

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**VÝZNAM VYBRANÝCH BIOMARKERŮ
V HODNOCENÍ A PATOGENEZI OSTEOARTRÓZY
A REVMATOIDNÍ ARTRITIDY**

Autoreferát doktorské disertační práce



MUDr. Ladislav Šenolt

Praha 2006

Uchazeč: MUDr. Ladislav Šenolt

Revmatologický ústav
Na Slupi 4
128 50 Praha 2
e-mail: seno@revma.cz

Téma: Význam vybraných biomarkerů v hodnocení a patogenezi
osteoartrózy a revmatoidní artritidy

Školitel: Prof. MUDr. Karel Pavelka DrSc.

Oborová rada: fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda komise pro obhajobu oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Trojan DrSc.

Poděkování

Školiteli: Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc. (ředitel Revmatologického ústavu v Praze)

Prof. Dr. Steffenu Gayovi (vedoucí výzkumné skupiny WHO centra molekulární biologie a nových terapeutických strategií pro revmatické choroby při revmatologické klinice v Univerzitní Nemocnici Curych)

Prof. Dr. Renate Gayové (Centrum molekulární biologie WHO v Curychu)

Michelu Neidhartovi, PhD, PD. (Centrum molekulární biologie WHO v Curychu)

Mariam Grigorian MD, PhD (Centrum pro výzkum rakoviny, Copenhagen)

Mgr. Martinu Braunovi (Revmatologický ústav v Praze)

RNDr. Vladimíru Vilímovi, CSc. (Revmatologický ústav v Praze)

MUDr. Olině Kryštůfkové (Revmatologický ústav v Praze)

Prof. MUDr. Jiřímu Vencovskému, DrSc. (Revmatologický ústav v Praze)

Ing. Aleně Dohalové, CSc. (Fyziologický ústav I.LF UK)

a mnoha dalším kolegům z Revmatologického ústavu v Praze a Centra pro experimentální revmatologii v Curychu.

OBSAH	Stránka
1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	6
3. METODIKA	7
3.1. Pacienti a kontrolní skupina	7
3.2. Synoviální tkáň	7
3.3. Laboratorní vyšetření	7
3.4. Klinické a rentgenové vyšetření	8
3.5. Statistické zpracování	9
4. VÝSLEDKY	10
4.1. Pentosidin u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	10
4.2. Oligomerní protein chrupavkové matrix (COMP) u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	13
4.3. Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF- κ B a osteoprotegerin u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou	14
4.4. Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy	16
5. DISKUZE	18
5.1. Pentosidin u pacientů s osteoartrózou	18
5.2. Pentosidin u pacientů s revmatoidní artritidou	19
5.3. Oligomerní protein chrupavkové matrix u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	20
5.4. Osteoprotegerin a ligand pro receptor aktivující NF- κ B u pacientů s osteoartrózou a revmatoidní artritidou	21
5.5. Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy	22
6. ZÁVĚR	24
7. SUMMARY IN ENGLISH	26
8. LITERATURA	28
9. SEZNAM PRACÍ AUTORA	30

I. ÚVOD

Osteoartróza (OA) a revmatoidní artritida (RA) patří mezi nejčastější kloubní onemocnění. Téměř 15 % dospělé populace je postiženo OA a přibližně 0.5-1% populace RA (1). OA je heterogenní onemocnění postihující především váhonosné klouby, páteř a drobné klouby rukou. Selhání kloubního aparátu je důsledkem narušeného metabolismu a degradace kloubní chrupavky. Navíc je také ovlivněn metabolismus subchondrální kosti, která se stává rigidnější a ztrácí vlastnosti podílející se na absorpci mechanického zatížení (2). Vzniká subchondrální kostní skleróza a tvoří se osteofyty. U RA je naopak kostní tkáň postižena destrukcí, která se na rentgenu typicky projevuje kostními usuracemi. RA se manifestuje často extraartikulárně, počínaje revmatoidními uzly a konče život ohrožující vaskulitidou. V současné době je za klíčovou tkáň vzniku OA považována kloubní chrupavka a tkáň kloubní výstelky je pokládána za primární místo vzniku RA. Synoviální membrána kloubu během RA podléhá hyperplazii, je infiltrována zánětlivými buňkami, což vede k tvorbě agresivní vaskularizované granulační tkáně (panu) (3).

Diagnóza OA a RA se opírá o kombinaci klinického a rentgenového nálezu, přičemž stanovení diagnózy RA napomáhají i některé autoprotilátky. Rentgenový snímek často vypovídá o poměrně pokročilém stádiu choroby a mezi mírou obtíží a rentgenovým nálezem existuje často významná diskrepance. Při sledování progresu choroby je třeba opakovat rentgenová vyšetření často s odstupem několika let. Tento poměrně dlouhý interval by bylo vhodné zkrátit. K tomu má sloužit stanovení biologických markerů. Pomocí biomarkerů bychom tak měli být schopni zachytit časná stadia onemocnění nebo včas určit prognózu dalšího vývoje choroby (4). Rozvíjející se výzkum v oblasti biomarkerů by měl dále přispět k jejich využití pro diagnostiku, hodnocení efektu léčby a pochopení patogeneze obou chorob.

