblasti spojení chrupavky a subchondrální kosti je ve větším množství zastoupen kostní sialoprotein. Bylo prokázáno, že časně po poranění kolenního kloubu vzrůstá jeho množství v synoviální tekutině a zvýšené sérové koncentrace BSP měly dokonce vztah k progresi OA (22).

Markery synovitidy

Buňky artrotická synovie, kloubní chrupavky i subchondrální kosti participují na syntéze prostaglandinů, proteolytických enzymů, cytokinů i růstových faktorů, a přispívají tak k zánětlivému poškození kloubu (23). U OA existuje asociace mezi mírou synovitidy a progresí poškození kloubu.

Glykoprotein-39 (YKL-40), kyselina hyaluronová a N-terminální propeptid kolagenu typu III (PIIINP) jsou považovány za potenciální ukazatele synovitidy. Vyšší sérová hladina glykoproteinu-39 byla zjištěna u pacientů s pokročilou formou OA kolenních kloubů, jeho koncentrace v synoviální tekutině byla až desetkrát vyšší než v séru a u pacientů s OA kyčelních kloubů dokonce korelovala s C-reaktivním proteinem (CRP) (24,25). Stanovení kyseliny hyaluronové v séru mělo prediktivní význam při hodnocení zúžení kloubní štěrbiny (26) a PIIINP při hodnocení aktivity a kloubního poškození u OA kolenních kloubů (27). Nicméně se jedná o markery nespecifické, na jejichž syntéze se podílí řada jiných buněk. V tomto směru je přínosnější stanovení glykosylovaného pyridinolinu, tzv. glukosyl-galaktosyl pyridinolinu (Glc-Gal-PYD), který je přítomen zejména v synovii a jehož zvýšené hladiny v moči u OA pacientů měly významný vztah k symptomům choroby (27).

Nespecifické markery zánětu

V posledních letech se na OA pohlíží jako na více méně zánětlivé onemocnění s lehce zvýšenou hladinou sérového CRP. Některé studie poukazují na CRP jako na ukazatel závažnosti a dalšího vývoje choroby (28,29). Nicméně kromě akutního či chronického zánětu existuje mnoho dalších faktorů - např. věk, diabetes mellitus, ateroskleróza, tělesná hmotnost, kouření či alkohol, které mohou hladinu CRP ovlivnit, a představovat tak limitaci pro jeho další využití při bližším hodnocení OA.

V artrotické tkáni se významně uplatňuje zvýšená tvorba prozánětlivých cytokinů, která vede k nerovnováze mezi expresí matrixových metaloproteináz (MMP) a jejich tkáňových inhibitorů (TIMP) ve prospěch proteolytických enzymů, jež přispívají k destrukci hyalinní chrupavky a narušení kloubu (30). U pacientů s OA byly oproti zdravým kontrolám zjištěny vyšší plazmatické koncentrace MMP-3 a MMP-9, přičemž jedinci s generalizovanou formou OA měli vyšší hodnoty obou MMP (31). U jedinců s OA kolenních kloubů byly zjištěny i vyšší plazmatické koncentrace TIMP-1 (32). Na druhé straně u jedinců s OA kyčelních kloubů byly oproti zdravým kontrolám zjištěny nižší sérové hladiny TIMP-1, jež měly

dokonce prediktivní význam dalšího vývoje rentgenové progresse OA (33). Prozánětlivé cytokiny (IL-1, TNF- α) nemají větší význam jako markery OA, nicméně jejich lehce zvýšené hladiny mohou negativně ovlivnit reparativní proces mezibuněčné matrix artrotické chrupavky (34). Větší význam by mohlo mít snad stanovení TNF- α solubilního receptoru II, který v kombinaci s jinými markery vykazoval diagnostický potenciál u OA (16).

Jedním z významných parametrů zánětu je oxid dusnatý (NO), multifunkční molekula, která sehraává úlohu v řadě biologických procesů (35). Kloubní chrupavka makroskopicky více postižená artrotickým procesem vykazuje větší množství NO oproti oblastem nepostiženým, a vyšší hladiny NO byly pozorovány u OA pacientů i v séru a synoviální tekutině (36,37). Vlivem glykačního a oxidačního stresu vznikají v těle takzvané pozdní produkty pokročilé glykace (AGE - advanced glycation end product), které se oproti jiným tkáním zvýšeně hromadí v kloubní chrupavce (38), ovlivňují její fyzikální, biochemické i buněčné vlastnosti a předpokládá se jejich významná role v patogenezi OA. V moči pacientů s OA byl zjištěn zvýšený AGE produkt – pentosidin, jež měl určující význam pro přítomnost choroby (39). Nicméně se jedná o ukazatel nespecifický a jeho vyšší hodnoty mohou ovlivnit i jiné patologické stavy: např. diabetes mellitus, renální insuficience či chronické zánětlivé/autoimunitní stavy (40).

Markery kloubní chrupavky

Fragmenty molekul extracelulární matrix mohou v tělních tekutinách reflektovat metabolický obrat kloubní chrupavky. Základními markery syntézy neboli reparace chrupavky jsou propeptidy kolagenu typu II (PIINP, PIICP), některé epitopy chondroitinsulfátového řetězce, glykoprotein 39 (YKL-40) a kyselina hyaluronová. Kolagen typu II představuje téměř 80% suché váhy kloubní chrupavky a mezi přímé ukazatele jeho syntézy patří propeptidy kolagenu II. N-propeptid existuje ve dvou variantách (IIA a IIB), přičemž varianta IIA představuje vývojovou formu a může být znovu tvořena artrotickou chrupavkou (41). V počátečních stádiích OA je destrukce kloubní chrupavky kompenzována zvýšenou syntézou kolagenu, což je provázeno zvýšenou hodnotou C-propeptidu kolagenu II v kloubní chrupavce a synoviální tekutině (42,43). Koncentrace C-propeptidu v synoviální tekutině vykazovala navíc ve 4-leté prospektivní studii prediktivní charakter zúžení tibiofemorální kloubní štěrbiny u pacientek s časnou OA (43). Na druhé straně byly v séru pacientů s OA kolenních kloubů pozorovány nižší koncentrace N-propeptidu (44). Agrekan je tvořen jaderným proteinem, řetězci glykosaminoglykanů (zejména keratansulfát a chondroitinsulfát) a patří mezi hlavní

nekolagenní molekuly kloubní chrupavky. Je odpovědný za elastické vlastnosti chrupavky a chrání kolagen před proteolytickým štěpením (45). Navzdory jeho zvýšené syntéze v časně fázi OA dochází během progresu choroby k jeho úbytku. Některé epitopy chondroitinsulfátového řetězce (např. epitop 846) mohou odrážet anabolický proces a jejich snížené hodnoty v séru OA pacientů mohou představovat narušenou reparační kapacitu artrotické chrupavky v pozdních stádiích choroby (16)

Degradace kloubní chrupavky může být monitorována stanovením keratansulfátu, příčně vazebného C-telopektidu kolagenu typu II (CTX-II) nebo oligomerního proteinu chrupavkové matrix (COMP). Stanovení keratansulfátu v tělních tekutinách nemá pravděpodobně větší význam při hodnocení vývoje choroby (19,46). V časně fázi OA nebo krátce po poranění kloubu se do synoviální tekutiny zvýšeně uvolňuje telopeptid CTX-II (47). Jeho koncentrace jsou významně vyšší v moči u pacientů s OA oproti zdravým kontrolám (48,49). Vyšší hladiny CTX-II byly zaznamenány u pacientů s OA kyčelních než kolenních kloubů (49). U pacientů s OA kolenních kloubů měly navíc hodnoty CTX-II v moči prediktivní význam dalšího vývoje choroby a byly též asociovány s rychle progredující formou OA kyčelních kloubů (42,48).

V posledních letech je věnováno mnoho pozornosti analýze nekolagenního proteinu COMP, který je také považován za ukazatel destrukce kloubní chrupavky (50,51). COMP koreloval s abnormalitami kostní scintigrafie kolenních kloubů (52) a podle několika studií je považován za potenciální prediktivní marker progresu OA kolenních i kyčelních kloubů (53,54). Sérové hladiny COMP navíc odrážely klinicky přítomnou synovitidu u pacientů s OA kolenních kloubů (55) a byly charakterizovány jako časný indikátor choroby (56).

POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY REVMATOIDNÍ ARTRITIDY

U pacientů se symetrickou polyartritidou je někdy obtížné rychle diferencovat mezi diagnózu časného stádia revmatoidní artritidy nebo jiného zánětlivého revmatického onemocnění. RA je chronické zánětlivé onemocnění, které vede k destrukci kloubů, ireverzibilním deformitám a funkčnímu omezení. Diagnóza choroby se v současné době opírá o přepracovaná kritéria Americké revmatologické asociace (ACR, American College of Rheumatology) z roku 1987 (57). Senzitivita těchto kritérií v časném stádiu choroby je však nízká. Revmatoidní faktor nemusí být pozitivní až u 20% pacientů a rentgenové známky kostní eroze či destrukce chrupavky nemusí být patrný během prvních týdnů či měsíců choroby. ACR kritéria též neúplně odpovídají na dvě základní otázky – určení prognózy choroby a odpovědi na léčbu. Ireverzibilní změny kloubního aparátu často vznikají již v průběhu prvních let onemocnění (58). Proto v současné době existuje konsensus včasné a agresivní léčby RA, která může přispět ke klinickému a funkčnímu zlepšení, a zpomalit rentgenovou progresi, eventuelně navodit remisi choroby (59). S ohledem na zvážení rizika nežádoucích účinků, prospěchu a ceny léčby je v současné době doporučováno začít léčbu preparáty ze skupiny tzv. chorobu modifikujících antirevmatických léků (metotrexát, sulfasalazin, hydroxychlorochin) a v případech nedostatečné odpovědi nebo intolerance pak zahájit biologickou léčbu (blokátory TNF – infliximab, etanercept, adalimumab) (60).

V klinické praxi a při hodnocení lékových studií se v současné době užívá několik prediktivních ukazatelů rentgenové progresy RA. Jedná se jednak o klinické a funkční známky aktivity choroby (DAS28, HAQ, apod.), laboratorní ukazatele zánětu (FW, CRP), genetické markery (HLA-DRB1) a rentgenový nález (kostní eroze). Nicméně tyto ukazatele mají také svá omezení a nízkou senzitivitu. Kostní eroze a destrukce chrupavky mohou probíhat nezávisle na zánětlivém postižení kloubního aparátu a progresy kloubního postižení tak může pokračovat navzdory nízké zánětlivé aktivitě a klinickému zlepšení (61). Mezi nové potenciální markery pro hodnocení RA patří některé nové autoprotilátky, zánětlivé parametry, ukazatele kloubního metabolismu a dědičné faktory (tab.2).

Autoprotilátky asociované s revmatoidní artritidou

RA je autoimunitní onemocnění, které vzniká na podkladě zvýšené aktivity imunitního systému. Dominantní postavení při vzniku autoimunitní choroby má narušení tolerance vůči vlastním tkáním, vznik autoreaktivních T- a B-lymfocytů a následná aktivace dalších imunokompetentních buněk s tvorbou autoprotilátek (8,9).

Tabulka 2. Potenciální markery hodnocení revmatoidní artritidy.

Autoprotilátky	RF, Anti-CCP, RA-33
Zánětlivé parametry	FW, CRP, S100 proteiny, AGE/pentosidin, NO, IL, MMP
Parametry metabolismu kloubu	kyselina hyaluronová, PIINP, YKL-40, Glc-Gal-PYD, CTX-I, CTX-II, COMP
Genetické faktory	HLA-DR4, HLA-DM

RF, revmatoidní faktor; anti-CCP, protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu; FW, sedimentace erytrocytů; CRP, C-reaktivní protein; AGE, advanced glycated endproduct (pozdní produkt pokročilé glykace); NO, nitric oxide (oxid dusnatý); IL, interleukin; MMP, matrixová metaloproteináza; PNP, N-propeptid kolagenu; YKL-40, glykoprotein 39; Glc-Gal-PYD, glukosyl-galaktosyl pyridinolin; CTX, C-terminal crosslinking telopeptide of collagen (C-terminální příčně vazebné telopeptidy kolagenu); COMP, cartilage oligomeric matrix protein (oligomerní protein chrupavkové matrix); HLA, human leukocyte antigen (transplantační antigen).

Revmatoidní faktor je protilátka zaměřená proti Fc části molekuly IgG a byl původně objeven v roce 1940 (62). Nejčastěji používaným izotypem revmatoidního faktoru je IgM, který má senzitivitu přibližně 90%. Ostatní izotypy mají senzitivitu nižší. K detekci revmatoidního faktoru se nejčastěji používá latex fixační test nebo metoda ELISA. Nicméně pozitivita revmatoidního faktoru může být přítomna u dalších systémových revmatických onemocnění, některých bakteriálních infekcí či nádorových onemocnění. S věkem navíc stoupá výskyt revmatoidního faktoru i u zdravé populace (2-20%) (63). Existuje však jistý vztah mezi vysokou koncentrací revmatoidního faktoru a systémovými příznaky, vaskulitidou, těžkým průběhem a další prognózou choroby. Sledování revmatoidního faktoru v rámci monitorování průběhu choroby nebo odpovědi na léčbu je však sporné.

Ostatní protilátky (ANA, RA33, ANCA, apod.) se mohou také vyskytovat v průběhu RA, jejich specifita pro RA je však nízká. V poslední době se stává velmi oblíbené stanovení protilátek proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP). Hlavní antigenní determinantou těchto protilátek je citrulin - zvláštní aminokyselina, která vzniká post-translační enzymatickou modifikací argininového zbytku polypeptidového řetězce. Historie anti-CCP má souvislost s objevem protilátek proti antiperinukleárnímu faktoru (APF) a keratinu (AKA). Ukázalo, že oba druhy protilátek reagují s filagrinem – citrulinovaným proteinem, který je asociován s keratinovými filamenty (64). Citrulinované proteiny i protilátky proti těmto proteinům (anti-CCP) se nachází v RA synoviální tkáni a přítomnost anti-CCP protilátek v séru je vysoce specifická (> 95%) pro diagnózu RA (65). Detekce anti-CCP protilátek má navíc prediktivní význam strukturálního poškození u jedinců s časným

začátkem choroby a u jedinců s nediferencovanou artritidou trvající méně než 3 měsíce dokáží anti-CCP protilátky s vysokou citlivostí odlišit pacienty, kteří vyvinou perzistující RA (66,67). Specificita tohoto prediktivního nálezu se zvyšuje při kombinaci anti-CCP s pozitivitou IgM revmatoidního faktoru. Efekt léčby na sérové hladiny autoprotiátok je diskutabilní (68).

Zánětlivé parametry

Hyperplastická synoviální tkáň infiltrovaná zánětlivými buňkami představuje klíčovou tkáň patologického procesu RA. Základem je nerovnováha mezi tvorbou pro- a protizánětlivých cytokinů, která vede k nadměrné tvorbě enzymů degradujících kloubní matrix. Kromě lokálně zánětlivých změn je v popředí systémová zánětlivá odpověď.

Systémovým ukazatelem probíhajícího zánětu je CRP, jehož tvorba játry je stimulována prozánětlivými cytokiny (IL-6, IL-1, TNF). Již dříve bylo prokázáno, že CRP reflektuje aktivitu choroby lépe než sedimentace erytrocytů, může mít vztah k rentgenové progresi a může klesat u pacientů s dobrou klinickou odpovědí na chorobu modifikující antirevmatickou léčbu (69). Ačkoli prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6 a TNF) a MMP mají klíčové postavení v patogenezi RA, jejich sérové hladiny nejsou příliš specifické a nemají významnější uplatnění při hodnocení RA (70). Nicméně sérové koncentrace MMP-3 mohou odrážet zánětlivou aktivitu choroby a MMP-1 spíše vznik nových kostních erozí (71).

S100 proteiny patří mezi kalcium vázající molekuly, jež mohou představovat významné ukazatele probíhajícího zánětu. Fagocytární buňky kloubní výstelky a synoviální tekutiny tvoří významné množství heterodimeru S100A8/S100A9 (kalprotektin). Zvýšené sérové koncentrace kalprotektinu významně korelovaly s klinickou i laboratorní aktivitou RA (72,73). Nebylo zatím prokázáno, že by měly prediktivní význam rentgenové progresi choroby (73). Jejich zvýšené koncentrace v séru však mohou předznamenávat relaps choroby již týdnů před vzestupem standardních zánětlivých ukazatelů a vlastní manifestací choroby (74). Totéž platí pro další S100 protein S100A12 (kalgranulin C), jak bylo prokázáno u pacientů s juvenilní idiopatickou artritidou (75).

Při aktivaci imunokompetentních buněk během RA je produkována řada reaktivních kyslíkových radikálů, roste oxidační stres a dochází k hyperplazii kloubní výstelky a posílení zánětlivé odpovědi (76). Jedním z významných radikálů je oxid dusnatý (NO), jehož zvýšené

koncentrace u pacientů s RA korelovaly s aktivitou choroby, reaktanty akutní fáze i některými zánětlivými cytokiny (77). Vedle hyperglykémie přispívá oxidační stres významně k tvorbě AGE, jejichž hlavním představitelem je pentosidin. Bylo popsáno, že zvýšené hladiny pentosidinu u pacientů s RA korelovaly s klinickou i laboratorní aktivitou choroby a jsou tak považovány za nový potenciální biomarker aktivity RA (78).

Ukazatele kloubního metabolismu

RA je chronické zánětlivé onemocnění projevující se destrukcí kloubů. Metabolický obrat kloubního aparátu může být reflektován ukazateli degradace či novotvorby jednotlivých komponent extracelulární matrix kloubní výstelky, chrupavky a kosti.

