

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Markéta Fojtíková

Imunogenetické a hormonální predispoziční markery systémových revmatických onemocnění, zejména systémového lupusu erythematosu

Immunogenetic and hormonal markers of predisposition to systemic rheumatic diseases particularly systemic lupus erythematosus

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. MUDr. Karel Pavelka, DrSc.

Konzultantka: doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

Praha, 2011

Obsah	2
Seznam zkratk	4
Klíčová slova	8
1. Úvod: Autoimunitní revmatická onemocnění – přehled chorob a současného poznání v patogeneze a léčbě	10
1.1 Charakteristika mechanismů rozvoje autoimunitního onemocnění	10
1.1.1 Prolomení tolerance vůči vlastním antigenům	11
1.1.2 Genetická rizika a autoimunitních onemocnění	12
1.1.2.1 Polymorfismus HLA I. a II. třídy a autoimunita	15
1.1.2.2 Další geny HLA I. třídy: MHC-class I related genes (MIC)	20
1.1.2.3 Ostatní rizikové genetické oblasti	21
1.1.3 Environmentální faktory a autoimunita	22
1.1.4 Hormonální změny a autoimunita	23
1.1.4.1 Estrogeny a autoimunita	24
1.1.4.2 Prolaktin a autoimunita	24
1.2 Systémový lupus erythematoses	30
1.2.1 Patogeneze systémového lupusu erythematosu	30
1.2.2 Klinický a laboratorní obraz	32
1.2.3 Léčba systémového lupusu erythematosu	37
1.2.3.1 Léčba mírně a středně aktivního systémového lupusu erythematosu	37
1.2.3.2 Léčba vysoce aktivního systémového lupusu erythematosu	41
1.2.3.3 Perspektivy v léčbě systémového lupusu erythematosu	43
1.3 Ostatní systémová revmatická onemocnění	44
1.3.1 Revmatoidní artritida	44
1.3.2 Psoriatická artritida	46
1.3.3 Systémová sklerodermie	47
1.3.4 Zánětlivé myopatie – dermatomyositida a polymyositida	48
2. Hypotézy	50
3. Cíle práce	51
4. Metodika	52
4.1 Soubor pacientů	52
4.2 Genetické analýzy	52

4.3	Stanovení hladiny prolaktinu v séru a synoviální tekutině	53
4.4	Statistické analýzy	54
5.	Výsledky	54
5.1	Imunogenetická analýza systémového lupusu erythematosu	54
5.2	Imunogenetická analýza psoriatické artritidy	56
5.3	Analýza hladin prolaktinu v séru a synoviální tekutině u nemocných s revmatoidní artritidou	57
5.4	Genetická analýza funkčního polymorfismu mimohypofyzárního promotoru PRL genu	58
6.	Diskuze	60
6.1	Genetická predispozice systémového lupusu erythematosu	61
6.2	Genetická predispozice psoriatické artritidy	63
6.3	Prolaktin a systémová revmatická onemocnění	64
7.	Závěry	68
8.	Abstrakt	70
8.1	Abstrakt v českém jazyce	70
8.2	Abstrakt v anglickém jazyce	72
9.	Přílohy	74
9.1	Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce	74
9.1.1	Rheumatology International	75
9.1.2	Rheumatology International	83
9.1.3	Clinical and Experimental Rheumatology	91
9.1.4	Annals of the Rheumatic Diseases	98
9.1.5	Rheumatology International	101
9.1.6	Rheumatology International	104
9.2	Seznam publikací in extenso bez vztahu k disertační práci	108
9.3	Seznam hlavních prezentací	109
10.	Literatura	111
11.	Prohlášení	132
12.	Identifikační záznam	133

Seznam zkratk

ACLA:	Antikardiolipidové protilátky
ACPA:	Protilátky proti citrulinovaným peptidům
AIHA:	Autoimunitní hemolytická anémie
AIRE:	Autoimunitní regulátor
ALMS:	Aspreva Lupus Management Study
ANA:	Antinukleární protilátky
Anti-dsDNA:	Autoprotilátky proti dvoušroubovici DNA
Anti- β 2 GPI:	Autoprotilátky proti β 2 glykoproteinu I
Anti-Jo1:	Autoprotilátky proti histidyl tRNA syntetáze
Anti-La:	Autoprotilátky proti antigenu La
Anti-Mi2:	Autoprotilátky proti jaderné helikáze
Anti-NR2 NMDA:	Autoprotilátky proti receptoru NR2 kyseliny glutámové
Anti-P protein:	Autoprotilátky proti fosforylovaným ribozomálním peptidům
Anti-PRL:	Autoprotilátky proti prolaktinu
Anti-Ro:	Autoprotilátky proti antigenu Ro
Anti-RNP:	Autoprotilátky proti malým ribonukleoproteinům
Anti-Scl-70:	Autoprotilátky proti DNA topoisomerase I
Anti-Sm:	Autoprotilátky proti Smithové antigenu
Anti-SRP:	Autoprotilátky proti malým signálním polypeptidům
AP-1:	Aktivační protein-1
APC:	Antigen-prezentující buňky
APL:	Antifosfolipidové autoprotilátky
APS:	Antifosfolipidový syndrom
AS:	Ankylozující spondylitida
ATF-2:	Aktivační transkripční faktor-2
AZA:	Azathioprin
BAFF:	B-buňky aktivující faktor (synonymum BlyS)
BCR:	Receptor B lymfocytů
BILAG:	British Isles Lupus Assessment Group Index
BP:	Páry bází
CADM:	Cancer associated dermatomyositis
CD40L:	CD 40 ligand

CMV:	Cytomegalovirus
CMP:	Centrální mozková příhoda
CNS:	Centrální nervový systém
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4
CYA:	Cyklosporin A
CYC:	Cyklofosfamid
DAG:	Diacylglycerol
DAS-28:	Disease Activity Score
DM:	Dermatomyositida
DMARDs:	Chorobu modifikující léčiva
DNA:	Deoxyribonukleová kyselina
EBNA 1,2:	Nukleární antigen Epstein-Barrové viru 1,2
EBV:	Epstein-Barrové virus
ECLAM:	European Consensus Lupus Activity Measure
FKHRL1:	Forkhead transcription factor family-1
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER:	Estrogenový receptor
ERE:	Estrogen responsive elements
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
E4BP:	4E binding protein
FDA:	Food and Drug Administration
GAS:	γ -interferon binding site
G-CSF:	Kolonie granulocytů stimulující faktor
GIT:	Gastrointestinální trakt
GM-CSF:	Kolonie granulocytů a monocytů stimulující faktor
GSK:	Glukagon synthase kinase 3
GWAS:	Genome-wide association studies (Celogenomové asociační studie)
HLA:	Human leukocyte antigens
Hsp70:	Heat shock protein
IFN- γ :	Interferon- γ
IFN- α :	Interferon- α
IgA, G, E:	Imunoglobulin A, G, E
IK:	Imunokomplex

IL – x:	Interleukin – x
IL-2R:	Receptor pro interleukin 2
iNOS:	Iducibilní syntáza oxidu dusnatého
InsP3:	Inositol-3 fosfátu
Jak:	Janus kináza
Jak-2:	Janus kináza-2
JIA:	Juvenilní idiopatická artritida
JNK:	Jun-N-terminal kinase
kDa:	Kilo Dalton
LA:	Lupusové antikoagulant
LAi:	Lupus Activity Index
LEF:	Leflunomid
LN:	Lupusová nefritida
LTA:	Lymfotoxin A
LTB:	Lymfotoxin B
LS:	Larsenovo skóre
λ :	Konstanta lambda
MAPK:	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MBL:	Mannose binding lecitin
M-CSF:	Kolonie monocytů stimulující faktor
MHC:	Hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIC:	MHC- class I related chain
MMF:	Mykofenolát mofetil
MMP:	Metaloproteinázy
MP:	Metylprednisolon
mRNA:	Messenger riboxynukleová kyselina
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
MTX:	Methotrexát
NIH:	National Institutes of Health
NF κ B:	Nukleární faktor kappa B:
NP-SLE:	Neuropsychiatrický systémový lupus erythematoses
NS:	Nesignifikantní
NZB/W F1:	New Zealand Black/White kříženec

NZW/BXSB F1: Kříženec New Zealand White a BXSB

OA: Osteoartróza

OR: Odds Ratio

PBMC: Periferní mononukleární buňky

PCR: Polymerázová řetězcová reakce

PCR – SSP: PCR s použitím sekvenčně specifických primerů

PD-1: Programme death-1

PDN: Prednison

PI3K: Fosfatidylinositol-3-kináza

PKC: Proteinkináza C

PLC: Fosfolipáza C

PM: Polymyositida

PPA2: Protein phosphatase 2

PRL: Prolaktin

PRL-R: Receptor pro prolaktin

PsA: Psoriatická artritida

PSORAS: Psoriatic arthritis susceptibility

PSORS: Psoriasis susceptibility

PTPN22: Protein tyrosine phosphatase – 22

PV: Psoriasis vulgaris

RA: Revmatoidní artritida

RANK: Receptor Activator of NFκB

RANKL: Receptor Activator of NFκB ligand

RIA: Radioimunoanalýza

RFLP: Analýza délky restrikčních fragmentů

RNA: Riboxynukleová kyselina

RS: Roztroušená skleróza

SF: Synoviální fibroblasty

SIR: Standardizovaný poměr incidence

SNP: Jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

SLAM: The Systemic Lupus Activity Measure

SLE: Systémový lupus erythematoses

SLEDAI: Index aktivity systémového lupusu erythematosu

SSc:	Systémová sklerodermie
SSP:	Sekvenčně specifické primery
SSO:	Sekvenčně specifické oligonukleotidy
Stat:	Signální transduktor a aktivátor transkripce
TAP 1,2:	ATP-binding cassette transporter 1,2
TCR:	Receptor T lymfocytů
TF:	Transkripční faktor
TGF- β :	Transformující růstový faktor- β
TIA:	Transitorní ischemická ataka
TNF- α :	Tumor necrosis factor- α
T1D:	Diabetes mellitus 1. typu
UVA, B:	Ultrafialové záření A, B
WB:	Western Blot

Klíčová slova

Systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida, psoriatická artritida, systémová sklerodermie, polymyositida, dermatomyositida, gen, alela, hlavní histokompatibilní systém, polymorfismus, prolaktin, exprese, asociace, autoimunita

Key words

Systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, systemic sclerosis, polymyositis, dermatomyositis, gene, allele, major histocompatibility system, polymorphism, prolactin, expression, association, autoimmunity

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v Biomedicině - oboru Fyziologie a Patofyziologie člověka na 1. Lékařské Fakultě University Karlovy v Praze.

Poděkování patří především mému školiteli, prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., který převzal vedení mého studia po prof. MUDr. Ctiboru Dostálovi, DrSc., a konzultance mé práce, doc. MUDr. Marii Černé, CSc. Svému školiteli děkuji za všestrannou podporu, motivaci k vědecké a klinické činnosti a inspirující připomínky při řešení práce. Své školitelce děkuji za výjimečnou podporu při laboratorních činnostech, laboratorní zázemí a za metodické vedení mé práce. Profesoru C. Dostálovi děkuji za podporu a cenné podněty k práci v začátcích mého postgraduálního studia.

Velmi bych chtěla poděkovat všem kolegům a kolegyním z Revmatologického ústavu v Praze, kteří mi předávali své cenné zkušenosti a vědomosti z oblasti klinické a výzkumné a velmi děkuji kolegyním z Oddělení obecné biologie a genetiky a Oddělení molekulární biologie 3. Lékařské Fakulty University Karlovy, které mi pomohly při technickém zvládnutí řešení tématu práce.

Velké díky patří mé rodině, která mi dodává podporu za všech okolností.

1. Úvod: Autoimunitní systémová onemocnění – přehled chorob a současné poznání v patogeneze a léčbě

1.1 Charakteristika mechanismů rozvoje autoimunitního onemocnění

Autoimunitními onemocněními je nazývána variabilní skupina chorob, které mají společný rys ve své patogenezi: v imunitním systému došlo k selhání rozpoznání organismu vlastních antigenů, které jsou označeny jako patogeny a je proti nim namířena humorální a i buněčná imunitní reakce vedoucí k poškození tkání. Klinický průběh autoimunitních onemocnění je variabilní – podle postižených orgánů a tkání rozlišujeme autoimunity na orgánově specifické a systémové.

Autoimunitní onemocnění, jak orgánově specifická, tak systémová (viz Tabulka 1), se vyskytují cca u 5% populace a patří k závažným důvodům morbidity osob v reprodukčním věku. Onemocnění začínají v kterémkoliv věku, u některých jsou častěji postiženy ženy. Etiopatogeneza těchto chorob je široká, k vypuknutí choroby u geneticky vnímavé osoby je nutné přispění dalších vlivů, a sice individuálních (věk, hladiny pohlavních hormonů), faktorů zevního prostředí (biologických, chemických či fyzikálních) a psychického a fyzického stresu.

Tabulka 1. Autoimunitní onemocnění	
Systémová	Orgánově specifická
Revmatoidní artritida	Roztroušená skleróza
Sjögrenův syndrom	Gravesova choroba
Systémová sklerodermie	Hashimotova tyreoiditida
Polymyositida	Autoimunitní diabetes
Dermatomyositida	Primární biliární cirhóza
Systémový lupus erythematoses	Autoimunitní gastritida
Psoriatická artritida	Crohnova choroba
Antifosfolipidový syndrom	Célie
Systémové vaskulitidy	Ulcerózní kolitida

1.1.1 Prolomení tolerance vůči vlastním antigenům

K prolomení autotolerance vede komplexní, mnohastupňový, navzájem se prolínající a ovlivňující proces, na kterém se podílí složky a buňky jak adaptivní, tak i přirozené imunity. Lidský organismus má dvě úrovně mechanismů tolerance vůči svým vlastním antigenům. Jedná se o toleranci centrální a periferní.

Centrální tolerance se projevuje v průběhu velmi časného vývoje imunokompetentních buněk (B a T lymfocytů), který probíhá v thymu, v případě T lymfocytů, nebo v kostní dřeni, během zrání B lymfocytů, a je pečlivě regulován lokálním mikroprostředím - mezibuněčnými kontakty a cytokiny. Při vývoji B lymfocytů v kostní dřeni dochází přeskupováním genů pro H a L řetězce k syntéze povrchového imunoglobulinu, antigenně specifického receptoru BCR. Kritickým momentem v dalším vývoji B buněk je testování reakce tohoto receptoru k nabízeným autoantigenům – pokud se k nim váže s vysokou afinitou, dochází k indukci apoptózy buňky. U T lymfocytů je selekce během vývoje ještě přísnější a vyzrává pouze 98% pro-thymocytů. Nezralé T lymfocyty s již definitivním receptorem TCR jsou exponovány autoantigenům na povrchu dendritických a epitelálních buněk v kůře thymu. Pokud reagují s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) s navázanými vlastními peptidy, dostávají silný podnět k apoptóze a jsou zlikvidovány (1-3). Na druhou stranu, odstraněny jsou i nezralé T lymfocyty s nedostatečnou vazbou k MHC molekulám a zralý T lymfocyt je jen ten, který je schopný s nízkou afinitou reagovat s MHC proteiny – třídou I. v případě CD8+ T buněk a třídou II. CD4+ T lymfocytů.

Autoreaktivní buňky, které přece jen uniknou centrálnímu mechanismu negativní selekce mohou být ještě ztlumeny několika mechanismy v periférii (2). Jedná se o klonální delecii, kdy autoreaktivní buňky po setkání s autoantigenem hynou aktivací apoptózy (například interakcí apoptotického receptoru Fas s ligandem FasL), klonální anergii, kdy nedojde k aktivaci buňky, neboť chybí signály kostimulačních molekul a klonální ignoranci, kdy jsou autoantigeny exprimovány v podprahovém množství, které neposkytuje dostatečný signál k aktivaci. Další možností je aktivní suprese autoreaktivních lymfocytů – a to dalšími imunitními buňkami (například T regulačními lymfocyty) a jejich produkty, například cytokiny jako je interleukin (IL)-10 nebo transformující růstový faktor (TGF)- β (1-4).

1.1.2 Genetická rizika a autoimunitních onemocnění

Genetika autoimunitních onemocnění vykazuje několik specifíků. Autoimunitní choroby, až na výjimky, jako je například autozomálně recesivní onemocnění - polyglandulární syndrom I., u kterého je identifikováno několik mutací genu nazvaného autoimunitní regulátor (AIRE) (1, 4), jsou polygenní a nevykazují klasickou mendelovskou dědičnost. I přesto se ale autoimunity častěji vyskytují v postižených rodinách. Agregace onemocnění v rodině je dána konstantou lambda (λ), která určuje poměr mezi prevalencí choroby mezi příbuznými postiženého jedince k prevalenci v běžné populaci, $\lambda \geq 5$ znamená signifikantní spolupodíl genetických faktorů na rozvoj onemocnění. V rámci autoimunitních onemocnění se λ s liší u jednotlivých onemocnění – například psoriasis vulgaris (PV) dosahuje 4-11, ale u psoriatické artritidy (PsA) 27-47 (5), u systémového lupusu erythematosu (SLE) a céliakie dosahuje hodnot až 30 (6,7), u Crohnovy choroby 20-35 (8), roztroušené sklerózy (RS) 20-40 (9), ale u autoimunitního diabetu (T1D) pouze 15 (10) a revmatoidní artritidy (RA) 5-10 (11). Pro identifikaci genetických rizik byla sledována i shoda rozvoje onemocnění u dvojčat; autoimunitní choroby vykazují vesměs statisticky významný rozdíl konkordance vzniku choroby mezi dvojčaty mono- a dizygotními. U monozygotních dvojčat je konkordance vyšší, například cca 83% u monozygotních versus 16% u dizygotních dvojčat a výskytem céliakie (12) nebo 42% versus 7% s T1D (10). Konkordance nižší než 100% znamená nutnost přispění dalších faktorů k rozvoji choroby.

Dalším specifíkem v genetice autoimunit je to, že u příbuzných jedince nemocného s autoimunitní chorobou, jak systémovou (SLE, RA a další), tak i orgánově specifickou (RS, céliakie, T1D a další) existuje zvýšené riziko k rozvoji nejen již manifestované autoimunitní choroby, ale i autoimunity jiné (13, 14). Riziko rozvoje onemocnění nám v tomto určuje standardizovaný poměr incidence (SIR), tj. podíl počtu pozorovaných a očekávaných případů. Hemminki et al. v recentních studiích sledoval vzájemné vztahy několika autoimunitních chorob, a sice SLE, RA, céliakie, ankylozující spondylitidy (AS), zánětlivých střevních zánětů (Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy) a T1D na rozsáhlém počtu nemocných a jejich příbuzných (15). Zjistil například, že děti nemocných rodičů s RA mají až 2.96x vyšší riziko vzniku AS oproti zdravé populaci. SIR je pro děti RA rodičů zvýšeno i u dalších systémových onemocnění, například SLE (2.13) a Sjögrenova syndromu (2.25) a i u orgánově specifických, např. Hashimotovy thyreoiditidy (1.54) nebo perniciózní anémie (1.53) (16). Obdobně existuje riziko vyššího výskytu další autoimunity u jedince postiženého

již jednou autoimunitou, například u T1DM je až 20x vyšší riziko rozvoje céliakie (17) a cca 4.5x vyšší riziko vzniku autoimunitní thyreoiditidy (18).

Uvedený fenotypový overlap několika autoimunit u jednoho jedince nebo jedné rodiny je způsoben i overlapem rizikových genetických lokalit u různých autoimunit (viz Tabulka 2). K rozvoji autoimunitních chorob přispívá většinou několik rizikových genů.

Tabulka 2. Přehled genů asociovaných s patogenezí několika autoimunitních onemocnění

Lokalita	Geny Název	Funkce	Asociované choroby	Literatura
6p21.3-22.2	MHC	HLA I. a II. Třídy - Prezentace antigenu	SLE, RA, PsA, AS, RS, T1D, GD, céliakie, PV, CD, UC	6, 7, 9, 12, 19-26
1p31	IL-23R	Receptor pro IL-23, stimulace T lymfocytů, NK buněk a makrofágů	UC, CD, AS, céliakie, PV	8, 20, 24, 25, 27
10p15	IL-2Ralfa (CD25)	Součást receptoru pro IL-2, aktivace T lymfo, úloha ve zrání CD4+CD25+buněk	RA, RS, T1D, GD	9, 20, 28
2q33	CTLA-4	Kostimulační molekula cytotoxických T lymfocytů, suprese T lymfocytů	RA, SLE, T1D, CD, UC, GD, HT	20, 26, 29,30
4q26-27	IL-2, IL-21	Stimulace proliferace T, B a NK buněk a naivních CD45RA+ T lymfocytů	RA, T1D, céliakie, PsA, UC, SLE	7, 20, 24, 25, 32-35
16q12	NOD2/CARD 15	Intracelulární receptor bakteriální produktů, transdukce signálu k NFkB	CD, PsA	20, 36
6q23.3	TNFAIP3	TNF- α indukibilní protein 3, blokuje inhibitor NFkB	RA, SLE, T1D, CD, PV	20, 34, 37-40
2q32.2-3	STAT-4	Intracelulární molekula, součást signální dráhy Jak-Stat, nezbytná pro IL-12 signál	RA, SLE, LSc	6, 45, 46
1p13	PTPN22	Tyrosin. fosfatáza T lymfocytů, supresor vývoje a aktivace T buněk	RA, SLE, T1D, GD, CD	6, 20, 41- 44

SLE: systémový lupus erythematoses, RA: revmatoidní artritida, PsA: psoriatická artritida, AS: ankylozující spondylitida, RS: roztroušená skleróza, T1D: autoimunitní typ diabetu, GD: Graves-Basedowova choroba, PV: psoriasis vulgaris, UC: ulcerózní kolitida, CD: Crohnova choroba, HT: Hashimotova thyreoiditida, LSc: limitovaná sklerodermie; IL: interleukin, TNF- α : tumor nekrotizující faktor- α , NFkB: nukleární faktor kappa B, Jak-Stat: Janus kinaza-Signální transduktor a aktivátor transkripce

Detekce rizikových genů je prováděna pomocí vazbových analýz „linkage analysis“ (10, 18, 19, 22). Pomocí této metody se sleduje výskyt mnoha polymorfních markerů – mikrosatelitových nebo i jednonukleotidových polymorfismů (single-nucleotide

polymorphism, SNP) v rodinách postižených jistým onemocněním. Detekce probíhá metodami fragmentační analýzy anebo přímé sekvenace. Ve výsledcích se pak hledá odchylka od předpokládané mendelovské dědičnosti, která znamená vazbu daného markeru se vznikem onemocnění. Pomocí statistického testu LOD score se porovnává hypotéza, že je daný marker ve vazbě s onemocněním s pravděpodobností, že s onemocněním ve vazbě není. K studiím tohoto typu je nutné mít rodokmen sledovaných rodin.

Další možností detekce rizikových genů a alel jsou asociační studie. U asociačních studiích se sleduje frekvence jistého genetického znaku (SNP, mikrosatelitového polymorfismu, delece atd.) u kohorty nemocných a u kohorty zdravých jedinců. Detekce může probíhat molekulárně genetickými metodami obdobně jako u „linkage analysis“ studií (tj. přímá sekvenace, fragmentační analýza), ale i polymerázová řetězcová reakce (PCR) s analýzou délky restričních fragmentů (RFLP) nebo sekvenčně specifických primerů (SSP), eventuelně oligonukleotidů (SSO). Výběr sledovaného genetického polymorfismu je dán většinou jeho efektem na funkci genu (ovlivnění exprese genu, vlivem na strukturu peptidu, atd.). V posledních letech probíhají rozsáhlé asociační studie na velkých počtech nemocných lidí a zdravých kontrol metodami celogenomových screeningů (genome-wide association studies, GWAS). Pomocí GWAS lze detekovat tisíce SNP či jiných polymorfismů včetně insercí, delecí a nově i lokalit s duplikací DNA na základě microarray analýz (6-9, 20,21,23-26). Frekvence detekovaných alel se poté porovnává mezi nemocnými a zdravými pomocí statistických testů (kontingenční tabulka, Fischer exact test a další) a stanovuje se statistická významnost – hodnota p . V asociačních studiích je nutno p hodnotu korelovat počtem pozorování (například Bonferroniho korekce). Dále se statisticky hodnotí míra rizika - Odds Ratio (OR). OR určuje, kolikrát má jedinec nesoucí určitý genetický znak vyšší riziko onemocnění v porovnání s jedincem, který tento znak nemá.

Hlavní rizikovou „autoimunitní“ oblastí, která je s vysokou statistickou významností opakovaně detekována u různých autoimunitních chorob (viz Tabulka 2), je oblast krátkého raménka 6. chromozómu, 6p21.3-22.2 (5, 6, 9, 19-26). Tato lokalita obsahuje cca 200 genů, přičemž minimálně 40% je spojeno s imunitními reakcemi. V oblasti se vyskytuje soubor genů spojených reprezentací antigenů – hlavní histokompatibilní komplex, který obsahuje geny HLA (human leukocyte antigens), 6p21.3-21.1. Rozeznáváme HLA I. třídy (HLA-A, B, C, G, E a F) a HLA II. třídy (HLA-DR, DQ, DP, DM, DO). Oblast dále obsahuje další HLA-geny, jako jsou geny MIC- A-G (MHC- class I related chain, A-G) a geny spojené se zpracováním peptidu molekul HLA I. třídy, TAP 1, 2 (ATP-binding cassette transporter).

Další početnou skupinou genů označovaných jako HLA III. třídy jsou geny ovlivňující průběh imunitní odpovědi. Jedná se o geny pro složky komplementu (C2, 4), molekulární chaperony (Hsp70) a cytokiny – například tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) nebo lymfotokiny (LTA a B) a další. V blízkosti HLA oblasti, v oblasti 6p22.2 je lokalizován i gen pro prolaktin, PRL (47).

1.1.2.1 Polymorfismus HLA I. a II. třídy a autoimunita

HLA oblast je vysoce polymorfní - v současnosti bylo detekováno 6403 alel v oblastech HLA I. a II. třídy (viz Tabulka 3). Mezi jednotlivými alelami pak existuje vazebná nerovnováha – to znamená, že určité alely se dědí společně za vzniku daných haplotypů. Geny HLA I. a II. třídy kódují povrchové transmembránové glykoproteidy, které mají zásadní roli v prezentaci antigenu.

HLA geny I. a II. třídy se dědí kodominantně, a proto jsou na povrchu buněk exprimovány produkty genů zděděných po matce i po otci. Genetické variace v oblasti vazebných míst určují schopnost HLA molekuly vázat (auto)antigen. Polymorfismus alel a haplotypů v HLA oblasti vykazuje významné populační odlišnosti (48) a určuje dostatečný repertoár vazebných míst pro endogenní a exogenní peptidy (antigeny).

Molekula HLA I. třídy se skládá z těžkého alfa řetězce nekovalentně spojeného s β 2 mikroglobulinem, jehož gen je lokalizován na 15. chromozómu, 15q21-22. Těžký řetězec alfa je kódován geny HLA-A, B a C. Alfa řetězec má 2 polymorfní domény (α 1 a α 2), které ohraničují žlábek – místo pro navázání antigenu, a nepolymorfní doménu α 3, nacházející se blízko buněčné membrány. Do vazebného místa HLA I. třídy, složeného ze dvou alfa helix šroubovic ohraničujících dno beta skládaného listu, se mohou vázat peptidy o velikosti 8-10 aminokyselin pocházející z endogenních

Tabulka 3. Polymorfismus alel HLA I. a II. třídy update 6/2011

HLA I. třídy	počet alel
A	1601
B	2125
C	1102
E	10
F	22
G	47
HLA II. třídy	počet alel
DRA	7
DRB	1027
DRB	928
DRB	1
DRB	57
DRB	15
DRB	19
DRB	3
DRB	2
DRB	1
DRB	1
DQA1	44
DQB1	153
DPA1	32
DPB1	149
DMA	7
DMB	13
DOA	12
DOB	13

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats/html>

cizorodých proteinů. Tyto proteiny jsou degradovány v cytoplazmě a transportovány do endoplazmatického retikula, kde se spojují s HLA molekulou během její syntézy. Molekula HLA I. třídy s navázaným peptidem je poté exprimována na povrchu buněčné membrány jaderných buněk a rozpoznávána CD8+ T lymfocyty (49).

Molekuly HLA II. třídy se skládají ze dvou řetězců, alfa a beta. Oba řetězce jsou kódovány geny HLA - alfa řetězec geny A (HLA-DRA1, DQA1, DPA1) a řetězec beta geny B, HLA-DRB1, DQB1 a DPB1. HLA-DRB1 patří mezi nejpolymorfnější geny HLA oblasti (viz Tabulka 3). Polymorfní domény $\alpha 1$ a $\beta 1$ ohraničující vazebné místo, nepolymorfní domény $\alpha 2$ a $\beta 2$ jsou blízko buněčné membrány. Vazebné místo u HLA II. třídy, složené rovněž ze dvou alfa helix šroubovic ohraničující dno beta skládaného listu, je více otevřeno a mohou se do něj vázat peptidy o velikosti 15-35 aminokyselin. Repertoár, který je HLA molekula II. třídy schopna vázat, činí 650-2000 různých peptidů, které mohou být původu endogenního i exogenního. Splynutí HLA molekuly II. třídy s peptidem probíhá na rozdíl od molekuly I. třídy až po definitivní syntéze HLA – její připravený prekurzor, jehož vazebné místo je chráněno invariantním řetězcem, je uvolněn po dokončení své syntézy do sekrečních váček. Ty fúzí s endozómy obsahující peptidy z fagocytovaných antigenů a až v této chvíli dochází k uvolnění invariantního řetězce a navázání peptidu. Kompletní molekula HLA II. třídy je poté vystavena na povrchu antigen prezentujících buněk a rozpoznávána CD4+ T lymfocyty (50).

Některé alely HLA I. a II. třídy, eventuelně haplotypy HLA, mohou být spojeny s autoimunitními onemocněními (51-58). Pro porovnání je uveden výskyt jednotlivých genetických variant u různých autoimunit, viz Tabulka 4. Velikost rizika vzniku choroby je u různých autoimunit různá. Vzhledem k tomu, že autoimunitní onemocnění mají multifaktoriální etiopatogenezi a na jejich rozvoji se podílí jak genetické, tak zevní faktory, neznamená ještě samotná přítomnost rizikové alely (anebo haplotypu) rozvoj autoimunitní choroby, avšak zvyšuje její pravděpodobnost. Céliakie je například asociována s haplotypem HLA II. třídy: HLA –DQA1*0501 - DQB1-0201, který se vyskytuje u 90% nemocných a jen u 30% zdravých jedinců (52). Uvedený haplotyp kóduje HLA-DQ2 molekulu, která preferenčně váže gliadin. Céliakie se však objeví pouze u 4% s uvedeným haplotypem lidí. Obdobně u ankylozující spondylitidy se onemocnění objeví pouze u 5% nosičů HLA-B27 alely. Díky odlišné schopnosti polymorfních HLA molekul vázat antigeny, mohou být některé HLA alely (eventuelně haplotypy) rizikové pro jedno onemocnění, ale ochranné pro druhé – například HLA-DQB1*0602 je rizikovou pro vznik roztroušené sklerózy

a systémového lupusu erythematosu, ale protektivní pro vznik autoimunního diabetu (51, 54, 56, 58).

Tabulka 4. Rizikové alely, haplotypy a genotypy HLA I. a II. třídy u automunitních chorob v kavkazské populaci

Choroba	HLA	Průměrný výskyt znaku (%)		
		Nemocní	Zdraví	Literatura
Célie	(DRB1*03)-DQA1*0501-DQB1*0201	90-95	20	52
Gravesova choroba	DRB1*0304-DQB1*02-DQA1*0501	47	24	55
Autoimunitní diabetes	DRB1*0401-DQB1*0302	50	8.2	56
Psoriasis vulgaris	Cw*0602	60	15	57
Roztroušená skleróza	DRB1*1501; DQA1*0102; DQB1*0602	32	11	58
Systémový lupus erythematosus	DRB1*0301 -DQB1*0201	40	21	63
	DRB1*1501 -DQB1*0602	21.6	10.7	64
Revmatoidní artritida	DRB1*0401	19.8	12.6	66
	DRB1*0401/0401	2.9	0.8	66
	DRB1*0401/0404	3.5	1.0	66
	DRB1*0404	9.0	8.3	66
	DRB1*0404/0404	0.9	0.4	67
	DRB1*0101	10.4	5.9	67
Ankylozující spondylitida	B*2702; B*2705; B*2704; B*2707	90-95	<10	51,69
Psoriatická artritida	Cw*0602	58	18	70
Systémová sklerodermie	DRB1*0404	4.3	1.9	71
	DRB1*1104	7.1	3.0	71
	DPB1*1301	3.7	1.4	71
	DPB1*0301	23.0	16.8	71
	DQA1*0501	31.6	24.0	71
Polymyositida	DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02	33.6	16.5	72
Dermatomyositida	DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02	24.5	16.5	72

Mechanismů, jakými HLA polymorfismus ovlivňuje imunitní funkce, je několik: genetický polymorfismus, lokalizovaný v oblasti exonů kódujících část peptidu vazebného místa, vede k jisté primární struktuře peptidu. V některých případech pak dochází k odlišné terciární struktuře vazebného místa a rozdílné afinitě k (auto)antigenům a jejich nedostatečné vazbě k HLA molekule a následně odlišné afinitě k TCR receptoru. Další možností je odlišné intracelulární zpracování antigenů u vybraných HLA molekul, což vede k prodloužení infekce a možnému vyvolání systémové odpovědi. Příkladem je asociace HLA-B27 a reaktivní artritidy - recentně bylo prokázáno prodloužené přežívání a replikace Salmonella

enteritidis u HLA- B27 pozitivní buněčné linie lidských monocytů (53). Některé z exogenních antigenů, například Epstein-Barrové virus (EBV) nebo cytomegalovirus (CMV), Streptococcus pyogenes a další, mohou způsobit „molekulární mimikry“ – to je podobnost mikrobiálních antigenů s určitými HLA molekulami. Typicky je tímto mechanismem zvažován účinek HLA-B27 u ankylozující spondylitidy anebo HLA-Cw6 a keratinu v patogeneze psoriázy. V imunitních mechanismech ovlivňuje HLA systém vznik centrální a periferní tolerance, neboť HLA molekuly jsou exprimovány v místech vývoje a zrání imunitních buněk. V oblasti thymu může dojít díky změněné afinitě některých HLA molekul k TCR receptoru k úniku autoreaktivních T lymfocytů anebo k nedostatečné selekci regulačních T lymfocytů. V periférii mohou pak HLA molekuly vázat autoantigeny a spustit autoimunitní odpověď (48, 51).

Asociace HLA antigenů, detekovaných sérologickými technikami, s revmatickými chorobami byla zjištěna v letech 1971 (asociace HLA-B8 a systémového lupusu erythematodu), 1973 (asociace HLA-B27 a ankylozující spondylitidy) a 1976 (asociace HLA-DR4 a revmatoidní artritidy). Molekulárně genetické metody k detekci rizikových alel HLA systému byly použity v 90. letech minulého století a HLA oblast je stále popisovanou rizikovou oblastí v GWAS provedených u revmatických onemocněních ve 21. století (6, 19-23).

U SLE byla původní asociace s HLA-B8 (59) postupně vysvětlena vazebnou nerovnováhou mezi touto alelou a HLA-DRB1*0301. Vzniká tak, zejména pro kavkazskou populaci, rizikový haplotyp: HLA-B8-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (60-63), který je ve vazbě i s geny HLA III. třídy – delecí C4A/CYP21A (64). Haplotyp HLA-DRB1*03-DQB1*0201 je nazýván „autoimunitním haplotypem“, neboť se často vyskytuje i u dalších autoimunitních onemocněních (viz Tabulka 4). Dalším rizikovým haplotypem SLE v kavkazské, ale i japonské populaci je DRB1*1501-DRB5*0101-DQA1*0102-DQB1*0602 (64, 65), i když nebyl prokázán v některých studiích v kavkazské populaci (61, 62). U SLE tak panují v rizikových a i ochranných HLA alelách/haplotypech výrazné geografické odlišnosti, a to nejen ve velkých populacích (hispanšská, kavkazská, afroamerická), ale i v jednotlivých populacích kavkazského původu (středoevropská, severoevropská, jihoevropská). Genotyp HLA není spojen s klinickými projevy nemoci, ale potvrzeny jsou asociace s autoprotilátkovou aktivitou – haplotyp HLA-DRB1*03-DQB1*0201 s anti-La, dsDNA protilátkami a haplotyp HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 s protilátkami anti-Ro a anti-Sm (63).

U RA je genetika HLA alel/haplotypů spojena s protilátkovou aktivitou a potažmo i průběhem choroby. Sérologická asociace s antigenem HLA-DR4 byla rozklíčována do následujících alel HLA-DRB1*04: 0401, 0404, 0405 a 0408, dále byla jako riziková identifikována HLA-DRB1*0101 a 1001 (66, 67), přičemž homozygoti pro jednotlivé alely nebo heterozygoti pro rizikové alely mají vyšší riziko choroby (viz Tabulka 4). Společným rysem těchto alel je tzv. sdílený epitop, tj. konzervativní struktura peptidu v 70-74 (QKRAA, QRRAA, RRRAA – kde Q je glutamin, K lysin, R arginin, A alanin) v místě třetího hypervariabilního úseku DRB1. Tato variabilita se nachází v oblasti alfa helixu vazebného místa molekuly HLA a na myších modelech byla zjištěna vyšší schopnost aktivovat CD4+T lymfocyty. Alely „sdíleného epitopu“ jsou spojeny se seropozitivní revmatoidní artritidou a recentně byla prokázána asociace RAA epitopu se vznikem protilátek proti citrulinovaným peptidům (ACPA) (68). ACPA vznikají citrulinací argininových zbytků, patří ke specifickým protilátkám u revmatoidní artritidy a jsou spojeny s jejím závažnějším průběhem.

S rozvojem AS je spojen antigen HLA-B27 a z celkem 65 alel genu HLA-B27 byly identifikovány jako rizikové alely HLA-B*2702 a *2705 u kavkazské a HLA-B*2704 a *2707 u asijské populace (51, 69), na druhou stranu protektivními jsou alely HLA-B*2706 a *2709. HLA-B27 a HLACw*0702 se vyskytuje častěji i u nemocných s axiální formou PsA (70). PsA je, obdobně jako psoriáza, spojena s HLA-Cw*0602, přičemž ochrannými alelami je zdají být HLA-Cw*0802 a *0701 (70).

I další revmatická systémová onemocnění jsou spojena s polymorfismy v HLA oblasti. Recentně byla publikována multicentrická asociační studie u systémové sklerodermie (SSc), sledující odlišnosti mezi populací kavkazskou, hispánskou a afroamerickou. U všech populací byly identifikovány jako rizikové alely: HLA-DPB1*0301 a HLA-DQA1*0501, u kavkazské a hispánské populace ještě alela HLA-DRB1*11 a její subtyp *1104 a u kavkazské populace ještě: HLA-DRB1*0404 a DPB1*1301, u afroamerické pak pouze HLA-DRB1*0804. I v případě SSc existuje výraznější asociace s profilem typických autoprotilátek: HLA-DRB1*0404 s autoprotilátkami proti centromerám a RNA-polymeráze III, HLA-DRB1*1104 a DPB1*1301 proti topoizomeráze (71). U zánětlivých onemocnění svalstva panují imunogenetické rozdíly mezi dvěma hlavními chorobami - dermatomyositidou (DM) a polymyositidou (PM), a to i napříč populacemi. DM je spojena v kavkazské i afroamerické populaci s rizikovým haplotypem HLA-DRB1*03-DQB1*02 (72, 73), PM je s tímto haplotypem spojena jenom v kavkazské populaci (72). Další odlišností jsou, pro PM ochranné alely HLA-DRB1*0701 a DQA1*0201, které jsou však

asociovány s vyšším výskytem autoprotilátek proti jaderným proteinům, anti-Mi2, typických pro DM (72).

1.1.2.2 Další geny HLA I.třídy: MHC-class I related genes (MIC)

Další rizikovou oblastí pro rozvoj autoimunity jsou neklasické geny HLA I. třídy – MIC (MHC-class I related gene). Oblast je uložena 46.4 kb směrem k centromere od HLA-B lokusu a obsahuje celkem 7 genů: MIC-A, B, C, D, E, F a G (74). Geny MIC-A a B jsou přepisovány do peptidu, MIC-C-G jsou pseudogeny. Oblast MIC-A i B je, obdobně jako HLA I. a II. třídy, vysoce polymorfní a prozatím bylo identifikováno 73 alel MIC-A a 31 alel MIC-B. Produkty MIC-A a B jsou polypeptidy exprimované pod vlivem buněčného stresu, infekce a na povrchu některých nádorových buněk. Na rozdíl od HLA I. třídy nejsou MIC-A a B molekuly spojeny s $\beta 2$ mikroglobulinem a neprezentují antigeny. Obě molekuly jsou však rozpoznávány NKG2D receptorem přirozených zabíječů (NK buněk) a $\gamma\delta$ T lymfocytů a CD8+ T lymfocytů (75, 76) a podílí se tak na likvidaci poškozených buněk.

Produkt genu MIC-A je 43kD polypeptid obsahující 383 aminokyselin. Skládá se ze tří částí – extracelulární domény ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), transmembránové a cytoplasmatické části. Gen MIC-A se skládá ze 6 exonů a jeho promotorová oblast obsahuje vazebná místa pro následující transkripční faktory: nukleární faktor kappa B (NF κ B), aktivační protein-1 (AP-1), aktivační transkripční faktor-2 (ATF-2), c-Fos, c-Jun a další. Exprese MIC-A je vyvolána proteiny tepelného šoku (heat shock proteins), infekčními agens (CMV, adenovir 5, Mycobacterium tuberculosis, enteropatická Escherichia coli) a expozicí v podmínkách poškozujících DNA (ionizující záření, inhibitory DNA replikace, chemikáliemi ovlivňující strukturu chromatinu). MIC-A je exprimován pouze v některých buňkách (viz Tabulka 5) a prozatím nebyl detekován ve strukturách centrálního nervového systému.

Polymorfismus MIC-A genu se týká hlavně exonů 2-4 kódujících extracelulární domény $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, (77) a exonu 5 kódujícího transmembránovou část (78). V oblasti extracelulárních domén polymorfismy (jednonukleotidové, inserce/delece) udávají variabilitu vazebného místa pro NKG2D receptor - rozlišují se alely s vysokou (alely *001,

Tabulka 5. Místa exprese MIC-A

epiteliální buňky střeva a žaludku
monocyty
keratinocyty
fibroblasty
dřeňové buňky thymu
epiteliální buňky solidních tumorů:
plic, prsu, ledvin, vaječníku, prostaty
a střeva

*002, *007 a *017) a nízkou afinitou k receptoru (alely *004, *006, *008, *009, *010), které se navzájem liší v záměně aminokyseliny methioninu/valinu v pozici 129 (79). Polymorfismus v transmembránové části MIC-A je odlišný – jedná se o mikrosatelitový polymorfismus s opakováním tripletu [GCT]_n (78). Doposud bylo identifikováno podle počtu opakování [GCT]₄₋₁₀ celkem 8 alel: MIC-A4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 a MIC-A5.1 (78, 80, 81). Alela MIC-A5.1 je dána 5 opakováními [GCT]₅ a insercí G mezi druhou a třetí repeticí, čímž je vytvořen předčasný stop kodon v pozici 304 pátého exonu. Tato alela má zkrácenou transmembránovou část a zcela jí chybí cytoplasmatická část (82). Některé MIC-A alely jsou shodné v extracelulární části, ale liší se v transmembránových alelách, na druhou stranu mezi některými extracelulárními a transmembránovými alelami existuje vazebná nerovnováha a jsou identifikovány haplotypy: MIC-A*008-A5.1; MIC-A*002-A9 a MIC-A*009-A6 (83). Polymorfismus MIC-A alel je spojován s vnímavostí k autoimunitním chorobám, rozvojem selhání přihojení transplantátů a některých nádorových chorob.