V klinické praxi a při hodnocení lékových studií existuje v současné době několik prediktivních ukazatelů rentgenové progresu. Při hodnocení RA jde jednak o klinické a funkční známky aktivity choroby, laboratorní ukazatele zánětu, genetické markery a rentgenový nález. Nicméně tyto ukazatele mají také svá omezení a nízkou senzitivitu.

Kostní eroze a destrukce chrupavky mohou totiž probíhat nezávisle na zánětlivém postižení kloubního aparátu a mohou progredovat i navzdory nízké zánětlivé aktivitě a klinickému zlepšení (5). Mezi nové potenciální markery pro hodnocení RA patří některé nové autoprotilátky, zánětlivé parametry, ukazatele kloubního metabolismu a dědičné faktory. Při hodnocení progresu OA je stále zlatým standardem rentgenový snímek a měření zúžení kloubní štěrbin. Experimentálně se začínají uplatňovat také různé modifikace magnetické rezonance. Jako náhradní ukazatele slouží biologické markery OA, které by měly reflektovat metabolismus kloubní tkáně, tj. hyalinní chrupavky, kosti nebo synoviální membrány.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo stanovení vybraných potenciálních biologických markerů v séru a 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, markery imunologické aktivity 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. Vybrané markery jsme hodnotili v longitudinální studii a v řadě průřezových studií. Dalším cílem bylo zjistit, je-li protein podporující tvorbu metastáz S100A4 (metastasin) tvořen RA synoviální tkání a má-li význam v patogenezi RA s ohledem na tvorbu enzymů degradujících extracelulární matrix.

3. METODY

3.1. Pacienti a kontrolní skupina

Do této práce byli zařazeni pacienti s revmatoidní artritidou a osteoartrózou kolenních kloubů splňující daná kritéria onemocnění podle Americké revmatologické asociace. Kontrolní skupinu tvořili zdraví jedinci. 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 Zurich). Synoviální fibroblasty použité k experimentu na tkáňových kulturách byly získány ze 4-8 pasáže.

3.3. Laboratorní vyšetření

Stimulace synoviálních fibroblastů

Synoviální fibroblasty byly stimulovány oligomerní frakcí proteinu S100A4. Koncentrace S100A4 v experimentu v závislosti na dávce byla 0.1 až 4.0 µg/ml. Pro experimenty v závislosti na čase (6, 12 a 24 hodin) byla použita koncentrace 0.5 µg/ml. Buňky byly sesbírány a mRNA izolována v každém z uvedených časů. Buněčný supernatant byl získán za 24 hodin po stimulaci proteinem S100A4.

Měření vybraných biologických markerů

Tělní tekutiny (sérum a synoviální tekutina) a supernatant byly po odběru skladovány při teplotě -70°C. 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 sendvičové ELISA (Biomedica, Vienna). Absorpce byla měřena při 450 nm (Dynex Technologies). Pentosidín byl měřen pomocí vysoce účinné kapalínové chromatografie (HPLC).

Imunohistochemie

Protein S100A4 byl analyzován imunohistochemicky na řezech synoviální tkáně zalitých v parafínu. Po odstranění parafínu z tkáně a blokování nespecifických vazeb byla použita myši monoklonální protilátka anti-S100A4 v ředění 1:300. Inkubace tkáně s myši biotynilovanou protilátkou (1:1000) a streptavidin alkalickou fosfatázou byla následována barvením tkáňových řezů pomocí DAKO Fast Red Substrátu (DAKO Corporation, Carpinteria, USA). Myši 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 Random hexameru a MultiScribe reverzní transkriptázy (Applied Biosystems). 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 pro MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 a MMP-14. Amplifikační reakce byla následována 40 cykly dvoustupňového PCR, denaturací, ztužovací a extenzivní reakcí.

Inhibice NF-κB signální dráhy

Syntetický peptid NF-κB SN50 (Cell-Permeable Inhibitor Peptide, Calbiochem) tlumící translokaci aktivního komplexu NF-κB do jádra byl použit k inhibici signální dráhy NF-κB. NF-κB SN50 byl přidán k synoviálním fibroblastům 30 minut před stimulací proteinem S100A4. Pro zhodnocení funkční aktivity NF-κB byla použita transfekce synoviálních fibroblastů DNA vektorem IκBαM pCMV (BD Bioscience) za použití nukleofekčního kitu (Amaxa, Switzerland). Synoviální fibroblasty byly stimulovány po dobu 6 hodin proteinem S100A4. MMP-1 a MMP-3 byly měřeny pomocí 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 $0.56 \times$

(počet bolestivých kloubů) + 0.28 x (počet oteklých kloubů) + 0.7 ln (FW) + 0.012 x (pacientovo globální hodnocení stavu) (6). Funkční aktivita RA byla určena podle dotazníku zdravotního stavu HAQ (Health Activity Questionnaire) (7). Bolest a funkční stav u pacientů s OA byly hodnoceny pomocí indexu WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities osteoarthritis index) (8).