Mezi markery lokálně probíhající synovity, které mohou odrážet aktivitu choroby a některé mohou mít i prediktivní charakter progresu kloubního postižení, patří kyselina hyaluronová, N-propeptid kolagenu typu III a glykoprotein-39 (YKL-40) (79-81). Více specifický pro kloubní výstelku je však glykosylovaný pyridinolin, tzv. glukosyl-galaktosyl pyridinolin (Glc-Gal-PYD). Nedávno byla prokázána významná asociace jeho zvýšených hladin s progresí kloubních erozí během jednoho roku u pacientů s časnou RA (82).

Revmatoidní artritida je provázena narušeným metabolickým obratem kloubu, což je provázeno elevací parametrů destrukce kosti a chrupavky. Zvýšené hladiny příčně vazebných telopeptidů kolagenu CTX-I a CTX-II v moči vykazovaly prediktivní charakter rentgenové progresu u pacientů s časnou RA (83). Mnohem lepší prediktivní význam progresu choroby měly zejména u jedinců bez rentgenových známek kloubní destrukce. Po terapii pacientů s RA byl pozorován významný pokles ukazatelů destrukce kosti i kloubní chrupavky (CTX-I, CTX-II) (83). Navíc kombinovaná antirevmatická terapie vykazovala lepší efekt na pokles močového CTX-II. Velikost tohoto poklesu měla také významný vztah k dalšímu vývoji RA ve smyslu rentgenové progresu choroby. V posledních letech je extenzivně zkoumán význam nekolagenního proteinu COMP. Vedle chondrocytů se však na jeho tvorbě mohou podílet i buňky synoviální membrány a dalších měkkých tkání kloubu (84). Byla nalezena významná asociace mezi zvýšenými hladinami COMP u pacientů s časnou RA a progresí choroby (85). Nicméně v nedávné prospektivní 5-leté studii nebyl prokázán vztah COMP k zánětlivé aktivitě, ani rentgenové progresi choroby (86). Novotvorba a degradace kosti na molekulární úrovni je regulována proteiny systému osteoprotegerin (OPG), ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF- κ B (RANKL) a jeho receptor RANK (87). Zvýšená tvorba RANKL

aktivovanými T-lymfocyty, synoviálními fibroblasty a osteoblasty přispívá k osteoklastogenezi a odbourávání kosti. Opačně působí molekula OPG, která váže RANKL, tím tento ligand inaktivuje a zabraňuje kostní resorpci. V synoviální tekutině pacientů s RA byla pozorována zvýšená koncentrace solubilního RANKL a nízká koncentrace OPG, což může reflektovat negativní kostní metabolismus již na počátku choroby (88).

Dědičné faktory

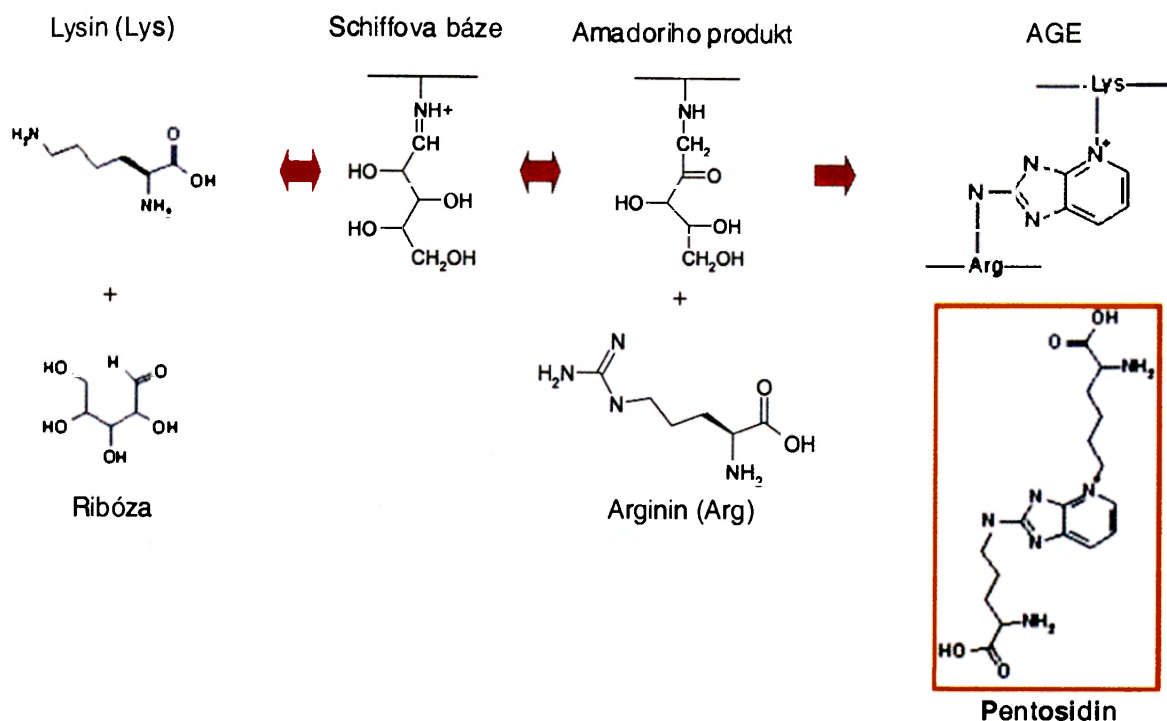
Příčina vzniku RA není dosud plně objasněna, nicméně se předpokládá, že její vznik může být spuštěn dosud neznámým činitelem u geneticky predisponovaných jedinců. Je pozorována významná asociace RA s molekulami HLA-systému, a to zejména s HLA-DR4 antigeny. V poslední době byla prokázána důležitá role genů HLA-DM, přičemž kombinace alel HLA-DM s HLA-DRB1 může pomoci odhalit pacienty se špatnou prognózou choroby (89). Pozornost je věnována pouze některým HLA-DR4 genům (alelám), které kódují totožný úsek aminokyselin v oblasti tzv. žlábků β glykoproteinového řetězce. Tento úsek se nazývá sdílený epitop. Již dříve bylo pozorováno, že pacienti se sdílenými epitopy HLA-DRB1 odpovídali lépe na agresivnější kombinovanou antirevmatickou léčbu (90). V současnosti bylo potvrzeno, že množství sdílených epitopů má vztah k závažnosti choroby a může přispět při výběru pacientů pro biologickou léčbu (91). Stanovení sdílených epitopů, ani polymorfismu genů pro některé cytokiny však dosud neumožnilo předpovědět klinickou odpověď na TNF blokující léčbu u pacientů s RA (92).

Vedle polymorfismu řady cytokinů, receptorů a transkripčních faktorů, je v posledním roce extenzivně zkoumán například gen pro tyrosin fosfatázu PTPN22, protein s regulační aktivitou v T- i B-lymfocytech. Zjistilo se, že jeho polymorfismus významně zvyšuje riziko vzniku revmatoidní artritidy s pozitivitou revmatoidního faktoru, a to nezávisle na antigenech HLA-systému (93). Na klinické úrovni však nejsou genetické faktory zatím běžně využívány.

1.4.VYBRANÉ BIOMARKERY

1.4.1. PENTOSIDIN - POZDNÍ PRODUKT POKROČILÉ GLYKACE

Pozdní produkty pokročilé glykace (AGE) vznikají spontánní neenzymatickou modifikací molekul s delším biologickým poločasem rozpadu. Jedná se o složitý pochod (Obr.1.), při kterém se aldehydová nebo ketoskupina cukru navazuje na aminoskupinu proteinů a dává vznik časným produktům glykace (Schiffova báze). Později dochází k pomalému přeuspořádání vazeb a vzniká tzv. Amadoriho produkt - intermediární produkt glykace. Další přeměnou se tato sloučenina během týdnů až měsíců přestaví na ireverzibilní produkty pokročilé glykace, které se po svém objeviteli nazývají Maillardovy sloučeniny (94). Vedle neenzymatické glykace se in vivo na zvýšené tvorbě AGE podílí a jejich vznik urychluje oxidace (95). Heterogenní skupinu AGE představují dva základní typy modifikovaných struktur. Jedná se o adiční sloučeniny (adukty) a příčně vazebné elementy (kroslinky). Pentosidin patří do skupiny tvořící příčné vazby a představuje nejlépe charakterizovaný ukazatel glykoxydačního zatížení organismu.



Obr.1. Schematické zjednodušení Maillardovi reakce. Redukující cukr se váže na aminokyselinový zbytek proteinového řetězce a dává vznik časným, intermediárním, a následně pozdním produktům pokročilé glykace (AGE). Chemická struktura pentosidinu je znázorněna v červené čarce.



Za fyziologických podmínek vzrůstá množství AGE důsledkem přirozeného stárnutí a hladiny AGE ve tkáních a v séru stoupají zejména po dosažení sedmdesátého roku. V organismu existují tři základní mechanismy, které ovlivňují množství AGE (96). Jedná se jednak o možnost enzymatické redukce reaktivních sloučenin kyslíku, což vede ke snížení tvorby AGE. Dále existence strukturální specifity, která umožňuje glykaci tkání na více vnímavých místech cílových molekul. Jako poslední mechanismus ovlivňující množství AGE je přítomnost specifických receptorů pro AGE na imunokompetentních a endotelových buňkách. Podle typu specifického receptoru pro AGE může dojít k odstranění glykačních produktů z organismu nebo k aktivaci prozánětlivé odpovědi (97). Navíc některé patologické stavy (např. renální insuficience či diabetes mellitus) přispívají ke sníženému uvolňování, zvýšené tvorbě a hromadění AGE v organismu (96,98). Předpokládá se, že zvýšené množství AGE při těchto chorobách může vést k modifikaci některých proteinů arteriální intimy, a může tak přispět k rozvoji aterosklerózy (99). Škodlivé působení AGE spočívá ve dvou základních mechanismech. Zvýšená akumulace AGE v organismu může mít jednak negativní vliv na fyzikální vlastnosti tkání, které jsou více vnímavé k mechanickému poškození (100), a dále může ovlivňovat i buněčné pochody na molekulární úrovni (97). AGE mohou stimulovat intracelulární signální molekuly (MAP-kinázy, NF-κB) a přispět ke zvýšené tvorbě adhezních molekul, cytokinů, růstových faktorů a proteolytických enzymů. Tím dochází k aktivaci zánětlivé odpovědi a destruktivnímu poškození okolní tkáně. Významnou roli při tomto procesu sehrává receptor pro AGE (RAGE), který patří do skupiny imunoglobulinové superrodiny buněčných povrchových molekul (97).

Věk představuje významný rizikový faktor pro vznik OA. Za fyziologických podmínek dochází v organismu k akumulaci glykačních produktů právě důsledkem přirozeného stárnutí. Bylo zjištěno, že v kloubní chrupavce vzroste množství pentosidinu mezi obdobím adolescence a 80. rokem věku více než 30-ti násobně (38). Vysvětlením tohoto je fakt, že kolagen typu II má biologický poločas delší než 100 let. Neenzymatická modifikace kolagenních struktur negativně ovlivňuje kvalitu, metabolický obrat a reparační kapacitu hyalinní chrupavky, a finálně může přispět ke snížení odolnosti vůči působení mechanických sil, kterým je chrupavka v průběhu života vystavena (39). Zvýšená akumulace AGE kloubní chrupavkou je tak považována za jeden z molekulárních mechanismů, kterým se věk podílí na patogenezi OA (101).

Zánětlivý proces představuje molekulárně buněčnou souhru, která vede k tvorbě cytokinů, chemokinů, růstových faktorů, proteolytických enzymů a reaktivních kyslíkových radikálů. V místech chronického zánětu jsou významným zdrojem kyslíkových radikálů zejména aktivované makrofágy a je tudíž pochopitelné, že větší zánětlivá aktivita bývá spojena se zvýšenou tvorbou AGE (103). Revmatoidní artritida je chronické zánětlivé onemocnění, u kterého je pozorována zvýšená akumulace AGE v kloubní chrupavce (40) i v synoviální tkáni (104). Zvýšené množství AGE v kloubní chrupavce u RA pacientů může mít, jako u OA, podobné a pravděpodobně i významnější účinky vedoucí k destrukci chrupavky. Předpokládá se, že AGE mohou stimulovat tvorbu IL-6 osteoblasty (105) a mohou měnit kvalitu kostního kolagenu ve prospěch zvýšené fragility a zvýšeného rizika vzniku fraktur (106). Nedávno byl také objeven glykovaný IgG, který má narušené vazebné i efektorové funkce. Takto modifikovaný imunoglobulin může vést k tvorbě autoprotilátek - IgM anti-IgG-AGE, které vykazovaly vztah k přítomnosti RF a jsou pokládány za nový sérologický marker aktivity RA (107). Zvýšené hladiny pentosidinu byly pozorovány v séru, synoviální tekutině a moči RA pacientů (108). Z těchto tělních tekutin představuje sérový pentosidin hlavní indikátor systémové zánětlivé aktivity onemocnění a je považován za marker chronického zánětu a oxidačního stresu.

1.4.2. OLIGOMERNÍ PROTEIN CHRUPAVKOVÉ MATRIX (COMP)

COMP je nekolagenní glykoprotein kloubní chrupavky, který patří mezi kalcium vázící proteiny trombospondinové rodiny extracelulárních proteinů. Byl objeven jako specifický protein hyalinní chrupavky (109), ale v pozdějších letech se ukázala jeho přítomnost také v jiných kloubních tkáních, např. ligamentech, meniscích či synoviální tkáni (84). COMP má molekulovou hmotnost větší než 500 kDa a je tvořen pěti identickými podjednotkami. Fyziologická úloha COMP však není doposud plně objasněna. Důležitou roli pravděpodobně sehrává v chondrogenезi a interakci chondrocytů s mezibuněčnou hmotou chrupavky. COMP se může vázat na kolageny typu I, II a IX, a bylo popsáno, že mutace COMP mají vztah k rozvoji pseudoachondroplazie a mnohočetné epifyzeální dysplazie (110). COMP může vázat také některé hydrofobní molekuly (např. vitamin D) a působit jako jejich rezervoár (111). Nedávno bylo prokázáno, že COMP vazbou na integrinové receptory zprostředkovává interakci chondrocytů a synoviálních fibroblastů s extracelulární matrix (112,113). To představuje možný mechanismus ukotvení synoviálních fibroblastů k matrix kloubní chrupavky, což může podporovat destruktivní proces u RA.

COMP patří mezi jeden z nejvíce vyjádřených genů v kloubní chrupavce a je považován za ukazatel její destrukce (50,51). Krátce po poranění kloubu a v časných stádiích OA dochází k vzestupu hladin COMP v synoviální tekutině postiženého kloubu (114). Nicméně zvýšený COMP v synoviální tekutině v časných stádiích choroby je spíše odrazem zvýšené syntézy COMP, než projevem degradace hyalinní chrupavky (115). Vyšší hladiny COMP byly také pozorovány v séru u pacientů s OA, vykazovaly vztah k množství postižených kloubů a závažnosti tohoto postižení (116), stejně tak jako ke klinicky prokázané synovitidě kolenních kloubů (55). U pacientů s OA kyčelních kloubů byly zvýšené koncentrace COMP v séru pozorovány již v období před rentgenovým postižením kloubů (56) a COMP v séru měl navíc prediktivní charakter dalšího vývoje OA kyčelních i kolenních kloubů ve smyslu zúžení kloubní štěrbiny (53,54).

Zvýšené hladiny COMP v séru byly pozorovány také v časně fázi RA (85), přičemž vyšší hodnoty COMP byly u pacientů, u kterých došlo k destrukci kyčelních kloubů (117). Stanovení koncentrace COMP mělo v nedávné práci dokonce prediktivní charakter dalšího vývoje RA ve smyslu závažnějšího postižení kloubů (118). Navíc při biologické léčbě i nitrokloubní instalaci kortikosteroidů RA pacientům byl pozorován významný pokles sérových hodnot COMP (119,120).

1.4.3. LIGAND PRO RECEPTOR AKTIVUJÍCÍ TRANSKRIPČNÍ FAKTOR NF- κ B (RANKL), RECEPTOR RANK A OSTEOPROTEGERIN (OPG)

Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF- κ B (RANKL) je součástí TNF rodiny. Spolu s receptorem aktivujícím transkripční faktor NF- κ B (RANK) a neaktivním receptorem pro RANKL osteoprotegerinem (OPG) představují proteiny ovlivňující kostní remodelaci a imunitní proces (121). Existuje několik forem RANKL - nitrobuněčná, vázaná na buněčnou membránu a extracelulární. Tvorba RANK a RANKL je stimulována zejména prozánětlivými cytokiny (IL-1, TNF- α). RANKL je tvořen řadou buněk včetně aktivovaných T-lymfocytů, synoviálních fibroblastů a osteoblastů. Zvýšená produkce RANKL umožňuje diferenciaci a aktivaci osteoklastů. Tento děj je zprostředkován pomocí interakce volného či na buňky vázaného RANKL s receptorem RANK na prekurzorech osteoklastů. Další buňky tvořící receptor RANK jsou dendritické buňky a T-lymfocyty (122). U těchto imunokompetentních buněk vede interakce mezi RANK a RANKL k aktivaci T-lymfocytů a delšímu přežívání dendritických buněk, což má významnou úlohu v patogenezi zánětu. Zvýšené množství

RANKL bylo pozorováno u pacientů s RA v synoviální tkáni, zejména pak v oblastech kloubní destrukce (123). Předpokládá se tak významná úloha systému RANK/RANKL/OPG při vzniku periartikulární osteoporózy a destrukce kosti během chronického zánětu. V tomto procesu je důležitá zejména nerovnováha mezi tvorbou RANKL a OPG ve prospěch molekuly RANKL.