1.1.2.3 Ostatní rizikové genetické oblasti

I další rizikové oblasti pro rozvoj autoimunity obsahují geny spojené s fungováním imunitního systému (viz Tabulka 2). U autoimunit a zvláště revmatických chorob existují rozdíly v expresi cytokinů a chemokinů (IL-2, 6, 17 a dalších) (7, 24, 25, 32-35). Abnormální je i mezibuněčná komunikace – polymorfní receptory pro cytokiny (IL-2R, IL-23R a další) (6, 8, 9, 20, 26, 27, 29) mohou mít odlišné schopnosti k vazbě svého produktu a imunitní synapse může být abnormální i v případě povrchových a kostimulačních molekul (CTLA-4 a dalších) (20, 27, 30, 31). Během posledních let se stále do popředí zájmu dostávají geny, které kódují molekuly intracelulárních signálních drah, například Jak-Stat (Janus kinázy a signální transduktory a aktivátory transkripce), NFκB, molekul mechanismů apoptózy, a další (6, 20, 34, 36-46).

Na rozvoji fenotypu autoimunity se podílí interakce mezi jednotlivými geny, interakce mezi genetickými a epigenetickými mechanismy, recentně se zvažuje role genového imprintingu - maternálního v případě juvenilní idiopatické artritidy (JIA) (84) a Crohnovy choroby (85) a paternálního u PsA (36). V neposlední řadě i interakce mezi genetickou vnímavostí a environmentálními faktory.

1.1.3 Environmentální faktory a autoimunita

Kandidátních faktorů ze zevního prostředí, které se podílí na vzniku autoimunit, je řada. Patří k nim infekce, chemikálie včetně léčiv a polutantů, fyzikální faktory – typicky UV záření v patogenezi SLE, ale i dietní a sociální zvyklosti, včetně kouření cigaret. Tyto vlivy provází jedince v průběhu života a důležitost setkání s nimi je dána poznáním, že konkordance chorob u dizygotních dvojčat je vyšší než u sourozenců (6-14). Mechanismy, jakým zasahují zevní faktory do patogeneze imunitní odpovědi, jsou stále studovány.

Infekční agens mají několik možností, jak spustit autoimunitní proces. Jedním z nich je „antigen spreading“ tj. odhalení dříve skrytého autoantigenů (např. z imunologicky privilegovaných míst během zánětu, příkladem je jedna z teorií vzniku roztroušené sklerózy) anebo ektopickou expresí HLA molekul II. třídy, adhezivních a stresových molekul (např. MIC-A) a zvýšení tak možnosti interakce antigen prezentujících buněk (APC) s T lymfocyty. „Molekulární mimikry“ umožní přetrvávání imunitní reakce na infekční agens kvůli podobnosti tělu vlastních autoantigenů s antigenními epitopy bakterií (Streptokoky skupiny A, *Yersenia enterocolitica*, *Salmonella* sp., *Chlamydia trachomatis*, a další) anebo virů, zvláště EBV, CMV, parvoviru B19 a některých retrovirů (2, 86). Příklady jsou zkřížená reakce mezi antigenem M Streptokoka skupiny A a proteinem M sarkolemy myocytů v patogenezi revmatické horečky, recentně je popsána imunitní reakce namířená na tento antigen a tělu vlastní keratin v patogenezi psoriázy u HLA - Cw*0602 pozitivních osob (87) a zkřížená reakce mezi nukleárními antigeny EBNA1 a EBNA2 EBV viru a jadernými antigeny Ro60, Sm v patogenezi SLE. Virové infekce se ovšem nepodílí jen na prolomení autotolerance, ale i na přetrvávání imunitní reakce. U virových infekcí, například EBV, dochází k intermitentní reaktivaci infekce, což vede k opakované antigenní stimulaci imunitního systému. EBV, ale i CMV, navíc produkují antiapoptotické a některým cytokinům podobné proteiny, jako např. IL-10 a bcl-2, čímž se podílí na přetrvávání patologické imunitní reakce včetně immortalizace autoreaktivních buněk (88).

K chemickým látkám, jejichž vyšší expozice je spojena s autoimunitou, patří křemík, rtuť, aromatické uhlovodíky, jod a další. Mechanismy, jakými chemikálie působí, jsou různé, například nadbytek jódu v potravě vede k vysoce jodizovanému tyreoglobulinu, který je imunoreaktivní, snáze se proti němu tvoří autoprotilátky a může dojít k vývoji autoimunitní thyreoiditidy (89). Křemík zase indukuje apoptózu a zvyšuje tak nálož autoantigenů (90).

Samostatnou kapitolou působení chemických faktorů na rozvoj autoimunity je léky indukovaný lupus erythematodes. Byla identifikována řada léčiv (například hydralazin,

procainamid, penicillamin, sulfasalazin a další), které mohou onemocnění vyvolat. V klinickém průběhu lze u tohoto onemocnění vysledovat úplné zlepšení stavu po vysazení rizikového léčiva. Jedním z mechanismů jejich účinku je ovlivnění epigenetických modifikací, metylace kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Metylace je postsyntetická úprava DNA, kdy nukleotid cytosin je změněn na metylcytosin. Tato změna inhibuje vazbu transkripčních faktorů (TF) k promotorům cílových genů a je tak změněna jejich exprese. Metylace DNA je prováděna enzymem metyltransferázou, jejíž aktivita může být ovlivněna dvěma způsoby, přímo jejím inhibítoem anebo snížením její exprese. Hypometylace CD4+T lymfocytů mění expresi genů pro CD11a, perforin, CD70 a interferon gamma (IFN- γ) a dramaticky ovlivňuje jejich schopnost reagovat na vlastní antigeny (91). CD4+ T lymfocyty se stávají autoreaktivními - ztratí potřebu reagovat na komplex HLA II. třídy s navázaným antigenem a k reakci jim stačí pouze molekula HLA II. třídy. Navíc, jsou schopny stimulovat B lymfocyty k produkci protilátek (92). Procainamid je kompetitivní inhibitor T-buněčné DNA metyl transferázy a hydralazin inhibuje její expresi cestou signální dráhy ERK (extracellular signal-regulated kinase).

Četné retrospektivně provedené studie u nemocných s RA, SLE, ale i RS, Gravesovou chorobou a dalšími poukazují na fakt, že se v jejich předchorobí vyskytla událost, která výrazně ovlivnila jejich psychickou anebo fyzickou pohodu (93). I když není prozatím jednoznačně prokázán kauzální vztah mezi psychickým anebo fyzickým stresem a rozvojem autoimunity, vzájemné vztahy mezi nervovým, humorálním a imunitním systémem známy jsou. Imunitní buňky (zejména monocyty, NK, CD4+ T i B lymfocyty, ale i další) exprimují na svém povrchu receptory pro hypofyzární hormony (pro prolaktin, adrenokortikotropní a růstový hormon, a další) a intracelulární receptory pro hormony štítné žlázy a glukokortikoidy a pod jejich vlivem se diferencují a produkují cytokiny. Na druhou stranu některé cytokiny, např. IL-1, 2, 6, TNF- α a další, uvolňované při zánětu, stimulují syntézu a sekreci některých hypothalamických liberinů a i hypofyzárních hormonů. Nerovnováha v těchto neurohumorálně – imunitních vztazích může patřit k faktorům podporujících patologickou imunitní reakci, její přetrvávání a ideální prostředí pro rozvoj autoimunit.

1.1.4 Hormonální změny a autoimunita

Z klinického pozorování i literárních údajů vyplývá, že některá autoimunitní onemocnění se objevují převážně u žen. Poměr žen a mužů se liší u jednotlivých onemocnění – největší poměr, až 9:1 (ženy versus muži) lze vysledovat u Sjögrenova syndromu

(autoimunitní postižení žláz s vnitřní sekrecí – zejména slzných a slinných), následuje SLE a autoimunitní thyreoiditida (94). Z druhé strany existují nemoci jako T1D nebo ulcerózní kolitida, kde je poměr muži/ženy vyrovnaný anebo AS s převahou mužů. Pohlavní dimorfismus ve vnímavosti k rozvoji autoimunit je vysvětlována vlivem pohlavních hormonů, zejména estrogenů a prolaktinu (95).

1.1.4.1 Estrogeny a autoimunita

Estrogeny ovlivňují imunitní funkce. Efekt estrogenů je dán aktivací estrogenových, převážně intracelulárních nukleárních receptorů (ER α a β) exprimovaných v periferních mononukleárních buňkách (PBMC), konkrétně CD4+T, CD8+T lymfocytech, B lymfocytech a monocytech. ER α a β se váží přímo k regulačním oblastem genů v oblastech DNA nazvaných ERE (Estrogen-responsive elements) anebo působí jako kofaktory/korepresory ostatních transkripčních faktorů (například AP-1, NF κ B a dalších), což má důležité konsekvence k regulaci zánětlivého procesu. Existují však i membránové formy ER α a β spojené s intracelulární signalizací (mitogenem aktivovaných kináz, MAPK, fosfatidylinositol 3 kinázy, PI3K) vedoucí k aktivaci kináz ERK 1/2, p38 a JNK s funkcí regulace exprese genů (96), ale i nengenomickými funkcemi – uvolnění oxidu dusnatého z PBMC (97). Estrogeny zasahují do vývoje a funkce B lymfocytů tím, že nevedou k eliminaci autoreaktivních B buněčných klonů a v periférii aktivují B autoreaktivní lymfocyty, což vede ke zvýšené tvorbě autoprotilátek v řadě IgG (95, 98, 99).

1.1.4.2 Prolaktin a autoimunita

PRL je nejenom cirkulující hormon uvolňovaný z adenohypofýzy, ale i lokálně působící cytokin. Prolaktin ovlivňuje životně důležité procesy v buňce, jako je apoptóza, proliferace a diferenciace a účastní se i sekreční aktivity, motility a dalších schopností fungující buňky. PRL je syntetizován v thymocytech (100), v monocytech během svého vyžívání (101) a T a B lymfocytech izolovaných ze sleziny, lymfatických uzlin a tonzil, tj. míst, kde prodělávají svůj funkční vývoj (102).

Prolaktin působí během imunitní odpovědi v několika krocích. Podporuje vyžívání T a B lymfocytů a monocytů do dendritických buněk, zvyšuje jejich schopnost prezentovat antigen, podporuje syntézu IL-12 a je tak jedním z faktorů v počátcích aktivace imunitního systému (103). Během uměle navozené imunitní reakce, při pokusech in vitro, prolaktin zvyšuje mitogenem stimulovanou proliferaci lidských i myších T, B lymfocytů a NK buněk

(103, 104). V periferních mononukleárních buňkách a makrofázích PRL během stimulace mitogenem, a razantně méně sám, zvyšuje produkci cytokinů IL-12, IL-1 β , IFN- γ a TNF- α in vitro (105, 106, 107) i in vivo (108). Prolaktin stimuluje CD4+T i CD8+T lymfocyty k syntéze IFN- γ , TNF- α a IL-2 (104, 109). Takizawa a kol. zjistili, že PRL in vitro stimuluje expresi alfa řetězce receptoru pro IL-2 (CD25) na povrchu PBMC (110) a tak se vytváří ideální prostředí pro proliferaci T lymfocytů. Stimulační aktivita PRL je částečně závislá na jeho syntéze v imunitních buňkách a jeho autokrinními a parakrinními účinky, neboť při podání anti-PRL protilátek je potlačena sekrece IL-2 a IFN- γ i exprese kostimulačních molekul CD69 a CD40L až o 50% (104). Recentní in vivo studie ukazují, že hladina PRL koreluje s počtem B lymfocytů a panhypopituitární jedinci s nižší hladinou prolaktinu nejsou schopni adekvátně reagovat na vakcinaci (111). PRL stimuluje proliferaci B-lymfocytů a zvyšuje syntézu imunoglobulinů (112). Prolaktin se patrně podílí na kooperaci mezi B a T lymfocyty během sekundární syntézy protilátek. Chavez-Rueda a kol. zjistili in vitro, že pod vlivem PRL jsou zvýšeně exprimovány kostimulační molekuly CD40 a CD40L, i když CD40 pouze nesignifikantně (104).

PRL je peptidový hormon a jako takový potřebuje k zahájení svého účinku membránový receptor, receptor pro prolaktin (PRL-R), viz Obrázek 1. PRL-R patří, spolu s receptorem pro erythropoetin, leptin, G-CSF, GM-CSF, IL-2, 7 a dalšími, do rodiny cytokinových receptorů subrodiny I (113). PRL-R byl identifikován téměř na všech buňkách organismu. Lidské imunitní buňky - NK, T i B lymfocyty, monocyty, dendritické buňky, exprimují PRL-R v různém množství, což udává i jejich citlivost k působení PRL. Navíc i lokální množství PRL v mikroprostředí primárních i sekundárních lymfatických orgánů a míst, kde probíhá diferenciací imunitních buněk na začátku a v průběhu imunitní reakce, může ovlivnit trvání a průběh imunitní odpovědi. PRL-R s navázaným PRL spouští řadu nitrobuněčných pochodů, které mají za cíl aktivovat příslušné geny, eventuálně ovlivnit nitrobuněčné pochody (zvýšení intracelulárního vápníku, atd). PRL-R je spojen s proteinkinázami tyrosinového typu: Jak, Src, ZAP 70 proteinkinázami. Mezi Jak kinázy spojené s PRL-R patří Jak-2, mezi Src pak hlavně Fyn. Do účinku prolaktinu v buňce je zapojeno několik intracelulárních signálních drah: Jak-STAT, Ras/Raf/MAPK, PI-3K/Akt, PLC/DAG/PKC, Fyn/Vav, IRS-I/PI-3K (98-101,103-106,108,112-114)), viz Obrázek 2.

Obrázek 1. Typy receptoru pro prolaktin (PRL-R)

Lidský PRL-R se vyskytuje ve 4 variantách, které vznikají alternativním splicingem. PRL-R se skládá ze 3 domén: a – extracelulární; b – transmembránová; c – cytoplasmatická

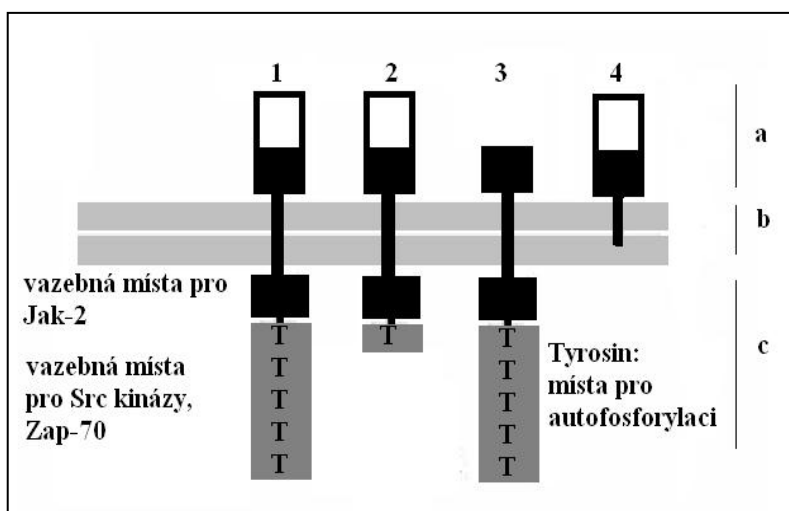
1. Dlouhá varianta: Je nejčastější a schopná aktivovat všechny intracelulární cesty, vyskytuje se ve všech lymfatických orgánech (kostní dřeni, lymfatických uzlinách, thymu i slezině) i na leukocytech v cirkulaci

2. Střední varianta:

Zachována schopnost aktivace intracelulárních cest spojených s Jak-2, omezená schopnost aktivovat Src kinázy. Převážně je exprimována ve slezině, kostní dřeni, omezeně v lymfatických uzlinách (LU) a minimálně v thymu a periferních lymfocytech.

3. ΔS varianta: Omezená vazba prolaktinu, avšak rychlejší schopnost aktivovat intracelulární cesty. Pouze 1/3 všech PRL-R je tato varianta, vyskytuje se omezeně v LU, slezině, thymu i leukocytech v cirkulaci, minimálně v kostní dřeni.

4. PRL-BP: PRL-vázající peptid je schopen PRL vázat, nikoli spustit intracelulární cesty. Vyskytuje se sporadicky.



Exprese prolaktinu v imunitních buňkách je důležitá pro jeho cytokinové funkce. PRL je protein o velikosti 23 kDa složený ze 199 aminokyselin, obsahuje 6 cysteinových zbytků, které dávají vznik 3 disulfidovým můstkům. Vytváří 2 vazebná místa pro svůj receptor (114). Gen pro prolaktin leží v oblasti 6p22.2-21.3 a je uspořádán do 5 exonů oddělených 4 rozsáhlými introny (115). Exon 1 je rozdělen a je místem začátku transkripce: exon 1 v adenohipofýze a předsunutý exon 1A v mimohypofyzárních lokalitách. Před oběma exony 1 se rozkládají 2 na sobě nezávislé regulační oblasti - úsek 5 000 bp (párů bazí) před exonem 1 určuje transkripci v adenohipofýze, kdežto 3000 bp rozsáhlá oblast před exonem 1A řídí transkripci v mimohypofyzárních lokalitách (116). Při transkripci PRL genu tak vznikají 2 typy mRNA: hypofyzární a o 150 bp delší mimohypofyzární. Mimohypofyzární mRNA obsahuje exon 1A, který však není přepisován do peptidu a během translace je tvořen jediný

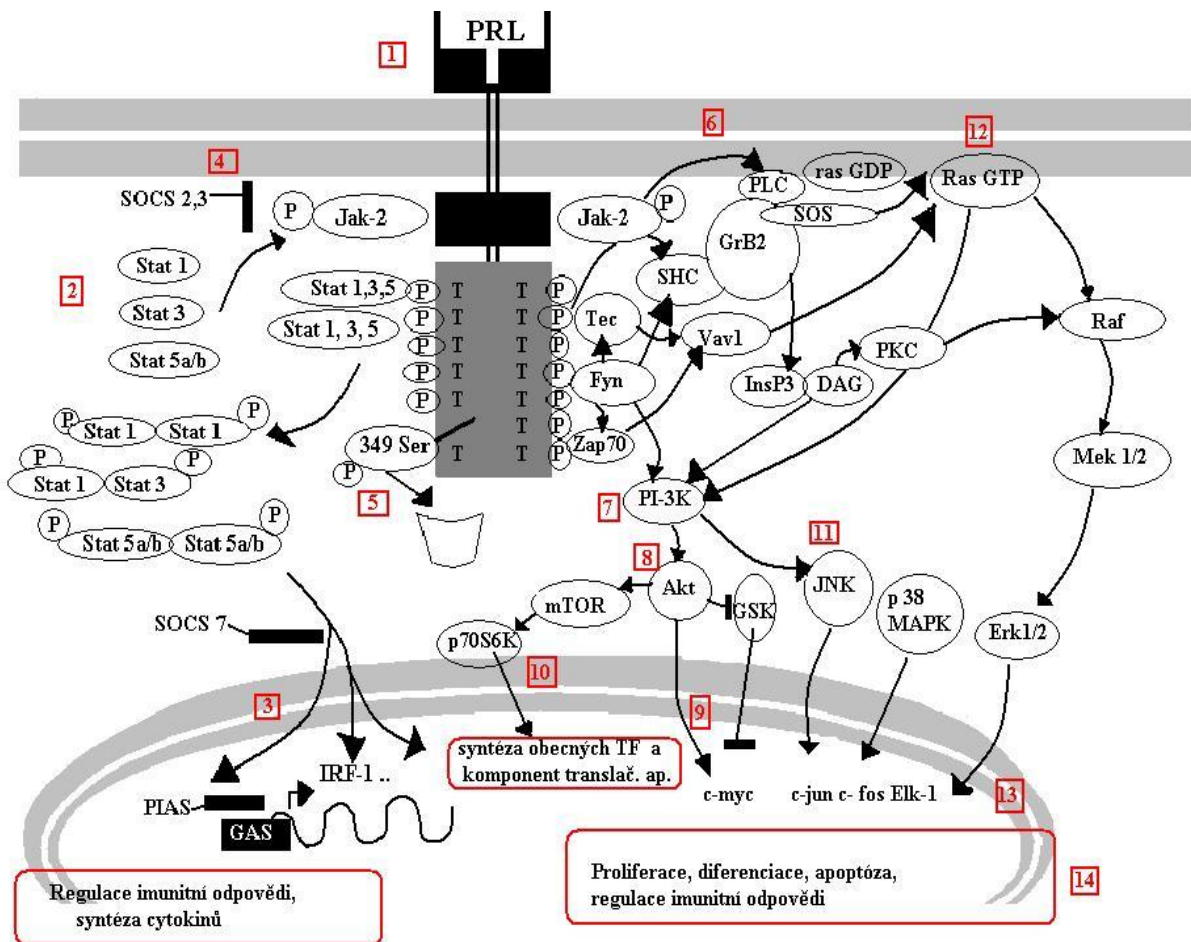
prohormon PRL o velikosti 227 aminokyselin (26 kDa), který je identický ve všech buňkách, které PRL produkují.

Změny hladiny prolaktinu a její souvislost s průběhem orgánově specifických i systémových autoimunitních onemocnění byla prokázána na experimentálních modelech i v humánní medicíně. V Tabulce 6 jsou popsány příklady chorob ve vztahu k vyšší hladině prolaktinu. Zvýšená hladina prolaktinu byla poprvé zjištěna u mužů se SLE na konci 80. let minulého století (117). Od té doby proběhly četné studie týkající se tohoto hormonu a cytokinu. Mírná hyperprolaktinémie (HPRL) se vyskytuje u 15-30% nemocných SLE (118) a zvýšená hladina prolaktinu je spojena s aktivitou onemocnění (119, 120). Vera-Lastra a kol. pozorovali signifikantní pokles hladin prolaktinu a hodnot SLEDAI během šesti měsíců léčby glukokortikoidy a hydroxychlorochinem u 27 žen s glomerulonefritidou a 16 žen s kožně-kloubním flarem (121). V literatuře však najdeme práce, které souvislost mezi HPRL a aktivitou SLE nepotvrdily. Příčinou diskrepance jsou protilátky proti prolaktinu (anti-PRL IgG), díky nimž se cirkulující 23 kDa prolaktin mění v komplex 23kDa-IgG PRL, in vivo neúčinný makroprolaktin. Leanos-Miranda a kol. detekovali anti-PRL IgG u 5% nemocných SLE, avšak u SLE s hyperprolaktinémií jsou zachyceny až u 40% (122). SLE nemocní s HPRL a vyšší koncentrací makroprolaktinu mají nižší aktivitu onemocnění a aktivita SLE je spojena s volným, bioaktivním prolaktinem (119, 120).

V případě RA byl pomocný vliv prolaktinu na rozvoj onemocnění prokázán na experimentálních modelech (123, 124). V humánní medicíně jsou výsledky dosud publikovaných prací rozporné - některé práce popisují vyšší, stejnou anebo i nižší sérovou hladinu PRL. Mateo a kol. zjistila vyšší hladinu PRL u mužů, která koreluje s trváním nemoci a stupněm rentgenového nálezu (125). Zvýšená hladina prolaktinu v séru nemocných se SSc koreluje s mnohočetným postižením a aktivitou onemocnění (126, 127). Czuwara-Ladykowska a kol. sledovala v recentní práci vliv PRL na T-lymfocyty, prokázala, že lymfocyty SSc pacientů produkují mRNA prolaktinu a pod vlivem PRL zvýšeně exprimují CD25 (128). Prozatím není jasné, zda má PRL nějakou úlohu v patogenezi Pm a DM. Jenom jedna studie prokázala hyperprolaktinémii u 24% nemocných s PM a kupodivu, zvýšená hladina PRL nebyla zjištěna u DM (129). Bohužel, v této práci není uvedena laboratorní ani klinická charakteristika pacientů.

Obrázek 2. Intracelulární signalizace prolaktinu v imunitních buňkách

1. PRL-R po navázání PRL dimerizuje, tím dojde k přiblížení cytoplazmatických kinázových domén, které se začnou vzájemně fosforylovat na tyrosinových reziduích a k aktivaci Jak-2.
2. Následuje navázání Stat 1, 3 a 5, jejich fosforylace, což jim umožní se spojit v dimery a stát se tak aktivními .
3. Aktivované Stat cestují do jádra, kde se váží na GAS (γ -interferon binding site) a aktivují expresi genů IRF (Interferon) -1, SOCS 2, 3 a 7 a iNOS (inducibilní syntázu oxidu dusnatého) působí jako kofaktory ostatních transkripčních faktorů a jaderných receptorů.



4. CIS a SOCS inhibují aktivitu Jak-2, SOCS 7 inhibuje vstup dimerů Stat do jádra, PIAS inhibuje vazbu dimerů STAT k DNA.
5. Fosforylace aminokyseliny serinu v pozici 349 vede k označení receptoru a jeho degradaci.

6. Aktivovaný PRL-R spustí fosfolipázu C (PLC- γ), která štěpí membránové lipidy za vzniku inositol-3 fosfátu (InsP3) a diacylglycerolu (DAG). DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC), která fosforyluje Raf a účastní se tak aktivace MAP kináz.
 7. PI-3K (fosfatidylinositol 3 kináza) může být aktivována DAG (cestou PLC- γ), Src tyrosinkinázou Fyn, nebo aktivovaným Ras.
 8. PI-3K fosforyluje proteinkinázu B – Akt.
 9. Akt se podílí na zvýšení exprese c-myc a inhibuje GSK (glukagon synthese kinase 3), která zvyšuje degradaci c-myc. Jádro navíc pod vlivem Akt opouští transkripční faktor FKHRL-1 (je fosforylován a deaktivován). FKHRL-1 je faktor stimulující expresi pro apoptotického genu Bim.
 10. Akt v cytoplazmě fosforyluje mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR fosforyluje p70S6K, čímž jej aktivuje a spustí tak syntézu komponent translačního komplexu. mTOR se podílí na aktivaci p70S6K i nepřímo tím, že sníží aktivitu PPA2 (protein phosphatase 2), která inhibuje p70S6K a aktivuje 4EBP1 (4E binding protein), který inhibuje translaci.
 11. PI-3K aktivovaná Fyn fosforyluje jednu z mitogen aktivovaných kináz - JNK (Jun-N-terminal kinase) v Nb2 T buněčné linii a makrofázích.
 12. Komplex SHC-Grb2-SOS je aktivovaný jak src- kinázami (Fyn), tak Jak-2 a fosforyluje Ras GDP na Ras GTP, který je začátkem cesty k aktivaci MAPK Erk1/2. MAPK Erk1/2 fosforyluje transkripční faktory c-fos a c-jun, které regulují expresi několika genů vč. antiapoptotických. Ras může být aktivován i cestou Tec/Vav1.
 13. Na aktivaci faktorů c-myc, c-fos a c-jun se pod vlivem PRL podílí i další z MAPK – p38 a JNK. Pod vlivem PRL byl detekován aktivní p38 v myších makrofázích, lidských PBMC a granulocytech, PRL navíc stimuluje jeho syntézu v Nb2 T buňkách. Aktivní JNK byla detekována v makrofázích a T buněčné linii Nb2. V makrofázích je JNK aktivována cestou PI-3K. Avšak přesné mechanismy, jak PRL aktivuje tyto dva faktory nejsou t.č. známy.
 14. Několik drah (PI-3K, PLC γ , MAPK, STAT 1,3,5) se spojuje k aktivaci antiapoptotických genů. Mechanismy jsou individuální pro tu kterou buňku, avšak tato schopnost PRL je dokumentována napříč spektrem imunitních buněk in vitro i in vivo. Tak například Bcl-2 je aktivován jak v liniích T a B buněk, tak v linii lidské promyelocytární leukémie.
-

1.2 Systémový lupus erythematoses

SLE je závažné autoimunitní onemocnění. Charakterizovat jej lze jako onemocnění s komplexní poruchou imunoregulace, s hyperaktivitou B a T lymfocytů vedoucí k tvorbě spektra orgánově nespecifických autoprotilátek, které následně vyvolají poškození tkání jednotlivých orgánů.

SLE se vyskytuje celosvětově, průměrná incidence SLE je 2.4 případů na 100 000 obyvatel ročně. Ovšem je zde zřetelný rozdíl mezi jednotlivými populacemi a pohlavím. SLE je častější u žen – během reprodukčního věku (v rozmezí 20-40 let) až 9:1, v dětství a po menopauze je tento poměr 3-5:1. Z americké studie z 90. let 20.století byla prokázána incidence u žen kavkazské populace 3.5 na rozdíl od 9.5 na 100 tisíc obyvatel u afroamerických žen (135). Incidence v Číně je mírně vyšší než u kavkazské populace (5.4 na 100 tis. obyvatel) (136). Celkově je na světě cca 3 miliony žen nemocných s lupusem oproti jen 300 tisíci mužům. SLE je závažné onemocnění, avšak mortalita díky novým léčebným možnostem stále klesá, zatímco v 80. letech minulého století byla průměrně 4.7 na 1 milion obyvatel, v současnosti se jedná průměrně o 2.2 na 1 milion obyvatel (137).

1.2.1 Patogeneze systémového lupusu erythematosu

Etiopatogeneze onemocnění je široká a bohužel doposud ne zcela objasněná. Onemocnění vzniká u geneticky vnímavého jedince (soubor genetických oblastí a genů spojených se SLE, viz Tabulka 2 a Tabulka 7). Na patogenезi se podílí i hormonální faktory (estrogeny, prolaktin) a environmentální noxy včetně infekce (CMV, EBV a další), viz Tabulka 7. Společnými rysy všech rizikových agens je: porucha imunoregulace včetně syntézy cytokinů, porucha v prezentaci antigenů, nadměrná apoptóza, dysregulace intracelulárních drah imunitních buněk včetně abnormalit v transkripčním aparátu, abnormální aktivace komplementu a tvorba imunitních komplexů (6, 20, 35, 91, 92, 95, 98, 99, 112, 138, 139).

T lymfocyty mají centrální úlohu v adaptivních (na antigenu závislých) imunitních reakcích. V případě SLE jejich abnormality v několika krocích imunitní odpovědi mají za výsledek rozvoj onemocnění. Jedná se o ztráty imunologické tolerance, abnormality v T buněčné signalizaci, v T-lymfocytární kostimulaci a deficienci T regulačních buněk (Treg). Ztráta imunologické tolerance vzniká na úrovni centrální a periferní. Při vývoji T lymfocytů v thymu dochází k úniku autoreaktivních T lymfocytů s TCR s nízkou afinitou k

autoantigenům a zatímco u zdravého člověka se stávají anergními a po aktivaci podléhají apoptóze, u SLE perzistují a podílí se na rozvoji onemocnění (140).

Tabulka 7. Klíčové faktory patogeneze Systémového lupusu erythematosu		
Riziko	Faktory	Mechanismus účinku
Genetická vnímavost	HLA	Prezentace (auto)antigenů, cross-reaktivita, antigen spreading
	Složky komplementu	Snížená clearance imunitních komplexů
	Fcγ receptory: FcγRI, RII	Prolongovaná clearance IgG a protilátek
	MBL	Snížená na protilátkách nezávislá aktivace komplementu
	PTPN22	Regulace aktivity T lymfocytů
	PD-1	Regulace aktivity a tolerance T lymfocytů
	TNF-α	Přetrvávání lokálního zánětu a destrukce tkáně
Environmentální faktory	CTLA-4	Dysregulace T lymfocytů
	EBV infekce	Antigenní cross-reaktivita: EBNA1 a anti-Sm a anti-Ro60 Defektní DNA metylace
	CMV infekce	Redistribuce autoantigenů: Exprese Ro antigenu na keratinocytech, syntéza anti-Ro
	Infekce retroviry	Suprese DNA metylace
	Chemikálie a léčiva	Demethylace DNA
Hormonální vlivy	UV záření	Demethylace DNA; UV- indukovaná apoptóza keratinocytů
	Estrogeny	Imunostimulační efekt: proliferace T snížení apoptózy autoreaktivních B lymfocytů
	Prolaktin	Únik autoreaktivních B lymfocytů z negativní selekce

HLA: Human leukocyte antigens; MBL: mannose binding lectin; PTPN22: Protein tyrosine phosphatase – 22; PD-1: Programme death-1; TNF-α: Tumor necrosis factor-α; CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4, EBV: Epstein-Barrové virus; CMV: Cytomegalovirus, UV: ultrafialové záření; DNA: Deoxyribonukleová kyselina
Literatura: 6, 20, 35, 95, 98, 99, 113, 138, 139

CD4+T lymfocyty rozpoznávají řadu vlastních antigenů: DNA a histony (141) a malé ribonukleoproteiny: Sm-B, Sm-D, U1-70kd, U1-A (142, 143, 144). Tyto buňky rozpoznávají antigen spolu s HLA-DR, produkují velké množství IFN-γ, IL-4 a IL-10 (143) a vytváří podporu pro B lymfocyty k produkci autoprotilátek (144). Další abnormalitou SLE - T lymfocytů je odlišná intracelulární signalizace, včetně zvýšené intracelulární fosforylace anebo deficientní aktivace Ras/Raf/mitogenem aktivované kaskády (140). U SLE T lymfocytů byla popsána vyšší rezistence k apoptóze a snížené mechanismy k aktivované buněčné smrti (145). Další možností k rozvoji SLE je vztah mezi antigen-prezentujícími

buňkou a TCR. Imunologická synapse u SLE je narušená, existuje vyšší exprese CD40 - CD40 ligandu (CD40L), což vede k nižšímu prahu stimulace antigen prezentujícími buňkami, včetně možnosti rozpoznávat apoptotický materiál na APC (146).

B lymfocyty jsou chápány jako ústřední patologické imunitní SLE buňky – u pacientů lze detekovat jejich zvýšené množství v různé fázi aktivace, na myších modelech byla prokázána nutnost přítomnosti B lymfocytů k rozvoji SLE. B lymfocyty jsou hyperaktivní a spontánně produkují vysoké hladiny imunoglobulinů (147). Do onemocnění zasahují produkcí patogenních autoprotilátek, na začátku onemocnění dochází k polyklonální expanzi B lymfocytů, později převládá antigenem stimulovaná aktivace B lymfocytů. Patologické autoprotilátky mohou vyvolat poškození tkání - a to přímo (vazbou autoprotilátky na buněčný povrch s následnou lýzou buňky – hemolytická anémie u SLE), tvorbou a ukládáním imunokomplexů do tkání (SLE nefritida), zkříženou reakcí proti intracelulárnímu a povrchovému antigenu (anti-dsDNA protilátky reagují zkříženě s ribozomálními proteiny glomerulárních mesangiálních buněk a mají na ně cytostatický efekt – SLE nefritida), eventuelně mohou autoprotilátky penetrovat dovnitř buňky a mít na ni regulační vliv vazbou na autoantigen (antilymfocytární protilátky vedoucí k apoptóze buňky).

B lymfocyty jsou však samy o sobě patologické – jedním z mechanismů je nedostatečné odstranění autoreaktivních klonů B lymfocytů, příčinou může být nadprodukce B-lymfocyty aktivujícího faktoru – BAFF v periférii podporujícího jejich přežívání a porucha v pro-apoptotických genech bcl-2, fas podílejících se na disrupci centrální tolerance. B lymfocyty jsou citlivější na aktivační cytokiny – například stimulací interleukiny IL-6 a IL-10, jsou snadněji aktivovány a rychleji vyžívají (148). K jejich patologické funkci je třeba i vhodné prostředí a kooperace s ostatními imunitními buňkami – zejména T lymfocyty.

1.2.2 Klinický a laboratorní obraz

SLE je v klinickém obrazu mnohotvárný – vyskytují se jednak celkové příznaky (febrilie, váhový úbytek, únava) a jednak příznaky spojené s postižením jednotlivých orgánů. Důležité orgánové manifestace SLE jsou uvedeny v Tabulce 8. SLE je chronické, celoživotní onemocnění. Období remise, kdy je aktivita SLE nízká, přechází do aktivního onemocnění vlivem výše uvedených faktorů, ale i bez jasně identifikované příčiny. Aktivní onemocnění ohrožuje pacienta na životě, dlouhodobý průběh onemocnění vede chronickému poškození tkání a orgánů s následnými konsekvencemi.

Tabulka 8. Klinické projevy Systémového lupusu erythematosu

Orgánové postižení	Klinické projevy	Patogenetický mechanismus/histopatologický nález
Muskuloskeletální	Artralgie, neerozivní artritida, Jacoudova artropatie Myositida	Perivaskulární buněčná infiltrace, mírná proliferace synovie, svalová atrofie Buněčné infiltráty, ojediněle nekrózy
Kožní	Erytém - ve tváři, celkový, subakutní a chronické při kožním LE	Buněčná infiltrace, depozita imunokomplexů v dermo-epidermální zóně, zvýšená apoptóza keratinocytů pod vlivem UVB
Serózních blan	Pleuritida Perikarditida GIT syndrom	Exsudát: infiltrace lymfocyty, imunokomplexy (IK), fibrinové vločky; perivaskulární fibrinoidní nekroza
Plicní	Akutní: SLE pneumonitida, alveolární krvácení, reverzibilní hypoxémie Chronické: intersticiální fibroza, plicní hypertenze	Infiltrace zánětlivých buněk do alveolů a intersticia. Agregace neutrofilů ve stěnách cév. Pozdní fáze zánětu - jizvení intersticiální tkáně, pokles difuzní kapacity plic (a1)
Kardiální a cévní	Myokarditida - arytmie, poruchy vedení, kardiomegalie, srdeční selhání Endokarditida Akcelerovaná ateroskleróza	Infiltrace zánětlivých buněk. Zánět chlopní, fibrotizující jizevnatění Multifaktoriální - důsledek chronického zánětu, hyperlipidémie
Hematologické	Anémie normochromní normocytární s retikulocytózou Leukocytopenie, lymfocytopenie Trombocytopenie	Tepelné IgG protilátky proti aniontovému transportéru a glykophorinu na povrchu erytrocytů, neautoimunitní mechanismy . Lymfocytotoxické IgM proti CD45; IgG proti β2mikroglobulinu, HLA II.třídě, IL2R. Protilátky IgG proti glykoproteinům IIb/IIIa.
Neuropsychiatrické	Cefalea, chorea, neuropatie centrální i periferní, retinopatie, transverzální myelitida, epilepsie, CMP, TIA (a2) . Psychóza, organický psychosyndrom	Vaskulopatie - perivaskulární lymfocytární infiltrace, cévní hyalinizace. Mnohočetné drobné mikroinfarkty. Antineuronální protilátky proti povrchovým i intracytoplazmatickým antigenům (neurofilamenta). Porucha propustnosti hematoencefalické bariéry. In situ tvorba autoprotilátek.
Nefrologické	Lupusová glomerulonefritida (typ I-V dle biopsie)→nefrotický syndrom, akutní renální selhání, chronická renální insuficience	Ukládání imunokomplexů v mezangiu a v subendotelu glomerulárních kapilár. Chemotaxe zánětlivých buněk s poškozením glomerulů s nekrózou a následnou sklerózou. Patogenní autoprotilátky: Antinukleozomální protilátky - váží se na heparan sulfát bazální membrány glomerulů. Anti-dsDNA - vazba na negativně nabitě polymery bazálních membrán glomerulů.
Gastrointestinální	Defekty dutiny ústní Pankreatitida Autoimunitní hepatitida (b), Zánět střev (b), uzávěr mesenterálních cév	Vaskulitida cév

Vysvětlivky: a) Příčinou může být sekundární antifosfolipidový syndrom (APS) (1) je nutno rozlišit sekundární plicní hypertenzi tromboembolické etiologie při sekundárním APS (2) Centrální mozková příhoda (CMP), transitorní ischemická ataka (TIA) se vyskytují i při sekundárním APS b) jedná se spíše o komorbiditu anebo jsou projevem vaskulitidy cév

Diagnostika SLE je, vzhledem k rozmanitým projevům, obtížná. Typické projevy SLE se objevují u nemocných již před stanovením diagnózy: kožní manifestace (diskoidní erytém) se objevuje cca 1,74 roku před stanovením diagnózy, křeče spojené se vzácnějším postižením nervového systému cca 1,70 roku (149). Nejčastější klinický příznak v době stanovení diagnózy je artritida. Pro diagnózu SLE byl stanoven soubor diagnostických kritérií – spojují se v nich klinické manifestace (orgánové postižení) a laboratorní nálezy určující orgánové postižení a imunologický profil nemocného (150). V současné době se jedná o 11 bodů (viz Tabulka 9), avšak v diskuzi jsou nová klasifikační kritéria zohledňující více faktorů. Současně je k diagnóze SLE třeba, aby byly u nemocného prokázány alespoň 4 kritéria z ACR revidovaných kritérií (150). Specificita a senzitivita při splnění 4 bodů je u těchto kritérií je 92%, u splnění 6 bodů je specificita 95% a senzitivita 97%. Další vyšetření, například renální biopsie v případě postižení ledvin, určuje rozsah a typ postižení.

K dalším problémům diagnostiky SLE patří určení aktivity onemocnění. Aktivita onemocnění kolísá – období nízké aktivity (remise) se střídá s obdobím aktivity vysoké (flaru). Podle aktivity onemocnění se odvíjí léčba, prognóza nemocného, u žen je aktivita důležitá pro prognózu těhotenství. Vzhledem k multiorgánovému postižení u SLE jsou pro stanovení aktivity onemocnění používány komplexní skórovací systémy, které sledují jednotlivé manifestace SLE a jejich tíži hodnotí pomocí určitého skóre. Mezi skórovací systémy SLE patří: SLE Disease Activity Index (SLEDAI) a jeho varianta SELENA-SLEDAI, British Isles Lupus Assessment Group Index (BILAG), Lupus Activity Index (LAI), The Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) a European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM). Pro běžnou klinickou praxi jsou nejvhodnější BILAG (určující detailně jednotlivá orgánová postižení, která dostávají podle závažnosti skóre A-E) a u nás používaný SLEDAI (určující globálně aktivitu onemocnění pomocí bodů pro manifestace SLE).

Přítomnost autoprotilátek patří k laboratorním charakteristikám onemocnění a jsou součástí diagnostických kritérií SLE (viz Tabulka 9). Výskyt autoprotilátek, obdobně jako některých klinických projevů, předchází diagnózu SLE (151). Arbuckle et al. vyšetřovali retrospektivně séra 130 SLE nemocných pro 7 autoprotilátek (ANA, anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La a APL) a zjistili, že minimálně jedna autoprotilátka se vyskytuje v séru už 9.4 roku před manifestací SLE (151).

Stran výskytu autoprotilátek před diagnózou SLE je můžeme rozdělit na 2 typy, prvním jsou autoprotilátky vyskytující se častěji i u jiných onemocnění anebo v malém titru i u zdravých lidí (patří k nim ANA, anti-Ro a anti-La) a druhé, u zdravých lidí a jiných onemocnění vzácné autoprotilátky (anti-dsDNA, anti-Sm), které jsou typické a patognomické pro SLE. Zatímco první typ autoprotilátek se může objevit dlouho (i léta) před začátkem onemocnění, druhý typ se začíná zpravidla objevovat kolem 2 let před onemocněním, přičemž anti-Sm je otázkou posledního roku (151).