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 (9). Pro longitudinální sledování progresu choroby byly snímky hodnoceny modifikací metody podle Lequesna a šířka kloubní štěrbin byla měřena v nejužším místě mediálního kompartmentu tibiofemorálního kloubu podle Altmanova atlasu (10). Snímky rukou a nohou u pacientů s RA byly provedeny v předozadní a šikmé projekci a byly hodnoceny podle Steinbrockera (11).

3.5. Statistické zpracování

Všechny hodnoty byly vyjádřeny jako průměr nebo medián ± 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 a 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 REVMATOIDNÍ ARTRITIDOU

Do průřezové studie bylo zařazeno 38 pacientů s OA kolenních kloubů (13 mužů a 25 žen, průměrný věk 64.1 let). Ve skupině pacientů s RA bylo 39 jedinců (7 mužů a 32 žen, průměrný věk 53.0 let). Kontrolní skupinu tvořilo 38 jedinců bez anamnézy kloubních obtíží (15 mužů a 23 žen, průměrný věk 58.3 let). Do longitudinální studie se z celkového počtu 100 pacientů ke konečnému vyšetření po 2 letech dostavilo 89 pacientů (Tab.1). Jednalo se o pacienty s relativně časným začátkem choroby, jehož délka nepřesáhla 3 roky. Jedinci s diabetem mellitus či renální insuficiencí nebyli zařazeni do žádné z studií.

Tabulka 1. 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 štěrbin na počátku (mm)	4.95±1.46	-	-
Zúžení kloubní štěrbin během 2 let (mm)	-0.4±0.79	-	-

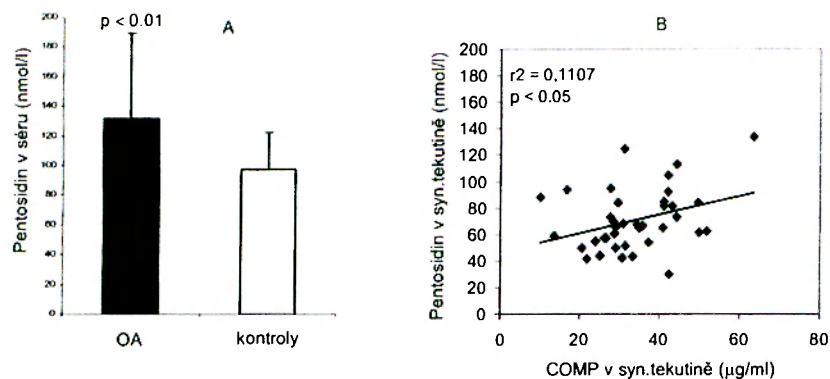
OA, osteoartróza; BMI, body mass index.

Zvýšená hladina pentosidinu u pacientů s osteoartrózou kolenních kloubů

U pacientů s OA kolenních kloubů jsme v porovnání s kontrolní skupinou pozorovali významně vyšší sérové hladiny pentosidinu (132.1 ± 56.2 vs 97.7 ± 24.0 nmol/l, $p < 0.01$) (Obr.1A). Pentosidin byl 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 ($r_s = 0.56$, $p < 0.001$).

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

Zjistili jsme statisticky významný vztah mezi pentosidinem a COMP v synoviální tekutině ($r = 0.11$, $p < 0.05$) (Obr.1B), přičemž tento vztah platil i pro pentosidin v séru a COMP v synoviální tekutině ($r_s = 0.12$, $p < 0.05$). Nepozorovali jsme žádný vztah mezi sérovým COMP a pentosidinem v séru ($r = 0.01$).



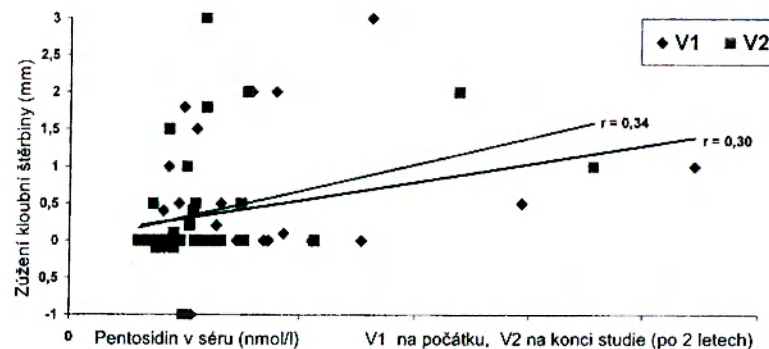
Obr.1. Porovnání sérové hladiny pentosidinu u pacientů s osteoartrózou (OA) kolenních kloubů s kontrolní skupinou (A) a korelace pentosidinu s ukazatelem destrukce chrupavky COMP v synoviální tekutině pacientů s OA kolenních kloubů (B).

Vztah pentosidinu ke klinickému stavu a rentgenovému stádiu osteoartrózy

U jedinců s OA kolenních kloubů i kontrolní skupiny jsme nepozorovali závislost pentosidinu na věku. Pentosidin nevykazoval vztah k míře kloubní bolesti, ani ke klinickému stavu (dotazník WOMAC). Neshledali jsme významný rozdíl mezi pentosidinem u pacientů s unilaterální či bilaterální OA kolenních kloubů, hladiny pentosidinu nebyly také ovlivněny rentgenovým stádiem OA.