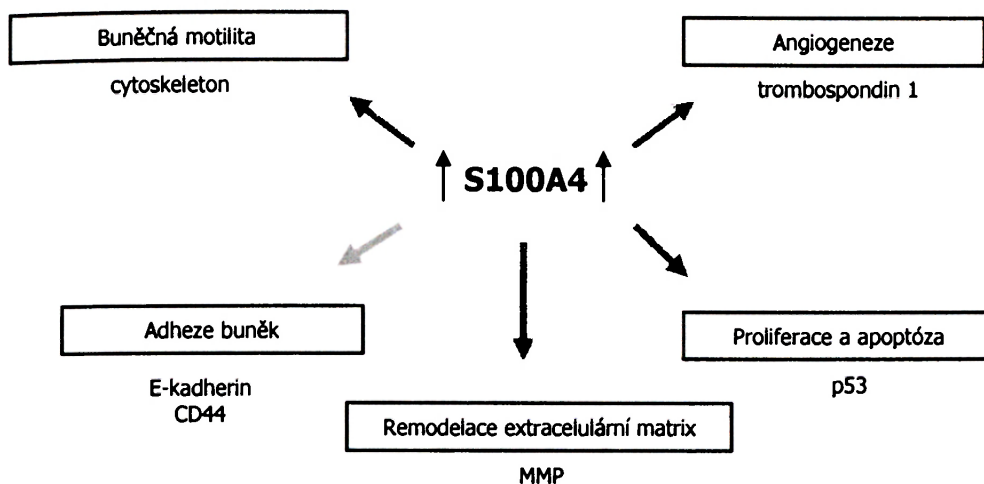
OPG postrádá transmembranózní doménu, má schopnost vázat RANKL, a představuje přirozený inhibitor interakce mezi RANKL a RANK. Tlumí tak vyžívání osteoklastů a aktivaci imunokompetentních buněk. Na zvířecím modelu vedla potlačená tvorba OPG (-/-) k těžké osteoporóze (124). Postmenopauzální osteoporóza má příčinu v nedostatku estrogenů, který vede ke snížené tvorbě OPG a zvýšené produkci RANKL (125). Tento nepoměr může přispět ke vzniku osteoporózy, což může být odvráceno hormonální substituční léčbou. U pacientek s osteoporózou byly naopak zjištěny zvýšené hladiny OPG v séru (126). Pravděpodobně neexistuje bližší vztah mezi tvorbou OPG, osteoklastickou resorpcí a sérovými hladinami OPG. Zatímco množství RANKL je zvýšené v místech probíhajícího zánětu a kloubní destrukce (127), množství volného OPG v synoviální tkáni u pacientů s RA je nižší (128). V séru pacientů s RA byly oproti kontrolní skupině zjištěny zvýšené hodnoty OPG i RANKL, které se normalizovaly po zavedení anti-TNF biologické léčby (129). Naopak hladiny OPG v synoviální tekutině byly zjištěny nižší u pacientů s RA oproti pacientům s OA (130). V poslední době nachází také systém RANK/RANKL/OPG uplatnění v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění (131) či komplikací diabetu mellites (132).

1.4.4. PROTEIN S100A4

S100A4 (známý také jako metastasin, kalvaskulin či protein specifický pro fibroblasty) představuje jeden z více než 20 kalcium vázících proteinů S100 rodiny s nízkou molekulární hmotností (9-13kDa). Tyto molekuly ovlivňují řadu biologických pochodů - zejména pak buněčný růst a dělení, energetický metabolismus, kontraktilitu a motilitu buněk, nitrobuněčnou signalizaci a mezibuněčnou komunikaci (133). S100A4 protein byl původně izolován z krysích nádorových buněk (134) a následně byla prokázána významná asociace metastatického fenotypu s tvorbou S100A4 lidskými nádorovými buňkami (135). S100A4 představuje nadějný ukazatel metastatické aktivity, který má prediktivní hodnotu u některých nádorových onemocnění (136). Úloha S100A4 při šíření nádorových buněk spočívá na molekulární úrovni v ovlivnění tvorby některých proteinů (molekuly cytoskeletu, E-kadherin, p53, trombospondin a enzymy degradující matrix). S100A4 tak může ovlivňovat buněčnou

motilitu, adhezi buněk, proliferaci a apoptózu, angiogenezi a remodelaci proteinů extracelulární matrix (obr.2.) (137).

Protein S100A4 může být tvořen řadou aktivovaných buněk, včetně fibroblastů, makrofágů, leukocytů a endoteliálních buněk (138). Byla též pozorována jeho sekrece a extracelulární lokalizace (139). Extracelulární S100A4 pak může vykazovat autokrinní a parakrinní aktivitu. Nedávno bylo zjištěno, že extracelulární S100A4 snižuje expresi genu pro inhibitor angiogeneze trombospodin 1 a proapoptotickou molekulu bax. Dále zvyšuje tvorbu několika enzymů degradujících matrix (zejména MMP-13) cévním endotelem a nádorovými buňkami (139-141). Extracelulární S100A4 tak může přispět k prodlouženému přežívání buněk, může podporovat angiogenezi a destrukci extracelulární hmoty.



Obr.2. Potenciální vliv proteinu S100A4 na genovou expresi a chování buněk (upraveno podle Mazzucchelli 2002.).
MMP, matrixové metaloproteinázy; p53, tumor supresorový protein.

V progresi destrukce kloubu u RA se významně uplatňují aktivované synoviální fibroblasty (142). Důležitou roli v tomto nevratném patologickém stavu hraje zvýšená produkce proteolytických enzymů synoviálními fibroblasty. Nedávno bylo zjištěno, že RA synoviální fibroblasty tvoří řadu odlišných genů v porovnání s fibroblasty neproliferujícími (143). Jedním z nich je právě gen pro S100A4, který je tvořen RA synoviální tkání. S100A4 tak byl prezentován jako jedna z molekul, která může mít význam v patogenezi RA.

2. CÍL PRÁCE

Základní vyšetření pro diagnózu a klasifikaci OA představuje stále prostý rentgenový snímek. Mezi rentgenovým nálezem a subjektivními příznaky choroby existuje často významná diskrepance. Obtížné je zejména zachytit časná stádia choroby, kdy rentgenový nález bývá často negativní. To platí také pro RA, jejíž diagnózu může zpočátku komplikovat i nepřítomnost specifické autoprotilátkové aktivity. Cílem této disertační práce bylo proto stanovení vybraných potenciálních biologických markerů v séru a v synoviální tekutině u pacientů s OA a RA, zhodnocení jejich vztahu k zánětlivým parametrům, klinické aktivitě choroby a morfologickému postižení kloubů. Jednalo se o ukazatele metabolického obratu chrupavky, kosti a parametry systémového a lokálního zánětu. Zásadním cílem bylo zhodnocení jejich diagnostického a prognostického potenciálu. Dalším cílem bylo bližší pochopení patogenetických mechanismů na podkladě vzájemných vztahů mezi jednotlivými markery, které odrážejí odlišné metabolické pochody. Jednalo se převážně o průřezové hodnocení vybraných biologických markerů. Při hodnocení prediktivního významu pentosidinu bylo provedeno longitudinální sledování pacientů s OA kolenních kloubů a zhodnocení progresu choroby ve smyslu morfologických změn kloubu.

Nedávno bylo zjištěno, že prolifерující synoviální fibroblasty mají větší potenciál exprese genu pro S100A4 a následně byla potvrzena také přítomnost mRNA pro S100A4 v synoviální tkáni pacientů s RA. Proto bylo dalším cílem této práce zjistit, zda produkt genu pro S100A4 - metastasin je tvořen RA synoviální tkání a pokud ano, má-li význam v patogenezi RA s ohledem na tvorbu enzymů degradujících extracelulární matrix.

3. METODIKA

3.1. Pacienti a kontrolní skupina

Do této práce byli zařazeni pacienti s revmatoidní artritidou a osteoartrózou kolenních kloubů. Diagnózy uvedených chorob byly stanoveny na podkladě kritérií Americké revmatologické asociace (57,144). Všichni účastníci studie patřili mezi ambulantní pacienty Revmatologického ústavu v Praze, kterým byla při terapeutické punkci kolenního kloubu s jejich souhlasem odebrána krev. Kontrolní skupinu tvořili zdraví jedinci, převážně zaměstnanci Revmatologického ústavu (n=38). V longitudinální studii bylo celkově vyšetřeno 89 pacientů s OA kolenních kloubů. V průřezových studiích byl vyšetřen různý počet pacientů (n=32-48).

3.2. Synoviální tkáň

Synoviální tkáň byla získána během operačního zákroku od pacientů s RA, OA a od zdravých jedinců po traumatické události (Ortopedická klinika, Schulthess Hospital Zürich). Synoviální fibroblasty použité k experimentu na tkáňových kulturách byly izolovány ze 4-8 pasáže.

3.3. Laboratorní metody

Stimulace synoviálních fibroblastů

K aktivaci synoviálních fibroblastů byla použita oligomerní frakce proteinu S100A4. Jeho koncentrace ve stimulačním experimentu v závislosti na dávce byla 0.1 až 4.0 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace 0.5 $\mu\text{g/ml}$ S100A4 byla použita pro experimenty v závislosti na čase (6, 12 a 24 hodin). Buňky byly sesbírány a mRNA izolována v každém z uvedených časů. Buněčný supernatant byl získán za 24 hodin po stimulaci proteinem S100A4.

ELISA

Tělní tekutiny a supernatant byly po odběru skladovány při teplotě -70°C až do konečného zpracování. Většina biomarkerů byla měřena pomocí ELISA, COMP sendvičovou metodou ELISA, matrixové metaloproteinázy pomocí komerčně dostupných kitů (Biotrak Amersham Biosciences Company), OPG a solubilní RANKL pomocí sandvičové ELISA (Biomedica, Vienna). Absorpce byla měřena při 450 nm (Dynex Technologies).

HPLC metoda – vysoce účinná kapalinová chromatografie

Pentosidin byl měřen pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie – tzv. metody HPLC. Vzorek tělní tekutiny byl předem upraven kyselou hydrolyzou (16hod./105°C v 6M HCl), purifikací a prekoncentrací pomocí extrakce na tuhé fázi. Dále bylo provedeno vakuové odpaření rozpouštědel (6 hod. SpeedVac), 4) a převedení do mobilní fáze. Vlastní gradientová HPLC analýza byla provedena v reverzní fázi na skleněné koloně typu CGC Separon SGX C18 (150x3 mm) plněné sférickými částicemi silikagelu (7 μm) s navázaným oktadecylsilanem. Použitá mobilní fáze se skládala z 0.02 M heptafluoromáselné kyseliny a 0.01 M síranu amonného. Lineární gradient byl dán proměnnou koncentrací acetonitrilu (12,5 – 25 %). Citlivá fluorescenční detekce: $\lambda_{\text{emisní}} = 385 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{excitační}} = 335 \text{ nm}$. Kolona byla termostatována na 40°C, průtok mobilní fáze = 0,5 ml/ min, nástřik: 10 μl finálně zpracovaného hydrolyzátu tělní tekutiny (sérum, synoviální tekutina).

Imunohistochemie

Protein S100A4 byl analyzován imunohistochemicky na řezech synoviální tkáně zalitých v parafínu. Tkáň na sklíčku byla zbavena parafínu, inkubována v trypsinu, a následně blokována avidinovým a biotinovým vektorem. Nespecifické vazby byly blokovány 2% fetálním telecím sérem (FCS) rozpuštěným v bufferu 100mM TRIS-HCL, 150mM NaCl a ddH₂O. Následovala inkubace s anti-S100A4 myší monoklonální protilátkou (1:300) ve 4°C přes noc. Po omytí byla tkáň na sklíčku inkubována s myší biotynilovanou protilátkou (1:1000) a streptavidin alkalickou fosfatázou. Barvení tkáňových řezů bylo provedeno pomocí DAKO Fast Red Substrátu (DAKO Corporation, Carpinteria, USA). Myší specifický IgG byl použit jako negativní kontrola.

Real-time polymerázová řetězová reakce (PCR)

Ribonukleová kyselina (RNK) byla izolována ze synoviálních fibroblastů za použití Rneasy kitu (Qiagen) podle standardního protokolu. Komplementární DNA (cdNA) byla získána reverzní transkripcí za použití následujících chemikálií (Applied Biosystems):

10x TayMan RT Buffer	2
25mM Magnesium chloride	4.4
deoxy dNTPs mixture	4
Random Hexamer	1
Rnase Inhibitor	0.4
MultiScribe Reverse Transcriptase(50 U/ul)	0.5
<u>RNK + DEPC H2O</u>	<u>7.7</u>
Celkový objem	20 ul

Reverzní transkripce byla provedena pomocí cykléru GeneAmp polymerázové řetězové reakce (PCR) (Applied Biosystems) při 25°C na 10 minut, následovala 30 minutová inkubace v 48°C a 5 minut při 95°C. Komplementární DNA byla skladována při -20°C do zpracování. Real-time PCR byla provedena pomocí přístroje ABI Prism 7700 Sequence Detection system (Applied Biosystems). K reakci byly použity předem připravené komerčně dostupné primery a próby: MMP-1 forward primer 5'-TGT-GGA-CCA-TGC-CAT-TGA-GA-3', reverse primer 5'-TCT-GCT-TGA-CCC-TCA-GAG-ACC-3', probe 5'-AGC-CTT-CCA-ACT-CTG-GAG-TAA-TGT-CAC-ACC-3'; MMP-3 forward primer 5'-GGG-CCA-TCA-GAG-GAA-ATG-AG-3', reverse primer 5'-CAC-GGT-TGG-AGG-GAA-ACC-TA-3', probe 5'-AGC-TGG-ATA-CCC-AAG-AGG-CAT-CCA-CAC-3'; MMP-9 forward primer 5'-GGC-CAC-TAC-TGT-GCC-TTT-GAG-3', reverse primer 5'-GAT-GGC-GTC-GAA-GAT-GTT-CAC-3', probe 5'-TTG-CAG-GCA-TCG-TCC-ACC-GG-3'; MMP-13 forward primer 5'-TCC-TAC-AAA-TCT-CGC-GGG-AAT-3', reverse primer 5'-GCA-TTT-CTC-GGA-GCC-TCT-CA-3', probe 5'-CAT-GGA-GCT-TGC-TGC-ATT-CTC-CTT-CAG-3'; MMP-14 forward primer 5'-TGG-AGG-AGA-CAC-CCA-CTT-TGA-3', reverse primer 5'-GCC-ACC-AGG-AAG-ATG-TCA-TTT-C-3', probe 5'-CCT-GAC-AGT-CCA-AGG-CTC-GGC-AGA-3'. Objem TaqMan reakce byl 11.5 µl za použití 11.25 nM forward primeru, 11.25 nM reverse primeru, 5 nM FAM/TAMRA TaqMan próby a 6.25 µl TaqMan Universal PCR Master Mixu (Applied Biosystems). Amplifikační reakce byla provedena při 95°C po dobu 10 minut, následovalo 40 cyklů dvou stupňového PCR, denaturace při 95°C po dobu 15 vteřin a ztužovací a extenzivní reakce při 60°C po dobu 60 vteřin. Ribosomální 18S byla použita jako vnitřní kontrola ke korekci výsledku porovnáním dosaženého prahu cyklu (Ct). Δ Ct hodnoty byly získány pomocí relativní kvantifikace odečtením hodnoty Ct 18S od Ct matrixových metaloproteináz.

Inhibice NF- κ B signální dráhy

Syntetický peptid NF- κ B SN50 / Cell-Permeable Inhibitor Peptide (Calbiochem), který tlumí translokaci aktivního komplexu NF- κ B do jádra, byl použit k objasnění účasti signální dráhy NF- κ B při aktivaci tvorby MMP po stimulaci fibroblastů proteinem S100A4. NF- κ B SN50 byl přidán k synoviálním fibroblastům 30 minut před stimulací proteinem S100A4. Genová exprese MMP-1 a MMP-3 byla analyzována po 6 hodinách pomocí Real-time PCR a porovnána s expresí MMP-1 a MMP-3 u fibroblastů stimulovaných pouze S100A4 proteinem.

Transfekce vektorem pCMV-I κ B α M

Před stimulačním experimentem byla použita transfekce synoviálních fibroblastů nukleofekčním kitem (Amaxa, Switzerland). Pelet 5×10^5 synoviálních fibroblastů byl rozpuštěn ve 100 μ l nukleofekčního roztoku a následně byl přidán 1 μ g I κ B α M pCMV DNA vektor nebo prázdný kontrolní vektor (BD Bioscience). Směs byla přenesena do elektroporetické kyvety, podstoupila nukleofekci v nukleofekčním přístroji (Amaxa), a následně byla přenesena do 6-ti jamkové destičky obsahující předeřáté DME-medium, které bylo po 8 hodinách vyměněno. Účinná transfekce synoviálních fibroblastů byla podle nukleofekčního protokolu $64 \pm 12\%$. Synoviální fibroblasty byly stimulovány po dobu 6 hodin proteinem S100A4 po 36 hodinách od transfekce. MMP-1 a MMP-3 byly měřeny Real-time PCR.