U SLE bylo identifikováno celkem přes 100 různých autoprotilátek, většinou v řadě IgG, což svědčí pro polyklonální aktivaci B lymfocytů. Pro klinickou praxi se však využívá jen část z nich. Testem zjišťujícím autoprotilátky – přímou imunofluorescencí Hep2 buněk lze rozpoznat skupinu antinukleárních protilátek (ANA). Tyto autoprotilátky jsou namířeny proti řadě jaderných antigenů - proti DNA, histonům, nukleozomům, RNA v jádře, chromatinu, strukturám jádra a jádérka, ale i komponentám cytoplazmy. K detekci jednotlivých protilátek se používá dvousměrná elektroforéza, enzymová imunoassay (ELISA), radioimunoanalýza (RIA) anebo Western Blot (WB). Anti-Sm a anti-RNP jsou autoprotilátky zaměřené proti

malým jaderným ribonukleoproteinům, které jsou součástí spliceosomu; anti-Sm se vyskytují u 10-30% SLE nemocných a jsou pro tuto chorobu vysoce specifické (152). Na druhou stranu, protilátky proti histonům se typicky objevují u léky indukovaného SLE. Přítomnost antifosfolipidových protilátek svědčí o možném vývoji sekundárního antifosfolipidového syndromu, přítomnost anti-SSA/Ro a anti-SSB/La sekundárního Sjogrenova syndromu.

Tabulka 9. Revidovaná diagnostická kritéria Systémového lupusu erythematosu

Kritérium	Popis
Obličejový kožní erytém	Trvající, plochý, přecházející přes líce a vynechávající okraje nasolabiální rýhy
Diskoidní erytém	Erytematózní vyvýšené skvrny na kůži obličeje s adheujícími jizvami; event. atrofická jizvení
Fotosenzitivita	Kožní erytém jako následek neobvyklé reakce po oslunění
Defekty ústní sliznice	Nebolestivé ulcerace ústní nebo nosohltanové sliznice
Artritida	Neerozivní artritida dvou a více periferních kloubů
Serositida	Pleuritida Perikarditida
Porucha ledvin	Přetrvávající proteinurie více než 0,5g/24hod Buněčné válce
Neurologické poruchy	Křeče (po vyloučení jiné příčiny) Psychóza (po vyloučení jiné příčiny)
Hematologické poruchy (a)	Hemolytická anémie s retikulocytózou Leukopenie celková méně než $4.0 \times 10^9/l$ Lymfopenie méně než $1.5 \times 10^9/l$ Trombocytopenie méně než $100 \times 10^9/l$
Imunologické poruchy (a)	anti-dsDNA anti-Sm antifosfolipidové protilátky
Antinukleární protilátky	Abnormální titr autoprotilátek prokázaných imunofluorescencí

Vysvětlivky: a) stačí vždy jeden z projevů
Literatura: 150

Některé autoprotiilátky jsou asociovány s orgánovými manifestacemi a aktivitou choroby. Autoprotiilátky proti dvoušroubovici DNA (anti-dsDNA) se mohou objevit těsně před začátkem onemocnění (151) anebo mohou předcházet, či se objevit současně s renálním postižením (149) anebo mohou předpovídat i jiný, například CNS, flare. K nefritogenním autoprotiilátkám patří vedle anti-dsDNA i anti-C1q autoprotiilátky, autoprotiilátky proti nukleozomům a proti alfa-aktininu (149, 153). Anti-C1q autoprotiilátky, které se vyskytují u cca 30-55% s renálním postižením (149, 154), mají společně s anti-dsDNA vysokou prediktivní hodnotu SLE – renálního flaru (154). Nefritogenní autoprotiilátky rozpoznávají povrchové antigeny glomerulárních buněk (heparan sulfát, laminin, alfa-aktinin), v případě anti-dsDNA existuje i in situ novotvorba imunokomplexů anebo tvoří imunokomplexy ukládané do mesangia glomerulů.

Výskyt neurologického anebo psychiatrického postižení u SLE (NP-SLE) se pohybuje podle literatury mezi 37-95% (155). Autoprotiilátky mohou být u CNS postižení tvořeny lokálně in situ anebo mohou do CNS prostupovat zánětlivě (nebo i jinak) porušenou hematoencefalickou bariérou (155, 156). V zásadě lze rozlišit dva typy autoprotiilátek. První jsou antifosfolipidové protiilátky – anti-kardiolipidové autoprotiilátky (ACLA), autoprotiilátky proti β 2 glykoproteinu I (anti- β 2 GPI) a protrombinu a lupusové antikoagulans (LA). Tyto autoprotiilátky jsou většinou spojeny s fokálním neurologickým postižením (TIA, CMP) způsobeným intravaskulární trombózou. Druhý typ autoprotiilátek se vyskytuje u difúzního CNS postižení projevujícího se křečemi, poruchami nálady, poruchami kognitivních funkcí a dalšími. U tohoto postižení byly identifikovány autoprotiilátky proti fosforylovaným ribozomálním peptidům (anti-P protein), které se vyskytují cca u 25% nemocných a v některých pracích korelují s aktivitou onemocnění (155). U neuropsychiatrického postižení jsou spokojovány s psychózou a depresí. Ze sledovaných antineuronálních protiilátek byly prozatím antigeně identifikovány pouze autoprotiilátky proti glutamátovému receptoru NR2 (anti-NR2 NMDA receptoru) (156), se kterým reagují i anti-dsDNA protiilátky. Recentně byly popsány autoprotiilátky proti esteráze D u kognitivní dysfunkce u SLE nemocných a autoprotiilátky proti APEX 1 endonukleáze u psychiatrických projevů SLE (157).

Další typ autoprotiilátek – anti-SSA/Ro a anti-SSB/La se vyskytuje u subakutního kožního lupusu, neonatálního SLE, SLE při deficienci C2 a C4. U nemocných s anti-Ro byl prokázán chronický průběh onemocnění. Anti-Ro autoprotiilátky se podle autoantigenu rozlišují na anti-Ro52 a anti-Ro60 a zejména anti-Ro52 je spojen s kongenitálním srdečním AV blokem III. stupně dětí pozitivních matek (158). Hematologické onemocnění SLE bývá

spojeno s autoprotilátkami proti lymfocytům, erytrocytům i trombocytům. Jejich přítomnost ale není pro SLE specifická.

1.2.3 Léčba systémového lupusu erythematu

Léčebná strategie u nemocných SLE se skládá ze tří pilířů: prvním je navození remise, druhým je udržovací léčba s prevencí SLE flarů a třetím je léčba komorbidit a snaha o snížení orgánového postižení vyvolaného nejen chorobou samotnou, ale i léčbou (159). Součástí léčby není jen farmakoterapie, ale i důsledná režimová opatření, jako je fotoprotekce, prevence infekcí a stresu. Farmakologická léčba SLE se odvíjí od aktivity onemocnění (viz Tabulka 10) a od orgánové manifestace choroby (160).

Tabulka 10. Možnosti léčby Systémového lupusu erythematu

SLE - aktivita	SLE - manifestace	Dávka kortikosteroidů	Immunosuprese
Vysoká SLEDAI >12	Lupusová nefritida CNS postižení Vaskulitida Akutní hemorhagická alveolitida	Vysoké dávky: Pulzy MP až 1000mg/den 1-3x a) p.o. PDN 0.5-1g/kg/den	Cyklofosfamid c), Mykofenolát mofetil, IVIg d), Rituximab e) jiné - plazmaferéza
Střední SLEDAI 8-12	Serositida Hematologické postižení Vaskulitida	Střední dávky: p.o. PDN 0.2- 0.5mg/kg/den b)	Metotrexát, Leflunomid, Cyklosporin A, Azathioprin, IVIg d), Rituximab e), Belimumab f)
Mírná SLEDAI 4-8	Artritida Kožní postižení Serositida	Nízké dávky: p.o. PDN 0.1-0.2 mg/kg/den b)	Antimalarika, Metotrexát, Leflunomid, Azathioprin, Thalidomid

MP: Metylprednisolon, PDN: Prednison, CNS: Centrální nervový systém, IVIg: intravenózní imunoglobuliny

a) Použití k rychlému zvládnutí těžkého onemocnění

b) Při mírném a středním flaru lze přechodně navýšit p.o. Prednison anebo použít 100mg Triamcinolonu intramuskulárně

c) Cyklofosfamid v léčbě lupusové nefritidy v režimu NIH anebo Euro-Lupus s indukční a následnou udržovací fází, u vážných vaskulitid anebo CNS postižení

d) IVIg - vhodné u těhotných žen a febrilních pacientů, jinak léčba druhé volby

e) Rituximab - off-label lék, u aktivní choroby rezistentní k běžným imunosupresivům

f) Belimumab - schválen k léčbě aktivního SLE americkou FDA 3/2011

1.2.3.1 Léčba mírně a středně aktivního systémového lupusu erythematu

Při mírné aktivitě SLE jsou doporučeny nízké dávky kortikosteroidů (prednison 0.1-0.2 mg/kg/den) v kombinaci s antimalariky. S mírnou aktivitou je většinou spojen SLE flare kožně-kloubní. U středně aktivního onemocnění je doporučená dávka kortikosteroidů vyšší

(prednison 0.2-0.5 mg/kg/den) a použití některého z imunosupresivních léčiv – cyklosporinu A (CYA) u hematologického postižení anebo azathioprinu (AZA) při serositidách, hematologickém a kožním postižení (viz Tabulka 10).

V případě těžkého kloubního postižení je, vyjma kortikosteroidů a antimalarik, indikována imunosupresivní léčba metotrexátem (MTX), eventuálně leflunomidem (LEF) nebo AZA. Biologická léčba inhibitory TNF- α je u SLE artritidy otázkou – Aringer et al. sledovali efekt infliximabu, monoklonální protilátky proti TNF- α u 6 pacientů se SLE, přičemž 3 z nich trpěli refrakterní artritidou. Při použití infliximabu došlo k promptnímu zlepšení artritidy, u všech došlo k relapsu artritidy po 8-11 týdnech (161). Otevřená studie byla v dalších letech rozšířena o dalších 7 pacientů, nemocní byli sledováni celkem 4 roky. Ačkoliv pozitivní efekt na artritidu byl potvrzen, ukázaly se výrazné komplikace – u jedné nemocné se objevil lymfom CNS, jedna nemocná zemřela na pneumonii způsobenou *Legionella pneumoniae* (162). Dalším problémem užití inhibitorů TNF- α je zvýšená syntéza autoprotilátek – ANA, anti-dsDNA a IgG antikardiolipinových autoprotilátek. I když Aringer a kol. i v dlouhodobém sledování nezjistili zvýšený výskyt nových SLE flarů (objevení se artritidy po 8 týdnech infliximabu nebylo hodnoceno jako flar), potvrdili zvýšenou produkci všech výše uvedených autoprotilátek (162), přičemž se u jedné nemocné s nově objevenějšími ACLA objevila hluboká žilní trombóza.

V případě kožních manifestací SLE jsou indikovány jednak léčiva použitá lokálně (kortikosteroidy, retinoidy, analoga vitamínu D₃, tacrolimus) a i systémově. Opět je první volbou antimalarikum (160), u torpidních kožních manifestací je možno použít thalidomid a ostatní imunosupresiva (MTX, AZA, Cyklofosfamid - CYC, Mykofenolát mofetil – MMF). Z biologické léčby byly popsány kazuistiky s pozitivním efektem Rituximabu, monoklonální protilátky anti-CD20 vedoucí k depleci B lymfocytů, u torpidního kožního postižení (163), randomizované studie o účinnosti však chybí.

Hematologické postižení se u SLE může projevovat jako anémie, leukocytopenie – neutropenie a lymfocytopenie a trombocytopenie. V případě anémie je nutno rozlišit její původ. U SLE se může objevit anémie chronických onemocnění (normochromní normocytární anémie s nízkou hladinou sérového železa, normální anebo zvýšenou hladinou feritinu), anémie z deficitu železa (poikilocytóza, hypochromií mikrocytární anémie s nízkou hladinou sérového železa a s nízkou hladinou feritinu) anebo autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) zpravidla s tepelnými IgG autoprotilátkami, vzácně s chladovými IgM autoprotilátkami. První dva typy anémie je nutno léčit symptomaticky, v případě anémie

chronických chorob je možné použití erythropoetinu, eventuelně krátkodobě kortikosteroidy, v případě deficitu železa jeho suplementace a vyloučení příčin jeho ztráty. V případě AIHA jsou indikovány kortikosteroidy (až 1mg Prednisonu/kg/den), u torpidních AZA, CYC, MMF, intravenózní imunoglobuliny (IVIg) anebo Rituximab (160, 164). Leukocytopenie – neutropenie a lymfocytopenie provází zpravidla aktivní onemocnění, léčba sestává z kortikosteroidů a cyklosporinu A; při lymfocytopenii je indikována profylaxe infekce pneumocystis carini trimetoprimem/sulfmetoxazolem, při těžké neutropenii (pod 500/ul) jsou indikovány růstové faktory – G-CSF. Trombocytopenie se vyskytuje u 20-50% aktivních nemocných a je zpravidla mírná, bez klinických projevů a bez potřeby terapie. Avšak u 5% se vyskytne těžká trombocytopenie (s počtem trombocytů po 50 000/dl) projevující se trombocytopenickou purpurou – léčba se skládá iniciálně z vysokých dávek kortikosteroidů (1.0-1.5mg/kg/den) nebo i.v. pulzu metylprednisolonu, s následnou imunosupresí AZA, MMF, eventuelně CYA anebo Rituximabem. V těžkých případech je možné použít plazmaferézu anebo IVIg. U nemocných bez odpovědi na imunosupresi je indikována splenektomie (164).

Postižení serózních blan projevující se perikarditidou, pleuritidou a vzácně i peritonitidou může provázet mírně, středně i vysoce aktivní SLE. Perikarditida bývá zpravidla mírná s dobrou odpovědí na nesteroidní antirevmatika. Při těžké nebo refrakterní perikarditidě jsou indikovány vyšší dávky kortikosteroidů (prednison 0.5-1.0mg/kg/den) a imunosuprese AZA, MTX a dalšími. V případě tamponády (velmi vzácné manifestace SLE perikarditidy) je indikována perikardiocentéza a do léčby jsou doporučeny kortikosteroidy intravenózně v pulzech (methylprednisolon 500-1000mg 3-5dní), imunosuprese včetně CYC anebo IVIg (165). K zvládnutí pleuritidy většinou stačí nesteroidní antirevmatika, kortikosteroidy, antimalarika a při refrakterním onemocnění imunosupresi. Pleurodéza je indikována vzácně při chronickém onemocnění s klinickými projevy (166). Lupusová peritonitida se vyskytuje až u 12% nemocných. Léčba je po správné, ale obtížné diagnostice (v diferenciální diagnostice bolestí břicha u SLE nemocných je nutno vyloučit všechny příčiny bolestí břicha, někdy až s nutností laparoskopie) u většiny pacientů úspěšná při středních dávkách kortikosteroidů. Při masivním anebo refrakterním ascitu jsou indikovány i.v. pulzy metylprednisolonu a imunosuprese AZA, CYA a CYC (167).

Novinkou v léčbě středně aktivního lupusu je belimumab, humánní rekombinantní protilátka IgG proti aktivátoru B - lymfocytů (faktoru BAFF), který byl schválen pro léčbu SLE americkou Food and Drug Administration (FDA) v březnu 2011. BAFF je cytokin

produkovaný četnými buňkami přirozené (neutrofilů, monocytů, makrofágů a dendritické buňky) i získané imunity (T a B lymfocyty) a má centrální úlohu v přežívání B lymfocytů. Hladina BAFF faktoru reflektuje aktivitu SLE a hladinu anti-dsDNA autoprotilátek (168). V experimentálních modelech na hlodavcích byl prokázán pozitivní efekt blokování BAFF faktoru na rozvoj SLE nefritidy a snížení počtu B lymfocytů, nadějně výsledky s poklesem zralých CD20+ B lymfocytů byly prokázány i na hominidech a v prvních fázích klinického hodnocení nebyly prokázány závažné nežádoucí účinky (168). Druhá fáze klinického zkoušení belimumabu u souboru 449 SLE nemocných s mírně a středně aktivním onemocněním prokázala signifikantní rozdíl v délce mezidobí do objevení se SLE flaru (154 versus 104 dní, $p=0.036$), signifikantní zlepšení choroby podle skórovacího systému SELENA-SLEDAI, a to pokles o 28.8% versus 14.2% u placeba, ($p=0.0435$) a signifikantní pokles titru anti-dsDNA autoprotilátek a aktivovaných CD20+ B lymfocytů (169). Ve třetí fázi klinického hodnocení belimumabu u SLE, studii BLISS-52 a -76, byla testována dávka (1mg/kg versus 10mg/kg versus placebo) a sledován efekt na předem stanovené markery: zlepšení hodnot SELENA-SLEDAI o 4 a více body, neobjevení se žádného A nebo více než dvou B BILAG flarů (1A/2B) a nezhoršení se hodnocení stavu nemocného lékařem o 0.3 body. Do studie bylo rekrutováno 819 SLE nemocných se středně aktivním lupusem na standardní medikaci (imunosuprese a antimalarika) a kortikosteroidech, nemocní s akutní lupusovou nefritidou a CNS postižením nebyli zavzati do studie. V týdnu 52 (BLISS-52) byl prokázán signifikantní rozdíl mezi nemocnými s belimumabem v obou dávkách a nemocnými s placebem (170) – skóre SELENA-SLEDAI se vylepšilo o 4 a více bodů u 53% a 58% nemocných s belimumabem v dávkách 1mg/kg a 10mg/kg v porovnání se skupinou s placebem (46%), $p=0.019$ a $p=0.0024$. V případě BILAG 1A/2B flarů byl prokázán efekt belimumabu pouze v dávkách 10mg/kg – u kontrolní skupiny se neobjevily o 73%, kdežto u léčené u 81%, $p=0.018$. V hodnocení klinického stavu nemocného lékařem byl rozdíl u obou testovaných dávek oproti placebu, 79 a 80% versus 69%, $p=0.0078$ a $p=0.0048$. V dalším sledování, BLISS-76, byly sledovány stejné parametry v pokračování léčby u stejných pacientů. V týdnu 76 byl prokázán signifikantní rozdíl v poklesu aktivity SELENA-SLEDAI o 4 a více bodů pouze u skupiny léčených 10mg/kg belimumabu (47%) na rozdíl od placeba (36%), $p=0.006$, v případě belimumabu 1mg/kg byl pokles u 43% ($p=0.08$). U obou skupin byl prokázán pozitivní efekt na zvýšení hladin komplementu (C3 a C4) a snížení hladin anti-dsDNA autoprotilátek (171). Zároveň byla prokázána bezpečnost použití léčiva. Belimumab je tedy novým preparátem k léčbě SLE. Jeho zařazení do léčebných algoritmů je nyní

předmětem diskuzí a dalších sledování. Z profilu pacientů ve studii BLISS-52 a BLISS-76 vyplývá, že z léku budou patrně nejvíce profitovat nemocní séropozitivní (ANA, anti-dsDNA) se střední a vysokou aktivitou.

1.2.3.2 Léčba vysoce aktivního systémového lupusu erythematodu

Pro vysoce aktivní SLE je vyhrazena léčba vysokými dávkami kortikosteroidů – podání může být perorální (dávka až do 1 mg/kg/den) anebo v podobě pulzu metylprednisolonu (MP). Pulzy MP slouží k rychlému zvládnutí akutní choroby – podány mohou být 1-3x, dávka je dána v rozmezí 500mg - 1000mg. Dávkování MP v pulzech je však otázkou - Edwards et al. v otevřené studii referoval stejný benefit podání 100 a 1000mg MP u 21 aktivních SLE, bez efektu na nežádoucí účinky (172). Dle farmakokinetických a farmakodynamických studií je k plné imunosupresi dostatečná dávka 320mg MP (173). Z imunosupresivních léčiv lze použít cyklofosfamid, mykofenolát-mofetil, při nezvladatelném průběhu onemocnění plazmaferézu, IVIg anebo B-depletující léčbu rituximabem. Vysoce aktivnímu onemocnění odpovídá postižení ledvin, akutní onemocnění plicní (akutní hemoragická alveolitida), těžké cytopenie, postižení centrálního nervového systému a závažné případy vaskulitidy (viz Tabulka 10).

Postižení ledvin se vyskytuje u 50-75% nemocných se SLE. Lupusová nefritida (LN) se, podle histopatologického nálezu, dělí na 6 tříd (viz Tabulka 11). Léčba lupusové nefritidy záleží na aktivitě onemocnění a na typu nefritidy. Léčba proliferativní lupusové nefritidy (třída III a IV) má dva úseky – prvním je indukce remise, druhým je udržovací fáze.

Pro léčbu proliferativní lupusové nefritidy se stal zlatým standardem cyklofosfamid podávaný v pulzech, který prokázal vyšší účinnost oproti metylprednisolonu (175). Proto byl zaveden v 90. letech 20. století velmi úspěšný protokol NIH (National Institutes of Health): skládá se z indukce i.v. metylprednisolonu v dávce 1000mg anebo prednisonu 0.5mg/kg/den po 4 týdny s následnou detrací a s navazujícími měsíčními pulzy cyklofosfamidu (v dávce 0.75g/m²) v následujících 6 měsících. Následovala udržovací fáze – a to i.v cyklofosfamid ve stejné dávce podávaný jednou za tři měsíce po dobu jednoho roku po navození remise anebo po dobu až dvou let (175, 176). Problémem tohoto režimu je vysoká toxicita – zejména gonadální: až u 50% žen v závislosti na věku docházelo k předčasnému ovariálnímu selhání (177). Tento protokol je tedy v posledních letech, a zejména u kavkazské rasy, zaměněn na „Euro-Lupus Nephritis protocol“, který se skládá z indukce třemi pulzy metylprednisolonu v dávce 750mg s navazujícím prednisonem v dávce 0.5mg/kg/den po 4 týdny s následnou

detrakcí a šesti pulzy cyklofosfamidu o dávce 500mg po 14 dnech (178). Jako udržovací fáze následuje azathioprin v dávce 2mg/kg/den po dobu 27 týdnů (178).

Dalším léčivem možným k použití u LN je mykofenolát mofetil, recentně proběhly dvě studie týkající se jeho nadřazenosti nad i.v. cyklofosfamidem – ALMS v indukci remise a MAINTAIN v udržovací fázi. Studie ALMS (Aspreva Lupus Management Study) neprokázala vyšší účinnost MMF v indukci remise LN oproti i.v. CYC (179), ale byl potvrzen srovnatelný efekt obou léčiv. Recentně publikované výsledky studie MAINTAIN rovněž nepotvrdily vyšší efekt MMF versus azathioprinu u LN v režimu Euro-Lupus, i když nástup cytopenie způsobené léčivou byl u MMF opožděnější než u AZA (180). MMF je tedy indikován v indukci a udržovací léčbě proliferativní lupusové nefritidy, zejména u žen s reprodukčním potenciálem.

Léčba II. třídy LN se skládá z kortikosteroidů a imunosuprese v případě alterace funkčních renálních parametrů. Na druhou stranu, v léčbě LN V. třídy je indikováním imunosupresivem MMF, eventuelně cyklosporin A nebo azathioprin (160).

Velmi slibné výsledky v léčbě LN ukazovaly četná pozitivní kasuistická sdělení a otevřené studie s rituximabem. Randomizovaná studie LUNAR sledovala efekt rituximabu u nemocných s LN III. a IV. třídy, nemocní měli současnou medikaci kortikosteroidy a MMF. Nebyl však prokázán žádný rozdíl mezi nemocnými s rituximabem a nemocnými s placebem (181). Přesto je rituximab u proliferativní LN léčivem druhé volby při nedostatečné odpovědi na běžné režimy.

Postižení centrálního nervového systému patří k závažným SLE flarům. Diverzita v klinických projevech – od fokálních (TIA, CMP) až po difúzní projevy (psychózy, křeče, organický psychosyndrom, a další) určuje i rozdílný terapeutický přístup, který se skládá ze zvládnutí symptomů a z ovlivnění patogenetických mechanismů. Fokální projevy NP-SLE jsou způsobeny protrombofilním stavem nemocných a k jejich zvládnutí je, kromě běžných doporučení, indikována antikoagulační léčba v indukční i v udržovací fázi (160). Difúzní projevy NP-SLE je nutno zvládnout symptomaticky (antidepresiva, antipsychotika,

Tabulka 11. Klasifikace Lupusové nefritidy (ISN/RPS 2003)

Třída I	Minimální mesangiální LN
Třída II	Mesangiálně proliferativní LN
Třída III	Fokální proliferativní LN (IIIA, IIIA/C, IIIC)
Třída IV	Difúzní proliferativní LN IV-S(A), IV-G(A), IV-S(A/C), IV-S(C), IV-G(C)
Třída V	Membranózní LN
Třída VI	Pokročilá sklerotizující LN

LN - lupusová nefritida, A-aktivní léze, C-chronické léze, S-segmentální, G-globální
 ISN/RPS - International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (174)

antiepileptika a další) a kombinovanou imunosupresí. Prozatím neexistuje randomizovaná studie s léčbou NP-SLE, nicméně vzhledem k retrospektivním analýzám jsou doporučovány pulzy cyklofosfamidu (v dávce protokolu NIH), azathioprin, intratekální aplikace methotrexátu a kortikosteroidy (ve vyšších dávkách a pro zvládnutí akutní choroby i v i.v. pulzech) (155, 160, 182). V rezistentních případech je možno použít B-depletující léčbu rituximabem (155).

1.2.3.3 Perspektivy v léčbě systémového lupusu erythematosu

Patogeneze SLE je velmi široká, proto nalézt správnou léčbu je velmi obtížné. Ústřední úlohu v patogenezi sehrávají B lymfocyty a abnormální komunikace mezi jednotlivými složkami přirozené i adaptivní imunity. Do klinického testování jsou zahrnuta léčiva ovlivňující B, T lymfocyty a některé cytokiny, ale i léčiva navozující imunologickou toleranci (například anti-DNA tolerageny – abetimus, edragen).

V éře biologických preparátů jsou u SLE použita léčiva ovlivňující B lymfocyty (147). Mezi B-depletující léčiva patří anti-CD20 (rituximab, okrelizumab), B-buňky modulující anti-CD22 (epratuzumab) a anti-BAFF (belimumab). V případě rituximabu obě randomizované studie, LUNAR u lupusové nefritidy a EXPLORER u středně aktivního SLE bez postižení ledvin, selhaly stran prokázání účinnosti, na druhou stranu u obou studií nebyly zjištěny závažné nežádoucí účinky (181, 183). Klinické zkušenosti nicméně ukazují efekt rituximabu u závažných a na léčbu rezistentních případů. V současné době probíhá studie RITUXILUP, která porovnává efekt rituximabu u LN III., IV. a V. třídy u nemocných léčených MMF bez kortikosteroidů v udržovací fázi. Monoklonální protilátka anti-CD22, epratuzumab, moduluje účinek B lymfocytů bez ovlivnění jejich počtu. Během studií fáze IIb, EMBLEM, byl zjištěn pozitivní efekt na snížení aktivity a zlepšení BILAG skóre u středně aktivního a těžkého SLE (184). Proto byly v polovině roku 2010 zahájeny další randomizované studie fáze III. Funkci B lymfocytů ovlivňuje i nově registrovaný lék, BenLysta, belimumab, diskutovaný výše. Další z možných léčiv ovlivňujících B lymfocyty, a sice monoklonální protilátka proti receptoru TACI – atacicept, byl stažen z klinických hodnocení pro vysoký výskyt infekčních komplikací.

Dalším cílem SLE léčby jsou T lymfocyty. U experimentálních modelů se jevil jako efektivní abatacept, protilátka proti kostimulační molekule CTLA-4. Ve fázi II testování tohoto léku byl prokázán nižší výskyt BILAG A flarů u nemocných s léčivem oproti placebo (40.7% versus 54.4%), nicméně u pacientů s testovacím léčivem byl zjištěn i vyšší výskyt

nežádoucích účinků (185). Dále, ale prozatím v probíhajících fázích I a II, jsou testovány inhibitory signalizačních intracelulárních molekul (rapamycin – v případě mammalian target of rapamycin, mTOR a R788 u spleen tyrosin kinase inhibitor, Syk).

Další skupinu testovaných léčiv tvoří protilátky proti cytokinům. Použití protilátek proti TNF- α (infiximab, a dalších) bylo zvažováno k léčbě muskuloskeletálního postižení a lupusové nefritidy, avšak nežádoucí účinky stran infekce a zvýšené tvorby autoprotilátek vyřadily tato léčiva z širšího použití (161, 162). Testuje se i inhibitor receptoru IL-6, prozatím jsou známy výsledky fáze I u 16 nemocných se středně aktivním SLE, které vypadají nadějně. Nadějně se jeví i sifalimumab a rontalizumab, monoklonální protilátky proti IFN- α , se kterými probíhají studie fáze II. Novinkami a budoucí perspektivou by mohlo být blokování IL-17 a IL-21, jejichž hladiny jsou zvýšeny u aktivních SLE.

1.3 Ostatní systémová revmatická onemocnění

K revmatickým onemocněním patří spektrum chorob, v této části zmiňuji pouze ty, které mají souvislost s mou prací.

1.3.1 Revmatoidní artritida

RA je chronické autoimunitní onemocnění, které postihuje cca 0.5- 1% populace, přičemž výskyt onemocnění je častější u žen - poměr k mužům je u premenopauzálních žen 4-5:1 a u postmenopauzálních 2:1 (186). Onemocnění je charakterizováno symetrickou polyartritidou objevující se predominantně na malých a středně velkých kloubech horních a dolních končetin, v některých případech provázenou i mimokloubními projevy (například intersticiální pneumonitida, vaskulitida a další) anebo i postižením velkých kloubů (187). Klinicky probíhá RA s obdobími aktivity a remisí, u některých nemocných pod obrazem trvalé aktivity vedoucí až k destrukcím kloubů a ztrátě mobility. Diagnostika RA je založena na diagnostických kritériích (187). V současné době jsou již modifikovaná diagnostická kritéria pro časnou fázi RA (viz Tabulka 12), které umožňují rozpoznat onemocnění velmi časně a zahájit tak dříve léčbu, což má pozitivní efekt na perspektivu nemocných.

Etiopatogeneze onemocnění není doposud zcela objasněná, k rozvoji onemocnění je třeba genetická vnímavost (viz Tabulka 2) (66, 67, 68) spolu s faktory zevního prostředí (například kouření, infekce). Hlavními patogenetickými momenty u RA jsou systémové poruchy v imunoregulaci a lokální zánět. Na aktivaci zánětu se podílí T lymfocyty – a sice nedostatečnou funkcí regulačních T lymfocytů a úniku autoreaktivních T lymfocytů při jejich

zrání. Dalším momentem je podpora B lymfocytů, které poté produkují jednak prozánětlivé cytokiny, ale i autoprotilátky – revmatoidní faktory a ACPA.

Lokálně dochází v synoviálních kloubech k hyperplazii synovie s tvorbou zánětlivé granulační tkáně (panu) obsahující T a B lymfocyty, makrofágy, fibroblasty a další buňky. Panus invaduje do kloubní štěrbině, jeho aktivované buňky se jednak podílí na zahájení a přetrvávání lokálního zánětu

(produkcí prozánětlivých cytokinů IL-1, 6, TNF- α a dalšími) a jednak podporují synoviální fibroblasty (SF) a osteoklasty v destrukci chrupavky a erozi přilehlé kosti (188). SF jsou buňkami citlivými k prozánětlivým cytokinům a navíc je i samy produkují, čímž zpětně podporují aktivaci T lymfocytů a přežívání B lymfocytů a udržují tak lokální zánět.

SF jsou ale zejména vysoce efektivní v destrukci chrupavky, ke které adherují a vlivem svých proteolytických enzymů, metaloproteináz (MMP), MMP-1, 3, 13, 14 a 15 a kathepsinů B, K a L, ji degradují (188). Eroze přilehlé kosti je dílem druhých efektivních buněk, osteoklastů. Osteoklasty se diferencují z prekurzorových buněk

a v posledních letech se pro jejich vývoj ukazuje jako klíčová vazba mezi receptorem prekurzorových buněk (RANK, Receptor Activator of NF κ B) s RANKL (Receptor Activator of NF κ B ligand) exprimovaným na aktivovaných T lymfocytech, neutrofilech a SF. Prozánětlivé cytokiny, např. IL-1, 17, 18 a TNF- α stimulují syntézu RANKL anebo zesilují intracelulární signalizaci (189).

Léčba revmatoidní artritidy spočívá ve farmakologických a nefarmakologických postupech. Nefarmakologické postupy – jako je rehabilitace nebo rekonstrukční operace řeší

Tabulka 12.

ACR klasifikační kritéria pro diagnózu revmatoidní artritidy

- a) Ranní ztuhlost více než 1 hodinu
- b) Artritida 3 a více skupin kloubů
- c) Artritida ručních kloubů
- d) Symetrická polyartritida
- e) Revmatické uzle
- f) Revmatoidní faktor v séru
- g) Rentgenové změny kompatibilní s diagnózou

Diagnóza RA při minimálně 4 pozitivních bodech, body a - d musí být přítomny alespoň 6 měsíců (186)

Nově navržená klasifikační kritéria pro diagnózu revmatoidní artritidy

	skóre	
	1 střední - velký	0
	2-10 středních-velkých	1
Klouby	1-3 malé rukou, nohou nebo RC	2
	4-10 malé rukou, nohou nebo RC	3
	více než 10 (aspoň 1 ruce,nohy, RC)	5
Sérologie	RF a ACPA negativní	0
	RF nebo ACPA nízké pozitivní	2
	RF nebo ACPA vysoce pozitivní	3
Trvání	méně než 6 týdnů	0
symptomů	více než 6 týdnů	1
Reaktanty	normální CRP a FW	0
akutní	abnormální CRP a/nebo FW	1

Pro diagnózu RA je nutné 6 a více bodů

RC: radiokarpální kloub, RF: revmatoidní faktor, ACPA: protilátky proti citrulinovaným peptidům, CRP: protein akutní fáze, FW: sedimentace erytrocytů

lokální kloubní postižení. Farmakologickou léčbou lze zvládnout jednak aktivní kloubní chorobu, jednak mimokloubní chorobu a v neposlední řadě i přidružené a z léčby vyplývající onemocnění (léčba kortikosteroidy indukované osteoporózy a dalších). V terapii RA mají, zejména v počátku nebo při vysoce aktivním onemocnění, své jisté postavení kortikosteroidy, nicméně jejich použití by mělo být omezeno na co nejkratší nutnou dobu. Strategii léčby RA je navození remise. Ihned po diagnóze má nastupovat podávání chorobu modifikujících léčiv (methotrexát, leflunomid, salazopyrin, cyklosporin A, azathioprin, antimalarika) a to buď samostatně anebo při neúčinnosti v kombinacích. Při nedostatečném efektu léčby jsou indikovány biologické preparáty – léčiva inhibující účinek TNF- α : monoklonální protilátky - infliximab, adalimumab, golimumab, lidský TNF receptor, etanercept, nebo humanizovaný Fab fragment protilátky proti TNF- α konjugovaný polyetylglykolem, certolizumab. Při nedostatečném efektu těchto léčiv je možná záměna jednoho za druhý anebo použití dalších skupin – rituximabu (anti-CD20 protilátka), abataceptu (inhibice kostimulace CTLA-4) anebo tocilizumabu (monoklonální protilátka proti receptoru IL-6) (190). V současné době probíhá řada klinických studií testující léčiva blokující intracelulární signalizační molekuly (Janus-kinázy, Mitogenem-aktivované kinázy a další) anebo blokující další cytokiny – IL-17, 6 a další.

1.3.2 Psoriatická artritida

PsA je heterogenní chronické onemocnění, které je charakterizována artritidou, zpravidla seronegativní provázející psoriázu (PV) (191). PsA se vyskytuje u 7–42 % pacientů s PV (192). Vztah mezi rozvojem kožního a kloubního postižení není jednoznačný – PsA se zpravidla objevuje během kožní manifestace psoriázy (průměrně do 10 let jejího trvání, cca u 75% nemocných), může však rozvoj artritidy předcházet (u 10-20%) anebo se objevit současně s kožním syndromem (u 11-15%) (193). Souvislost mezi tíží kožního a kloubního postižení je různá – těžké kloubní postižení může být provázeno pouze malými kožními příznaky a zhoršení kloubního onemocnění nemusí korespondovat se zhoršení kožních projevů a obráceně (193). V klinickém obraze se u PsA objevují artritidy, které mohou být symetrické, podobné RA, ale častěji, až v 70% se objevují asymetrické oligoartritidy. U nemocných s postižením nehtů se často vyvine artritida distálních interfalangeálních kloubů. Charakter artritidy může být od neerozivních forem až k těžkému erozivnímu postižení a osteolýze falang prstů u mutilující formy PsA. Dalším možným klinickým postižením je u PsA zánět v oblastech úponů šlach a vazů ke kosti, entezitidy. Postižení

sakroiliakálních kloubů (sakroileitida) bývá zpravidla spojena s HLA B27 pozitivitou a vyskytuje se jen u 5% nemocných.

Etiopatogeneze onemocnění je obdobně, jako u RA, komplexní a ne zcela objasněná. Genetické pozadí PsA se částečně překrývá s rizikovými geny pro rozvoj psoriázy (viz Tabulka 2). Rizikovou oblastí jsou geny HLA – I. třídy (57) a dále oblast PSORAS 1 (16q12), která obsahuje gen NOD2/CARD15. Tento gen kóduje intracelulární receptor nezbytný pro rozpoznávání bakteriální polysacharidů (36). PsA provází porucha imunitních reakcí – zkřížena reaktivita (87), porucha imunotolerance T a B lymfocytů. Synoviální membrána vykazuje zvýšenou vaskularitu a obdobně jako u RA proliferuje a vytváří zánětlivý panus, a to díky aktivovaných T lymfocytům, makrofágům a synoviálním fibroblastům (194). Tyto buňky produkují prozánětlivé cytokiny, ústřední úlohu má patrně TNF- α , který se podílí na podpoře syntézy metaloproteináz, destrukci chrupavky a kosti obdobně jako u revmatoidní artritidy (195).

Léčba psA je opět medikamentózní a ostatní (chirurgická, rehabilitační). Má za cíl snížit aktivitu onemocnění, předejít kloubním deformitám a ztlumit bolest. K léčbě se využívají nesteroidní antirevmatika a v závažnějších případech, chorobu modifikující léčiva (DMARDs) – methotrexát, sulfasalazin, leflunomid a cyklosporin A. Při použití těchto léčiv může dojít ke zlepšení nejen kloubního, ale i kožního postižení. Závažné formy onemocnění rezistentní k DMARDs výborně reagují na biologickou léčbu zastoupenou v současnosti preparáty blokující účinek TNF- α (infliximab, adalimumab, golimumab, etanercept a certolizumab) (196).

1.3.3 Systémová sklerodermie

SSc je chronické celkové onemocnění, které postihuje kůži a vnitřní orgány. Onemocnění se vyskytuje jako limitované kožní postižení (sklerodaktylie a akroskleróza) anebo difúzní kožní sklerodermie – s postižením kůže obličeje, těla a končetin. Klinicky lze sledovat cévní změny způsobné poruchami mikrocirkulace drobných, zpravidla digitálních arterií, postižení dýchacího systému (alveolitida a následně vývoj bazilární plicní fibrózy), rozvoj plicní hypertenze a postižení gastrointestinálního traktu, které se manifestuje hypomotilitou jícnu, gastroesofageálním reflexem a malabsorbí. Artritida nebo polyartralgie se objevují až u 75% nemocných (197). Onemocnění se vyskytuje až 3x častěji u žen (198).

Na rozvoji onemocnění se podílí genetické predispozice (71) a environmentální vlivy (197, 198); jsou popsány chemikálie vedoucí k rozvoji onemocnění (například organická

rozpouštědla, křemík, a další). V patogenezi se pak uplatňují tři činitelé – postižení cév, imunitní aktivace, zánět a fibróza. Vaskulární dysfunkce, časná známka SSc, je způsobená poškozením endoteliálních buněk (autoprotiilátkami proti endoteliím, cytokiny – TGF- β), následnou expresí HLA a intercelulárních adhezních molekul. Dochází k infiltraci T lymfocytů, monocytů a fibroblastů a produkci extracelulární matrix. To následně vede k proliferaci intimy a zúžení lumen cév, což má za následek redukcii průtoku a rozvoj končetinových ischemií a ulcerací. Obdobné změny mohou nastat i u cév vnitřních orgánů – GIT, plicích, ledvinách a srdci. Další patologií u SSc je porucha humorální imunity – u nemocných se objevují antinukleární protilátky (>90%) a typicky autoprotiilátky proti DNA topoisomerase I (anti-Scl-70) (197). Fibróza je závěrečným krokem patogeneze SSc – je způsobená nadměrnou produkcí kolagenu typu 1 i 3 a zároveň sníženou syntézou kolagen-degradujících metaloproteináz (199), vše za podpory TGF- β a IL-4 syntetizovanými aktivovanými T lymfocyty a monocyty.

Léčba SSc je obtížná. Vzhledem k tomu, že patogeneze není stále jasná, kauzální terapie neexistuje. Při závažných, zejména systémových, projevech je možné použít imunosupresiva – metotrexát, azathioprin, u kterých byl popsán efekt na kožní syndrom (197), a cyklofosfamid, který má místo u akutní alveolitidy a prodlužuje přežívání (200). Nicméně ani jeden z DMARDs neprokazuje výraznou účinnost nebo zastavení choroby. Ze systémové léčby jsou testovány biologické preparáty - anti-CD20 u kožního kloubního postižení (200), existují kazuistiky popisující pozitivní efekt na kožní syndrom při použití tocilizumabu, protilátky proti receptoru IL-6 (201). V současné době probíhá studie SCOT „Scleroderma cyclophosphamide or transplantation trial“, která sleduje rozdíl v efektu autologní transplantace kostní dřeně a i.v. pulzů cyklofosfamidu. Podstatnou roli také hraje léčba specifického orgánového postižení – léčba plicní hypertenze, dysfagie a malabsorbce (197).

1.3.4 Zánětlivé myopatie – dermatomyositida a polymyositida

PM a DM jsou systémová autoimunitní onemocnění, u kterých jsou postiženy primárně svaly, v případě DM i charakterické kožní projevy. Systémové komplikace jako je vaskulitida, artritida, postižení srdce, gastrointestinálního traktu a plic se vyskytují u obou chorob. Hlavním klinickým příznakem je symetrická svalová slabost postihující proximální svalové skupiny, trup, krk a symptomy vyplývající ze systémových komplikací – dušnost,

dysfagie a malnutrice. Jedná se o vzácná onemocnění (incidence je 2-10/1milion obyvatel), pík incidence je mezi 50.- 60. rokem života a ženy jsou postiženy 3x častěji než muži (202).