Vztah pentosidinu k rentgenové progresi osteoartrózy kolenních kloubů

Během 2 let studie došlo k průměrnému zúžení kloubní štěrbiny o 0.4 ± 0.79 mm. Koncentrace pentosidinu byly na začátku studie vyšší v porovnání s kontrolní skupinou (143.4 ± 99.0 vs 115.3 ± 34.3 nmol/l, $p = 0.04$). 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 štěrbiny (obr.2.).



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

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, $p < 0.02$). Pentosidin v séru byl významně vyšší v séru než v synoviální tekutině (156.0 ± 124.0 vs 83.1 ± 68.6 nmol/l, $p < 0.001$) a jako u pacientů s OA byla pozorována významná korelace pentosidinu v séru a synoviální tekutině ($r = 0.9$, $p < 0.001$). Pentosidin v séru a synoviální tekutině se statisticky příliš nelišil mezi pacienty s RA a OA. Koncentrace pentosidinu v tělních tekutinách nebyla ovlivněna věkem ani délkou choroby.

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 ($r = 0.02$). 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 (6 mužů a 26 žen, průměrný věk 51.3 let) a 48 pacientů s OA kolenních kloubů (13 mužů a 25 žen, průměrný věk 66.1 let).

COMP v séru a synoviální tekutině

U jedinců s OA a RA i zdravých kontrol vzrůstaly významně sérové koncentrace COMP s věkem ($p < 0.001$). Koncentrace COMP v séru adaptované k věku se nelišily mezi pacienty s RA (3.8 ± 1.0 µg/ml), OA (3.8 ± 1.3 µg/ml) a kontrolami (3.5 ± 1.4 µg/ml). COMP v séru byl vyšší u jedinců mužského pohlaví ve všech sledovaných skupinách, nicméně pozorovaný rozdíl nebyl statisticky významný. Koncentrace COMP byly

významně vyšší v synoviální tekutině než v séru u pacientů s RA (19.1 ± 12.6 vs 3.3 ± 1.0 µg/ml, $p < 0.001$) i u pacientů s OA (32.5 ± 11.4 vs 3.9 ± 1.3 µg/ml, $p < 0.001$). Koncentrace COMP v synoviální tekutině u OA pacientů byla významně vyšší než u RA pacientů ($p < 0.001$). Hladina COMP v synoviální tekutině nebyla ovlivněna věkem ani pohlavím jedinců v žádné ze sledovaných skupin.

Vztah COMP k aktivitě a rentgenovému stádiu choroby

Průměrná koncentrace CRP u pacientů s RA byla významně vyšší než u pacientů s OA (35.8 ± 37.1 vs 5.8 ± 9.3 mg/ml, $p < 0.001$). Průměrná hodnota sedimentace erytrocytů u pacientů s RA dosahovala 38.4 ± 19.7 mm/h. Počet leukocytů v synoviální tekutině byl vyšší u RA pacientů oproti OA pacientům (7581 ± 6066 vs 402 ± 1045 v 1 ml). Všechny tyto ukazatele zánětlivé aktivity nevykazovaly vztah ke COMP v tělních tekutinách. Aktivita choroby RA pacientů hodnocená dle HAQ či DAS 28 a OA pacientů hodnocená dle WOMAC neměla vliv na hodnoty COMP v tělních tekutinách. Stejně tak nebyly hodnoty COMP ovlivněny časnjším začátkem choroby u RA pacientů (do 4 roků) oproti pacientům s delším průběhem choroby (více než 5 let). Sérové hodnoty COMP u RA a OA neměly vztah k rentgenovým stádiím chorob. Totéž platilo pro COMP v synoviální tekutině OA pacientů. U pacientů s RA byla nalezena korelace sérového COMP s koncentrací anti-CCP protilátek ($p < 0.05$).

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

Do této průřezové studie bylo zařazeno 45 pacientů s RA (9 mužů a 36 žen, průměrný věk 54.0 let) a 46 pacientů s OA kolenních kloubů (15 mužů a 31 žen, průměrný věk 66.0 let).

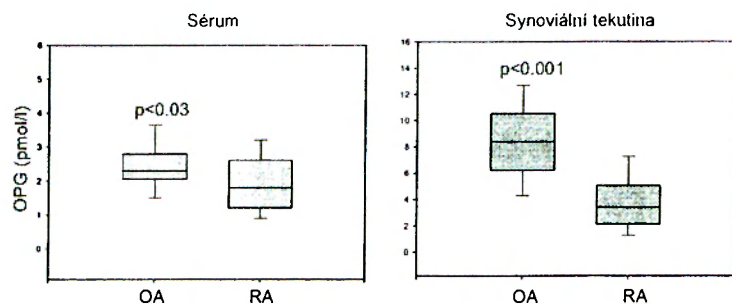
Ligand pro receptor aktivující transkripční faktor NF-κB (RANKL)

Sérové koncentrace solubilního 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 RA a OA (3.36 ± 2.7 vs

3.41±1.4 pmol/l). Nezávisle na diagnóze byl zjištěn negativní vztah RANKL k CRP ($p<0.05$). RANKL v synoviální tekutině nevykazoval žádný vztah k aktivitě RA.