3.4. Klinické a rentgenové vyšetření

Aktivita obou chorob byla hodnocena pomocí speciálních dotazníků. Pro RA byl použit dotazník DAS 28 (Disease Activity Score), který se vypočítá podle vzorce $0.56 \times \sqrt{\text{(počet bolestivých kloubů)}} + 0.28 \times \sqrt{\text{(počet oteklých kloubů)}} + 0.7 \ln(\text{FW}) + 0.012 \times \text{(pacientovo globální hodnocení stavu)}$ (145). Funkční aktivita RA byla určena podle dotazníku zdravotního stavu HAQ (Health Activity Questionnaire) (146). Bolest a funkční stav u pacientů s OA byly hodnoceny pomocí indexu WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities osteoarthritis index) (147).

Rentgenové snímky u pacientů s OA byly provedeny v předozadní projekci podle standardního protokolu s koleny v plné extenzi a patami u sebe. Při hodnocení průřezových studií byly vyhodnoceny podle Kellgrena a Lawrence (148). Pro longitudinální sledování progresu choroby byly snímky hodnoceny modifikací metody podle Lequesena a šířka

kloubní štěrby byla měřena v nejužším místě mediálního kompartmentu tibiofemorálního kloubu podle Altmanova atlasu (149). U jedinců s oboustranným postižením kolenních kloubů byl vybrán kolenní kloub, který byl více postižen artritickým procesem. Snímky rukou a nohou u pacientů s RA byly provedeny v předozadní a šikmé projekci a byly hodnoceny podle Steinbrockera (150).

3.5. Statistické zpracování

Všechny hodnoty byly vyjádřeny jako průměr nebo medián \pm směrodatná odchylka. Mann-Whitney U-test byl použit pro porovnání dvou nepárových hodnot, Wilcoxonův test pro porovnání dvou párových hodnot a metoda lineární regrese při analýze vztahu mezi dvěma proměnnými. Statistická významnost byla vyjádřena Spearmanovým koeficientem. Analýza rozptylu byla použita pro adaptaci hodnoty sledovaných veličin k více proměnným. Hodnoty p menší než 0.05 byly považovány za statisticky významné.

4. VÝSLEDKY

4.1. PENTOSIDIN U PACIENTŮ S OSTEOARTRÓZOU A REVMAUTOIDNÍ ARTRITIDOU

Do této průřezové studie bylo zařazeno 38 pacientů s OA kolenních kloubů, 13 mužů a 25 žen. Průměrný věk sledovaných pacientů byl 64.1 let a délka choroby byla 7.7 let. Ve skupině pacientů s RA bylo 39 jedinců, z nichž bylo 7 mužů a 32 žen, jejichž průměrný věk byl 53.0 let a délka choroby činila 9.6 let. Kontrolní skupinu tvořilo 38 jedinců bez anamnézy kloubních obtíží, jednalo se o 15 mužů a 23 žen průměrného věku 58.3 let (tab.3). Do longitudinální studie se z celkového počtu 100 pacientů ke konečnému vyšetření po 2 letech dostavilo 89 pacientů. Jednalo se o 59 žen a 30 mužů. Průměrný věk sledované skupiny byl 57 let. Jednalo se o pacienty s relativně časným začátkem choroby, jehož délka nepřesáhla 3 roky (tab.4). Jedinci s diabetem mellitus či renální insuficiencí nebyli zařazeni do žádné z provedených studií.

Tabulka 3. Demografická data jedinců průřezové studie hodnotící význam pentosidinu u pacientů s osteoartrózou (OA) a revmatoidní artritidou (RA).

	OA	RA	kontroly	p1	p2
Muži/ženy	13/25	7/32	15/23	-	-
Věk (roky)	64.1±10.1	52.8±14.2	58.3±9.1	<0.05	NS
Délka choroby (roky)	8.1±7.7	9.6±6.6	-	-	-
DAS skóre	-	5.6±1.4	-	-	-
HAQ skóre	-	1.2±1.1	-	-	-
Anti-CCP (mU/ml)	-	22.8±32.4	-	-	-
CRP (ng/ml)	5.9±10.5	41.6 ±36.4	-	-	-
FW (mm/h)	-	38.1±19.4	-	-	-
Leukocyty v SF (počet)	402 ± 1045	6865.8±6681.4	-	-	-
COMP v séru (µg/ml)	4.1±1.3	3.5±0.8	3.3±1.4	<0.05	<0.001
COMP v SF (µg/ml)	33.7±11.0	23.8±11.4	-	-	-
Pentosidin v séru (nmol/l)	132.1±56.2	156.0±124.0	97.7±24.1	<0.01	<0.02
Pentosidin v SF (nmol/l)	70.7±22.8	83.1±68.6	-	-	-

RA, revmatoidní artritida; OA, osteoartróza; DAS, Disease Activity Score (skóre aktivity choroby); HAQ, Health Activity Questionnaire (dotazník zdravotního stavu); CRP, C-reaktivní protein; FW, sedimentace erytrocytů; anti-CCP, protilátky proti cyklickému citrulinu; COMP, cartilage oligomeric matrix protein (oligomerní protein chrupavkové matrix); SF, synovial fluid (synoviální tekutina).

P1 ukazuje rozdíl mezi pacienty s OA a kontrolní skupinou, p2 ukazuje rozdíl mezi pacienty s RA a kontrolní skupinou.

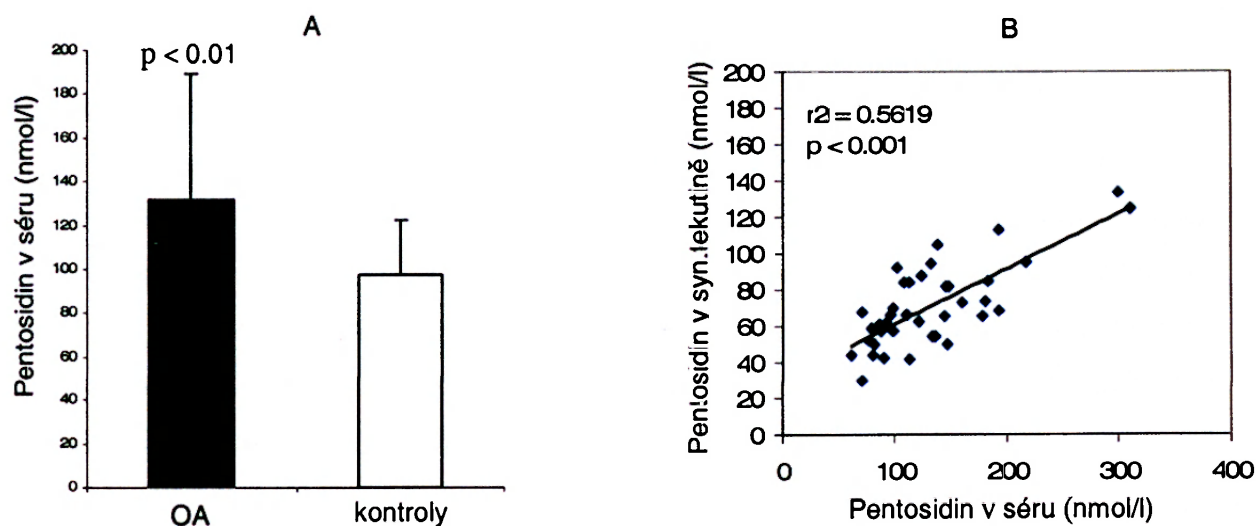
Tabulka 4. Demografická data jedinců longitudinální studie hodnotící prediktivní význam pentosidinu při hodnocení progresu osteoartrózy (OA) kolenních kloubů během 2-letého sledování.

	OA	kontroly	p
Muži/ženy	30/59	8/12	-
Věk (roky)	56.7±7.2	51.7±6.4	-
Délka choroby (roky)	2.9±1.8	-	-
BMI (kg/m ²)	28.6±4.6	27.8±5.2	-
Pentosidin v séru na počátku	143.4±99.0	115.3±34.0	0.04
Pentosidin v séru po 2 letech	125.6±76.9	-	-
Šířka kloubní štěrbiny na počátku (mm)	4.95±1.46	-	-
Zúžení kloubní štěrbiny během 2 let (mm)	-0.4±0.79	-	-

OA, osteoartróza; BMI, body mass index.

4.1.1. Zvýšená hladina pentosidinu u pacientů s osteoartrózou

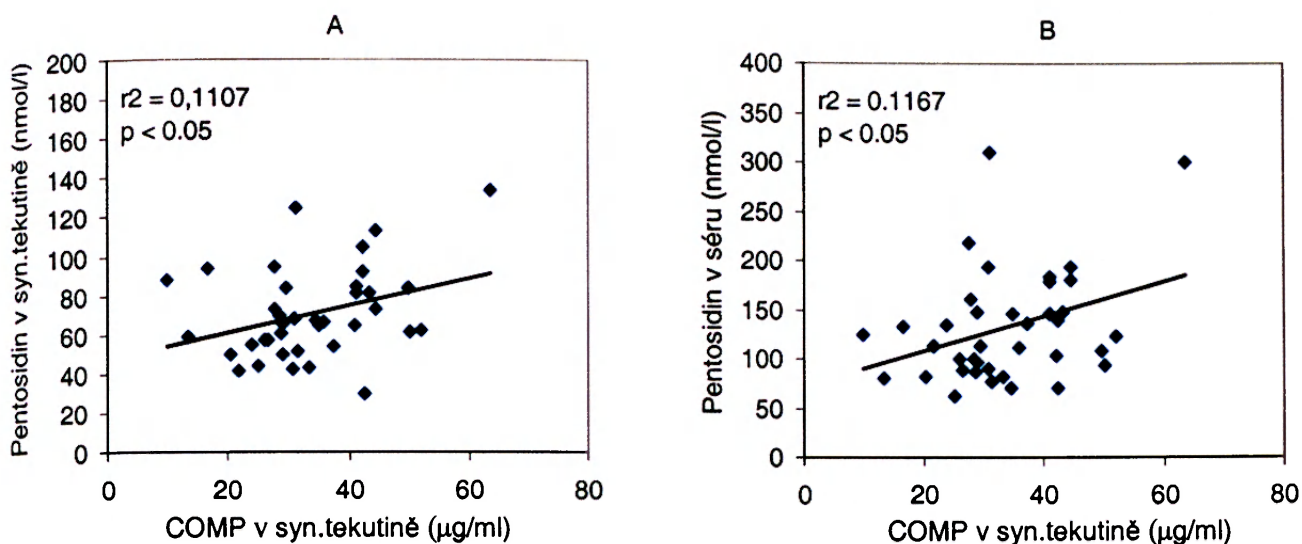
U pacientů s OA kolenních kloubů jsme oproti kontrolní skupině prokázali významně vyšší sérové hladiny pentosidinu (132.1 ± 56.2 vs 97.7 ± 24.0 nmol/l, $p < 0.01$) (obr.3A). Pentosidin byl významně vyšší v séru než v synoviální tekutině (132.1 ± 56.2 vs 70.7 ± 22.8 , $p < 0.001$) a mezi koncentracemi pentosidinu v obou kompartmentech byl statisticky významný vztah ($r^2 = 0.56$, $p < 0.001$) (obr.3B).



Obr.3. Porovnání sérové hladiny pentosidinu pacientů s osteoartrózou (OA) kolenních kloubů s kontrolní skupinou (A). Korelace pentosidinu v séru a synoviální tekutině u pacientů s OA kolenních kloubů (B).

4.1.2. Vztah pentosidinu k ukazateli destrukce kloubní chrupavky oligomernímu proteinu chrupavkové matrix (COMP) u pacientů s osteoartrózou

Zjistili jsme statisticky významný vztah mezi pentosidinem a COMP v synoviální tekutině ($r^2=0.11$, $p<0.05$) (obr.4A), přičemž tento vztah platil i pro pentosidin v séru a COMP v synoviální tekutině ($r^2=0.12$, $p<0.05$) (obr.4B). Nepozorovali jsme žádný vztah sérového COMP k pentosidinu v séru ($r^2=0.01$).



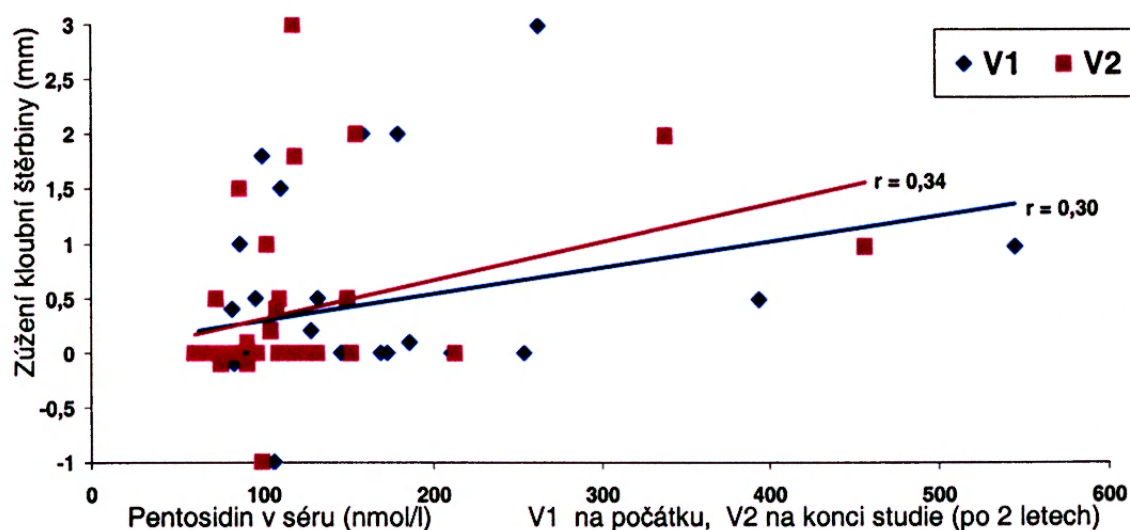
Obr.4. Korelace pentosidinu v synoviální tekutině (A) a séru (B) s ukazatelem destrukce chrupavky COMP v synoviální tekutině pacientů s osteoartrózou (OA) kolenních kloubů.

4.1.3. Vztah pentosidinu ke klinickému a rentgenovému stádiu osteoartrózy

Nepozorovali jsme vztah mezi věkem pacientů s OA kolenních kloubů a hodnotou pentosidinu v séru, ani v synoviální tekutině. Závislost na věku sérového pentosidinu nebyla pozorována ani u kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků. Pentosidin nevykazoval vztah k míře kloubní bolesti či ke klinickému stavu hodnoceného podle dotazníku WOMAC. Neshledali jsme taky statisticky významný rozdíl mezi pentosidinem u pacientů s unilaterální a bilaterální OA kolenních kloubů. Při užití analýzy variace jsme neprokázali vztah mezi pentosidinem v séru či synoviální tekutině s rentgenovým stádiem choroby.

4.1.4. Vztah pentosidinu k rentgenové progresi osteoartrózy

Šířka kloubní štěrby na počátku studie byla 4.95 ± 1.46 mm a na konci 4.55 ± 1.58 mm. To znamená, že během 2 let došlo k průměrnému zúžení kloubní štěrby o 0.4 ± 0.79 mm, což odpovídá průměrné roční progresi zúžení štěrby o 0.2 mm. Na začátku studie byly vyšší koncentrace pentosidinu (143.4 ± 99.0 vs 115.3 ± 34.3 nmol/l, $p=0.04$), nicméně na konci studie se již nelišily od vstupních hodnot pentosidinu u kontrolní skupiny jedinců (125.6 ± 76.9 vs 115.3 ± 34.3 nmol/l). Vstupní ($r=0.30$, $p<0.05$) i konečné ($r=0.34$, $p<0.05$) hodnoty pentosidinu měly významný vztah k progresi choroby ve smyslu zúžení kloubní štěrby (obr.5).

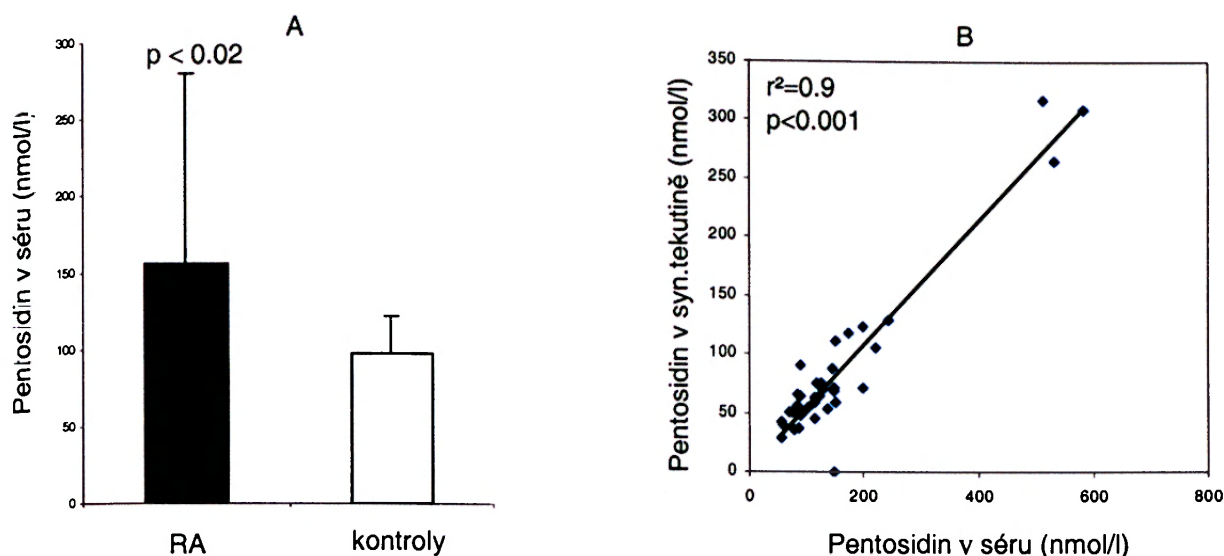


Obr.5. Vztah sérového pentosidinu k progresi osteoartrózy (OA) kolenních kloubů ve smyslu zúžení kloubní štěrby během 2-letého sledování. Koncentrace pentosidinu byly stanoveny na počátku a po dvou letech sledování.