V etiopatogenezi onemocnění mají úlohu genetické faktory, zejména oblast HLA II. třídy (72,73), za podpory faktorů zevního prostředí. Existuje podskupina onemocnění – „cancer associated dermatomyositis“ (CADM), která je spojena s maligním onemocněním – prozatím není jasné, zda CADM znamená paraneoplastický fenomén anebo zda chronický zánět a imunosupresivní léčba vedou ke snadnějšímu vzniku tumoru. V rozvoji onemocnění existují tři nezávislé patogenetické složky: poškození svalových vláken cytotoxickou reakcí (infiltrovanými CD8+ a CD4+ T lymfocyty a makrofágy), poškození metabolismu a funkce svalových vláken cytokiny a chemokiny (IL-1, TNF- α a dalších) a poškození mikrocirkulace způsobené zánětlivými perivaskulárními infiltráty a ztrátou kapilár. Systémově lze u PM a DM detekovat různé autoprotilátky. Autoprotilátky proti histidyl-tRNA syntetáze, anti-Jo1, korelují s aktivitou onemocnění a intersticiálním plicním postižením, autoprotilátky proti malým signál rozpoznávajícím peptidům, anti-SRP, s těžkou nekrotizující myositidou a kardiálním postižením. Z druhé strany autoprotilátky anti-Mi2, namířené proti jaderné helikáze, jsou spojeny s mírnějším klinickým průběhem dermatomyositidy (203). Recentně byly identifikovány autoprotilátky anti155/140 (jejich substrát zatím není znám), které se vyskytují u dermatomyositidy spojené s nádorovým onemocněním (204).

V léčbě PM a DM se uplatňují kortikosteroidy, imunosupresivní léčiva i nové biologické léky. Na začátku onemocnění jsou indikovány vysoké dávky kortikosteroidů (dávka 0.75-1mg/kg/den), které se snižují po měsíci a v léčbě zůstávají cca 1 rok nebo déle. V imunosupresi se u PM i DM používá azathioprin, cyklosporin A, takrolimus, methotrexát a cyklofosfamid (202). V poslední době byl potvrzen efekt intravenózních imunoglobulinů u nemocných s DM (202, 205) a probíhají studie s rituximabem a anti-TNF preparáty.

2. Hypotézy

a) Genetická predispozice má důležitou roli v rozvoji SLE. Geny hlavního histokompatibilního systému, hlavní rizikové SLE oblasti, vykazují výraznou populační variabilitu. Imunogenetický background v oblasti HLA II. třídy je základní genetickou charakteristikou SLE. Mikrosatelitový polymorfismus v transmembránové části genu MIC-A určuje schopnosti této molekuly reagovat na infekční podněty, například CMV infekci. Abnormální imunitní odpověď na toto infekční agens je spojována s patogenezí SLE. Některé alely MIC-A mohou tedy být genetickým rizikem rozvojem onemocnění. Gen MIC-A je lokalizován v blízkosti HLA I. a II. třídy, mezi jednotlivými alelami mohou vznikat genové vazby a vytvářet rizikový SLE haplotyp.

b) Genetická predispozice a stres jsou podstatnými faktory v rozvoji PsA. MIC-A peptid je exprimován pod vlivem buněčného stresu a rozpoznáván NKG2D receptorem NK buněk a může být jednou ze součástí začátku abnormální imunitní reakce a rozvoje artritidy u psoriázy. Alely mikrosatelitového polymorfismu exonu 5 transmembránové části MIC-A molekuly jsou ve vazebné nerovnováze s alelami její extracelulární části, rozpoznávané NK buňkami. Gen MIC-A je spolu s HLA I. třídy součástí rizikové oblasti pro rozvoj PV a PsA, PSORS 1. Mikrosatelitový polymorfismus v transmembránové části genu MIC-A může být rizikovou oblastí pro rozvoj PsA. Jednotlivé alely MIC-A a HLA I. třídy se mohou navzájem potencovat v riziku anebo být ve vazebné nerovnováze.

c) Zvýšené hladiny prolaktinu v séru byly prokázány u nemocných SLE, PM a SSc, a RA. Prolaktin působí jako prozánětlivý cytokin a imunomodulátor a je produkován v periferních tkáních a imunitních buňkách. Lokální množství prolaktinu v synoviální tekutině u RA se může podílet na přetrvávání a progresi choroby. Abnormální množství prolaktinu může ovlivnit i rovnováhu v regulacích zrání imunitních buněk a časných fázích imunitních reakcí a vést k rozvoji autoimunitního fenotypu. Exprese prolaktinu v lymfocytech a mimohypofyzárních tkáních je regulována alternativním promotorem PRL genu, který obsahuje v oblasti GATA sekvence funkční jednonukleotidový polymorfismus, -1149 G/T SNP, jehož G alela vede k vyšší produkci prolaktinu. G alela -1149 G/T SNP PRL genu může být jedním z rizik pro rozvoj autoimunity. Vzhledem k blízkosti PRL genu ke genům MHC komplexu může být i součástí rizikových haplotypů.

3. Cíle práce

- a) Zjistit imunogenetický background, polymorfismy v HLA II. a I. třídy, u systémového lupusu erythematosu a psoriatické artritidy v české populaci.

- b) Detekovat alely mikrosatelitového polymorfismu v transmembránové části genu MIC-A u nemocných se systémovým lupusem erythematosem a psoriatickou artritidou a zjistit jejich podíl na vzniku onemocnění.

- c) Stanovit hladinu prolaktinu v séru a synoviální tekutině u nemocných s revmatoidní artritidou a zjistit, zda ovlivňuje klinický a laboratorní průběh onemocnění.

- d) Detekovat funkční jednonukleotidový polymorfismus -1149 G/T genu pro prolaktin u systémového lupusu erythematosu, revmatoidní artritidy, psoriatické artritidy, systémové sklerodermie a zánětlivých myopatií chorob a zjistit, zda se podílí na rozvoji a fenotypu onemocnění.

4. Metodika

4.1 Soubor pacientů

Pro genetické analýzy byly použity soubory nemocných se SLE (n=156), RA (n=173), PsA (n=100), SSc (n=75), PM (n=47) a DM (n=68) a 123 zdravých jedinců. V rámci stanovení hladin prolaktinu v séru a synoviální tekutině bylo vyšetřeno 29 nemocných s RA a jako kontrolní skupina, 26 nemocných s osteoartrózou (OA). Nemocní i jedinci kontrolní skupiny byli testováni v rámci probíhajících výzkumných projektů na Revmatologickém ústavu. Všichni jedinci byli o studiích informováni a podepsali informovaný souhlas.

4.2 Genetické analýzy

K detekci HLA I. a II. třídy byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) se sekvenčně specifickými primery (Olerup SSPTM, Genovision, Oslo, Norway). Příprava a průběh PCR reakce proběhla dle doporučení výrobce. PCR produkty byly zviditelněny na 2% agarózovém gelu.

Pro detekci mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A genu, exonu 5, byla použita metoda PCR s následnou analýzou fragmentů publikovaná Novotou a kol. (206). PCR produkty byly analyzovány elektroforetickou separací pomocí Fragment analyzer v 1.02 software (Amersham Biosciences, Vienna, Austria). Podle velikosti fragmentů (123bp, 126bp, 127bp, 129 bp a 139 bp) byly identifikovány alely MIC-A4, A5, A5.1, A6 a A9.

Pro detekci -1149 G/T SNP mimohypofyzárního promotoru byl použit vlastní protokol obsahující PCR – RFLP metodu: 137 bp úsek mimohypofyzárního promotoru PRL genu byl amplifikován pomocí nově designovaných primerů (forward: 5'-GCAGGTCAAGATAACCTGGA-3', revers: 5'-CATCTCAGAGTTGAATTTATTCCTT-3'). V reverzním primeru bylo vytvořeno umělé místo pro restrikci ApoI endonukleázou, která byla použita pro RFLP. Toto umělé místo bylo interní kontrolou, zda proběhla restrikční reakce v pořádku. Restrikční fragmenty byly odečteny ze 4% agarózového gelu, viz Obrázek 3.

Obrázek 3. Elektroforéza s detekcí genotypů -1149 G/T SNP mimohypofyzárního promotoru PRL genu

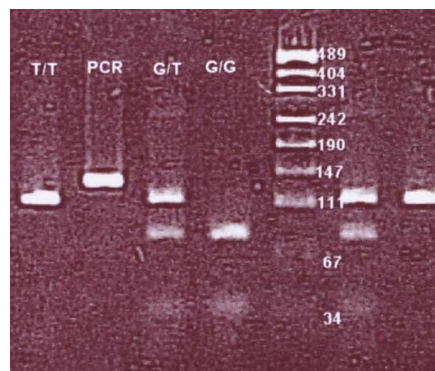
Podle velikosti fragmentů lze identifikovat genotypy:

TT (120 bp + 17 bp)

GT (120 bp + 85 bp + 35 bp + 17 bp)

GG (85 bp + 35 bp + 17 bp)

PCR produkt jako kontrolní marker (120bp)



4.3 Stanovení hladiny prolaktinu v séru a synoviální tekutině

Sérum a synoviální tekutina od nemocných s RA a OA byly odebrány za stanovených podmínek: odběr synoviální tekutiny byl proveden během terapeutické arthrocentézy, odběr krve následoval 1.- 5. den v dopoledních hodinách, po minimálně 20 minutovém odpočinku. Koncentrace prolaktinu v séru a synoviální tekutině byla stanovena pomocí radioimunometrické metody, komerčním kitem (IRMA, Immunotech, Praha).

4.4 Statistické analýzy

U genetických studií byly rozdíly v distribuci alel a genotypů analyzovány pomocí χ^2 testu nebo Fisherova exaktního testu. K statistickým analýzám byl použit Epi Info software (verze 3.3 Oct 2004, Atlanta, Georgia). Statistická signifikance byla stanovena při P hodnotě nižší než 0.05 s Bonferroniho korekcí pro mnohočetná porovnání. Stanovení OR hodnoty bylo provedeno pomocí Wolfovy metody s Haldanovou korekcí.

Pro statistickou analýzu hladin PRL v séru a synoviální tekutině byl použit statistický program SPSS, verze 17. Protože hodnoty byly v parametrickém uspořádání, byly testovány pomocí studentova t-testu. Pro korelační analýzu byl použit Pearsonův korelační koeficient. Jako statisticky signifikantní byla hodnocena hodnota P nižší než 0.05.

5. Výsledky

5.1 Imunogenetická analýza systémového lupusu erythematosu

Kompletní imunogenetická analýza je v příloze 9.1.1: HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population, Rheumatol Int, in print.

Cíle studie:

Zjistit distribuci alel genů HLA II. třídy (HLA-DRB1 a HLA-DQB1) u nemocných SLE a zjistit, zda se některé podílí na vzniku onemocnění anebo laboratorní či klinické manifestaci SLE. Dále detekovat alely mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A genu a zjistit, zda některá z nich má úlohu v rozvoji SLE. Zjistit, zda existují genové vazby mezi HLA II. třídy a MIC-A alelami.

Výsledky:

Distribuci alel HLA-DRB1, HLA-DQB1 a MIC-A jsme testovali u 123 nemocných se SLE a 99 zdravých jedinců. Zjistili jsme statistický významný rozdíl v rozložení alel u obou skupin (HLA-DRB1 $p < 0.001$ a HLA-DQB1 $p < 0.005$). U skupiny SLE je frekvence alel HLA-DRB1*03, *08 a *15 vyšší než u kontrolní skupiny (22.8% versus 10.6%, 6.1% versus 2.0% a 22.0% versus 14.7%), avšak pouze alela HLA-DRB1*03 si udržela statistickou signifikanci, $p_c = 0.008$; OR 2.5 CI95% (1.44-4.27). V případě HLA-DQB1 byla frekvence vyšší u SLE skupiny v porovnání s kontrolní u alel HLA-DQB1*0201, *0402 a *0602 (22.8% versus 10.6%, 5.3% versus 1.5% a 21.1% versus 13.1%), i zde si udržela pouze alela HLA-DQB1*0201 statistickou signifikanci po Bonferroniho korekci, $p_c = 0.01$; OR 2.5 CI95% (1.44-4.34). Zjistili jsme nižší frekvenci HLA-DRB1*11 a HLA-DQB1*0301 u nemocných SLE v porovnání s kontrolní skupinou, avšak bez statistické signifikance po Bonferroniho korekci.

V dalších testech jsme potvrdili vazebnou nerovnováhu mezi HLA-DRB1*03-DQB1*0201, HLA-DRB1*08-DQB1*0402, HLA-DRB1*15-DQB1*0602 a HLA-DRB1*11-DQB1*0301 ($p = 10^{-5}$; $p = 0.03$; $p = 10^{-9}$; $p = 10^{-6}$). V testované skupině se haplotyp HLA-DRB1 *03-DQB1*0201 vyskytuje u 44.7% SLE v porovnání s 15.2% u zdravých, $p_c < 0.001$; OR 4.54 (2.36-9.09).

Z alel mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A jsme detekovali: MIC-A4, A5, A5.1, A6 a A9. Distribuce alel se odlišuje signifikantně u obou skupin, $p < 0.01$. Zjistili jsme signifikantně vyšší frekvenci MIC-A5.1 u nemocných SLE (55.7%) v porovnání se zdravými (39.9%), $p_c = 0.005$; OR 1.88 CI95% (1.29-2.77). Z druhé

strany, alelu MIC-A6 jsme detekovali pouze u 10.6% SLE nemocných, ale u 19.7% zdravých, $p_c = 0.035$; OR 0.48 CI95% (0.28-0.82).

Nezjistili jsme vazebnou nerovnováhu mezi alelami HLA-DRB1 nebo HLA-DQB1 a alelami testovaného polymorfismu MIC-A. Kombinace MIC-A5.1 a HLA-DRB1*03 je však signifikantně častější u SLE (16.7%) než u zdravých jedinců (2.0%), $p_c < 0.000001$; OR 9.71 CI95% (3.40-27.70). Na druhou stranu absence MIC-A6 spolu s absencí HLA-DRB1*11 je signifikantně častější u skupiny SLE (84.6% versus 70.2%), $p_c = 0.0003$; OR 2.32 CI95% (1.47-3.70).

Závěr:

V české populaci je u nemocných SLE signifikantně vyšší frekvence alel HLA-DRB1*03 a HLA-DQB1*0201 v porovnání se zdravými jedinci. Haplotyp HLA-DRB1*03-DQB1*0201 je rizikovým pro rozvoj SLE. Alela MIC-A5.1 je rizikovou, kdežto alela MIC-A6 protektivní pro rozvoj SLE. Přítomnost MIC-A5.1 spolu s HLA-DRB1*03 je vysoce riziková pro rozvoj SLE, kdežto v případě alely MIC-A6 se zvyšuje riziko SLE v její nepřítomnosti spolu s alelou HLA-DRB1*11.

5.2 Imunogenetická analýza psoriatické artritidy

Kompletní imunogenetická analýza je v příloze 9.1.2: HLA-Cw*06 class I region rather than MICA is associated with psoriatic arthritis in Czech population, Rheumatol Int, 2009.

Cíle studie:

Zjistit distribuci alel genů HLA I. třídy (HLA-Cw) u nemocných s PsA a zjistit, zda se některé podílí na vzniku onemocnění anebo klinické a radiologické manifestaci PsA. Detekovat alely mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A a zjistit, zda některá z nich přispívá k rozvoji PsA. Zjistit, zda existují genové vazby mezi HLA I. třídy a MIC-A alelami.

Výsledky:

Distribuci alel HLA-Cw a MIC-A jsme testovali u 100 nemocných s PsA a 94 zdravých jedinců.

Alela HLA-Cw*06 se objevuje častěji u nemocných s PsA v porovnání se zdravými jedinci, 36.0% versus 15.9%, $p_c < 0.05$; OR 2.56 CI95% (1.33-4.76). Tato asociace je dána primárně zvýšenou frekvencí alely HLA-Cw*0602 u nemocných s PsA, kteří mají psoriázu I. typu (33.4%), v porovnání se zdravými jedinci (10.0%), $p_c < 0.05$; OR 3.33 CI95% (1.44-7.69). U nemocných s PsA s psoriázou II. typu nebyla asociace s alelou HLA-Cw*06 prokázána.

Z alel mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části genu MIC-A jsme detekovali 5 alel: MIC-A4, A5, A5.1, A6 a A9. Zjistili jsme vyšší frekvenci MIC-A9 u nemocných s PsA (46.0%), zvláště s psoriázou II. typu (58.6%) v porovnání se zdravými jedinci (38.0%), $p_{(nekorigované)} = 0.05$ a $p_{(nekorigované)} = 0.017$. Avšak po korekcích hodnoty p neudržely statistickou významnost ($p_c = 0.250$ a $p_c = 0.085$).

Závěr:

HLA-Cw*0602 je spojena s PsA, která se objevuje u nemocných s psoriázou I. typu. MIC-A9 alela se vyskytuje častěji u nemocných s PsA, kteří trpí psoriázou II. typu, avšak k potvrzení této asociace je nutné rozšíření studie.

5.3 Analýza hladin prolaktinu v séru a synoviální tekutině u nemocných s revmatoidní artritidou

Kompletní analýza hladin prolaktinu v séru a synoviální tekutině u nemocných s RA je v příloze 9.1.3: Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage, Clin Exp Rheumatol, 2010.

Cíle studie:

Zjistit, zda hladina prolaktinu v séru a synoviální tekutině reflektuje systémovou zánětlivou aktivitu a rentgenovou progresi u nemocných s RA.

Výsledky:

Hladina prolaktinu v séru a v synoviální tekutině byla zjišťována u 29 nemocných s RA, jako kontrolní skupinu jsme sledovali 26 nemocných s OA kolen.

U nemocných s RA jsme detekovali vyšší hladiny prolaktinu v séru (299.55 ± 27.28 mIU/l) i v synoviální tekutině (338.85 ± 33.49 mIU/l) v porovnání s nemocnými s OA, 230.59 ± 16.61 a 245.97 ± 21.88 mIU/l, obě $p < 0.05$. Hladina prolaktinu v séru koreluje pozitivně s hladinou prolaktinu v synoviální tekutině u obou onemocnění, RA ($r=0.546$, $p=0.002$) i OA ($r=0.528$, $p=0.006$).

Hladina PRL v synoviální tekutině byla signifikantně vyšší u RA nemocných s vysoce aktivní chorobou ($DAS-28 > 5.1$) v porovnání s nemocnými se střední a mírnou aktivitou (433.0 ± 62.5 mIU/l versus 318.3 ± 42.6 mIU/l). Obdobně hodnota DAS-28, určující aktivitu onemocnění, signifikantně pozitivně koreluje s hladinou prolaktinu v synoviální tekutině, $r=0.485$, $p=0.010$. Sérové hladiny prolaktinu korelují signifikantně s tíží rentgenového postižení, $r=0.484$, $p=0.014$), s hodnotou DAS-28 však pouze nesignifikantně, ($r=0.345$, $p=0.078$). Nezjistili jsme žádnou korelaci mezi hladinou PRL v séru ani v synoviální tekutině s výskytem autoprotilátek RF a ACPA.

Závěr:

Prokázali jsme vztah mezi hladinou prolaktinu v séru a synoviální tekutině s aktivitou a rentgenologickým postižením u revmatoidní artritidy.

5.4 Genetická analýza funkčního polymorfismu mimohypofyzárního promotoru PRL genu

V rámci testování této hypotézy jsme sledovali rozložení alel a genotypů -1149G/T SNP mimohypofyzárního promotoru PRL genu (dále jen -1149 G/T SNP PRL genu) u SLE, RA (příloha 9.1.4), PsA (příloha 9.1.5), SSc a zánětlivých myopatií (příloha 9.1.6).

Cíle:

Zjistit, zda funkční polymorfismus -1149 G/T SNP PRL genu přispívá k vnímavosti a patogenezi systémových revmatických onemocnění.

Výsledky:

Polymorfismus -1149 G/T SNP PRL genu byl sledován u nemocných se SLE (n=156), RA (n=173), PsA (n= 83), SSc (n=75), PM (n=47) a DM (n=68) a 123 zdravých jedinců.

GT genotyp se vyskytuje signifikantně častěji u nemocných s RA než u zdravých jedinců (56.10% versus 41.50%), $p_c = 0.039$; OR 1.82 CI95% (1.14-2.94). U dalších onemocnění se rozložení alel a genotypů -1149 G/T SNP PRL genu se nelišilo mezi nemocnými všech testovaných skupin a zdravou populací.

V případě SLE, se G alela vyskytuje u 63% nemocných s kloubním postižením na rozdíl od nemocných bez artritidy (40%), $p_c = 0.0086$; OR 2.56 CI95%(1.51-4.33). GG genotyp je signifikantně častější u nemocných se začátkem choroby mezi 21. - 40. rokem (44.8%) v porovnání s těmi, kdo onemocní dříve (před 20. rokem, 15.8%) anebo později (po 40. roce věku, 24.0%), $p_c = 0.023$; OR 2.94 CI95% (1.43-5.96). Neprokázali jsme žádnou asociaci mezi alelami nebo genotypy -1149 G/T SNP PRL genu a autoprotiilátkovou aktivitou (anti-dsDNA, Sm, anti-RNP, anti-SSA a anti-SSB).

U SSc jsme, obdobně jako u SLE, prokázali rozdíly v rozložení genotypů v závislosti na začátku onemocnění. Genotyp TT se vyskytuje signifikantně méně často u nemocných se začátkem choroby po 45. roce (4.1%) na rozdíl od nemocných se začátkem choroby v mladším věku (před 45. rokem, 25%), $p_c = 0.02$; OR 0.13 CI95% (0.02-0.69).

U nemocných s PsA a zánětlivými myopatiemi není rozdíl v rozložení alel a genotypů v závislosti na jejich klinické, rentgenové nebo laboratorní charakteristice.

Závěr:

Genotyp GT se vyskytuje častěji u nemocných s RA. Alela G a genotyp GG -1149 G/T SNP mimohypofyzárního promotoru PRL genu jsou spojeny s kloubním postižením u SLE a začátkem onemocnění ve věkové skupině 21-40. Na druhou stranu, TT genotyp se

objevuje signifikantně méně často u nemocných se SSc s manifestací choroby po 45. roku života.

6. Diskuze

Etiopatogeneze systémových revmatických onemocnění je komplexní, podílí se na ní genetická predispozice a působení faktorů, jako jsou hladiny pohlavních hormonů, infekce a stres. Samotný rozvoj onemocnění je několikastupňový proces a porucha regulace v imunitní odpovědi může nastat v kterémkoliv kroku. U těchto onemocnění se některé imunitní patologické mechanismy prolínají, některé jsou typické pro jednotlivá onemocnění. Tato práce je první imunogenetickou studií u dvou závažných revmatických chorob, SLE a PsA v české populaci. Sleduje také roli prolaktinu, cytokinu s úlohou v imunoregulaci, u revmatických onemocnění – SLE, RA, PsA, SSc a zánětlivých myopatií.

6.1 Genetická predispozice systémového lupusu erythematosu

Genetická predispozice je nezbytná pro rozvoj SLE, což potvrzují výsledky studií monozygotních dvojčat trpících onemocněním, u kterých byla prokázána konkordance 24-69% na rozdíl od konkordance 2-9% u dvojčat dizygotních (207). SLE je multifaktoriální onemocnění (viz Tabulka 2) a v recentních celogenomových screenincích bylo identifikováno několik SLE - rizikových oblastí: 1q23 (208), 1g25 (6), 1q41 (209), 2q34-35 (210), 3p14 (6), 4p16 (211), 5p14-15 (207, 212), 6p21-22 (6, 213), 10q22 (210), 11p13 (214), 16q11-12 (208, 213), 17p13 (215), 18q21 (216) a 19p13 (216). Některé lokality se liší napříč populacemi, nicméně oblast 6p21 obsahující soubor genů hlavního histokompatibilního systému se vyskytuje v GWAS opakovaně a je oblastí s nejsilnější asociací k SLE (review 207).

V první imunogenetické studii v české populaci u SLE jsme potvrdili, že rozložení alel HLA II. třídy – HLA-DRB1 a HLA-DQB1 se signifikantně liší mezi nemocnými a zdravými jedinci. Zjistili jsme silnou asociaci mezi HLA-DRB1*03 alelou ($p_c = 0.008$, OR 2.5) a HLA-DRB1*03-DQB1*0201 haplotypem ($p < 0.0001$, OR 4.54) u nemocných se SLE v porovnání se zdravými jedinci. V četných publikovaných pracích z různých populací byly jako SLE - rizikové haplotypy identifikovány: HLA-DRB1*03-DQB1*0201, HLA-DRB1*15-DQB1*0602 a DRB1*08-DQB1*0402 (60-65, 217-220). V naší skupině SLE nemocných jsme detekovali rovněž vyšší frekvence alel HLA-DRB1*15 a HLA-DRB1*08 a haplotypů HLA-DRB1*15-DQB1*0602 a HLA-DRB1*08-DQB1*0402, nicméně po korekcích pro mnohočetná porovnání tato pozorování ztratila statistickou významnost. Tento nález není ale v kavkazské – evropské populaci ojedinělý. Fernando M et al. v robustní britské studii u 314 SLE rodin prokázala rovněž asociaci s HLA-DRB1*03, kdežto frekvence

alel HLA-DRB1*15 a DRB1*08 nevykazovaly rozdíly mezi nemocnými a zdravými (61). HLA-DRB1*15 nebyla prokázána jako riziková ani u španělské populace (220). Obdobný výsledek přinesla norská práce se 164 SLE nemocnými a 254 zdravými jedinci, kde byla alela HLA-DRB1*15 nalezena u 22% SLE a 17% zdravých, ($p=NS$) a HLA-DRB1*03 u 25% SLE v porovnání s 11% zdravými jedinci ($p_c < 10^{-6}$) (62), což jsou výsledky srovnatelné s naším pozorováním. Asociace HLA-DRB1*15 a SLE se tedy ukazuje v populaci afroamerické, asijské (65, 217) i kavkazské – ale jen v některých evropských studiích (64, 217, 218). Na druhou stranu, Steinsson et al. v asociační studii provedené na Islandu neprokázali vyšší výskyt ani HLA-DRB1*03 ani HLA-DRB1*15 (221). Obdobně studie ze sousedního Polska neprokázala ani jeden z rizikových haplotypů anebo alel, avšak u 24 SLE pacientů detekovali vyšší frekvenci alely HLA-DRB1*07 (222). Výsledky této práce jsou zajímavé, nicméně potřebují další potvrzení na větším počtu pacientů. Alela HLA-DRB1*07 je v několika jiných studiích identifikována jako protektivní (61, 63). V naší práci je frekvence alely HLA-DRB1*07 obdobná u zdravých i SLE nemocných (13.0% a 14.7%), na druhou stranu jsme detekovali nižší frekvenci alely HLA-DRB1*11 a haplotypu HLA-DRB1*11-DQB1*0301 u nemocných SLE v porovnání se zdravými jedinci, 6.1% versus 13.6% a 12.2% versus 24.2%, nicméně tyto nálezy nejsou statisticky významné po korekcích. Protektivní úloha HLA-DRB1*11 nebyla prozatím prokázána a nálezy je nutné potvrdit na větším počtu testovaných jedinců. Některé SLE asociační studie prokazují souvislost HLA-DRB1*03 s anti-dsDNA (217), anti-Sm a anti-SSB (63) autoprotilátkami a HLA-DRB1*15 s anti-SSA autoprotilátkami (63, 217), kterou jsme nepotvrdili. Na tento nálezy se je třeba ale podívat kriticky –jistě by bylo třeba rozšířit skupinu nemocných i zdravých testovaných jedinců. Naše studie prokázala, že frekvence alel v oblasti HLA II. třídy (HLA-DRB1 a DQB1) je obdobná v české a dalších evropských populacích – tento nálezy je poučný pro další genetické analýzy a léčebné strategie. Odlišné imunogenetické pozadí choroby může vést k zapojení jiných imunologických mechanismů a odlišné odpovědi na farmakologickou léčbu.

Frekvence alel mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části genu MIC-A je odlišná u SLE nemocných a zdravých jedinců. Alela MIC-A5.1 se vyskytuje signifikantně častěji u SLE nemocných, což je v souladu se asociačními studiemi, které provedl Gambelughe et al. u 48 italských (220) a Sanchez et al. u 333 španělských (219) SLE nemocných. V naší práci přítomnost MIC-A5.1 alely dramaticky zvyšuje riziko vzniku SLE u HLA-DRB1*03 pozitivních jedinců: OR 1.88 pro MIC-A5.1, OR 2.5 pro HLA-DRB1*03 a

OR 9.71 pro kombinaci MIC-A5.1- HLA-DRB1*03. Společný podíl na vyšším riziku rozvoje SLE přitom není dán vazebnou nerovnováhou mezi oběma alelami, kterou jsme nepotvrdili obdobně jako předchozí práce (219, 220). Efekt aditivního efektu MIC-A5.1 u HLA-DRB1*03-DQB1*0201 pozitivní jedinců byl prokázán i u jiné autoimunity, a sice céliakie se subklinickým průběhem (223). Alela MIC-A5.1 se liší od ostatních MIC-A alel tím, že obsahuje inserci mezi G nukleotidu mezi druhou a třetí repeticí trinukleotidového mikrosatelitového polymorfismu [GCT], což vytváří předčasný stop kodon a výsledný protein této alely má zkrácenou transmembránovou část a zcela mu chybí cytoplasmatická část (82). Molekuly MIC-A jsou exprimovány pod vlivem buněčného stresu anebo infekce a jsou rozpoznávány NKG2D receptorem NK buněk, receptory $\gamma\delta$ T lymfocytů a CD8+ T lymfocytů (75, 76). Infekce CMV má několik možností, aby unikla imunitnímu dozoru a jedním z nich je ovlivnění exprese MIC-A. Za normálních okolností buňka infikovaná CMV exprimuje stresové molekuly, včetně MIC-A, a je tak označena pro cytotoxické reakce. CMV však může využít vlastní ochranné možnosti - nastartuje produkci svého proteinu UL142, který intracelulárně degraduje molekuly MIC-A. Místem proteolýzy je úsek v transmembránové části, který chybí zkrácené verzi molekuly MIC-A kódované alelou MIC-A5.1 a exprese této molekuly tedy není při CMV infekci snížena (224). V patogenezi SLE může následná cytotoxická reakce vést ke zvýšené náloži autoantigenů. U HLA-DRB1*03 pozitivních jedinců potom může dojít ke snazšímu zpracování autoantigenů a jejich prezentaci dalším imunitním buňkám a rozvoji autoimunity. V naší práci jsme bohužel nezjistili asociaci mezi MIC-A5.1 a autoprotilátkovou aktivitou a další dvě práce tuto skutečnost nepopisují. Rozsáhlejší bádání je nezbytné k pochopení vzájemných vztahů mezi MIC-A5.1 a SLE.

Novým, doposud nepublikovaným nálezem, je protektivní vliv alely MIC-A6 v rozvoji SLE, který je potencován současnou absencí alely HLA-DRB1*11. Alela MIC-A6 je ve vazbě s extracelulární alelou *009 (83), která má nízkou afinitu k NKG2D receptoru (79). Protekce MIC-A6 tak může být vysvětlena buďto preferencí jiných alel (MIC-A5.1) anebo preferencí alel, které vykazují vyšší vnímavost poškozených či infikovaných buněk k NKG2D receptoru, vystupňované cytotoxicitě a zvýšené náloži autoantigenů. Na druhou stranu, v naší práci jsme nepotvrdili dříve publikovanou nižší frekvenci alely MIC-A9 u SLE (220). Tato diskrepance může být dána odlišnou skladbou SLE nemocných – v naší práci je alela MIC-A9 častější u nemocných s kožním postižením (16.6% versus 7.7%), tento nález je však statisticky nevýznamný.

Lze shrnout, že práce týkající se imunogenetické predispozice SLE prokázala silnou asociaci mezi onemocněním a haplotypem HLA-DRB1*03-DQB1*0201. U HLA-DRB1*03 pozitivních jedinců je navíc riziko výrazně zvýšeno přítomností alely MIC-A5.1. Alela MIC-A6 mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části molekuly MIC-A je nově identifikovaným protektivním markerem SLE.

6.2 Genetická predispozice psoriatické artritidy

PsA se vyskytuje u 7–42 % pacientů s PV (192). V genetice PV bylo prozatím identifikováno dvanáct rizikových lokalizací (PSORS 1-12), avšak pouze jedna z nich, PSORS 1, je spojena s rozvojem PsA (36, 225 - 227). Samostatnou oblastí asociovanou s PsA je PSORAS 1 (36), která obsahuje gen NOD2/CARD15, kódující intracelulární receptor fagocytujících buněk zasahující do imunitní odpovědi na bakteriální infekci. Na rozdíl od PV nejsou u PsA prozatím data sledující výskyt choroby u dvojčat. Precizní práce Molla a Wrighta však popisuje až 55x vyšší riziko vzniku artritidy u prvostupňových příbuzných v porovnání se zdravou populací a podporuje tak vysoký podíl genetických faktorů v rozvoji PsA (191). Riziková oblast PSORS 1 obsahuje geny HLA, MIC-A, TNF- α a další.

Imunogenetická analýza PsA byla v české populaci provedena poprvé. Zjistili jsme, že výskyt alel HLA I. třídy je rozdílný mezi nemocnými s PsA a zdravou českou populací. Tento rozdíl je dán zvýšenou frekvencí HLA-Cw*06 alel (36.0%) u pacientů s PsA při porovnání se zdravými osobami (15.9%, $p_c < 0.05$, OR 2.56). Frekvence alel HLA-Cw v české populaci jsou obdobné jako u sousedních evropských národů (226). Nejčastější alelou HLA-Cw*06 je Cw*0602, která je signifikantně spojena s PsA u nemocných s psoriázou I. typu. HLA-Cw*0602 alela se vyskytuje v průměru u 50% nemocných s kožní formou psoriázy ve studiích v různých populacích a je spojena se závažnějším průběhem onemocnění (57, 227, 228). Naopak, u PsA bývá frekvence HLA-Cw*06 alel a potažmo HLA-Cw*0602 zpravidla nižší - pohybuje se v rozmezí 17% - 40% (228-231). V sousedním Polsku byla alela HLA-Cw*06 identifikována u 58% PsA nemocných, chybí však údaj o rozlišení jednotlivých alel (226). Na druhou stranu, Grubić et al. v chorvatské populaci neprokázal asociaci mezi HLA-Cw*06 a PsA (232). V naší práci jsme nezjistili rozdíl v zastoupení HLA-Cw*06 alel u obou typů periferní artritidy, erozivní a neerozivní. HLA-Cw*0602 tak ovlivňuje spíše vznik artritidy než její další průběh. Naše pozorování podporuje a doplňuje zjištění v již publikované práci, kde nebyl shledán rozdíl v distribuci alel HLA-Cw*06 mezi jednotlivými klinickými typy PsA, a to periferní artritidou a spondylartritidou (233).

V případě rozložení frekvencí alel mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A genu jsme nezjistili signifikantní rozdíly mezi nemocnými PsA a zdravými jedinci, nezjistili jsme ani vazebnou nerovnováhu mezi alelami HLA-Cw a MIC-A. Na druhou stranu, alela MIC-A9 se vyskytovala častěji u nemocných s PsA II. typu v porovnání s kontrolami (58.6% versus 30.8%), tento nálezn však po korekci ztratil statistickou významnost ($p_c = 0.085$). Alela MIC-A9 byla popsána jako riziková ve dvou studiích – Gonzalez et al. zjistil vyšší frekvenci MIC-A9 u 65 nemocných s polyartikulárním postižením u PsA (228) a výsledky potvrdil i u jiné populace, u 52 Židovských PsA nemocných (231). Na druhou stranu, v chorvatské populaci u 58 nemocných byla zjištěna vyšší frekvence MIC-A4, ale ne MIC-A9 (232). Rozdíly v těchto studiích a naší práci mohou být dány odlišnou populační distribucí HLA alel, neboť MIC-A9 byla prokázána ve vazebné nerovnováze HLA-B*5701 a B*3801 (231). Dalším možným problémem jsou relativně malé počty testovaných jedinců a nejednotná nomenklatura v klinickém popisu PsA.

Lze shrnout, že imunogenetická analýza provedená u nemocných s psoriatickou artritidou potvrdila roli HLA-Cw*0602 v rozvoji artritidy u psoriázy, přičemž závisí na věku, kdy se kožní projevy onemocnění objeví. V naší populaci není rozdíl mezi alelami mikrosatelitového polymorfismu v transmembránové části MIC-A u PsA ve srovnání se zdravými kontrolami.

6.3 Prolaktin a systémová revmatická onemocnění

Hormonální aspekty patří k důležitým faktorům vzniku a progresu systémových revmatických onemocnění. Tyto choroby se vesměs vyskytují častěji u žen, zvláště v reprodukčním věku. Fyziologické změny v hormonálních poměrech žen během těhotenství mohou korelovat s aktivitou chorob a učí nás o úloze pohlavních hormonů v jejich patogenezi. Do rovnováhy imunitní odpovědi během těhotenství zasahuje prolaktin, a vysoká syntéza estrogenů, progesteronu a glukokortikoidů. Pomyslná rovnováha je převážena na stranu glukokortikoidů - makrofágy produkují méně IL-12 a TNF- α a imunitní odpověď se kloní směrem k Th2 (234, 235). Dochází proto ke zhoršení chorob spojených s autoproti látkami (jako je SLE) a k vylepšení onemocnění spojených s převahou Th1 imunitní odpovědi, jako je RA anebo RS. Situace se změní po porodu, hyperprolaktinémie přetrvává, avšak množství kortizolu rychle klesá (235) a převáží imunostimulační efekt prolaktinu (103-107, 109, 110). Autoimunitní onemocnění, jako je RA a RS, ale i SLE mohou v tomto období buďto relabovat nebo nově propuknout. Prolaktin je peptid několika

tváří – funguje nejen jako hormon s funkcí během těhotenství a laktace, ale také působí jako účinný imunomodulátor. Efekt prolaktinu na imunitní systém se projeví zejména za stresu (psychického i fyzického), kdy jeho hladina vyvažuje tlumivý účinek glukokortikoidů (236, 237). U autoimunitních onemocnění může jeho zvýšená hladina (z různých důvodů, včetně genetické predispozice) být jedním z faktorů podporující patologickou imunitní reakci.

V naší práci jsme sledovali, zda hladina prolaktinu v séru a synoviální tekutině koreluje se zánětlivou aktivitou RA. Tato studie navazovala na předchozí práce profesora Dostála, které potvrdily vyšší hladiny prolaktinu v séru nemocných se SLE a prokázaly je i u nemocných s RA (238, 239). Ptali jsme se proto, zda hladina prolaktinu v séru koreluje se zánětlivou aktivitou choroby, zda je prolaktin v synoviální tekutině zánětlivě změněného kloubu a zda existuje vztah mezi progresí onemocnění a prolaktinem. V nové studii jsme sledovali nemocné s RA (celkem 29) a nemocné OA kolene (celkem 26), což je nezáánětlivé kloubní onemocnění, a proto tito jedinci sloužili jako kontrolní skupina. Obdobně jako Moszkorzová et al. (238) jsme zjistili vyšší hladinu prolaktinu v séru RA nemocných. U revmatoidní artritidy se předchozí práce stran sérového prolaktinu lišily, některé prokazovaly hladiny PRL v séru vyšší (125, 240), jiné shodnou (241, 242) anebo i nižší (243) v porovnání se zdravými jedinci. Tyto rozdíly mohou být dány různou aktivitou choroby - při aktivním onemocnění jsou u RA zvýšeny prozánětlivé cytokiny, jako je IL-6 a IL-1 β , které stimulují uvolnění prolaktinu z hypofýzy. Další příčinou diskrepance v detekci sérových PRL hladin může být rozdílná charakteristika pacientů v jednotlivých pracích. V naší studii jsme zjistili signifikantní pozitivní korelaci mezi sérovou hladinou prolaktinu a tíží rentgenologického postižení, hodnocenou podle Larsenova skóre. Mateo et al. obdobně zjistila vyšší hladiny u nemocných RA s delším průběhem nemoci a horším skóre ve funkčních testech (125).

V další části práce jsme detekovali hladiny prolaktinu v synoviální tekutině. Hladiny prolaktinu v synoviální tekutině jsou vyšší než ty sérové a korelují s hladinami sérového prolaktinu u RA i OA. Prolaktin se může do synoviální tekutiny přesunout ze systémového oběhu (244) anebo může být syntetizován lokálně imunitními buňkami, zvláště T lymfocyty panu, pro což svědčí i naše výsledky. Prolaktin v synoviální tekutině byl signifikantně vyšší u nemocných RA a jeho hladiny pozitivně korelovaly s celkovou aktivitou choroby charakterizovanou skórem DAS-28. Prolaktin má v synoviální tekutině několik úloh - jeho receptor je exprimován na četných imunitních buňkách, synoviálních fibroblastech a chondrocytech. Na jednu stranu prolaktin funguje jako ochranný faktor před apoptózou chondrocytů stimulací jejich antiapoptotických genů (245). Na druhou funguje jako účinný

imunostimulační cytokin, který podporuje proliferaci T, B lymfocytů a NK buněk (103, 104), ale i syntézu prozánětlivých cytokinů – IFN- γ , TNF- α a IL-1 β (105-109), které se podílí na udržování lokálního zánětu. Synoviální fibroblasty jsou dalšími cílovými buňkami pro prolaktin. PRL jednak nepřímo ovlivňuje jejich proliferaci a jednak je přímo podporuje k syntéze metaloproteinázy 3, IL-6 a IL-8 (246). Sérový prolaktin, jehož hladiny jsou zvýšeny při vysoké klinické aktivitě, se může dostat do synoviální tekutiny (244), narušit tam lokální rovnováhu a vést k strukturálním změnám typických pro RA.

Ve druhé, genetické části, naší práce jsme se věnovali prolaktinu syntetizovanému v imunitních buňkách. PRL uvolňovaný z imunitních buněk sice neovlivňuje sérové hladiny prolaktinu (247), ale může být modulačním faktorem během zrání monocytů (101), T a B lymfocytů (102, 103) a i během stimulované odpovědi T, B lymfocytů a NK buněk (103, 104, 112). Na rozdíl od adenohypofýzy, kde je uvolnění prolaktinu řízeno regulací jeho transkripce a pak regulací jeho uvolnění do oběhu, je syntéza prolaktinu v mimohypofyzárních lokalitách regulována pouze na úrovni transkripce PRL genu. Gen pro prolaktin obsahuje dvě regulační oblasti – hypofyzární a mimohypofyzární promotor (115, 116). Produkce prolaktinu v imunitních buňkách je řízena mimohypofyzárním promotorem, který v oblasti GATA sekvence obsahuje funkční jednonukleotidový polymorfismus (-1149 G/T SNP), jehož alela G vede k vyšší expresi prolaktinu (248).