Osteoprotegerin

Koncentrace OPG byla významně vyšší v synoviální tekutině než v séru ($p<0.001$) a v obou tělních tekutinách OPG navzájem koreloval u sledovaných skupin ($p<0.005$). OPG v synoviální tekutině pacientů s OA byl 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.3.). 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 ($p<0.03$). OPG v synoviální tekutině u pacientů s OA a v obou tělních tekutinách u pacientů s RA nebyl věkem ovlivněn.



Obr.3. Porovnání koncentrace OPG v séru a synoviální tekutině u pacientů s osteoartrózou (OA) a revmatoidní artritidou (RA).

U pacientů s RA velmi významně korelovaly hodnoty OPG a COMP v synoviální tekutině ($p=0.005$). To neplatilo u pacientů s OA, kde OPG v séru významně koreloval s ukazatelem resorpce kosti deoxyrydinolinem ($p=0.05$) a jistý trend byl pozorován také pro pyridinolin ($p=0.06$), což platilo i po adaptaci OPG k věku. Tento pozitivní vztah mezi OPG a markery metabolického obratu kosti nebyl pozorován u pacientů s RA.

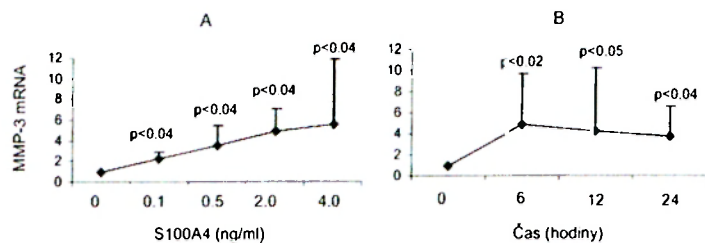
4.4. VÝZNAM S100A4 V PATOGENEZI REVMATOIDNÍ ARTRITIDY

Expres proteinu S100A4 synoviální tkání

S100A4 protein byl exprimován všemi RA synoviálními tkáněmi (10/10), byl lokalizován v oblastech synoviální intimy, intersticia a kolem synoviálních cév. Navíc byl přítomen v oblastech agresivního panu u 4/4 pacientů s RA. S100A4 se nacházel i v extracelulárním prostoru. Podle morfologické charakteristiky buněk tvoří S100A4 synoviální fibroblasty i makrofágy. Synoviální tkáň pacientů s OA (5/7) vykazovala podobný charakter barvení na protein S100A4, nicméně jeho intenzita byla slabší a extracelulární lokalizace S100A4 nebyla pozorována. U kontrolní synoviální tkáň jedinců po traumatu (3/3) nebyla tvorba S100A4 pozorována vůbec.

S100A4 zvyšuje expresi MMP mRNA synoviálními fibroblasty

Stimulovali jsme RA synoviální fibroblasty proteinem S100A4 a v závislosti na dávce jsme pozorovali indukci exprese MMP-1, MMP-3 (obr.4A), MMP-9 a MMP-13 mRNA 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 významně 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 MMP. Na druhé straně nedošlo ke zvýšené expresi MMP-14 mRNA. Podobné výsledky byly pozorovány u synoviálních fibroblastů OA pacientů. Při stimulaci RA synoviálních fibroblastů v závislosti na čase (6, 12 a 24 hodin) jsme použili 0.5 $\mu\text{g/ml}$ S100A4 proteinu. Indukce exprese MMP-3 mRNA (obr.4B) byla zjištěna ve všech časových intervalech s nejvyššími hodnotami po 6 hodinách (4.8x, 4.2x, a 3.7x vzestup). Po stimulaci proteinem S100A4 byla zvýšena také exprese MMP-1, MMP-9 i MMP-13, nicméně s různou kinetikou. Významná korelace byla nalezena mezi indukcí exprese MMP-1 a MMP-3 mRNA ($p<0.05$).



Obr.4. 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).

Uvolnění MMP ze stimulovaných synoviálních fibroblastů

Zvýšená exprese MMP na úrovni mRNA byla potvrzena na proteinové úrovni. Došlo ke zvýšenému 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.

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). Funkční aktivita NF-κB potvrzena transfekcí synoviálních fibroblastů vektorem IκBαM 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.

5. DISKUSE

5.1. Pentosidin u pacientů s osteoartrózou

U pacientů s OA kolenních kloubů jsme zjistili zvýšené sérové hladiny pentosidinu v porovnání se zdravou skupinou 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 sérového pentosidinu s progresí zúžení kloubní štěrbině po 2 letech sledování.

Zvýšené hladiny pentosidinu v séru nebyly v minulosti u pacientů s OA pozorovány (12). Nicméně náš soubor pacientů byl větší a výsledky jsou v souladu s nálezem vyšší koncentrace pentosidinu v moči u pacientů s OA (13). 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
2. oxidační stres.

Vyšší metabolický obrat a progresivní destrukce hyalinní chrupavky během OA může vést k pozorované ztrátě fluorescence glykačních produktů v blízkosti povrchu kloubní chrupavky a předpokládanému uvolnění proteinů modifikovaných pentosidinem do tělních tekutin (14). V posledních letech se na OA pohlíží jako na zánětlivé postižení kloubní tkáně (15), jež může být provázeno nízkou hladinou systémového zánětu v podobě lehce zvýšeného sérového C-reaktivního proteinu (16). Důležitou komponentou a zároveň významným ukazatelem metabolismu hyalinní chrupavky je COMP (17). Předpokládáme, že námi pozorovaná vyšší koncentrace pentosidinu a korelace pentosidinu s COMP v synoviální tekutině mohou odrážet lokální zánětlivě-destruktivní proces OA.