4.1.5. Zvýšená hladina pentosidinu u pacientů s revmatoidní artritidou

Hodnoty pentosidinu byly významně vyšší u pacientů s RA oproti kontrolní skupině (156.0 ± 124.0 vs 97.7 ± 24.0 nmol/l, $p<0.02$) (obr.6A). Pentosidin byl významně vyšší v séru než v synoviální tekutině (156.0 ± 124.0 vs 83.1 ± 68.6 nmol/l, $p<0.001$). Byla pozorována významná korelace pentosidinu v séru a synoviální tekutině ($r^2=0.9$, $p<0.001$) (obr.6B). Průměrná koncentrace pentosidinu u pacientů s RA byla vyšší než u pacientů s OA, nicméně rozdíly v séru a synoviální tekutině mezi těmito chorobami nebyly statisticky významné (156.0 ± 124.0 vs 132.1 ± 56.2 nmol/l a 83.1 ± 68.6 vs 70.7 ± 22.8 nmol/l). Věk pacientů, ani

délka choroby neměla vliv na koncentraci pentosidinu v tělních tekutinách. Nebyl též rozdíl v koncentracích pentosidinu mezi muži a ženami. Neshledali jsme žádný vztah pentosidinu k ukazateli destrukce chrupavky COMP.



Obr.6. Porovnání sérové hladiny pentosidinu u pacientů s revmatoidní artritidou (RA) s kontrolní skupinou (A). Korelace pentosidinu v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA (B).

4.1.6. Vztah pentosidinu ke klinické aktivitě a rentgenovému poškození u pacientů s revmatoidní artritidou

Koncentrace pentosidinu v séru korelovaly se sedimentací erytrocytů ($r=0.44$, $p<0.03$), nikoli však s CRP ($r=0.04$). Neshledali jsme korelaci pentosidinu s leukocyty v synoviální tekutině ($r=0.02$). Dále jsme nepozorovali rozdíl mezi hodnotami pentosidinu u pacientů s pozitivitou revmatoidního faktoru (RF) oproti RF negativním pacientům. Pentosidin v séru ($r=0.06$) i v synoviální tekutině ($r=0.007$) nekoreloval s koncentracemi autoprotilátek anti-CCP v daných tělních tekutinách. Nebyla také zjištěna asociace mezi aktivitou choroby (DAS28, HAQ) a koncentracemi pentosidinu v séru či synoviální tekutině. Rentgenové stádium RA také nemělo vliv na hladinu pentosidinu v tělních tekutinách.

4.2. OLIGOMERNÍ PROTEIN CHRUPAVKOVÉ MATRIX (COMP) U PACIENTŮ S OSTEOARTRÓZOU A REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU

Do této průřezové studie bylo zařazeno 32 pacientů s aktivní RA průměrného věku 51.3 let, jednalo se o 6 mužů a 26 žen. Průměrná délka choroby byla 10.5 let. Dále 48 pacientů s OA kolenních kloubů průměrného věku 66.1 let. Jednalo se o 13 mužů a 25 žen, jejichž délka choroby byla 8.3 let.

4.2.1. COMP v séru a synoviální tekutině

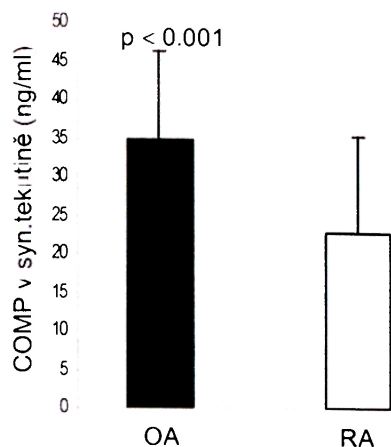
Sérové koncentrace COMP u jedinců s OA, RA i zdravých kontrol vykazovaly statisticky významnou závislost na věku ($p < 0.001$). Vyšší koncentrace COMP byly pozorovány u starších jedinců. Po adaptaci sérových hodnot COMP k věku nebyly rozdíly mezi pacienty s RA ($3.8 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$), OA ($3.8 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$) a kontrolami ($3.5 \pm 1.4 \mu\text{g/ml}$).

Tabulka 5. Charakteristika pacientů s revmatoidní artritidou (RA), osteoartrózou (OA) a kontrolní skupiny hodnotící význam COMP.

Demografická data	RA	OA	kontroly	p
Věk (roky)	51.3 ± 13.4	66.1 ± 10.3	55.2 ± 7.9	-
Muži/ženy	6/26	13/25	15/23	-
délka choroby (roky)	10.5 ± 8.9	8.3 ± 7.6	-	-
Klinická data				
RTG (S, K-L)	2.3 ± 1.1	2.6 ± 0.8	-	-
DAS skóre	5.6 ± 1.4	-	-	-
HAQ skóre	1.2 ± 0.8	-	-	-
WOMAC index	-	43.3 ± 14.3	-	-
Biochemická data				
CRP (mg/ml)	35.8 ± 37.1	5.8 ± 9.3	-	<0.001
FW (mm/h)	38.4 ± 19.7	-	-	-
Leukocyty v SF (počet)	7581 ± 6066	402 ± 1045	-	<0.001
Anti-CCP (mU/ml)	22.7 ± 29.4	0	-	<0.001
COMP v séru (ng/ml)	$4.1 (3.8) \pm 1.0$	$3.5 (3.8) \pm 1.2$	$3.2 (3.5) \pm 1.4$	NS
COMP v SF (ng/ml)	22.8 ± 12.8	34.8 ± 11.4	-	<0.001

RA, revmatoidní artritida; OA, osteoartróza; S, Steinbrocker; K-L, Kellgren-Lawrence; DAS, Disease Activity Score (skóre aktivity choroby); HAQ, Health Activity Questionnaire (dotazník zdravotního stavu); WOMAC, Western Ontario and McMaster Universities osteoarthritis index (index hodnotící aktivitu OA); CRP, C-reaktivní protein; FW, sedimentace erytrocytů; COMP, cartilage oligomeric matrix protein (oligomerní protein chrupavkové matrix); SF, synovial fluid (synoviální tekutina).

COMP v séru byl vyšší u jedinců mužského pohlaví ve všech sledovaných skupinách, pozorovaný rozdíl však postrádal statistickou významnost. Koncentrace COMP v synoviální tekutině byly významně vyšší než v séru u pacientů s RA (19.1 ± 12.6 vs $3.3 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.001$) i u pacientů s OA (32.5 ± 11.4 vs $3.9 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.001$). Koncentrace COMP v synoviální tekutině u OA pacientů byla významně vyšší než u RA pacientů ($p < 0.001$, obr.7). Hladina COMP v synoviální tekutině nebyla ovlivněna věkem ani pohlavím jedinců v žádné ze sledovaných skupin.



Obr.7. Koncentrace COMP v synoviální tekutině u pacientů s OA a RA.

4.2.2. Vztah COMP k aktivitě a rentgenovému stádiu choroby

Průměrná koncentrace CRP u pacientů s RA (35.8 ± 37.1 mg/ml) byla významně vyšší než u pacientů s OA (5.8 ± 9.3 mg/ml, $p < 0.001$). Průměrná hodnota sedimentace erytrocytů u pacientů s RA dosahovala 38.4 ± 19.7 mm/1h. Oba tyto ukazatele laboratorní aktivity nevykazovaly statisticky významný vztah k hladině COMP v séru či synoviální tekutině. Počet leukocytů v synoviální tekutině RA pacientů byl 7581 ± 6066 a také nevykazoval vztah k hladině COMP v synoviální tekutině. Množství leukocytů v synoviální tekutině OA pacientů (402 ± 1045) bylo významně nižší než u RA pacientů a také nekorelovalo s hodnotami COMP v synoviální tekutině. Průměrná hodnota dotazníku HAQ byla 1.2 a hodnota klinické aktivity dle DAS 28 byla 5.6. COMP v tělních tekutinách u pacientů s RA nevykazoval vztah k výše uvedeným veličinám. Průměrná hodnota WOMAC, dotazníku aktivity OA, byla 43.3 a také nekorelovala s hodnotami COMP v séru či synoviální tekutině. Hodnoty COMP v tělních tekutinách u jedinců s časnějším začátkem RA ($n = 11$, max. 4 roky) se nelišily oproti hodnotám u jedinců s delším průběhem choroby ($n = 21$, 5-38 let); sérum: 3.3 ± 0.7 vs 3.6 ± 1.1 $\mu\text{g/ml}$, synoviální tekutina: 23.3 ± 14.4 vs 22.3 ± 11.8 $\mu\text{g/ml}$). Zjistili jsme však významnou asociaci COMP s parametrem autoprotilátkové aktivity. Čím vyšší byly hodnoty anti-CCP protilátky, tím vyšší byly u RA pacientů hodnoty COMP v séru ($p < 0.03$).

Pacienti s RA a OA byli rozděleni do jednotlivých skupin podle rentgenového stádia hodnoceného podle Steinbrockera, respektive Kellgrena a Lawrence. Sérové hodnoty COMP pacientů s RA a OA se mezi jednotlivými rentgenovými stádii nelišily. Totéž platilo pro COMP v synoviální tekutině OA pacientů.

4.3. LIGAND PRO RECEPTOR AKTIVUJÍCÍ TRANSKRIPČNÍ FAKTOR NF-κB A OSTEOPROTEGERIN U PACIENTŮ S OSTEOARTRÓZOU A REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU

Do této studie bylo zařazeno 45 pacientů s RA, jednalo se o 9 mužů a 36 žen. Jejich průměrný věk byl 54 let. Pacientů s OA kolenních kloubů bylo 44 (14 mužů, 30 žen) a jejich průměrný věk byl 66 let (tab.6.).

Tabulka 6. Charakteristika pacientů s revmatoidní artritidou (RA) a osteoartrózou (OA) ve studii hodnotící význam systému OPG/RANKL.

Demografická data	RA	OA	p
Věk (roky)	54 ± 10.6	66 ± 14.3	<0.001
Muži/ženy	9/36	14/30	-
CRP (mg/ml)	39.6 ± 34.7	5.2 ± 8.2	<0.001
Leukocyty v SF (počet)	7900 ± 10002	415.6 ± 1077	<0.001
DAS28 skóre	5.7 ± 1.4	-	-
OPG v séru (pmol/l)	1.9 ± 1.0	2.4 ± 0.8	<0.03
OPG v SF (pmol/l)	3.9 ± 2.4	8.4 ± 2.9	<0.001
RANKL v séru (pmol/l)	78% < 0.4 pmol/l	89% < 0.4 pmol/l	-
RANKL v SF (pmol/l)	3.36 ± 2.7	3.41 ± 1.4	NS
COMP v séru (ng/ml)	3.49 ± 0.8	4.05 ± 1.3	NS
COMP v SF (ng/ml)	21.55 ± 9.0	34.88 ± 11.5	<0.001
Pyridinolin v séru (nmol/l)	13.1 ± 8.1	8.7 ± 4.6	NS
Deoxypyridinolin v séru (nmol/l)	11.2 ± 7.5	10.3 ± 7.6	NS

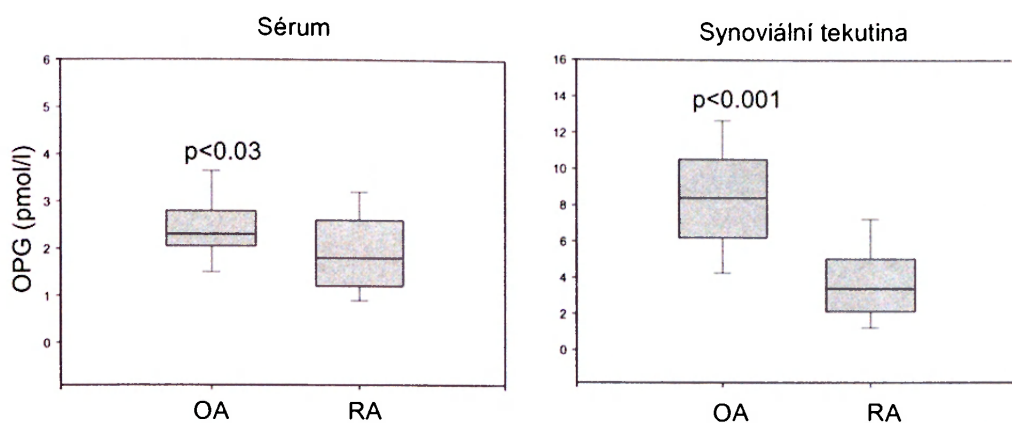
RA, revmatoidní artritida; OA, osteoartróza; DAS, Disease Activity Score (skóre aktivity choroby); CRP, C-reaktivní protein; OPG, osteoprotegerin; RANKL, ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF-κB; COMP, cartilage oligomeric matrix protein (oligomerní protein chrupavkové matrix); SF, synovial fluid (synoviální tekutina).

4.3.1. Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF-κB (RANKL)

Sérové koncentrace solubního RANKL byly u většiny jedinců (více než 80%) pod detekčním limitem (<0.4 pmol/l). Koncentrace RANKL v synoviální tekutině byly vyšší oproti příslušným hodnotám v séru a nelišily se mezi skupinami pacientů s RA a OA (3.36±2.7 vs 3.41±1.4 pmol/l). Nezávisle na diagnóze byl zjištěn negativní vztah RANKL k CRP (p<0.05). Nicméně hodnota RANKL v synoviální tekutině nevykazovala asociaci s aktivitou RA podle dotazníku DAS28.

4.3.2. Osteoprotegerin

Koncentrace OPG byla významně vyšší v synoviální tekutině než v séru ($p < 0.001$) a OPG navzájem koreloval v obou tělních tekutinách u obou sledovaných skupin ($p < 0.005$). Koncentrace OPG v synoviální tekutině u pacientů s OA byla významně vyšší než u pacientů s RA (8.4 ± 2.9 vs 3.9 ± 2.4 pmol/l, $p < 0.001$). Totéž platilo i pro OPG v séru (2.4 ± 0.8 vs 1.9 ± 1.0 pmol/l, $p < 0.03$) (obr.8.).



Obr.8. Porovnání koncentrace OPG v séru a synoviální tekutině u pacientů s osteoartrózou (OA) a revmatoidní artritidou (RA).

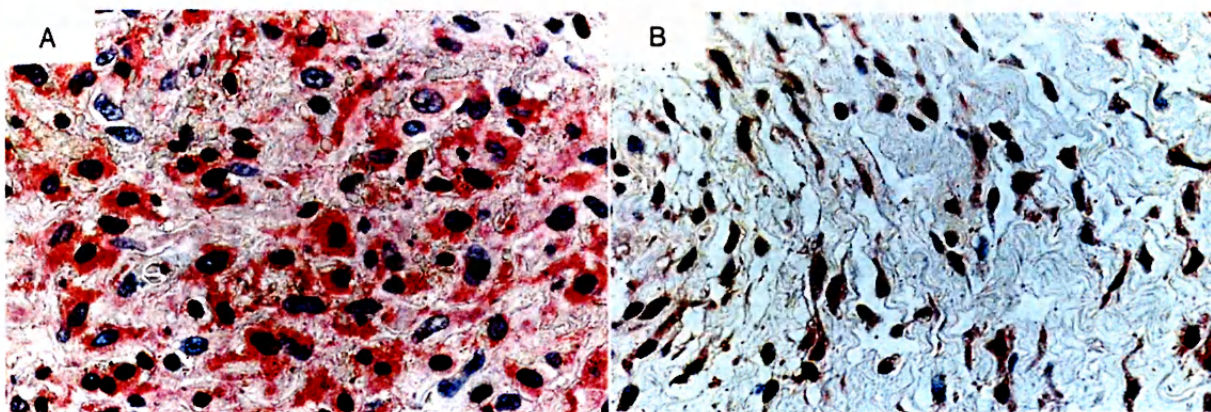
Poměr OPG:RANKL v synoviální tekutině byl významně menší u pacientů s RA než u pacientů s OA ($p < 0.001$). Koncentrace OPG v synoviální tekutině a séru se nelišila mezi jednotlivými rentgenovými stádii OA. U pacientů s OA vzrůstala koncentrace sérového OPG s věkem ($p < 0.03$). Hodnoty OPG v synoviální tekutině u pacientů s OA a v obou tělních tekutinách u pacientů s RA nebyly věkem ovlivněny.

Sérové hodnoty OPG a COMP u pacientů s OA vzrůstaly s věkem a navzájem spolu korelovaly ($p < 0.04$). Tento vztah však neplatil po adaptaci obou parametrů k věku. U pacientů s RA velmi významně korelovaly hodnoty OPG a COMP v synoviální tekutině ($p = 0.005$). Naopak u pacientů s OA v synoviální tekutině spolu vzájemně parametry OPG a COMP nekorelovaly. OPG v séru pacientů s OA navíc významně koreloval s ukazatelem degradace kosti deoxypyridinolinem ($p = 0.05$) a jistý trend byl pozorován také pro pyridinolin ($p = 0.06$), což bylo prokázáno i po adaptaci OPG k věku. Tento pozitivní vztah mezi OPG a markery metabolického obratu kosti nebyl pozorován u pacientů s RA.