V genetických analýzách nemocných SLE, RA, PsA, SSc a zánětlivých myopatií jsme sledovali výskyt funkční alely G -1149G/T SNP PRL genu. U nemocných SLE jsme nezjistili rozdíl ve frekvencích alel ani genotypů v porovnání se zdravými jedinci. Tento výsledek je v souladu s pracemi z italské (249), ale i mexické populace (250), ale liší se od práce Stevens et al., který popsal vyšší frekvenci alely G u SLE (248). V naší práci jsme zjistili signifikantní asociaci mezi alelou G a kloubním postižením u SLE. Artritida objevující se u SLE má odlišný charakter než u RA. Ačkoliv může dojít k deformitám, jsou tyto způsobeny postižením kolem kloubních struktur a nedochází k destrukci chrupavky a erozi kosti (160). Náš výsledek lze chápat v tomto kontextu jako protektivní, vyšší produkce prolaktinu imunitními buňkami lokálně během artritidy může podpořit přežívání chondrocytů (245). Další rozdíly ve frekvenci alel a genotypů jsme detekovali u SLE a SSc nemocných v závislosti na věku vzniku onemocnění. Genotyp GG se vyskytuje signifikantně častěji u SLE nemocných mezi 21.- 40. rokem v porovnání s ostatními. Na druhou stranu, genotyp TT se vyskytuje signifikantně méně často u nemocných se systémovou sklerodermií a počátkem onemocnění po 45. roku. Faktor věku jedince na rozvoji autoimunitních

onemocnění má důležitou roli zejména v kontextu hladin pohlavních hormonů. Genotyp GG s vyšší syntézou prolaktinu v imunitních buňkách u nemocných v reprodukčním období může být zesilujícím faktorem pro účinek prolaktinu na systémové imunitní reakci, zejména na zrání autoreaktivních B lymfocytů (98, 99, 148). Z druhé strany na věku závislá genetická predispozice byla popsána u jiných autoimunit, například alely HLA II. třídy anebo polymorfismus -607C/A promotoru IL-18 se liší mezi nemocnými s autoimunním diabetem, který se manifestuje v dětství anebo v časně dospělosti (251, 252). Výsledek u systémové sklerodermie je nutno chápat kriticky, nižší frekvence genotypů TT může skrývat častější přítomnost na alelu G bohatých genotypů, které ale nejsou prozatím identifikované pro malé počty testovaných nemocných. Czuwara-Ladykowska a kol. recentně zjistila, že lymfocyty SSc pacientů produkují mRNA prolaktinu (128) a proto jsou nezbytné další studie na úrovni PRL gen-mRNA-protein u této choroby a v závislosti na její průběh. Na druhou stranu, u RA nemocných jsme zjistili vyšší výskyt heterozygotů G/T, ale ne rozdílný výskyt ani jedné z alel. Recentní asociační studie provedená na rozsáhlém souboru 3405 nemocných RA ukazuje, že genotyp TT je protektivním pro RA (253). Tato diskrepance by mohla být vysvětlena vazebnou nerovnováhou s jiným genetickým markerem, která ale nebyla u této práce provedena. V naší práci jsme nezjistili genetické vazby mezi alelami polymorfismu -1149G/T SNP PRL genu a některými z imunogenetických predispozic, HLA I. třídy (HLACw) a HLA II. třídy (HLA-DRB1 a HLA-DQB1). Nicméně, detekce dalších genetických markerů a sledování haplotypů se zdá být nezbytné.

Lze shrnout, že zvýšené hladiny prolaktinu v séru a synoviální tekutině ovlivňují klinický a rentgenologický průběh revmatoidní artritidy a reflektují zánětlivou aktivitu choroby. Frekvence alel a genotypů jednonukleotidového funkčního polymorfismu v oblasti promotoru PRL genu varíují v závislosti na věku začátku onemocnění a klinické manifestaci systémového lupusu erythematosu a systémové sklerodermie, neprokázali jsme však asociaci mezi tímto polymorfismem a psoriatickou artritidou a zánětlivými myopatiemi.

7. Závěry

Systémová revmatická onemocnění jsou skupinou chorob se společným rysem v patogenezi – komplexní poruše imunitních mechanismů tolerance vlastních antigenů. Etiopatogeneza systémových revmatických onemocnění je široká, podílí se na ní genetická predispozice a působení faktorů, jako jsou hladiny pohlavních hormonů, infekce a stres. Podíl genetické vnímavosti na rozvoji onemocnění je u různých chorob různý, ale nezbytný. Samotný rozvoj onemocnění je několikastupňový proces a porucha regulace v imunitní odpovědi může nastat v kterékoliv fázi imunitní odpovědi. Tato práce je první imunogenetickou studií u dvou závažných revmatických chorob, SLE a PsA v české populaci a sleduje roli úlohu prolaktinu, potentního imunomodulačního cytokinu, u revmatických onemocnění – SLE, RA, PsA, SSc a zánětlivých myopatií.

Imunogenetická predispozice je nezbytná pro rozvoj systémového lupusu erythematosu. Prokázali jsme silnou asociaci mezi rozvojem onemocnění a HLA-DRB1*03 alelou ($p_c = 0.008$; OR 2.5) a HLA-DRB1*03-DQB1*0201 haplotypem ($p_c < 0.001$; OR 4.54) v české populaci. Z alel mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části genu MIC-A je frekvence MIC-A5.1 alely signifikantně vyšší u nemocných SLE (55.7%) v porovnání se zdravými (39.9%), $p_c = 0.005$; OR 1.88, kdežto frekvence alely MIC-A6 signifikantně nižší, 10.6% u SLE versus 19.7% u zdravých ($p_c = 0.035$; OR 0.48). Kombinace MIC-A5.1 a HLA-DRB1*03 je signifikantně častější u SLE než u zdravých jedinců, $p_c < 0.000001$; OR 9.71 a absence MIC-A6 spolu s nepřítomností HLA-DRB1*11 je signifikantně častější u skupiny SLE, $p_c = 0.0003$; OR 2.32. Naše práce ukazuje, že na rozvoji SLE se podílí několik genů a rizikové alely se mohou potencovat a obdobně protektivní oblasti mohou snižovat riziko onemocnění. V dalších analýzách je třeba mít na paměti, že existují vzájemné vztahy gen-gen, gen-environmentální faktory a gen-epigenetické faktory.

Poprvé provedenou analýzou dvou genů, HLA-Cw a MIC-A, rizikové lokality psoriatické artritidy (PSORS1) v české populaci jsme identifikovali predispoziční markery pro rozvoj onemocnění. Alela HLA-Cw*06 se objevuje častěji u nemocných s psoriatickou artritidou v porovnání se zdravými jedinci, 36.0% versus 15.9%, $p_c < 0.05$; OR 2.56. Tato asociace je dána primárně zvýšenou frekvencí alely HLA-Cw*0602 u nemocných s PsA, kteří mají psoriázu I. typu (33.4%) v porovnání se zdravými jedinci (10.0%), $p_c < 0.05$; OR 3.33. Zjistili jsme zvýšenou frekvenci MIC-A9 alely mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části MIC-A u nemocných s PsA (46.0%), zvláště s psoriázou II. typu (58.6%) v porovnání se zdravými jedinci (38.0%), $p_{(\text{nekorigované})} = 0.05$ a $p_{(\text{nekorigované})} = 0.017$;

nálezy však neudržely po korekcích statistikou významnost. Další genetické analýzy, s důkladným klinickým hodnocením pacientů a rozšířením počtu jedinců testovaného souboru, jsou potřebné pro detekci genetických rizik rozvoje PsA a pochopení její patogeneze.

Hladina prolaktinu v séru i v synoviální tekutině je signifikantně vyšší u nemocných s RA v porovnání s nemocnými s OA, obě $p < 0.05$ a obě hodnoty navzájem pozitivně korelují u obou onemocnění, RA ($r=0.546$, $p=0.002$) i OA ($r=0.528$, $p=0.006$). U aktivního onemocnění jsou hodnoty PRL v synoviální tekutině vyšší a pozitivně korelují s hodnotou skóre DAS-28, $r=0.485$, $p=0.010$. Navíc jsme zjistili, že sérové hladiny prolaktinu reflektují tíži rentgenového postižení u RA, $r=0.484$, $p=0.014$. Naše práce tak dává jasný důkaz o zapojení prolaktinu (hormonu a cytokinu) do patogeneze RA. PRL by mohl být potenciálním markerem aktivity onemocnění, eventuálně jeho inhibice by mohla být terapeutickou možností u rezistentních případů. V další práci je jistě třeba sledovat odpověď hladin PRL na léčbu, zejména inhibitory TNF- α a receptoru pro IL-6.

Naše výsledky zkoumání funkčního polymorfismu mimohypofyzárního promotoru genu PRL ukazují, že GT genotyp -1149G/T SNP PRL genu se vyskytuje signifikantně častěji u nemocných s RA než u zdravých jedinců (56.10% versus 41.50%), $p_c = 0.039$; OR 1.82. a frekvence G alely -1149 G/T SNP PRL genu je signifikantně vyšší u SLE s kloubní manifestací $p_c = 0.0086$; OR 2.56. GG genotyp je signifikantně častější u nemocných SLE se začátkem choroby mezi 21. - 40. rokem (44.8%), $p_c = 0.023$; OR 2.94 CI95% (1.43-5.96) a genotyp TT se vyskytuje signifikantně méně často u nemocných se začátkem SSc po 45. roku, $p_c = 0.02$; OR 0.13. G alela -1149 SNP PRL genu je spojena s vyšší expresí prolaktinu. U některých skupin může nadbytečná lokální exprese PRL ovlivnit vnímavost k chorobě.

8. Abstrakt

8.1 Abstrakt v českém jazyce

ÚVOD: V multifaktoriální etiopatogenezi systémových revmatických chorob je nezbytná genetická vnímavost. PRL je účinný imunomodulátor, který podporuje rozvoj autoimunity.

CÍLE PRÁCE:

1. Zjistit imunogenetický background, HLA II. a I. třídy a alely mikrosatelitového polymorfismu transmembránové části exonu 5 genu MIC-A (dále MIC-A), u SLE a PsA.
2. Zjistit, zda PRL v séru a synoviální tekutině ovlivňuje klinický a laboratorní průběh RA.
3. Zjistit, zda se funkční polymorfismus -1149 G/T SNP mimohypofyzárního promotoru PRL genu podílí na rozvoji a fenotypu SLE, RA, PsA, SSc a zánětlivých myopatií.

METODIKA: Genetické analýzy u souborů nemocných se SLE (n=156), RA (n=173), PsA (n=100), SSc (n=75), PM (n=47) a DM (n=68) a 123 zdravých jedinců: PCR-SSP (HLA I. a II. třídy), PCR-fragmentační analýza (MIC-A) a PCR-RFLP (-1149 G/T SNP PRL). Detekce PRL v séru a synoviální tekutině u 29 RA a 26 OA pomocí radioimunometrické analýzy.

VÝSLEDKY:

1. Rizikové imunogenetické markery SLE v české populaci jsou alela HLA-DRB1*03 ($p_c = 0.008$; OR 2.5) a haplotyp HLA-DRB1 *03-DQB1*0201 ($p_c < 0.001$; OR 4.54). Frekvence MIC-A5.1 je vyšší u SLE než u zdravých ($p_c = 0.005$; OR 1.88). MIC-A5.1 spolu s HLA-DRB1*03 výrazně zvyšuje riziko SLE, $p_c < 0.000001$; OR 9.71. Alela HLA-Cw*0602 je častější u PsA s psoriázu I. typu než u zdravých, $p_c < 0.05$; OR 3.33.
2. V séru i synoviální tekutině jsou hladiny PRL vyšší u RA (299.55 ± 27.28 a 338.85 ± 33.49 mIU/l) než u OA, 230.59 ± 16.61 a 245.97 ± 21.88 mIU/l, obě $p < 0.05$. Hladiny synoviálního PRL korelují s DAS-28, $p = 0.010$ a sérový PRL s tíží rentgenového postižení, $p = 0.014$.
3. GT genotyp -1149 G/T SNP PRL se vyskytuje signifikantně častěji u nemocných s RA než u zdravých jedinců, $p_c = 0.039$; OR 1.82. Genotyp GG je signifikantně častější u SLE se začátkem choroby mezi 21. - 40. rokem v porovnání s ostatními, $p_c = 0.023$; OR 2.94. Obdobně je genotyp TT vzácný u SSc nemocných se začátkem choroby po 45. roce (4.1%) na rozdíl od nemocných se začátkem před 45. rokem (25%), $p_c = 0.02$; OR 0.13.

ZÁVĚR: Tato práce je první imunogenetickou studií u dvou závažných revmatických chorob, SLE a PsA, v české populaci. Zjistili jsme, že alela MIC-A5.1 výrazně zvyšuje riziko SLE u HLA-DRB1*03 pozitivních osob. U PsA s PV I. typu jsme potvrdili rizikou alelu HLA-Cw*0602. PRL ovlivňuje průběh systémových revmatických onemocnění - u RA

reflektuje aktivitu a tíží onemocnění, distribuce genotypů -1149 G/T SNP PRL se liší kv závislosti na věku objevení se SLE a SSc.

8.2 Abstrakt v anglickém jazyce

INTRODUCTION: Several factors including genetic susceptibility are required for systemic rheumatic diseases development. Immunomodulatory PRL effect supports autoimmunity.

AIMS:

1. To detect the immunogenetic background (alleles HLA class I, II and microsatellite polymorphism of the transmembrane part exon 5 of MIC-A gene) of SLE and PsA.
2. To detect PRL serum and synovial fluid with regard to clinical and laboratory RA activity.
3. To find the role of the functional polymorphism -1149G/T SNP PRL of extrapituitary promoter of PRL gene in SLE, RA, PsA, SSc and inflammatory myopathies development.

METHODS: Genetic analyses of patients with SLE (n=156), RA (n=173), PsA (n=100), SSc (n=75), PM (n=47) a DM (n=68) and 123 healthy individuals: PCR-SSP (HLA class I and II), PCR-fragment analysis (MIC-A) a PCR-RFLP (-1149 G/T SNP PRL). In 29 RA a 26 OA PRL serum and synovial fluid concentrations were detected using immunoradiometric assay.

RESULTS:

1. The allele HLA-DRB1*03 ($p_c=0.008$; OR 2.5) and haplotype HLA-DRB1*03-DQB1*0201 ($p_c <0.001$; OR 4.54) were determined as risk immunogenetic markers for SLE in Czech population. In SLE versus controls allele MIC-A5.1 was increased ($p_c =0.005$; OR 1.88). MIC-A5.1 together with HLA-DRB1*03 increases the risk for SLE development, $p_c <0.000001$; OR 9.71. Allele HLA-Cw*0602 was appeared frequently in PsA with psoriasis type I compared to controls, $p_c <0.05$; OR 3.33.
2. Serum and synovial fluid PRL levels were increased in RA (299.55 ± 27.28 and 338.85 ± 33.49 mIU/l, respectively) than OA, 230.59 ± 16.61 and 245.97 ± 21.88 mIU/l, respectively, both $p <0.05$. Synovial fluid and serum PRL levels correlate with DAS-28 ($p=0.010$) and structural damage ($p=0.014$), respectively.
3. Genotype GT -1149 G/T SNP PRL is more frequent in RA than in controls, $p_c =0.039$; OR 1.82. Genotype GG is more common in patients with SLE onset in range of 21. - 40. years compare to others, $p_c =0.023$; OR 2.94 and genotype TT seems to be rare in SSc with disease onset after 45. years compare to others, $p_c =0.02$; OR 0.13.

CONCLUSION: In our first SLE and PsA immunogenetic study in Czech population we detected increasing effect of allele MIC-A5.1 in HLA-DRB1*03 individuals on SLE susceptibility. Allele HLA-Cw*0602 is a risk for PsA with psoriasis type I. PRL modulates

course of systemic rheumatic diseases: PRL reflects RA activity and severity and alleles of -
1149G/T SNP PRL gene show age-related differences of SLE and SSc development.

9. Přílohy

9.1 Seznam publikací, které jsou podkladem disertační práce

Fojtíková M, Novota P, Čejková P, Pešičková S, Tegzová D, Černá M. HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol Int*, Epub March 30, in print

Fojtíková M, Štolfa J, Novota P, Čejková P, Dostál C, Černá M. HLA-Cw*06 class I region rather than MICA is associated with psoriatic arthritis in Czech population. *Rheumatol Int* 2009, 29: 1293-9

Fojtíková M, Tomasová Studýnková J, Filková M, Lacinová Z, Gatterová J, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clin Exp Rheumatol* 2010, 28: 849-54

Fojtíková M, Černá M, Čejková P, Růžičková Š, Dostál C. Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007, 66:706-707

Štolfa J, Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Šedová L, Dostál C. Polymorphism of the prolactin extrapituitary promoter in psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 2007, 27:1095-1096

Fojtíková M, Čejková P, Bečvář R, Vencovský J, Tomasová Studýnková J, Černá M. Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010, 30: 1691-1693

9.1.1 Rheumatology International

Fojtíková M, Novota P, Čejková P, Pešičková S, Tegzová D, Černá M. HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol Int*, Epub March 30, in print

IF: 1,512

HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population

Markéta Fojtíková · Peter Novota · Pavlína Čejková ·
Satu Pešičková · Dana Tegzová · Marie Černá

Received: 17 November 2009 / Accepted: 12 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The genetic components contribute to the systemic lupus erythematosus development. This study for the first time determined the distribution of the polymorphisms and linkage disequilibrium in HLA class II, MICA and PRL gene among patients suffering from SLE and healthy Czech individuals. DNA was obtained from the peripheral blood cells of 123 SLE patients and 96 healthy people. Allele variants of the HLA class II, MICA transmembrane polymorphism and PRL extrapituitary promoter -1149G/T SNP were detected using the sequence-specific primers analysis, PCR-fragment analysis and PCR-RFLP, respectively. In Czech population, only DRB1*03-DQB1*0201 haplotype is significantly associated with increased risk for SLE development: the frequency in SLE group was 44.7% in comparison with 15.2% in controls, $P_c < 0.0001$; OR 4.54 CI 95% (2.36–9.09). The MICA-A5.1 allele is present significantly more often in SLE (55.7%) than controls (39.9%), $P_c = 0.005$; OR 1.88 CI 95% (1.29–2.77), and the combination of HLA DRB1 *03 together with MICA-A5.1 is strongly associated with SLE [$P_c < 0.000001$; OR 9.71 CI 95% (3.4–27.7)]. On the other hand, the MICA-A6 allele is less frequent in SLE patients compared to controls,

10.6% and 19.7%, respectively [$P_c = 0.035$; OR 0.48 CI 95% (0.28–0.82)], and the combination of absence both alleles MICA-A6 and HLA DRB*11 seems to be risk for SLE development compared to controls, 84.6 and 70.2%, respectively, [$P_c = 0.0003$ OR 2.32 CI 95% (1.47–3.70)]. We found that only G allele of the -1149 G/T SNP is associated with specific clinical manifestation of SLE, arthritis [$P_c = 0.022$; OR 2.63, CI 95% (1.45–4.81)]. HLA class II-MICA combinations may increase/decrease a risk for SLE development. Multiple studies focusing on the ethnical differences as well as genetic-epigenetic relationships are necessary for better understanding SLE pathogenesis.

Keywords Systemic lupus erythematosus · Immunogenetics · Gene · Polymorphism

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease that affects predominantly women in child-bearing age. The pathogenesis of this illness has not been still clearly elucidated. However, complex changes during the network of the immune response may result in production of the pathogenic autoantibodies and organ damage by the immune complexes consumption [1].

Although the beginning and perpetuation of the pathological immune response may be influenced by hormonal milieu and some factors like stress, infections and others [2, 3], the genetic background for SLE development is necessary [2, 4]. In fact, cooperation between multiple predisposing genetic loci determines individuals susceptible to SLE. Interestingly, SLE genome-wide studies particularly in Caucasian population demonstrated risk areas

M. Fojtíková (✉) · P. Novota · S. Pešičková · D. Tegzová
Institute of Rheumatology, Na Slupi 4,
128 00 Prague 2, Czech Republic
e-mail: fmar@centrum.cz

P. Čejková · M. Černá
Department of the General Biology and Genetics,
Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruska 87,
100 00 Prague 10, Czech Republic

P. Čejková
Department of Anthropology and Human Genetics,
Faculty of Science, Charles University Prague, Vinicna 7,
128 43 Prague 2, Czech Republic

on the several chromosome, namely 1q25.1, 3p14.3, 4p16, 6p21, 7q32, 11p15.5, 16p12.3, 16p11.2 and 20p12 [5–8]. The candidate genes are mainly involved in the immune response regulation particularly in B-cell maturation [5, 9], complement activation, immune cells communication [9] and expression of the intracellular transcriptional factors such as interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) and signal transducer and activator of transcription 4 (*STAT4*) [2, 9]. The highly polymorphic major histocompatibility complex (HLA) that encoded the peptides class I and II for antigen and autoantigen presentation to CD8+ T and CD4+ T cells, respectively, is located within the SLE strongly susceptible region 6p22.3-21.1 [5, 10]. HLA alleles frequency may vary among different population [11], are in linkage disequilibrium and may be predisposing markers for various autoimmune diseases [12]. SLE has been associated with extended HLA class I and II haplotypes: B*08 - DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 and DRB1*1501-DQA*0102-DQB1*0602 [13, 14] in Caucasian population. Nevertheless, other risk genes are located near the HLA region. The major histocompatibility complex class I chain-related gene A (*MICA*) is located 47 kb centromeric to the HLA-B locus [15] and encodes *MICA* protein that is expressed on the keratinocytes, endothelial cells and monocytes under the stress condition [16]. *MICA* peptide interacts with NKG2D/DAP10 receptor of the nature killers (NK) cells and receptor of the CD8 and $\delta\gamma$ T lymphocytes and stimulates Th2 immune response [17–19]. *MICA* consists of the three extracellular domains, transmembrane segment (TM) and cytoplasmic tail compound 383 amino acids polypeptide. The trinucleotide microsatellite polymorphism in the exon 5 of the TM region, namely alleles *MICA*-A4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 according the [GCT]*n* repetitions and allele *MICA*-A5.1 with G insertion between the second and third repetitions has been described [20–22]. The *MICA* 5.1 allele of this microsatellite polymorphism was identified as the independent risk allele for SLE development in an Italian population [23]; however, next Spanish study demonstrated linkage disequilibrium between *MICA* 5.1 and B*08, but not with DRB1*03 [24].

In our work, we investigated polymorphisms of the HLA class II, *MICA* and prolactin (PRL) gene in patients suffering from SLE in Czech patients with Slavic origin. PRL gene is located close to the risk SLE region. Prolactin may act as a cytokine, and recent data show that PRL can break an autoreactive B-cells apoptosis and cause SLE in susceptible animals [25, 26]. In humans, elevated serum PRL levels have been associated with active SLE [27], and immune cells from SLE patients produce more PRL than those from healthy individuals. Lymphocyte PRL synthesis is regulated by alternative, extrapituitary promoter, and the G allele of the -1149 G/T

SNP of extrapituitary PRL promoter (rs1341239) leads to higher PRL expression [28].

Patients and methods

Patients

A total of 123 Czech SLE patients, 106 (86.2%) women and 17 (13.8%) men, with average age of 43.4. All of them fulfilled at least four criteria for SLE diagnosis according to the American College of Rheumatology (ACR) classification [29].

We examined 99 healthy Czech individuals as control group, 29 (29.3%) women and 70 (70.7) men, with average age 39.3.

This study was approved by the Ethical Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague.

Methods

Genomic DNA preparation: DNA was extracted from peripheral leukocytes by commercial set QiaAmp DNA Maxi Kit spin columns (QIAGEN GmbH, Hilde, Germany). DNA was diluted to the concentration 30 ng/ul.

HLA-class II typing was performed using polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific primers (SSP-PCR). For genotyping HLA class II region was used the Olerup SSP™ HLA-DRB1 and HLA-DQB low resolution kit and HLA-DQB1 high-resolution subtyping kit for each detected allele (Genovision, Oslo, Norway). Procedure of PCR mix amplification and PCR cycling parameters was in concordance with recommendations. The PCR products were identified on 2% agarose gel.

MICA exon 5 transmembrane microsatellite polymorphism analysis was completely depicted by Novota et al. [30]. The following primers were used for the polymorphic transmembrane region: forward Cy5-5'-GCTGGTCTTCA GAGTCATTGGC-3' and reverse 5'-GGACCCTCTGCAG CTGATGTTTTTC-3'. The PCR products were identified using electrophoretic separation in the ALFexpress II DNA analysis system, and the fragment sizes were determined automatically using the Fragment analyzer v 1.02 software (Amersham Biosciences, Vienna, Austria). According to fragment sizes, 123, 126, 127, 129 and 139 bp, we identified *MICA* A4, A5, A5.1, A6 and A9 alleles, respectively.

PCR-RFLP methodology was used for analysis of the -1149 G/T SNP of the extrapituitary PRL promoter [31]. Briefly, the 137 base pairs (bp) region of the PRL extrapituitary promoter was amplified by employing the following primers: forward 5'-GCAGGTCAAGATAACC TGGA-3' and reverse 5'-CATCTCAGAGTTGAATTTAT

TTCCTT-3'. ApoI restriction endonuclease for RFLP was used, and the restriction fragments were visualized on 4% agarose gel. We identified these genotypes: TT homozygote characterized by 120 + 17 bp, GG homozygote by 85 + 35 + 17 bp, and GT heterozygote by 120 + 85 + 35 + 17 bp DNA fragments.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were calculated using standard methods and statistical evaluation Epi Info software (Version 3.3 October 2004, Atlanta, Georgia). Statistical differences in allele distributions were analyzed by either a chi-squared (χ^2) or Fischer's exact probability test. Significance was defined using a Bonferroni-corrected P value lower than 0.05. The strength of the associations observed was estimated by calculating the odds ratios (OR) according to Wolf's method with a Haldane's correction.

Results

HLA class II genotyping: allele frequencies and genotype distribution

Distribution of the HLA class II alleles was investigated in 222 individuals, 123 SLE patients and 99 healthy volunteers, all of them were with Czechs origin. There were significant differences in HLA DRB1 and HLA DQB1 allele distribution between patients and controls, $P < 0.001$ and $P = 0.0048$ using χ^2 test, respectively. We found that frequencies for four alleles in each HLA class II subgroup in our healthy population differ from SLE patients: HLA DRB1*03, *08, *15 and *11 (see Table 1) and HLA DQB1*0201, *0402, *0602 and *0301 (see Table 2).

The higher frequency of the HLA DRB1*03, *08 and *15 alleles was detected in SLE group 22.8, 6.1 and 22.0%, respectively, compare to healthy controls 10.6, 2.0 and 14.7%, respectively. However, only differences in HLA DRB1*03 allele frequency maintain the statistical significance after corrections, $P_c = 0.008$; OR 2.5 CI 95% (1.44–4.27). On the other hand, we found lower frequency of HLA DRB1*11 allele in SLE patients (6.1 vs. 13.6% in controls), but P value lost significance after corrections.

We found an association between HLA DQB1*0201 and SLE, which was detected in 22.8% SLE patients compared to 10.6% in controls, $P_c = 0.01$; OR 2.5 CI 95% (1.44–4.34). In our SLE patients group, neither higher frequencies of the HLA DQB1*0402 and HLA DQB1*0602 alleles (5.3 and 21.1% compared to 1.5 and 13.1% in general population, respectively) nor the lower frequency HLA DQB1*0301 (8.5 vs. 17.2% in controls) did reach statistical significance after corrections.

We identified 52 genotypes of HLA DRB1 and 48 genotypes of HLA DQB genes. We did not find neither deviation between studied groups and HLA DRB1 or HLA DQB1 genotypes nor any significant association between homo or heterozygotes and SLE (data not shown).

The strong linkage disequilibrium between HLA DRB1*03-DQB1*0201, HLA DRB1*08-DQB1*0402, HLA DRB1*15-DQB1*0602 and HLA DRB1*11-DQB1*0301 ($P = 10^{-5}$; $P = 0.03$; $P = 10^{-9}$; $P = 10^{-6}$, respectively) was defined in the control group. We confirm as a main HLA predisposition factor HLA DRB1*03 allele ($P_c = 0.008$). Significant association with HLA DQB1*0201 ($P_c = 0.01$) is due to known linkage disequilibrium.

MICA transmembrane microsatellite polymorphism exon 5 analysis

We detected five alleles of the MICA TM exon 5 microsatellite polymorphism, A4, A5, A5.1, A6 and A9 in both SLE patients and control group (see Table 3). There was a significant difference of allele distribution between these two groups, $P < 0.01$ (χ^2 test). We found that MICA-A5.1 allele is present significantly more often in SLE patients (55.7%) than in controls (39.9%), $P_c = 0.005$; OR 1.88 CI 95% (1.29–2.77). Furthermore, the allele MICA-A6 is less frequent in SLE patients compared to controls, 10.6 and 19.7%, respectively, $P_c = 0.035$; OR 0.48 CI 95% (0.28–0.82).

Conversely, there were no differences in genotypes distribution of MICA TM exon 5 microsatellite polymorphism, which we detected 15 in each group (data not shown). Although we did not ascertain any significant association, there was a trend to higher presence of MICA-A5.1/A5.1 homozygotes among SLE patients compared to controls, 31.7 and 20.2%, respectively ($P_u = 0.05$; OR 1.85 before correction) and lower presence of MICA-A4/A6 heterozygotes in SLE patients (1.6%) than in control subjects (10.1%) ($P_u = 0.005$; OR 0.14 before correction).

In the control group, we tested linkage disequilibrium between HLA class II (DRB1*03, *04, *11, *15) and MICA-A4, A5, 5.1, A6 and A9. We did not find any linkage disequilibrium between HLA DRB and MICA alleles, $P > 0.05$ in all cases.

Contribution of MICA-A5.1 and MICA-A6 to susceptibility to SLE

We also tested whether the risk alleles HLA DRB1 *03, *08, *15 and MICA-A5.1, and the protective alleles HLA DRB1 *11 and MICA-A.6, respectively, contribute to the disease development independently.

HLA DRB1 *03 allele together with MICA-A5.1 allele was strongly associated with SLE compared to controls,

Table 1 Allele frequencies of the HLA class II among patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy Czech individuals (controls)

P value was determined by χ^2 test comparing SLE group to controls, P_{uc} = uncorrected P_c = corrected with Bonferroni correction for 12 detected alleles, *n* = number of cases, OR = odds ratio, CI = 95% confidence interval

HLA DRB1	SLE 2 <i>n</i> = 246 (%)	Controls 2 <i>n</i> = 198 (%)	<i>P_c</i>	OR (95% CI)
*01	18 (7.3)	20 (10.1)	ns	
*03	56 (22.8)	21 (10.6)	0.008	2.5 (1.44–4.27)
*04	25 (10.2)	28 (14.2)	ns	
*07	32 (13.0)	29 (14.7)	ns	
*08	15 (6.1)	4 (2.0)	ns/ P_{uc} . 0.03	3.3 (1.10–10.01)
*10	1 (0.4)	2 (1.0)	ns	
*11	15 (6.1)	27 (13.6)	ns/ P_{uc} .0.007	0.4 (0.21–0.82)
*12	1 (0.4)	2 (1.0)	ns	
*13	21 (8.5)	24 (12.1)	ns	
*14	5 (2.0)	8 (4.0)	ns	
*15	54 (22.0)	29 (14.7)	ns/ P_{uc} . 0.04	1.6 (1.01–3.33)
*16	3 (1.2)	4 (2.0)	ns	

Table 2 Allele frequencies of the HLA class II among patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy Czech individuals (controls)

P value was determined by χ^2 test comparing SLE group to controls, P_{uc} = uncorrected P_c = corrected with Bonferroni correction for 18 detected alleles, *n* = number of cases, OR = odds ratio, CI = 95% confidence interval

HLA DQB1	SLE 2 <i>n</i> = 246 (%)	Controls 2 <i>n</i> = 198 (%)	<i>P_c</i>	OR (95% CI)
*0201	56 (22.8)	21 (10.6)	0.01	2.5 (1.44–4.34)
*0202	23 (9.4)	23 (11.7)	ns	
*0203	0	1 (0.5)	ns	
*0301	21 (8.5)	34 (17.2)	ns/ P_{uc} .0.006	0.45 (0.25–0.81)
*0302	21 (8.5)	27 (13.7)	ns	
*0303	9 (3.7)	7 (3.5)	ns	
*0304	2 (0.8)	1 (0.5)	ns	
*0401	1 (0.4)	0	ns	
*0402	13 (5.3)	3 (1.5)	ns/ P_{uc} .0.03	3.7 (1.02–14.28)
*0501	18 (7.3)	20 (10.1)	ns	
*0502	4 (1.6)	5 (2.5)	ns	
*0503	5 (2.1)	9 (4.5)	ns	
*0504	1 (0.4)	0	ns	
*0601	2 (0.8)	2 (1.0)	ns	
*0602	52 (21.1)	26 (13.1)	ns/ P_{uc} .0.02	1.78 (1.06–3.03)
*0603	14 (5.7)	14 (7.1)	ns	
*0604	4 (1.6)	4 (2.0)	ns	
*0606	0	1 (0.5)	ns	

16.7–2.0%, respectively [$P_c < 0.000001$; OR 9.71 (3.4–27.7)], and the number of double negative subjects was significantly reduced in SLE group in comparison with control one, 38.2 and 51.5%, respectively, $P_c = 0.005$; OR 0.58 (0.39–0.85). However, there were no differences in the number of combination of HLA DRB1 *03 positive and negative and vice versa MICA-A5.1 in SLE and controls group.

In the case of HLA DRB1 *08 and *15 alleles, we found that the MICA-A5.1 allele occurs more frequently in SLE negative for DRB1 *08 (52.4%) and DRB1 *15 (43.5%) than in controls 38.9% [$P_c = 0.004$; OR 1.75 (1.19–2.56)] and 31.3% [$P_c = 0.008$; OR 1.69 (1.14–2.5)], respectively and in SLE group was significantly reduced the number of

negative subjects for both DRB1 *08 and MICA-A5.1 (41.5%) and DRB1 *15 and MICA-A5.1 (34.5) compared to controls, 59.1% [$P_c = 0.0002$; OR 0.49 (0.33–0.71)] and 52.5% [$P_c = 0.0001$; OR 0.48 (0.32–0.70)], respectively.

The absence of HLA DRB1*11 together with MICA-A6 allele is significantly more common in SLE compared to controls, 84.6 and 70.2%, respectively, [$P_c = 0.0003$ OR 2.32 (1.47–3.70)].

–1149 G/T PRL extrapituitary promoter polymorphism analysis

We did not detect any association between alleles of the –1149 G/T SNP extrapituitary PRL promoter in SLE

Table 3 Allele Frequencies of the MICA TM exon 5 microsatellite polymorphism and -1149 G/T SNP of the Extrapituitary Prolactin Promoter in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy population (controls)

Allele of the microsatellite exon 5 TM polymorphism	SLE <i>n</i> = 246 (%)	Controls <i>n</i> = 198 (%)	<i>P_c</i>	OR (95% CI)
A4	26 (10.6)	25 (12.6)	ns	
A5	24 (9.7)	25 (12.6)	ns	
A5.1	137 (55.7)	79 (39.9)	0.005	1.88 (1.29–2.77)
A6	26 (10.6)	39 (19.7)	0.035	0.48 (0.28–0.82)
A9	33 (13.4)	30 (15.2)	ns	
Allele of the -1149 G/T SNP PRL				
G	142 (57.7)	112 (56.7)	ns	
T	104 (42.3)	86 (43.3)	ns	

P value was determined by χ^2 test comparing SLE group to controls, *P_c* = corrected with Bonferroni correction for five detected alleles, *n* = number of cases, OR = odds ratio, CI = 95% confidence interval

patients and healthy individuals (Table 3), and no differences in genotypes distribution between groups were observed (data not shown).

Moreover, we did not find any linkage disequilibrium between G or T allele and HLA class II alleles (DRB1*03, *08, *11, *15), *P* > 0.05 in all cases.

Analysis of risk and protective SLE haplotypes

In our population, we found that only DRB1*03-DQB1*0201 haplotype is significantly associated with increased risk for SLE development: the frequency in SLE group was 44.7 vs. 15.2% in controls, *P_c* < 0.0001; OR 4.54 (2.36–9.09). The other risk haplotypes, DRB1*08-DQB1*0402 [10.6% (SLE) vs. 3.0% (controls), *P_u* = 0.03; OR 3.84] and DRB1*15-DQB1*0602 (42.3 vs. 25.3%, *P_u* = 0.008; OR 2.17) as well as protective one, DRB1*11-DQB1*0301 [12.2% (SLE) vs. 24.2% (controls), *P_u* = 0.01; OR 0.43], did not reach statistical significance after corrections.

When we looked for the risk/protective HLA haplotypes extended with MICA and PRL alleles, we did not find any significant differences between SLE and controls. However, we noticed a trend: the haplotype DRB1*03-DQB1*0201–MICA-A5.1 was more common in SLE patients 72.7% than in controls 20.0%, *P_u* = 0.002 (OR 11.11), but the combination of DRB1*03-DQB1*0201 and MICA-A4 and MICA-A6 seems to occur rarely in SLE than healthy subjects, 5.5 and 33.3%, *P_u* = 0.002 (OR 0.12) and 1.8 and 33.3%, *P_u* = 0.001 (OR 0.04), respectively.

Correlation between the clinical and laboratory findings in SLE and predisposing alleles

We divided our SLE patients according to the presence or absence of the specific organ involvement (according to the

SLE classification criteria: kidney, CNS, heart, lungs, joints, skin, blood cells) and the autoantibodies (anti-dsDNA, anti-Sm, anti-Ro, anti-La). We compared the allele frequencies in patients with organ manifestation or autoantibodies versus patients without these signs. We found that G allele of the -1149 G/T SNP of the extrapituitary PRL promoter is significantly associated with joint involvement in SLE (63.3%) compared to SLE patients without this manifestation (39.6%), *P_c* = 0.022; OR 2.63, CI (95%) 1.45–4.81. In all other cases detected, risk alleles did not reach significance after corrections.

Discussion

SLE is a multifactorial disease, and for this reason both genetic and environmental factors are contributing to its manifestation. In our work, we studied polymorphisms in three genes (HLA class II, MICA, PRL) located within the susceptible locus for SLE on the chromosome 6 [11, 23, 28]. Genes in this region show a high level of polymorphism and linkage disequilibrium. All three genes that we studied encoded molecules influenced in the immune response. HLA class II glycoproteins are responsible for initial step of the immune response and antigen presentation, stress-inducible MICA peptides may contribute to the Th2 immune reaction and induction of tolerance [17, 18]. Prolactin like a cytokine modulates immune cells (T and dendritic cells) maturation and differentiation [32, 33] and has direct effect to autoreactive B cells development [26].

The immunogenetic study focusing on the SLE development in Czech population has not been performed before. The HLA allele frequencies are slightly different in central European population than in other European countries [34].

In our work, we detected a strong association between SLE and HLA DRB1*03, HLA DQB1*0201 alleles, as it

was demonstrated previously in the other Caucasian population [10, 14, 24, 35]. Similarly, we found significantly increased HLA DRB1*03-DQB1*0201 haplotype in our SLE patients. On the other hand, the association between the haplotype DRB1*1501-DQB1*0602 and both DRB1*15 and DQB1*0602 alleles did not reach statistical significance after corrections. Although several studies show the association of the DRB1*1501-DQB1*0602 and SLE [14, 36], our finding is in concordance with Smerdel et al. who demonstrated only weak elevation of DRB1*15 allele in SLE patients [35]. Interestingly, we found a protective role of HLA DRB1*11, and this association has not been described before. On the other hand, the DRB1*07 allele which is supposed to be protective [13, 36] was not decreased in our population. This allele may vary among populations, for example the work from neighboring country Poland demonstrated higher frequency of this allele in a small cohort [37].

The next point of our study was to elucidate the role of MICA TM microsatellite polymorphism in SLE development. In concordance with the Italian and Spanish [23, 24] previously published works, we detected high frequencies of the MICA-A5.1 allele in SLE patients. Like others, we did not find a linkage disequilibrium between MICA-A5.1 and HLA DRB1 alleles, especially *03. However, the presence of the MICA-A5.1 allele positively modifies genetic risk of HLA DRB1*03 to SLE. Similarly, Lopez-Vazquez demonstrated independent risk of MICA-A5.1 allele to the HLA DRB1*03-DQB1*0201 haplotype leading to another autoimmune disease, celiac disease in adults [38]. Completely different interaction is between MICA-A5.1 allele and HLA DRB1*08/HLA DRB1*15. In the case of HLA DRB1 *08 and *15 alleles, we found that the MICA-A5.1 allele occurs more frequently in SLE negative for DRB1*08 and DRB1*15 than in controls. Moreover, negativity for MICA-A5.1 allele together with the absence of HLA DRB1*08 and DRB1*15 reduces the risk for SLE development. We can conclude according to the Svejgaard and Ryder [39] that DRB1 *08 or *15 and MICA-A5.1 themselves are independent predisposed factors (OR 3.3 or 1.6, and OR 1.9, respectively), MICA-A5.1 does not increase the risk for SLE development with these alleles; however, it may play some opposite role in triggering of autoimmune reaction, and for this reason presence of MICA-A5.1 in SLE etiopathogenesis excludes function of DRB1 *08 or *15 alleles. However, in our study we identified only uncorrected significance for these HLA alleles, and further studies with increased number of SLE patients and different populations are required to confirm this finding. The new outcome of this work is observation of the lower frequency of MICA-A6 allele in SLE patients; moreover, the combination of the absence of two alleles, HLA DRB1*11 and MICA-A6, may lead to higher

susceptibility to develop SLE. Gambelunghe and et al. found that MICA-A9 is a protective allele, but we did not confirm it [23]. This discrepancy may be due to the different characteristics of patients, for example, in our study the MICA-A9 allele is higher in SLE patients with skin involvement: 16.6% compared to those without this manifestation 7.7% (insignificant observation, data not shown). On the other hand, MICA-A5 allele is the risk allele in Italian study, but in Spanish one seems to be protective [23, 24]. In our work, we did not find any association between MICA-A5 allele and SLE itself or any clinical or lab characteristic. It is also necessary to keep in mind that there is huge variability in MICA allele frequencies among populations probably due to microsatellite type of polymorphism [22].

In conclusion, we detected a strong association of the HLA DRB1*03-DQB1*0201 with SLE, which is positively modified by MICA-A5.1 in the Czech, central European population. MICA exon 5 transmembrane gene microsatellite polymorphism varies among European population. This is the first work of this region about immunogenetic background of the Czech SLE patients.

Acknowledgments This study was supported by the Czech Ministry of Health—Research Project MZO 00023728 and the MHCR grant NS/10618-3.