Monitorování biologických markerů OA má více pozitivních výsledků při hodnocení progresu dalšího vývoje choroby ve smyslu zúžení kloubní štěrbině. Pozdním produktům

pokročilé glykace je v posledních letech věnováno stále více pozornosti. Jejich množství v organismu vzrůstá v souvislosti se stárnutím a přítomností některých patologických stavů. Navíc působením na některé buňky mohou zvyšovat tvorbu prozánětlivých cytokinů (18). Věk patří mezi základní rizikový faktor primární OA a v kloubní chrupavce vzrůstá množství AGE právě během stárnutí organismu (19). Zvýšená akumulace AGE v kloubní chrupavce negativně ovlivňuje kvalitu, metabolický obrat a reparační kapacitu hyalinní chrupavky (13,19,20). Po provedení totální endoprotézy postiženého kloubu u pacientů s OA kolenních kloubů významně poklesly hladiny zvýšeného pentosidinu v moči (21). V této práci jsme pozorovali zvýšené hladiny pentosidinu v séru a jejich vztah k progresi zúžení kloubní štěrbině 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. Pentosidin 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 (22,23). 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 (23). V rozporu s tímto jsme nepozorovali asociaci zvýšeného pentosidinu s CRP či s aktivitou choroby. Pentosidin vykazoval vztah pouze k sedimentaci erytrocytů. Je obtížné vysvětlit diskrepanci našeho pozorování s předchozími studiemi. Tento rozdíl může být způsoben například použitím odlišného dotazníku na hodnocení aktivity choroby. Naš nález je v rozporu s tvrzením, že pentosidin představuje marker odrážející zánětlivou aktivitu 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.

Nepodařilo se prokázat, že by hladiny pentosidinu měly vztah k ukazateli metabolického obratu kloubní chrupavky COMP v séru či synoviální tekutině u jedinců s RA. V patogenezi RA sehrává významnou úlohu citrulinace proteinů synoviální tkáně a tvorba protilátek proti těmto modifikovaným proteinům (anti-CCP) má vysokou specifitu pro diagnózu RA (24). Detekce anti-CCP protilátek má navíc prediktivní význam strukturálního postižení u jedinců s časným začátkem choroby (25). Také se nepodařilo prokázat asociaci pentosidinu s protilátkovou aktivitou anti-CCP. Narozdíl od OA, kde pentosidin koreloval s COMP v synoviální tekutině, u RA pravděpodobně zvýšené hladiny pentosidinu odrážejí oxidační stres a zčásti chronickou zánětlivou aktivitu, nikoli destrukci kloubní chrupavky či autoprotilátkovou aktivitu choroby. Je 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

COMP představuje významný ukazatel metabolismu kloubní tkáně, zejména degradace hyalinní chrupavky (17). Vedle pohlaví, rasy a fyzické aktivity, patří věk mezi důležitý faktor ovlivňující koncentraci COMP v séru (26). Závislost na věku 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 (26). 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 odlišně probíhající metabolismus a destrukci artritické chrupavky v průběhu OA. COMP spíše představuje lokální ukazatel destrukce artritické chrupavky než-li systémový ukazatel metabolismu revmatické kloubní tkáně. Pokročilost rentgenové destrukce kolenních kloubů u OA pacientů neměla vliv na hodnoty COMP v séru ani v synoviální tekutině. Systémové hodnoty COMP také nevykazovaly závislost na pokročilosti RA vyjádřené rentgenovou destrukcí drobných ručních a nožních kloubů. U pacientů s časnou OA kolenních kloubů jsme nepozorovali prediktivní význam sérového COMP na vývoj choroby ve smyslu rentgenové progresy, který byl popisovaný v minulosti (27). Jedním z vysvětlení může být jednak odlišný průběh a délka choroby nebo kratší doba sledování pacientů v našem souboru.

Předpokládá se, že COMP může představovat marker reflektující časný zánět v průběhu nadměrného přetěžování kloubních struktur. V patogenezi RA sehrává významnou roli systémový zánětlivý proces a nedávno byla v časně fázi RA pozorována korelace COMP se zánětlivou aktivitou choroby, počtem oteklých kloubů a CRP (28). Nicméně v prospektivní 5-ti leté studii neodrážel COMP zánětlivou aktivitu ani destruktivní aspekt RA (29). Stejně tak i naše práce nepodporuje vztah COMP k rentgenovému poškození kloubů, klinické, ani laboratorní aktivitě RA. Pozorovali jsme však významný vztah sérového COMP s hladinami anti-CCP protilátek u pacientů s RA, což 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. To je důvod proč jsme pozorovali vyšší hladiny těchto molekul v místech probíhajícího zánětu, tj. v synoviální tekutině. Nižší koncentrace OPG v tělních tekutinách u pacientů s RA svědčí pro teorii nedostatečné protektivní úlohy OPG před kostní resorpcí u systémového zánětlivého onemocnění.