4.4. VÝZNAM S100A4 V PATOGENEZI REVMATOIDNÍ ARTRITIDY

4.4.1. Exprese proteinu S100A4 synoviální tkáni

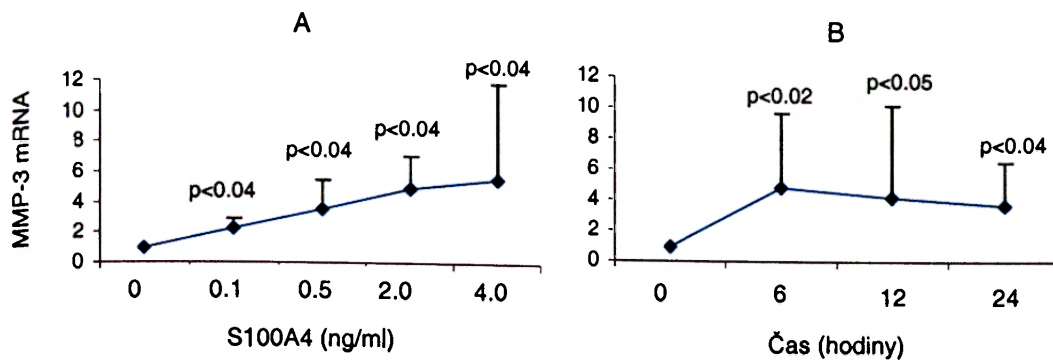
Synoviální tkáň RA pacientů (10/10) vykazovala tvorbu S100A4 proteinu. S100A4 byl lokalizován v oblastech synoviální intimy, intersticia a také endotelových buněk synoviálních cév. Přítomnost S100A4 byla navíc pozorována v oblastech destrukce kosti (panu) u 4/4 pacientů s RA. S100A4 se také nacházel v extracelulárním prostoru. Podle morfologické charakteristiky tvoří S100A4 synoviální fibroblasty i makrofágy. Synoviální tkáň pacientů s OA (5/7) vykazovala podobný charakter barvení na protein S100A4, nicméně intenzita barvení byla slabší a extracelulární lokalizace S100A4 nebyla pozorována (obr.9). U kontrolní synoviální tkáně od pacientů po traumatu (3/3) nebyla tvorba S100A4 pozorována vůbec.



Obr.9. Rozdíl v imunohistochemickém barvení proteinu S100A4 v synoviální tkáni pacientů s revmatoidní artritidou (RA) (A) a osteoartrózou (OA) (B). Originální zvětšení 400x.

4.4.2. S100A4 zvyšuje expresi MMP mRNA synoviálními fibroblasty in vitro

Protože jsme u pacientů s RA pozorovali extracelulární přítomnost S100A4, stimulovali jsme synoviální fibroblasty proteinem S100A4. V závislosti na dávce S100A4 jsme pozorovali indukci exprese MMP-1, MMP-3 (obr.10A), MMP-9 a MMP-13 mRNA RA synoviálními fibroblasty již po 6 hodinách stimulace. Mírná indukce exprese MMP byla pozorována při stimulaci RA synoviálních fibroblastů nejnižší koncentrací S100A4 (0.1 $\mu\text{g/ml}$) - 2.9x, 2.3x, 1.3x, a 1.1x vzestup). Při vyšších koncentracích S100A4 byla pozorována vyšší exprese MMP. Pro nejvyšší použitou koncentraci S100A4 (4.0 $\mu\text{g/ml}$) byl pozorován 5.8x, 5.6x, 4.7x, a 5.2x vzestup exprese genu pro MMP. Na druhé straně nedošlo ke zvýšené expresi genu pro MMP-14. Podobné výsledky byly pozorovány u synoviálních fibroblastů od OA pacientů.



Obr.10. Indukce exprese MMP-3 mRNA synoviálními fibroblasty od pacientů s revmatoidní artritidou (RA) stimulovanými různými koncentracemi proteinu S100A4 po dobu 6 hodin (A). Indukce exprese MMP-3 mRNA RA synoviálními fibroblasty stimulovanými 0.5 µg/ml S100A4 po dobu 6, 12 a 24 hodin (B).

Při stimulaci RA synoviálních fibroblastů v závislosti na čase (6, 12 a 24 hodin) jsme použili 0.5 µg/ml S100A4 proteinu. Indukce exprese MMP-3 mRNA (obr.10B) byla zjištěna ve všech časových intervalech s nejvyššími hodnotami již po 6 hodinách stimulace (4.8x, 4.2x, a 3.7x vzestup). Po stimulaci proteinem S100A4 byla zvýšena také exprese genů pro MMP-1, MMP-9 i MMP-13, nicméně s různou kinetikou. Zatímco MMP-9 mRNA byla zvýšeně indukována ve všech časových intervalech (2.6x, 2.9x, a 2.3x vzestup), MMP-1 mRNA byla významně zvýšena po 6 a 12 hodinách (2.7x a 2.8x vzestup) a MMP-13 měla maximum po 6 hodinách (2.6x vzestup). Významná korelace byla nalezena mezi expresí MMP-1 a MMP-3 mRNA ($p<0.05$).

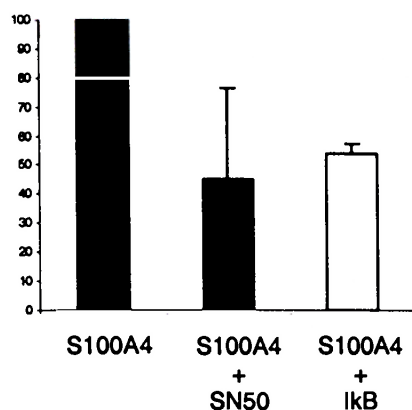
4.4.3. Tvorba MMP stimulovanými synoviálními fibroblasty

Zvýšená exprese MMP na genové úrovni byla potvrzena na proteinové úrovni po stimulaci RA synoviálních fibroblastů proteinem S100A4 po dobu 24 hodin. Zjistili jsme zvýšené uvolnění proteinů MMP-1 (180%, $p<0.03$) a MMP-3 (160%, $p<0.05$) do buněčného supernatantu z RA synoviálních fibroblastů stimulovaných proteinem S100A4 po 24 hodinách.

4.4.4. Význam NF-κB signální dráhy v indukci tvorby MMP synoviálními fibroblasty stimulovanými S100A4

Význam transkripčního faktoru NF-κB v indukci MMP synoviálními fibroblasty byl určen pomocí NF-κB SN50 – inhibitoru translokace aktivního komplexu NF-κB do jádra. RA synoviální fibroblasty předem inkubované s molekulou NF-κB SN50 vykazovaly sníženou

expresi genů pro MMP-1 a MMP-3 (26 ± 17 a 55 ± 23 % pokles). Abychom zjistili funkční aktivitu NF- κ B, použili jsme transfekci synoviálních fibroblastů vektorem I κ B α M pCMV. Transfekované synoviální fibroblasty vykazovaly také sníženou indukci exprese MMP-1 a MMP-3 (34 ± 14 a 46 ± 3 % pokles) oproti fibroblastům transfekovaným prázdným vektorem. Snížení tvorby MMP-3 mRNA po inhibici NF- κ B signální dráhy je znázorněno na obr.11.



Obr.11. Redukce exprese genu pro MMP-3 po inhibici transkripčního faktoru NF- κ B za použití inhibitoru translokace aktivního komplexu NF- κ B do jádra SN-50 a transfekčního vektoru I κ B α M pCMV.

5. DISKUSE

5.1. Pentosidin u pacientů s osteoartrózou

Ve studii zabývající se významem pozdních produktů pokročilé glykace u OA jsme zjistili zvýšené sérové hladiny pentosidinu u pacientů s OA kolenních kloubů oproti zdravé skupině dobrovolníků. Pozorovali jsme významnou asociaci pentosidinu s ukazatelem metabolického obratu kloubní chrupavky COMP v synoviální tekutině. Navíc jsme u jedinců s časným začátkem choroby pozorovali pozitivní vztah koncentrace pentosidinu v séru s progresí zúžení kloubní štěrbiny po 2 letech sledování.

Zvýšené hladiny pentosidinu v séru u pacientů s OA nebyly v minulosti pozorovány (108), nicméně náš soubor pacientů byl větší a je v souladu s nálezem vyšší koncentrace pentosidinu v moči u pacientů s OA (39). Močový pentosidin měl dokonce určující význam přítomnosti OA. Podle našich předpokladů se na zvýšené koncentraci pentosidinu mohou podílet dva základní mechanismy:

1. vyšší metabolický obrat a progresivní destrukce hyalinní chrupavky a
2. oxidační stres.

Vyšší metabolický obrat a progresivní destrukce hyalinní chrupavky během OA může vést k pozorované ztrátě fluorescence glykačních produktů blízko povrchu kloubní chrupavky a předpokládanému uvolnění proteinů modifikovaných pentosidinem do tělních tekutin (151). Důležitou komponentou hyalinní chrupavky a zároveň ukazatelem jejího metabolismu je COMP (50) - potenciální ukazatel destrukce a progresu OA kloubní chrupavky (53,54). V posledních letech se na OA pohlíží jako na zánětlivé postižení kloubní tkáně (152), jež může být provázeno nízkou hladinou systémového zánětu v podobě lehce zvýšeného sérového C-reaktivního proteinu (28,29). Oxidační stres při zánětlivém postižení kloubní tkáně tak může představovat další mechanismus vedoucí k vzestupu hladin pentosidinu v séru OA pacientů. Vyšší oxidační stres je například odpovědný za vyšší hladiny pentosidinu během chronického zánětu u pacientů s RA (108). Na podkladě těchto hypotéz se domníváme, že námi pozorovaná vyšší koncentrace pentosidinu a jeho korelace s COMP v synoviální tekutině může odrážet lokálně zánětlivě-destruktivní proces OA.

Průměrné roční zúžení kloubní štěrbiny kolenních kloubů u pacientů s časnou OA bylo 0.2 mm. Podle literárních údajů se průměrné roční zúžení kloubní štěrbiny může pohybovat v rozmezí 0.06 až 0.6 mm za rok (153). Šíře kloubní štěrbiny však může být vlivem bolesti a neúplné extenze kolenního kloubu zmenšena (154). Proto je výhodnější provádět rentgenové snímky pomocí semiflekční techniky. My jsme použili techniku snímkování s extendovanými koleny, jelikož v době začátku studie nebylo známo o výhodnosti semiflekční techniky pro longitudinální studie. Monitorování biologických markerů OA má zatím více pozitivních výsledků při hodnocení progresu destrukce chrupavky a predikce dalšího vývoje choroby. V posledních letech je mnoho pozornosti věnováno významu pozdních produktů pokročilé glykace v souvislosti se stárnutím, patogenezí diabetu mellites, renální insuficiencí a zánětlivými chorobami (96-99). Významným rizikovým faktorem OA je věk a v kloubní chrupavce významně vzrůstá množství AGE právě během stárnutí organismu (38). Nedávno bylo zjištěno, že zvýšená akumulace AGE v kloubní chrupavce negativně ovlivňuje kvalitu (38), metabolický obrat a reparační kapacitu hyalinní chrupavky (39,101). U pacientů s OA kolenních kloubů byly zjištěny zvýšené hladiny pentosidinu v moči, které významně poklesly po operaci s provedením totální endoprotézy postiženého kloubu (155). V této práci jsme pozorovali zvýšené hladiny pentosidinu v séru a jejich vztah k progresi zúžení kloubní štěrbiny u pacientů s OA kolenních kloubů. Předpokládáme tak, že pentosidin může představovat nový potenciální biomarker hodnocení OA, který může odrážet zánětlivě-degradační proces choroby.

5.2. Pentosidin u pacientů s revmatoidní artritidou

U pacientů s RA jsme prokázali významně vyšší hladiny pentosidinu v séru oproti kontrolám. Pentosidinu vykazoval vztah k sedimentaci erytrocytů, nikoli však k CRP, autoprotilátkové či klinické aktivitě choroby.

U pacientů s RA byla již dříve popsána zvýšená akumulace AGE v kloubních tkáních a tělních tekutinách (40,108). Předpokládá se, že zvýšená tvorba a akumulace AGE má příčinu ve zvýšené tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů během chronického zánětu. Pentosidin v séru je považován za indikátor aktivity onemocnění, ukazatel chronického zánětu a oxidačního stresu u pacientů s RA (108). V rozporu s touto prací jsme nepozorovali asociaci zvýšeného pentosidinu s CRP či aktivitou choroby. Pentosidin vykazoval vztah pouze k sedimentaci erytrocytů. Je obtížné vysvětlit diskrepanci našeho pozorování s předchozí studií. Tento rozdíl může být způsoben například použitím odlišného dotazníku na hodnocení

aktivity choroby. V předchozí práci byl použit tzv. Lansburyho index, kdežto my jsme použili více rozšířený a častěji používaný dotazník hodnotící aktivitu choroby DAS28. Tento nálezn je v rozporu s tvrzením, že pentosidin představuje potenciální zánětlivý marker aktivity RA. Při porovnání hladin pentosidinu v séru a synoviální tekutině u pacientů s RA bylo zjištěno pouze nevýznamné zvýšení oproti pacientům s OA. Příčinou může být vyšší věk pacientů s OA, ačkoli jsme nepozorovali závislost pentosidinu na věku v žádné ze sledovaných skupin.

Protože jsme u pacientů s OA pozorovali asociaci pentosidinu s COMP v synoviální tekutině, chtěli jsme objasnit vztah těchto dvou parametrů také u RA. Nepodařilo se nám však prokázat, že by hladiny pentosidinu měly vztah k ukazateli metabolického obratu kloubní chrupavky COMP v séru či synoviální tekutině u jedinců s RA. Citrulínace proteinů synoviální tkáně sehrává významnou úlohu v patogenezi RA a tvorba protilátek proti těmto modifikovaným proteinům (anti-CCP) má vysokou specificitu pro diagnózu RA (65). Detekce anti-CCP protilátek má navíc prediktivní význam strukturálního postižení u jedinců s časným začátkem choroby (66,67). V naší práci se nepodařilo prokázat asociaci pentosidinu s protilátkovou aktivitou vyjádřenou tvorbou anti-CCP protilátek. Narozdíl od OA, kde pentosidin koreloval s COMP v synoviální tekutině, u RA pravděpodobně zvýšené hladiny pentosidinu mohou odrážet oxidační stres a chronickou zánětlivou aktivitu choroby, nikoliv destrukci kloubní chrupavky či autoprotilátkovou aktivitu choroby. Je navíc známo, že k destrukci kloubu může docházet i bez přítomnosti prokazatelné zánětlivé aktivity.

5.3. Oligomerní protein chrupavkové matrix u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou

Potvrdili jsme, že věk představuje významný faktor ovlivňující sérovou hladinu COMP. Po adaptaci biomarkeru k věku jsme již nepozorovali rozdíl v sérových koncentracích COMP mezi OA a RA pacienty a kontrolní skupinou. Na druhé straně COMP v synoviální tekutině nebyl ovlivněn věkem a byl významně vyšší u pacientů s OA, což může odrážet metabolismus kloubní chrupavky postižené artrotickým procesem a odlišný mechanismus patogeneze choroby.

COMP představuje významný ukazatel metabolismu kloubní tkáně, zejména degradace hyalinní chrupavky (50). Vedle pohlaví, rasy a fyzické aktivity, patří věk mezi důležitý faktor ovlivňující koncentraci COMP v séru (156). Adaptované hladiny COMP k věku nevykazovaly významný rozdíl mezi žádnou ze sledovaných skupin. Tato závislost na věku

však nebyla pozorována pro COMP v synoviální tekutině, který může přímo odrážet metabolismus tkáně postiženého kloubu. COMP v séru má systémový charakter odrážející metabolismus ostatních kloubních struktur a tkání organismu, což představuje jeden z limitujících faktorů použití sérového COMP při hodnocení postižení jednoho kloubu u chorob, jež mají často polyartikulární charakter. Muži ze všech sledovaných skupin měli vyšší koncentrace sérového COMP oproti ženám, což je v souladu s nedávnou studií zabývající se závislostí COMP na etnické příslušnosti a pohlaví (156). Vyšší sérové hodnoty COMP u mužů je možno vysvětlit větší tělesnou konstitucí mužů oproti ženám a tudíž větším množstvím pojivové tkáně obsahující COMP.

V synoviální tekutině jsme pozorovali významně vyšší COMP u pacientů s OA oproti RA, což by mohlo odrážet lokálně probíhající destrukci artrotické chrupavky a změny jejího metabolismu v průběhu OA. Pokročilá rentgenová destrukce kolenních kloubů u OA pacientů neměla vliv na hodnoty COMP v séru ani v synoviální tekutině a systémové hodnoty COMP též nevykazovaly závislost na pokročilosti RA vyjádřené rentgenovou destrukcí drobných ručních a nožních kloubů. Nicméně lze spekulovat, že zvýšené hladiny COMP v synoviální tekutině u pacientů s OA oproti RA mohou spíše odrážet odlišné metabolické změny artrotické chrupavky. Nepozorovali jsme však dříve popsany (53) prediktivní význam sérového COMP na vývoj choroby při dvouletém sledování rentgenové progresu u pacientů s časnou OA kolenních kloubů. Jedním z vysvětlení může být jednak odlišný průběh a délka choroby nebo kratší doba sledování pacientů v našem souboru.

U maratónských běžců byl zjištěn zvýšený sérový COMP a jeho korelace s některými cytokiny v průběhu a do 24 hodin po 42-km závodu (157). Předpokládá se, že COMP může představovat marker reflektující časný zánět v průběhu nadměrného přetěžování kloubních struktur. V patogenezi RA sehrává oproti OA významnou roli systémový zánětlivý proces a nedávno byla v časně fázi RA pozorována korelace COMP se zánětlivou aktivitou choroby, počtem oteklých kloubů a CRP (158). Nicméně v prospektivní 5-ti leté studii neodrážel COMP zánětlivou aktivitu ani destruktivní aspekt RA (86). Stejně tak i naše práce nepodporuje vztah COMP k rentgenovému postižení kloubů, klinické, ani laboratorní aktivitě RA.