References

1. Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481–490
2. Molokhia M, McKeigue P (2006) Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. *Lupus* 15:827–832
3. Petri M (2008) Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:412–415
4. Castro J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M (2008) The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 7:345–351
5. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEM), Halley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL et al (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40:204–210
6. Lee YH, Nath SK (2005) Systemic lupus erythematosus susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis. *Hum Genet* 118:434–443
7. Cervino AC, Tsinoremas NF, Hoffman RW (2007) A genome-wide study of lupus: preliminary analysis and data release. *Ann NY Acad Sci* 1110:131–139
8. Rhodes B, Vyse TJ (2008) The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 47:1603–1611
9. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, Lee AT, Ferreira RC et al (2008) Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 358:900–909

10. Tsao BP (2004) Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 16:513–521
11. Nowak J, Mika-Witkowska R, Polak M, Zajko M, Rogatko-Koros M, Graczyk-Pol E, Lange A (2008) Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A,-C,-B,-DRB1 and-DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations. *Tissue antigens* 71:193–205
12. Yu CC, Whitacre CC (2004) Sex, MHC and complement C4 in autoimmune diseases. *Trends Immunol* 25:694–699
13. Gladman DD, Urowitz MB, Darlington GA (1999) Disease expression and class II HLA antigens in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 8:466–470
14. Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, Baechler EC et al (2002) Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 71:543–553
15. Bahram S, Bresnahan M, Gerahty DE, Spies T (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6259–6963
16. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P (1998) MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47:139–148
17. Zhang Y, Stastny P (2006) MICA antigens stimulate T cell proliferation and cell-mediated cytotoxicity. *Hum Immunol* 67:215–222
18. Cerwenka A (2009) The new list on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 206:265–268
19. Groh V, Steine A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279:1737–1740
20. Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Gonzales E, Martin J (2002) A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue Antigens* 60:526–528
21. Gambelunghe G, Brozzetti AL, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A (2006) MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum Immunol* 67:1005–1007
22. Ota M, Katsuyama Y, Mizuji N, Ando H, Furihata K, Ono S, Pivetti-Pezzi P, Tabbara KF, Palimeris GD, Niobin B, Davatchi F, Chams H, Geng Z, Bahram S, Inoko H (1997) Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 49:448–454
23. Gambelunghe G, Gerli R, Bartoloni Bocci E, Del Sindaco P, Ghaderi M, Sanjeevi CB, Bistoni V, Falorni A (2005) Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 44:287–292
24. Sanchez E, Torres B, Vilches JR, Lopez-Nevot MA, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Gonzalez-Gay MA, Ramon E, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A, Martin J, Gonzalez-Escribano MF (2006) No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 45:1096–1100
25. Cohen-Solal JF, Jegannathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C, Diamond B (2008) Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:528–532
26. Saha S, Gonzalez J, Rosenfeld G, Keiser H, Peeva E (2009) Prolactin alter the mechanism of B cell tolerance induction. *Arthritis Rheum* 60:1743–1752
27. Leanos-Miranda A, Cardenas-Mondragon G (2006) Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 45:97–101
28. Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R, Ollier WE, Worthington J, Davis JR (2001) Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:2358–2366
29. Hochberg MC (1997) Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725
30. Novota P, Kolesa L, Slavcev A, Cerna M (2004) Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MICA-A gene. *Folia Biologica (Praha)* 50:21–23
31. Fojtikova M, Cerna M, Cejkova P, Ruzickova S, Dostal C (2007) Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:706–707
32. Dimitrov S, Lange T, Fehm HL, Born J (2004) A regulatory role of prolactin, growth hormone and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 18:274–368
33. Jara LJ, Benitez G, Medina G (2008) Prolactin, dendritic cells, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 7:251–255
34. Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK et al (2009) HLA-A,-B, -C, and-DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens* 73:17–32
35. Smerdel-Ramoya A, Finholt C, Lilleby V, Gilboe IM, Harbo HF, Maslinski S, Forre O, Thorsby E, Lie BA (2005) Systemic lupus erythematosus and extended major histocompatibility complex—evidence for several predisposing loci. *Rheumatology* 44:1368–1373
36. Alarcon GS, McGwin G, Bartolucci AA, Roseman J, Lisse J, Fessler BJ, Bastian HM, Friedman AW, Reveille JD (2001) Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. Differences in damage accrual. *Arthritis Rheum* 44:2797–2806
37. Hrycek A, Siekiera U, Cieslik P, Szkrobka W (2005) HLA-DRB1 and -DQB1 alleles and gene polymorphisms of selected cytokines in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 26:1–6
38. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousono C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C (2002) MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 50:336–340
39. Svejgaard A, Ryder LP (1994) HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue antigens* 43:18–27

9.1.2 Rheumatology International

Fojtíková M, Štolfa J, Novota P, Čejková P, Dostál C, Černá M. HLA-Cw*06 class I region rather than MICA is associated with psoriatic arthritis in Czech population. *Rheumatol Int* 2009, 29: 1293-9.

IF: 1,512

HLA-Cw*06 class I region rather than MICA is associated with psoriatic arthritis in Czech population

Markéta Fojtíková · Jiří Štolfa · Peter Novota ·
Pavína Čejková · Ctibor Dostál · Marie Černá

Received: 14 August 2008 / Accepted: 5 January 2009 / Published online: 28 January 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic inflammatory joint disease which affects patients suffering from psoriasis. The genetic background especially the susceptibility loci on the short arm of the chromosome six contribute to PsA development. In our study, we looked for the role of the MICA and HLA-Cw genes polymorphisms in PsA pathogenesis. We investigated 100 PsA patients and 94 healthy Czech individuals. We found an association between HLA-Cw*06 and PsA namely PsA with psoriasis type I (age of psoriasis onset before 40 years) compared to healthy individuals ($P_{\text{corrected}} < 0.05$, OR 2.56, CI 95% 1.33–4.76 and $P_{\text{corrected}} = 0.01$, OR 3.03, CI 95% 1.53–5.88, respectively). The MICA-A9 allele of the transmembrane microsatellite MICA polymorphism occurred more frequently in PsA with psoriasis type II group (age of psoriasis onset after 40 years) than in controls, 58.6 versus 38.0%, respectively however, this finding did not reach a statistical significance after correction ($P_{\text{corrected}} = 0.085$).

Keywords Psoriatic arthritis · HLA genes · MICA gene · Erosive disease · Age of psoriasis onset

Introduction

Psoriatic arthritis (PsA) is a heterogenous disease characterized as a rheumatoid factor negative inflammatory arthritis [1]

which may coincide with psoriasis in up to 40% [2, 3]. PsA usually appears during the psoriasis course, but it may develop before or simultaneously with the onset of the skin manifestation [4]. Interestingly, no correlation was found between the severity of skin and joint manifestation [4, 5]. PsA progresses to a destructive arthritis in 20% and the erosive disease is associated with increased mortality [3, 6]. Psoriasis is a complex T-cell mediated autoimmune skin disease and genetic predisposition together with environmental factors such as stress or infection play a role in the psoriasis and PsA genesis [7, 8], however, the exact pathogenesis has not been elucidated yet. Nine genetic susceptibility loci for psoriasis (PSORS 1–9) have been identified [9, 10] whereas PSORS 1 is located in the short arm of the chromosome six (6p21.3). Several genes residing in this localization are in linkage disequilibrium, they are highly polymorphic and moreover, their allele frequencies may vary among different populations. Thereby the identification of the predisposing alleles for psoriasis, more specifically PsA development has still been in interest of researchers.

The major histocompatibility complex (MHC) class I region namely the HLA-Cw*06 has been established as the real psoriasis susceptibility gene [11–13]. HLA-Cw*0602 occurs in both psoriasis type I and PsA with psoriasis type I [14–17], but no differences of allele frequencies in the three clinical PsA subgroups—oligo, poly and spondylarthritis have been demonstrated [18]. On the other hand, the secondary association of previously described psoriasis and PsA predisposing HLA-B38, B39 and B57 alleles [19, 20] has been clarified to be in linkage disequilibrium with MHC class I chain-related gene A (MICA) [18]. MICA is a highly polymorphic gene settled 47 kb centromeric to the HLA-B locus [21]. MICA expression is induced by cell stress and the three extracellular domains, transmembrane segment (TM) and cytoplasmatic tail compound 383 amino

M. Fojtíková (✉) · J. Štolfa · P. Novota · C. Dostál
Institute of Rheumatology, Na Slupi 4,
128 00 Prague 2, Czech Republic
e-mail: fmar@centrum.cz

P. Čejková · M. Černá
Department of the Molecular and Cell Biology,
Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague,
Ruská 87, Prague, Czech Republic

acids polypeptide interacts with NKG2D/DAP10 receptor of the natural killers (NK) cells, it is recognized by CD8 and $\gamma\delta$ T lymphocytes [22, 23] and contributes to the immune surveillance. The trinucleotide microsatellite polymorphism in the exon 5 of the TM region, namely alleles MICA-A4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 according the (GCT) $_n$ repetitions and allele MICA-A5.1 with G insertion between the second and third repetitions has been described [24–27]. The MICA-A9 [18, 28] and MICA-A4 alleles has been supposed to be a risk markers to PsA development.

The stress events play a role in psoriasis and PsA pathogenesis [5]. The polypeptide prolactin (PRL) as the stress releasing hormone and additionally T-cells mediated cytokine [29] may be involved in the immunological background of psoriasis and PsA [30, 31]. PRL gene is located in the region 6p21.3–22.2 and the G allele of the extrapituitary PRL promoter leads to higher PRL expression [32] and may modulate T-cells mediated immune response.

In our work we studied for the first time the predisposing polymorphisms in the HLA-Cw, MICA and PRL gene in patients of Czech origin suffering from peripheral form of PsA.

Materials and methods

Patients

One hundred Czech patients, 51 women and 49 men, with average age 54.6 years, suffering from PsA were examined in this study. The diagnosis of the PsA was established using the Moll and Wright criteria [1] and only RF negative patients with peripheral form of PsA were included in this study. PsA patients were divided into two groups—with erosive ($n = 61$) and non-erosive ($n = 39$) peripheral arthritis using X-ray examination. According to the age of psoriasis onset they were classified as psoriasis type I (skin manifestation before 40 years of age, $n = 67$) and type II (skin manifestation after the age of 40, $n = 30$), however, three patients were without skin manifestation.

As a control group we examined 94 healthy Czech people, 30 women and 64 men, with average age 40.1 years. This study was approved by the Ethical Committee of the Third Faculty of Medicine of the Charles University in Prague.

Methods

Genomic DNA preparation DNA was extracted from peripheral leukocytes by commercial set QiaAmp DNA Maxi Kit spin columns (QIAGEN GmbH, Hilde, Germany). DNA was diluted to the concentration 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

HLA-C typing was performed using polymerase chain reaction (PCR) with sequence specific primers (SSP-PCR).

For genotyping HLA C region, the Olerup SSPTM HLA-C typing and HLA-Cw*06 subtyping kit by Genovision (Oslo, Norway) was used. Procedure of PCR mix amplification and PCR cycling parameters was in concordance with recommendations. The PCR products were identified on 2% agarose gel.

MICA exon 5 transmembrane microsatellite polymorphism analysis was completely described by Novota et al. [33]. These primers were used for the polymorphic transmembrane region: forward Cy5-5'-GCTGGTCTTCAGAGTCATTGGC-3' and reverse 5'-GGACCCTCTGCAGCTGATGTTTTC-3'. The PCR products were identified using electrophoretic separation in the ALFexpress II DNA analysis system and the fragment sizes were determined automatically using the Fragment analyzer v 1.02 software (Amersham Biosciences, Vienna, Austria). According to fragment sizes 123, 126, 127, 129 and 139 bp we identified MICA A4, A5, A5.1, A6 and A9 alleles, respectively.

–1149G/T SNP extrapituitary PRL promoter was detected using PCR-RFLP methodology previously described [34]. Briefly, the 137 bp region of the PRL extrapituitary promoter was amplified by employing the following primers: forward 5'-GCAGGTCAAGATAACCTGGA and reverse 5'-CATCTCAGAGTTGAATTTATTTCCTT. ApoI restriction endonuclease for RFLP was used, the restriction fragments were visualized on 4% agarose gel. The genotypes we identified were: TT homozygote characterized by 120 + 17 bp, GG homozygote by 85 + 35 + 17 bp, and GT heterozygote by 120 + 85 + 35 + 17 bp DNA fragments.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were calculated using standart methods and statistical evaluation Epi Info software (Version 3.3, October 2004, Atlanta, Georgia). Statistical differences in allele distributions were analyzed by either a χ^2 or Fischer's exact probability test. Significance was defined using a Bonferroni corrected P value lower than 0.05. The strength of the associations observed was estimated by calculating the odds ratios (OR) according to Wolf's method with a Holdane's correction.

Results

HLA Cw genotyping of 100 PsA patients and 94 controls of Czech origin

We found a statistically significant association between the HLA-Cw*06 allele and PsA patients compared to controls, 36.0 versus 15.9%, respectively, $P_{\text{corrected}} < 0.05$; OR 2.56; CI 95% 1.33–4.76. There were significantly more

Table 1 Frequencies of the HLA-Cw* alleles distribution among the Czech patients with psoriatic arthritis (PsA) and healthy controls

HLA-Cw	PsA (n = 200)		Psoriasis type I (n = 134)		Psoriasis type II (n = 58)		PsA erosive (n = 122)		PsA non-erosive (n = 78)		Controls (n = 188)
	%	P value	%	P value	%	P value	%	P value	%	P value	
*01	14.0	NS	17.9	NS	6.9	NS	9.8	NS	20.5	NS	12.8
*02	14.0	$P_{un} = 0.05^a$	11.9	NS	17.2	$P_{un} = 0.04^a$	16.4	$P_{un} = 0.02^a$	10.3	NS	5.3
*03	16.0	NS	16.3	NS	17.2	NS	14.8	NS	17.9	NS	26.6
*04	18.0	$P_{un} = 0.01^a$	16.3	$P_{un} = 0.01^a$	20.8	NS	21.3	NS	12.9	$P_{un} = 0.01^a$	36.2
*05	8.0	NS	6.0	NS	13.8	NS	9.8	NS	5.1	NS	8.5
*06	36.0	$P_{un} = 0.003^b$	41.9	$P_{un} = 0.0007^c$	24.1	NS	34.4	$P_{un} = 0.01^a$	38.5	$P_{un} = 0.008^a$	15.9
*07	48.0	NS	52.2	NS	41.4	NS	44.3	NS	53.8	NS	62.7
*08	8.0	NS	4.5	NS	10.4	NS	8.2	NS	7.7	NS	3.2
*12	28.0	NS	25.5	NS	34.6	$P_{un} = 0.05^a$	29.5	NS	25.6	NS	17.0
*14	3.0	NS	1.5	NS	3.4	NS	1.6	NS	5.1	NS	3.2
*15	1.0	NS	0.0	NS	3.4	NS	1.6	NS	0.0	NS	1.1
*16	5.0	NS	6.0	NS	3.4	NS	6.6	NS	2.6	NS	4.3
*17	1.0	NS	0.0	NS	3.4	NS	1.6	NS	0.0	NS	3.2

P value was determined by χ^2 test comparing each group to controls, P_{un} uncorrected, P_c corrected with Bonferroni correction for 13 detected alleles, NS not significant

^a $P_c = NS$

^b $P_c < 0.05$; OR 2.56; CI 95% 1.33–4.76

^c $P_c = 0.01$; OR 3.03; CI 95% 1.53–5.88

HLA-Cw*06 allele bearers in PsA patients with psoriasis type I (41.9%) than in the control group (15.9%), $P_{corrected} = 0.01$; OR 3.03; CI 95% 1.53–5.88, whereas no association between HLA-Cw*06 and PsA with psoriasis type II was detected (see Table 1). The frequency of this allele was higher in PsA with non-erosive arthritis compared to controls, 38.5 versus 15.9%, however, it did not reach statistical significance after correction ($P_{corrected} = 0.112$). The most frequent allele of the HLA-Cw*06 was HLA-Cw*0602 which was significantly associated with PsA with psoriasis type I (33.4%) versus controls (10.0%), $P_{corrected} < 0.05$ OR 3.33 CI 95% 1.44–7.69 (data not shown). Neither the HLA-Cw*02 overexpression in PsA erosive (16.4%) and PsA psoriasis type II (17.2%), nor underexpression of the HLA-Cw*04 allele in the PsA psoriasis type I (16.3) and non-erosive PsA (12.9%) compared to healthy controls (5.3 and 36.2%, respectively) became significant after correction (see Table 1).

MICA transmembrane microsatellite polymorphism exon 5 analysis

We analyzed 194 individuals (100 PsA patients and 94 healthy people) of Czech origin and we detected five alleles of the MICA TM microsatellite polymorphism, namely MICA-A4, A5, A5.1, A6 and A9 (see Table 2). There was high frequency of the MICA-A9 allele in the PsA and specially PsA with psoriasis type II groups than in controls,

46.0% and 58.6 versus 38.0%, respectively, however, after correction these findings did not reach a statistical significance ($P_{corrected} = 0.250$ and 0.085 , respectively). The lower frequency of the MICA-A6 in the PsA erosive group (21.3%) compare to controls (38.4%) was found, nevertheless, it is not significant after corrections. In genotypes of the MICA TM microsatellite polymorphism there was no significant association between groups with PsA and controls (data not shown).

–1149G/T PRL extrapituitary promoter polymorphism typing

We investigated 82 PsA patients and 84 healthy controls. We did not find any positive or negative correlation between alleles (see Table 3) or genotypes (data not shown) of the –1149G/T SNP PRL extrapituitary promoter in PsA and its subgroups and controls. Moreover, we looked for any linkage disequilibrium between –1149G/T PRL SNP and polymorphisms in HLA-Cw and MICA genes, but we did not detect any one.

Discussion

Psoriatic arthritis is a complex heterogenous disease and both genetic and environmental factors contribute to its pathogenesis. However, the interactions of genetic factors

Table 2 Allele frequencies of the MICA transmembrane region exon 5 microsatellite polymorphism in Czech patients with psoriatic arthritis and healthy controls

Alleles of the MIC-A [GCT] <i>n</i>	PsA (<i>n</i> = 200)		Psoriasis type I (<i>n</i> = 134)		Psoriasis type II (<i>n</i> = 58)		PsA erosive (<i>n</i> = 122)		PsA non-erosive (<i>n</i> = 78)		Control subjects (<i>n</i> = 188)
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	
A4	26.00	NS	26.90	NS	27.60	NS	31.10	NS	17.90	NS	25.50
A5	17.00	NS	16.40	NS	17.20	NS	16.40	NS	17.90	NS	27.70
A5.1	84.00	NS	92.50	NS	69.00	NS	85.30	NS	82.10	NS	77.60
A6	27.00	NS	23.90	NS	27.60	NS	21.30	<i>P</i> _{un} = 0.04 ^a	35.90	NS	38.40
A9	46.00	<i>P</i> _{un} = 0.05 ^a	40.30	NS	58.60	<i>P</i> _{un} = 0.017 ^b	45.90	NS	46.20	NS	30.80

PsA psoriatic arthritis, *P* value was determined by χ^2 test comparing each group to control subjects, *P*_{un} uncorrected, *P*_{corr} corrected using Bonferroni correction for five alleles, NS not significant

^a *P*_{corr} > 0.05

^b *P*_{corr} = 0.085; OR 2.32; CI 95% 1.13–4.54

Table 3 Allele frequencies of the –1149G/T SNP PRL extrapituitary promoter polymorphism in Czech psoriatic arthritis patients and healthy controls

PRL –1149 G/T SNP	PsA (<i>n</i> = 82)		Psoriasis type I (<i>n</i> = 57)		Psoriasis type II (<i>n</i> = 22)		PsA erosive (<i>n</i> = 54)		PsA non-erosive (<i>n</i> = 28)		Controls (<i>n</i> = 94)
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	
G	60.4	NS	61.4	NS	56.8	NS	62.0	NS	57.1	NS	60.7
T	39.6	NS	38.6	NS	43.2	NS	38.0	NS	42.9	NS	39.3

P value was determined by χ^2 test comparing each group to controls, *n* number of cases, PsA psoriatic arthritis, NS not significant

heading toward to PsA development have not been elucidated yet. In our work, we studied the polymorphisms in the HLA-Cw, MICA and PRL genes in Czech PsA patients and controls and we looked for allele frequencies of these genes in PsA subgroups according to radiological patterns and the psoriasis types.

In our study, we found an association between HLA-Cw*06 namely HLA-Cw*0602 allele and PsA patients primarily those suffering from psoriasis type I. HLA-Cw*0602 allele has been associated with severe course and early onset of skin psoriasis [35, 36]. However, the weaker association between HLA-Cw*0602 allele and PsA, than psoriasis type I has been demonstrated [15, 17] and some works did not find any significant association between HLA-Cw*0602 and PsA [37]. Queiro et al. demonstrated longer skin lesions-arthritis period in HLA-Cw*0602 positive patients compared to negative and no correlation between HLA-Cw*06 presence and clinical forms of PsA [38]. In our work, we found equal HLA-Cw*06 distribution between PsA erosive and not erosive subgroups. Our results support the evidence of HLA-Cw*0602 role in PsA with psoriasis type I rather than PsA itself. Coincidentally with recent published work by Ho et al. [15] we can conclude that it is necessary to divide PsA according to the age of psoriasis onset for future genetic studies.

The second aim of our study was to determine allele frequencies of the microsatellite transmembrane polymorphism in the exon 5 of the MICA gene in Czech PsA and controls. We detected five alleles of this polymorphism, namely A4, A5, A5.1, A6 and A9 and we did not find previously observed less frequent alleles MICA-A7, A8 and A10 in our population [26, 27]. The MICA molecule is expressed on the endothelial and CD8 T cells surface and via NKG2D receptor of NK and T cells is involved in the immune response [22, 39, 40] and may play a role in the autoimmune diseases pathogenesis [40]. The MICA-A4 allele of the exon 5 MICA (TM) polymorphism has been associated with juvenile idiopathic arthritis [41] and with autoimmune diabetes and psoriasis in Korean population [42, 43]. Interestingly, in Caucasian population the link between MICA-A5 allele and autoimmune diabetes with onset in childhood has been detected [44] in contrary to MICA-A5.1 in diabetes onset in adults [45–47]. Several other studies have been showing the association between MICA exon 5 (TM) microsatellite polymorphism and Addison disease [53], atypical celiac diseases [48], ulcerative colitis [49] and Behcet disease [50]. On the other hand, the secondary association of the MICA-A5.1 in systemic lupus erythematosus was described [51]. Nevertheless, MICA gene allele frequencies may vary across populations

and diseases in Europe as well as over the world (see Table 4). In our work, we detected a higher frequency of the MICA-A9 allele in PsA and PsA with psoriasis type II versus controls, 46.0 and 58.6% versus 30.8%, respectively however, after corrections for multiple alleles these findings did not reach statistical significance. We did not confirm previously described predisposing alleles for PsA: MICA-A4 in Croatian work [37] and MICA-A9 described in Spanish [18] and Jewish PsA [28]. This variation may be caused by different MICA exon 5 TM polymorphism allele distribution (see Table 4). The other reason may be a slightly various allele distribution in HLA alleles class I in different population [52] and the secondary linkage disequilibrium with MICA gene [28]. Besides, Grubic et al. surprisingly did not demonstrate HLA-Cw*06 in contrast to MICA-A4 association with their PsA patients [37].

The higher frequency of MICA-A9 allele among patients with PsA suffering for psoriasis type II in contrary to association between HLA-Cw*06 and PsA with psoriasis type I shows a second difference in our work between these two subgroups. Disorders associated with multiple genetic and environmental factors contributing to their development may express an age-dependent genetic differences. Generally, the most important genetic factors of pathogenesis lead to disease development in younger age. Differences of HLA and MICA allele frequencies have been demonstrated in autoimmune diabetes mellitus between childhood and adult onset [47, 54].

The PRL gene is located at the neighbourhood of the PSORS1 and MHC. In general, PRL shows not only endocrinological activities but acts as a cytokine as well [55]. PRL may modulate immune response, keratinocyte growth and may be involved in psoriasis pathogenesis [30, 56]. Moreover, functional polymorphism -1149G/T at the extrapituitary promoter of PRL gene leading to higher PRL lymphocyte production was observed [32]. In our study, the allele distribution of the -1149G/T SNP was equal and neither HLA-Cw nor MICA alleles, and PRL gene linkage disequilibrium was found. Hence we can presume that potential PRL influence on psoriasis and PsA pathogenesis is more likely caused by pituitary regulation and pathological or stress-induced secretion than genetic predisposition of lymphocyte PRL production.

We can conclude that PsA is a complex disease with polygenic background. PsA with psoriasis type I and type II are genetically different subgroups of one illness, whereas HLA Cw*0602 has been the most important predisposing allele in PsA with psoriasis type I pathogenesis, while MICA-A9 may play a role in PsA with psoriasis type II pathogenesis. Neither HLA Cw*0602 nor MICA-A9 are associated with radiological patterns of PsA. More genetic studies to determine the PsA susceptibility across different population are necessary.

Table 4 Allele frequencies of the MICA TM microsatellite polymorphism among different populations and its association with selected autoimmune diseases

MICA alleles	Latvian		Croatian		Spanish		Jewish		Italian		Korean					
	JIA (n = 119)	C (n = 107)	PsA (n = 58)	C (n = 157)	PsA (n = 65)	C (n = 45)	At. CD (n = 54)	C (n = 116)	PsA (n = 52)	C (n = 73)	T1DM (n = 95)	C (n = 98)	Ps (n = 138)	C (n = 129)	T1DM (n = 119)	C (n = 134)
A4	34.0 ^a	18.0 ^a	30.17 ^b	17.11 ^b	20.0	20.0	16.66	25.86	9.6	15.0	19.0	22.0	18.8	24.6	23.5	15.3
A5	20	23.0	3.45	10.43	13.8	22.2	13.0	28.44	13.4	31.5	53.0 ^c	15.0 ^c	30.4	47.6	24.4	29.1
A5.1	61.0	69.0	N/A	N/A	40.0	57.5	90.74 ^d	44.0 ^d	40.3	46.5	35.0	35.0	71.0 ^e	27.0 ^e	22.3	16.0
A6	28.0	25.0	12.93	25.94	43.0	37.3	39.0	43.1	48.0	54.7	48.0	54.0	13.8	43.7	12.6 ^f	24.6 ^f
A9	33.0	42.0	N/A	N/A	58.4 ^g	31.1	11.11	30.17	55.7 ^h	27.3 ^h	27.0	37.0	29.7	28.6	17.2	14.9
	[41]		[37]		[18]		[48]		[28]		[45]		[43]		[42]	

N/A not available data, C controls, JIA juvenile idiopathic arthritis, T1DM diabetes mellitus type I, PsA psoriatic arthritis, Ps psoriasis, At.CD atypical celiac disease

^a $P_c = 0.04$, OR 2.3; ^b $P_c = 0.01$, RR 2.1; ^c $P_c = 0.0005$, OR 6.1; ^d $P_c = 0.000001$, OR 12.5; ^e $P_c = 0.000001$, RR 6.6; ^f $P_c = 0.003$, RR 0.44; ^g $P_c = 0.0003$, RR 3.29; ^h $P_c = 0.0009$, OR 3.34

Acknowledgment This study was supported by the Czech Ministry of Health—Research Project MZO 00023728.

References

- Moll JM, Wright V (1973) Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 3:55–78. doi:10.1016/0049-0172(73)90035-8
- Alenius GM, Stenberg B, Stenlund H, Lundblad M, Dahlqvist SR (2002) Inflammatory joint manifestations are prevalent in psoriasis: prevalence study of joint and axial involvement in psoriatic patients, and evaluation of a psoriatic and arthritic questionnaire. *J Rheumatol* 29:2577–2582
- Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P (2005) Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome. *Ann Rheum Dis* 64(Suppl II):14–17
- Elkayam O, Ophir J, Yaron M, Casi D (2000) Psoriatic arthritis: interrelationships between skin and joint manifestations related to onset, course and distribution. *Clin Rheumatol* 19:301–305. doi:10.1007/PL00011173
- Sibilia J (2006) Psoriasis: skin and joints, same fight? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20(Suppl 2):56–72. doi:10.1111/j.1468-3083.2006.01774.x
- Gladman DD, Farewell VT, Wong K, Husted J (1998) Mortality studies in psoriatic arthritis: results from a single center. II. Prognostic indicators for death. *Arthritis Rheum* 41:1103–1110. doi:10.1002/1529-0131(199806)41:6%3c1103::AID-ART18%3e3.0.CO;2-N
- Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H (2004) Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol* 135:1–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02310.x
- Setty AR, Choi KH (2007) Psoriatic arthritis epidemiology. *Curr Rheumatol Rep* 9:449–454. doi:10.1007/s11926-007-0073-3
- Valdimarsson H (2007) The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol* 25:563–567. doi:10.1016/j.clindermatol.2007.08.010
- Nair RP, Stuart P, Henseler T (2000) Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 66:1833–1844. doi:10.1086/302932
- Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S et al (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* 78:827–851. doi:10.1086/503821
- Balendran N, Clough RL, Arguello JR, Barber R, Veal C, Jones AB et al (1999) Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 113:322–328. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00710.x
- Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RDR, Frodsham A et al (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6:813–820. doi:10.1093/hmg/6.5.813
- Asumalahti K, Ameen M, Suomela S, Hagforsen E, Michaelsson G, Evans J et al (2003) Genetic analysis of PSORS1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol* 120:627–632. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12094.x
- Ho YPCP, Barton A, Worthington J, Plant D, Griffiths CHEM, Young HS et al (2008) Investigating the role of the HLA-Cw*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 67:677–682. doi:10.1136/ard.2007.071399
- Queiro R, Torre JC, Gonzales S, Lopez-Larea C, Tinture T, Lopez-Lagunas I (2003) HLA antigens may influence the age of onset of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 30:505–507
- Gladman DD, Cheung C, Ng CM, Wade JA (1999) HLA-C locus alleles in patients with psoriatic arthritis (PsA). *Hum Immunol* 60:259–261. doi:10.1016/S0198-8859(98)00123-2
- Gonzalez S, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, Gonzales-Roces S, Sanchez del Rio J, Perez R et al (1999) The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to develop psoriatic arthritis, and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 42:1010–1016. doi:10.1002/1529-0131(199905)42:5%3c1010::AID-ANR21%3e3.0.CO;2-H
- Gladman DD, Farewell VT (1995) The role of HLA antigens as indicators of disease progression in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 38:845–850. doi:10.1002/art.1780380619
- Eastmond CJ (1994) Psoriatic arthritis. *Genetics and HLA antigens*. *Baillieres Clin Rheumatol* 8:263–276. doi:10.1016/S0950-3579(94)80018-9
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6259–6263
- Cerwenka A, Langer LL (2001) Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181:158–169. doi:10.1034/j.1600-065X.2001.1810113.x
- Groh V, Steine A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 279:1737–1740. doi:10.1126/science.279.5357.1737
- Ota M, Katsuyama Y, Mizuji N, Ando H, Furihata K, Ono S et al (1997) Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 49:448–454
- Perez-Rodriguez M, Corel A, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG et al (2000) A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 55:162–165. doi:10.1034/j.1399-0039.2000.550209.x
- Gambelunghe G, Brozzetti AL, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A (2006) MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum Immunol* 67:1005–1007. doi:10.1016/j.humimm.2006.10.007
- Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Gonzales E, Martin J (2002) A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue Antigens* 60:526–528. doi:10.1034/j.1399-0039.2002.600608.x
- Gonzales S, Brautbar C, Martínez-Borra J, López-Vazquez A, Segal R, Blanco-Gelaz MA et al (2001) Polymorphism in MICA rather than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Hum Immunol* 62:632–638. doi:10.1016/S0198-8859(01)00242-7
- Matalka KZ (2003) Prolactin enhances production of interferon-gamma, interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor-alpha, in a stimulus-specific manner. *Cytokine* 21:187–194. doi:10.1016/S1043-4666(02)00496-9
- Kanda N, Watanabe S (2007) Prolactin enhances interferon-gamma-induced production of CXC ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Endocrinology* 148:2317–2325. doi:10.1210/en.2006-1639
- Mc Murray RW (2001) Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 31:21–32. doi:10.1053/sarh.2001.25482
- Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R et al (2001) Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:2358–2366. doi:10.1002/1529-0131(200110)44:10%3c2358::AID-ART399%3e3.0.CO;2-K
- Novota P, Kolesar L, Slavcev A, Cerna M (2004) Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MIC-A gene. *Folia Biol (Praha)* 50:21–23

34. Fojtikova M, Cerna M, Cejkova P, Ruzickova S, Dostal C (2007) Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:706–707. doi:10.1136/ard.2006.061788
35. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K (1997) HLA-Cw*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriasis. *J Invest Dermatol* 109:183–186. doi:10.1111/1523-1747.ep12319304
36. Szczerkowska Dobosz A, Rebala K, Szczerkowska Z, Nedoszytko B (2005) HLA-C locus alleles distribution in patients from northern Poland with psoriatic arthritis: preliminary report. *Int J Immunogenet* 32:389–391. doi:10.1111/j.1744-313X.2005.00543.x
37. Grubic Z, Peric P, Eećuk-Jelicic E, Zunec R, Stingl K, Curkovic B et al (2004) The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. *Eur J Immunogenet* 31:93–98. doi:10.1111/j.1365-2370.2004.00452.x
38. Queiro R, Gonzales S, Lopez-Larrea C, Alperi M, Sarasqueta C, Riestra JL et al (2006) HLA-C locus alleles may modulate the clinical expression of psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 8:R185–R190. doi:10.1186/ar2097
39. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle JH, Phillips LL, Lanier LL et al (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727–729. doi:10.1126/science.285.5428.727
40. Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T (2003) Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9452–9457
41. Zake LN, Cimdirina I, Rumba I, Dabadghao P, Sanjeevi CB (2002) Major histocompatibility complex class I chain related (MIC) A gene, TNF α microsatellite alleles and TNF β alleles in juvenile idiopathic arthritis patients from Latvia. *Hum Immunol* 63:418–423. doi:10.1016/S0198-8859(02)00385-3
42. Park Y, Lee H, Sanjeevi CB, Eisenbarth GS (2001) MICA polymorphism is associated with type 1 diabetes in the Korean population. *Diabetes Care* 24:33–38. doi:10.2337/diacare.24.1.33
43. Choi HB, Han H, Youn JI, Kim TY, Kim TG (2000) MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens* 56:548–550. doi:10.1034/j.1399-0039.2000.560609.x
44. Gambelunghe G, Ghaderi M, Cosentino A, Ad Falorni, Brunetti P, Ad Falorni, Sanjeevi CB (2000) Association of MHC class I chain-related A (MIC-A) gene polymorphism with type I diabetes. *Diabetologia* 43:507–514. doi:10.1007/s001250051336
45. Gambelunghe G, Ghaderi M, Tortoioli C, Falorni A, Santeusano F, Brunetti P et al (2001) Two distinct MICA gene markers discriminate major autoimmune diabetes types. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3754–3760. doi:10.1210/jc.86.8.3754
46. Novota P, Kolostova K, Pinterova D, Novak J, Weber P, Treslova L et al (2005) Association of MHC class I chain related gene-A microsatellite polymorphism with the susceptibility to T1DM and LADA in Czech adult patients. *Int J Immunogenet* 32:273–275. doi:10.1111/j.1744-313X.2005.00532.x
47. Cerna M, Kolostova K, Novota P, Romzova M, Cejkova P, Pinterova D et al (2007) Autoimmune diabetes mellitus with adult onset and type 1 diabetes mellitus in children have different genetic predispositions. *Ann N Y Acad Sci* 1110:140–150. doi:10.1196/annals.1423.016
48. Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Bousono C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J et al (2002) MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of celiac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 50:336–340. doi:10.1136/gut.50.3.336
49. Ding Y, Xia B, Lu M, Zhang Y, Li J, Ye M et al (2005) MHC class I chain-related gene A-A5.1 is associated with ulcerative colitis in Chinese population. *J Clin Exp Immunol* 142:193–198. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02907.x
50. Yabuki K, Mizuji N, Ota M, Katsayama Y, Palimeris G, Stavropoulos C et al (1999) Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet's disease in Greece. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1921–1926
51. Sanchez E, Torres B, Vilches JR, Polez-Nevot MA, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J et al (2006) No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 45:1096–1100. doi:10.1093/rheumatology/kei058
52. Nowak J, Mika-Witkowska R, Polak M, Zajko M, Rogatko-Koros M, Graczyk-Pol E et al (2008) Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A, C, B, DRB1 and DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations. *Tissue Antigens* 71:193–205. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00991.x
53. Gambelunghe G, Falorni A, Ghaderi M, Laureati S, Brunetti P, Falorni A et al (1999) Microsatellite polymorphism of the MHC class I-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3701–3707. doi:10.1210/jc.84.10.3701
54. Cejkova P, Novota P, Cerna M, Kolostova K, Novakova D, Kucera P et al (2008) HLA DR1, DQB1 and insulin promoter VNTR polymorphisms: interactions and the association with adult-onset diabetes mellitus in Czech patients. *Int J Immunogenet* 35:133. doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00749.x
55. Dimitrov S, Lange T, Fehh HL, Born J (2004) A regulatory role of prolactin, growth hormone and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 18:368–374. doi:10.1016/j.bbi.2003.09.014
56. Giasuddin AS, El-Sherif AI, El-Ojali SI (1998) Prolactin: does it have a role in the pathogenesis of psoriasis? *Dermatology* 197:119–122. doi:10.1159/000017981

9.1.3 Clinical and Experimental Rheumatology

Fojtíková M, Tomasová Studýnková J, Filková M, Lacinová Z, Gatterová J, Pavelka K, Vencovský J, Šenolt L. Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clin Exp Rheumatol* 2010, 28: 849-54.

IF: 2,396

Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage

M. Fojtíková¹, J. Tomasová Studýnková¹, M. Filková¹, Z. Lacinová², J. Gatterová¹,
K. Pavelka¹, J. Vencovský¹, L. Šenolt¹

¹Institute of Rheumatology and Department of Clinical and Experimental Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic, ²3rd Department of Medicine, Department of Endocrinology and Metabolism, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic.

Abstract

Objectives

Prolactin (PRL) is a hormone with cytokine-like activities that has been demonstrated to be involved in immune responses. However, there are inconsistent results related to the role of PRL in rheumatoid arthritis (RA). Therefore, the aim of this study was to evaluate the levels of PRL in serum and synovial fluid in patients with RA and osteoarthritis (OA) and examine whether PRL might be associated with laboratory and clinical disease activity of RA.

Methods

A total of 29 patients with RA and 26 patients with OA were included in the study. The concentration of PRL in the serum and synovial fluid was measured by immunoradiometric assays, and the levels of serum anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies (ACPA) and IgM rheumatoid factor (IgM-RF) were analysed by ELISA. Disease activity score (DAS 28) and radiological (Larsen) score were assessed.

Results

The levels of PRL in serum (299.55 ± 27.28 vs. 230.59 ± 16.61 mIU/l, $p=0.041$) as well as in synovial fluid (338.85 ± 33.49 vs. 245.97 ± 21.88 mIU/l, $p=0.024$) were significantly higher in patients with RA than in patients with OA. A moderate correlation was found between disease activity of RA and levels of PRL in synovial fluid ($r=0.485$, $p=0.010$) and the serum PRL levels correlated significantly with the total Larsen score ($r=0.484$, $p=0.014$).

Conclusion

The findings of increased prolactin levels in patients with RA lead to the assumption that prolactin may play a role in disease severity and the process of joint damage in RA.

Key words

prolactin, rheumatoid arthritis, disease activity, hormones

Marketa Fojtíková, MD
Jana Tomasová Studýnková, MD, PhD
Maria Filková, MD
Zdeňka Lacinová, RNDr
Jindřiška Gatterová, MD
Karel Pavelka, MD, PhD, Prof
Jiří Vencovský, MD, PhD, Prof
Ladislav Šenolt, MD, PhD, Assoc Prof

This study was supported by the MHCR NR/9292 – 3 grant and research project no. 00023728.

Please address correspondence and reprint requests to:

Dr Marketa Fojtikova,
Institute of Rheumatology,
Na Slupi 4,
128 50 Prague 2, Czech Republic.
E-mail: fmar@centrum.cz

Received on January 19, 2010; accepted in revised form on June 25, 2010.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2010.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterised by the accumulation of immune cells and activation of synovial fibroblasts within the synovial membrane, which subsequently results in cartilage destruction and erosion of the adjacent bone (1-3). To date, the aetiology of RA is unknown, and its pathogenesis remains incompletely understood. However, sex hormones have been suggested to modulate both onset as well as progression of the disease (4). Females are affected more frequently than males, and there is evidence that during pregnancy RA usually improves, which is in contrast to the characteristic exacerbation after delivery, a period when both cortisol and oestrogens rapidly decline and prolactin (PRL) remains significantly increased (4, 5).

In addition to its unique roles in reproduction and lactation, PRL acts as a potent immunomodulator (6, 7). The immune capability of PRL is generally stimulatory, while oestrogens and cortisol support the anti-inflammatory Th2 immune response. PRL maintains immune homeostasis, and its receptors have been detected on several immune cells, synovial fibroblasts and chondrocytes (6, 8, 9). In immune cells, PRL up-regulates transcription of the interferon regulatory factor IRF-1 gene and modulates expression of pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-12, interferon (IFN)- γ and tumour necrosis factor (TNF)- α (10, 11). Moreover, PRL exhibits anti-apoptotic activities, leading to increased survival of both autoreactive T-cells and B-cells (10, 12).

Several hormones, including PRL, have been observed in the synovial fluid of patients with RA (13), and elevated serum PRL levels have been detected in children suffering from antinuclear antibody (ANA)-positive juvenile idiopathic arthritis (14). In addition, serum PRL levels have been shown to correlate with disease activity of systemic lupus erythematosus (15, 16). However, in the case of RA there have been found inconsistent results varying from lower (17), equal (18) to higher PRL serum levels (19, 20). Nevertheless, in an experimental model, PRL was shown

to aggravate arthritis in hypophysectomised rats (21) and in humans PRL serum levels correlated with proinflammatory chemokine MIP-1 α (22), active disease (22) and worse Steinbrocker functional stage (20). Moreover, RA patients with increased serum PRL levels required strenuous therapy with glucocorticoids (23).

The aim of our study was to determine the levels of PRL in serum and synovial fluid of patients with RA and osteoarthritis (OA) and to characterise its potential association with the disease activity and joint damage.

Methods

Patients

Twenty-nine patients fulfilling the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for RA (24) were included in this study. The control group consisted of 26 patients with knee OA who met the ACR criteria for OA of the knee (25). Detailed characteristics of both groups are shown in Table I. The study was approved by the Ethical Committee of the Institute of Rheumatology in Prague, and all patients agreed on participation by signing the informed consent.

Synovial fluid was collected under standard conditions from the knee joint during therapeutic arthrocentesis. As the PRL serum levels show physiological diurnal variation, the blood samples were taken 1-5 days thereafter in the morning hours (at least 1 hour after waking up) and after at least 20 minutes at rest before sampling. Patients suffering from hypothyreosis, those that were pregnant or using drugs affecting PRL secretion were not included in this study.

Functional disability questionnaires (Czech validated versions) and disease activity were assessed at the time of arthrocentesis. The Western Ontario and McMaster Universities Index (WOMAC) was used for patients with OA. For patients with RA, the disease activity score (DAS) and health assessment questionnaire (HAQ) were examined. The DAS28 was calculated using the formula: $0.56\sqrt{\text{(number of tender joints)}} + 0.28\sqrt{\text{(number of swollen joints)}} + 0.7L_n$ (erythrocyte

Competing interests: none declared.

Table I. Baseline characteristics of patients.

	RA (n=29)	OA (n=26)	p-value
Age (years)	62.21 ± 2.52	66.20 ± 2.15	0.246
Gender (female/male)	22/7	15/11	0.249
Female: pre/postmenopausal	2/22	0/15	0.504
Disease duration (years)	7.86 ± 1.85	8.07 ± 1.68	0.594
Disease activity (DAS 28)	4.83 ± 0.29	NA	–
Mean Larsen score (index)	26.12	–	–
Glucocorticoids (n)	21	–	–
DMARDs (n) MTX/HCQ/SAS/LEF	29 17/3/5/4	–	–
Biological agents:			
TNF inhibitors/tocilizumab	8 7/1	–	–
CRP (mg/l)	21.65 ± 5.16	5.10 ± 1.62	0.007
ESR (mm/ 1 st h)	26.34 ± 5.62	11.5 ± 1.74	0.010
ACPA (IU/ml)	275.21 ± 100.3	NA	–
RF IgM (U/ml)	17.28 ± 4.11	NA	–

DAS, disease activity score; DMARDs, Disease modifying antirheumatic drugs; MTX: Methotrexate; HCQ: Hydroxychloroquine; SAS: Sulphasalazine; LEF: Leflunomide; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; ACPA: Anti-citrullinated peptide autoantibodies; RF: rheumatoid factor.