V porovnání se zdravými a stejně starými ženami byly vyšší sérové koncentrace OPG pozorovány u žen s postmenopauzální osteoporózou (30). U těchto pacientek byly koncentrace OPG vyšší u žen, které měly nižší densitu kostního minerálu a navíc korelovaly s močovým pyridinolinem a deoxypyridinolinem. Korelaci s markery kostní resorpcy jsme pozorovali také v naší práci u pacientů s OA kolenních kloubů. Důležitou charakteristikou RA je lokální úbytek kostní density a vznik kostních erozí, což je provázáno nižší tvorbou OPG synoviální tkání (31). V souladu s tímto jsme zjistili nižší koncentraci OPG v synoviální tekutině u pacientů s RA a navíc korelaci OPG s COMP v synoviální tekutině. Jedná se o 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, což je pravděpodobným vysvětlením odlišného patogenetického mechanismu poškození kloubních struktur u obou chorob.

V porovnání s nadměrnou tvorbou RANKL lymfocyty a makrofágy v RA synoviální tkáni (32) 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. 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 poškození kosti a hyalinní chrupavky u aktivní RA.

5.5. Význam S100A4 v patogenezi revmatoidní artritidy

Poprvé jsme prokázali intracelulární i extracelulární přítomnost proteinu S100A4 v synoviální tkáni RA pacientů. Protein S100A4 byl přítomen i v oblastech agresivní

synoviální tkáně (panu). Dále jsme zjistili, že extracelulární S100A4 indukuje zvýšenou tvorbu několika MMP synoviálními fibroblasty, což ukazuje na význam S100A4 v procesu kloubní destrukce během RA.

Na různých typech tumorů byly zjištěny účinky intracelulárního i extracelulárního proteinu S100A4 podporující tvorbu metastáz (33,34). 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 jsou hlavními strůjci kloubní destrukce u RA. Hlavním zdrojem těchto enzymů jsou fibroblasty synoviální intimy a agresivního panu (35). Protože jsme pozorovali extracelulární lokalizaci S100A4, lze uvažovat o významu secemovaného S100A4 u RA. Objevíli jsme, že exogenní S100A4 stimuluje tvorbu několika MMP synoviálními fibroblasty, což bylo nedávno pozorováno též u endotelových a nádorových buněk (34). Invazivní chování agresivních synoviálních fibroblastů tak připomíná zvýšený metastatický potenciál nádorových buněk v přítomnosti S100A4.

NF- κ B představuje klíčový nitrobuněčný regulátor zánětu a jeho tvorba u RA synoviální tkáně byla pozorována v místech panu, kde dochází k destrukci kloubu (35). Při inhibici NF- κ B signální dráhy byla o polovinu redukována syntéza MMP-3 synoviálními fibroblasty stimulovanými proteinem S100A4. Úloha NF- κ B při expresi MMP fibroblasty stimulovanými proteinem S100A4 je v souladu s nedávnou prací na endotelových buňkách, které vedle synoviálních fibroblastů či makrofágů mohou také produkovat S100A4 a podporovat angiogenezi popsanou u tumorů (34,37). Zvýšená vaskularizace RA synoviální tkáně představuje důležitý moment choroby, a tak lze spekulovat, že S100A4 tvořený endotelovými buňkami cév synoviální tkáně může podporovat zánětlivou aktivitu RA. Byla popsána interakce S100A4 s tumor supresorovým proteinem p53, což může ovlivnit délku buněčného přežívání (38). Nedávno bylo popsáno, že zvýšená exprese S100A4 působí jako negativní regulátor mineralizace extracelulární matrix. Podílí se na tom ovlivnění diferenciací osteoblastů a potlačení tvorby osteoblastických genů (39). Jestli protein S100A4 ovlivňuje regulaci apoptózy či snižuje kostní kvalitu u RA by mělo být předmětem dalších výzkumů.

6. ZÁVĚR

Tato disertační práce pojednává o využití vybraných biomarkerů při hodnocení OA a RA. Dále řeší vzájemné vztahy těchto markerů, což 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. V porovnání s pacienty s RA jsme u pacientů s OA kolenních kloubů pozorovali vyšší koncentraci 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 neodliší zdravé jedince od pacientů s kloubním postižením. 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 studiemi pozorovali vyšší hladiny pentosidinu v porovnání se zdravými kontrolami, nicméně 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 sérového 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 destrukcí 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 RA s nádorovými chorobami. 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 tkání 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. SUMMARY IN ENGLISH

Rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) represent the most common forms of musculoskeletal disorders that affect diarthrodial joints, lead to joint damage and disability. Extra-articular manifestations accompanied the joint disease only in RA. Diagnosis of both conditions most commonly bears on the conventional radiography. Mostly in OA, radiographic changes often occur late in the disease and are largely irreversible. Molecular markers could reflect joint damage, inflammation, or immune response. Current investigation revealed potential uses of molecular markers, ranging from understanding pathogenesis of the diseases to predicting and monitoring the outcome of the treatment.