Lze konstatovat, že stárnutí organismu se významně podílí na zvýšené hladině COMP v séru, což je nutno zohledňovat v dalších studiích. Po adaptaci COMP k věku již nebyl pozorován

rozdíl v koncentracích COMP v séru mezi jedinci s OA, RA a kontrolami. COMP v synoviální tekutině nebyl ovlivněn věkem a byl významně vyšší u OA pacientů. COMP tak pravděpodobně představuje lokální ukazatel destrukce artrotické chrupavky než systémový ukazatel metabolismu revmatické kloubní tkáně. Nicméně pozitivní vztah COMP s vysoce specifickou autoprotilátkou anti-CCP může ukazovat na asociaci imunitní aktivity a destrukce kloubní tkáně u RA.

5.4. Osteoprotegerin a ligand pro receptor aktivující NF- κ B u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou

Osteoprotegerin a RANKL sehrávají významnou úlohu při regulaci kostního obratu a vedle kostních buněk či synoviálních fibroblastů se na jejich tvorbě podílí řada imunokompetentních buněk. Proto jsme prokázali vyšší hladiny těchto molekul v místech probíhajícího zánětu, tj. v synoviální tekutině, než v séru. Navíc nižší koncentrace OPG v tělních tekutinách u pacientů s RA svědčí pro teorii nedostatečné protektivní úlohy OPG před kostní resorpcí u systémového zánětlivého onemocnění.

Vyšší koncentrace OPG byly pozorovány v séru u žen s postmenopauzální osteoporózou oproti zdravým a stejně starým ženám (159). U těchto pacientek s osteoporózou byly koncentrace OPG vyšší u žen, které měly nižší denzitu kostního minerálu a navíc korelovaly s markery kostní resorpce močovým pyridinolinem a deoxypyridinolinem. To se podařilo potvrdit i v naší práci u pacientů s OA kolenních kloubů. Není jasné proč i přes vyšší hodnoty OPG dochází ke ztrátě kostní denzity. Pravděpodobně se jedná o neefektivní kompenzatorní tvorbu OPG při zvýšené produkci RANKL. Na druhé straně u pacientů s RA, u nichž dochází k lokálnímu úbytku kostní denzity a vzniku kostních erozí, jsme zjistili nižší koncentrace OPG, což je v souladu s nižší tvorbou OPG synoviální tkání pacientů s aktivní RA (128). Významná asociace COMP s OPG v synoviální tekutině u pacientů s RA patří mezi dosud nepopsaný moment, který je pravděpodobně odrazem asociace lokální destrukce hyalinní chrupavky a metabolismu kosti u pacientů s RA. Tento vztah nebyl pozorován u pacientů s OA. Pravděpodobným vysvětlením je odlišný patogenetický mechanismus postižení kloubních struktur u obou chorob.

V porovnání s nadměrnou tvorbou RANKL lymfocyty a makrofágy v RA synoviální tkáni (127) jsme nepozorovali vyšší koncentraci volného RANKL v synoviální tekutině u pacientů s aktivní RA oproti jedincům s OA. Dá se tak předpokládat, že na lokální osteoresorpci se

nepodílí volný, ale na buňky vázaný RANKL. Pro to svědčí i negativní korelace RANKL v synoviální tekutině se zánětlivou aktivitou choroby. Nízké koncentrace měřeného volného RANKL, zejména nedetekovatelné hodnoty v séru, mohou být způsobeny vazbou RANKL na OPG in vivo. ELISA metoda pro detekci RANKL totiž využívá princip potažených jamek molekulou OPG, což umožní vazbu volného RANKL, ale ne RANKL vázaného na OPG.

Nižší lokální produkce markeru regulace metabolického obratu kosti OPG v synoviální tekutině představuje sníženou ochranu zánětem postižené tkáně před destrukcí kosti. Navíc, významný vztah OPG s ukazatelem destrukce chrupavky COMP svědčí pro asociaci lokálního postižení kosti a hyalinní chrupavky u aktivní RA.

5.5. Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy

My jsme poprvé prokázali intracelulární i extracelulární přítomnost proteinu S100A4 v synoviální tkáni RA pacientů. Protein S100A4 byl navíc přítomen i v oblastech invaze tkáně do kosti. Navíc jsme zjistili, že extracelulární S100A4 indukuje zvýšenou tvorbu několika MMP synoviálními fibroblasty, což ukazuje na význam S100A4 v procesu kloubní destrukce během RA.

V řadě studií na různých typech tumorů byly zjištěny účinky intracelulárního i extracelulárního proteinu S100A4 podporující tvorbu metastáz (135-137,138-141). Invazivní chování buněk je nejdůležitějším znakem zakládání metastáz, přispívá k neovaskularizaci a šíření nádorových buněk. Na tomto procesu se významně podílí zvýšená tvorba MMP. Enzymy degradující matrix, a to zejména MMP, jsou hlavními strůjci kloubní destrukce u RA. Hlavním zdrojem těchto enzymů jsou fibroblasty synoviální intimy a agresivního panu (71). Protože S100A4 je lokalizován jak v intracelulárním, tak extracelulárním kompartmentu, lze uvažovat o významu secernovaného S100A4 u RA. Objevili jsme, že exogenní S100A4 stimuluje tvorbu několika MMP synoviálními fibroblasty, což bylo nedávno pozorováno též u endoteliálních a nádorových buněk (139,140). Invazivní chování agresivních synoviálních fibroblastů tak připomíná zvýšený metastatický potenciál nádorových buněk v přítomnosti S100A4.

Při inhibici NF- κ B signální dráhy byla o polovinu redukována syntéza MMP-3 synoviálními fibroblasty stimulovanými proteinem S100A4. NF- κ B představuje klíčový nitrobuňkový regulátor zánětu a jeho tvorba u RA v synoviální tkáni byla pozorována v místech panu, kde

dochází k destrukci kloubu (160). Úloha aktivace NF- κ B při expresi enzymů degradujících matrix po stimulaci proteinem S100A4 potvrzuje nedávný objev na endotelových buňkách (140).

Vedle synoviálních fibroblastů či makrofágů, mohou produkovat S100A4 také endoteliální buňky, a tak podporovat angiogenezi popsanou u tumorů (139-141). Zvýšená vaskularizace RA synoviální tkáně představuje důležitý moment choroby (161). Lze tak spekulovat, že S100A4 tvořený endotelovými buňky cév synoviální tkáně může podporovat zánětlivou aktivitu RA. U nádorových buněk byla popsána interakce S100A4 s tumor supresorovým proteinem p53, což může ovlivnit délku buněčného přežívání (135,139). Utlumení genové exprese odhalilo novou úlohu S100A4 jako negativního regulátoru mineralizace extracelulární matrix. Podílí se na tom ovlivnění diferenciaci osteoblastů a potlačení tvorby osteoblastických genů (162). Jestli protein S100A4 ovlivňuje regulaci apoptózy či snižuje kostní kvalitu také u RA by mělo být předmětem dalších výzkumů.

6. ZÁVĚR

Léčba osteoartrózy a revmatoidní artritidy je spojena s vysokými ekonomickými náklady. Prodlužující se střední délka života a očekávaný nárůst počtu jedinců s kloubními obtížemi přispívá k prohloubení ekonomického zatížení celé společnosti. To je jeden z důvodů proč v Ženevě v roce 2000 byla první dekáda tohoto milénia vyhlášena světovými odborníky „Dekádou kostí a kloubů“. Přes velkou snahu řady odborných pracovišť stále v současné době neexistuje molekulární marker, jež by byl validován pro hodnocení OA nebo RA.

Tato disertační práce pojednává o využití vybraných biomarkerů při hodnocení OA a RA. Dále řeší vzájemné vztahy těchto markerů, což navíc přispívá k bližšímu pochopení patogeneze obou chorob. Z vybraných markerů jsme hodnotili ukazatele oxidačního stresu a zánětlivé aktivity (pentosidin, CRP), parametry degradace kloubní chrupavky (COMP), metabolického obratu kosti (OPG, RANKL, deoxypyridinolin, pyridinolin), markery imunity (anti-CCP) a protein asociovaný s metastázami S100A4. U pacientů s OA kolenních kloubů jsme prokázali zvýšené hladiny pentosidinu a jejich pozitivní vztah k ukazateli destrukce kloubní chrupavky COMP v synoviální tekutině. Navíc jsme zjistili prediktivní význam pentosidinu při hodnocení progresu OA kolenních kloubů u časně formy OA, kdy jedinci s časným začátkem choroby a s vyššími koncentracemi pentosidinu vykazovali rychlejší rentgenovou progresi postiženého kloubu. Naše výsledky tak poukazují na asociaci oxidačního zatížení organismu a degradaci kloubní chrupavky, a staví pentosidin mezi několik nových potenciálních biologických markerů OA. Vyšší rozptyl sérových hodnot pentosidinu u pacientů s OA a u kontrolní skupiny však představuje limitující faktor pro diagnostické využití pentosidinu. U pacientů s OA kolenních kloubů jsme oproti pacientům s RA pozorovali vyšší koncentrace COMP v synoviální tekutině, což pravděpodobně odráží odlišný patogenetický mechanismus lokálně probíhající degradace a metabolismu artrotické chrupavky. Sérové hladiny COMP odráží systémový charakter metabolismu hyalinní chrupavky, nikoli postižení jednoho kloubu. Na úrovni jednotlivců navíc koncentrace COMP neodlišuje zdravé jedince od pacientů s kloubním postižením. COMP je tak studován zejména v longitudinálních studiích a jeho význam je spatřován převážně v určení prognózy dalšího vývoje choroby, což se nepodařilo potvrdit v naší práci u pacientů s časným začátkem OA. Pozitivní vztah regulační molekuly kostního obratu OPG s deoxypyridinolinem v séru u pacientů s OA poukazuje na určitou rovnováhu protektivního mechanismu kostního

metabolismu a resorpce kosti. Nepodařilo se nám prokázat, že by vyšší hodnoty OPG měly vztah k rentgenovému stádiu u pacientů s OA.

U pacientů s RA jsme v souladu s předchozími pracemi pozorovali vyšší hladiny pentosidinu v porovnání se zdravými kontrolami, nicméně již jen nevýznamné zvýšení oproti pacientům s OA. Navíc jsme nepotvrdili pozitivní asociaci pentosidinu s klinickou aktivitou choroby, ani s markerem destrukce chrupavky COMP či imunologickým prediktivním ukazatelem anti-CCP. Naopak pozitivní vztah systémových hodnot COMP s anti-CCP u pacientů s RA poukazuje na možnou asociaci imunitní aktivity a destruktivního poškození kloubní tkáně. Pacienti s RA měli v synoviální tekutině i v séru nízké hladiny regulační molekuly metabolického obratu kosti OPG, což je v souladu s pozorovaným úbytkem kostní hmoty a destrukce kloubu. Pozitivní korelace COMP a OPG v synoviální tekutině může ukazovat na přirozenou asociaci lokálních změn destrukce kloubní chrupavky a kosti. Dále jsme zjistili zvýšenou tvorbu proteinu stimulujícího tvorbu metastáz S100A4 buňkami synoviální tkáně u pacientů s RA, zejména pak v oblastech agresivního panu. Tento objev poukazuje v určitém ohledu na podobnost průběhu RA s metastatickým potenciálem nádorových chorob. Zjistili jsme, že obdobně jako nádorové buňky, synoviální fibroblasty vystavené vlivu proteinu S100A4 zvýšeně tvoří enzymy degradující extracelulární matrix (MMP), což představuje jeden z důležitých momentů patogeneze revmatoidní artritidy. Tvorba proteinu S100A4 RA synoviální tkáně a uplatnění S100A4 v patogenezi této choroby přispělo k rozšíření spektra prozánětlivých mediátorů podobných cytokinům, které mohou nalézt uplatnění v hodnocení či budoucí léčbě RA.

7. LITERATURA

1. Lawrence RC, Helmick GG, Arnett DF et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778-788.
2. Sowers M. Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:447-51.
3. Sharma L. Local factors in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:441-6.
4. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res* 2002;4:337-45.
5. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15: 628-33.
6. Ma Y, Pope RM. The role of macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2005;11:569-80.
7. Meinecke I, Rutkauskaite E, Gay S, Pap T. The role of synovial fibroblasts in mediating joint destruction in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2005;11:563-8.
8. Firestein GS. The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2004;114:471-4.
9. Munthe LA, Corthay A, Os A, Zangani M, Bogen B. Systemic autoimmune disease caused by autoreactive B cells that receive chronic help from Ig v region-specific T cells. *J Immunol* 2005;175:2391-400.
10. Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:783-9.
11. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347-53.
12. Feige U, Hu YL, Gasser J, Campagnuolo G, Munyaiazi L, Bolon B. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor-alpha synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1457-70.
13. Muller-Ladner U, Gay S. The SCID mouse--a novel experimental model for gene therapy in human rheumatoid arthritis. *Drugs Today (Barc)* 1999;35:379-88.
14. Maini RN, Wolfe F. Workshop summary: health outcomes and health economic issues surrounding the use of biological therapies in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38 Suppl 2:48-9.
15. Garnero P. Osteoarthritis: biological markers for the future? *Joint Bone Spine* 2002;69:525-30.

16. Otterness IG, Swindell A, Zimmerer RO, Poole AR, Ionescu M, Weiner E. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthritis cartilage* 2000;8:180-85.
17. Myers SL, O'Connor BL, Brandt KD. Accelerated clearance of albumin from the osteoarthritic knee: implications for interpretation of concentrations of "cartilage markers" in synovial fluid. *J Rheumatol.* 1996;23:1744-8.
18. Lajeunesse D, Reboul P. Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15: 628-33.
19. Bruyere O, Collette JH, Ethgen O, et al. Biochemical markers of bone and cartilage remodeling in prediction of longterm progression of knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 2003;30:1043-50.
20. Bettica P, Cline G, Hart DJ, Meyer J, Spector TD. Evidence for increased bone resorption in patients with progressive knee osteoarthritis: longitudinal results from the Chingford study. *Arthritis Rheum* 2002;46:3178-84.
21. Rovetta G, Monteforte P, Grignolo MC, Brignone A, Buffrini L. Hematic levels of type I collagen C-telopeptide in erosive versus nonerosive osteoarthritis of the hands. *Int J Tissue React* 2003;25:25-8.
22. Wollheim FA. Bone sialoprotein-a new marker for subchondral bone. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:331-2.
23. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1237-47.
24. Johansen JS, Hvolris J, Hansen M, Backer V, Lorenzen I, Price PA. Serum YKL-40 levels in healthy children and adults. Comparison with serum and synovial fluid levels of YKL-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint. *Br J Rheumatol.* 1996;35:553-9.
25. Conrozier T, Carlier MC, Mathieu P, Colson F, Debard AL, Richard S, Favret H, Bienvenu J, Vignon E. Serum levels of YKL-40 and C reactive protein in patients with hip osteoarthritis and healthy subjects: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:828-31.
26. Sharif M, George E, Shepstone L, Knudson W, Thonar EJ, Cushnaghan J, Dieppe P. Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1995;38:760-7.

27. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* 2001;60:619-26
28. Sturmer T, Brenner H, Koenig W, Gunther KP. Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Ann Rheum Dis* 2004;63:200-5.
29. Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB. Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis Rheum* 1997;40:723-7.
30. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993;53:288-95.
31. Masuhara K, Nakai T, Yamaguchi K, Yamasaki S, Sasaguri Y. Significant increases in serum and plasma concentrations of matrix metalloproteinases 3 and 9 in patients with rapidly destructive osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 2002;46:2625-31.
32. Naito K, Takahashi M, Kushida K, Suzuki M, Ohishi T, Miura M, Inoue T, Nagano A. Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 1999;38:510-5.
33. Chevalier X, Conrozier T, Gehrman M, Claudepierre P, Mathieu P, Unger S, Vignon E. Tissue inhibitor of metalloprotease-1 (TIMP-1) serum level may predict progression of hip osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:300-7.
34. Manicourt DH, Poilvache P, Van Egeren A, Devogelaer JP, Lenz ME, Thonar EJ. Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:281-8.
35. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:66-81.
36. Salvatierra J, Escames G, Hernandez P, et al. Cartilage and serum levels of nitric oxide in patients with hip osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1999;26:2015-7.
37. Karan A, Karan MA, Vural P, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2003;22:397-9.
38. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 2000;350:381-387.