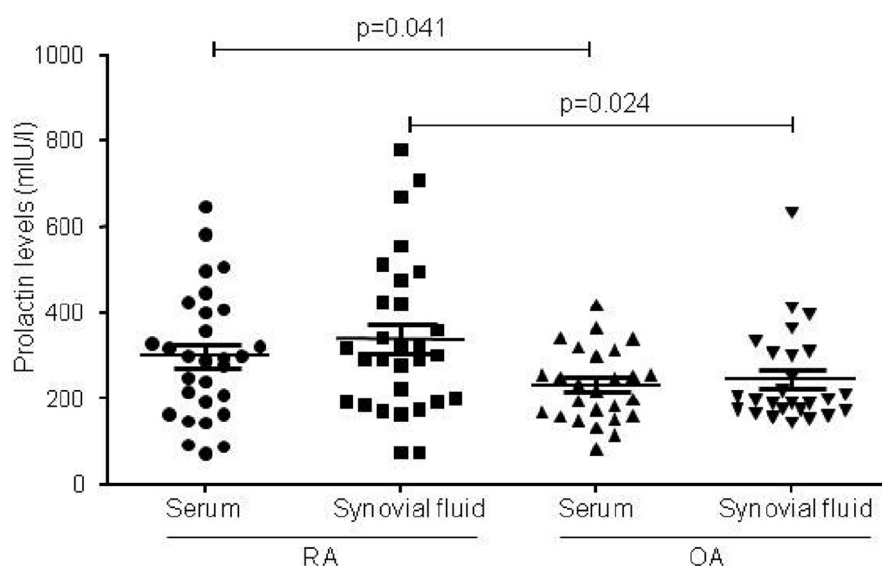


Fig. 1. Serum and synovial fluid levels of prolactin in patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA).

sedimentation rate) +0.014 (patient's assessment of disease activity). RA patients were stratified according to the DAS28 into three groups with low (DAS28 <3.2), moderate (DAS28 3.2-5.1) and high disease activity (DAS28 >5.1). Radiographs of hands, wrists and feet in frontal projection were taken from all patients at baseline. Radiographs were evaluated for joint space narrowing and erosions using modification of Larsen score (26). The total radiographic (Larsen) score was calculated by the grading from 0 (intact bony outlines and normal joint space) to 5 (mutilating changes) in 32 joint regions (26).

Laboratory analysis

The concentration of PRL in serum and synovial fluid was measured in duplicate using an immunoradiometric assay (IRMA, Immunotech, Prague). Samples (50 µl) were incubated with ¹²⁵I-labelled antibody (150000cpm/500 µl) in tubes pre-coated with mice monoclonal antibody for one hour at room temperature by continuous shaking. The contents of tubes were then aspirated. The tubes were washed twice with 2ml of wash solution, and the radioactivity bound to the tubes was measured using a gamma counter. The standards supplied with the kits were calibrated using the inter-

national standard WHO 84/500 (1ng/ml=30.3mIU/l). The limit of sensitivity of the assay was 30mIU/l. The intra- and inter-assay coefficients of variation were determined with the use of pooled patients' serum samples and were 4.5 and 8.8%, respectively. In the test there was no cross reactivity to other human hormones (hLH, hFSH, hTSH, hCG, hGH and HPL) as well as to rheumatoid factor. The levels of anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies (ACPA) and IgM rheumatoid factor (IgM-RF) were analysed by ELISA (Test Line s.r.o., Czech Republic). C-reactive protein (CRP) was determined by nephelometry.

Statistical analysis

The IBM statistics software SPSS version 17 (<http://www.spss.com>) was used for statistical analysis. The levels of PRL were normally distributed, and therefore the student's *t*-test was used to analyse the difference between the two groups. *Pearson's* correlation coefficient was used for correlations between PRL and selected variables. Data are presented as the mean ± standard deviation. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Chi-square test and Student's *t*-test were used for the analysis of the variables of the demographic data.

Results

Increased prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis

The mean serum PRL levels in patients with RA were significantly higher than those in patients with OA (299.55 ± 27.28 vs. 230.59 ± 16.61 mIU/l, *p*=0.041). Similarly, the levels of PRL in synovial fluid were significantly higher in patients with RA than in patients with OA (338.85 ± 33.49 vs. 245.97 ± 21.88 mIU/l, *p*=0.024) (Fig. 1). The levels of PRL in synovial fluid were insignificantly increased compared to PRL levels in the serum in both groups; synovial fluid and serum levels significantly correlated with each other in patients with RA (*r*=0.546, *p*=0.002) as well as in patients with OA (*r*=0.528, *p*=0.006), see Figure 2. The levels of PRL in serum and synovial fluid in both groups were not affected

by disease duration or treatment with non-steroidal antirheumatic drugs or low dose glucocorticoids. The levels of PRL were also not affected by disease modifying anti-rheumatic drugs or biologics (data not shown).

When we stratified the subjects according to hormonal status, serum levels of PRL were significantly higher in postmenopausal, female RA patients ($n=20$) in comparison with the same group of OA patients ($n=15$) (323.1 ± 40.90 vs. 221 ± 22.71 mIU/l, $p=0.037$). However, in the synovial fluid, there was no difference between postmenopausal females with RA and OA (329.1 ± 31.28 vs. 268.80 ± 33.26 mIU/l, $p=0.297$). No differences were observed in serum as well as synovial fluid PRL levels between RA and OA males (data not shown). In the group of RA patients, PRL levels in synovial fluid, but not serum, were significantly higher in postmenopausal females in comparison to RA males (329.1 ± 31.28 vs. 207.6 ± 45.51 mIU/l, $p=0.040$). However, in the OA patients, there were no differences in serum (221 ± 22.71 vs. 243.7 ± 24.8 mIU/l; $p=0.507$) and synovial fluid (268.8 ± 33.26 vs. 214.7 ± 23.42 mIU/l; $p=0.929$) PRL levels between postmenopausal females and males.

Association between prolactin, disease activity and morphological changes in patients with rheumatoid arthritis

Increased synovial fluid PRL levels were found in RA patients suffering from active disease ($\text{DAS28}>5.1$; $n=11$) in comparison with patients with moderate and low disease activity (433.0 ± 62.5 vs. 318.3 ± 42.6 mIU/l, $p=0.045$). Altogether, synovial fluid PRL levels significantly correlated with DAS28 in patients with RA ($r=0.485$, $p=0.010$; Fig. 3). In contrast, we only found a trend for the association between disease activity and serum PRL levels in patients with RA ($r=0.345$, $p=0.078$). On the other hand, the total radiographic (Larsen) score correlated significantly with the serum PRL levels ($r=0.484$, $p=0.014$), but not with that in synovial fluid ($r=0.154$, $p=0.460$; Fig. 4). The levels of PRL in both se-

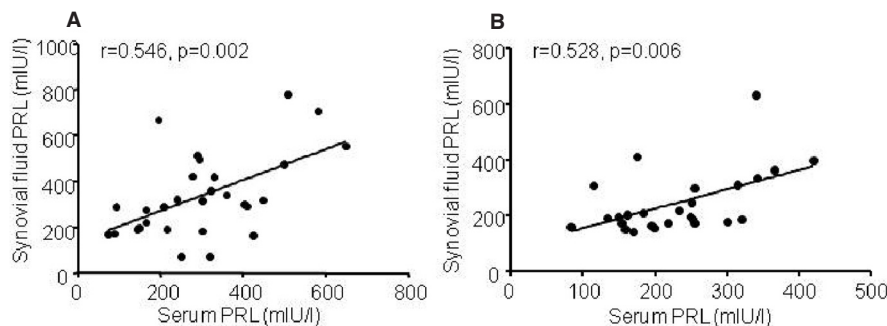


Fig. 2. Correlation between the levels of prolactin (PRL) in the serum and synovial fluid of patients with (A) rheumatoid arthritis (RA) and (B) osteoarthritis (OA).

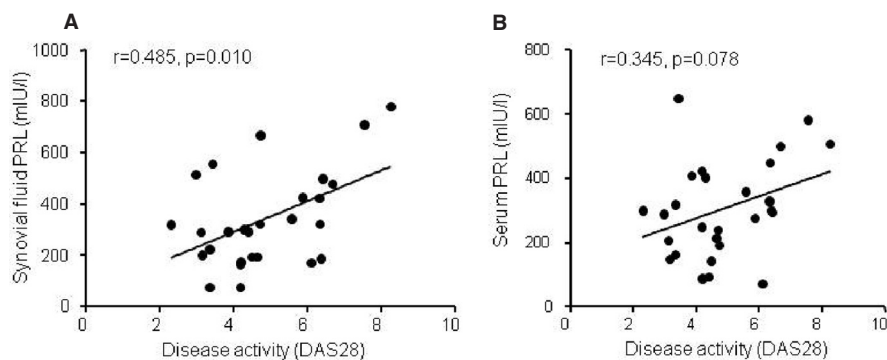


Fig. 3. Association between the levels of prolactin (PRL) in the synovial fluid (A) and serum (B) and disease activity in patients with rheumatoid arthritis (RA).

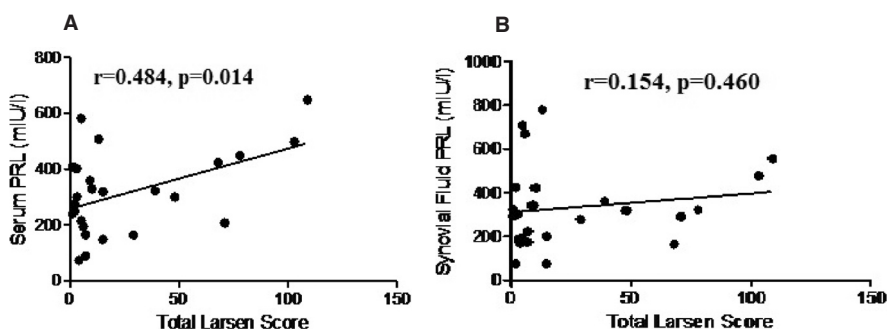


Fig. 4. Correlation between the levels of prolactin (PRL) in the (A) serum and (B) synovial fluid and Total Larsen score in patients with rheumatoid arthritis (RA).

rum and synovial fluid did not correlate with functional status of the disease assessed by HAQ or by WOMAC in RA and OA patients, respectively (data not shown). The levels of PRL in the serum as well as in the synovial fluid were not associated with either the levels of serum CRP or with the serum autoantibodies such as IgM-RF or ACPA (data not shown).

Discussion

In this study, we found increased levels of PRL in both the serum and synovial fluid of patients with RA in comparison to patients with OA. Furthermore, the

levels of synovial fluid PRL correlated significantly with the disease activity and the levels of systemic PRL correlated with the total radiographic score in patients with RA. Our results suggest that the inflammatory course of the disease may contribute to increased PRL levels, which may reflect structural damage in patients with RA. The levels of serum PRL and its relationship with disease activity and severity have been demonstrated in several autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus (15, 16), systemic sclerosis (27) and celiac disease (28). However, previous data

studying serum levels of PRL in RA patients have been inconsistent. The levels of serum PRL have been reported from lower (17), equal (18, 29) to higher (19, 20) in comparison to healthy individuals, and association between the levels of PRL and disease activity have not yet been shown. Similar to the latter data (19, 20), we showed increased PRL levels in serum and in the synovial fluid of patients with RA, which supports the association between the levels of PRL in the serum and synovial fluid (30). Furthermore, the levels of PRL in the synovial fluid significantly correlated with the disease activity of RA, while systemic levels of PRL showed only a tendency for this association and reflected rather the morphologic joint changes of active long-standing RA. Whether PRL could represent a surrogate marker with predictive value for further radiographic progression of the disease or even contribute to structural changes itself has not yet been shown. Some authors have suggested that PRL in synovial fluid is derived from the plasma (13, 31). However, under inflammatory conditions, PRL may be also produced locally in immune cells and resident tissue cells of the joint, including synovial fibroblasts and chondrocytes expressing also PRL receptor (8, 9). There is evidence that PRL serves as a potent immunostimulatory cytokine and may be involved in inflammation and synovial hyperplasia (8, 10-12). PRL is suggested to have dual functions locally in the joint tissues. While in chondrocytes PRL prevents their apoptosis due to activation of antiapoptotic genes (32), it stimulates synovial cell proliferation and increases the synthesis of matrix metalloproteinase (MMP)-3, IL-6 and IL-8 (8). We therefore suggest that the increased levels of PRL produced either locally or derived from the blood circulation may contribute to structural changes associated with the development of RA.

In contrast to local sites, the systemic levels of PRL in our study showed only a tendency for association with the actual disease activity. However, we did not perform analysis of free serum prolactin and macroprolactin because only three RA patients had

moderate hyperprolactinemia. In future studies, it might be interesting to determine whether the disease activity of RA correlates with levels of the free serum PRL as was previously demonstrated in patients with SLE (16). The regulation of PRL synthesis is negatively controlled by dopamine and is positively regulated by stress, exercise, circadian rhythms, the levels of oestrogens and proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 (33, 34). In postmenopausal females, the levels of serum PRL should be similar to that in males, which is what we saw in this study. Increased levels of serum PRL in postmenopausal, female RA patients compared to those in postmenopausal, female OA patients may be due to increased inflammatory activity of the autoimmune disease compared with the non-inflammatory nature of OA. On the other hand, we observed comparable PRL levels between RA and OA male patients. This observation could be explained by the very small number of male patients included in our study, while others have demonstrated increased serum PRL levels in male RA patients compared to OA male patients (20, 35), which supports chronic inflammation as the cause of elevated PRL levels. On the other hand, two works demonstrated that serum levels of PRL were not altered in the beginning of the RA (29, 36). Recently has been found that patients with active RA have decreased PRL response to hypoglycaemia-induced stress, although the response recovered following treatment with disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) (29). Our study is cross-sectional; therefore we are unable to evaluate the effect of anti-inflammatory treatment on the levels of PRL in patients with RA. However, we did not detect any differences in the levels of PRL in patients treated with DMARDs and biologic agents.

In summary, this study shows increased PRL levels in the serum and mainly in the synovial fluid of patients with RA in comparison to control OA subjects. This study shows the correlation between disease activity, structural damage and the levels of PRL in pa-

tients with RA. Our data support the hypothesis that PRL may play a role in the pathology of RA.

References

1. RAU R: Is remission in rheumatoid arthritis associated with radiographic healing? *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: S41-4.
2. SCHEFF G, SIEPER J: Inflammation and repair mechanisms. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27 (Suppl. 55): S33-5.
3. LORIES RJ, BAETEN DL: Differences in pathophysiology between rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27 (Suppl. 55): S10-4.
4. CUTOLO M, STRAUB RH: Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 218-25.
5. CHUANG E, MOLITCH ME: Prolactin and autoimmune disease in humans. *Acta Biomed* 2007; 78: 255-61.
6. MATERAL, MORIM, GEUNA M, BUTTIGLIERI S, PALAESTRO G: Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol* 2000; 109: 47-55.
7. REDELMAN D, WELNIAK LA, TAUB D, MURPHY WJ: Neuroendocrine hormones such as growth hormone and prolactin are integral members of the immunological cytokine network. *Cell Immunol* 2008; 252: 111-21.
8. NAGAFUCHI H, SUZUKI N, KANEKO A, ASAI T, SAKANE T: Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 1890-900.
9. OGUETA S, MUNOZ J, OBREDON E, DELGADO-BAEZA E, GARCIA-RUIZ JP: Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Moll Cell Endocrinol* 2002; 190: 51-63.
10. DOGUSAN Z, BOOK ML, VERDOOD P, YU-LEE LY, HOOGHE-PETERS EL: Prolactin activates interferon regulatory factor-1 expression in normal lympho-hemopoietic cells. *Eur Cytokine Network* 2000; 11: 435-42.
11. CARRENO PC, SACEDON R, JIMENEZ E, VICENTE A, ZAPATA AG: Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J Neuroimmunol* 2005; 160: 135-45.
12. SAHA S, GONZALEZ J, ROSENFELD G, KEISLER H, PEEVA E: Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1743-52.
13. ROVENSKY J, KVETNANSKY R, RADIKOVA Z et al.: Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23: 292-6.
14. MCMURRAY RW, ALLEN SH, PEPMUELLER PH, KEISLER D, CASSIDY JT: Elevated serum prolactin levels in children with juvenile rheumatoid arthritis and antinuclear antibody seropositivity. *J Rheumatol* 1995; 22: 1577-80.
15. MOSZKORZOVA L, LACINOVA Z, MAREK J, MUSILOVA L, DOHNALOVA A, DOSTAL C: Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 807-12.

16. LEANOS-MIRANDAA, CARDENAS-MONDRA-GON G: Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006; 45: 97-101.
17. NAGY E, CHALMERS IM, BARAGAR FD, FRIESEN HG, BERCZI I: Prolactin deficiency in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18: 1662-8.
18. GUTIERREZ MA, GARCIA ME, RODRIGUEZ JA, MARDONEZ G, JACOBELLI S, RIVERO S: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with active rheumatoid arthritis: a controlled study using insulin hypoglycemia stress test and prolactin stimulation. *J Rheumatol* 1999; 26: 277-81.
19. RAM S, BLUMBERG D, NEWTON P, ANDERSON NR, GAMA R: Raised serum prolactin in rheumatoid arthritis: genuine or laboratory artefact? *Rheumatology* 2004; 43: 1272-4.
20. MATEO L, NOLLA JM, BONNIN MR, NAVARRO MA, ROIG-ESCOFET D: High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; 25: 2077-82.
21. NEIDHART M, FLUCKIGER EW: Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology* 1992; 77: 449-55.
22. KULLICH WC, KLEIN G: High levels of macrophage inflammatory protein-1 α correlate with prolactin in female patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1998; 17: 263-4.
23. ROVENSKY J, BAKOSOVA J, PAYER J *et al.*: Increased demand for steroid therapy in hyperprolactinemic patients with rheumatoid arthritis. *Int J Tissue React* 2001; 23: 145-9.
24. ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA *et al.*: The American Rheumatism Associations 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
25. ALTMAN N 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.
26. LARSEN A: How to apply Larsen score in evaluating radiographs of rheumatoid arthritis in longterm studies? *J Rheumatol* 1995; 22: 1974-5.
27. MIRONE L, BARINI A, BARINI A: Androgen and prolactin (Prl) levels in systemic sclerosis (SSc): relationship to disease severity. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1069: 257-62.
28. KAPUR G, PATWARI AK, NARAYAN S, NAND VK: Serum prolactin in celiac disease. *J Trop Pediatr* 2004; 50: 37-40.
29. EIJSBOUTS AM, VAN DEN HOOGEN FH, LAAN RF, SWEEP CG, HERMUS AR, VAN DE PUTTE LB: Decreased prolactin response to hypoglycaemia in patients with rheumatoid arthritis: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 433-7.
30. ROVENSKY J, IMRICH R, RADIKOVA Z *et al.*: Peptide hormones and histamine in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocr Regul* 2005; 39: 1-6.
31. ROVENSKY J, SIMOROVA E, RADIKOVA Z *et al.*: Comparison of hormone transfer to pleural and synovial exsudates. *Endocr Regul* 2006; 40: 29-36.
32. ZERMENO C, GUZMAN-MORALES J, MACOTELA Y *et al.*: Prolactin inhibit the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* 2006; 189: R1-R8.
33. LEITE CM, MACHADO GJ, DORNELLES RC, FRANCI CR: Actions of angiotensin II and dopamine in the medial preoptic area on prolactin secretion. *Physiol Res* 2008; 57: 109-18.
34. GEREZ J, BONFIGLIO J, SOSA S *et al.*: Molecular transduction mechanisms of cytokine / hormone interactions: role of gp130 cytokines. *Exp Physiol* 2007; 92: 806-9.
35. SERIOLO B, FERRETTI V, SULLI A, FASCIOLO D, CUTOLO M: Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966: 258-62.
36. TEMPL E, KOELLER M, RIEDL M, WAGNER O, GRANINGER W, LUGER A: Anterior pituitary function in patients with newly diagnosed rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 350-6.

9.1.4 Annals of the Rheumatic Diseases

Fojtíková M, Černá M, Čejková P, Růžičková Š, Dostál C. Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007, 66:706-707.

IF: 8,111

Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis

Markéta Fojtíková, Marie Černá, Pavlína Čejková, Šárka Růžicková, Ctibor Dostál

Ann Rheum Dis 2007;**66**:706–707. doi: 10.1136/ard.2006.061788

Prolactin (PRL) and its production by lymphocytes have been suggested to play a distinct role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA).^{1,2} PRL acts as a cytokine and influences the maturation and differentiation of immune cells.^{3,4} Extrapituitary PRL synthesis is regulated by an alternative promoter,⁵ which contains a single-nucleotide polymorphism (SNP) at the region –1149 G/T. Higher PRL mRNA expression is associated with the G allele in lymphocytes.⁶ High frequency of the G allele was described in patients with SLE,⁷ but was not confirmed in other work.⁸

We investigated –1149 G/T SNP in 156 patients with SLE and 173 patients with RA, and in 123 healthy individuals (control group). Patients with SLE consisted of 134 (85.9%) women and 22 (14.1%) men, with a mean age of 43.4 years. SLE diagnosis was determined using the American College of Rheumatology classification criteria.⁹ Patients with RA consisted of: 132 (76.3%) women and 41 (23.7%) men, with a mean age of

57.4 years; all fulfilled the RA diagnostic criteria.¹⁰ The control group consisted of 40 (32.5%) women and 83 (67.5%) men, with a mean age of 38.7 years. The study was approved by the ethics committee of The Third Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic.

The PCR–RFLP (restriction fragment length polymorphism) method was used for –1149 G/T SNP detection. During PCR, the 137 base pairs (bp) region of the PRL extrapituitary promoter was amplified by using the following primers: forward 5′-GCAGGTCAAGATAACCTGGA and reverse 5′-CATCTCAGAGTTGAATTTATTTCCTT. For RFLP, *ApoI* restriction endonuclease was used. The genotypes identified were TT homozygote characterised by 120 and 17 bp, GG homozygote characterised by 85, 35 and 17 bp, and GT heterozygote characterised by 120, 85 and 35 bp + 17 bp DNA

Abbreviations: PRL, prolactin; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; SNP, single-nucleotide polymorphism

Table 1 Occurrence of genotype and allele frequencies of –1149 G/T single-nucleotide polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter in Czech patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis and controls, and in patients with SLE according to specific organ involvement

Subject groups	–1149 G/T SNP of the extrapituitary prolactin promoter						
	Genotype			Allele frequency		Number of cases	% [†]
	GG	GT	TT	G	T		
SLE						156	
	Pc ¹	34.60	44.90	20.50	0.57	0.43	NS
		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Specific organ involvement							
Renal	With	63	31.10	52.40	17.50	0.56	0.44
	Without	93	37.60	39.80	22.60	0.57	0.43
	Pc ²		NS	NS	NS	NS	NS
Neuropsychiatric	With	33	30.30	51.50	18.20	0.56	0.44
	Without	123	35.80	43.10	21.10	0.57	0.43
	Pc ²		NS	NS	NS	NS	NS
Cardiac	With	35	28.60	45.70	25.70	0.51	0.49
	Without	121	36.40	44.60	19.00	0.59	0.41
	Pc ²		NS	NS	NS	NS	NS
Pulmonary	With	25	32.00	48.00	20.00	0.56	0.44
	Without	131	35.10	44.30	20.60	0.57	0.43
	Pc ²		NS	NS	NS	NS	NS
Articular	With	117	41.00	43.60	15.40	0.63	0.37
	Without	39	15.40	48.70	35.90	0.40	0.60
	Pc ²		NS	NS	NS	0.0086 [‡]	0.0086 [‡]
Dermal	With	94	36.20	45.70	18.10	0.59	0.41
	Without	62	32.30	43.50	24.20	0.54	0.46
	Pc ²		NS	NS	NS	NS	NS
RA		173	32.40	56.10	11.50	0.60	0.40
	Pc ³		NS	0.039 [*]	NS	NS	NS
Controls		123	39.80	41.50	18.70	0.61	0.39

Pc, P corrected values; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus; SNP, single-nucleotide polymorphism.

Pc values were calculated by the χ^2 test from 2×2 contingency tables of the separate genotype occurrence or allele frequency of (1) each patient with SLE and control group (Pc¹), (2) presence or absence for the clinical feature (Pc²) and (3) each patient with RA and control group (Pc³). Bonferroni correction for multiple comparisons was used.

*OR 1.82, 95% CI 1.14 to 2.94.

†OR 2.56, 95% CI 1.51 to 4.33.

‡OR 0.39, 95% CI 0.23 to 0.6.

fragments. Results were evaluated by χ^2 test with Bonferroni correction.

There was no difference in genotype and allele frequencies in the SLE group compared with healthy Czech individuals (table 1). Our results support previous Italian findings,⁸ but differ from the UK report.⁷ However, with respect to the specific organ manifestation of SLE (table 1), we detected an association between the G allele and articular involvement ($P_c = 0.0086$, OR 2.56, 95% CI 1.51 to 4.33). Based on age when SLE was diagnosed, we observed a GG genotype frequency of 44.8% in the 21–40 years subgroup compared with 15.8% and 24.0% in the <20 years and >40 years subgroup, respectively ($P_c = 0.023$, OR 2.94, 95% CI 1.43 to 5.96). Additionally, we correlated the presence of alleles and genotypes of –1149 G/T SNP with antibodies against antinuclear antibody, double-stranded DNA, Sm, RNP, Ro and La, but no connection was found (data not shown).

Significantly higher heterozygote GT genotype was detected in the RA group compared with the controls ($P_c = 0.039$, OR 1.82, 95% CI 1.14 to 2.94). We observed no differences in homozygote genotypes or in allele frequencies between patients with RA and controls (table 1). Across the groups, no gender differences in genotype distribution or allele frequencies were identified (data not shown).

In conclusion, the presence of the G allele and GG genotype of the PRL extrapituitary promoter –1149 G/T SNP is associated with certain clinical features of SLE. The GT genotype is a predisposing genetic factor for RA. Further investigation on this is required.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by the research programme of the Ministry of Health of the Czech Republic—IGA MZ CR: NR/8191-3/2004.

Authors' affiliations

Markéta Fojtíková, Ctibor Dostál, Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, Prague, Czech Republic

Marie Černá, Pavlína Čejková, Department of Cell and Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Šárka Růžičková, Department of Molecular Biology and Immunogenetics, Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, Prague, Czech Republic

Competing interests: None declared.

Correspondence to: Dr M Fojtíková, Department of Cell and Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic; fmarr@centrum.cz

Accepted 13 January 2007

REFERENCES

- 1 Leães-Miranda A, Cárdenas-Mondragon G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006;**45**:97–101.
- 2 Neidhart M, Gay RE, Gay S. Prolactin and prolactin-like polypeptides in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 1999;**53**:218–22.
- 3 Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci* 1996;**59**:599–614.
- 4 Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 2006;**18**:456–61.
- 5 Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 1994;**8**:356–73.
- 6 Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R, et al. Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;**44**:2358–66.
- 7 Stevens A, Ray DW, Worthington J, Davis JR. Polymorphisms of the human prolactin gene—implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;**10**:676–83.
- 8 Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, Marchini M, Scorza R, Giovanna Danieli M, et al. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003;**64**:274–84.
- 9 Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;**40**:1725.
- 10 Arnett FC. Revised criteria for the classification of rheumatoid-arthritis. *Bull Rheum Dis* 1989;**38**:1–6.

Doppler ultrasonographic characteristics of superficial and deep-flow signals in the knee joint pannus of patients with rheumatoid arthritis

Reiji Kasukawa, Kiori Shio, Yukiko Kanno, Ai Sato, Atsushi Takahashi, Yukio Yamadera, Takashi Kanno

Increased blood flow signals on power Doppler ultrasonography in the proliferated synovium (pannus) of patients with rheumatoid arthritis (RA) have been used to evaluate articular inflammation.^{1–7} Fiocco *et al*⁸ reported that, in patients with RA after 3 months of etanercept treatment, superficial layer vascularity of the knee joint pannus⁸ was significantly reduced, and this occurred before deep-layer vascularity was affected. In all, 97 knee joints of 52 patients with RA were scanned longitudinally and transversely at suprapatellar recess; we measured the vascular resistance, resistance index (RI) and pulsatility index (PI) on spectral Doppler (with the lowest filter setting at 125 Hz) and 167 colour flow signals in the pannus on power Doppler (using a pulse repetition frequency of 1170–1220 Hz with maximum gain eliminating background noise). The flow signals were categorised into superficial flow signals (located in the superficial half of the pannus and fluid space) and deep flow signals (located in the deep

half of the pannus) of either capsular or supracortical pannus. The mean (SD) RI value (0.724 (0.125)) of the 102 superficial flow signals (87 capsular, 15 supracortical) was significantly lower ($p < 0.001$) than the mean (SD) RI value (0.872 (0.172)) of the 65 deep flow signals (43 capsular, 22 supracortical). The difference in mean PI values between superficial and deep signals was less significant ($p = 0.002$) than for mean RI values.

Subsequently, the flow signals in the joints were divided into a superficial pattern and a deep pattern on the basis of their dominant location in the pannus on both longitudinal and transverse scans. Following this, we compared 61 joints with superficial pattern signals and 36 joints with deep pattern signals with respect to the intensities of the colour flow signals (graded 0–3 by the modified Klausner's method),⁹ synovial effusion

Ann Rheum Dis 2007;**66**:707–708. doi: 10.1136/ard.2006.064360

Abbreviation: RA, rheumatoid arthritis

9.1.5 Rheumatology International

Štolfa J, Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Šedová L, Dostál C. Polymorphism of the prolactin extrapituitary promoter in psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 2007, 27:1095-1096.

IF: 1,512

Polymorphism of the prolactin extrapituitary promoter in psoriatic arthritis

Jiří Štolfa · Markéta Fojtíková · Pavlína Čejková · Marie Černá · Liliana Šedová · Ctibor Dostál

Received: 24 January 2007 / Accepted: 20 April 2007 / Published online: 13 June 2007
© Springer-Verlag 2007

Psoriatic arthritis is characterized as seronegative arthritis that affects patients suffering from psoriasis [1]. Aetiology of this condition is still not clear and therapeutic approaches are not always successful. However, good response to bromocriptine therapy decreasing prolactin levels in patients with psoriatic arthritis has been demonstrated in some reports [2, 3]. Prolactin acts as a cytokine and plays a role in pathogenesis of systemic autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [4, 5]. Moreover, high serum prolactin levels were observed in group of patients with psoriasis and link between keratinocytes hyperproliferation and prolactin has been proposed [6]. The peptide hormone prolactin is produced from pituitary lactotrophs and extrapituitary tissues such as lymphocytes as well. Extrapituitary PRL production is regulated by an alternative promoter located 5.8 kb upstream from the pituitary one [7, 8]. A functional single nucleotide polymorphism (SNP) G/T at the position –1149 of this extrapituitary promoter has been observed and in lymphocytes higher PRL mRNA expression found to be connected with G allele [9]. In our work we studied –1149G/T SNP PRL in group of 83 Czech patients with psoriatic arthritis (PsA).

We genotyped –1149G/T SNP in 83 PsA patients and 123 healthy individuals (control group). PsA patients: 43 (51.8%) females, 40 (48.2%) males, average age 54.1 years.

Control group: 40 (32.5%) females and 83 (67.5%) males, average age 38.7 years. This study was approved by the Ethical Committee of the Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague.

PCR-RFLP methodology was used for –1149G/T SNP detection. PCR: The 137 bp region of the PRL extrapituitary promoter was amplified by employing following primers: Forward primer 5' GCAGGTCAAGATAACCTGGA and reverse primer 5' CATCTCAGAGTTGAATTTATTTCCTT. The PCR reaction was run under these conditions: initial temperature 94°C for 2 min, then 32 cycles with 94°C for 17 s, 55°C for 17 s, 72°C for 17 s, and final temperature 72°C for 1 min. RFLP: ApoI restriction endonuclease was used. The three genotypes were identified as indicated: the homozygote TT was characterized by 120 + 17 bp, the homozygote GG by 85 + 35 + 17 bp, and the heterozygote GT genotype by 120 + 85 + 35 + 17 bp DNA fragments. Results were evaluated by Chi square test with Bonferroni correction.

The genotypes and alleles frequency of –1149G/T SNP PRL extrapituitary promoter were similar in group of PsA patients and control group (Table 1). We did not find any differences in genotype and allele distribution between healthy female and male and between female and male patients with psoriatic arthritis, respectively (data not shown). Moreover, we correlated genotype and allele distribution of –1149G/T SNP with clinical feature of psoriatic arthritis, such as age of onset psoriasis and radiological type of psoriatic arthritis. In Table 2 there are results of this correlation, where no significant association was detected.

In conclusion, –1149G/T SNP of the extrapituitary prolactin promoter is not associated with psoriatic arthritis (see Table 1) and its characteristic such as the onset of skin lesion and radiological type of arthritis (see Table 2). Our findings could indicate that –1149G/T SNP prolactin

J. Štolfa · M. Fojtíková (✉) · L. Šedová · C. Dostál
Institute of Rheumatology, Na Slupi 4,
128 50 Prague 2, Czech Republic
e-mail: fmar@centrum.cz

P. Čejková · M. Černá
Department of Cell and Molecular Biology,
Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague,
Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

Table 1 Genotype and allele frequency of the –1149G/T SNP prolactin extrapituitary promoter in patients with psoriatic arthritis and healthy controls

Genotype and allele	PsA <i>N</i> (%)	Controls <i>N</i> (%)	<i>P</i> corr.
GG	31 (37.3)	49 (39.8)	NS
GT	38 (45.8)	51 (41.5)	NS
TT	14 (16.9)	23 (18.7)	NS
G	100 (60.2)	149 (60.6)	NS
T	66 (39.8)	97 (39.4)	NS

SNP single nucleotide polymorphism, *PRL* prolactin, *PsA* psoriatic arthritis, *N* number of cases, *NS* non significant, *P corr.* *P* corrected values were calculated by the Chi squared test from 2 × 2 contingency tables; Bonferroni correction for multiple comparisons was applied

Table 2 Genotype and allele frequency of the –1149G/T SNP extrapituitary prolactin promoter and clinical features of psoriatic arthritis

Type PsA	<i>N</i>	Genotype			Allele frequency	
		GG (%)	GT (%)	TT (%)	G	T
Erosive	55	36.3	50.9	12.8	0.62	0.38
Non-erosive	28	39.3	35.7	25.0	0.57	0.43
	<i>P</i> corr.	NS	NS	NS	NS	NS
Type PV ^c						
Type I ^a	58	36.2	50.0	13.8	0.61	0.39
Type II ^b	22	40.9	31.8	27.3	0.57	0.43
	<i>P</i> corr.	NS	NS	NS	NS	NS

SNP single nucleotide polymorphism, *PRL* prolactin, *PsA* psoriatic arthritis, *PV* psoriasis vulgaris, *N* number of cases, *NS* non significant, *P corr.* *P* corrected values were calculated by the Chi squared test from 2 × 2 contingency tables; Bonferroni correction for multiple comparisons was used

^a Type I—onset of skin lesions before 40 years

^b Type II—onset of skin lesions after 40 years

^c 3 patients were without skin lesions, but classified as psoriatic arthritis

extrapituitary promoter does not belong to pathogenetic factors of psoriatic arthritis, and thus confirm the results of the same analysis in juvenile idiopathic arthritis [10], but

not in SLE, that found G allele of –1149G/T SNP to be a risk factor [8]. Possible alteration of prolactin levels in psoriatic arthritis might be caused by regulation of prolactin release from pituitary gland. Nevertheless, further investigations for explaining the role of prolactin in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis are necessary.

Acknowledgment Supported by the Research program of the Ministry of health of Czech Republic: IGA MZ CR: NR/8191–3/2004.

References

1. Wright V (1989) What is the best treatment approach for a patient with the mutilating pattern of psoriatic peripheral arthritis. *Br J Rheumatol* 28:382
2. Buskila D, Sukenik S, Holcberg G, Horowitz J (1991) Improvement of psoriatic arthritis in a patient treated with bromocriptine for hyperprolactinemia. *J Rheumatol* 18:611–612
3. McMurray RW (2001) Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* 31:21–32
4. Giasuddin ASM, El Sherif AI, El Ojali SI (1998) Prolactin: does it have a role in the pathogenesis of psoriasis? *Dermatology* 197:119–122
5. Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragon G (2006) Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 45:97–101
6. Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T (1999) Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 26:1890–1900
7. Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, DiMattia GE (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit–1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8:356–373
8. Stevens A, Ray D, Alansari A, Hajeer A, Thomson W, Donn R, Ollier WE, Worthington J, Davis JR (2001) Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 44:2358–2366
9. Stevens A, Ray DW, Worthington J, Davis JR (2001) Polymorphisms of the human prolactin gene—implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:676–683
10. Donn RP, Farhan A, Stevens A, Ramanan A, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group (2002) Neuroendocrine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41:930–936

9.1.6 Rheumatology International

Fojtíková M, Čejková P, Bečvář R, Vencovský J, Tomasová Studýnková J, Černá M. Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010, 30: 1691-1693.

IF:1,512

Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis

Markéta Fojtíková · Pavlína Čejková · Radim Bečvář ·
Jiří Vencovský · Jana Tomasová Studýnková ·
Marie Černá

Received: 18 September 2009 / Accepted: 29 November 2009 / Published online: 19 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Sirs,

Increased serum prolactin (PRL) levels have been demonstrated in several autoimmune diseases including polymyositis (PM) and systemic sclerosis (SSc) [1–3]. PRL is produced by the lactotrophs of the pituitary gland, but the immune cells can produce PRL as well, and PRL acts as a cytokine with role in B, T, and dendritic cell maturation [1]. Czuwara-Ladykowska et al. [4] demonstrated higher PRL mRNA synthesis in lymphocytes from patients suffering from SSc than in healthy individuals. Multiple promoters regulate *PRL* gene transcription. Unlike the pituitary production controlled by the pituitary promoter under the influence of transcriptional factor Pit-1, the extrapituitary (including that by immune cells) PRL secretion is regulated by the Pit-1 independent alternative promoter located 5840 bp distal to the start of the PRL transcriptional site [5]. This extrapituitary promoter contains functional single nucleotide polymorphism (SNP) –1149 G/T (rs1341239) in the GATA sequence; G allele leads to higher PRL

mRNA in lymphocytes synthesis [6]. GG genotype has been associated with systemic lupus erythematosus (SLE) [6, 7], while TT genotype was identified as protective for non-Hodgkin and follicular lymphoma, and rheumatoid arthritis development [8, 9].

In this study, we looked for distribution of allele and genotype of the –1149 G/T SNP of the extrapituitary PRL promoter in 75 patients with SSc (average age 61.4), in 47 subjects with PM (average age 57.8), in 68 patients with dermatomyositis (DM) (average age 58.3), and in 123 healthy Czech individuals (blood donors and medical students, average age 39.7). SSc and PM/DM patients met classification criteria for these illnesses [10, 11]. PCR–RFLP methodology was used for –1149G/T SNP detection [7]. Briefly, we amplified 137 bp region of the PRL extrapituitary promoter and for restriction used ApoI endonuclease. We determined the following genotypes: the homozygote TT characterized by 120 + 17 bp, the homozygote GG by 85 + 35 + 17 bp, and the heterozygote GT by 120 + 85 + 35 + 17 bp DNA fragments. Results were evaluated by χ^2 test with Bonferroni correction. Control group was in Hardy–Weinberg equilibrium.

The genotype and allele distribution did not show any significant differences in groups of PM, DM, and SSc patients compared to healthy individuals (Table 1), and we detected neither gender distribution differences (data not shown) nor correlation with specific clinical or serological manifestation of these diseases (lung fibrosis, type of scleroderma, antiScl-70 and antiJo-1 positivity) (Table 1). However, we found a significant inverse association between TT genotype in SSc patients with disease onset after 45 years compared to individuals with SSc and diseases onset prior to 45 years (2/47 = 4.1 vs. 6/18 = 25%, respectively; *P* corrected = 0.02; OR = 0.13; CI (95%): 0.02–0.69).

M. Fojtíková (✉) · R. Bečvář · J. Vencovský ·
J. Tomasová Studýnková
Institute of Rheumatology, Na Slupi 4,
12850 Prague 2, Czech Republic
e-mail: fmar@centrum.cz

P. Čejková · M. Černá
Department of General Biology and Genetics,
Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague,
Ruska 87, 10000 Prague 10, Czech Republic

P. Čejková
Department of Anthropology and Human Genetics,
Faculty of Science, Charles University in Prague,
Vinicna 7, 12843 Prague 2, Czech Republic

Table 1 Genotype and allele distribution of the prolactin (PRL) extrapituitary promoter –1149 G/T SNP in the autoimmune diseases: Polymyositis (PM), Dermatomyositis (DM), Systemic Sclerosis (SSc), and healthy individuals (Controls)

Characterization of tested groups		PRL extrapituitary promoter –1149 G/T SNP				
		Genotype			Allele	
		GG	GT	TT	G	T
PM	<i>n</i> = 47 (%)	20 (42.5)	21 (44.7)	6 (12.8)	61 (64.9)	33 (35.1)
	<i>P</i> ₁	ns	ns	ns	ns	ns
Jo-1 positive (34.0%)	% (<i>P</i> ₂)	37.5 (ns)	56.3 (ns)	6.2 (ns)	65.6 (ns)	34.4 (ns)
CPM (4.3%)	% (<i>P</i> ₂)	50.0 (ns)	50.0 (ns)	0 (ns)	75 (ns)	25 (ns)
DM	<i>n</i> = 68 (%)	19 (27.9)	35 (51.5)	14 (20.6)	73 (53.7)	63 (46.3)
	<i>P</i> ₁	ns	ns	ns	ns	ns
Jo-1 positive (19.1%)	% (<i>P</i> ₂)	15.5 (ns)	46.1 (ns)	38.4 (ns)	38.5 (0.03) ^a	61.5 (0.03) ^b
CDM (13.2%)	% (<i>P</i> ₂)	22.2 (ns)	55.6 (ns)	22.2 (ns)	50 (ns)	50 (ns)
SSc	<i>n</i> = 75 (%)	31 (41.3)	36 (48.0)	8 (10.7)	98 (65.3)	52 (34.7)
	<i>P</i> ₁	ns	ns	ns	ns	ns
Scl-70 positive (45.2%)	% (<i>P</i> ₂)	51.5 (ns)	42.4 (ns)	6.1 (ns)	72.7 (ns)	27.3 (ns)
Lung Fibrosis (40.3%)	% (<i>P</i> ₂)	41.4 (ns)	51.7 (ns)	6.9 (ns)	67.2 (ns)	32.8 (ns)
lSSc (54.6%)	% (<i>P</i> ₂)	46.3 (ns)	48.8 (ns)	4.9 (0.03) ^c	70.7 (ns)	29.3 (ns)
dSSc (38.6%)	% (<i>P</i> ₂)	34.5 (ns)	48.3 (ns)	17.2 (ns)	58.7 (ns)	41.3 (ns)
Onset after 45 years (65.3%)	% (<i>P</i> ₂)	40.8 (ns)	55.1 (ns)	4.1 (0.007 ^d ;0.01 ^e)	68.3 (ns)	31.3 (ns)
Controls	<i>n</i> = 123 (%)	49 (39.8)	51 (41.5)	23 (18.7)	149 (60.6)	97 (39.4)

n Number of cases, *P*₁ *P* value was determined by the χ^2 test comparing each group (PM, DM, SSc) and controls, *P*₂ *P* value was determined by the χ^2 test comparing positive/negative feature and comparing each feature and controls, *P*_c *P* value corrected for multiple comparisons (3 detected genotypes, 2 alleles), *ns* not significant, *ANA* Antinuclear antibodies, *Jo-1* antibodies against histidyl-tRNA synthetase, *Scl-70* antibodies against DNA topoisomerase I, *lSSc* limited cutaneous SSc, *dSSc* diffuse cutaneous SSc, *CPM* cancer associated Polymyositis, *CDM* cancer-associated Dermatomyositis

^a *P* value is defined by χ^2 test when compare Jo-1 positive DM and healthy controls. *P*_c = 0.06, *ns*

^b *P* value is defined by χ^2 test when compare Jo-1 positive DM and healthy controls. *P*_c = 0.06, *ns*

^c *P* value is defined by χ^2 test when compare SSc patients with limited disease compare to controls. *P*_c = 0.09, *ns*

^d *P* value is defined by χ^2 test when compare SSc patients with disease onset prior and after 45 years. *P*_c = 0.02; OR 0.13; CI (95%) 0.02–0.69

^e *P* value is defined by χ^2 test when compare SSc patients with disease onset after 45 years and controls. *P*_c = 0.04; OR 0.2; CI (95%) 0.04–0.82

Thus, genotype –1149 TT of the extrapituitary PRL promoter SNP (via reduced PRL promoter activity and consequently lower PRL levels in lymphocytes) seems to be associated with decreased risk to SSc development in older age. With regards to the age of onset, no differences in allele or genotype frequencies in patients with polymyositis and dermatomyositis were found. We can assume that this polymorphism might be somewhat specific for SSc and therefore warrants further investigation into PRL genetics and its levels during the disease course.