The aim of the thesis was to analyze several biochemical markers in serum, synovial fluid and synovial tissue samples from patients with RA and OA, and to evaluate their diagnostic and predictive values as well as their contribution to the pathogenesis of the diseases.

We found increased serum pentosidine concentrations in OA patients that were of a predictive value of the joint space narrowing in OA of the knee joint and correlation between pentosidine and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid that make pentosidine one of the new potential biomarkers of the OA. Serum level of COMP was similar among patients with OA and RA as well as healthy individuals. In our study, COMP in serum was not predictive for further progression of OA and did not correlate with any marker of inflammation both in OA and RA. On the other side, COMP was significantly elevated in OA synovial fluid in contrast to RA synovial fluid, which may reflect distinct pathogenic feature of cartilage loss in OA process. Relationship between modulator of bone metabolism osteoprotegerin (OPG) and marker of bone turnover deoxypyridinolin in serum from OA patients could represent a balance between bone-protective role of OPG and bone resorption.

In RA patients significantly elevated levels of pentosidine were associated neither with disease activity nor with CRP. One can thus speculate about pentosidine as a surrogate marker of disease activity in RA. Relationships between COMP and anti-CCP antibodies in serum and COMP and OPG in synovial fluid may reflect the association of systemic cartilage turnover and immune activity, and local cartilage destruction and bone metabolism in RA. Decreased levels of OPG in RA can be responsible for the periarticular osteoporosis and bone destruction observed in RA, and predicate of an insufficient bone-protective role of OPG in inflammatory diseases. Moreover, we found the expression of metastasis-inducing protein - S100A4 at sites of invasion in RA synovium. In addition, exogenous S100A4 modulated expression and production of several matrix metalloproteinases (MMP) by RA synovial fibroblasts. Since several phenomena are similar between RA and malignant tumors, it can be hypothesized that S100A4 contributes to the aggressive, invasive, and tumor-like behavior of RA synovium.

=====

In conclusion, pentosidine may represent new biochemical marker of OA progression. Increased COMP in synovial fluid from OA patients can be a result of a different pathogenic feature of cartilage destruction in OA compared to RA. A relationship between several cartilage, bone, and immunological markers in RA could show a complexity of the disease. S100A4 could represent a new molecule that might be implicated in the pathogenesis of RA.

8. LITERATURA

1. Lawrence RC, Helnick 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. 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.
3. Zvaifler NJ, Firestein GS. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:783-9.
4. Giamcro P. Osteoarthritis: biological markers for the future? *Joint Bone Spine* 2002;69:525-30.
5. 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.
6. Prevoo MJ, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte JB, 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.
7. Ramey DR, Raynauld JP, Fries JF. The health assessment questionnaire 1992: status and review. *Arthritis Care Res* 1992;5:119-29.
8. 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
9. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494-501
10. 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
11. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis *JAMA* 1994;140:659-62
12. 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.
13. Verzijl N, Bank RA, TeKoppele JM, DeGroot J. AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:616-22.
14. 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.
15. Pelletier JP, Pelletier JM, Abramson SB. Osteoarthritis, an Inflammatory Disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-1247.
16. Stürmer 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.
17. 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.
18. Pertynska-Marczewska M, Kiriakidis S, Wait R, Beech J, Feldmann M, Paleolog EM. Advanced glycation end products upregulate angiogenic and pro-inflammatory cytokine production in human monocyte/macrophages. *Cytokine* 2004;28:35-47.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.

23. 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.
24. Vincent C, Nogueira I, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* 2005;38:17-24.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Grigorian MS, Tulchinsky EM, Zain S, et al. The mts1 gene and control of tumor metastasis. *Gene* 1993;135:229-38.
39. 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.

SEZNAM PRACÍ AUTORA

Literatura:

1. Forejtová Š, Pavelka K, Gatterová J, Šenolt L. Rychle progresující 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.
3. Vilím V, Vobůrka 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.
4. 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.
5. 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.
6. Vaněčková M, Seidl Z, Mašek M, Krásenský J, Olejárová M, Gatterová J, Forejtová Š, Šenolt L, Pavelka K, Dancš J. Volumetrické sledování chrupavky v obraze MR u gonartrózy. *Čes. Radiol* 2004;1:24-26.
7. Šenolt L, Pavelka K. Význam subchondrální kosti v patogenezi osteoartrózy. *Osteologický Bulletin* 2004;9:54-58.
8. Pavelka K, Forejtová S, Olejárová M, Gatterová J, Šenolt L, Spáček P, Braun M, Hulejová M, Stovickova J, Pavelkova A. Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:277-83.
9. Šenolt L, Vencovský J, Pavelka K. Transdukční signální dráhy – cíl terapie revmatoidní artritidy budoucnosti? *Čes. Revmatol* 2005;2:58-66.
10. Šenolt L, Pavelka K. Molecular markers of osteoarthritis. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2005;72:191-6.
11. Šenolt L, Gatterová J, Pavelka K. Oligomerní protein matrix chrupavky (COMP) v séru a synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou. *Rheumatologia* 2005;3:123-128.
12. 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.
13. 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.
14. 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
15. 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. Mische, 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. sympozium Ortopedické kliniky IPVZ a I.LF UK FN Na Bulovce Praha, 11/2005