39. Verzijl N, Bank RA, TeKoppele JM, DeGroot J. AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:616-22.
40. Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, et al. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis Rheum* 1994;37:724-8.
41. Aigner T, Zhu Y, Chansky HH, Matsen FA 3rd, Maloney WJ, Sandell LJ. Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1999;42:1443-50.
42. Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998;102:2115-25.
43. Sugiyama S, Itokazu M, Suzuki Y, Shimizu K. Procollagen II C propeptide level in the synovial fluid as a predictor of radiographic progression in early knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:27-32.
44. Garnero P, Ayrat X, Rousseau JC, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2613-24.
45. Pratta MA, Yao W, Decicco C, et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003;278:45539-45.
46. Fawthrop F, Yaqub R, Belcher C, Bayliss M, Ledingham J, Doherty M. Chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in progressive versus non-progressive osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:119-22.
47. Lohmander LS, Atley LM, Pietka TA, Eyre DR. The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:3130-9.
48. Garnero P, Conrozier T, Christgau S, Mathieu P, Delmas PD, Vignon E. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:939-43.
49. Jung M, Christgau S, Lukoschek M, Henriksen D, Richter W. Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology* 2004;71:70-6.
50. Saxne T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol* 1992;31:583-91.
51. Larsson E, Erlandsson Harris H, Lorentzen JC, et al. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein, fibrinogen and hyaluronan distinguish inflammation and

- cartilage destruction in experimental arthritis in rats. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:996-1000.
52. Petersson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:33-9.
53. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* 2002;10:707-13.
54. Conrozier T, Saxne T, Fan CS, et al. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in hip osteoarthritis: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis* 1998;57:527-32.
55. Vilím V, Vytášek R, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Procházka B, Kraus VB, Pavelka K. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects the presence of clinically diagnosed synovitis in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* 2001;9:612-18.
56. Dragomir AD, Kraus VB, Renner JB, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein and clinical signs and symptoms of potential pre-radiographic hip and knee pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:687-91.
57. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
58. Pincus T, Fuchs HA, Callahan LF, Nance EP Jr, Kaye JJ. Early radiographic joint space narrowing and erosion and later malalignment in rheumatoid arthritis: a longitudinal analysis. *J Rheumatol* 1998;25:636-40.
59. Emery P. Evidence supporting the benefit of early intervention in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2002;66:3-8.
60. Haque UJ, Bathon JM. The role of biologicals in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:179-89.
61. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br J Rheumatol* 1996;35:1263-8.
62. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep corpuscles. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 1940;1:172-88

63. Sheldon J. Laboratory testing in autoimmune rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18:249-69.
64. Sebbag M, Simon M, Vincent C, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995;95:2672-9.
65. Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* 2005;38:17-24.
66. Vencovský J, Macháček S, Šedová L, et al. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:427-30.
67. Raza K, Breese M, Nightingale P, et al. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:231-8.
68. De Rycke L, Verhelst X, Kruithof E, Van den Bosch F, Hoffman IE, Veys EM, De Keyser F. Rheumatoid factor, but not anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, is modulated by infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:299-302.
69. Blackburn WD Jr. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *J Rheumatol Suppl* 1994;42:9-13.
70. Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol* 1999;26:251-8.
71. Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2263-74.
72. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1994;21:733-8.
73. Madland TM, Hordvik M, Haga HJ, Jonsson R, Brun JG. Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *Scand J Rheumatol* 2002;31:351-4.
74. Schulze zur Wiesch A, Foell D, Frosch M, Vogl T, Sorg C, Roth J. Myeloid related proteins MRP8/MRP14 may predict disease flares in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:368-73.

75. Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I, et al. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum* 2004;50:1286-95.
76. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:265-78.
77. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:230-6.
78. Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:1275-8.
79. Majeed M, McQueen F, Yeoman S, McLean L. Relationship between serum hyaluronic acid level and disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1166-8.
80. Sharif M, George E, Dieppe PA. Synovial fluid and serum concentrations of aminoterminal propeptide of type III procollagen in healthy volunteers and patients with joint disease. *Ann Rheum Dis* 1996;55:47-51.
81. Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, et al. Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:618-26.
82. Garnero P, Gineyts E, Christgau S, Finck B, Delmas PD. Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosyl-pyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:21-30.
83. Garnero P, Landewe R, Boers M, Verhoeven A, et al. Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum* 2002;46:2847-56.
84. Hummel KM, Neidhart M, Vilim V, et al. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fibroblasts and synovial fluids. *Br J Rheumatol* 1998;37:721-8.
85. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1992;31:593-8.
86. Roux-Lombard P, Eberhardt K, Saxne T, Dayer JM, Wollheim FA. Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to

- radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(5):544-51.
87. Buckley KA, Fraser WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 2002;39:551-6.
88. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, et al. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:1003-12.
89. Morel J, Roch-Bras F, Molinari N, Sany J, Eliaou JF, Combe B. HLA-DMA*0103 and HLA-DMB*0104 alleles as novel prognostic factors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1581-6.
90. O'Dell JR, Nepom BS, Haire C, et al. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis* 1998;57:209-13.
91. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, et al. The Shared Epitope is a marker of severity associated with selection for, but not with response to infliximab in a large rheumatoid arthritis population. *Ann Rheum Dis* 2005 Aug 11;
92. Lee AT, Li W, Liew A, et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun* 2005;6:129-33.
93. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:196-201.
94. Cloos PAC, Christgau S. Non-enzymatic covalent modifications of proteins:mechanisms, physiological consequences and clinical applications. *Matrix Biol* 2002;21:39-52
95. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution. *Diabetes* 1996;45:S67-72.
96. Reiser KM. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;218:23-37.
97. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108:949-55.
98. Miyata M, Iida Y, Horie K, Cai Z, Sugiyama S, Maeda K. Pathophysiology of advanced glycation end-products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:27-80.

99. Imanaga Y, Sakata N, Takebayashi S. In vivo and in vitro evidence for the glycooxidation of low density lipoprotein in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000;150:343-55.
100. Reihnsner R, Menzel EJ. Two-dimensional stress-relaxation behavior of human skin as influenced by non-enzymatic glycation and the inhibitory agent aminoguanidine. *J Biomech* 1998;31:985-93.
101. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1207-15.
102. Nerlich AG, Schleicher ED. N ϵ -(carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis* 1999;144:41-47.
103. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002;105:816-22.
104. Drinda S, Franke S, Canet CC, et al. Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:488-92.
105. Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T et al. Advanced Glycation Endproducts Stimulate Interleukin-6 Production by Human Bone-Derived Cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:439-446.
106. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 2002;31:1-7.
107. Lucey MD, Newkirk MM, Neville C, Lepage K, Fortin PR. Association between IgM response to IgG damaged by glyoxidation and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000;27:319-23.
108. Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1999;38:1275-78.
109. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, et al. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 1992;267:6132-6.
110. Posey KL, Hayes E, Haynes R, Hecht JT. Role of TSP-5/COMP in pseudoachondroplasia. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1005-12.

111. Ozbek S, Engel J, Stetefeld J. Storage function of cartilage oligomeric matrix protein: the crystal structure of the coiled-coil domain in complex with vitamin D(3). *EMBO J* 2002;21:5960-8.
112. Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 2005;
113. Neidhart M, Zaucke F, von Knoch R, et al. Galectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 2005;64:419-24.
114. Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:8-13.
115. Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegard D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol* 2004;23:381-91.
116. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum* 1999;42:2356-64.
117. Mansson B, Carey D, Alini M, et al. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 1995;95:1071-7.
118. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004 Sep 30
119. Crnkic M, Mansson B, Larsson L, Geborek P, Heinegard D, Saxne T. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) decreases in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept. *Arthritis Res Ther* 2003;5:R181-5.
120. Weitoft T, Larsson A, Saxne T, Ronnblom L. Changes of cartilage and bone markers after intra- articular glucocorticoid treatment with and without postinjection rest in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005 Aug 11;
121. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:623-30.

122. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175-9.
123. Gravallese EM, Manning C, Tsay A, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;43:250-8.
124. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:610-5.
125. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221-30.
126. Abrahamsen B, Hjelmberg JV, Kostenuik P, et al. Circulating amounts of osteoprotegerin and RANK ligand: genetic influence and relationship with BMD assessed in female twins. *Bone* 2005;36:727-35.
127. Crotti TN, Smith MD, Weedon H, et al. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1047-54.
128. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:123-34.
129. Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 2002;46:1744-53.
130. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2005 May 12
131. Ueland T, Yndestad A, Oie E, Florholmen G, et al. Dysregulated osteoprotegerin/RANK ligand/RANK axis in clinical and experimental heart failure. *Circulation* 2005;111:2461-8.

132. Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2005;48:561-8.
133. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003;60:540-51.
134. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev* 1989;3:1086-93.
135. Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, et al. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene* 1993;135:229-38.
136. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005;92:1955-8.
137. Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002;160:7-13.
138. Gibbs FE, Barraclough R, Platt-Higgins A, Rudland PS, Wilkinson MC, Parry EW. Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J Histochem Cytochem* 1995;43:169-80.
139. Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, et al. Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 2004;279:24498-504.
140. Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, et al. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004;23:5487-95.
141. Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, et al. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001;20:4685-95.
142. Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:361-7.
143. Masuda K, Masuda R, Neidhart M, et al. Molecular profile of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis depends on the stage of proliferation. *Arthritis Res* 2002;4:R8. 2002.
144. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Diagnostic and*

- Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-49
145. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
 146. Ramey DR, Raynauld JP, Fries JF. The health assessment questionnaire 1992: status and review. *Arthritis Care Res* 1992;5:119-29.
 147. Angst F, Aeschlimann A, Steiner W, Stucki G. Responsiveness of the WOMAC osteoarthritis index as compared with the SF-36 in patients with osteoarthritis of the legs undergoing a comprehensive rehabilitation intervention. *Ann Rheum Dis* 2001;60:834-40
 148. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-501
 149. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-49
 150. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis *JAMA* 1949;140:659-62
 151. Gibson GJ, Verner JJ, Nelson FR, Lin DL. Degradation of the cartilage collagen matrix associated with changes in chondrocytes in osteoarthritis. Assessment by loss of background fluorescence and immunodetection of matrix components. *J Orthop Res* 2001;19:33-42.
 152. Pelletier JP, Pelletier JM, Abramson SB. Osteoarthritis, an Inflammatory Disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-1247.
 153. Mazuca SA, Brandt KD, Katz BP. Is conventional radiography suitable for evaluation of a disease-modifying drug in patients with knee osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5:217-26.
 154. Mazuca SA, Brandt KD, Lane KA, Katz BP. Knee pain reduces joint space width in conventional standing anteroposterior radiographs of osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 2002;46:1223-7.

155. Špaček P, Adam M. HPLC method for pentosidine determination in urine, serum, and tissues as a marker of glycation and oxidation loading of the organism. *J.Liq.Chrom.&Rel.Technol* 2002;25:1807-20.
156. Jordan JM, Luta G, Stabler T, et al. Ethnic and sex differences in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum* 2003;48:675-81.
157. Neidhart M, Muller-Ladner U, Frey W, et al. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:222-9.
158. Soderlin MK, Kastbom A, Kautiainen H, Leirisalo-Repo M, Strandberg G, Skogh T. Antibodies against cyclic citrullinated peptide (CCP) and levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in very early arthritis: relation to diagnosis and disease activity. *Scand J Rheumatol* 2004;33:185-8.
159. Yano K, Tsuda E, Washida N, et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999;14:518-27.
160. Benito MJ, Murphy E, Murphy EP, van den Berg WB, FitzGerald O, Bresnihan B. Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1781-7.
161. Neidhart M, Brühlmann P, Gay RE, Gay S. Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999, 42: 622-30.
162. Kato C, Kojima T, Komaki M, et al. S100A4 inhibition by RNAi up-regulates osteoblast related genes in periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326:147-53.

8. SEZNAM PRACÍ AUTORA

Literatura:

1. Forejtová Š, Pavelka K, Gatterová J, **Šenolt L**. Rychle progredující osteoartróza a metody hodnocení progresu osteoartrózy. *Čes Revmatol* 2002;1:11-18.
2. **Šenolt L**, Pavelka K. Oxid dusnatý (NO), intermediární produkty NO a jejich vliv na patogenezi osteoartrózy. *Čes Revmatol* 2003;1:42-50.
2. Vilím V, Vobúrka Z, Vytášek R, **Šenolt L**, Tchetverikov I, Kraus VB, Pavelka K. Monoclonal antibodies to human cartilage oligomeric matrix protein: epitope mapping and characterization of sandwich ELISA. *Clin chim acta* 2003;328:59-69.
3. **Šenolt L**, Braun M, Pavelka K. Konečné produkty pokročilé glykace u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou a jejich potenciální úloha v patogenezi těchto onemocnění. *Čes.Revmatol* 2003;3:146-56.
4. Olejárová M, Seidl Z, Vaněčková M, Gatterová J, Forejtová Š, **Šenolt L**, Pavelka K. Longitudinální sledování progresu MR obrazu kolenních kloubů u gonartrózy. Výsledky dvouleté studie. *Čes.Revmatol* 2003;4:169-73.
5. Vaněčková M, Seidl Z, Mašek M, Krásenský J, Olejárová M, Gatterová J, Forejtová Š, **Šenolt L**, Pavelka K, Daneš J. Volumetrické sledování chrupavky v obraze MR u gonartrózy. *Čes. Radiol* 2004;1:24-26.
6. **Šenolt L**, Pavelka K. Význam subchondrální kosti v patogenezi osteoartrózy. *Osteologický Bulletin* 2004;9:54-58.
7. Pavelka K, Forejtova S, Olejarova M, Gatterova J, **Senolt L**, Spacek P, Braun M, Hulejova M, Stovickova J, Pavelkova A. Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:277-83.
8. **Šenolt L**, Vencovský J, Pavelka K. Transdukční signální dráhy – cíl terapie revmatoidní artritidy budoucnosti? *Čes. Revmatol* 2005;2:58-66.
9. **Šenolt L**, Pavelka K. Molecular markers of osteoarthritis. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2005;72:191-6.
10. **Šenolt L**, Gatterová J, Pavelka K. Oligomerní protein matrix chrupavky (COMP) v séru a synovialní tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou. *Rheumatologia* 2005;3:123-128.
11. **Šenolt L**, Braun M, Olejárová M, Forejtová Š, Gatterová J, Pavelka K. Increased pentosidine, an Advanced Glycation Endproduct, in serum and synovial fluid from

patients with knee osteoarthritis and its relation with cartilage oligomeric matrix protein. *Ann Rheum Dis* 2005;64:886-90.

12. Šedová L, Šenolt L, Parkmanová P, Olejárová M, Vencovský J. Protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP) v séru a synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou. *Čes. Revmatol* 2005;3:79-83.
13. Šenolt L, Grigorian M, Lukanidin E., Michel BA, Gay RE, Gay S, Pavelka K, Neidhart M. S100A4 (Mts1): is there any relation to the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Immunol Rev.* 2005; v tisku
14. Šenolt L, Grigorian M, Lukanidin E., Beat S, Gay RE, Gay S, Pavelka K, Neidhart M. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis* 2005, přijato do redakce časopisu

Abstrakta:

EULAR 2003, 2005 - kongres evropské ligy proti revmatismu

1. *L. Sedova, L. Senolt, P. Parkmanova, M. Olejarova, K. Pavelka, J. Vencovsky.* LEVELS OF ANTIBODIES TO CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE (ANTI-CCP) IN SERUM AND SYNOVIAL FLUID OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS PATIENTS
2. *L. Senolt, V. Vilim, M. Braun, P. Spacek, K. Pavelka* PENTOSIDINE, WELL-CHARACTERIZED ADVANCED GLYCATION END PRODUCT, IN SERUM AND SYNOVIAL FLUID IN PATIENTS WITH PRIMARY KNEE OSTEOARTHRITIS
3. *O. Krystufkova, J. Niederlova, L. Senolt, M. Hladikova, S. Ruzickova, J. Vencovsky, K. Pavelka* RA PATIENTS HAVE LOWER SERUM AND SYNOVIAL FLUID LEVELS OF OPG THAN OA PATIENTS BUT NO SIGNIFICANT DIFFERENCE IN SOLUBLE RANKL
4. *L. Senolt, M. Grigorian, E. Lukanidin, B. Baslund, B.A. Miche, S. Gay, R.E. Gay, K. Pavelka, M. Neidhart* METASTASIS-ASSOCIATED PROTEIN S100A4 IS EXPRESSED IN OSTEOARTHRITIS AND RHEUMATOID ARTHRITIS SYNOVIUM AND UP-REGULATES THE EXPRESSION OF MATRIX-METALLOPROTEINASES IN SYNOVIAL FIBROBLASTS

Přednášky:

Význam pozdních produktů pokročilé glykace v patogenezi osteoartrózy a revmatoidní artritidy

- seminář revmatologického ústavu 2002

S100A4 (mts1) je exprimován synoviální tkání u pacientů s revmatoidní artritidou a moduluje produkci matrixových metaloproteináz

- MYRACE, Reichenau, 02/2005

- CIS Spring School in Systemic Autoimmune Diseases, Santa Fe, NM ,USA 03/2005

- seminář revmatologického ústavu 7/2005

- 49. sjezd českých a slovenských revmatologů, Piešťany, 09/2005

Biologické markery osteoartrózy

- 27. symposium Ortopedické kliniky IPVZ a I.LF UK FN Na Bulovce Praha, 11/2005

9. PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi rád poděkoval svému školiteli Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli revmatologického ústavu v Praze, za vzorné vedení a významnou pomoc při postgraduálním studiu a dále za umožnění zahraniční studijního pobytu v laboratoři experimentální revmatologie v Curychu. V souvislosti s tím bych rád poděkoval Prof. Dr. Steffenu Gayovi, vedoucímu výzkumné skupiny WHO centra molekulární biologie a nových terapeutických strategií pro revmatické choroby při oddělení revmatologie v Univerzitní Nemocnici Curych, jeho ženě Prof. Dr. Renate Gayové a Michelu Neidhartovi, PhD, PD za významnou pomoc při studiu molekulární biologie a poznání řady metod při práci na buněčných kulturách a genové expresi.

Za vynikající spolupráci na výzkumu a odborné konzultace bych také rád poděkoval Prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc., Mgr. Martinu Braunovi, RNDr. Vladimíru Vilímovi, CSc., MUDr. Olze Kryštůfkové z revmatologického ústavu v Praze a Ing. Aleně Dohnalové, CSc. z fyziologického ústavu I.LF UK v Praze.