Acknowledgment This study was supported by the grant of the Czech Ministry of Health: NR/9292–3.

References

- Orbach H, Zandman-Goddard G, Amital H et al (2007) Novel biomarkers in autoimmune diseases—prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 1109:385–400
- La Montagna G, Meli R, Criscuolo T et al (2004) Bioactivity of prolactin in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 22:145–150
- Mirone L, Barini A, Barini A (2006) Androgen and prolactin (Prl) levels in systemic sclerosis (SSc) relationship to disease severity. *Ann NY Acad Sci* 1069:257–262
- Czuwara-Ladykowska J, Sicinska J, Olsewska M et al (2006) Prolactin synthesis by lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Biomed Pharmacother* 60:152–155
- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R et al (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 8:356–373
- Stevens A, Ray DW, Worthington J et al (2001) Polymorphisms of the human prolactin gene—implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:676–683
- Fojtikova M, Cerna M, Cejkova P et al (2007) Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:706–707
- Skibola CF, Bracci PM, Paynter RA et al (2005) Polymorphisms and haplotypes in the cytochrome P450 17A1, prolactin, and catechol-O-methyltransferase genes and non-Hodgkin lymphoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2391–2401

9. Lee YC, Raychaudhuri S, Cui J et al (2009) The PRL-1149 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 60:1250–1254
10. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee (1980) Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 23:581–590
11. Bohan A, Peter JB (1975) Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 292:344–347

9.2 Seznam publikací in extenso bez vztahu k disertační práci

Publikace s impact faktorem

Čejková P, Fojtíková M, Černá M. Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmun Rev* 2009, 9: 23-27 IF: 6,368

Romžová M, Hohenadel D, Kološtová K, Pinterová D, Fojtíková M, Růžičková S, Dostál C, Bošák V, Rychlík I, Černá M: NFκB and its inhibitor IκB in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol*, 2006, 67:706-713 IF: 2,605

Recenzované publikace, bez impact faktoru

Fojtíková M, Černá M, Pavelka K. Souborný pohled na efekt hormonu a cytokinu prolaktinu v rozvoji a patogenezi autoimunitních onemocnění. *Vnitř Lék* 2010, 56: 402-13

Dostál C, Fojtíková M, Lacinová Z, Černá M, Moszkorzová L, Zvárová J, Marek J. Stresová odezva prolaktinu u nemocných se systémovým lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritidou (RA) a u zdravých kontrol. *Vnitř Lék* 2007, 53: 1265-8

9.3 Seznam hlavních prezentací

Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Růžičková Š, Štolfa J, Dostál C: Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and psoriatic arthritis. The Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) Barcelona, Španělsko 6/2007

Fojtíková M, Štolfa J, Lippert J, Tomasová Studýnková J, Šedová L, et al.: Differences in serum prolactin levels between psoriatic arthritis, psoriasis vulgaris, rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) Londýn, Velká Británie 5/2011

Fojtíková M, Novota P, Tegzová D, Pavelka K, Svobodova R, Černá M: Polymorphisms of the major histocompatibility complex class I chain – related gene A (MICA) in SLE genetics. 8th European Lupus Meeting Porto, Portugalsko 4/2011

Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Dostál C: Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in systemic lupus erythematosus. 7th Central European Congress of Rheumatology (CECR) Praha, Česká republika 5/2008

Černá M, Fojtíková M, Novota P, Štolfa J, Kovář J and Dostál C: Microsatellite polymorphism of MHC class I chain-related A gene in Czech patients with autoimmune diseases. 7th Central European Congress of Rheumatology (CECR) Praha, Česká republika 5/2008

Fojtíková M, Novota P, Čejková P, Tegzová D, Pešičková S, Pavelka K, Černá M: Risk and Protective Alleles of the Major Histocompatibility Complex Class I chain – related Gene A (MICA) in SLE Pathogenesis. 9th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference Molecular determinant of T Cell Immunity Štrbské pleso, Slovensko 9/2010

Fojtíková M, Novota P, Tegzová D, Pavelka K, Černá M: MICA-A5.1 allele of the transmembrane microsatellite polymorphism may increase the risk for SLE development in

HLA - predisposed individuals. 7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovinsko 5/2010

Fojtíková M, Novota M, Štolfa J, Dostál C, Černá M. Psoriatic arthritis is associated with HLA-Cw*0602 allele, but not with MIC-A transmembrane polymorphisms in Czech patients. 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugalsko 9/2008

Čejková P, Fojtíková M, Brož J, Trešlova L, Anděl M, Černá M Expression of prolactin, Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 by monocytes from patients with late-onset Type 1 Diabetes. 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugalsko 9/2008

Čejková P, Fojtíková M, Dostál C, Trešlová L, Marek J, Černá M: Insulin promoter VNTR polymorphism - association with diabetes mellitus with onset after the age of 35 years. 5th International Congress on Autoimmunity Sorrento, Itálie 11/ 2006

Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Dostál C: G allele of the SNP-1149G/T of the Extrapituitary prolactin promoter is involved in the SLE pathogenesis. 4th Meeting of Young Rheumatologists Across Europe (MYRACE) Vídeň, Rakousko 1/2008

Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Dostál C: Jednonukleotidový funkční polymorfismus - 1149G/T distálního promotoru genu pro prolaktin ve vztahu k systémovému lupus erythematoses. 8.SVK 1. LF UK 5/2007

Černá M, Romžová M, Kološtová K, Pintérová D, Fojtíková M, Růžičková Š, Bošák V, Dostál C: Vztah NF-κB a jeho inhibitoru IκB k autoimunitním revmatologickým chorobám. 51. Výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Banská Bystrica, Slovensko 9/2007

Fojtíková M, Čejková P, Černá M, Růžičková Š, Štolfa J, Dostál C: Polymorfismus v oblasti mimohypofyzárního promotoru genu pro prolaktin u systémového lupus erythematoses, revmatoidní artritidy a psoriatické artritidy. 51. Výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Banská Bystrica, Slovensko 9/2007

10. Literatura

1. **Peterson P**, Org T, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008, 8: 948-957
2. **Corthay K**. How do regulatory T cells do? *Scan J Immunol* 2009, 70: 326-336.
3. **Smith-Garvin JE**, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009, 27: 591-619
4. **Ramsey C**, Hässler S, Marits P, et al. Increased antigen presenting cell-mediated T cell activation in mice and patients without the autoimmune regulator. *Eur J Immunol* 2006, 36: 305-17
5. **Gladman DD**, Farawell VT, Pellet F, et al. HLA is a candidate region for psoriatic arthritis. evidence for excessive HLA sharing in sibling pairs. *Hum Immunol* 2003, 64: 887-9
6. **International Consortium for Systemic Lupus erythematosus Genetics (SLEGEN)**, Harley JB, Alercon-Riquelme ME, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008, 40: 204-10
7. **Heel DA**, Franke L, Hunt KA, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 2007, 39: 827-9
8. **Duerr RH**, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006, 314 (5804): 1461-3
9. **International Multiple Sclerosis Genetics Consortium**, Hafler DA, Compston A, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007, 357 (9): 851-62
10. **Hyttinen V**, Kaprio J, Kinnunen L, et al. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 2003, 52: 1052–1055
11. **Grant SF**, Thorleifsson G, Frigge ML, et al. The inheritance of rheumatoid arthritis in Iceland. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 2247–54
12. **Nistico L**, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006, 55: 803-808
13. **Hemminki K**, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia* 2009, 52: 1820-8

14. **Hemminki K**, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial association of inflammatory bowel diseases with other autoimmune and related diseases. *Am J Gastroenterol* 2010, 105: 139 – 47
15. **Hemminki K**, L X, Sundquist K, Sundquist J. Shared familial aggregation of susceptibility to autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2009, 60: 2845-47
16. **Hemminki K**, Lii X, Sundquist J, Sundquist K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 2009, 60: 661–668
17. **Barera G**, Bonfanti R, Viscardi M, et al. ccurrence of celiac disease after onset of type 1 diabetes: a 6-year prospective longitudinal study. *Pediatrics*. 2002 May;109(5):833-8.
18. **Goodwin G**, Volkening LK, Laffel LMB. Younger Age at Onset of Type 1 Diabetes in Concordant Sibling Pairs Is Associated With Increased Risk for Autoimmune Thyroid Disease. *Diabetes Care* June 1, 2006 29:1397-1398
19. **Bronson PG**, Komorowski LK, Ramsay PP, et al. Analysis of Maternal–Offspring HLA Compatibility, Parent-of-Origin Effects, and Noninherited Maternal Antigen Effects for HLA–DRB1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010, 62: 1712-1717
20. **The Wellcome Trust Case Control Consortium**. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007, 447: 661–83
21. **Tamiya G**, Shinya M, Imanishi T, et al. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 2005, 14: 2305-2321
22. **van der Helm AHM**, Cornelis F, Huizinga TWJ. Genetics for rheumatologists. In: *Eular Compendium on Rheumatic Diseases*. 2009, BMJ publishion group and European League against Rheumatism. 1.edition, 230-244.
23. **Liu Y**, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, et al. A Genome-Wide Association Study of Psoriasis and Psoriatic Arthritis Identifies New Disease Loci. *PLoS Genet* 2008, 4:e1000041
24. **Todd JA**, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007, 39: 857 – 864
25. **Wellcome Trust Case Control Consortium**, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium, Burton PR, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007, 39: 1329-37
26. **Heel DA**, Fisher SA, Kirby A, et al. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004, 13: 763 -70

27. **Einarsdottir E**, Koskinen LLE, Dukes E, Kainu K, Suomela S, et al. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease. *BMC Med Genet* 2009, 28, 10:8
28. **Brand OJ**, Lowe CE, Heward JM, et al. Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66: 508-12.
29. **Rodriguez MR**, Nunez-Roldan A, Aquilar F, et al. Association of the CTLA4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2002, 63: 76-81
30. **Torres B**, Aquilar F, Franco E, et al. Association of the CT60 marker of the *CTLA4* gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 2211-15
31. **Einarsdottir E**, Soderstrom I, Lofgren-Burström A, et al. The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Hum Genet* 2003, 11: 81-4
32. **Garner CP**, Murray JA, Ding YC, et al. Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in a US population. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 4219-4225
33. **Festen EA**, Goyette P, Scott R, Annese V, et al. Genetic variants in the region harbouring IL2/IL21 associated with ulcerative colitis. *Gut* 2009, 58 :799-804.
34. **Coenen MHJ**, Trynka G, Heskamp S, et al. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease *Hum Mol Genet* 2009, 18: 4195-4203
35. **Sawalha AH**, Kaufman KM, Kelly JA, et al. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 458-61
36. **Karason A**, Gudjonsson JE, Upmanyu R, et al.: A Susceptibility Gene for Psoriatic Arthritis Maps to Chromosome 16q: Evidence for Imprinting. *Am J Hum Genet* 2003, 72: 125-131
37. **Graham RR**, Cotsapas C, Davies L, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 2008, 40: 1059-1061
38. **Kawasaki A**, Ito S, Furakawa H, Hayashi T, et al. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1 with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Res Therapy* 2010, 12: R174

39. **Fung EZ**, Smyth DJ, Howson JM, et al. Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun* 2009, 10: 188-19
40. **Nair RP**, Duffin KC, Helms C, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* 2009, 41: 199-204
41. **Begovich AB**, Carlton VE, Honigberg LA, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004, 75: 330-7
42. **Bottini N**, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004, 36: 337-8
43. **Smyth D**, Cooper JD, Collins JE, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004, 53: 3020-3
44. **De Jager PL**, Sawcer S, Waliszewska A, et al. Evaluating the role of the 620W allele of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in Crohn's disease and multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet* 2006, 14: 317- 21
45. **Remmers EF**, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007, 357: 977–86
46. **Rueda B**, Broen J, Simeon C, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 2071-2077
47. **Goffin V**, Shiverick KT, Kelly P, Martial J. Sequence-Function Relationships Within the Expanding Family of Prolactin, Growth Hormone, Placenta Lactogen, and Related Proteins in Mammals. *Endocr Rev* 1996, 17: 385-410
48. **Thorsby E**, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: genes involved and possible mechanisms. *Transplant Immunol* 2005, 14: 175-182
49. **Neijssen J**, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes L. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 2005, 44 (7029): 83-8
50. **Berger AC**, Roche PA. MHC class II transport as a glance. *J Cell Sci* 2009, 122: 1-4
51. **Caillat-Zucman S**. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2009, 78: 1-8
52. **Hunt KA**, Heel DA. Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut* 2009, 58: 473-476

53. **Ge S**, Danino V, Hinton HC, Granfors K. Microarray analysis of response of Salmonella during infection of HLA-B27- transfected human macrophage-like U937 cells. *BMC Genomics* 2010, 11: 456
54. **Baisch JM**, Weeks T, Giles R, et al. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990, 322: 1836–1841
55. **Heward JM**, Allahabadia A, Daykin J, et al. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 3394-7
56. **Nejentsev S**, Reijonen H, Adojaan B, et al. The effect of HLA-B allele on the IDDM risk defined by DRB1*04 subtypes and DQB1*0302. *Diabetes* 1997, 46: 1888-9
57. **Gudjonsson JE**, Karason A, Runarsdottir EH, et al. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients – an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *J Invest Dermatol* 2006, 126: 740-745
58. **Coraddu F**, Reyes-Yanez MP, Parra A, et al. HLA associations with multiple sclerosis in the Canary Islands. *J Neuroimmunol* 1998, 87: 130-5
59. **Grumet FC**, Coukell A, Bodmer JG, et al. Histocompatibility (HLA) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease *N Engl J Med* 1971, 285: 193–196
60. **Whittingham S**, Mathews JD, Schanfield MS, et al. HLA and Gm genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1983, 21: 50–57
61. **Fernando MM**, Stevens CR, Sabeti PC, et al. Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS Genet* 2007, 3: e192
62. **Smerdel-Ramoya A**, Finholt C, Lilleby V, et al. Systemic lupus erythematosus and the extended major histocompatibility complex - evidence for several predisposing loci. *Rheumatology* 2005, 44: 1368-1373
63. **McHugh NJ**, Owen P, Cox B, et al. MHC class II, tumour necrosis factor α , and lymphotoxin α gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006, 65: 488-94
64. **So AK**, Fielder AH, Warner CA, et al. DNA polymorphism of major histocompatibility complex class II and class III genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1990, 35: 144–147

65. **Hashimoto H**, Nishimura Y, Dong RP, et al. HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1994, 23: 191-6
66. **Fries JF**, Wolfe F, Apple R, et al. HLA–DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 2320-2329
67. **Balsa A**, Cabezón A, Orozco G, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 2010, 12: R62
68. **Van der Helm-van Mil AH**, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis Res Ther* 2008, 10: 205
69. **Reveile JD**. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, 20: 601-609
70. **Queiro R**, Gonzalez S, Lopez-Larrea C, et al. HLA-C locus alleles may modulate the clinical expression of psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R185
71. **Arnett FC**, Gourh P, Shete S, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 2010, 69: 822-27
72. **Chinoy H**, Salway F, Fertig N, et al. In adult onset myositis, the presence of interstitial lung disease and myositis specific associated antibodies are governed by HLA class II haplotype, rather than by myositis subtype. *Arthritis Res Ther* 2006, 8: R13
73. **O'Hanlon TP**, Rider LG, Marnyrova G, et al. HLA polymorphisms in African Americans with idiopathic inflammatory myopathy: allelic profiles distinguish patients with different clinical phenotypes and myositis autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 3670-81
74. **Bahram S**, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 6259–6263
75. **Zhang Y**, Stastny P. MICA antigens stimulate T cell proliferation and cell-mediated cytotoxicity. *Hum Immunol* 2006, 67: 215–22
76. **Groh V**, Steine A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998, 279: 1737–1740
77. **Fodil N**, Laloux L, Wanner V, et al. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 1996, 44: 351-7

78. **Ota M**, Katsuyama Y, Mizuji N, et al. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 1997, 49: 448–454
79. **Steinle A**, Li P, Morris DL, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001, 53: 279-87
80. **Rueda B**, Pascual M, Lopez-Nevot MA, et al. A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats. *Tissue Antigens* 2002, 60: 526–528
81. **Gambelunghe G**, Brozzeti AL, Ghaderi M, et al. MICA A8: a new allele within MHC class I chain-related A transmembrane region with eight GCT repeats. *Hum Immunol* 2006, 67: 1005–1007
82. **Gaedieri S**, Leelayuwat C, Townend DC, et al. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics* 1997, 45: 209-216
83. **Petersdorf EW**, Shuler KB, Longton GM, et al. Population study of allelic diversity in the human MHC-class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999, 49: 605-12
84. **Zeft A**, Shear ES, Thompson SD, et al. Familial Autoimmunity: Maternal Parent-of-Origin Effect in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rheumatol* 2008, 27: 241-44
85. **Akolkar PN**, Gulwani-Akolkar B, Heresbach D, et al.: Differences in risk of Crohn's disease in offspring of mothers and fathers with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997, 92: 2241-4
86. **Perl A**. Role of endogenous retroviruses in autoimmune diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2003, 23: 123-143
87. **Johnston A**, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, et al. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 2004, 138: 83-93
88. **Miller-Kittrell M**, Sparer TE. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology* 2009, 6: 4
89. **Burek CL**, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun* 2009, 33: 183-9
90. **Powell JJ**, Van de Water J, Gershwin ME. Evidence for the role of environmental agents in the initiation or progression of autoimmune conditions. *Environ Health Perspect* 1999, 107 (Supl 5): 667 - 72

91. **Richardson B.** DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol* 2003, 109: 72-9
92. **Oelke K,** Lu Q, Richardson D, et al. Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG synthesis by lupus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 1850-1860
93. **Stojanovich L.** Stress and autoimmunity. *Autoimmunity Rev* 2010, 9: A271 – A276
94. **Lockshin MD.** Sex differences in autoimmune disease. *Lupus* 2006, 15: 753-756
95. **Šterzl I.** Přehledná imunoendokrinologie (patofyziologie, diagnostika, terapie). Jessenius Maxdorf, 2006 s. 98-108
96. **Li L,** Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100: 4807-12
97. **Simoncini T,** Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH-kinase. *Nature* 2000, 407: 538-41
98. **Cohen-Solal JF,** Jeganathan V, Hill L, et al. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008, 17: 528-32
99. **Grimaldi CM.** Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 2006, 18: 456-61
100. **Krishnan N,** Thellin O, Buckley DJ, et al. Prolactin supresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 2003, 144: 2102-2110
101. **Gingras MC,** Margolin JF. Differential expression of multiple unexpected genes during U937 cell and macrophage differentiation detected by suppressive subtractive hybridization. *Exp Hematol* 2000, 28: 65-76
102. **Wu H,** Devi R, Malarkey WB. Expression and localization of prolactin messenger ribonucleic acid in the human immune system. *Endocrinology* 1996, 137: 349 - 353
103. **Matera L,** Mori M, Geuna M, et al. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol* 2000, 109: 47-55
104. **Chavez-Rueda K,** Hernandez J, Zenteno E, et al. Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol* 2005, 116: 182–91

105. **Tripathi A**, Sodhi A. Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophages in vitro on treatment with prolactin and growth hormone: involvement of protein tyrosine kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase signal transduction pathways. *Mol Immunol* 2007, 44: 3185
106. **Tripathi A**, Sodhi A. Prolactin-induced production of cytokines in macrophages in vitro involves JAK/STAT and JNK MAPK pathways. *Int Immunol* 2008, 20: 327–336.
107. **Matalka KZ**. Prolactin enhances production of interferon- γ , interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor- α in a stimulus-specific manner. *Cytokine* 2003, 21: 187 -194
108. **Majumder B**, Biswas R, Chattopadhyay U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer* 2002, 97: 493-500
109. **Dimitrov S**, Lange T, Ehm HL, Born J. A regulatory role of prolactin, growth hormone, and corticosteroids for human T-cell production of cytokines. *Brain Behav Immun* 2004, 18: 368-74
110. **Takizawa K**, Kitani S, Takeuchi F, Yamamoto K. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocrine J* 2005, 52: 635-641
111. **Mukherjee A**, Helbert M, Ryder WDJ, et al. Failure of antibody response to polysaccharide antigen in treated panhypopituitary adults. *Clin Exp Immunol* 2009, 156: 271-277
112. **Lahat N**, Miller A, Shtiller R, Toubi E. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993, 47: 35-40
113. **Clevenger CV**, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction *Lupus* 2001, 10: 706-718
114. **Freeman ME**, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000, 80: 1523–1631
115. **Gerlo S**, Davis JR, Mager DL, Kooijman R. Prolactin in man: a tale of two promoters. *Bioessays* 2006, 28: 1051-5
116. **Gellersen B**, Kempf R, Telgmann R, et al. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Moll Endocrinol* 1994, 8: 356-73
117. **Lavalle C**, Loyo E, Paniagua R, et al. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987, 14: 268-272

118. **McMurray RW**, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: Review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 2100-2110
119. **Leanos-Miranda A**, Cardenas-Mondragon G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006, 45: 97-101
120. **Cardenas-Mondragon G**, Ulloa-Aguirre A, Isordia-Salas I, et al. Elevated serum bioactive prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease activity as disclosed by homologous receptor bioassays. *J Rheumatol* 2007, 34: 1514-1521
121. **Vera-Lastra O**, Mendez C, Jara LJ, et al. Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment. *J Rheumatol* 2003, 30: 2140-2146
122. **Leanos-Miranda A**, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001, 44: 866-875
123. **Neidhart M**, Fluckiger EW. Hyperprolactinaemia in hypophysectomized or intact male rats and the development of adjuvant arthritis. *Immunology* 1992, 77: 449–455
124. **Ratkay LG**, Weinber J, Waterfield JD. The effect of lactation in the post-partum arthritis of MRL-lpr/fas mice. *Rheumatology* 2000, 39: 646-651
125. **Mateo L**, Noila JM, Bonnion MR et al. High serum prolactin levels in men with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998, 25: 2077 - 2082
126. **Macejová Ž**, Trejbal D, Oetterová M, Lazúrová I. Prolaktín – marker aktivity systémových ochorení spojiva? *Vnitř Lék* 2008, 54: 1039-1044
127. **Mirone L**, Barini A, Barini A. Androgen and prolactin (Prl) levels in systemic sclerosis (SSc): relationship to disease severity. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1069: 257-262
128. **Czuwara-Ladykowska J**, Sicinska J, Olszewska M, et al. Prolactin synthesis by lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Biomed Pharmacother* 2006, 60: 152-155.
129. **Orbach H**, Zandman-Goddard G, Amital H, et al. Prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci* 2007, 1109: 385-400
130. **Yamasaki K**, Horiuchi I, Minohara M, et al. Hyperprolactinemia in optico-spinal multiple sclerosis. *Intern Med* 2000, 39: 296-299

131. **Legakis I**, Petroyianni V, Saramantis A, Tolis G. Elevated prolactin to cortisol ratio and polyclonal autoimmune activation in Hashimoto's thyroiditis. *Horm Metab Res* 2001, 33: 585-589
132. **Kapur G**, Patwari AK, Narayan S, Nand VK. Serum prolactin in celiac disease. *J Trop Pediatr* 2004, 50: 37-40
133. **Kanda N**, Shibata S, Tada Y, et al. Prolactin enhances basal and IL-17 induced CCL20 production by human keratinocytes. *Eur J Immunol* 2009, 39: 996-1006
134. **Sanches Regana M**, Millet P. Psoriasis in association with prolactinoma: three cases. *Br J Dermatol* 2000, 143: 864-867
135. **McCarty DJ**, Manzi S, Medsger TA Jr, et al. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995, 38: 1260-70
136. **Mok CC**, To CH, Ho LY, Yu KL. Incidence and mortality of systemic lupus erythematosus in a southern Chinese population, 2000-2006. *J Rheumatol* 2008, 35: 1978-82.
137. **Bernatsky S**, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum* 2006, 54: 2550-7
138. **Liu MF**, Weng CT, Weng MY. Variable increased expression of program death-1 and program death-1ligands on peripheral mononuclear cells is not impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2009, 2009 : 406136
139. **Wong CK**, Lit LCW, Tam LS. Abberant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005, 44 : 989-994
140. **Hoffman R**, Maldonado ME. T-cells and systemic lupus erythematosus. In :Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS : *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007; 95-102
141. **Rajagopalan S**, Zordan T, Tsokos GC, Datta SK. Pathogenesis anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: Isolation of CD4-8 T helper cell lines that express the gamma delta T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 7020-7024
142. **Talken BL**, Bailey CW, Reardon SL, et al. Structural analysis of TCRalpha and beta chains from human T-Cells clones specific for small nuclear ribonucleoprotein polypeptides Sm-D, Sm-B, and U1-70kD: TCR complementarity determining region 3 usage appears highly conserved. *Scand J Immunol* 2001, 54: 204-210

143. **De Silva-Udawatta M**, Kumar SR, Greidinger EL, et al. Cloned human TCR from patients with autoimmune disease can respond to two distinct autoantigens. *J Immunol* 2004, 172: 3940-3947
144. **Greidinger EL**, Gazitt T, Jaimes KF, et al. Human T cell clones specific for heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2 autoantigen from connective tissue disease patients provide help for autoantibody production. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 2216-2222
145. **Xu L**, Zhang L, Yi Y, et al. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* 2004, 10: 411-415.
146. **Desai-Mehta A**, Lu L, Ramsey-Goldman R, et al. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 1996, 97: 2063-2071.
147. **Sanz I**, Lee FE. B cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6: 326-337
148. **Saha S**, Gonzalez J, Rosenfeld G, et al. Prolactin alter mechanism of B cell tolerance induction. *Arthritis Rheum* 2009, 60: 1743-1752
149. **Heinlen LD**, McClain MT, Merrill J, et al. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum* 2007, 56: 2344-2351
150. **Hochberg MC**. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, 40:1725
151. **Arbuckle MR**, McClain MT, Rubertone MV, e al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erthematosus. *N Eng J Med* 2003, 349: 1526-1533
152. **Chan EKL**, Peebles C, Fritzler MJ, et al. Anti-spliceosomal autoantibodies. In :Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS : Systemic lupus erythematosus. Mosby 2007; 274-280
153. **Mannik M**, Merrill CE, Stamps LD, Wener MH. Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003, 30: 1495–504
154. **Matrat A**, Veysseyre-BalterC, Trolliet P, et al. Simultaneous detection of anti-C1q and anti-double stranded DNA autoantibodies in lupus nephritis: predictive value for renal flares. *Lupus* 2011, 20: 28-34
155. **Hanly JG**. The nervous system in systemic lupus erthematosus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: Systemic lupus erythematosus. Mosby 2007; 414-428

156. **Hanly JG**, Urowitz MB, Siannis F, et al. Autoantibodies and neuropsychiatric events at the time of systemic lupus erythematosus diagnosis: Results from an international inception cohort study. *Arthritis Rheum* 2008, 58: 843-853
157. **Katsumata Y**, Kawaguchi Y, Baba S, et al. Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* 2011, Epub 7 Apr, in print
158. **Buyon JP**, Clancy RM. Autoantibodies to SSA/Ro and SSB/La : potential mechanisms of tissue injury in neonatal lupus-congenital heart block. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 248-257
159. **Bertsias G**, Ioannidis JPA, Boletis J, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR standing committee for international clinical studies including therapeutics. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 195-205
160. **Mosca M**, Shoenfeld Y, Bombardieri S. Systemic lupus erythematosus: treatment. In: Bijlsma JWJ, et al.: *Eular compendium on rheumatic diseases*. BMJ 2009, 269-280
161. **Aringer M**, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open –label study. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 3161-9
162. **Aringer M**, Houssiau F, Gordon C, et al. Adverse events and efficacy of TNF- α blockade with infliximab in patients with systemic lupus erythematosus: long-term follow-up of 13 patients. *Rheumatology* 2009, 48: 1451-4
163. **Risselada AP**, Kallenberg CGM. Therapy-resistant lupus skin disease successfully treated with rituximab. *Rheumatology* 2006, 45: 915-6
164. **Harris EN**, Wilson WA, Pierangeli SS. Hematologic and coagulation abnormalities of systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 408-143
165. **Elliot JR**, Kao AH, Manzi S. The heart and systemic lupus erythematosus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 361-373
166. **Mediwake R**, du Bois RM. The lung in systemic lupus erythematosus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 374-381
167. **Mok CC**. Gastrointestinal disease in systemic lupus erythematosus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 382-392

168. **Thanou-Stavraki A**, Sawalha AH. An update on belimumab for the treatment of lupus. *Biologics* 2011, 5: 33-43
169. **Wallace DJ**, Stohl W, Furie RA, et al. A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009, 61: 1168-78
170. **Petri M**, Levy RA, Merrill JT, et al. Belimumab, a BLYS-specific inhibitor, reduced disease activity, flares, and prednisone use in patients with seropositive SLE: combined efficacy results from the phase 3 BLISS-52 and -76 studies. *Arthritis Rheum* 2010, 62 (Suppl. 10):190
171. **Furie RA**, Zamani O, Wallace DJ, et al. Belimumab, a BLYS-specific inhibitor, reduced disease activity and severe flares in seropositive SLE patients: BLISS-76 study results through Wk 76. *Arthritis Rheum* 2010, 62 (Suppl 10):606
172. **Edwards J**, Snaith M, Isenberg D. A double blind controlled trial of methylprednisolone infusions in systemic lupus erythematosus using individualised outcome assessment. *Ann Rheum Dis* 1987, 46: 773-776
173. **Al-Mani M**, Urowitz M. Systemic steroids. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007, 487-497
174. **Weening JJ**, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2004, 65: 521-530
175. **Gourley MF**, Austin HA 3rd, Scott D, et al. Methylprednisolon and cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1996, 125: 549-557
176. **Boumpas DT**, Austin HA, Vaughn EM, et al. Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet* 1992, 340: 741-5
177. **Boumpas DT**, Austin HA, Vaughan EM, et al. Risk for sustained amenorrhea in patients with systemic lupus erythematosus receiving intermittent pulse cyclophosphamide therapy. *Ann Intern Med* 1993, 119: 366-9
178. **Houssiau FA**, Vasconcelos C, D'Cruz R, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus nephritis trial, a randomised trial of low-dose versus high-dose cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 2121-2131
179. **Appel GB**, Contreras G, Dooley MA, et al. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20: 1103-1112

180. **Houssiau FA**, D’Cruz R, Sangle S, et al. Azathioprine versus mycophenolate mofetil for long-term immunosuppression in lupus nephritis : results from the MAINTAIN Nephritis trial. *Ann Rheum Dis* 2010, 69: 2083-2089
181. **Furie R**, Looney RJ, Rovin B, et al. Efficacy and safety of rituximab in subjects with active proliferative lupus nephritis (LN): results from the randomized, double-blind phase III Lunar study. *Arthritis rheum* 2009, 60 (Suppl 1): S429
182. **Bertsias GK**, Boumpas DT. Pathogenesis, diagnosis and management of neuropsychiatric SLE manifestations. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6: 358-367
183. **Lateef A**, Petri M. Biologics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2010, 22: 504-509
184. **Gordon C**, Petri M, Kalunian K, et al. Epratuzumab demonstrates clinically meaningful improvements in patients with moderate-to-severe systemic lupus erythematosus (SLE): results from emblemTM. *Lupus* 2011, 20: 348-353 (abstrakt)
185. **Kvien TK**, Uhlig T, Odegard S, et al. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1069: 212-222
186. **Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988, 31:315-324
187. **Kvien TK**, Scherer HU, Burmester G. Rheumatoid arthritis. In: Bijlsma JWJ, et al.: Eular compendium on rheumatic diseases. *BMJ* 2009, 61-80
188. **Karouzakis E**, Neidhart M, Gay RE, et al. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett* 2006, 106:8-13
189. **Zijlstra TR**, Bernelot Moens HJ, Bukhari MA. The rheumatoid arthritis articular damage score: first steps in developing a clinical index of long term damage in RA. *Ann Rheum Dis* 2002, 61:20-3
190. **McInnes IB**, Jacobs JWG, Woodburn J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis. In: Bijlsma JWJ, et al.: Eular compendium on rheumatic diseases. *BMJ* 2009, 81-91
191. **Moll JM**, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973, 3: 55
192. **Alenius GM**, Jidell E, Nordmark L, Dahlqvist SR. Disease manifestation and HLA antigens in psoriatic arthritis in Northern Sweden. *Clin Rheumatol* 2002, 21: 357-6
193. **Elkayam O**, Ophir J, Yaron M, Cusi D. Psoriatic arthritis: interrelationships between skin and joint manifestations related to onset, course and distribution. *Clin Rheumatol* 2000, 19: 301-5

194. **Partsch G**, Steiner G, Leeb BF, et al. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol* 1997, 24: 518-23
195. **Ritchlin CT**, Haas-Smith SA, Li P, et al. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003, 111: 821-31
196. **Sieper J**, Haibel H, Mielants H. Management of spondylarthritides. In: Bijlsma JWJ, et al.: *Eular compendium on rheumatic diseases*. *BMJ* 2009, 116-131
197. **Matucci-Cerinic M**, Miniati I, Denton CP. Systemic sclerosis. In: Bijlsma JWJ, et al.: *Eular compendium on rheumatic diseases*. *BMJ* 2009, 290-296
198. **Maitre A**, Hours M, Bonnetterre V, et al. Systemic sclerosis and occupational risk factors: role of solvents and cleaning products. *J Rheumatol* 2004, 31: 2395–401
199. **Leask A**, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2002, 4:136–42
200. **Postlethwaite AE**, Haris LJ, Raza SH, et al. Pharmacotherapy of systemic sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2010, 11: 789-806
201. **Shima Y**, Kuwahara Y, Murota H, et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology* 2010, 49: 2408-12
202. **Lunberg IE**, Vencovsky J, Dani L. Polymyositis, dermatomyositis, inflammatory diseases of muscle and other myopathies. In: Bijlsma JWJ, et al.: *Eular compendium on rheumatic diseases*. *BMJ* 2009, 297-313
203. **Kao AH**, Lacomis D, Lucas M, et al. Anti-signal recognition particle autoantibody in patients with and patients without idiopathic inflammatory myopathy. *Arthritis Rheum* 2004, 50: 209–215
204. **Kaji K**, Fujimoto M, Hasegawa M, et al. Identification of a novel autoantibody reactive with 155 and 140 kDa nuclear proteins in patients with dermatomyositis: an association with malignancy. *Rheumatology* 2007, 46: 25-26
205. **Zong M**, Lundberg IE. Pathogenesis, classification and treatment of inflammatory myopathies. *Nat Rev Rheumatol* 2011, 7: 297 – 306

206. **Novota P**, Kolesar L, Slavcev A, et al. Fluorescence-based automated fragment analysis of microsatellite polymorphism within the transmembrane region of the MICA-A gene. *Folia Biologica (Praha)* 2004, 50: 21-3
207. **Namjou B**, Kelly JA, Harley JB. The genetics of lupus. In: Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS: *Systemic lupus erythematosus*. Mosby 2007; 74-86
208. **Tsao BP**, Cantor RM, Grossman JM, et al. Linkage and interaction of loci on 1q23 and 16p12 may contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 2928-2936
209. **Graham RR**, Langefeld CD, Gaffney PM, et al. A genetic linkage and transmission disequilibrium of marker haplotypes at chromosome 1q41 in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 2001, 3: 299-305
210. **Quintero-del-Rio AI**, Kelly JA, Garriott CP, et al. SLEN2 (2q34-35) and SLEN1 (10q22.3) replication in systemic lupus erythematosus stratified by nephritis. *Am J Hum Genet* 2004, 75: 346-348
211. **Gray-McGuire C**, Moser KL, Gaffney PM, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: Evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am J Hum Genet* 2000, 67: 1460-1469
212. **Nath SK**, Namjou B, Garriot CP, et al. Linkage analysis of SLE susceptibility: confirmation of SLER1 at 5p15.3. *Genes Immun* 2004, 5: 209-214
213. **Gaffney PM**, Ortmann WA, Selby SA, et al. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: Results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. *Am J Hum Gene* 2000, 66: 547-556
214. **Nath SK**, Namjou B, Kilpatrick J, et al. A candidate region on 11p13 for systemic lupus erythematosus: A linkage identified in African-American families. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004, 9: 64-67
215. **Nath SK**, Kelly JA, Namjou B, et al. Evidence for susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2001, 69: 1401-1406
216. **Namjou B**, Nath SK, Kilpatrick J, et al. Genome scan stratified by the presence of anti-double-stranded DNA (dsDNA) autoantibody in pedigrees multiplex for systemic lupus erythematosus (SLE) establishes linkage at 19p13.2 (SLED1) and 18q21.1 (SLED2). *Genes Immun* 2002, 3: S35-41

217. **Graham RR**, Ortmann WA, Langefeld CD et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002, 71:543-553
218. **Tsuchiya N**, Kawasaki A, Tsao BP, et al. Analysis of the association of HLA-DRB1, TNF α promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Imm* 2001, 2: 317-22
219. **Sanchez E**, Torres B, Vilches JR, et al. No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2006, 45: 1096-1100
220. **Gambelunghe G**, Gerli R, Bartoloni Bocci E, et al. Contribution of MHC class I chain-related A (MICA) gene polymorphism to genetic susceptibility for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005, 44:287–292
221. **Steinsson K**, Jónsdóttir S, Arason GJ, et al. A study of the association of HLA DR, DQ, and complement C4 alleles with systemic lupus erythematosus in Iceland. *Ann Rheum Dis* 1998, 57: 503-505
222. **Hrycek A**, Siekiera U, Cieslik P, et al. HLA-DRB1 and -DQB1 alleles and gene polymorphisms of selected cytokines in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2005, 26: 1-6
223. **Lopez-Vazquez A**, Rodrigo L, Fuentes D, et al. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut* 2002, 50:336–340
224. **Ashiru O**, Bennett NJ, Boyle LH, et al. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 2009, 83: 12345-12354
225. **Valdimarsson H**. The genetic basis of psoriasis. *Clin Dermatol* 2007, 25: 563-567
226. **Szczerkowska Dobosz A**, Rebała K, Szczerkowska Z, et al. HLA-C locus alleles distribution in patients from northern Poland with psoriatic arthritis: preliminary report. *Int J Immunogenet* 2005, 32: 389-391
227. **Trembath RC**, Clough RL, Rosbotham JL, et al. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 813-820
228. **Gonzalez S**, Martinez-Borra J, Torre-Alonso JC, et al. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to develop psoriatic arthritis, and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 1999, 42:1010-1016

229. **Gladman DD**, Cheung C, Ng CM, et al. HLA-C locus alleles in patients with psoriatic arthritis (PsA). *Hum Immunol* 1999, 60: 259-61
230. **Ho YPCP**, Barton A, Worthington J, et al. Investigating the role of the HLA-Cw*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008, 67: 677-82
231. **Gonzalez S**, Brautbar C, Martinez-Borra J, et al. Polymorphism in MICA other than HLA-B/C genes is associated with psoriatic arthritis in the Jewish population. *Hum Immunol* 2001, 62: 632-638
232. **Grubic Z**, Peric P, Eeéuk-Jelicic E, et al. The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic arthritis in the Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2004, 31: 93-98
233. **Queiro R**, Torre JC, Gonzales S, et al. HLA antigens may influence the age of onset of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2003, 30: 505-507
234. **Matalka KZ**, Ali DA. Stress-induced versus preovulatory and pregnancy hormonal levels in modulating cytokine production following whole blood stimulation. *Neuroimmunomodulation* 2005, 12: 366-374
235. **Elenkov IJ**, Wilder RL, Bakalov VK, et al. IL-12, TNF- α , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001, 86: 4933-38
236. **Dorshkind K**, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev* 2000, 21: 292-312
237. **Fomicheva EE**, Nemirovych-Danchenko EA, Korneva EA. Immunoprotective effects of prolactin during stress-induced immune dysfunction. *Bull Exp Biol Med* 2004, 6: 544-547
238. **Moszkorzova L**, Lacinova Z, Marek J, et al. Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20: 807-8012
239. **Dostál C**, Moszkorzová L, Musilová L, et al. Serum prolactin stress values in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003, 62: 487-8
240. **Ram S**, Blumberg D, Newton P, et al. Raised serum prolactin in rheumatoid arthritis: genuine or laboratory artefact? *Rheumatology* 2004, 43: 1272-1274

241. **Gutierrez MA**, Garcia ME, Rodriguez JA, et al. Hypothalamic-pituitary – adrenal axis function in patients with active rheumatoid arthritis: a controlled study using insulin hypoglycemia stress and prolactin stimulation. *J Rheumatol* 1999, 26: 277-281
242. **Eijsbouts AM**, Van Den Hoogen FH, Laan RF, et al. Decreased prolactin response to hypoglycaemia in patients with rheumatoid arthritis: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 2005, 64: 433-467
243. **Nagy E**, Chalmers IM, Baragas FD, et al. Prolactin deficiency in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991, 18: 1662-1668
244. **Rovenský J**, Květnanský R, Radíková Z, et al. Hormone concentrations in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005, 23: 292-296.
245. **Zermeño C**, Guzman-Morales J, Macotela Y, et al. Prolactin inhibit the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* 2006, 189: R1-R8
246. **Nagafuchi H**, Suzuki N, Kaneko A, et al. Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999, 26: 1890-900
247. **Paraiba DB**, Soares CR, Bartolini P, et al. Lymphocytic prolactin does not contribute to systemic lupus erythematosus hyperprolactinemia. *Clin Exp Rheumatol* 2010, 28: 866-72
248. **Stevens A**, Ray DW, Worthington J, et al. Polymorphisms of the human prolactin gene – implications for production of lymphocyte prolactin and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001, 10:676-683
249. **Mellai M**, Giordano M, D’Alfonso S, et al. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003, 64: 274-284
250. **Montoya-Diaz E**, Cervera-Castilo H, Chávez-Sánchez L, et al. Prolactin promoter polymorphism (-1149G/T) is associated with anti-DNA antibodies in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest* 2011, Epub Apr 18
251. **Novota P**, Kolostova K, Pinterova D, et al. Association of MHC class I chain related gene-A microsatellite polymorphism with the susceptibility to T1DM and LADA in Czech adult patients. *Int J Immunogenet* 2005, 32: 273-275
252. **Cerna M**, Kolostova K, Novota P, et al. Autoimmune diabetes mellitus with adult onset and type 1 diabetes mellitus in children have different genetic predispositions. *Ann NY Acad Sci* 2007, 1110: 140-150

253. **Lee YC**, Raychaudhuri S, Cui J, et al. The PRL -1149G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2009, 60: 1250-1254

11. Prohlášení autorky

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 09.06.2011

Markéta Fojtíková

12. Identifikační záznam

FOJTÍKOVÁ, Markéta. *Imunogenetické a hormonální predispoziční markery systémových revmatických onemocnění, zejména systémového lupusu erythematosu. [Immunogenetic and hormonal markers of predisposition to systemic rheumatic diseases particularly systemic lupus erythematosus]*. Praha, 2011. 132 stran, 9 příloh. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika revmatologie. Školitel Pavelka, Karel.

: